

絮凝剂在银杏叶提取液中除杂工艺研究

陈小明^{1,2,3}, 梁静华⁴, 袁 凤¹, 吕宏再³, 何福林^{1*}

¹湖南科技学院化学与生物工程学院; ²湖南科技学院湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室;

³湖南恒伟药业股份有限公司, 永州 425100; ⁴桂林三金药业股份有限公司, 桂林 541004

摘要: 本实验以黄酮醇苷含量为评价指标, 筛选硅藻土、明胶、壳聚糖、101 果汁澄清剂、ZTC1 + 1 天然澄清剂、活性炭六种澄清剂, 分别采用单因素和正交试验法对银杏叶提取液的澄清条件进行工艺优化。结果表明: 银杏叶提取液的最佳澄清条件为明胶做澄清剂, 每 10 g 生药加 1% 明胶溶液 3 mL, 浓缩液药比为 6: 1 (mL/g)、pH 为 5.5、温度为 40 °C。明胶作为银杏叶提取液的除杂澄清剂稳定、可行。

关键词: 壳聚糖; 硅藻土; 明胶; 101 果汁澄清剂; ZTC1 + 1 天然澄清剂; 活性炭絮凝澄清剂; 银杏叶

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.9.014

Study on Impurity Removal Technology in Extraction Solution of *Folium ginkgo* by Flocculant

CHEN Xiao-ming^{1,2,3}, LIANG Jing-hua⁴, YUAN Feng¹, LV Hong-zai³, HE Fu-lin^{1*}

¹School of chemistry and engineering, Hunan University of Science and Engineering; ²Key Laboratory of

Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South, Hunan University of Science and Technology;

³Hunan Heng wei pharmaceutical Co., LTD, Yongzhou 425100, China; ⁴Guilin San jin pharmaceutical Co., LTD, Guilin 541004, China

Abstract: In this study, the content of flavonol glycosides was used as an evaluation index to screen the six kinds of clarifying agent, including diatomite, gelatin, chitosan, 101 juice clarifying agent, ZTC1 + 1 natural clarifier and activated carbon, single factor and orthogonal test were applied to optimize the clarifying condition of *Ginkgo biloba* extract. The results showed the optimal clarification condition of *G. biloba* extract were: gelatin as the clarifying agent, 3 mL per 10 g crude drugs with 1% gelatin solution, 6: 1 (mL/g) as extraction concentration, 5.5 as extraction pH, 40 °C as extraction temperature. Gelatin can be used as a clarifying agent of *G. biloba* extract and it is stable and feasible.

Key words: chitosan; diatomite; gelatin; 101 juice clarifying agent; ZTC1 + 1 natural clarifier; activated carbon; flocculation clarifying agent; *Ginkgo biloba*

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L 的干燥叶, 主含银杏黄酮醇苷、银杏内酯、银杏多糖^[1], 具有敛肺、平喘、活血化瘀和止痛的功效^[2]。传统用于肺虚咳喘等, 现代用于高血脂症、冠心病、心绞痛等疾病的治疗^[3]。现代医学研究发现其还具有对中老年心脑血管疾病、老年性痴呆症、脑功能不全、精神障碍、记忆功能衰退等症有药理功效, 同时还具有抗衰老、抗肿瘤、抗菌、消炎等疗效^[4]。银杏叶制剂在制备过程中, 经醇提减压浓缩后^[5,6]含有大量难以用普通过滤方法除去非水溶性物质, 这些成分会使药液变得混浊。此外, 非水溶性物质中

的叶绿素等杂质也会对下一步大孔吸附树脂纯化造成毒化, 因此开展药液的澄清分离研究, 以除去糖类、蛋白质、悬浮物质、鞣质等杂质^[7]具有重要意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司, 515 型泵系统, 2487 型二极管阵列检测器, Luna C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); PHS-3C 型精密 pH 计 (上海雷磁仪器厂); 电热套 98-1-B 型 (天津市泰斯特仪器有限公司); 旋转蒸发器 RE-52A (上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药材与试剂

槲皮素 (批号 100081-201408)、山柰酚 (批号 110861-201310)、异鼠李素 (批号 110860-201410),

收稿日期: 2016-05-20 接受日期: 2016-07-15

基金项目: 湖南省科技计划重点项目: 银杏功能成份提取技术成果产业化开发 (2015CK3002)

* 通讯作者 Tel: 86-746-6381164; E-mail: 97528499@qq.com

对照品均购于中国药品生物制品检定所;银杏叶(湖南永州);甲醇(色谱纯);水为超纯水;明胶溶液(使用前配成1%明胶溶液);其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮醇苷含量测定^[2]

2.1.1 银杏黄酮醇苷的含量测定方法

采用色谱条件与系统适用性试验 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以甲醇-0.4%磷酸溶液(50:50)为流动相;检测波长为360 nm,理论板数按槲皮素峰计算应不低于2500。

2.1.2 对照品溶液的制备

分别精密称取经五氧化二磷干燥过夜的槲皮素对照品、山柰素对照品、异鼠李素对照品,加甲醇制成每1 mL分别含30、30 μg和20 μg的混合溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备

精密吸取待测液6 mL加甲醇-25%盐酸溶液(4

:1)混合液25 mL,加热回流30 min,放冷,转移至50 mL量瓶中,并加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 测定法

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定,分别计算槲皮素、山柰素和异鼠李素的含量,按下式换算成总黄酮醇苷的含量,其HPLC色谱图见图1。

总黄酮醇苷含量=(槲皮素含量+山柰素含量+异鼠李素含量)×2.51^[2]

2.1.5 线性关系考察

分别精密吸取“2.1.2”项下的槲皮素、山柰素、异鼠李素标准储备液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL于5 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,各对照品溶液分别进样10 μL,记录峰面积。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程为: $y = 35200x + 9372.6$, $r = 0.9996$,总黄酮醇苷在12.16~146.54 μg/mL与峰面积呈良好的线性关系。

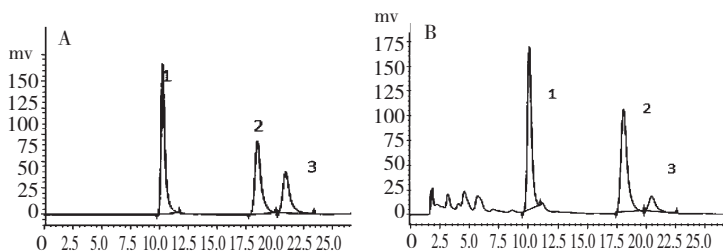


图1 对照品溶液(A)及供试品溶液(B)总黄酮醇苷HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of total flavonoid glycosides of reference solution (A) and sample solution (B)

1. 槲皮素 2. 山柰素 3. 异鼠李素

1. Quercetin 2. Kaempferide 3. Isorhammetin

2.2 银杏叶提取液的制备

称取银杏叶400 g,第一次用8倍量70%乙醇回流提取3 h,第二次用6倍量70%乙醇回流提取3 h,合并提取液,过滤,续滤液减压浓缩至无醇味,加水稀释至药液体积(mL):生药质量(g)为10:1、8:1、6:1、4:1、2:1、1:1,备用。

2.3 絮凝剂的选择

取60 mL液药比为6:1的提取液6份,分别加入1%的壳聚糖、硅藻土、101果汁澄清剂、明胶、ZTC1+1天然澄清剂、活性炭溶液5 mL,摇匀,在室温下静置24 h,观察药液澄清情况及上清液中总黄酮醇苷含量,结果为:在静置24 h后,沉淀质量分别为1.12、1.05、0.932、1.25、1.11、0.930 g;总黄酮醇苷含量分别为70.67、69.04、69.00、74.67、70.51、

70.10 μg/mL。试验结果表明,在静置24 h后,加入明胶的效果比其它五种絮凝剂强,结果见图2。

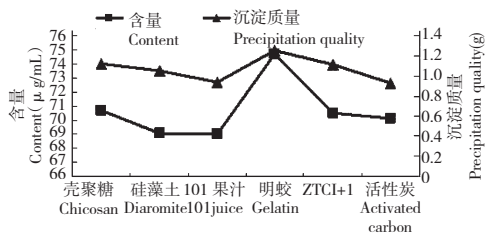


图2 絮凝剂种类与黄酮醇苷含量和沉淀质量的关系

Fig. 2 Effects of clarifying agent type on contents of flavonoid glycosides as well as the quality of precipitate

2.4 絮凝剂用量的考察

取60 mL液药比为6:1的提取液6份,分别加入1%明胶溶液0、1、2、3、4、5 mL摇匀,在室温下静

置 24 h, 观察药液澄清情况及上清液中总黄酮醇苷含量。结果: 沉淀质量分别为 0.324、0.623、0.879、0.951、0.952、0.954 g; 总黄酮醇苷含量分别为 65.3、66.7、69.3、73.4、72.8、72.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果表明提取液随 1% 明胶溶液用量增加, 上清液总黄酮醇苷含量和沉淀质量增大, 但 1% 明胶溶液用量超过 3 mL 时, 总黄酮醇苷含量反而下降, 沉淀质量增加不大, 结果见图 3。

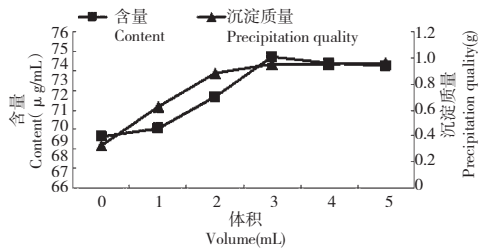


图 3 1% 明胶溶液用量与黄酮醇苷含量和沉淀质量的关系
Fig. 3 Effect of dosage of 1% gelatin solution on the content of flavonol glycosides and quality of precipitate

2.5 单因素考察

2.5.1 温度考察

取 60 mL 液药比为 6:1 的提取液 5 份, 加入 3 mL 1% 明胶溶液, 5 份放入不同温度下, 温度分别是 20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$, 摇匀, 静置 24 h, 观察药液澄清情况及上清液中总黄酮醇苷含量, 沉淀质量分别为 0.88、0.91、1.18、0.97、0.88 g; 总黄酮醇苷含量分别为 65.4、67.2、72.5、70.3、69.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果表明提取液随温度的增加, 上清液总黄酮醇苷含量和沉淀质量增大, 但温度超过 40 $^{\circ}\text{C}$ 时, 总黄酮醇苷含量与沉淀质量反而下降, 结果见图 4。

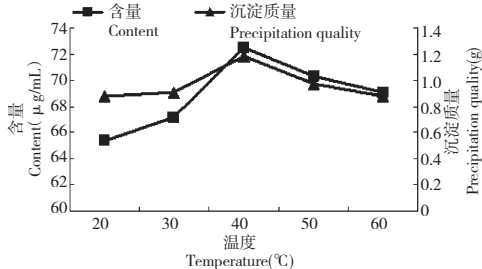


图 4 温度与黄酮醇苷含量和沉淀质量的关系
Fig. 4 Effect of temperature on the content of flavonol glycosides and quality of precipitate

2.5.2 pH 考察

取 60 mL 液药比为 6:1 的提取液 6 份, 加入 3 mL 1% 明胶溶液, 然后滴加醋酸或者氨水调节 pH,

使溶液 pH 分别为 3、4、5、6、7、8, 摇匀, 放置在室温下 24 h, 观察药液澄清情况及上清液中总黄酮醇苷含量, 沉淀质量分别为 0.34、0.67、0.97、0.89、0.82、0.80 g; 总黄酮醇苷含量分别为 50.21、51.20、75.00、71.80、69.40、69.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。表明提取液随 pH 的增加, 上清液总黄酮醇苷含量和沉淀质量增大, 但 pH 超过 5 时, 总黄酮醇苷含量与沉淀质量反而下降, 结果见图 5。

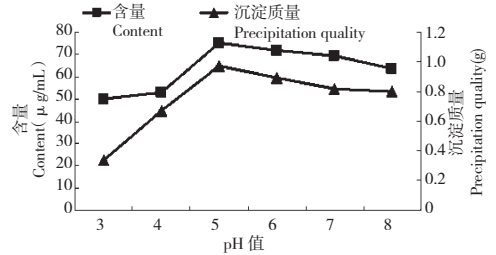


图 5 pH 与黄酮醇苷含量和沉淀质量的关系
Fig. 5 Effects of pH on the content of flavonol glycosides and quality of precipitate

2.5.3 液药比的考察

取 60 mL 不同的液药比分别为 2:1、4:1、6:1、8:1、10:1 的提取液 5 份, 分别加入 3 mL 1% 明胶溶液, 摇匀, 在室温条件下静置 24 h, 观察药液澄清情况及上清液中总黄酮醇苷含量, 结果沉淀质量分别为 0.88、0.91、1.13、0.94、0.89 g; 总黄酮醇苷含量分别为 65.20、66.70、73.20、67.30、68.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。表明提取液随液药比的增加, 上清液总黄酮醇苷含量和沉淀质量增大, 但液药比超过 6:1 时, 总黄酮醇苷含量与沉淀质量反而下降, 结果见图 6。

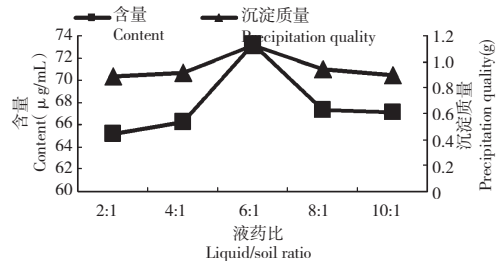


图 6 浓缩液药比与黄酮醇苷含量和沉淀质量的关系
Fig. 6 Effects of condensed liquid/soil ratio on the content of flavonol glycosides and quality precipitate

2.6 正交试验优选提取工艺

在单因素试验的基础上, 浓缩液药比 (A)、pH (B)、温度 (C) 进行 3 因素 3 水平的正交试验, 以总黄酮醇苷含量、沉淀质量为评价指标, 综合评分, 选

择 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素水平的选择、实验安排和方差分析见表 1~3。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels table

水平 Levels	A	B	C/ °C	D(空白)
1	5:1	4.5	35	
2	6:1	5.0	40	
3	7:1	5.5	45	

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal test

No.	A	B	C	D(空白)	总黄酮醇苷含量 Flavonol glycosides content ($\mu\text{g/mL}$)	沉淀质量 Precipitate quality (g)	综合评分 Overall rating
1	1	1	1	1	62.67	0.8746	95.984
2	1	2	2	2	71.24	1.2012	98.783
3	1	3	3	3	71.43	1.3128	98.919
4	2	1	2	3	72.62	1.2348	99.221
5	2	2	3	1	74.21	1.3224	99.699
6	2	3	1	2	63.17	0.8845	96.139
7	3	1	3	2	74.97	1.3405	100.000
8	3	2	1	3	67.54	0.8921	97.459
9	3	3	2	1	73.17	1.2235	99.378
K_1	293.86	295.20	289.57	295.06			
K_2	295.06	295.93	297.38	294.92			
K_3	293.60	294.43	294.64	295.59			
极差 R	4.16	1.506	7.81	0.68			

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源 Factors	SS	ν	MS	F	显著性 Significance
A	0.8201	2	0.41003	19.52	* $P < 0.05$
B	0.1048	2	0.05239	4.43	$P > 0.1$
C	19.7838	2	9.89190	187.74	* $P < 0.01$
D	0.0303	2	0.01515		

$F_{0.01(2,2)} = 99.0$; $F_{0.05(2,2)} = 19.0$; $F_{0.1(2,2)} = 9.0$

采用综合评分法对实验结果进行方差分析,即综合评分 = 权重系数(0.3) \times (100 + 最小总黄酮醇苷的含量 - 最大总黄酮醇苷的含量) + 权重系数(0.7) \times (100 - 最大沉淀的质量 + 最小沉淀的质量);极差分析表明:3种因素对总黄酮醇苷的含量和沉淀量影响程度依次为 $C > A > B$,其优化组合为 $A_2B_2C_2$ 。方差分析表明:温度对总黄酮醇苷的含量和沉淀量有非常显著影响,液药比对总黄酮醇苷的

含量和沉淀量有显著影响,pH对总黄酮醇苷的含量和沉淀量的影响不明显。结合极差和方差分析,从实际生产考虑,得出 $A_2B_3C_2$ 为该工艺的最优条件,即:液药比(A)为1:6、pH(B)为5.5、温度(C)为40 °C。

采用最优工艺参数,重复3次验证实验,结果见表4。表明所筛选的工艺条件稳定、方法可行,综合评分高。

表4 验证试验结果

Table 4 Results of verification tests

试验号 No.	1	2	3	平均值 Average
综合评分 Overall rating	99.135	99.876	99.987	99.666

3 讨论与结论

银杏叶用不同浓度乙醇提取后,提取液成分复杂,杂质多,如果不进行除杂,制备得到的银杏叶提取物及其制剂很难达到中国药典标准,因此,除杂过程非常重要。本实验所选择的絮凝剂在提取液澄清过程中,絮凝剂用量越大,提取液澄清效果越好,但随着絮凝剂用量的增加,絮凝后上清液中的有效成分总黄酮苷的含量缓慢减少,其原因可能是絮凝剂吸附完杂质后开始吸附黄酮,导致总黄酮醇苷含量减少。此外,不同季节、不同地区、不同部位的银杏,其总黄酮醇苷含量不一。实验以黄酮醇苷含量为评价指标,筛选硅藻土、明胶、壳聚糖、101果汁澄清剂、ZTC1+1天然澄清剂、活性炭六种澄清剂,并优化了明胶对银杏叶提取液的澄清工艺条件。

参考文献

- Zhang YS(张宇思), Gong ZN(龚祝南), Shi XP(石雪萍), *et al.* Study of the lipid regulation function on the ginkgo biloba leaf. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源), 2010, 29(2): 22-24.
- Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 315.
- Xu QS(许钦生), Song WH(宋卫华). Medical value of *Ginkgo biloba* leaf. *PLA Health*(解放军健康), 2010, 4: 23.
- An YR(安耀荣), Zhu XD(朱向东), Wang Y(王燕), *et al.* Research of anti-aging Tong Mai Yi Zhi capsule on activity of SOD, CAT and content of MAD in brain tissue of rats with experimental alzheimer dementia. *Tradit Chin Med Res*(中医研究), 2009, 6(22): 13-15.
- Han Z(韩学哲), An XD(安晓东), Wang XD(王东双), *et al.* Study on extracting and refining ginkgo flavonoids. *Chem Eng*(化学工程师), 2011, 4: 60-62.
- Li N(李宁), Li C(李楚). The orthogonal experimental design on total flavonoid in leaves of *Ginkgo biloba*. *J Shanxi Agric Univ, Nat Sci*(山西农业大学学报, 自科版), 2010, 30(1): 74-76.
- Xia XH(夏晓晖), Zhang Y(张宇), Xi YB(郗砚彬), *et al.* Advances in studies on chemical constituents and bioactivities of *Ginkgo biloba* L. *Chin J Exp Tradit Med Formu*(中国实验方剂学杂志), 2009, 15: 100-104.
- 41 Wang HF(王宏芳), *et al.* Protective effect of polysaccharides of *Tricholoma matsutake* on immune function of radiation damage mice. *J Xi'an Jiaotong Univ, Med Sci*(西安交通大学学报, 医学版), 2010, 31(3): 388-390.
- 42 Wang HF(王宏芳), *et al.* Protective effect of polysaccharides of *Tricholoma matsutake* on hematopoietic function of X-rays irradiated mice. *J Jilin Univ, Med Ed*(吉林大学学报, 医学版), 2008, 34: 751-754.
- 43 Wang HF(王宏芳), *et al.* Protective effects of polysaccharides of *Tricholoma matsutake* on the anti-oxide system of irradiated mice. *J Xi'an Jiaotong Univ, Med Sci*(西安交通大学学报, 医学版), 2011, 32(1): 72-74.
- 44 Turnheim K. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Exp Gerontol*, 2003, 38: 843-853.
- 45 Song CC(宋朝春), *et al.* Advances in the study of aging and anti-aging drugs. *Chin J Biochem Med*(中国生化药物杂志), 2015, 35: 163-170.
- 46 Le Bourg E. Using *Drosophila melanogaster* to study the positive effects of mild stress on aging. *Exp Gerontol*, 2011, 46: 345-348.
- 47 Liu G(刘刚), *et al.* Anti-aging effect of polysaccharide from *Tricholoma matsutake* on D-galactose-induced aging mice. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2012, 28: 1439-1442.

(上接第 1503 页)