

# 银杏叶黄酮含量对银杏叶提取物大孔树脂 纯化工艺条件的影响研究

倪力军, 颜玮韬, 张立国\*

华东理工大学化学学院, 上海 200237

**摘要:**为考察银杏叶中黄酮含量对银杏叶提取物质量、得率及黄酮提取率的影响,为银杏叶提取物的生产提供原料标准和对应的工艺参数,本文选取黄酮含量分别为 1.0%、0.8% 和 0.6% 的三批银杏叶,在保证提取物质量满足中国药典要求的前提下,探究银杏叶质量的变化对提取物大孔树脂纯化工艺条件的影响。采用统计回归方法分别建立了银杏叶提取物的黄酮含量、提取物得率及黄酮提取率与纯化乙醇浓度和体积之间的关系。研究发现银杏叶提取物中黄酮含量与乙醇浓度及洗脱液体积正相关;提取物得率与洗脱液体积负相关、与乙醇浓度的关系随银杏叶中黄酮含量而变化;低黄酮含量银杏叶的提取物质量对工艺参数最为敏感;提取物中内酯含量与银杏叶中黄酮含量呈正相关关系并与提取物中黄酮含量、洗脱液体积呈负相关关系。为保证提取物质量、工艺条件和得率的稳定,建议通过不同质量原料混合的方式使银杏叶中黄酮含量维持在 1%,采用 2 倍量 15% 乙醇进行洗脱,可获得黄酮含量大于 24%、内酯含量 6%、得率 2.6%、黄酮提取率大于 66% 的银杏叶提取物。

**关键词:**银杏叶提取物;银杏叶质量;黄酮醇苷

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.017

## Effects of Flavonoid Content in *Ginkgo biloba* Leaves on Macroporous Resin Purification Process of *Ginkgo biloba* Extract

NI Li-jun, YAN Wei-tao, ZHANG Li-guo\*

School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** This study aims to investigate the effect of flavonoids contents in *Ginkgo biloba* leaves on the quality, yield and flavonoid extraction rate of extract of *G. biloba* leaves (EGb), and provide quality standard of raw material and corresponding processing parameters for EGb production. *G. biloba* leaves with flavonoid content of 1.0%, 0.8% and 0.6% were applied to study the effects of the quality of *Ginkgo biloba* leaves on the macroporous resin purification process for ensuring the quality of EGb to meet the requirement of Chinese Pharmacopoeia. Statistic regression was used to investigate the relationship between EGb properties and the concentration and volume of ethanol for purification, respectively. These properties include flavonoid content and yield of EGb, and extraction rate of flavonoids. The results showed that the concentration of ethanol and eluent volume was positively correlated with the content of flavonoids in EGb. The yield of EGb was negatively correlated with the eluent volume and changed with the contents of flavonoids in the leaves. The quality of EGb extracted from *Ginkgo* Leaves with low flavonoid concentration was most sensitive to the processing parameters. The content of lactone in EGb had a positive relation with flavonoid content in *Ginkgo biloba* leaves. It also had a negative correlation with the flavonoid content of EGb and eluent volume. To keep the quality, processing conditions and yield of EGb stable, it was suggested to mix *G. biloba* leaves with different flavonoid concentration to make the flavonoid content in the leaves be 1.0%. By using twice amount of 15% ethanol to elute the resins, EGb containing more than 24% of flavonoids and 6% of lactone can be prepared with yield of 2.6% and over 66% flavonoid extraction rate.

**Key words:** *Ginkgo biloba* extract; *Ginkgo* leaves; flavonoid glycosides

银杏叶提取物有显著的改善心脑血管疾病和抗痴呆作用<sup>[1]</sup>,以其为原料的银杏制剂是目前全球销售量最大的天然药物品种之一。我国银杏叶制剂也

占超过 20% 国内医药市场的份额,银杏叶提取物作为银杏叶制剂的原料,截止 2013 年底,其市场份额接近 10 亿<sup>[2]</sup>。药理研究表明,银杏叶提取物中改善血液循环的有效成分主要为黄酮醇苷类物质(Flavonoids)和萜类内酯类物质(Terpene lactones)。根据 2015 版《中国药典》<sup>[3]</sup> 和美国药典 USP36<sup>[4]</sup> 中的有关规定,标准的银杏叶提取物 EGb761 中总黄酮含量不得低于 24.0% (HPLC/UV),总内酯含量不得低于 6.0% (HPLC/RI)。

迄今银杏叶提取物基本上是使用甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂或其水溶液进行提取后,进一步采用萃取或大孔树脂层析工艺进行纯化<sup>[5,6]</sup>。银杏提取物的制备工艺研究大都集中于有机溶剂的选择和配比的优化,以及探究各类辅助提取手段如微波辅助<sup>[7]</sup>、超声辅助<sup>[8]</sup>、酶辅助提取<sup>[9]</sup>,以及新技术如超临界萃取<sup>[10]</sup>、逆流色谱分离技术等<sup>[11]</sup>进行银杏叶提取。相关研究鲜有报道所用原料—银杏叶的质量,尤其是其中黄酮含量。众所周知,中药(植物药)原料的质量对其提取物质量及工艺条件有重大影响。近年来银杏叶提取物市场竞争激烈、利润空间缩小,导致其原料银杏叶种植管理和质量水平下滑,银杏叶中黄酮含量偏低,按照常规工艺条件难以生产出符合药典质量要求的银杏叶提取物。文献<sup>[12,13]</sup>等报道银杏叶中黄酮、内酯的含量受银杏叶产地、树龄、采收时间以及放置时间等因素影响,银杏叶中黄酮含量的差异最大可以达到 50% 以上<sup>[12]</sup>。

因此,研究银杏叶中黄酮含量对银杏叶提取物质量、工艺条件的影响,对于银杏叶提取物的生产和质量保障具有重要的意义。本文通过考察三批质量差异较大的银杏叶在不同纯化条件下的紫外-可见流出曲线、银杏叶提取物的质量、得率及黄酮提取率,探究纯化条件与银杏叶提取物得率及黄酮提取率间的关系,为制备符合药典质量标准的银杏叶提取物提供基础研究数据和解决方案。

## 1 材料与仪器

药材:三批银杏叶(分别记为 B1、B2 与 B3)分别由上海天宇公司提供,均采收于 2015 年 9 月。本实验室采用中国药典中规定的 HPLC 方法<sup>[3]</sup>测得 B1、B2 与 B3 银杏叶中黄酮含量分别为 0.98%、0.79% 和 0.63%。

对照品:槲皮素(批号:10081-9905,中国药品生

物制品检定所);白果内酯(批号:S1840010),银杏内酯 A(批号:Y4380010),银杏内酯 B(批号:X3110010),银杏内酯 C(批号:X3120010),皆购自上海安谱实验科技股份有限公司。

其他药品:HZ801 型大孔吸附树脂(批号:20141017,上海华震科技有限公司);聚酰胺吸附树脂(批号:20141017,上海华震科技有限公司);白凡士林(批号:20141104,国药集团化学试剂有限公司);环己烷(批号:20150717,上海凌峰化学试剂有限公司);盐酸(批号:20141124,上海凌峰化学试剂有限公司);氢氧化钠(批号:20150717,上海凌峰化学试剂有限公司);无水乙醇(批号:P1173780,上海泰坦科技股份有限公司);无水甲醇(批号:P1162099,上海泰坦科技股份有限公司);纯净水(批号:20141128,杭州娃哈哈有限公司);HPLC 级甲醇(批号:1615007147,德国默克公司)。

仪器:HWS-28 恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);DS-3510DTH 超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司);SE602F 电子秤(奥豪斯仪器(上海)有限公司);ML104/02 分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);RE-52D 旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂);TDL-5-A 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);LC-20AD XR 高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 银杏叶提取物的制备

将干银杏叶原料粉碎约 30 s。定量称取原料粉末于提取罐中,使用 70% (v/v) 乙醇溶液 75 °C 分别回流提取 4 h 和 2 h 各一次,料液比分别为 1:7 和 1:4,最后再用原料 2 倍当量水提取 1 h,合并提取液后浓缩至无醇,稍加水至 1 倍体积然后在 90 °C 下水解 45 min。向浓缩液中加水至 4 倍当量,放入 4 °C 冰箱中冷沉 12 h。冷沉液以 5000 rpm 的速度离心 10 min,沉淀弃去后取清液加入环己烷萃取三次(每次比例分别为 v/v 1:1,1:0.5 和 1:0.25),取下层水相 75 °C 下旋蒸除净环己烷。补充水至 4 倍原料当量,作为上样液施加于 HZ801 型大孔吸附树脂柱上,控制流出液速度为 1 Bv/h,上样结束后将流出液弃去。加入 4 倍当量水洗柱,保持流出速度不变,流出液弃去。使用一定浓度和体积的低度乙醇洗柱,保持流出速度不变,流出液弃去。加入 4 倍当量 70% 乙醇洗脱,流出液滴加至聚酰胺柱中,控制两柱

流出速度皆为 1.5 Bv/h (HZ801 柱流速适当加快), 收集流出液。将流出液在 70 °C 下旋蒸除去溶剂, 固体粗产品加入 0.6 倍当量无水乙醇回流溶解 30 min 后, 冷却抽滤。将滤液在 70 °C 下旋蒸至干, 即得到银杏叶提取物粉末。

## 2.2 银杏叶及银杏叶提取物中黄酮含量的测定

### 2.2.1 供试样品的制备

提取物供试样品制备取 35 mg 左右提取物样品, 精确称量至 0.0001 g, 加甲醇-25% 盐酸(4:1), v/v) 混合溶液 25.0 mL, 90 °C 水浴加热回流 50 min, 迅速冷却至室温, 转移至 50 mL 容量瓶, 甲醇稀释定容至刻度摇匀, 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液进样。

银杏叶供试样品制备取 1 g 左右银杏叶样品, 精确称量至 0.0001 g, 加入 30 mL 甲醇回流提取 4 h, 抽滤除去固体残渣, 使用少许甲醇洗涤残渣及滤纸三次, 滤液旋蒸回收甲醇至干, 加甲醇-25% 盐酸(4:1, v/v) 混合溶液 25 mL, 90 °C 水浴加热回流 50 min, 迅速冷却至室温, 转移至 50 mL 容量瓶, 甲醇稀释定容至刻度摇匀, 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液进样。

标准对照样品制备精密称取槲皮素标准品加甲醇制成 1 mL 含 20 ~ 40 μg 对照品的一系列标准溶液, 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液进样。

### 2.2.2 液相色谱条件

岛津超快速液相色谱仪(UPLC), ; 流动相 A: 0.4% 磷酸, B: 甲醇; 流动相配比为 A: B = 40: 60; 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 360 nm; 色谱柱: Athene C<sub>18</sub>-WP(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 进样量 10 μL。根据 2015 中国药典<sup>[3]</sup> 规定, 利用外标法确定样品中槲皮素, 山奈素, 异鼠李素的含量, 使用以下公式计算总黄酮醇苷含量:

$$W\% \text{总黄酮} = 2.51 \times (W\% \text{槲皮素} + W\% \text{山奈素} + W\% \text{异鼠李素}) \quad (1)$$

## 3 结果与讨论

本文在保障银杏叶提取物中黄酮含量 > 24% 的前提下, 以提取物得率与黄酮提取率为目标, 通过改变大孔树脂层析步骤中低浓度乙醇除杂的用量和乙醇浓度等工艺参数, 考察黄酮含量不同的三批银杏叶提取物在不同洗脱条件下的流出曲线以初步优化条件, 并最终提取物中黄酮含量、黄酮提取率及提取物得率随纯化工艺条件的变化, 以确定不同原料质量状况下的适宜工艺条件。

### 3.1 三批银杏叶提取液的 UV-Vis 流出曲线

分段收集三批银杏叶大孔树脂纯化步骤低浓度乙醇除杂得到的流出液, 在选取特定波长下, 扣除空白同浓度乙醇溶液的背景吸收后测定每段提取液的吸收度, 从而得到相应吸收波长下的流出曲线。

原花青素类物质分子结构与黄酮类物质相似, 是银杏提取物中含量仅次于黄酮及内酯类物质的活性成分, 有一定的自由基清除活性和抗氧化活性<sup>[14,15]</sup> 和抗老年痴呆功效<sup>[16]</sup>, 其在银杏叶提取物中的含量约 7%<sup>[17]</sup>。由于原花青素类物质含量对银杏叶提取物中黄酮和内酯含量有显著影响, 本文选取其代表物质儿茶素物质的特征吸收波长 280 nm, 监测大孔树脂吸附纯化过程对原花青素类物质的分离效果。

216 nm 为银杏中萜类内酯类物质的特征吸收峰<sup>[18]</sup>, 该类物质具有抗血小板活化因子(PAF) 活性及心脑血管保护作用<sup>[19]</sup>, 是银杏提取物中的关键药效成分, 本文通过监测该波长下的大孔树脂吸附过程的流出液吸收度以尽量减少内酯类成分的损失。

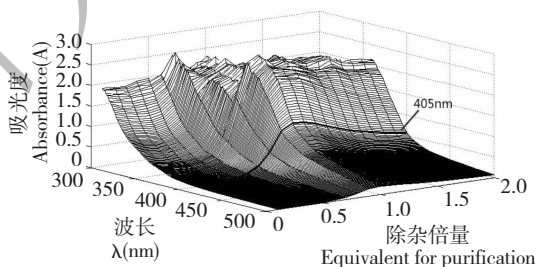


图1 波长-除杂倍量-吸收度 3D 谱图

Fig. 1 3D plot of length-purification equivalent-absorbance

分析波长范围为 300 ~ 500 nm 的区域做波长-洗脱体积-吸收度的 3D 图谱(图 1), 可以发现在 405 nm 处流出曲线变化趋势较为明显, 受其他吸收峰干扰较小, 可用于检测有色杂质的洗脱情况。由于极性和分子量更大, 15% 醇洗时有色杂质如双黄酮类物质会先于有效成分黄酮醇苷类物质被洗脱下来, 且由于接近可见光区, 受其他物质吸收干扰小, 可以保证结果的准确性。

#### 3.1.1 B1 批次的银杏叶提取物大孔树脂醇洗流出曲线

由图 2 的 280 nm 下流出曲线可以看出 20% 与 15% 乙醇对原花青素的洗脱能力基本相同、优于 10% 乙醇; 216 nm 波长下流出曲线表明, 20%、10% 及 15% 乙醇对内酯的洗脱能力依次降低, 15% 乙醇

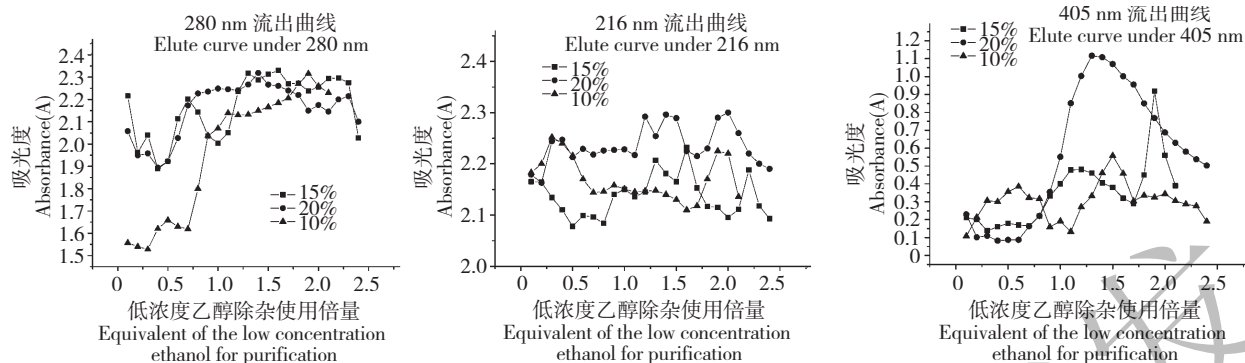


图2 B1 银杏叶提取物大孔树脂吸附流出曲线

Fig. 2 Macroporous resin adsorption outflow curve of B1 Ginkgo leaves

对杂质的区分能力更强,内酯损失较小,10%乙醇则在各方面表现不甚理想;由405 nm下流出曲线可知,20%乙醇较15%乙醇对有色物质的脱除能力更强,而15%乙醇洗脱时的流出曲线有更明显的杂质峰,说明15%乙醇对不同黄酮类物质有更好的区分能力,10%乙醇的区分能力和脱除能力都不明显;综合考量洗脱能力与杂质区分能力,之后的实验中剔

除了对10%乙醇的洗脱效果考察。从洗脱倍量来看,无论是采用10%、15%还是20%乙醇洗脱,在2倍量至2.5倍量的洗脱体积后杂质的吸收曲线呈明显的下降趋势。

### 3.1.2 B2 批次的银杏叶提取液大孔树脂醇洗流出曲线

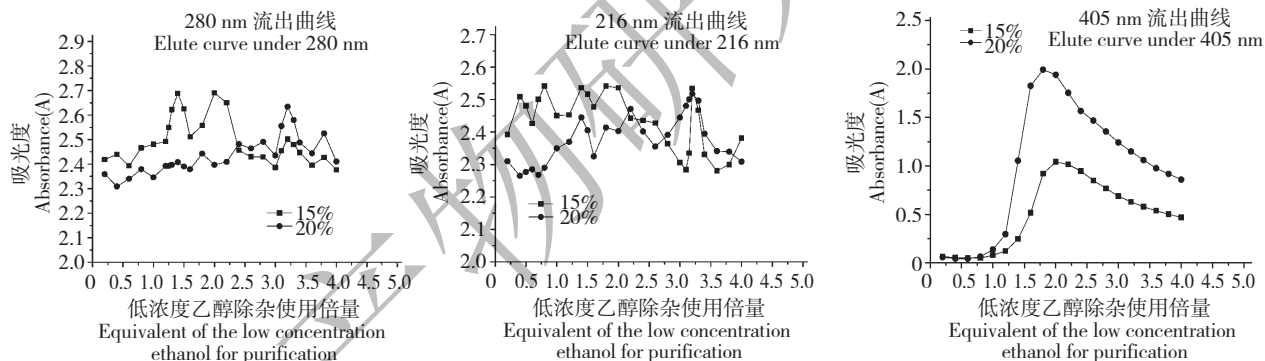


图3 B2 银杏叶提取物大孔树脂吸附流出曲线

Fig. 3 Macroporous resin adsorption outflow curve of B2 Ginkgo leaves

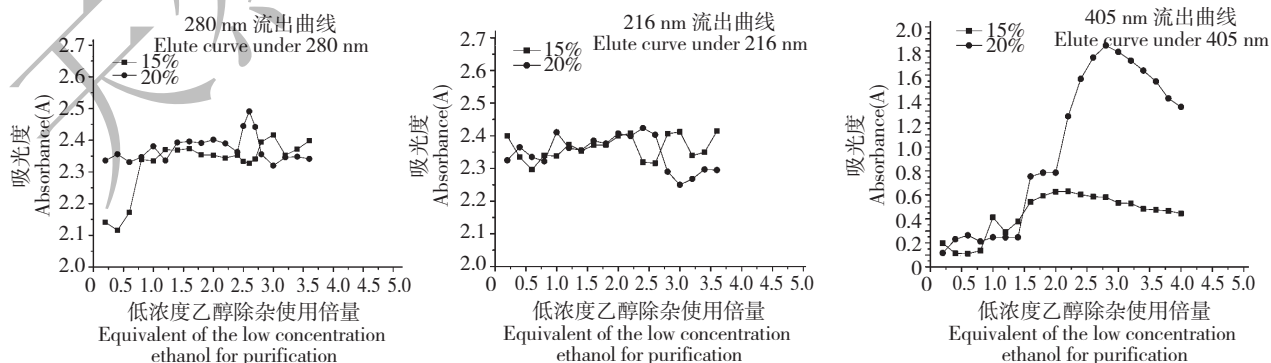


图4 B3 银杏叶提取物大孔树脂吸附流出曲线

Fig. 4 Macroporous resin adsorption outflow curve of B3 Ginkgo leaves

从图3的280 nm与216 nm下的流出曲线可明显看出,相对15%乙醇,20%乙醇流出曲线的吸光度明显更低,其对原花青素及内酯类物质都有更好的保护作用,而对于双黄酮类的杂质物质(405 nm)的洗脱能力更强。因此对于黄酮含量为0.8%的银杏叶,使用20%乙醇明显优于15%乙醇。对比图3与图2可以发现,图3中黄酮含量为0.8%的银杏叶提取液大孔树脂吸附流出曲线的吸光度相对更高,尤其是405 nm下流出曲线的最大吸收度比黄酮含量为1.0%的B1批次银杏叶提取液高出将近一倍,除杂所需的洗脱体积也要多出1倍量。

### 3.1.3 B3批次的银杏叶提取液大孔树脂醇洗流出曲线

由图4可以看出,280 nm下20%乙醇流出曲线

有一个更明显的杂质峰;20%与15%乙醇对内酯的脱除能力相近,但是考虑到3倍量后20%乙醇对内酯的洗脱呈明显的下降趋势而15%乙醇呈上升趋势,如果考虑其他条件后实际需要的洗脱倍量较大,应选取20%的洗脱条件;15%乙醇对黄酮含量很低的B3银杏叶粗提液中的有色杂质的洗脱能力明显不及20%乙醇。故对于黄酮含量为0.6%的应选取20%乙醇进行洗脱。

### 3.2 银杏叶提取物质量、得率及黄酮提取率与纯化条件间的关系考察

使用2.2中方法及2015版中国药典<sup>[3]</sup>中规定的方法测定各批次银杏叶在不同纯化条件下所制备的提取物中黄酮和内酯含量,计算提取物得率及黄酮提取率,结果见表1~3。

表1 不同纯化条件下B1批次(黄酮含量1.0%)银杏叶提取物质量、得率及黄酮提取率

Table 1 Quality and extraction rate of the extract products from B1 Ginkgo leaves under different extraction conditions

低度醇洗液浓度 Concentration of purification ethanol (% ,v/v)	低度醇洗液体积 Equivalent of the purification ethanol (n)	银杏叶提取物总黄酮含量 Total flavonoid content (%)	内酯含量** Lactone content (%)	提取物得率 Extract yield rate (%)	黄酮提取率 Flavonoid extraction rate (%)
5	4	19.1	-	3.8	72.6
	6	19.9	-	2.2	43.8
10	2	20.4	-	2.9	59.2
	2*	25.7	13.1	2.6	66.8
15*	2.5	25.6	12.5	2.6	66.6
	3	26.7	10.4	2.5	66.7
	2	27.7	12.5	2.4	66.5
	3	36.0	9.4	2.0	72.0

注:\* 最优的醇洗条件;\*\* 由于黄酮含量没有达到24%的标准,未测试内酯含量。

Note: \* Optimal purification condition; \*\* Lactone content unmeasured due to flavonoid content less than 24%.

表2 不同纯化条件下B2批次(黄酮含量0.8%)银杏叶提取物质量、得率及黄酮提取率

Table 2 Quality and extraction rate of the extract products from B2 Ginkgo leaves under different extraction conditions

低度醇洗液浓度 Concentration of purification ethanol (% ,v/v)	低度醇洗液体积 Equivalent of the purification ethanol (n)	银杏叶提取物总黄酮含量 Total flavonoid content (%)	内酯含量** Lactone content (%)	提取物得率 Extract yield rate (%)	黄酮提取率 Flavonoid extraction rate (%)
15	2	19.7	-	1.3	32.4
	2.5	21.5	-	1.3	35.4
	3	22.9	-	1.2	34.8
	4	23.0	-	1.2	34.9
20*	2	23.2	-	2.0	58.7
	2.5*	25.0	10.0	1.6	50.6
	3	30.0	8.5	1.4	53.2
	4	26.5	7.5	1.2	40.3

注:\* 最优的醇洗条件;\*\* 由于黄酮含量没有达到24%的标准,未测试内酯含量。

Note: \* Optimal purification condition; \*\* Lactone content unmeasured due to flavonoid content less than 24%.

表3 不同纯化条件下 B3 批次(黄酮含量 0.6%)银杏叶提取物质量、得率及黄酮提取率

Table 3 Quality and extraction rate of the extract products from B3 Ginkgo leaves under different extraction conditions

低度醇洗液浓度 Concentration of purification ethanol (% ,v/v)	低度醇洗液体积 Equivalent of the purification ethanol (n)	银杏叶提取物 总黄酮含量 Total flavonoid content (%)	内酯含量* * Lactone content (%)	提取物得率 Extract yield rate (%)	黄酮提取率 Flavonoid extraction rate (%)
15	1.5	18.5	-	1.6	46.9
	2	20.6	-	1.6	52.3
	2.5	21.5	-	1.5	51.1
	3	22.8	-	1.4	50.7
	4	23.0	-	1.3	47.5
20*	2*	24.2	7.5	1.2	46.1
	2.5	25.9	7.3	1.1	45.2
	3	31.9	6.3	1.0	52.2
	4	31.8	6.1	0.9	45.4

注: \* 最优的醇洗条件; \*\* 由于黄酮含量没有达到 24% 的标准, 未测试内酯含量。

Note: \* Optimal purification condition; \*\* Lactone content unmeasured due to flavonoid content less than 24%.

由表 1 可知,即使是黄酮含量最高(1.0%)的银杏叶,使用 5%~10% 乙醇洗脱时,提取物中黄酮含量仍不能达到 24% 的要求,使用 15% 以上乙醇洗脱时,则可得到黄酮含量合格的提取物,综合考虑提取物得率、黄酮与内酯含量及黄酮提取率及成本等因素,15% 乙醇 2 倍量洗脱条件最优。这与上节根据流出曲线获得的结论一致。

表 2~3 结果表明,对于黄酮含量较低(0.6~0.8%)的银杏叶,必须使用 20% 浓度乙醇进行洗脱才能得到合格的银杏叶提取物。三个表中各提取物中内酯含量与银杏叶中黄酮含量呈正相关关系并与提取物中黄酮含量、洗脱液体积 V 呈负相关关系。对于中黄酮含量大于 24% 的银杏叶提取物,得率及黄酮提取率随原料银杏叶中黄酮含量的增大而提高。各批次银杏叶提取物中黄酮含量随着醇洗浓度及洗脱倍量的增大而升高,而中低含量银杏叶中的黄酮提取率在洗脱液体积从 3 倍加到 4 倍时,会出现显著下降。因此,从乙醇用量、溶剂回收成本、提取物中内酯含量及黄酮提取率等角度综合考量,应在满足银杏叶提取物质量标准前提下,尽量选择较小的洗脱倍量。

由表 1~3 数据采用 SPSS 18.0 软件使用多元线性回归的方法分别拟合出各批次银杏叶提取物中黄酮含量  $FC_i$ 、提取物得率  $Y_i$  及黄酮提取率  $FE_i$  与洗脱浓度 C、洗脱液体积(倍量) V 之间的回归方程如下(其中下标  $i=1,2,3$  分别代表 B1、B2、B3 批次银杏叶):

$$FC_1 = 1.091C + 1.682V + 5.669 \quad (R = 0.937, P < 0.01) \quad (2a)$$

$$FC_2 = 0.88C + 1.674V + 3.761 \quad (R = 0.848, P < 0.05) \quad (2b)$$

$$FC_3 = 1.291C + 2.605V - 4.853 \quad (R = 0.937, P < 0.01) \quad (2c)$$

$$Y_1 = -0.102C - 0.311V + 4.921 \quad (R = 0.811, P = 0.068) \quad (3a)$$

$$Y_2 = 0.060C - 0.217V + 0.974 \quad (R = 0.846, P < 0.05) \quad (3b)$$

$$Y_3 = -0.078C - 0.138V + 3.016 \quad (R = 0.995, P < 0.01) \quad (3c)$$

$$FE_1\% = 0.058C^2 - 4.858V^2 - 0.500CV + 36.976V + 10.472 \quad (R = 0.885, P < 0.05) \quad (4a)$$

$$FE_2\% = 0.246C^2 - 1.559V^2 - 1.859CV + 38.266V - 37.068 \quad (R = 0.983, P < 0.05) \quad (4b)$$

$$FE_3\% = -0.053C^2 - 3.126V^2 + 0.431CV + 10.506V + 40.897 \quad (R = 0.789, P = 0.3) \quad (4c)$$

上述回归方程中除(4c)不能通过统计检验不予讨论外,分析其余方程可以看出对于黄酮含量为 0.6%、0.8%、1.0% 的三个批次银杏叶,其提取物中黄酮含量 FC 与洗脱液体积 V 及乙醇浓度 C 均呈正相关关系;黄酮提取率 FE 与洗脱液体积 V、乙醇浓度的平方  $C^2$  正相关,而与洗脱液体积的平方( $V^2$ )及乙醇浓度和洗脱液体积的乘积(CV)负相关;提取物得率的情况比较复杂:高黄酮含量(1.0%)与低黄酮含量银杏叶(0.6%)的提取物得率 Y 均与乙醇

度 C 负相关,但中等黄酮含量(0.8%)银杏叶的提取得率与乙醇浓度 C 正相关,三批银杏叶提取物得率均与洗脱液体积 V 负相关。

比较(2a)、(2b)与(2c)可看出,乙醇浓度 C 与洗脱液体积 V 对提取物黄酮含量的影响按照 B3 > B1 > B2 依次降低,因而低含量银杏叶提取时,为使提取物中黄酮含量满足 >24% 的要求,势必要增大乙醇浓度和洗脱液体积;比较(3a)、(3b)与(3c)可知,乙醇浓度 C 与洗脱液体积 V 对黄酮含量高(1.0%)的银杏叶提取物得率的影响要大于中低含量银杏叶。

上述回归方程给出的规律与表 1~表 3 的实验结果基本相符。提示在大孔树脂纯化过程中应尽量减少洗脱液量以提高产品得率,但要提高提取物中黄酮含量则应提高乙醇浓度与洗脱液体积。提取物得率与提取物中黄酮含量是一对矛盾的目标,实际生产过程可设定  $FC_i = 24\%$ ,  $Y_i = 1.0 \sim 2.6\%$ , 根据方程(2a)与(3a)(或者(2b)与(3b);(2c)与(3b))及约束条件  $V \geq 2$ ,  $C \geq 15$  确定适宜的乙醇浓度 C 与洗脱液体积 V。

## 4 结论

银杏叶中黄酮含量水平对于银杏叶提取物的质量、得率及黄酮提取率均有很大影响。相同工艺条件下,不同质量银杏叶制得的提取物中黄酮含量差别可达 10%~20%,提示应针对不同质量的银杏叶设计不同的纯化工艺条件。

对于中低黄酮含量(0.6~0.8%)的银杏叶,宜采用 2~2.5 倍 20% 乙醇洗脱,可保障提取物中黄酮含量大于 24% 的前提下,获得较高的得率(1.2~1.6%)及黄酮提取率(46.1~50.6%);对于高黄酮含量(1.0%)的银杏叶,宜采用 2 倍 15% 乙醇洗脱,可使提取物中黄酮含量达到 25.7%、获得 66.8% 的黄酮提取率及 2.6% 的得率。

三批不同黄酮含量银杏叶的提取物黄酮含量均与乙醇浓度和洗脱液体积成正比,其中低黄酮含量银杏叶的提取物中黄酮含量对乙醇浓度及洗脱液体积的变化最敏感,高含量银杏叶次之。根据本文结果调整银杏叶提取液大孔树脂纯化工艺参数,可更好利用不同质量的银杏叶资源,对实际生产过程产品质量的控制具有指导意义。为保证银杏叶提取物质量、工艺条件的稳定,降低生产成本,建议通过混合不同质量状况的银杏叶使原料中黄酮含量稳定在

1.0%,采用 2 倍量 15% 乙醇洗脱,以获得质量合格、得率和黄酮提取率高的银杏叶提取物。

## 参考文献

- 1 Laws KR, Sweetnam H, Kondel TK. Is *Ginkgo biloba* a cognitive enhancer in healthy individuals? A meta-analysis. *Hum Psychopharm Clin*, 2012, 27: 527-533.
- 2 Zhiyan Consulting Group (智研咨询集团). Report on market and investment opportunities of China *Ginkgo biloba* extract industry during year 2015-2020. <http://www.chyxx.com/research/201507/329542.html#catalogue>, 2015, 7.
- 3 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, 316-416.
- 4 United States Pharmacopoeia, USP36-NF31. Rockville, MD: The United States Pharmacopoeia Convention, 2013. 1476.
- 5 Zhou XH(周小华), Zeng H(曾晖), Li DH(李端华). Purification of total flavones of *Ginkgo biloba* L. leaves by HZ-841 adsorption resin. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2005, 17: 76-79.
- 6 Liu XG, Wu SQ, Li P, et al. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoid in *Ginkgo biloba*. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 113: 212-225.
- 7 Chen XP, Zhang YD. Rapid microwave-assisted hydrolysis for determination of Ginkgo flavonol glycosides in extracts of *Ginkgo biloba* leaves. *J Chromatogr Sci*, 2008, 46: 117-121.
- 8 Yang RH(杨荣华), Ren JD(任京东), Qu YX(屈云霞). Study on extracting flavonoids from the leaves of *Ginkgo biloba* by ultrasonic. *China Med Herald*(中国医药导报), 2010, 7(20): 25-27.
- 9 Wu ML(吴梅林), Zhou CS(周春山), Chen LS(陈龙胜). Study on the extraction of total flavonoids from Ginkgo leaves by enzyme hydrolysis. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2004, 16: 557-560.
- 10 Miao SF, Yu JP, Du Z, et al. Supercritical fluid extraction and micronization of ginkgo flavonoids from *Ginkgo biloba* Leaves. *Ind Eng Chem Res*, 2010, 49: 5461-5466.
- 11 Zhang Q, Chen LJ, Ye HY, et al. Isolation and purification of ginkgo flavonol glycosides from *Ginkgo biloba* leaves by high-speed counter-current chromatography. *J Sep Sci*, 2007, 30: 2153-2159.
- 12 Li YJ(李艳杰). Study on biological characteristics and pharmacological constituents of *Ginkgo biloba* leaves in Changchun and Nanjing. Changchun: Northeast Normal University (东北师范大学), MSc. 2008.