

## 钙离子去除银杏叶初提物中银杏酚酸的研究

刘丽娟, 田 静, 王向阳, 张 允, 李锁杰\*

西安天一生物技术股份有限公司, 西安 710000

**摘要:** 本文以银杏酚酸脱除率为指标, 考虑到杂质去除、内酯保护等因素, 采用了一种新方法, 即碳酸钙/冰醋酸-石灰法去处理银杏叶初提物。结果表明: 将 50 g 银杏叶提取液浓缩至 100 mL, 加入 5 g 碳酸钙, 0.8 mL 冰醋酸, 银杏酚酸的脱除率可达 97.96%。

**关键词:** 银杏叶; 酚酸; 碳酸钙; 冰醋酸

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.030

## Removal of Ginkgolic Acids from Ginkgo Biloba Leaf Extract by Calcium Ion

LIU Li-juan, TIAN Jing, WANG Xiang-yang, ZHANG Yun, LI Suo-jie\*

ACETAR Biotechnology Incorporation, Shanxi Xi'an 710000, China

**Abstract:** In this paper, a new method was used to treat the extract of Ginkgo biloba leaves. Taking the removal rate of Ginkgolic acids as the index and taking into account the factors such as impurity removal and lactone protection, the calcium carbonate/acetic acid-lime method was used. The results showed that: 50 g Ginkgo biloba extract was concentrated to 100 mL, adding 5 g calcium carbonate and 0.8 mL glacial acetic acid, the removal rate of Ginkgo acids was 97.96%.

**Key words:** Ginkgo biloba leaf; phenolic acids; Calcium carbonate; acetic acid

银杏叶提取物 (extracts of ginkgo biloba, EGb) 中主要含黄酮、内酯两大活性成分, 具多种药理作用, 已成为国内外治疗心脑血管疾病的热门天然药物, 其产品广泛应用于医疗、保健品领域, 并在食品、化妆品等领域有很大的应用潜能<sup>[1,4]</sup>。但银杏叶提取物中含有的银杏酚酸却会引起皮肤、粘膜等处的过敏性炎症反应, 是自然界中最强烈的接触性过敏原中的成分之一, 可引起严重的过敏反应, 还会引起基因突变、神经损伤等<sup>[5]</sup>。因此银杏酚酸的限量是银杏叶提取物产品质量的关键指标之一。目前国内生产的 EGb 中黄酮和内酯这两个有效成分的含量一般都能达到国际标准, 但在银杏酚酸含量的控制上却不尽如人意, 产品在国际市场上缺乏竞争力, 因此寻找一条高效去除银杏酚酸的方法意义重大。

银杏酚酸属于漆酚酸类物质, 主要由银杏酸、白果酚和白果二酚组成 (结构式如图 1)<sup>[6]</sup>。其中银杏酸可看作是水杨酸分子在苯环 C<sub>6</sub> 位上有较长侧链的系列化合物, 其侧链的 C 原子数、双键数、双键位置有所不同。

目前, 国内外去除 EGb 中银杏酚酸的方法主要有柱层析法和有机溶剂法<sup>[7,8]</sup>。虽然这两种方法都可以制得低酚酸的 EGb, 但是又各有缺点。柱层析法要用到专用的大孔树脂, 其价格昂贵, 预处理复杂, 使用寿命有限, 并且生产周期长<sup>[9]</sup>。有机溶剂法存在洗涤剂用量大、洗涤次数多、溶剂残留等问题<sup>[10]</sup>。本文从整个银杏叶提取的全过程考虑, 采用一种全新的碳酸钙/冰醋酸-石灰法处理银杏叶初提物, 既能絮凝杂质, 又能有效除去酚酸, 而且不会对内酯造成破坏, 是一个简单、经济的去除银杏叶初提物中银杏酚酸的方法。

## 1 实验部分

## 1.1 试剂与仪器

银杏叶, 产自陕西省汉中市。乙醇、碳酸钙、冰醋酸、生石灰均为化学纯。黄酮对照品为槲皮素, 内酯对照品为内酯提取物, 酚酸对照品为白果新酸, 对照品均来自中检所。YP20002 型电子天平; XMTD-4000 型恒温水浴锅; RE-52A 型旋转蒸发仪; 101 型电热鼓风干燥箱; 日本岛津 SPD-20A 型高效液相色谱仪。

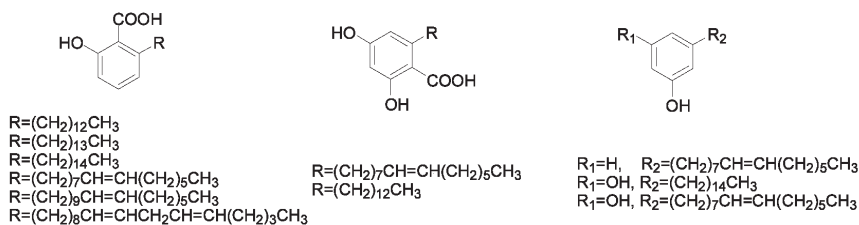


图1 银杏酚酸类化合物结构式

Fig. 1 The structure of Ginkgolic acids

## 1.2 分析方法

总银杏酸、萜类内酯、总黄酮醇苷均采用高效液相色谱法(通则 0512)测定(《中华人民共和国药典》2015年版一部银杏叶提取物)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 几种常见的去除银杏酚酸的方法

常见的去除 EGb 中银杏酚酸的方法主要有有机溶剂法和柱层析法。侯峰<sup>[11]</sup>等人还采用了超临界 CO<sub>2</sub> 的方法去脱除银杏叶提取物中的酚酸。此方法虽然也可有效除去酚酸,但在技术和设备方面要求很高,一般的生产条件很难达到,不适用于大规模生产,没有多大的实际应用价值。

### 1.3.2 金属离子配位法去除银杏酚酸

从银杏酚酸类化合物的分子结构中我们可以看出,此类化合物中具有酚羟基和羧基,且处于邻位,这是一个很好的金属离子配位点。当向银杏叶提取物中加入适当的金属离子时,该金属离子会与银杏酚酸配位,从而形成具有不同性能的配合物。然后再将此配合物从提取物中分离出来,从而达到去除酚酸的目的。目前关于金属离子配位法脱除银杏酚酸的报道寥寥无几。已见报道的去除银杏酚酸的金属离子有 Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup><sup>[6,12]</sup>,邵江娟<sup>[13]</sup>等人做了银杏酚酸与铋(Ⅲ)的配位,但仅仅只做了光谱学研究,并没有探究配位后对银杏酚酸含量的影响。而用 Ca<sup>2+</sup> 脱除银杏酚酸的研究未见报道。我们知道,钙是构成骨骼的重要物质,也是机体各项生理活动不可缺少的离子,如作为凝血因子参与凝血过程,参与肌肉收缩以及神经递质合成与释放、激素合成与分泌,维持和调节体内多种生化过程。由此可见, Ca<sup>2+</sup> 与酚酸配位后即使有游离的钙离子残留,也不会对人体造成伤害。

### 1.3.3 钙离子配位法去除银杏酚酸

在银杏叶提取物中加入适当量石灰乳可达到去除酚酸的目的,同时也会絮凝杂质,从而为后续进一

步处理省去了很多麻烦。但是石灰的加入会导致整个溶液体系处于强碱性环境中,而银杏内酯在碱性条件下不稳定,易开环,所以采用此方法制得的银杏叶提取物中往往内酯的含量很低。综合考虑上述情况,我们在整个处理过程中注意对 pH 的控制,又从整个银杏叶提取的全过程考虑,提出了一条碳酸钙/冰醋酸-石灰法。即先向银杏叶初提物中加入碳酸钙和冰醋酸,提供足量的钙离子与酚酸进行配位,然后再向混合体系中加入一定量的石灰水,水浴保温一定时间,以达到絮凝杂质的效果。此方法具有以下优点:(1)有效除去酚酸;(2)不破坏内酯;(3)絮凝杂质,既能避免水沉造成内酯的损失,又能确保后续上柱吸附黄酮时上样液的澄清度,以免造成柱子堵塞和影响吸附效果;(4)添加剂用量少,价格便宜,具有实际应用价值。

### 1.3.4 钙离子去除银杏酚酸的实验方法

准确称取粉碎的银杏叶 500 g 分别置于两个 3000 mL 的锥形瓶中,加入 50% 乙醇提取三次,溶剂倍量分别为 7 倍,6 倍,5 倍,提取时间分别为 2 h,2 h,1.5 h。将三次所得提取液合并,减压浓缩至 1000 mL。将这 1000 mL 浓缩液分为 10 份,每份 100 mL。然后边搅拌边向此 100 mL 浓缩液中加入一定量的碳酸钙,并用冰醋酸调至酸性,将混合体系在微热条件下继续搅拌 0.5 h。最后再加入一定量的石灰乳将混合体系 pH 调至中性,88 °C 水浴保温 1 h,可观察到明显的絮凝现象。将此混合液抽滤得澄清滤液,减压浓缩,烘干得红棕色粉末,待检。

实验中碳酸钙的作用,一是可以作为助滤剂,二是提供钙离子去与酚酸配位。冰醋酸实际上起到一个催化的作用,它先与碳酸钙反应,生成可溶性的醋酸钙,这样溶液体系中就有了游离的钙离子,这些游离的钙离子再去参与配位。在实验设计方面,应注意整个溶液体系 pH 的控制,在第一步配位时体系 pH 既不能太低,也不能太高,太低则配位效果不好,

太高则体系中游离的钙离子浓度有限,不能为配位提供充足的钙离子。综上所述,我们向提取液中加入充足的碳酸钙和不同量的冰醋酸,去探究钙离子去除酚酸的效果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 实验结果

将上述所得的 10 份浓缩液取出一份作为空白对照,剩下的 9 份分为三组,每组分别加入 5 g 碳酸钙和不同量的冰醋酸,然后分别测试其黄酮、内酯、酚酸含量,结果分别见表 1、表 2、表 3。

表 1 向银杏叶初提取物中加入 1 mL 冰醋酸处理后的检测结果

Table 1 The results of the treatment with 1 mL acetic acid were added to the extract of Ginkgo biloba

平行试验 Parallel experiments	检测项目 Detection items		
	酚酸 Phenolic acids (mg. kg <sup>-1</sup> )	内酯 Lactone (%)	黄酮 Flavonoids (%)
1	288.72	0.87	1.56
2	290.31	0.86	1.51
3	289.95	0.88	1.52
平均值 Average value	289.66	0.87	1.53
空白对照实验 Control experiments	12159.81	0.88	1.60
酚酸脱除率 Removal of phenolic acid rates (%)	97.62	-	-

表 2 向银杏叶初提取物中加入 0.8 mL 冰醋酸处理后的检测结果

Table 2 The results of the treatment with 0.8 mL acetic acid were added to the extract of Ginkgo biloba

平行试验 Parallel experiments	检测项目 Detection items		
	酚酸 Phenolic acids (mg. kg <sup>-1</sup> )	内酯 Lactone (%)	黄酮 Flavonoids (%)
1	249.54	0.87	1.47
2	246.65	0.88	1.49
3	246.37	0.92	1.51
平均值 Average value	247.52	0.89	1.49
空白对照实验 Control experiments	12159.81	0.88	1.60
酚酸脱除率 Removal of phenolic acid rates (%)	97.96	-	-

表 3 向银杏叶初提取物中加入 0.6 mL 冰醋酸处理后的检测结果

Table 3 The results of the treatment with 0.6 mL acetic acid were added to the extract of Ginkgo biloba

平行试验 Parallel experiments	检测项目 Detection items		
	酚酸 Phenolic acids (mg. kg <sup>-1</sup> )	内酯 Lactone (%)	黄酮 Flavonoids (%)
1	285.26	0.85	1.54
2	284.71	0.86	1.56
3	286.35	0.90	1.52
平均值 Average value	285.44	0.87	1.54
空白对照实验 Control experiments	12159.81	0.88	1.60
酚酸脱除率 Removal of phenolic acid rates (%)	97.65	-	-

## 2.2 结果分析与讨论

由表 1、2、3 可知,采用碳酸钙/冰醋酸-石灰法处理银杏叶初提物可使其中的银杏酚酸含量大大降低,酚酸脱除率最高可达 97.96%。根据相关文献<sup>[12,14]</sup>,我们猜测可能是钙离子与银杏酚酸的羟基与羧基配位,形成了一个二配位的配合物(图 2)。该配合物的极性小于酚酸,因此在极性溶剂中的溶解度也就减小。而本实验是在水体系(含极少量乙醇)中进行的,因此反应生成的配合物是以固体状态存在的,可通过过滤直接除去。溶液中可能会有一部分酚酸配合物残留,但是有文献报道<sup>[15]</sup>,只有银杏酚酸的羧基与长脂肪链同时存在时,才能与膜蛋白 1(E1)结合,抑制蛋白的修饰(SUMO 化)。而此配合物中,羧基已参与配位,也就是说,配位后的酚酸无法与蛋白相互作用,其毒副作用将会大大降低。

由表我们也可以看出,加入不同量的冰醋酸,酚酸的脱除率略有不同。加入 0.8 mL 冰醋酸,酚酸的脱除率最大,0.6 mL 次之,1 mL 最小。这可能是由于加入 1 mL 冰醋酸时,溶液体系的酸性增强,不利于银杏酚酸的电离,进而影响了配位效果。当加入 0.6 mL 冰醋酸时,溶液体系的酸性不够,提供的参与配位的钙离子浓度有限,也会影响配位。由表我们还可以看出,用此方法处理过的银杏叶提取物中内酯的含量并没有太大变化,也就是说没有损耗。黄酮有一部分损耗,但损耗不大。

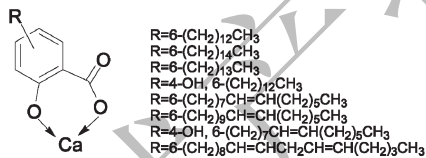


图 2 银杏酚酸-Ca(II)配合物可能的结构式

Fig. 2 The structure of coordination compounds between Ginkgolide acids and Ca(II)

## 3 结论

银杏酚酸的限量是银杏叶提取物产品质量的关键指标之一。目前,去除银杏叶中银杏酚酸所采用的柱层析法和有机溶剂法存在工序繁多、成产成本高等缺点。本文从整个银杏叶提取的全过程考虑,采用了一种全新的碳酸钙/冰醋酸-石灰法去处理银杏叶初提物,并对其除酚酸的效果进行了测试。结果显示,酚酸脱除率最高可达 97.96%。此方法既能絮凝杂质,又能有效除去酚酸,而且不会对内酯造

成破坏,是一个简单、经济的去除银杏叶初提物中银杏酚酸的方法。

## 参考文献

- 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(1): 75-79.
- Huo F (霍峰), Zhang YJ (张渝皎), Ma PG (马培贵), et al. Advance in researches on chemical composition and biological activity of *Ginkgo biloba* L. *J Sichuan Fore Sci Tech* (四川林业科技), 2008, 29(5): 17-20.
- Zhang HM (张红梅). The chemical constituents and pharmacological activities of natural medicine, *Ginkgo biloba*. *J Capital Normal Univ, Nat Sci* (首都师范大学学报, 自科版), 2014, 35(3): 41-46.
- Wei XL (魏学立), Qu W (曲玮), Liang JY (梁敬钰). Progress of *Ginkgo biloba* L. *Str Pharm J* (综述与讲座), 2013, 25(2): 1-8.
- Zang L (臧丽), Li YH (李英华), Ni LJ (倪力军), et al. Basic properties and latent applications of ginkgolide phenols and acids. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2000, 31: 331-333.
- Yang SL (杨世龙), Huang CL (黄春丽), Tang Y (唐颖), et al. Study on removing Ginkgolide acids from EGb by coordination-organic solvent method. *J Nanjing Fore, Nat Sci* (南京林业大学学报, 自科版), 2015, 39(2): 7-13.
- Ni LJ (倪力军), Zhang LG (张立国). Separation technology and detection of Ginkgolide acids from GBb. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2000, 7(6): 50-52.
- Zhu B (朱斌), Liu F (刘芬), Yan ZH (严兆华). Study on removing Ginkgolide acids from *Ginkgo biloba* extract. *J Nor Pharm* (北方药学), 2014, 11(4): 62-63.
- Kang RL (康如龙), Huang JL (黄继来), Su XJ (苏小建), et al. Content determination and removal method investigation of phenolic acid from *Ginkgo biloba*. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18(15): 45-47.
- Shao SR (邵胜荣), Liu DD (刘丹丹), Wang RG (王若谷). Study on removing Ginkgolide acids from *Ginkgo biloba* extract by extracting. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2000, 35: 98-99.
- Hou F (侯峰), Hua WJ (华文俊), Yao YD (姚煜东). Study on removing phenolic acids from *Ginkgo biloba* extract by supercritical CO<sub>2</sub>. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(1): 37-39.