

文章编号: 100226819(2001)0320103204

银杏黄酮苷提纯工艺研究

谢慧明, 骆祥峰, 张文成, 潘 见

(合肥工业大学农产品生物化工教育部重点实验室, 合肥 230069)

摘 要: 根据黄酮苷的物性选择丙酮, 正丁醇, 正丙醇, 乙酸乙酯为萃取剂。单因素实验优选出正丙醇为萃取黄酮苷的主萃取剂。对其进行改性, 通过单因素实验和正交实验优化出: 水 正丙醇= 1 25 为萃取黄酮苷的较佳萃取剂, $T = 25$, $t = 10$ min, 固液比= 15 1(g:100 mL) 为其最佳萃取工艺参数。最后得到纯度 > 50%, 得率 > 80% 的总黄酮苷产品。为后续提纯分离打下较好的基础。

关键词: 银杏; 黄酮苷; 纯化; 萃取工艺

中图分类号: S377 **文献标识码:** A

我国自古以来就有以银杏(*Ginkgo biloba* L.) 为药的记载。自 60 年代起, 德、日、法等国家银杏叶的提取工艺、化学成分进行了大量的研究工作。从近十几年的 CA 报道来看, 欧、美、日等国的研究渐趋单一总提取物的提纯, 如总黄酮苷、总内酯的精制纯化。以银杏叶提取物为原料的药物在欧、美、亚等国年销售额已达数十亿美元。我国有银杏叶初提取物(GBE) 加工厂近百家, 年生产能力约 300 t, 但品种单一, 档次较低。因此, 急需对银杏叶进行深度开发研究。

银杏叶中主要存在两类活性物质: 黄酮苷类化合物(flavonoid glycosides) 和萜内酯类化合物(ginkgolides and bilobalide)^[1]。银杏黄酮苷已用于治疗动脉硬化、高血压、脑卒中等心脑血管疾病, 还用于制作抗脂质过氧化、防止皮肤衰老及增进血液循环的保健食品、天然化妆品等。GBE 中黄酮苷类化合物逾 35 种, 主要苷元是山柰酚(kaempferol), 槲皮素(quercetin), 异鼠李素(isorhamnetin)。此外还存在 Ginkgtin, isoginkgetin, sciadopitysin 等^[2]。

银杏叶深度加工技术的关键是有效成分的高效富集。银杏黄酮苷高效提纯是搞清单味药药效作用的物质基础。精制纯化的银杏黄酮苷, 或考察其药效作用, 或进行结构修饰, 或与银杏内酯自由复配, 有

助于银杏类中药的成分、含量或比例的准确调控, 提高药效, 明确适应症, 创制新药; 便于通过 FDA 新药审评, 提高我国银杏产品的附加值, 促进银杏类中药打入国际市场。

目前, 银杏黄酮苷纯化到 50% 以上的实用化工工艺国内外尚无报道。日本曾有 50% 含量的银杏黄酮苷的专利申请^[3], 但未闻工业化实施。本文研究从银杏总内酯萃取物中提取纯化银杏黄酮苷。

1 实验材料与方法

1.1 材料

供试原料: 由本校超临界流体萃取研究室提供, 已提取过银杏萜内酯, 萃取物中总黄酮苷含量 < 32%。

化学试剂: 食用酒精, 正丁醇, 正丙醇, 乙酸乙酯等均为分析纯, 上海试剂二厂生产。

分析仪器: 高效液相色谱仪(HPLC, 美国 Waters 公司产)。

1.2 银杏总黄酮含量的测定

精密称取 2.5 mg 标准品, 用甲醇定容至 50 mL, 得到 0.05 mg/mL 标准溶液, 进样 5, 10, 15 μ L。按峰面积计算标准曲线。称取样品 50 mg, 置于 50 mL 烧瓶中, 加入 15 mL、70% 乙醇, 再加入 2 mL 25% HCl 在 80 $^{\circ}$ C 水浴回流 2 h。70% 乙醇定容至 50 mL, 取 1 mL 配成 5 mL 甲醇溶液。以甲醇-0.2% 磷酸水液为流动相。检测波长 360 nm。测得苷元含量通过换算因子, 换算成总黄酮含量。换算公式为: 总黄酮含量(%) = (苷元和) % \times 2.51。

收稿日期: 1999210208 修订日期: 2001203226

基金项目: 国家自然科学基金(29967008), 机械工业技术发展基金(97JA 0708) 资助项目

谢慧明, 副研究员, 硕士, 合肥市六安路 269 号 143 信箱 合肥工业大学, 230069

2 实验设计

2.1 工艺路线的设计

原料中除了黄酮苷类成分外,其它主要为果胶类、花色素类、叶腊、银杏酚酸类等物质。果胶类物质的存在对黄酮苷高效分离存在着较大影响,故提取分离时应首先使黄酮苷与果胶类物质分离。拟定总的工艺路线为:

原料 萃取黄酮苷 除脂溶性物质 树脂吸附 高纯黄酮苷

本工艺要求在萃取黄酮苷时能分离亲水性杂质,脱除大部分果胶类物质,使其残留量不至于影响后续工序的进行,树脂吸附精制黄酮苷时要求能洗脱下残留的亲水性物质,优化筛选出的萃取溶剂及配比要方便产业化应用。

本工艺的创新点在于胶质类成分的精简分离,黄酮苷得率的提高,同时采用了超临界流体萃取技术对最终的高纯银杏黄酮苷产品进行脱溶处理,溶剂残留量达到国家药典规定标准,确保产品在药品、保健品领域应用的安全性。工艺关键为黄酮苷的溶剂高效萃取和树脂吸附精制。本文主要探讨银杏黄酮苷溶剂萃取工艺,合理选取对银杏黄酮苷具有高选择性的萃取溶剂及操作工艺参数,使银杏黄酮苷具有高的得率,最大限度降低后续树脂精制工序的难度。

2.2 萃取总黄酮苷溶剂的选择

根据“相似相溶”原则,尽量选取与黄酮苷极性相近且能选择性萃取黄酮苷的溶剂;不使用强酸碱性溶剂,以避免生成新的化合物或衍生状态使有效成分遭到破坏;溶剂沸点要适中,易于蒸馏,使溶剂残留量最少;应优先选取在水中具有一定溶解度的萃取溶剂,以便在最后的树脂吸附精制工序能使残留溶剂进一步降低。

黄酮苷是由黄酮苷元与糖基构成,糖基主要为

单糖,二糖,三糖或与香豆酰基相连,大多为葡萄糖和鼠李糖^[4,5]。黄酮苷元极性较小,但糖基极性较大。黄酮苷是一个中等极性的物质。故应选取中等或中等偏上极性溶剂或溶剂系统为萃取剂^[6,7]。故此,首先考虑市场供求量比较大、毒性低的丙酮、正丙醇、正丁醇、乙酸乙酯为萃取溶剂,优选出主萃取溶剂,并对主萃取溶剂进行改性,以达到最佳的萃取效果。

2.3 单因素试验

由理论分析可知,固液比、萃取温度、萃取时间是对黄酮苷的纯度和得率有较大影响的因素;而对于改性后的主萃取剂还应考察溶液的不同配比对黄酮苷纯度和得率的影响。在其它因素不变的条件下,只改变某因素水平,进行实验,以考察各单因素对萃取效果的影响趋势和适宜范围。

2.4 正交试验

根据单因素试验结果,选出主萃取溶剂,将对总黄酮提取效果有较大影响的因素进行深入分析研究,并采用正交试验进一步优化。

3 实验结果及讨论

3.1 单因素实验

3.1.1 固液比(单位 g/100 mL)对选取主萃取剂的影响

固定 $T = 25$, 萃取时间 $t = 10$ min, 从实验结果可知:在选取的各个不同的固液比中,丙酮都能将原料溶解,乙酸乙酯几乎不溶解。根据“相似相溶”原则可知,原料中物质的极性介于丙酮 ($N = 21.5$) 和乙酸乙酯 ($N = 6.1$) 之间。用正丙醇,正丁醇为萃取溶剂实验结果如图 1a。从得率上看正丙醇得率在选取的各个固液比中都较正丁醇为高。从黄酮苷纯度上讲在固液比小于 15:1 时两者无显著差异。在固液比从 15:1 到 20:1 时正丙醇萃取黄酮苷的纯度较正丁醇萃取黄酮苷的纯度高。显然,从固液比来看选取正丙醇为主萃取剂较佳。

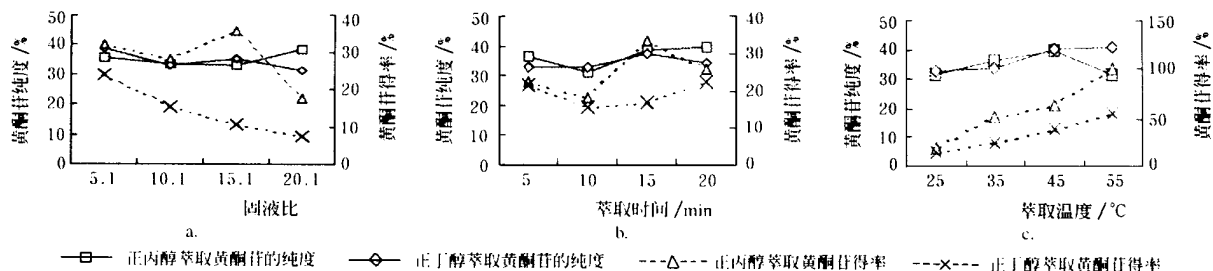


Fig.1 The influence of ratio of solid to liquid, extracting time and temperature on flavonoid glycosides extraction

3.1.2 萃取时间对选取主萃取剂的影响

固定 $T = 25$, 固液比 = 10 : 1。图 1b 是以正丙醇、正丁醇为萃取剂时的实验结果, 可以看出: 以正丙醇萃取黄酮苷的得率和纯度比正丁醇为萃取剂的得率和纯度高。故从萃取时间来考察选取正丙醇为主萃取剂较好。

3.1.3 萃取温度对选取主萃取剂的影响

实验结果表明(图 1c)当萃取温度小于 $T = 45$ 时正丙醇和正丁醇萃取黄酮苷的纯度相差不大。当温度大于 45 , 以正丁醇为萃取剂时, 所得黄酮苷纯度大于正丙醇为萃取剂的结果。但正丙醇萃取黄酮苷的得率始终明显高于正丁醇所获得的结果。从生产效率来讲以正丙醇为主萃取剂较为适宜。

3.1.4 主萃取剂的选择

通过以上对影响萃取性能的因素逐一考察后, 可知选取正丙醇为萃取溶剂较佳。

3.2 改性溶剂系统单因素实验结果

为使原料中的极性较大的黄酮苷更多地被溶剂所萃取, 对主萃取剂正丙醇加水以增大溶液的极性。改性后的萃取剂能明显增加总黄酮苷的纯度和得率。

3.2.1 固液比对萃取黄酮苷性能的影响

在 $T = 25$, $t = 10$ min, 水 : 正丙醇 = 1 : 15 的条件下, 从实验结果(图 2)可以看出: 主萃取剂水

正丙醇在 1 : 15 时萃取黄酮苷的纯度由以正丙醇为萃取剂时的 39.67% 提高到 46.67%, 黄酮苷得率由 63% 提高到 80% (见图 2), 这可能是改性后的萃取剂极性增大, 使极性较大的黄酮类化合物得到了充分的提取。从图 2 可以看出主萃取剂固液比 5 : 1, 10 : 1, 15 : 1 时得率较高。

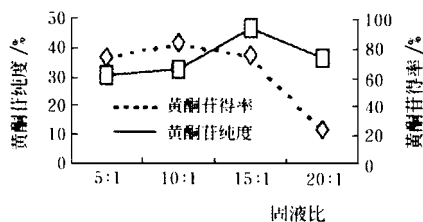


图 2 改性溶剂固液比对黄酮苷萃取性能的影响

Fig 2 The influence of the ratio of solid to modified liquid on flavonoid glycosides extraction

3.2.2 溶剂的配比对黄酮苷萃取性能的影响

在 $T = 25$, $t = 10$ min, 固液比 = 10 : 1 的条件下, 实验结果(图 3)表明当水 : 正丙醇配比为 1 : 7 时, 黄酮苷全部溶解。当配比为 1 : 25 时, 黄酮

苷纯度较高而得率也达到了较高值。这是由于溶剂中水配比减少时溶液的极性降低, 从而使果胶类物质在萃取剂中的溶解度降低。故主萃取剂正交实验溶液配比选取 1 : 15, 1 : 20, 1 : 25 为宜。

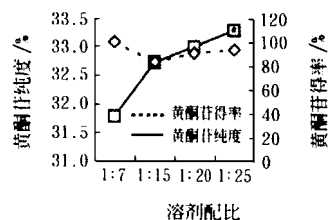


图 3 溶剂比对萃取黄酮苷性能的影响

Fig 3 The influence of modified solvent on flavonoid glycosides extraction

3.2.3 萃取时间对萃取性能的影响

在 $T = 25$, 固液比 = 10 : 1, 从图 4 可以看出水 2 正丙醇在 $t = 5$ min 时黄酮苷纯度较高, 但得率很低。 $t = 10$ min 后黄酮苷得率和纯度无明显变化。这可能是在 5 min 时黄酮类化合物溶出速度较快, 随着时间的增加黄酮苷与杂质的溶出速度基本达到平衡。从实用上考虑, 萃取时间为 5, 10 min 较为理想。

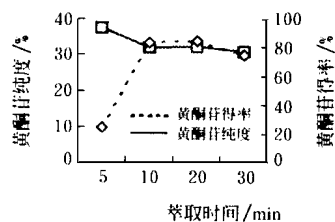


图 4 萃取时间对萃取黄酮苷性能的影响

Fig 4 The influence of time on flavonoid glycosides extraction

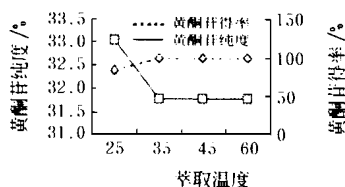


图 5 温度对萃取性能的影响

Fig 5 The influence of temperature on flavonoid glycosides extraction

3.2.4 温度对萃取性能的影响

在 $t = 10$ min, 固液比 = 10 : 1, 水 : 正丙醇 = 1 : 15 条件下, 从图 5 可以看出: 在 $T = 25$ 时黄酮苷纯度最高。水 2 正丙醇在萃取温度 T 大于 35 时原料全部溶解于溶液中。这是由于温度的升高, 杂质

与黄酮苷的溶解度同时大大增加,使杂质与黄酮苷共同溶解于溶液中,以至于达不到分离黄酮苷的目的。萃取温度过低则需要增加萃取设备的投资,故选取 $T = 25$ 为萃取温度较佳。

4 正交实验结果

通过选择对总黄酮苷提取效果有影响的各因素:萃取时间,固液比,溶剂配比中有意义的水平进行正交实验,对实验结果进行方差分析可知各因子影响萃取黄酮苷效果大小顺序为:溶剂配比>固液比>萃取时间。溶剂配比对黄酮苷纯度和得率影响极为显著。

5 结论

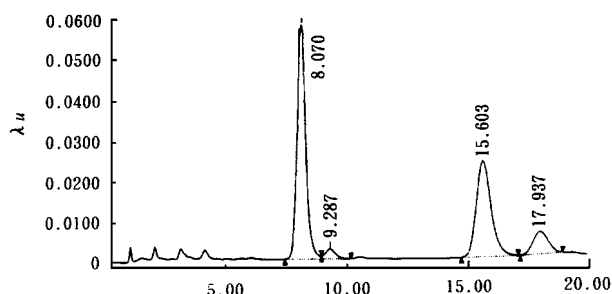


图 6 HPLC 图谱

Fig 6 The spectrogram of flavonoid glycosides extraction in HPLC

Peak Results

#	Name	Ret time min	Area (LY ³ sec)	Hright ÖLV	Amount	Int type
1	Quercetin	8.070	1433760	57707	0.076	BV
2		9.287	71917	2494		VB
3	Kaempferol	15.603	1008526	23779	0.056	BB
4	Isohametin	17.937	243887	5604	0.014	BB

通过对选取的四种溶剂进行萃取黄酮苷实验,优选出两种溶剂做单因素实验。并对优选出的主萃取剂正丙醇加以改性,通过单因素与正交实验得出萃取剂水2正丙醇最佳溶剂配比为 1:25。最佳实验条件为固液比为 15:1, $T = 25$, $t = 10$ min。最后得到黄酮苷纯度 > 50% (图 6), 黄酮苷得率 > 80% 的总黄酮苷产品。

[参 考 文 献]

- [1] Hasler A, Sticher O, Mecer B. Identification and detemination Arzneimittel aus den Blatten von Ginkgo biloba and Arzneiparapale [Z]. DE2117429, 1972
- [2] 李兆龙 银杏叶开发利用[M] 上海: 上海科学技术文献出版社 1996, 6~ 61, 150~ 165
- [3] μ, ì ° r 等 日本公开特许公报[Z], 平 3 - 264533(1991).
- [4] 刘桂霞, 孙玉玮, 金兆祥 银杏叶的研究进展[J] 国外医药, 植物药分册, 1994, 9(1): 11
- [5] 谢培山 关于银杏叶制剂的质量控制及质量标准的意见和商榷[J] 中药新药与临床药理 1996, 7(2): 1~ 3
- [6] 肖从厚 中药化学[M] 上海: 上海科学技术出版社, 1986 191~ 218
- [7] 姚新生 天然药物化学[M] 北京: 人民卫生出版社, 1996 191~ 205
- [8] 潘 见, 陈 强, 王国霞等 葛根黄酮浸取工艺优化研究[J] 农业工程学报, 1998, 14(4): 230~ 233

Optimum Extracting Technology of Flavonoid Glycosides in GBE

Xie Huming, Luo Xiangfeng, Zhang Wencheng, Pan Jian

(The Key Laboratory of Bioprocess of Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230069)

Abstract: According to flavonoides' material property, normal butyl alcohol, npropanol and ethyl acetate are chosen solvent. The optimum extracting conditions of flavonoids from GBE, which the ginkgolide was extracted (ginkgolide contents < 0.3%). The results showed that at 25, the ratio of solvents of water to npropanol is equal to 1:25, the ratio of solid to modified liquid is equal to 15:1, the extracted time is 10 minutes, the total flavonoides of extraction was more than 50%, the obtained ratio of the total flavonoides in GBE is more than 80%.

Key words: ginkgo biloba L; flavonoides; purification; extracting technology