

大孔吸附树脂纯化银杏叶提取物的工艺研究

童保华¹, 夏晓晖^{2*}, 薛孔方²

(1. 首都医科大学宣武医院, 北京 100053; 2. 北京双鹤药业股份有限公司双鹤研究院, 北京 100027)

[摘要] 目的: 研究大孔吸附树脂分离纯化银杏叶提取物的工艺条件。方法: 以银杏叶黄酮醇苷及银杏叶内酯为指标成分, 考察大孔吸附树脂对有效成分的吸附和解析条件。结果: 采用选用 DA201 作为纯化树脂, 效果最好。结论: 工艺成熟, 产品质量达到较好水平, 适合工业化生产。

[关键词] 大孔吸附树脂; 银杏叶; 黄酮醇苷; 内酯

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0005-03

Studies on Purification from *Ginkgo biloba* by Macroporous Adsorption Resin

TONG Bao-hua¹, XIA Xiao-hui^{2*}, XUE Kong-fang²

(1. Xuanwu Hospital Capital Medical University, Beijing 100053, China;

2. Beijing Double Crane Pharmaceutical Business Co. Ltd., Beijing 100027, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the purification of *Ginkgo biloba* by macroporous adsorption resin.

Method: Four types of macroporous adsorption resin were evaluated for separating efficiency by measuring the adsorption and eluting ratio of flavone and lactone. **Result:** The DA201 macroporous adsorption resin had the best separating efficiency. **Conclusion:** This method was fit for industry production.

[Key words] macroporous adsorption resin; leaves of *Ginkgo*; flavone; lactone

银杏在我国有漫长的药用、食用历史, 素有活化石之称。据《食疗本草》记载, 银杏可用于心悸怔忡, 肺虚咳喘等症。近数十年来, 国内外对银杏叶提取物(GBE)进行了较深入的研究, 其中银杏内酯已被列入治疗心脑血管疾病的重要药物。以银杏叶提取物为主要成分的“舒血宁注射液”、“金纳多注射液”广泛用于临床。

银杏叶提取物(GBE)自2002年列入《中国药典》增补版至今, 其制备工艺研究有了较多的文献报道。针对工业化生产的特点, 为确保 GBE 的质量均衡、稳定, 达到效益最大化的目的, 在广泛收集有关文献资料的基础上, 对银杏叶提取物工艺进行研究, 以优选工业化生产工艺参数。银杏叶提取物的制备

方法有醇提、水提-树脂、醇提-树脂。实验室中有采用其他有机溶媒或使用硫酸铵、醋酸铅等有害试剂的提取方法, 不适用于工业生产。目前在工业化生产中工艺比较成熟、产品质量比较稳定的提取纯化方法主要还是醇提-树脂。即采用稀乙醇提取、大孔树脂纯化等工序, 工序简洁, 工业化操作性强, 没有有机溶剂及其他有害物质的残留, 对环境不造成污染, 因而被广泛采用。但是因其工艺条件并没有统一的规范, 因而产品的质量各异。本实验针对《中国药典》2005年版所载银杏叶提取物提取“醇提-树脂法”中的大孔吸附树脂纯化工艺进行研究。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪: Waters 600E 泵; Waters 996PAD 检测器; Millennium³² 工作站; 717 自动进样器。Shimadzu Libror AEL 40SM(1/10 万)天平(日本岛津所); SYZ-A 石英亚沸高纯水蒸馏器(江苏信达仪器厂)。

[收稿日期] 20100613(006)

[通讯作者] * 夏晓晖, Tel: 13683641506, Fax: 64399465, E-mail: xxh_cn@126.com

1.2 试药 槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 10081-9304);山柰素对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 20861-9901);异鼠李素对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 20860-9702)。

银杏叶对照提取物(中国药品生物制品检定所提供,批号 0866-9701);银杏内酯 A(Ga)对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 20862-9902);银杏内酯 B(Gb)对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 20863-9902);银杏内酯 C(Gc)对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 20864-9601);白果内酯(Bb)对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 20865-9601);

甲醇(色谱纯, Tedia Company, Inc., Fairfield, OH, USA),水(重蒸馏,临用前制备),磷酸(分析纯,南京化学试剂厂)。

银杏叶药材产于贵州正安,经鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥幼叶,总黄酮醇苷含量大于 0.40%,符合《中国药典》2005 年版药典一部银杏叶项下规定;银杏叶药材中萜类内酯不得少于 0.25%,符合本品药材工艺研究的含量要求。

2 方法

银杏叶黄酮醇苷类及银杏叶内酯类均采用高效液相色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 D)测定。

3 树脂分离纯化工艺条件

3.1 树脂的选择 大孔树脂在银杏黄酮类及银杏内酯的纯化方面生产应用越来越广泛。大孔树脂生产厂家众多,型号规格性能各异。通过检索有关文献资料及相关厂家的应用情况,我们对几种应用比较成熟的大孔树脂作进一步筛选。麻秀萍等^[1]对天津南开大学生产的 10 种大孔树脂对银杏叶黄酮类成分的纯化进行了优选,认为弱极性树脂 AB-8 性能优越。张迪清等^[2]从国产另 11 种大孔树脂中筛选出 DA201 大孔树脂工艺成熟。李兆龙等^[3]从日产 Diain HP-10、HP-20、HP-21 无取代基型多孔树脂柱纯化银杏提取物试验中优选出 HP-20,取得较好效果。而国产 D101 大孔树脂在银杏提取物的应用方面也比较普遍,肖顺昌以其纯化银杏黄酮收到很好效果^[4]。

因此选择以上 4 种优选树脂作进一步的筛选。

3.1.1 吸附量的考察

准确称取经预处理的上述

4 种大孔树脂各 400 mg,于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入银杏叶总黄酮及银杏内酯水溶液 30 mL(黄酮含量为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、银杏内酯含量为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),置电动振荡机上振荡(频率 140 次/min),振荡 20 h,充分吸附后,滤过,测定滤液中剩余的黄酮及内酯浓度,分别按下式计算各树脂在室温下的黄酮醇苷及银杏内酯吸附量,结果见表 1:

$$Q = (C_0 - C_r) \times V/W$$

式中: Q 为吸附量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), C_0 为起始质量浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), C_r 为剩余质量浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), V 为溶液体积(mL), W 为树脂质量(g)。

表 1 4 种大孔树脂对银杏黄酮类及银杏内酯类

树脂	成分的吸附量(20)	
	黄酮类	银杏内酯类
AB-8	126.7	72.3
DA201	152.0	84.2
HP-20	166.6	92.1
D101	153.4	83.2

从表可见,对银杏中黄酮类及内酯类成分的吸附量,DA201 与 D101 吸附量相近,HP-20 吸附量最优,AB-8 吸附量较小。树脂对内酯成分的吸附量明显低于对黄酮类成分的吸附量。从银杏叶中 2 种成分的相对比例来看,4 种树脂都适宜于银杏叶提取物的纯化。综合价格比,DA201 与 D101 2 种树脂比较合适。

3.1.2 解吸率的考察 按 3.1 方法,取充分吸附后的树脂,分别精密加入 70%,80%,90% 的乙醇各 30 mL,浸泡 10 h,滤过,测定滤液中黄酮及内酯的浓度,根据吸附量计算解吸率,结果见表 2。

表 2 不同树脂对银杏叶成分的解吸率

树脂	70% 乙醇		80% 乙醇		90% 乙醇	
	黄酮类	内酯类	黄酮类	内酯类	黄酮类	内酯类
AB-8	61.5	68.8	62.0	72.8	63.9	74.0
HP-20	84.7	75.2	95.2	85.2	94.9	85.3
DA201	83.8	73.8	94.7	86.5	95.1	87.4
D101	79.4	77.5	89.2	79.0	90.4	82.6

结果表明,4 种树脂中,解脱率较为好的为 HP-20 及 DA201,用 80% 和 90% 乙醇均易将吸附于树脂上的黄酮解析出来,综合以上工艺筛选,选用 DA201,80% 乙醇作为洗脱剂。

3.2 洗脱溶剂量的选择

3.2.1 柱饱和和试验方法

根据银杏叶中 2 种主要

成分的相对含量及 DA201 大孔树脂对 2 种成分吸附量相对比值的的关系, 可以以黄酮类成分的饱和吸附性来确定柱的上柱量。

取过柱后供液 2 滴置白瓷板上, 加入冰乙酸 1 滴, 加入 1% 硫酸亚铁溶液 1 滴, 如溶液为深蓝色或黑色, 则表示柱已饱和, 如未变色, 则表示柱未饱和。

3.2.2 洗脱剂用量的考察 取药材, 60% 乙醇加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 提取溶液回收乙醇, 减压浓缩至约为药材质量的 1.5 倍量, 取浓缩液加于已处理好的 DA201 大孔树脂柱(用量: 干燥树脂 100 g)上, 过柱速度控制在每秒 1 ~3 滴, 每隔 2 min 对流出液进行一次饱和检验, 待柱饱和时即停止上样。记录上柱药液量, 用蒸馏水过柱, 至流出液清亮时为止, 记录蒸馏水的用量。改用 80% 乙醇过柱, 收集乙醇液, 每隔 2 min 对流出乙醇液进行 1 次黄酮检验, 至没有黄酮反应时停止, 记录乙醇用量。

结果显示, 蒸馏水的用量约为浓缩液的 3 倍, 洗脱乙醇的用量约为浓缩液的 2 倍, 为保证黄酮类成分的洗脱, 乙醇用量应以 3 倍量为宜。

3.3 纯化效果的验证 取银杏叶 500 g, 加入 10, 8 倍量 60% 乙醇, 分别回流提取 2 h, 滤取药液, 合并, 减压回收乙醇并浓缩至约 750 mL, 定容, 取样测定总固体物、总黄酮醇苷和总内酯含量。药液加于已处理树脂柱上(DA201 1 kg), 弃去流出液, 并以 1% 硫酸亚铁做饱和性试验, 待银杏黄酮和银杏内酯吸附在纯化柱上, 改用净化水过柱清洗, 当流出液较清亮时, 改用浓缩药液 3 倍量 80% 乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液, 定容, 取样测定总固体物、总黄酮醇苷及总内酯含量。试验重复 3 次, 结果见表 3:

表 3 大孔树脂纯化效果

No	总固体物			总黄酮醇苷			总内酯		
	过柱前 /g	过柱后 /g	降低率 /%	过柱前 /g	过柱后 /g	转移率 /%	过柱前 /g	过柱后 /g	转移率 /%
1	101.8	25.3	75.1	7.23	6.78	93.8	2.46	2.11	85.8
2	103.1	24.9	75.8	7.33	6.94	94.7	2.52	2.20	87.3
3	97.4	24.6	74.7	7.25	6.92	95.4	2.48	2.08	83.9
平均	100.8	24.9	75.3	7.27	6.88	94.6	2.49	2.13	85.5

从表可见, 药液经 DA201 大孔树脂过柱后, 总固体物降低 75.3%, 而总黄酮醇苷的转移率可以达到 94.6%, 含量占到总固体物的 27.6%, 银杏内酯的转移率为 85.5%, 含量占到总固体物的 8.6%, 纯

化效果明显, 有效成分损失小, 工艺稳定。

4 中试验证

取银杏叶 50 kg, 同 3.3 法制成提取液 75 L。过已处理的 DA201 纯化柱, 流速 100 L/h, 其余同 3.3 法收集乙醇洗脱液, 减压回收乙醇, 得流浸膏。提取流浸膏共 3 批, 继续减压浓缩至相对密度 1.25 ~ 1.30, 在进口温度 180 , 出口温度约 80 下喷雾干燥, 结果见表 4。

表 4 中试验证数据

批 号	080401	080410	080423
干浸膏量/g	2 458	2 383	2 416
干浸膏得率/%	4.92	4.77	4.83
提取物中总黄酮醇苷/%	27.4	27.7	27.2
总黄酮醇苷转移率/%	82.1	80.5	80.1
提取物中银杏内酯/%	8.2	8.5	8.3
银杏内酯转移率/%	61.1	61.4	60.8

注: 药材总黄酮醇苷质量分数 1.64%; 药材中银杏内酯质量分数 0.66%。

中试结果: 按工艺研究优选条件进行银杏叶提取物的提取纯化, 经 3 批中试试验表明, 工艺成熟, 产品质量达到较好水平。

5 讨论

本次试验通过对树脂分离纯化工艺的研究, 以银杏叶黄酮醇苷及银杏叶内酯为指标成分确定了具体工艺参数 通过解析率和吸附量工艺筛选, 从 AB-8, DA201, HP-20, D101 大孔树脂中选用 DA201 作为纯化树脂。 通过纯化工艺筛选, 确定依次用 3 倍量蒸馏水及 3 倍量 80% 乙醇洗脱, 收集 80% 乙醇流份。 经 3 批中试试验表明, 工艺成熟, 产品质量达到较好水平。

[参考文献]

- [1] 麻秀萍, 蒋朝晖, 杨玉琴, 等. 大孔吸附树脂对银杏叶黄酮的吸附研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(9): 539.
- [2] 张迪清, 何照范. 银杏叶资源化学研究[M]. 北京: 中国轻工出版社, 1999: 63.
- [3] 李兆龙, 虞杏英. 用树脂法和酶法从银杏叶中提取黄酮类化合物的介绍[J]. 中成药, 1994, 16(10): 52.
- [4] 肖顺昌, 伍岳宗. 银杏叶黄酮制备工艺研究[J]. 中国医药工业, 1990, 21(8): 341.

[责任编辑 仝燕]