

银杏总内酯提取物制备工艺的研究

全 燕, 马振山, 李先端, 王 琳

(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 以银杏总内酯提取物中白果内酯、银杏内酯 A、B、C 的含量为指标, 通过 HPLC 定量及 TLC 薄层鉴别, 正交优选确定了银杏总内酯的提取工艺及大孔吸附树脂分离的各工艺参数, 粗提物中内酯总量为 15%, 黄酮苷总量约为 35%, 明显高于文献报道的各方法。采用醋酸乙酯萃取分离总内酯和总黄酮, 工艺简单, 成本低, 总内酯转移率高, 经实验室放大及工厂中试生产表明工艺放大适应性较好, 总内酯提取物得率、四种内酯转移率及含量达到较理想的水平。

关键词: 银杏总内酯; 大孔吸附树脂; 提取分离

中图分类号: R283.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)06-0007-04

从银杏叶中提取出银杏总内酯, 经药效学试验, 治疗老年性痴呆效果显著。本研究以银杏总内酯中的四种主要成分: 白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的含量为指标, 全面考察了银杏总内酯的制备工艺, 为进一步开发新药打下了较好的基础。

1 仪器与试剂

惠普-1100 型高效液相色谱仪(美国), 蒸发激光散射检测器(美国)。白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 对照品由中国药品生物制品检定所提供。水为纯水, 甲醇为优级纯, 其他试剂均为分析纯。

2 色谱分析条件

Kromasil-C₁₈, 5 μ m, 4.6 \times 250mm 色谱柱(北京分析仪器厂制造)。

甲醇-四氢呋喃-水(20:10:75)为流动相。柱温 40 $^{\circ}$ C。蒸发激光散射检测器; 漂移管温度 110 $^{\circ}$ C, 气体流量 3L/min。分离度(R)4 种内酯峰与相邻杂峰分离度大于 1.5, 理论板数按白果内酯峰计算应不低于 3000。

3 方法与结果

3.1 乙醇回流提取条件优选 银杏叶 100g 生药, 按表 L9(3⁴) 正交设计表, 以含量为指标, 考察了乙醇浓度、提取次数、乙醇用量 3 个因素, 见表 2。以表 3 设计方案进行实验。

极差、方差分析结果表明: 影响白果内酯含量的主要因素为 A 因素(乙醇浓度), A 因素 3 个水平间

表 2 乙醇回流提取正交设计因素表

	A(乙醇浓度, %)	B(乙醇用量, 倍)	C(提取时间, h)
1	30	4	2.2
2	50	5.5	2.2, 1.5
3	70	7	2.2, 1.5, 1.5

有显著性差异, A₂、A₃ 水平接近, 明显优于 A₁, 由于 A₂、A₃ k 值接近, 为节约乙醇, 减少脂溶性杂质的溶出, 有利于进一步分离纯化, 应选 A₂、B、C 因素各水平间无显著性差异, 且 k 值接近, 可任选。酯 A 主要影响因素为 C 因素(提取次数), C₂、C₃ k 值接近, 考虑生产成本, 应选 C₂, 酯 A 各因素三水平间均无显著性差异, A、B 因素各水平 k 值接近, 可任选。酯 C 主要影响因素为 C 因素, 但各因素三水平间均无显著性差异, 且 k 值接近, 可任选。由于银杏叶药渣吸醇量较大, 约为 3 倍量, 故第一次回流选 7 倍量。综合考虑, 最佳提取工艺为 A₂B₁₋₃C₂, 即乙醇浓度为 50%, 回流提取 3 次(分别回流 2.2、1.5h), 乙醇用量分别为 7.4、4 倍量。

3.2 水返溶倍数的确定 取银杏叶乙醇提取液, 回收乙醇至无醇味, 取 20g 生药量的药液, 分别加水至 6、10、15、20 倍生药量返溶, 静置过夜, 抽滤, 不溶物分别用 25、15、15mL 甲醇洗涤 3 次, 滤过, 甲醇溶液水浴挥干, 用甲醇定容至 2mL, 为供试品溶液。另称取白果内酯对照品 2mg、银杏内酯 A 2mg、银杏内酯 B 1mg、银杏内酯 C 1mg 于同一容量瓶中, 加甲醇定容至 2mL, 为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取供试品溶液 6 μ L 及对照品溶液 3 μ L、6 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-醋酸乙酯-丙酮-甲醇(10:5:5:1)为

表 3 正交实验安排与结果

实验号	A	B	C	D (空列)	提出量(mg/20g 生药)		
					白果内酯	酯 A	酯 C
1	1	1	1	1	9.27	15.12	8.96
2	1	2	2	2	11.56	27.50	17.03
3	1	3	3	3	8.66	30.41	17.83
4	2	1	2	3	23.45	28.69	19.95
5	2	2	3	1	25.53	27.90	19.08
6	2	3	1	2	25.46	28.22	16.76
7	3	1	3	2	25.40	28.80	16.78
8	3	2	1	3	25.09	22.35	14.35
9	3	3	2	1	27.41	28.78	17.95

指标 白果内酯				
因素	A	B	C	D(误差 e)
\bar{K}_1	11.31	19.37	19.94	20.74
\bar{K}_2	24.81	20.73	20.81	20.81
\bar{K}_3	25.97	21.99	21.34	20.55
R	14.66	2.62	1.40	0.26
S	437.12	5.97	1.31	1.61
F	217.60 ¹⁾	3.71	0.81	

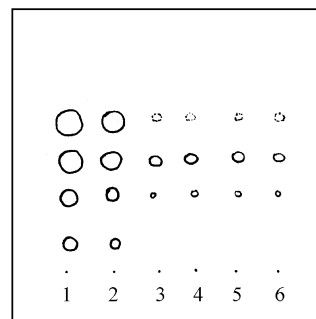
指标 酯 A				
因素	A	B	C	D(误差 e)
\bar{K}_1	24.34	23.96	21.90	23.93
\bar{K}_2	28.27	25.92	28.32	27.93
\bar{K}_3	26.40	29.14	28.80	27.15
R	3.93	5.18	6.90	3.22
S	23.15	40.95	89.14	26.96
F	0.86	1.52	3.31	

指标 酯 C				
因素	A	B	C	D(误差 e)
\bar{K}_1	14.61	14.56	13.36	15.33
\bar{K}_2	17.93	16.82	17.64	16.86
\bar{K}_3	16.36	17.51	17.90	16.71
R	3.32	2.90	4.54	1.53
S	16.58	14.28	39.05	4.26
F	3.90	3.35	9.17	

¹⁾ $P < 0.001$

展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在 140~160℃加热约 30 分钟, 放冷, 置紫外光灯(365nm)下检视。结果见示意图 1。

TLC 图表明, 银杏叶乙醇提取物 6~20 倍水返溶不溶物中均含有微量的银杏内酯, 不溶物中内酯总量明显小于 3mg, 而银杏叶中总内酯的含量约为



附图 水返溶不溶物 TLC 薄层色谱检查

1. 对照品(6μL); 2. 对照品(3μL); 3. 6 倍量水; 4. 10 倍量水返溶不溶物; 5. 15 倍量水返溶不溶物; 6. 20 倍量水返溶不溶物

0.5%, 故不溶物中内酯总量小于银杏叶中总内酯量的 3%, 可弃去, 以免增加不必要的成本。

3.3 大孔吸附树脂粗分离的工艺研究

3.3.1 大孔吸附树脂型号的选择 根据药物的化学性质, 选择 HPD-100 HPD-400 NKA-II AB-8 ADS-17 BS-55 六种不同型号的大孔吸附树脂, 分别预处理后, 用蒸馏水洗净, 减压抽干 5min, 备用。

取约含白果内酯 20%、银杏内酯 A 30%、银杏内酯 B 15%、银杏内酯 C 3% 的总内酯提取物 1.00g, 加 5mL 甲醇溶解, 再加水至 1800mL 溶解, 制成总内酯水溶液, 将总内酯水溶液均分 6 份, 每份 300mL 置于烧杯中, 加入各型号树脂 5.00g, 浸泡 4h, 将树脂转移至树脂柱上, 用总内酯溶液反复通过树脂柱 2 次, 使树脂吸附饱和, 过树脂的流出液经 TLC 检查, 均含有 4 种内酯, 表明树脂吸附已饱和。分别以 50mL 水洗树脂柱, 洗去树脂表面的内酯, 树脂床用 50mL 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 水浴挥干, 用甲醇定容至 2mL, 分别测定白果内酯及银杏内酯 A 的含量。

表 4 树脂型号的优选

树脂型号	树脂用量 (g)	树脂最大吸附量(mg)		树脂比吸附率(mg/g)	
		银杏内酯 A	白果内酯	银杏内酯 A	白果内酯
HPD-100	5.00	38.858	15.247	7.77	3.05
HPD-400	5.00	38.168	14.721	7.63	2.94
NKA-II	5.00	9.460	微量	1.89	微量
AB-8	5.00	34.365	11.323	6.87	2.26
ADS-17	5.00	9.144	微量	1.83	微量
BS-55	5.00	38.074	17.828	7.61	1.83

结果表明, HPD-100 BS-55 两种型号较好, HPD-100 树脂强度较好, 有严格的有机残留标准, 故选 HPD-100 型树脂。

3.3.2 HPD-100 大孔树脂床吸附参数的考察。

(1) 对银杏叶提取液的最大吸附量 取 HPD-

100 大孔树脂 25g, 装入树脂柱取按优选的工艺提取、返溶的银杏液水溶液, 药液通过树脂柱, 分段收集流出液, 分别以 5mL 醋酸乙酯萃取一次, 醋酸乙酯液 TLC 薄层检查, 结果见表 5。

表 5 HP-100 对银杏叶提取液的最大吸附量

样品号	流出药液量 (mL)	生药量 (g)	树脂: 生药 (g/g)	TLC 薄层检查			
				白果内酯	酯 A	酯 B	酯 C
1	100	12.5	1: 0.5	-	-	-	-
2	100~ 150	18.75	1: 0.75	-	-	-	-
3	150~ 200	25.0	1: 1.00	-	-	-	-
4	200~ 250	31.25	1: 1.25	-	-	-	-
5	250~ 300	37.5	1: 1.50	-	-	-	-
6	300~ 350	43.75	1: 1.75	+	-	-	+
7	350~ 400	50.0	1: 2.00	±	-	-	+
8	400~ 450	56.25	1: 2.25	±	+	+	+

结果表明, 树脂: 生药 1: 1.5 时, 四种内酯均未泄露, 由于树脂多次使用后吸附能力下降, 且树脂含水量可能有一定差异, 为确保内酯成分不损失, 应选 1: 1 用量为宜。

(2) 解吸附乙醇浓度的考察 取水返溶上清液, 通过 HPD-100 大孔树脂, 水洗至近无色, 分别用 4 倍树脂量的 10、20、30、40、50、60、70、95% 乙醇洗脱树脂床, 分段收集不同浓度的乙醇溶液, 洗脱液减压收干后, 加醋酸乙酯 30mL 溶解, 滤过, 滤液挥干, 以甲醇定容至 5mL。TLC 薄层检查, 结果表明, 用 10、20% 乙醇可洗去大量深棕色水溶性、大分子杂质, 但 4 种内酯成分未被洗出, 30、40、50% 乙醇洗脱液中有大量的白果内酯、酯 A、酯 B、酯 C, 60% 乙醇洗脱液中仅有痕量的白果内酯、酯 B、酯 C, 70、95% 乙醇洗脱液中已无内酯, 故宜先用 20% 乙醇洗去水溶性、大分子杂质, 再用 60% 乙醇洗脱。见表 6。

表 6 解吸附乙醇浓度的考察

样品号	乙醇洗脱浓度 (%)	TLC 薄层检查			
		白果内酯	酯 A	酯 B	酯 C
1	10	-	-	-	-
2	20	-	-	-	-
3	30	+	+	+	-
4	40	±	±	±	+
5	50	+	+	+	-
6	60	±	+	±	-
7	70	-	-	-	-
8	95	-	-	-	-

(3) 20% 乙醇除杂用量的考察 银杏叶水返溶

液, 通过 HPD-100 型大孔树脂, 用水洗至流出液近无色, 用 20% 乙醇洗脱, 分段收集。分别水浴加热挥干后, 105℃ 烤 5h, 恒重, 结果表明, 用 4 倍量 20% 乙醇除杂为 5 倍量的 97.5%, 5 倍量 20% 乙醇除杂量较小, 为节约成本, 采用 4 倍量 20% 乙醇除杂即可。见表 7。

表 7 20% 乙醇除杂用量的考察

样品号	20% 乙醇: 生药量 (mL/g)	20% 乙醇洗脱物干膏重 (g)	占总杂质比例 (%)
1	1: 1	11.54	39.2
2	2: 1	9.86	33.5
3	3: 1	4.83	16.4
4	4: 1	2.46	8.4
5	5: 1	0.74	2.5

(4) 60% 乙醇解吸附用量酌考察 取银杏叶水返溶液, 按确定的工艺条件过柱、水洗、20% 乙醇洗后, 用 60% 乙醇洗脱, 分段收集, TLC 薄层检查, 点样量 4.8μL 结果见表 8。

结果表明 60% 乙醇解吸附, 3 倍量即可洗出大部分内酯, 第 4 倍量中仅检出少量酯 A 和酯 B, 第 5 倍乙醇溶液中已无内酯成分, 故应选用 4 倍量 60% 乙醇解吸附。上述 1-4 号样品合并, 减压浓缩, 60℃ 真空干燥 3h, 得粗提物干膏, 得率为 3.7%, 经含量测定, 含白果内酯 5.7%、酯 A 4.5%、酯 B 2.1%、酯 C 2.9%, 粗提物含总内酯为 15%, 同时含有 35% 银杏黄酮, 还须进一步分离精制。

表 8 60% 乙醇解吸附用量的考察

样品号	60% 乙醇倍数 (树脂量)	TLC 薄层检查			
		白果内酯	酯 A	酯 B	酯 C
1	1	+	+	-	+
2	2	+	+	+	+
3	3	+	+	+	+
4	4	+	+	+	-
5	5	-	-	-	-
6	6	-	-	-	-

3.4 银杏内酯粗提物的分离精制工艺研究 粗提物含有大量的黄酮, 较难分离, 经试验比较醋酸乙酯萃取工艺的分离精制效果明显优于聚酰胺吸附、氧化铝柱精制等方法。故选用醋酸乙酯萃取工艺精制。

3.4.1 醋酸乙酯萃取用量及萃取次数的考察 银杏内酯粗提物乙醇溶液, 减压回收乙醇至无醇味, 加水 (0.5 倍生药量) 使溶解, 用醋酸乙酯萃取 5 次, 每

次用 1/4 生药量, 用 TLC 薄层色谱检查, 结果表明, 醋酸乙酯萃取 1 次即可将白果内酯提取完全, 但酯 A、酯 B、酯 C 需萃取 4 次, 第 4 次醋酸乙酯萃取液中酯 A、酯 B、酯 C 已明显较少, 为节约成本, 可萃取 3 次, 醋酸乙酯总用量为 0.75 倍生药量。见表 9。

表 9 醋酸乙酯萃取用量及萃取次数的考察

萃取 次数	醋酸乙酯: 生药量 (mL/g)	TLC 薄层检查			
		白果内酯	酯 A	酯 B	酯 C
1	1:4	+	+	+	+
2	1:4	-	+	+	+
3	1:4	-	+	+	+
4	1:4	-	±	±	±
5	1:4	-	-	-	-

3.4.2 醋酸乙酯萃取液的洗涤方式考察 醋酸乙酯萃取液合并, 分别用不同量的 4% 醋酸钠酸性水溶液 (PH5-6) 洗涤一次, 再用水洗一次, 回收醋酸乙酯干燥, 得内酯精提物, 醋酸乙酯萃取液 4% 醋酸钠酸性水溶液 (PH5-6) 洗涤一次, 再用水洗一次, 可提高精提物中总内酯的含量, 但收得率有所下降。见表 10。

表 10 醋酸乙酯萃取液的洗涤方式考察

样品 号	生药 量(g)	洗涤液用量(mL)		得量 (g)	得率 (%)	内酯含量(%)				转移率 ¹⁾ (%)	
		4% Na ₂ Ac	水			白果	酯 A	酯 B	酯 C		总内酯
1	306	100	50	1.9650	0.64	23.59	20.25	9.01	8.30	61.15	80.1
2	200	75	50	1.4758	0.73	20.23	17.30	9.75	8.14	55.42	83.5
3	200	50	50	1.6743	0.84	18.29	17.43	9.28	6.35	51.34	87.7
4	200	-	-	1.8036	0.90	18.32	15.56	8.57	8.17	50.62	93.2

1) 生药中 4 种内酯总含量 0.49%。

4 讨论与小结

银杏叶提取液经大孔树脂处理后的粗提物包含总黄酮和总内酯, 由于银杏叶中含有大量的叶绿素及植物蜡, 按文献的醇提法很难进一步分离精制。粗提物(黄酮苷 27.4%, 银杏萜内酯 10.6%) 的得率较低^[1,2]。而针对总内酯的提取工艺未见报道。

我们在文献的基础上, 经正交试验, 确定了以 50% 乙醇提取 3 次, 浓缩, 水返溶, 过大孔吸附树脂的提取粗分离工艺, 得到的中间提体四种内酯总量为 15%, 黄酮苷总量约为 35%, 明显高于文献报道的各方法。由于经过大孔吸附树脂粗分离, 除掉了大部分的水溶性杂质, 再精制的处理量大大减小, 仅用很少量的醋酸乙酯萃取, 即可得到含量高于 50% 的总内酯提取物, 同时可得到总黄酮部分。此工艺总内酯转移率高, 经实验室放大及工厂中试生产表明工艺放大适应性较好, 工艺简单, 成本明显降低, 总内酯提取物得率、四种内酯转移率及含量达到较理想的水平。

参考文献:

- [1] 姚渭溪. 银杏叶中活性成分的提取工艺. 测定及其进展 [J]. 中草药, 1995, 26(8): 1574.
- [2] 胡君萍, 陈坚. 银杏叶有效成分的提取及其制剂分析 [J]. 西北药学杂志, 1998, 13(1): 36.