

银杏叶中黄酮类化合物的提取和分离

李志平¹, 李护护²

(1. 陕西汉王药业股份有限公司, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西医药控股集团山海丹药业有限责任公司, 西安 710075)

摘要:对银杏叶中黄酮类化合物的乙醇提取工艺和膜分离纯化工艺进行研究,并优化工艺条件。结果表明:采用70%乙醇溶液在料液比1:10、80℃条件下提取2 h,然后采用截留相对分子质量依次为30 000、10 000、5 000的陶瓷膜组成梯度膜装置,在压力0.25 MPa、温度30℃、时间120 min条件下进行分离纯化,黄酮透过率为94.22%,产品中黄酮含量为45.60%。

关键词:银杏叶;黄酮;提取;膜分离;梯度膜

中图分类号:R284.1;TQ28

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)02-0131-04

Extraction and separation of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves

LI Zhiping¹, LI Huhu²

(1. Shaanxi Hanwang Pharmaceutical Co., Ltd., Hanzhong 723000, Shaanxi, China; 2. Shaanxi Pharmaceutical Holding Group Shanhaidan Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710075, China)

Abstract: The ethanol extraction and membrane separation process of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves were studied, and the process conditions were optimized as follows: extracting *Ginkgo biloba* leaves for 2 h at 80℃ and ratio of material to solvent 1:10 with 70% ethanol, then separated and purified by a gradient membrane device composed of ceramic membranes with relative molecular weights of 30 000, 10 000 and 5 000 under the conditions of the pressure 0.25 MPa, temperature 30℃ and time 120 min, and the flavonoid transmission rate was 94.22%, and the content of flavonoids in the product was 45.60% after membrane separation.

Key words: *Ginkgo biloba* leaves; flavonoids; extraction; membrane separation; gradient membrane

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科、银杏属落叶乔木,具有观赏、经济、药用价值。银杏叶中含有丰富的化学成分,主要有黄酮类、萜类、内酯类等化合物^[1],黄酮类化合物为其主要有效成分之一,具有优异的抗病毒、抗氧化^[2]、防治心血管疾病^[3]、增强免疫力^[4]等作用,其中抗氧化是其重要性能之一。目前油脂中使用的抗氧化剂多是人工合成,如TBHQ、BHA、BHT等,而黄酮类化合物具有酚类抗氧化的通性及显著的生物活性,是天然抗氧化剂^[5],且物美价廉易得。张靛灵等^[6]研究认为银杏黄酮可作为沙棘油的抗氧化剂,是人工合成抗氧化剂BHT的理想天然代用品。陕西汉中一带野生和人工种植的银杏树资源非常丰富,其药用成分高,春

季嫩叶中黄酮含量在1.6%以上^[7],高于其他地区的平均值,这为提取黄酮类化合物提供了充足的原料保证,也为陕南银杏种植区域脱贫增加了致富门路。

目前国内银杏叶提取黄酮工艺路线有两种:一种是水提取—减压浓缩—真空干燥;另一种是乙醇提取—减压浓缩—树脂柱分离—减压浓缩—真空干燥或喷雾干燥。前者耗能高,所得银杏黄酮收率低、品质差,只适合于特定用途粗品的获取;后者使用较多,能耗、品质都有较大改进,但树脂柱需频繁再生,生产效率不高。水和乙醇都不是黄酮的特定提取溶剂,所以最后得到的溶液不仅有黄酮,还有其他物质。

为了进一步发掘银杏黄酮的油脂抗氧化作用,同时充分开发利用陕西优势银杏叶资源、提升加工工艺水平,本文对银杏叶中黄酮的提取和分离纯化方法进行了研究。综合乙醇提取和膜分离的优点,将分离纯化方法从树脂柱吸附洗脱改为膜分离,又

收稿日期:2020-03-10;修回日期:2020-09-22

作者简介:李志平(1971),男,高级工程师,主要从事药品生产技术工作(E-mail)377527378@qq.com。

进一步从单一规格的膜改为梯度组合膜。经实际应用,膜分离效率比其他分离工艺高,得到的产品纯度也有显著提高。

1 材料与方法

1.1 实验材料

银杏叶,陕西省汉中市洋县收购,10 年以下树龄的树叶;芦丁标准品,上海士锋生物科技有限公司;无水乙醇,西安天茂化工有限公司。超滤膜(截留相对分子质量分别为 5 000、10 000、30 000),温州市大成药机有限公司。

722 型光栅分光光度计,南京诺新分析仪器有限公司;真空旋转蒸发仪,上海一凯仪器设备有限公司;赛默飞世尔 U3000 高效液相色谱仪;离心沉淀机,广州科晓科学仪器有限公司;膜分离装置,温州市大成药机制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 银杏叶中黄酮的提取与分离

工艺路线:干银杏叶—粉碎或切碎—乙醇溶液热回流 2 次—滤液合并—减压回收乙醇—加水转溶—离心分离—多梯度膜分离—减压浓缩—真空干燥—黄酮产品。

对工艺中影响提取效果的溶剂种类、提取温度、溶剂量、提取时间进行对比实验,找出最佳提取工艺参数;对影响膜分离效果的膜孔径或截留相对分子质量、过滤时间、压力、温度进行对比实验,研究其对膜通量的影响,从而找出最佳的膜分离工艺参数。

1.2.2 黄酮含量的测定

按 2015 版《中国药典》一部“银杏叶提取物”项下方法,采用高效液相色谱法测定黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 提取过程各因素对银杏叶黄酮的影响

为便于比较提取效果,提取物的分离精制仍采用 D101 大孔树脂吸附柱,吸附洗脱后进行减压浓缩,然后真空干燥,称重。

2.1.1 溶剂的影响

采用两种不同的有机溶剂乙醇、丙酮在不同体积分数下对银杏叶黄酮进行回流提取对比实验,提取温度 80 ℃,提取时间 2 h,料液比 1:10(干银杏叶质量与溶剂体积比,下同),考察不同溶剂对银杏叶黄酮提取的影响,结果见图 1。

由图 1 可知:丙酮溶液的体积分数在 60% 时的提取效果最好,而乙醇溶液的体积分数在 70% 时的提取效果最好;同体积分数时,丙酮提取效果始终是优于乙醇的。相对于乙醇而言,由于丙酮有毒性,价格昂贵,安全性差,工业化提取中使用较少。从提取

效果、生产安全性、环保、成本等多因素考虑,最佳溶剂选择 70% 乙醇溶液。

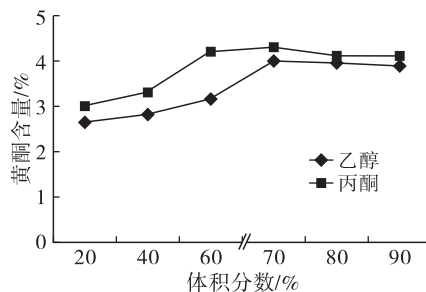


图 1 溶剂对黄酮提取效果的影响

2.1.2 提取温度的影响

采用 70% 乙醇为溶剂,提取时间 2 h,料液比 1:10,考察不同提取温度对银杏叶黄酮提取的影响,结果见图 2。

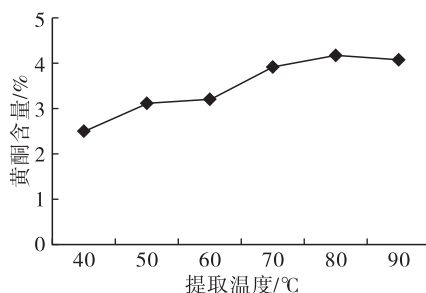


图 2 提取温度对黄酮提取效果的影响

由图 2 可知,随着提取温度的升高黄酮的提取效果越好,在 80 ℃ 时黄酮含量达到最大值,之后继续升高温度,黄酮含量下降,说明黄酮长时间在高温条件下,发生了氧化或其他化学变化。提取温度太高也会将杂质如叶绿素、单宁等大量溶出,增大了后续分离纯化的难度,且提取温度超过乙醇沸点,操作难度将大大增加,乙醇的挥发损失急剧增大。因此,选择最佳提取温度为 80 ℃。

2.1.3 料液比的影响

采用 70% 乙醇为溶剂,提取温度 80 ℃,提取时间 2 h,考察不同料液比对银杏叶黄酮提取的影响,结果见图 3。

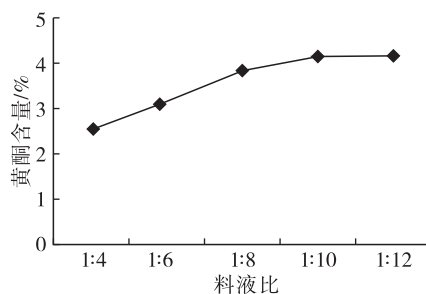


图 3 料液比对黄酮提取效果的影响

由图 3 可知,料液比在 1:4 ~ 1:10 时,黄酮含量随溶剂用量的增加而增加。料液比继续增加,虽然

黄酮含量有所增加,但这种趋势明显降低了。因此,从经济的角度选择最佳料液比为1:10。

2.1.4 提取时间的影响

采用70%乙醇为溶剂,提取温度80℃,料液比1:10,考察不同提取时间对银杏叶黄酮提取的影响,结果见图4。

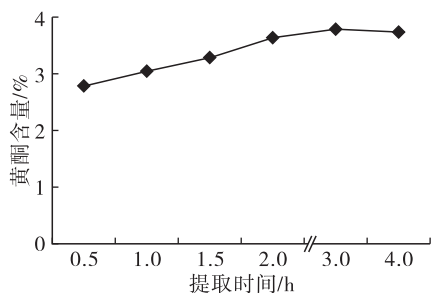


图4 提取时间对黄酮提取效果的影响

由图4可知,随着提取时间的延长,黄酮含量增加,提取时间超过2h后,黄酮含量几乎没有差异。因此,选择最佳提取时间为2h。

2.1.5 最佳工艺条件的确定

由上述实验结果,确定银杏叶黄酮最佳提取工艺条件为:用70%乙醇溶液提取,料液比1:10,提取温度80℃,提取时间2h。

2.2 银杏叶黄酮的膜分离工艺参数确定

分离纯化阶段要尽量保证黄酮不损失,杂质降低,还必须具有高生产效率。目前在工业生产上,银杏叶黄酮提取液的分离纯化常使用大孔树脂,该法虽然成熟,但操作烦琐,需频繁再生,生产效率不高。为改善这一状况,本研究对膜分离进行了尝试:先采用单一规格陶瓷膜,分别考察时间、温度、压力对膜通量的影响,确定最佳工艺参数后,再采用截留相对分子质量分别为30 000、10 000、5 000的陶瓷膜,组成梯度组合进行精分离操作。

2.2.1 时间对膜通量的影响

使用截留相对分子质量为10 000的陶瓷膜,料液温度30℃,高压泵压力0.25 MPa,分别过滤15、30、45、60、75、90、105、120、135、150、165、180 min,测定膜通量,结果见图5。

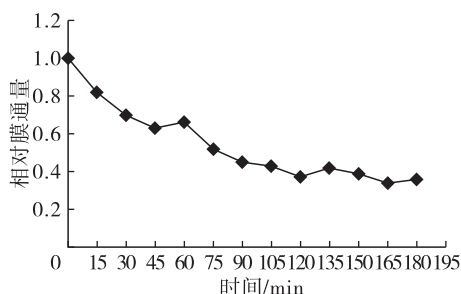


图5 时间对膜通量的影响

由图5可见,起始的45 min里膜通量快速下降,在中间阶段的1~2 h膜通量变化较平缓,120 min后相对膜通量基本稳定在0.34~0.37,说明120 min后堵塞很严重。综合考虑,选择时间为120 min。

2.2.2 压力对膜通量的影响

使用截留相对分子质量为10 000的陶瓷膜,料液温度30℃,高压泵压力分别选0.1、0.2、0.3、0.4 MPa,过滤时间120 min,在30、60、90、120 min这4个时间点分别测定膜通量,结果见图6。

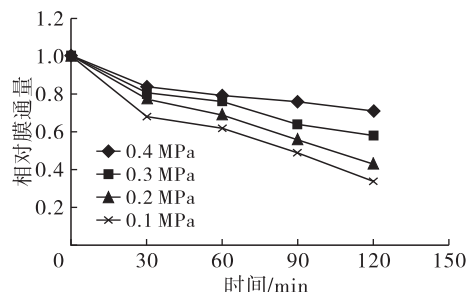


图6 压力对膜通量的影响

由图6可见,膜通量随着压力的增大而增加。理论上,压力越高,膜通量越高,但实际压力不能无限加大,因会影响整个膜装置系统的密闭性,甚至使膜损坏。推荐的压力为0.2~0.3 MPa。

2.2.3 温度对膜通量的影响

使用截留相对分子质量为10 000的陶瓷膜,高压泵压力0.25 MPa,过滤时间120 min,料液温度分别取20、30、35、40℃,在30、60、90、120 min这4个时间点分别测定膜通量,结果见图7。

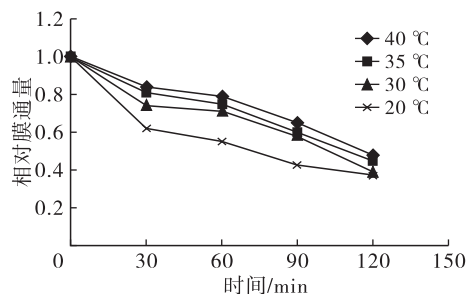


图7 温度对膜通量的影响

由图7可见,温度对膜通量有显著的影响。温度越高膜通量随时间延长,其降低得越缓慢。90 min时,在30、35、40℃下的膜通量几乎看不出明显区别。考虑到实际工业化大生产中,冷冻降温或者加热升温都比较麻烦。因此,综合生产和操作环境温度等因素,温度选择30℃为宜。

2.2.4 膜的选择和组合

2.2.4.1 单一规格膜截留相对分子质量的选择

膜的主要参数选择的依据是被分离物的相对分子质量。溶液中的鞣质、纤维素、树脂等物质形成的

分子团大大超过黄酮苷分子团,且分子为非标准的球形、柱形,所以过滤用膜的孔径需选择稍大一些。银杏叶中的黄酮类化合物、脂类化合物相对分子质量均不大于1 000^[8],故分别选用截留相对分子质量为5 000、10 000、30 000的陶瓷膜作为分离用膜,对经离心分离后的提取液进行再次分离纯化。比较有效成分黄酮透过率和产品中黄酮含量,结果见表1。

表1 不同截留相对分子质量膜的分离效果

膜的截留相对分子质量	黄酮透过率/%	产品中黄酮含量/%
未过滤原液	-	6.02
5 000	81.12	39.12
10 000	90.20	34.06
30 000	95.36	27.10
用30 000、10 000、5 000的3组膜组成梯度组合膜	94.22	45.60

从表1可以看出:选用截留相对分子质量5 000的陶瓷膜所得黄酮含量最高,但黄酮透过率只有81.12%;截留相对分子质量30 000的陶瓷膜黄酮透过率最高,黄酮含量却最低,说明杂质的透过量也增大了。从黄酮的透过率和实际黄酮的含量综合考虑,单一规格膜选用截留相对分子质量10 000的陶瓷膜为宜。

2.2.4.2 梯度分离工艺对膜通量的影响

考虑到溶液中高分子黏液、胶质物多,易对膜造成快速和严重的污染,造成膜通量快速下降^[9],生产中需要频繁进行反洗、正洗再生,实验将单一规格的截留相对分子质量10 000的陶瓷膜,改进为采用截留相对分子质量为30 000、10 000、5 000的3组膜,组成三级梯度膜分离装置。其他参数仍为压力0.25 MPa、时间120 min、温度30℃,多点测定膜通量。实验结果与单因素实验(图5)对比考察,结果如图8所示。

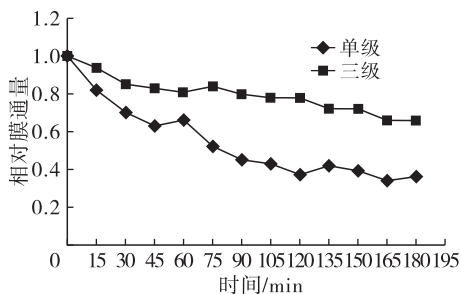


图8 单级与三级膜分离效果比较

由图8可知,采用三级梯度膜分离,膜通量下降趋势明显减慢,长时间保持在初始的70%以上,可极大地减少膜的再生频次,实现长时间连续生产,生产效率明显提高。采用梯度组合膜透过液均匀透明,鞣质、纤维素、树脂等截留率高,而黄酮类物质透过率高,达到94.22%(见表1),与30 000单一规格膜黄酮透过率相近,而黄酮含量达到45.60%(见表1),效果十分明显。可以推测,如果采用更多级的梯度膜分离装置,再将每级截留的物料返回上一级参与再分离(或者用于下一个批次的提取),可在提高膜分离效率、降低膜再生频次的基础上,进一步提高产品中黄酮含量。

3 结论

(1)银杏叶黄酮的最佳提取条件为:以70%乙醇溶液作溶剂,提取温度80℃,提取时间2 h,料液比1:10(干银杏叶质量与溶剂体积比)。

(2)选取截留相对分子质量为30 000、10 000、5 000的陶瓷膜组成梯度膜分离装置,在时间120 min、压力0.25 MPa、温度30℃条件下进行膜分离,最终得到的黄酮含量为45.60%,黄酮透过率为94.22%。

参考文献:

- [1] 王成章,陈祥,唐卫红,等. 银杏叶中黄酮类化合物及其分析法[J]. 林产化学与工业,1998,18(1):83-88.
- [2] 孟申. 中药有效成分抗氧化作用的实验研究[J]. 中国药理学通报,1992,8(5):326-330.
- [3] 龚晓健,李运曼,卞惠敏,等. 银杏总内酯抗血小板聚集与抗血栓作用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006,11(7):822-855.
- [4] 邹健,蒋晓燕,徐晓明. 银杏叶提取物EGb761神经保护作用研究进展[J]. 中草药,2005,36(11):1734-1736.
- [5] 张静,张晓鸣,佟建明,等. 银杏黄酮抑制脂质氧化的研究[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(6):842-847.
- [6] 张鞍灵,高锦明,李秀信,等. 沙棘和银杏黄酮对沙棘油的抗氧化研究[J]. 中国油脂,1999,24(6):42-44.
- [7] 孙茜,田伟,冯自立,等. 汉中5个引种品种银杏叶有效成分含量比较分析[J]. 广东化工,2019,46(2):18-20.
- [8] 王凤芹. 银杏叶中黄酮类化合物的分离及分析方法研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2008.
- [9] 孙伟光. 超滤膜特征有机污染物识别及膜污染控制研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2018.