

# 低银杏酚酸白果粉脱毒工艺优化

康津铭<sup>1</sup>, 王云春<sup>1</sup>, 樊恩生<sup>2</sup>, 刘鹏程<sup>2</sup>, 吴泽宇<sup>1</sup>, 惠爱玲<sup>1</sup>, 张文成<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>合肥工业大学食品与生物工程学院农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥

<sup>2</sup>江苏贝斯康药业有限公司, 江苏 徐州

收稿日期: 2023年2月17日; 录用日期: 2023年3月8日; 发布日期: 2023年5月8日

## 摘要

本文采用正己烷-乙醇混合溶剂降低银杏酚酸含量, 建立一种低酚酸白果粉的工艺。作者探究了正己烷浓度、洗脱时间、洗脱温度单因素影响, 并进一步通过响应面法优选出工艺参数: 正己烷含量为16.69%, 洗脱温度为41.73℃, 洗脱时间为28.02 min, 此条件下银杏酸含量 < 10 mg/kg, 符合国家药典2020版标准。

## 关键词

白果粉, 银杏酚酸, 工艺优化

# Optimization of Detoxification Process for Low Ginkgo Phenolic Acid in Ginkgo Powder

Jinming Kang<sup>1</sup>, Yunchun Wang<sup>1</sup>, Ensheng Fan<sup>2</sup>, Pengcheng Liu<sup>2</sup>, Zeyu Wu<sup>1</sup>, Ailing Hui<sup>1</sup>, Wencheng Zhang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Engineering Research Center of Bio-Process from Ministry of Education, School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei Anhui

<sup>2</sup>Jiangsu Beisicang Pharmaceutical Co., Ltd, Xuzhou Jiangsu

Received: Feb. 17<sup>th</sup>, 2023; accepted: Mar. 8<sup>th</sup>, 2023; published: May 8<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

In this paper, n-hexane-ethanol mixed solvent was used to reduce the content of ginkgo phenolic acid, and a process design optimization idea for ginkgo powder with low phenolic acid was established. In the experiment of reducing phenolic acid content, the n-hexane concentration, elution

\*通讯作者。

文章引用: 康津铭, 王云春, 樊恩生, 刘鹏程, 吴泽宇, 惠爱玲, 张文成. 低银杏酚酸白果粉脱毒工艺优化[J]. 药物化学, 2023, 11(2): 41-49. DOI: 10.12677/hjmce.2023.112007

time and elution temperature were investigated respectively. The optimal conditions for removing phenolic acid are obtained by response surface methodology: n-hexane content is 16.69%, the elution temperature is 41.73°C, and the elution time is 28.02 min. Under this condition, the phenolic acid content is less than 10 mg/kg, which meets national pharmacopoeia 2020.

## Keywords

Ginkgo Powder, Ginkgolic Acid, Technology Optimization

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

中国银杏资源丰富，占世界 70%；其全身是宝，提高资源的深加工水平是该领域研发热点之一。国内外对银杏的开发利用以银杏叶和白果(银杏种仁)为主。白果是一种营养丰富、药食兼备的天然资源。白果粉是白果加工而成的产品，具有保健作用和独特的风味，深受消费者的喜爱，用白果粉冲剂可制成具有保健作用的银杏粉冲剂[1] [2]。史垠垠等研究以白果为原料生产的饮料是营养价值很高的果味饮品，不仅有着独特的风味，而且有补心养气，益肾润肺，涩精固元，延年益寿，止咳平喘等功效[3]。同时以银杏果为主料，配以玉米粉、脱脂奶粉等为辅料制成营养丰富、易吸收的早餐粉[4]。

银杏酚酸类物质存在于白果、银杏外种皮和银杏叶中，是银杏及其制品中具有重要生物活性的成分。银杏酚酸属漆酚类物质，具有杀虫、杀菌和抑菌作用[5] [6]，也有研究表明，银杏酚酸类物质具有细胞毒性、非免疫毒性、引起变态反应、以及诱导有机体突变和致癌的可能性[7] [8] [9]。Lepoittevin 等通过豚鼠的过敏试验也发现了银杏酚酸是主要的过敏原[10]。银杏酚酸类物质的毒性包括胚胎毒性、致突变毒性和肾毒性等；如将银杏酸置于小鸡胚中进行试验，其胚胎毒性较强；若银杏提取物含 16%银杏酸，半数致死量可为 1.8 mg/只。银杏酸在大鼠的原代肝细胞中，能够致使 DNA 双链断裂，具有潜在的致突变毒性[11]。银杏酚酸作为银杏药物、提取物及半成品质量标准的重要控制指标之一，受到人们的广泛关注。目前国际生产标准，要求必须将银杏酸含量控制在 5 ppm 以下。2020 版中国药典标准规定：用 HPLC 法检测，GBE 中总银杏酸不得超过 5 ppm [12]。

银杏酚酸难溶于水和乙醇，易溶于石油醚等非极性溶剂，属于脂溶性化合物。在紫外线光照射过程中会出现强烈的淡蓝色荧光反应，为银杏酚酸的紫外吸收特性。银杏酚酸的酸性可以在皂化反应中酸碱中和，易于银杏酚酸的萃取分离，但是副产物较多。由于银杏酚酸羧基的存在，在 200°C 的条件下，银杏酚酸苯环上的羧基发生脱羧反应，表现出其热不稳定的性质，可利用这种性质特点，对银杏酚酸进行高温处理，从而达到去除部分银杏酚酸的目的[7]。考虑到溶剂法操作简单、脱除银杏酚酸较为彻底，为确保银杏酚酸含量在标准范围之内，预防白果粉安全隐患，本文拟采用复合溶剂法进行脱银杏酚酸的工艺研究，以制作一种稳定性良好、营养健康、具有保健功效的低银杏酚酸白果粉。

## 2. 材料与仪器设备

主要材料：市售银杏果：色谱纯乙腈(南京盛庆和化工)，色谱纯甲醇、正己烷、无水乙醇(国药集团化学试剂公司)。

主要仪器设备：1260 Infinity 高效液相色谱仪，安捷伦科技有限公司；BSA124S 分析天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；FD-1 冷冻干燥机，北京博医康技术公司。

### 3. 实验方法

#### 3.1. 工艺流程

原料→初选→蒸煮→脱壳→研磨→脱酸→筛分→包装

操作要点：

- 1) 初选：将新鲜的白果用水选法除去霉烂和空心果，用 40℃ 的风箱烘干直至其质量不会下降。
- 2) 蒸煮：先用开水煮沸 20~30 分钟，以 1:3 的比例将白果和水的比例煮沸，同时搅拌，以去除白果表皮上的银杏酸和其他有害物质。经预煮后，果皮的某些部位发生了裂痕，使果肉与果皮分离。
- 3) 脱壳：把水份排出，然后把它去掉。去皮及核：用清水反复冲刷，去掉内皮，取出内心。果芯中银杏酚酸的含量一般为核桃的 200~500 倍，去掉果核后，银杏果实的毒性物质含量明显下降。
- 4) 研磨：用胶体研磨机把水和白果仁按一定的比例加到一起，然后研磨均匀，然后在实验室里用小型药剂研磨机研磨，然后用 120 目筛分，存放在阴凉、干燥的地方。
- 5) 脱酸：采用正己烷 - 乙醇水洗脱：采用正己烷 - 乙醇溶液洗脱去残余的银杏酚酸，并分别测定了正己烷浓度、洗脱振荡频率、温度、时间和反应面法。
- 6) 筛分：用分选机对颗粒大小和大小适宜的全白果粉进行筛分。
- 7) 包装：将白果粉末定量称重后，按盒自动打包。

#### 3.2. 白果粉中银杏酚酸含量的检测方法

以中国药典 2020 中银杏叶浸膏中的酚酸为主要成分，使用 HPLC 法测定其含量[13]。总银杏酸参照高效液相色谱法(通则 0512)测定。色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为 150 mm，柱内径为 4.6 mm，粒径为 5 μm)；以含 0.1%三氟乙酸的乙腈为流动相 A，含 0.1%三氟乙酸的水为流动相 B，梯度洗脱；检测波长为 310 nm。

对照品溶液的制备：取白果酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含 1 μg 的溶液，作为对照品溶液；另取总银杏酸对照品适量，用甲醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液，作为定位用对照溶液。

供试品溶液的制备取本品粉末约 0.500 g，精密称定，置具离心管中，精密加入甲醇 5 mL，称定重量，超声使其溶解，放冷，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

测定法精密吸取供试品溶液、对照品溶液及定位用对照溶液各 50 μL，注入液相色谱仪，计算供试品溶液中与总银杏酸对照品相应色谱峰的总峰面积，以白果酸对照品外标法计算总银杏酸含量，即得。根据白果酸(C15:1)标品(纯度 90%)做出标准曲线(如图 1 所示)，使用最小二乘法进行线性回归得  $Y = 9.8692X - 0.5249$ ， $R^2 = 0.9996$ ，表明线性关系良好，总银杏酚酸含量可用白果酸含量乘以其对应的比例系数得到。白果酸的标准品 HPLC 图如图 2 所示。

#### 3.3. 实验设计

##### 3.3.1. 脱酸单因素试验设计

根据相似相容原理，采用正己烷 - 乙醇溶液进行提取。精准称取 0.500 g 白果粉于 10 mL 离心管中，加入 4 mL 一定比例的正己烷 - 乙醇溶液，在一定条件下水浴震荡一定时间，在 3500 r/min 转速下离心 10 min，回收有机溶剂，真空冷冻干燥后，用甲醇超声提取去酸后的白果粉，使用高效液相色谱仪检测其银杏酚酸含量[14]。

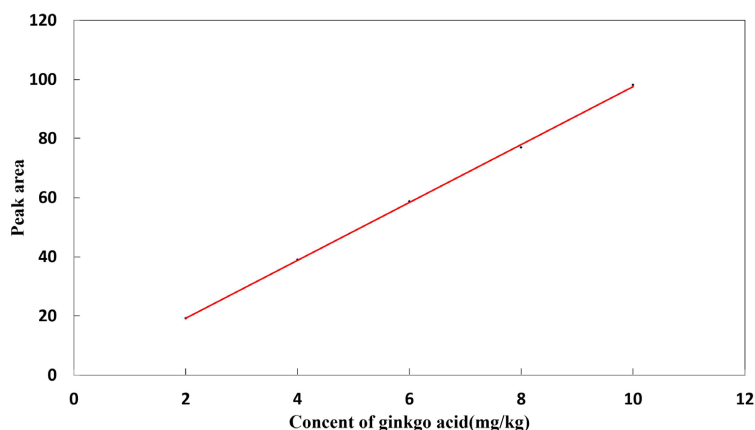
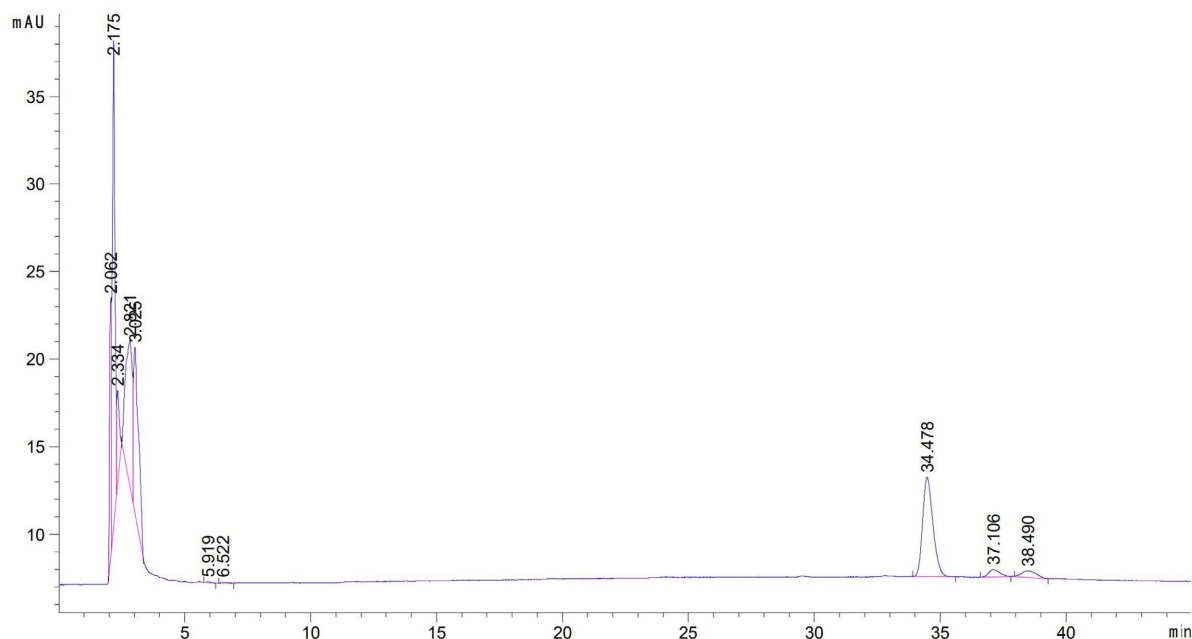


Figure 1. Standard curve of ginkgolic acid

图 1. 白果酸标准曲线图



注: 5 min 之前出的色谱峰为溶剂峰, 后续 34.478 min 处为白果酸(C15:1), 37.106 min 处为类似物氢化白果酸(C15:0)、38.490 min 处为类似物白果新酸(C17:1)。

Figure 2. HPLC chromatogram of total ginkgolic acid in the sample

图 2. 样品总银杏酚酸 HPLC 色谱图

对正己烷浓度、洗脱温度、振荡频率、洗脱时间 4 个因素检测其脱酸作用; 设定温度 = 30℃, 振荡频率 = 120 r/min, 时间 = 20 min, 分别使用浓度为 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 的正己烷溶液洗脱, 检测银杏酚酸含量, 选取最优浓度水平; 设定温度 = 30℃, 振荡频率 = 120 r/min, 浓度为最优水平, 分别选取 10、20、30、40、50 min 的时间进行洗脱, 检测结果, 选取最优时间水平; 控制其他条件一致, 分别在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 进行洗脱, 检测结果, 选取最优温度水平; 控制其他条件一致, 分别在 80、100、120、140、160 r/min 的振荡频率下进行洗脱, 检测结果, 选择最优振荡频率水平。从单因素实验中选择显著 ( $P < 0.05$ ) 的因素, 在最佳结果对应水平左右均匀选出 3 个水平, 为后续响应面试验铺垫[9]。

### 3.3.2. 脱酸响应面试验设计

在单因素试验的基础上，选取对感官评分影响显著的 3 个因素，利用 Box-Behnken 试验设计与分析进行 3 因素 3 水平响应面优化。

## 4. 实验结果

### 4.1. 溶液中正己烷含量对降低酚酸含量的影响

先固定其他变量，洗脱温度为 40℃，振动频率为 120 r/min，洗脱时间为 30 min，分别加入正己烷浓度在 5%、10%、15%、20%、25%的正己烷 - 乙醇溶液，进行反应，然后通过 HPLC 检测白果酸含量计算出银杏酚酸的总含量。

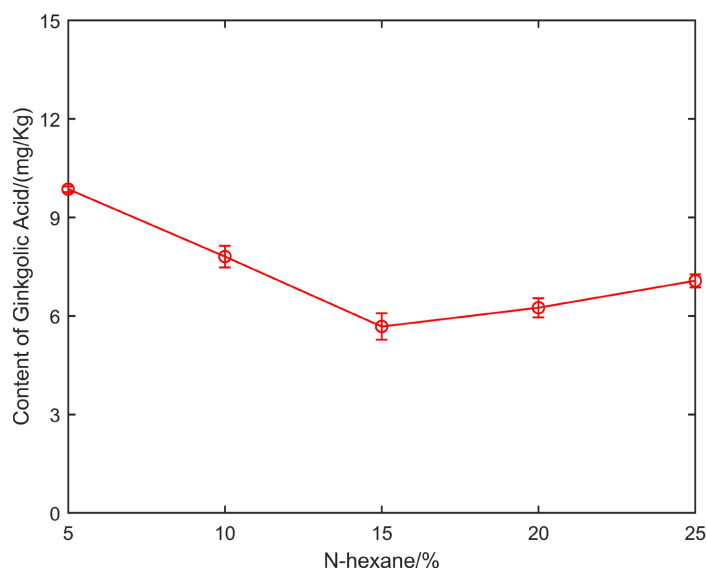


Figure 3. Effect of n-hexane concentration on the content of ginkgolic acid

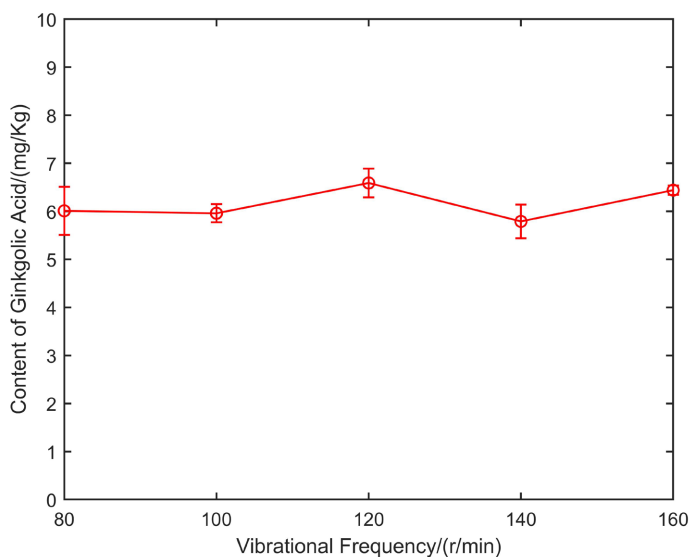
图 3. 正己烷浓度对银杏酚酸含量的影响

通过单因素方差分析，如图 3 所示，淀粉浆浓度该因素的  $P < 0.01$ ，即对结果非常显著，如图所示，在正己烷浓度从 5% 到 15%，银杏酚酸含量逐渐减少，白果酸的极性跟接近于正己烷，并且白果酸占总银杏酚酸比例较高，故总酸含量显著降低，在浓度为 15% 酚酸含量降至最低；从 15%~25%，由于白果粉中部分金属离子与乙醇和正己烷逐渐形成了配位化合物，正己烷的相对浓度反而下降，拟优选 10%~20% 范围进行后续优化。

### 4.2. 振动频率对降低酚酸含量的影响

先固定其他变量，洗脱温度为 40℃，正己烷浓度为 15%，洗脱时间为 30 min，分别设置卧式振荡床转速在 80、100、120、140、160 r/min，进行反应，然后通过 HPLC 检测白果酸含量计算出银杏酚酸的总含量。

通过单因素方差分析，如图 4 所示，振动频率浓度该因素的  $P > 0.05$ ，即对结果不显著，振荡频率的快慢一定程度上可以改变提取的速率，然而一方面由于酚酸含量较低容易提取，一方面是在其他提取条件，如温度和正己烷浓度的影响远超振动频率的影响；根据低能效原则，在影响不显著的情况下，可以不选择进行后续优化实验。

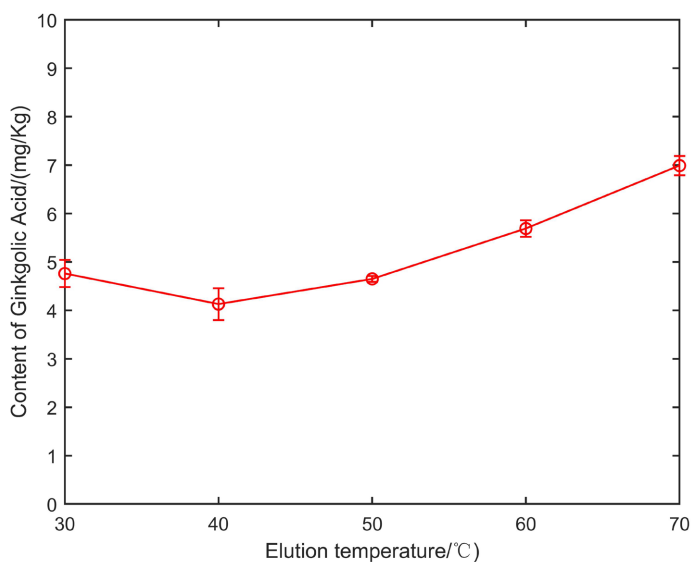


**Figure 4.** Effect of vibration frequency on the content of ginkgolic acid  
**图 4.** 振动频率对银杏酚酸含量的影响

#### 4.3. 洗脱温度对降低酚酸含量的影响

先固定其他变量，振动频率为 80 r/min，正己烷浓度为 15%，洗脱时间为 30 min，分别设置卧式振荡床保持恒温在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 进行反应，然后通过 HPLC 检测白果酸含量计算出银杏酚酸的总含量。

通过单因素方差分析，如图 5 所示，洗脱温度该因素的  $P < 0.01$ ，即对结果非常显著；在洗脱温度从 30℃ 到 40℃，银杏酚酸含量逐渐减少，正常大气压下，正己烷在乙醇内的最适溶解温度为 33℃，而在封闭环境下气压高于外界大气压，最适溶解温度有所上升，故提取效果变好；从 40℃ 到 70℃，由于乙醇逐渐接近沸点，正己烷的溶解性下降导致洗脱效果下降，拟优选 30℃ 到 50℃ 范围进行后续优化。



**Figure 5.** Effect of elution temperature on the content of ginkgolic acid  
**图 5.** 洗脱温度对银杏酚酸含量的影响

#### 4.4. 洗脱时间对降低酚酸含量的影响

先控制其他变量一致, 振动频率为 80 r/min, 正己烷浓度为 15%, 洗脱温度为 40℃, 分别设置洗脱的时间为 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 进行反应, 然后通过 HPLC 检测白果酸含量计算出银杏酚酸的总含量。

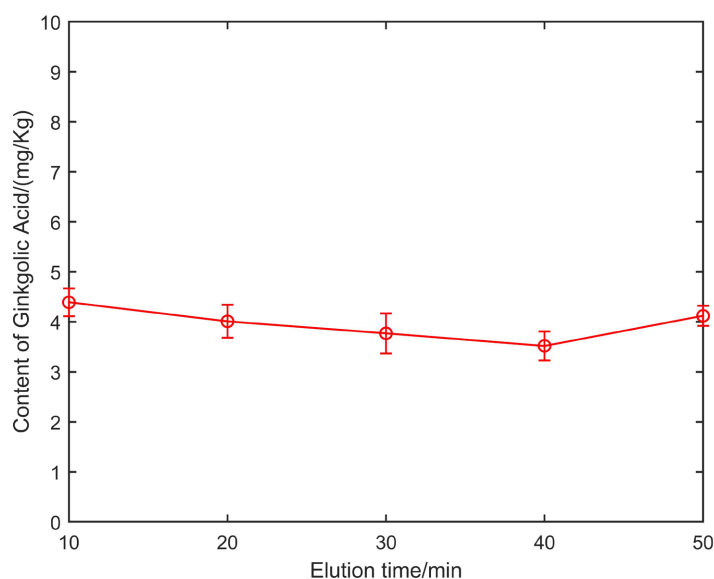


Figure 6. Effect of elution time on the content of ginkgolic acid

图 6. 洗脱时间对银杏酚酸含量的影响

通过单因素方差分析, 如图 6 所示, 洗脱时间该因素的  $P < 0.05$ , 即对结果显著, 洗脱时间的长短一定程度上可以改变提取的总量, 由于在一定时间后达到提取饱和故提取量不再增加, 拟优选 20~40 min 范围进行后续优化。

#### 4.5. Box-Behnken 试验结果与分析

在单因素试验的基础上, 以银杏酚酸含量(Y)为响应值, 以对影响显著的 3 个因素正己烷浓度(A)、洗脱温度(B)和洗脱时间(C)为考察因素, Box-Behnken 试验结果与分析见表 1。

Table 1. Optimization of removing ginkgolic acid technology parameters by Box-Behnken

表 1. Box-Behnken 法优化脱银杏酚酸参数

Run	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response 1
	A: 正己烷浓度	B: 洗脱温度	C: 洗脱时间	银杏酚酸含量
	%	℃	min	mg/kg
1	15	30	20	6.53
2	15	40	30	2.85
3	20	50	30	5.13
4	15	30	40	5.79
5	15	40	30	2.84
6	10	50	30	8.33

## Continued

7	20	30	30	6.49
8	20	40	40	5.21
9	15	40	30	2.81
10	15	40	30	2.79
11	15	50	20	5.66
12	20	40	20	4.01
13	10	40	20	7.52
14	15	40	30	2.86
15	10	30	30	9.03
16	10	40	40	6.47
17	15	50	40	5.91

运用 Design expert 里面的软件对表 3.3 中得分进行拟合, 得回归方程:  $Y = 2.83 - 1.31*A - 0.3513*B - 0.425*C - 0.1650*AB + 0.5625AC + 0.2475BC + 2.12A^2 + 2.29B^2 + 0.8500C^2$ , 将上述回归方程进行方差分析, 结果如表 2 所示。

**Table 2.** Analysis of variance of response surface test results

**表 2.** 响应面试验结果方差分析

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	significant
Model	64.88	9	7.21	130.49	<0.0001	**
A-正己烷浓度	13.81	1	13.81	249.93	<0.0001	**
B-洗脱温度	0.987	1	0.987	17.87	0.0039	**
C-洗脱时间	0.0144	1	0.0144	0.2616	0.0448	*
AB	0.1089	1	0.1089	1.97	0.2031	
AC	1.27	1	1.27	22.91	0.002	**
BC	0.245	1	0.245	4.44	0.0732	
A <sup>2</sup>	18.97	1	18.97	343.34	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	22.13	1	22.13	400.54	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	3.04	1	3.04	55.06	0.0001	**
Residual	0.3867	7	0.0552			
Lack of Fit	0.3833	3	0.1278	150.32	0.1128	
Pure Error	0.0034	4	0.0008			
Cor Total	65.27	16				

注: “\*”表示对结果影响显著( $P < 0.05$ ); “\*\*”表示对结果影响极显著( $P < 0.01$ )。

由表 2 可知, 所建立模型的  $P < 0.001$  显著; 失拟项  $P > 0.05$ , 不显著, 表明模型具有较高可靠性; 调整决定系数  $RA_{aj} = 0.9865$  表明银杏酚酸含量的变化有 98.65% 来源于正己烷浓度、洗脱温度和洗脱时间; 信噪比(signal-to-noise, S/N) = 32.81 > 4, 也从另一个方面表明此模型是可靠的。经方差分析, 3 个因素对降低银杏酚酸含量影响的主次顺序为  $A > B > C$ , 即正己烷浓度 > 洗脱温度 > 洗脱时间。

利用 Design Expert 8.0.5 软件对所得的回归方程进行逐步回归, 确定最佳工艺参数正己烷含量为



16.69%，洗脱温度为 41.73℃，洗脱时间为 28.02 min，此时银杏酚酸的含量预测值为 2.29 mg/kg，小于规定的 5 mg/kg，可以采用。为了便于实际操作，将最佳工艺参数修订为正己烷含量 17%、洗脱温度 42℃、洗脱时间 30 min，在此最优条件下，银杏酚酸的总含量为 2.31 mg/kg，与模型预测值(2.25 mg/kg)较一致，验证了模型的可靠性。

## 5. 结论

本文主要对白果粉中银杏酚酸进行脱除实验工艺参数优化，主要采用正己烷-乙醇混合溶液洗脱法进行实用化工艺尝试，获得如下结果或结论：

- 1) 通过预蒸煮、复合型有机“绿色”溶剂洗脱，可有效降低白果粉中银杏酚酸含量；
- 2) 采用响应面法获得较优条件，为满足实际生产应用，再进行工艺参数的整数修订，具体结果如下：正己烷含量 17%、洗脱温度 42℃、洗脱时间 30 min，在此最优条件下，银杏酚酸的总含量为 2.31 mg/kg；
- 3) 利用最优工艺参数，制备的实验样品，完全符合国家药典 2020 版标准对酚酸含量的限定要求，满足制药标准。

## 基金项目

江苏省科技项目(苏北科技专项)(编号 XZ-SZ202133)、佛山市科技创新专项资金(2015IT100015)。

## 参考文献

- [1] 李月娣. 银杏价值及其产业现状分析[J]. 长春大学学报, 2017, 27(2): 32-37.
- [2] 陈柏林, 邹敏敏, 苏二正, 汪贵斌, 郭起荣, 王佳宏, 曹福亮. 银杏果食药物质基础及其加工利用现状[J]. 生物加工过程, 2020, 18(6): 758-765+774.
- [3] 史垠垠. 白果饮料加工工艺及稳定性研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京林业大学, 2010.
- [4] 李颜, 郭澄. 银杏提取物中银杏酚酸类物质的毒性和药理活性研究进展[J]. 中国药业, 2021, 30(16): 1-5.
- [5] 唐仕荣, 巫永华, 李超, 顾绍辉, 顾立瑞. 低银杏酸速溶银杏果粉的加工工艺研究[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 116-122.
- [6] Yao, Q.-Q., Li, L., Xu, M.-C., Hu, H.-H., Zhou, H., Yu, L.-S. and Zeng, S. (2018) The Metabolism and Hepatotoxicity of Ginkgolic Acid (17 : 1) *in vitro*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **16**, 829-837. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30124-9](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30124-9)
- [7] 刘俊峰. 白果粉中银杏酚酸脱除工艺研究[D]: [硕士学位论文]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [8] Fan, G.-J., Wang, X., Wu, C.-E., Pan, H.-M., Yang, J.-T., Li, T.-T., Tang, Z.-X. and Cao, F.-L. (2017) Effect of Heating on the Content and Composition of Ginkgolic Acids in Ginkgo Seeds. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, **9**, 195-199. <https://doi.org/10.3920/QAS2015.0833>
- [9] Hecker, H., Johannisson, R., Koch, E., *et al.* (2002) *In vitro* Evaluation of the Cytotoxic Potential of Alkylphenols from Ginkgo Biloba. *Toxicology*, **177**, 167-177. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00189-0)
- [10] Lepoittevin, J.P., Benezra, C. and Asakawa, Y. (1989) Allergic Contact Dermatitis to Ginkgo Biloba L.: Relationship with Urushiol. *Archives of Dermatological Research*, **281**, 227-230. <https://doi.org/10.1007/BF00431055>
- [11] Ahlemeyer, B. (2003) Pharmacological Studies Supporting the Therapeutic Use of Ginkgo Biloba Extract for Alzheimer's Disease. *Pharmacopsychiatry*, **1**, 58-60.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 435.
- [13] 孟东. 银杏果中银杏酸的快速提取与高效液相色谱分析[J]. 食品科技, 2020, 45(5): 314-318+322.
- [14] 张思珏. 银杏酸的药理毒理作用及脱酸方法研究进展[J]. 中国社区医师, 2019, 35(8): 16-17.