

超声辅助碱液脱除白果中银杏酚酸工艺优化

龚君豪¹, 修效友^{2*}, 徐涛¹, 惠爱玲¹, 吴泽宇¹, 张文成^{1*}

¹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

²安徽德昌药业股份有限公司, 安徽 亳州

收稿日期: 2023年9月25日; 录用日期: 2023年10月8日; 发布日期: 2023年11月14日

摘要

本文采用固定功率超声辅助碱液降低白果中银杏酚酸的含量, 建立一种降低白果粉中银杏酚酸类致敏物质的新工艺。作者探究了萃取时间、萃取温度、碱液中甘油添加量的单因素影响, 并进一步通过正交法优选出工艺参数: 超声萃取时间40 min、萃取温度40℃、碱液中甘油添加量15‰, 此条件下银杏酚酸含量为1.35 μg/ml, 符合国家药典2020版标准。

关键词

超声辅助, 白果, 银杏酚酸, 工艺优化

Technology Optimization of Removing Ginkgolic Acid from *Ginkgo biloba* by Ultrasound Assisting Alkaline Solution

Junhao Gong¹, Xiaoyou Xiu^{2*}, Tao Xu¹, Ailing Hui¹, Zeyu Wu¹, Wencheng Zhang^{1*}

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

²Anhui Dechang Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou Anhui

Received: Sep. 25th, 2023; accepted: Oct. 8th, 2023; published: Nov. 14th, 2023

Abstract

In this paper, fixed power ultrasound assisting alkaline solution was used to reduce the content of ginkgolic acid in *Ginkgo biloba* and establish a new process for reducing the allergenic substances

*通讯作者。

文章引用: 龚君豪, 修效友, 徐涛, 惠爱玲, 吴泽宇, 张文成. 超声辅助碱液脱除白果中银杏酚酸工艺优化[J]. 药物化学, 2023, 11(4): 242-249. DOI: 10.12677/hjmce.2023.114029

of ginkgolic acid in *Ginkgo biloba* powder. The authors explored the single-factor effects of extraction time, extraction temperature, and the amount of glycerol added to the alkaline solution, and further optimized the process parameters through orthogonal design: extraction time of 40 minutes, extraction temperature of 40°C and the amount of glycerol added to the alkaline solution of 15%. Under this condition, the ginkgolic acid content is 1.35 µg/ml, which meets the standard of the National Pharmacopoeia 2020 edition.

Keywords

Ultrasound Assisting, *Ginkgo biloba*, 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

《本草纲目》中已经有记载，白果具有敛肺定喘、止带浊、缩小便的功效等[1]。白果是药食兼备的天然资源，富含蛋白质、脂肪和淀粉等物质，具有一定的食用价值[2]。将白果加工成固体饮料或粉冲剂[3] [4]，食用方便，保质期延长；若对其复配脱脂奶粉等，可开发成营养更全面的即食粉[5]。而《食物本草》中最早记载了银杏的毒性和解毒方法，后世历代医家多认为银杏有毒或小毒[6] [7]。虽然银杏酚酸具有多种生物活性，如抗菌、抗炎、抗肿瘤等活性[8] [9] [10] [11] [12]，但是其对人体的副作用受到更高关注和限制，特别是有致敏性和致突变毒性，或是银杏制品引起临床不良反应的主要物质，故银杏酚酸类的限量是评价银杏制品质量的指标之一。目前，欧美等国家银杏提取物生产标准要求必须将银杏酸含量控制在 5 ppm 以下或更低。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 [13]。

关于白果中酚酸脱除或提取方面也有相关报道，如黄莉清等采用正交实验筛选加热回流提取条件，有机溶剂萃取结合柱层析方法分离纯化银杏酚酸，生长速率法测定银杏酚酸对植物病原真菌菌丝抑制率[14]；于秋菊等采用 Box-Behnken 响应面法优化微波辅助乙醇提取银杏酚酸的最佳工艺，并研究其体外抗肿瘤活性[15]；康津铭等采用正己烷 - 乙醇混合溶剂降低银杏酚酸的含量，建立一种低酚酸白果粉的工艺[16]；上述报道中脱除银杏酚酸如果采用复合溶剂，则回收较难、污染也较重等不足；鉴于银杏酚酸属于脂溶性化合物，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，由于存在一些副产物，如果在碱液中添加一定量脂溶性组分，可实现萃取和中和的联合脱除酚酸效果，为确保银杏酚酸含量在标准范围之内，提高食用白果的安全性，本文拟采用复合碱液进行脱银杏酚酸的工艺研究，为提高效率，又辅助超声处理，以制作一种稳定性良好、营养健康、食用方便的低银杏酚酸白果粉。

2. 材料与仪器设备

主要材料：市售白果；食用级碳酸钠和甘油(国药集团化学试剂公司)；色谱甲醇(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；KQ300 型超声处理器，昆山超声仪器公司；FD-1 冷冻干燥机，北京博医康技术公司。

3. 实验方法

3.1. 白果粉中银杏酚酸含量的检测方法[16]

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[17]。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, 梯度萃取; 检测波长为 310 nm。

参照文献[14], 进行对照品溶液的制备、供试品溶液的制备, 以及标准曲线绘制, 根据白果酸(C15:1) 标品(纯度 90%)做出标准曲线, 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。

3.2. 实验设计

3.2.1. 脱酸单因素试验设计

根据碱中和及相似相容原理, 采用碳酸钠溶液添加一定量甘油进行萃取。精准称取 0.500 g 白果粉于 10 mL 离心管中, 加入 5 mL 一定比例的甘油 - 碱液, 在固定频率 40 KHZ、固定功率 300 W 的条件下, 在 3000 r/min 转速下离心 12 min, 固体物质真空冷冻干燥; 样品用甲醇超声提取去酸后获得萃取液, 使用高效液相色谱仪检测其银杏酚酸含量。

对萃取时间、萃取温度、碱液中甘油浓度 3 个因素检测其对脱银杏酚酸的变化规律: 1) 萃取时间作用规律, 在其它参数不变的情况下, 分别考察萃取时间为 10、20、30、40、50 min 条件下的作用效果; 2) 萃取温度, 在其它参数不变的情况下, 分别考察萃取温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的作用效果; 3) 碱液中甘油浓度, 在其它参数不变的情况下, 分别考察碱液中甘油浓度为 5%、10%、15%、20%、25% 条件下的作用效果; 分别检测试验结果, 选择较优的范围。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, 为后续正交试验设计提供依据。

3.2.2. 脱酸正交试验设计

在单因素试验的基础上, 选取对降低银杏酚酸含量影响显著的 3 个因素, 利用正交试验设计与分析进行 3 因素 3 水平优化。

4. 实验结果

4.1. 萃取时间对降低银杏酚酸含量的影响

控制其它参数不变, 即设置萃取温度为 40 $^{\circ}\text{C}$, 碱液中甘油浓度为 15%, 在此条件下, 分别对样品进行 10、20、30、40、50 min 的萃取处理, 萃取处理后, 制粉。精确称取经过两次处理后的银杏粉样品 0.5 g, 向其中加入精确量取的甲醇 5 ml, 混合后称出总重量。超声辅助萃取样品中的银杏酚酸, 超声提取后置于阴凉处直至常温, 再补足萃取过程中甲醇的蒸发量, 摇匀, 过滤。取滤液进行 HPLC 检测, 得出总银杏酸含量, 结果见图 1。

由图 1 可知, 随着萃取时间不断延长, 样品中的银杏酚酸含量呈现不断降低又有所波动的趋势, 且在萃取时间为 40 min 时银杏酚酸含量最低, 即此条件下银杏酚酸的脱除效率最高, 可能是游离的银杏酚酸基本被脱除, 如果降低到一定含量, 再增加萃取时间, 意义不大, 且存在人为误差等原因形成微小波动; 所以选择萃取时间 40 min 左右为较优条件。

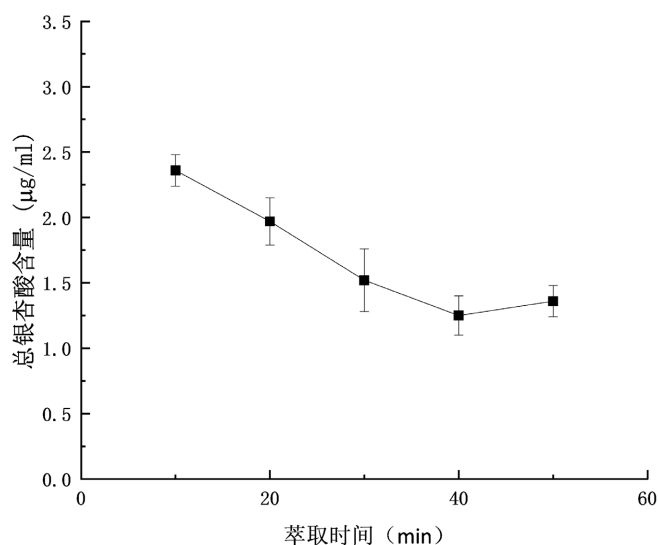


Figure 1. Effect of extraction time on the content of ginkgolic acid

图 1. 萃取时间对银杏酚酸含量的影响

4.2. 萃取温度对降低银杏酚酸含量的影响

控制其它变量不变, 即设置萃取时间为 30 min, 碱液中甘油浓度为 15%, 在此条件下, 分别将样品置于 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 的条件下, 进行超声辅助萃取去酸, 萃取处理后, 制粉。精确称取经过两次处理后的银杏粉样品 0.5 g, 向其中加入精确量取的甲醇 5 ml, 混合后称出总重量。超声辅助提取样品中的银杏酚酸, 超声萃取后置于阴凉处直至常温, 再补足萃取过程中甲醇的蒸发量, 摇匀, 过滤。取滤液进行 HPLC 检测, 得出总银杏酚酸含量, 结果见图 2。

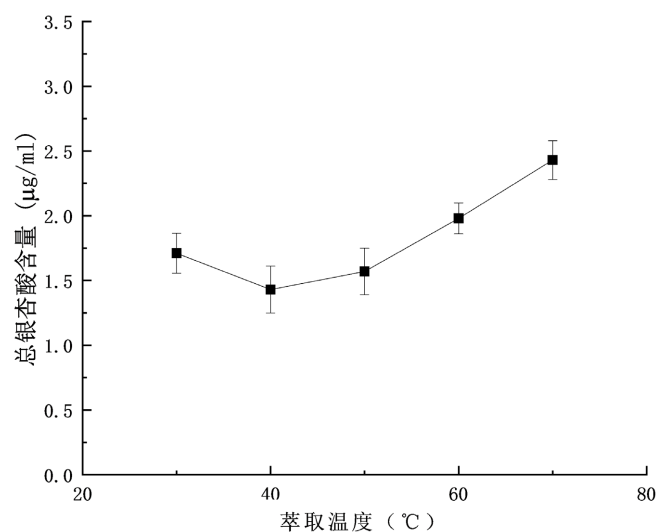


Figure 2. Effect of extraction temperature on the content of ginkgolic acid

图 2. 萃取温度对银杏酚酸含量的影响

由图 2 可知, 随着萃取温度不断上升, 样品中的银杏酚酸含量呈现先降低后上升的趋势, 且在萃取温度为 40℃ 时银杏酚酸含量最低, 即此条件下银杏酚酸的脱除效率最高, 所以选择萃取温度 40℃ 左右为

最佳条件。

推测出现这种结果的原因可能是：在封闭环境下加热，气压有所增加，甘油在碱液内的最适溶解温度上升至 40℃左右，故提取效果变好；从 40℃到 70℃，由于甘油的溶解度降低，银杏酚酸的溶解性下降导致萃取效果下降。

4.3. 碱液中甘油浓度对降低银杏酚酸含量的影响

控制其他变量不变，即设置萃取温度为 40℃，萃取时间为 30 min，在此条件下，分别用 5‰、10‰、15‰、20‰、25‰浓度的甘油碱液对样品萃取处理，萃取处理后，制粉。精确称取经过两次处理后的银杏粉样品 0.5g，向其中加入精确量取的甲醇 5 ml，混合后称出总重量。超声辅助提取样品中的银杏酚酸，超声提取后置于阴凉处直至常温，再补足提取过程中甲醇的蒸发量，摇匀，过滤。取滤液进行 HPLC 检测，得出总银杏酸含量，结果见图 3。

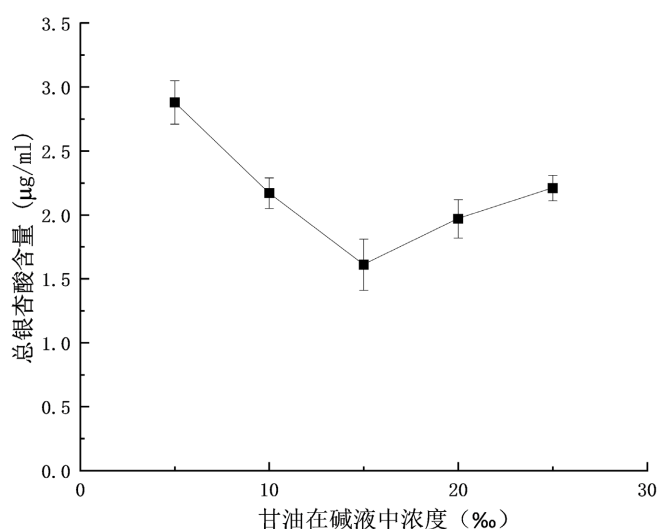


Figure 3. Effect of concentration of glycerol in alkaline solution on the content of ginkgolic acid

图 3. 甘油在碱液中浓度对银杏酚酸含量的影响

由图 3 可知，随着萃取碱液中甘油浓度不断上升，样品中的银杏酚酸含量呈现先降低后上升的趋势，且在甘油浓度为 15‰时银杏酚酸含量最低，即此条件下银杏酚酸的脱除效率最高，所以选择甘油浓度为 15‰左右为最佳条件。

4.4. 正交试验结果

Table 1. Orthogonal test results

表 1. 正交试验结果

试验号	因素			试验指标
	A	B	C	
	萃取温度 ℃	萃取时间 min	甘油浓度 ‰	总银杏酸含量 µg/ml
1	1 (30)	1 (20)	1 (10)	2.04
2	1	2 (30)	2 (15)	1.69

Continued

3	1	3 (40)	3 (20)	1.73	
4	2 (40)	1	2	1.42	
5	2	2	3	1.45	
6	2	3	1	1.66	
7	3 (50)	1	3	1.55	
8	3	2	1	2.10	
9	3	3	2	1.59	
K1	5.46	5.01	5.8		
K2	4.53	5.24	4.7		
K3	5.24	4.98	4.73		
k1	1.82	1.67	1.93		T = K1 + K2 + K3 = 16.27
k2	1.51	1.75	1.57		
k3	1.75	1.66	1.58		
R	0.31	0.09	0.36		
因素主→次		CAB			
最优组合条件		C ₂ A ₂ B ₃			

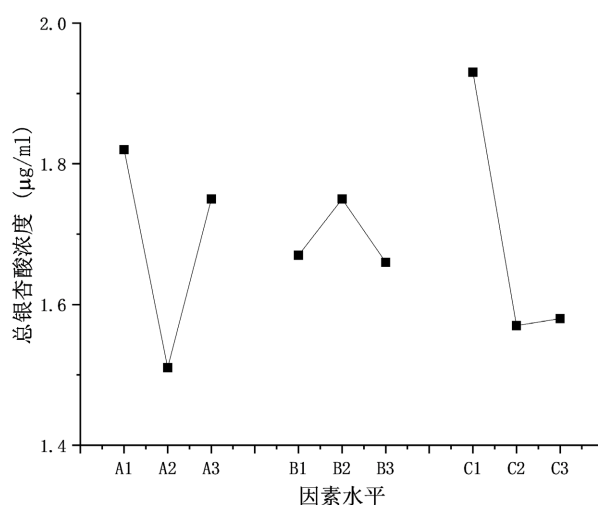


Figure 4. Trend chart of the relationship between factors and indicators

图 4. 因素与指标关系趋势图

由表 1、图 4 中的结果或变化趋势可得，甘油碱液萃取降低银杏酚酸含量实验中各个因素对于脱除样品中银杏酚酸的影响从大到小依次为：甘油浓度 > 萃取温度 > 萃取时间。极差分析得到的最优实验组合为 C₂A₂B₃，即甘油在碱液中浓度为 15%，萃取温度为 40℃，超声辅助萃取时间为 40 min，银杏酚酸含量降低到 1.35 µg/ml。

4.5. 白果粉速溶性结果

4.5.1. 添加剂对银杏粉湿润下沉性的影响

分别取添加了相当于银杏粉质量 0%、2.5%、5%、7.5% 麦芽糊精的银杏粉样品及添加了相当于银杏

粉质量 0%、2.5%、5%、7.5% β -环糊精的银杏粉样品置于装有 100 ml 沸水的 250 ml 烧杯中，使其在水面上分散开，使用玻璃棒沿着同一方向缓慢搅拌，记录样品完全湿润下沉所需要的时间，结果见图 5。

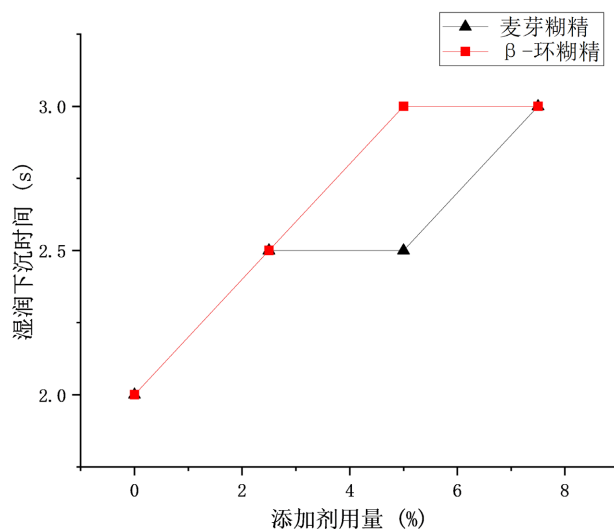


Figure 5. Effect of additive dosage on the wetting and sinking properties of ginkgo powder

图 5. 添加剂用量对银杏粉湿润下沉性的影响

由图 5 可知，加入添加剂的银杏粉样品(无论加入的是麦芽糊精还是 β -环糊精)湿润下沉时间大于未添加组，而且随着添加剂用量的上升，湿润下沉时间也存在上升趋势。所以，可以得出结论，添加剂的加入会一定程度提高银杏粉的稳定性。

4.5.2. 银杏粉颗粒大小对银杏粉湿润下沉性的影响

分别取经过 30、50、60、80 目筛的银杏粉样品 1.0 g 置于装有 100 ml 沸水的 250 ml 烧杯中，使其在水面上分散开，使用玻璃棒沿着同一方向缓慢搅拌，记录样品完全湿润下沉所需要的时间，结果见图 6。

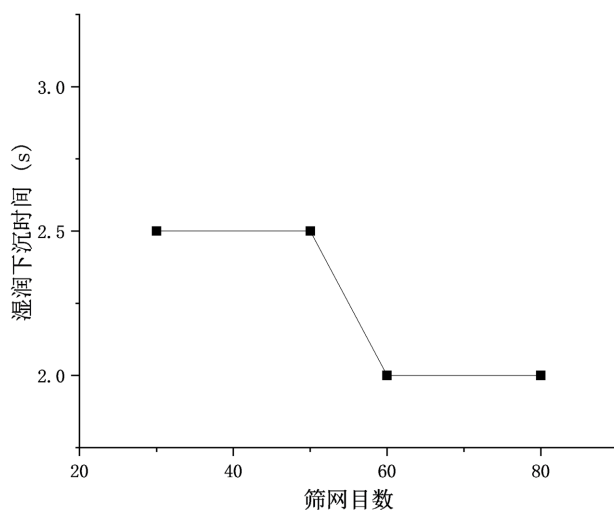


Figure 6. Effect of mesh size on the wetting and sinking properties of ginkgo powder

图 6. 筛网目数对银杏粉湿润下沉性的影响

由图 6 可知, 随着银杏粉样品所过筛网越细, 则样品的湿润下沉时间有减少的趋势。所以, 可以认为银杏粉样品的颗粒大小对银杏粉速溶性有一定影响——颗粒越细, 速溶性越强。

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, 主要采用超声辅助甘油碱液萃取法进行实用化工艺尝试, 获得如下结果或结论:

- 1) 通过超声辅助、甘油碱液“绿色”溶剂萃取, 可有效降低白果粉中银杏酚酸含量;
- 2) 采用正交试验法获得较优条件: 在固定频率 40 KHZ、固定功率 300 W 的条件下, 甘油在碱液中浓度为 15%, 萃取温度为 40℃, 超声辅助萃取时间为 40 min, 银杏酚酸含量降低到 1.35 μg/ml;
- 3) 添加麦芽糊精、β-环糊精, 一定程度提高银杏粉的稳定性, 且颗粒度越小, 速溶性越高;
- 4) 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)。

参考文献

- [1] 曾昭龙, 主编. 实用临床中药学[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2020.
- [2] 施维, 才颖, 黄缨, 主编. 中华颐养书: 水果蔬菜颐养方[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2020.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 郑伟然, 韩兆忠, 王正宽, 等. 银杏类制剂安全性研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(3): 437-443.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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**, 18-26. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30124-9](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30124-9)
- [9] 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.
- [10] Hecker, H., Johannisson, R., Koch, E. and Siegers, C.-P. (2002) *In Vitro* Evaluation of the Cytotoxic Potential of Alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. *Toxicology*, **177**, 167-177. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00189-0)
- [11] Kanowski, S., Herrman, W.M., Stephan, K., Wierich, W. and Hörr, R. (1997) Proof of Efficacy of the *Ginkgo biloba* Special Extract EGb 761 in Outpatients Suffering from Mild to Moderate Primary Degenerative Dementia of the Alzheimer Type or Multi-Infarct Dementia. *Phytomedicine*, **4**, 3-13. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(97\)80021-9](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(97)80021-9)
- [12] 杨波, 杜岳峰, 马帅军. 银杏酚酸通过 ERK-JNK-AKT 途径诱导前列腺癌细胞 p53 依赖性凋亡[J]. 山西医科大学学报, 2022, 53(5): 532-541.
- [13] 中华人民共和国药典(2020 年版: 一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 435.
- [14] 黄莉清, 张正红, 苏娇娇, 胡珊, 王黔阳, 彭丽娟, 何珺. 白果外种皮中银杏酚酸提纯及其抑菌活性初探[J]. 化学与粘合, 2023, 45(3): 193-196, 213.
- [15] 于秋菊, 耿凤英, 张梦蝶. Box-Behnken 响应面法优化银杏酚酸提取工艺及其抗肿瘤活性的研究[J]. 化学研究与应用, 2022, 34(4): 842-849.
- [16] 康津铭, 王春春, 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. <https://doi.org/10.12677/HJMce.2023.112007>
- [17] 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.