

# 基于AHP-熵权法结合正交试验优选银杏叶传统水提纯化工艺



姜誉弘<sup>1</sup>, 邹恺平<sup>2</sup>

1. 南京中医药大学附属医院(江苏省中医院)药学部(南京 210029)

2. 南京中医药大学附属医院(江苏省中医院)制剂部(南京 210029)

**【摘要】**目的 优选银杏叶最佳传统水提工艺和纯化工艺。方法 以总银杏酸转移率、总黄酮醇苷转移率和出膏率为考察指标,采用层次分析法(AHP)-熵权法确定权重系数,在单因素试验的基础上,采用正交试验优选出银杏叶的最佳水提和纯化工艺。结果 最佳水提工艺为:银杏叶饮片装量比为1/2,加8倍水,提取2次,每次30 min;最佳纯化工艺为:水提药液减压浓缩至相对密度1.08,4℃静置48 h,静置后的上层药液2 029×g离心5 min。结论 该方法稳定可行,能最大程度地去除有害成分总银杏酸,保留有效成分总黄酮醇苷。

**【关键词】**银杏叶;水提;纯化;总银杏酸;总黄酮醇苷;层次分析法-熵权法

## Optimization of traditional water extraction and purification process for Ginkgo folium based on AHP-entropy weight method combined with orthogonal experiment

JIANG Yuhong<sup>1</sup>, ZOU Kaiping<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine (Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine), Nanjing 210029, China

2. Department of Preparation, The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine (Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine), Nanjing 210029, China

Corresponding author: ZOU Kaiping, Email: zkp1987@126.com

**【Abstract】**Objective To optimize the traditional water extraction and purification process of Ginkgo folium. Methods Using the transfer rate of total ginkgolic acid, transfer rate of total flavonol glycosides, and extraction rate as evaluation indicators, the weight coefficient was determined by analytic hierarchy process (AHP)-entropy weight method. On the basis of single factor experiments, the optimal water extraction and purification process for Ginkgo folium were selected through orthogonal experiments. Results The optimum water extraction process was as follows: the ratio of ginkgo leaf pieces was 1/2, adding 8 times of water, decocting twice, and 30 min for each time. The optimum purification process was as follows: the water extract was concentrated under reduced pressure to a relative density of 1.08 and stewing at 4℃ for 48 h, and the upper layer of medicine liquid after stewing was centrifugated for 5 min at 2 029×g. Conclusion The method is stable and feasible, which can remove the harmful component, total ginkgolic acid to the greatest

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202312016

基金项目: 南京药学会—常州四药医院药学科科研基金资助项目(2020YX012)

通信作者: 邹恺平, 硕士, 主管中药师, Email: zkp1987@126.com

<https://zgys.whuzhmedj.com>

extent possible, and retain the effective component, total flavonol glycosides.

**【Keywords】** Ginkgo folium; Water extraction; Purification; Total ginkgolic acids; Total flavonol glycosides; Analytic hierarchy process-entropy weight

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶, 具有活血化瘀、通络止痛、敛肺平喘、化浊降脂的功效, 用于瘀血阻络、胸痹心痛、中风偏瘫、肺虚咳喘、高脂血症<sup>[1]</sup>。现代医学常用其治疗糖尿病<sup>[2]</sup>、高血压<sup>[3-4]</sup>、阿尔兹海默症<sup>[5]</sup>等, 在药品、保健品、化妆品等领域应用也十分广泛。银杏叶含特有的生物活性成分, 主要为总黄酮醇苷、银杏内酯、总银杏酸等, 其中总黄酮醇苷<sup>[6]</sup>的主要功效为抗氧化性, 银杏内酯有血小板拮抗作用, 总银杏酸被认定为主要毒性成分<sup>[7]</sup>, 具有免疫毒性、致敏性和细胞毒性, 过度服用可导致腹痛、腹泻、过敏性皮炎等不良反应发生, 但也有研究表明总银杏酸具有显著的抗肿瘤活性<sup>[8]</sup>, 对致病真菌球黑孢霉、链格孢霉、扩展青霉有抑制作用<sup>[9]</sup>, 故其药用价值备受争议。

现代制剂中应用的主要是银杏叶提取物, 且对其中总银杏酸的去除均采用化学纯化法, 如溶剂萃取法<sup>[10]</sup>、超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取法<sup>[11]</sup>、大孔树脂脱除法<sup>[12]</sup>等, 但这些方法均不适用于现在备案制要求下的医疗机构制剂开发。为此本研究旨在传统工艺配制中药制剂(以下简称“传统中药制剂”)的前提下, 考察银杏叶提取、纯化过程对总银杏酸转移率和总黄酮醇苷转移率的影响, 在保证其安全有效的前提下, 应用于更多传统中药制剂的开发。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

WatersAcquity Arc 型高效液相色谱仪, 包括 2489 检测器和 Empower 工作站(美国沃特世公司); SK6200H 型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司); DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); AX224ZH/E 型万分之一电子分析天平(奥豪斯仪器有限公司); BP211D 型十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司); ST16 型高速离心机(美国赛默飞世尔科技公司); I-100 型旋转蒸发仪(瑞士步琦有限公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

白果新酸(批号: 111690-201805, 纯度

99.7%)、总银杏酸(定位用, 批号: 111594-201605)、槲皮素(批号: 100081-201610, 纯度 99.1%)、山柰素(批号: 110861-202013, 纯度 93.2%)等对照品均购自中国食品药品检定研究院; 异鼠李素对照品(上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号: C13366424, 纯度 ≥ 98.0%); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯, 水为超纯水。

银杏叶饮片(安徽鑫泰药业有限公司, 产地: 江苏邳州, 批号: 201101)经江苏省中医院刘志辉主任中药师鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定

#### 2.1.1 供试品溶液的制备

精密吸取水提液 5 mL 置锥形瓶中, 加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)的混合溶液 20 mL, 称重, 加热回流 30 min, 放冷, 加混合溶液补足重量, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

#### 2.1.2 对照品溶液的制备

分别精密称取槲皮素、异鼠李素、山柰素和白果新酸对照品适量, 加甲醇配制成浓度分别为 1.070 0、0.417 2、1.056 0、1.011 0 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

#### 2.1.3 色谱条件

采用 HPLC 法, 色谱柱: Agilent EC-C<sub>18</sub> 柱(100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm); 流动相: 0.4% 磷酸水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~10 min, 35%~40%B; 10~30 min, 40%~55%B; 30~40 min, 55%~90%B; 40~65 min, 90%B; 65~70 min, 90%~35%B; 70~75 min, 35%B); 检测波长: 0~40 min, 360 nm; 40~75 min, 310 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μL。HPLC 色谱图见图 1。

#### 2.1.4 线性考察

分别精密吸取上述对照品适量, 用甲醇配制成各系列浓度的标准溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 以各成分浓度为横坐标(X, μg/mL)、峰面积为纵坐标(Y)绘

制标准曲线, 计算得回归方程: 槲皮素:  $Y=3.532 \times 10^4 X+9.021 \times 10^4$  ( $r=0.9998$ ); 异鼠李素:  $Y=3.219 \times 10^4 X+4.040 \times 10^4$  ( $r=0.9998$ ); 山柰素:  $Y=2.711 \times 10^4 X+413.28$  ( $r=0.9999$ ); 白果新酸:  $Y=5062.8X-178.16$  ( $r=1.0000$ )。各成分的线性范围分别为: 1.086 7~278.200 0  $\mu\text{g/mL}$ 、0.488 9~125.160 0  $\mu\text{g/mL}$ 、0.016 5~4.224 0  $\mu\text{g/mL}$  和 0.079 0~20.220 0  $\mu\text{g/mL}$ 。

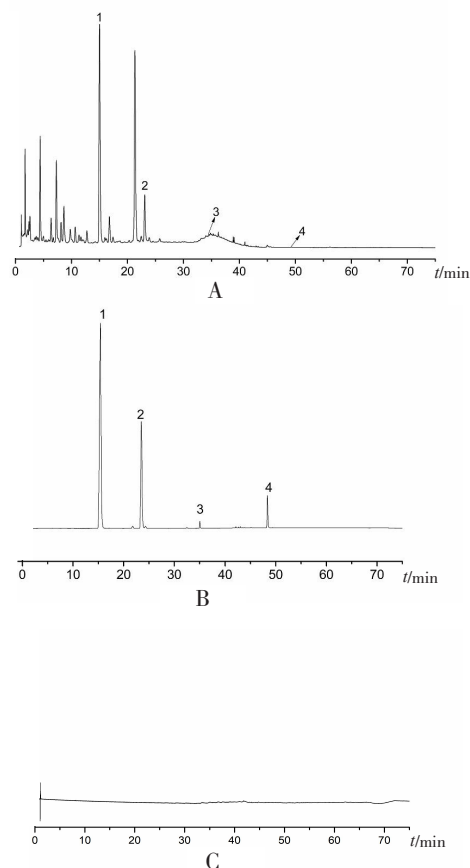


图1 HPLC色谱图

Figure 1. HPLC chromatograms

注: A. 供试品溶液; B. 混合对照品溶液; C. 空白溶剂; 1. 槲皮素; 2. 异鼠李素; 3. 山柰素; 4. 白果新酸。

### 2.1.5 精密度试验

精密吸取含槲皮素(浓度: 34.775 0  $\mu\text{g/mL}$ )、异鼠李素(浓度: 15.645 0  $\mu\text{g/mL}$ )、山柰素(浓度: 0.528 0  $\mu\text{g/mL}$ )和白果新酸(浓度: 2.527 5  $\mu\text{g/mL}$ )的混合对照品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件连续进样6次, 记录色谱图, 计算得槲皮素、异鼠李素、山柰素和白果新酸峰面积的RSD分别为0.32%、0.35%、2.00%和0.93% ( $n=6$ ), 结果表明仪器精密度良好。

### 2.1.6 稳定性试验

精密吸取同一份银杏叶水提液, 按“2.1.1”项

下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.3”项下色谱条件分别在0、2、4、6、12、24 h进样测定, 计算得槲皮素、异鼠李素、山柰素和白果新酸峰面积的RSD分别为3.85%、3.42%、4.05%和2.54% ( $n=6$ ), 结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

### 2.1.7 重复性试验

精密吸取银杏叶水提液6份, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 计算得槲皮素、异鼠李素、山柰素和白果新酸的平均含量分别为996.12、309.62、3.49和3.36  $\mu\text{g/mL}$ , 各成分的RSD分别为4.50%、3.78%、3.34%和2.84% ( $n=6$ ), 结果表明该方法重复性良好。

### 2.1.8 加样回收率试验

精密吸取已知含量的银杏叶水提液2 mL, 平行6份, 加入适量的槲皮素、异鼠李素、山柰素和白果新酸对照品溶液, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 计算各成分的加样回收率, 结果见表1。

### 2.1.9 含量测定方法

总黄酮醇苷含量 = (槲皮素含量 + 山柰素含量 + 异鼠李素含量)  $\times$  2.51; 以白果新酸为对照, 采用外标法计算总银杏酸含量<sup>[1]</sup>。指标成分的转移率(%) = 指标成分在煎煮液中的质量 / 指标成分在饮片中的质量  $\times$  100%。

## 2.2 出膏率测定

精密吸取银杏叶水提液5 mL, 置恒重蒸发皿中, 105  $^{\circ}\text{C}$ 烘干3 h, 置干燥器中冷却30 min, 精密称定重量, 按以下公式计算出膏率:

$$\text{出膏率}(\%) = \frac{\text{干膏重量}(\text{g}) \times \text{总体积}(\text{mL})}{\text{饮片重量}(\text{g}) \times \text{取样量}(\text{mL})} \times 100\%$$

## 2.3 提取工艺考察

### 2.3.1 单因素考察

以总银杏酸转移率、总黄酮醇苷转移率和出膏率为考察指标, 在固定其他3个条件不变的前提下, 分别对包煎袋装量比(0、1/4、1/2、3/4、1)、加水量(6、8、10、12倍)、提取时间(10、20、30、40 min)和提取次数(1、2、3次)进行单因素考察, 平行测定3次, 结果见图2。综合考虑各指标结果, 分别选择包煎袋装量比(1/4、1/2、3/4)、加水量(8、10、12倍)、提取时间(20、30、40 min)和提取次数(1、2、3次)进一步优化工艺。

表1 加样回收率试验结果

Table 1. Results of sample recovery rate tests

名称	样品含量 (μg)	对照品加入量 (μg)	测得量 (μg)	加样回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
槲皮素	1 486.18	1 284.00	2 731.92	97.02	95.25	2.14
	1 486.18	1 284.00	2 691.07	93.84		
	1 486.18	1 284.00	2 664.68	91.78		
	1 486.18	1 284.00	2 729.54	96.83		
	1 486.18	1 284.00	2 718.34	95.96		
	1 486.18	1 284.00	2 719.99	96.09		
异鼠李素	294.86	250.32	554.84	103.86	99.62	3.61
	294.86	250.32	539.37	97.68		
	294.86	250.32	529.05	93.56		
	294.86	250.32	547.82	101.05		
	294.86	250.32	549.32	101.65		
	294.86	250.32	544.97	99.92		
山柰素	4.09	4.22	8.59	106.50	100.20	4.13
	4.09	4.22	8.13	95.75		
	4.09	4.22	8.35	100.81		
	4.09	4.22	8.13	95.72		
	4.09	4.22	8.42	102.53		
	4.09	4.22	8.31	99.87		
白果新酸	4.42	3.24	7.55	96.72	96.04	2.47
	4.42	3.24	7.60	98.28		
	4.42	3.24	7.51	95.66		
	4.42	3.24	7.40	92.20		
	4.42	3.24	7.60	98.56		
	4.42	3.24	7.48	94.82		

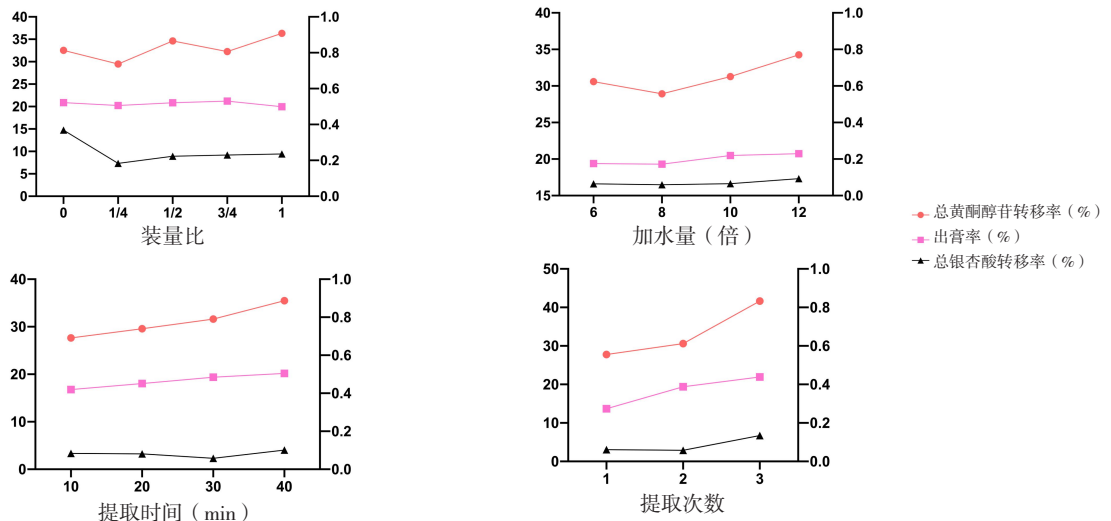


图2 银杏叶提取工艺参数的单因素考察结果 (n=3)

Figure 2. Results of single factor study on extraction parameters of Ginkgo folium (n=3)

注: 左边纵坐标对应总黄酮醇苷转移率和出膏率; 右边纵坐标对应总银杏酸转移率。

### 2.3.2 指标权重系数的确定

①采用 AHP 法确定权重<sup>[13]</sup>, 研究各因素对银杏叶提取工艺的影响, 确定权重系数。层次分析法既考虑了主观上对各项指标的重视程度, 又

考虑了各项指标原始数据之间的相互联系及其影响<sup>[14]</sup>。采用 1~9 标度法, 考虑到药物的安全性最重要, 因此确定总银杏酸转移率权重高于其他指标, 银杏叶中的主要有效成分为总黄酮醇苷, 出

膏率是影响后续传统中药制剂成型工艺的重要指标，因此两者同等重要。总银杏酸转移率、总黄酮醇苷转移率、出膏率作为权重指标进行量化处理，3 个指标的重要顺序依次为：总银杏酸转移率 > 总黄酮醇苷转移率 = 出膏率。因总银杏酸转移率较总

黄酮醇苷转移率而言介于“稍微重要”和“比较重要”之间，赋值 4；总银杏酸转移率较出膏率而言介于“稍微重要”和“比较重要”之间，赋值 4；总黄酮醇苷转移率较出膏率而言“同样重要”，赋值 1；构建两两比较的优先判断矩阵，见表 2。

表2 指标成对比较的判断优先矩阵

Table 2. Judgment priority matrix for comparison on index pairs

权重指标	总银杏酸转移率	总黄酮醇苷转移率	出膏率
总银杏酸转移率	1	4	4
总黄酮醇苷转移率	1/4	1	1
出膏率	1/4	1	1

根据构建的矩阵结果，利用 yaahp 软件计算得总银杏酸转移率、总黄酮醇苷转移率、出膏率的权重系数 ( $W_{j1}$ ) 依次为 0.666 7、0.166 7、0.166 7，一致性比率 (consistency ratio, CR) 为 0.00 (< 0.10)，表明此判断矩阵具有一致性，权重系数合理有效。

②采用熵权法根据各项指标观测值所提供信息量的大小来确定指标权重，不依赖于决策者的主观态度，为一种客观赋权法<sup>[15]</sup>。对正交试验设计结果进行标准化处理后，采用信息熵权法对各指标进行赋值，计算得总银杏酸转移率、总黄酮醇苷转移率、出膏率的权重系数 ( $W_{j2}$ )。

③采用 AHP-熵权法计算复合权重，将 AHP 法、熵权法确定的各指标  $W_{j1}$  和  $W_{j2}$  相结合，计算综合权重系数 ( $W_j$ )，公式为：

$$W_j = W_{j1} W_{j2} \sum_{i=0}^n W_{j1} W_{j2}$$

### 2.3.3 提取正交试验

根据“2.3.2”项下计算方法，确定提取正交试验中总银杏酸转移率、总黄酮醇苷转移率、出膏率的  $W_{j2}$  依次为 0.283 1、0.320 0、0.396 9， $W_j$  依次为 0.612 3、0.173 1、0.214 6。结合以上权重系数结果和规格化方程计算各指标的规格值<sup>[16]</sup>，采用以下公式计算加权综合评分：

$$\text{综合评分} = \frac{X_{Amax} - X_A}{X_{Amax} - X_{Amin}} \times 61.23 + \frac{X_B - X_{Bmin}}{X_{Bmax} - X_{Bmin}} \times 17.31 + \frac{X_C - X_{Cmin}}{X_{Cmax} - X_{Cmin}} \times 21.46$$

式中  $X_A$  为总银杏酸转移率， $X_B$  为总黄酮醇苷转移率， $X_C$  为出膏率。分别称取银杏叶饮片 50 g，选取装量比 (A)、加水量 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 为考察因素进行正交试验，因素水平见表 3，正交试验结果见表 4，方差分析见表 5。

表3 银杏叶提取工艺因素水平表

Table 3. Factor level table of extraction parameters of Ginkgo folium

水平	因素			
	A-装量比	B-加水量 (倍)	C-提取时间 (min)	D-提取次数 (次)
1	1/4	8	20	1
2	1/2	10	30	2
3	3/4	12	40	3

表4 银杏叶提取工艺正交试验设计与结果

Table 4. Orthogonal experimental design and results of extraction parameters of Ginkgo folium

试验号	A	B	C	D	综合评分
1	1	1	1	1	61.23
2	1	2	2	2	65.49
3	1	3	3	3	38.77
4	2	1	2	3	67.91
5	2	2	3	1	69.10
6	2	3	1	2	55.04
7	3	1	3	2	71.22
8	3	2	1	3	53.45

续表4

试验号	A	B	C	D	综合评分
9	3	3	2	1	47.04
K <sub>1</sub>	55.163	66.787	56.573	59.123	
K <sub>2</sub>	64.017	62.680	60.147	63.917	
K <sub>3</sub>	57.237	46.950	59.697	53.377	
R	8.854	19.837	3.574	10.540	

表5 银杏叶提取工艺正交试验方差分析表

Table 5. Variance analysis of orthogonal experiment of Ginkgo folium exaction process

因素	偏差平方和	自由度	F
A	128.649	2	5.661
B	657.791	2	28.944*
C	22.726	2	1.000
D	167.092	2	7.352
误差	22.73	2	

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ ; \*为有显著差异。

综上结果分析,极差最大的是加水量,且其对综合评分有显著影响。各因素影响顺序依次为: B(加水量) > D(提取次数) > A(装量比) > C(提取时间),最优提取工艺为: A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即装量比为 1/2,加 8 倍水,提取 2 次,每次提取 30 min。

### 2.3.4 提取工艺的验证试验

称取银杏叶饮片 50 g,按照“2.3.3”项下确定的最佳提取工艺,平行制备 3 份,总银杏酸的转移率分别为 0.080%、0.085%、0.082%,RSD 为 2.80% ( $n=3$ );总黄酮醇苷转移率分别为 38.54%、39.36%、39.38%,RSD 为 1.23% ( $n=3$ );出膏率分别为 18.05%、18.63%、18.82%,RSD 为 2.17% ( $n=3$ )。结果表明,最佳提取工艺稳定可行。

## 2.4 浓缩工艺考察

有文献报道,总银杏酸的熔点约 136 °C,沸点约 500 °C,达到 200 °C 会发生脱酸反应,因此总银杏酸具有一定的热稳定性<sup>[17]</sup>。结合实际大生产的应用情况,分别对银杏叶水煎药液进行常压浓缩和减压浓缩(60 °C, 90 mbar)考察,平行测定 3 份,结果得到常压浓缩后总银杏酸的转移率为 0.096%、总黄酮醇苷转移率为 31.26%、出膏率为 18.48%,减压浓缩后总银杏酸的转移率为 0.098%、总黄酮醇苷转移率为 38.53%、出膏率为 18.57%。结果表明,减压浓缩的结果均略高于常压浓缩,结合实际生产中减压浓缩效率较高等因素,因此最终选择减压浓缩作为最佳浓缩工艺。

## 2.5 纯化工艺考察

通过前期预试验发现,银杏叶水煎药液在经过静置和离心后,总银杏酸的含量显著降低,最大程度地保留了有效成分总黄酮醇苷,对出膏率的影响不大。因此,银杏叶经过水提浓缩后,对静置和离心工艺进行如下考察。

### 2.5.1 静置工艺考察

结合实际生产条件以及可行性,分别对静置药液的相对密度(1.06、1.08、1.10、1.12)、静置温度(4 °C、常温)、静置时间(12、24、36、48 h)进行单因素考察。相对密度 1.06(4 °C, 24 h, 编号 S1)、相对密度 1.08(4 °C, 24 h, 编号 S2)、相对密度 1.10(4 °C, 24 h, 编号 S3)、相对密度 1.12(4 °C, 24 h, 编号 S4)、静置温度常温(相对密度 1.08, 24 h, 编号 S5)、静置 12 h(相对密度 1.08, 4 °C, 编号 S6)、静置 36 h(相对密度 1.08, 4 °C, 编号 S7)、静置 48 h(相对密度 1.08, 4 °C, 编号 S8)的考察结果见图 3,最终确定的静置工艺为:相对密度 1.08,置 4 °C 静置 48 h。

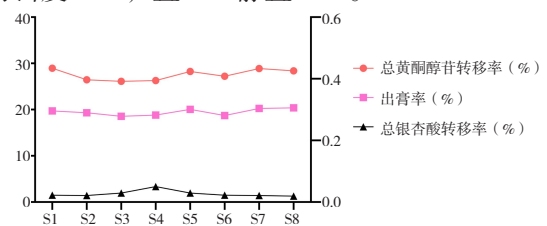


图3 银杏叶静置工艺考察结果

Figure 3. Results of study on the static technology of Ginkgo folium

注: 左边纵坐标对应总黄酮醇苷转移率和出膏率; 右边纵坐标对应总银杏酸转移率。

### 2.5.2 离心工艺正交试验

根据“2.3.2”项下计算方法,确定提取正交试验中,总银杏酸转移率、总黄酮醇苷转移率、出膏率的  $W_j$  依次为 0.380 4、0.405 2、0.214 4,  $W_i$  依次为 0.710 6、0.189 3、0.100 1。结合以上权重系数结果和规格化方程计算各指标的规格值<sup>[15]</sup>,用以下公式计算加权综合评分:

$$\text{综合评分} = \frac{X_{A\max} - X_A}{X_{A\max} - X_{A\min}} \times 71.06 + \frac{X_B - X_{B\min}}{X_{B\max} - X_{B\min}} \times 18.93 + \frac{X_C - X_{C\min}}{X_{C\max} - X_{C\min}} \times 10.01$$

式中  $X_A$  为总银杏酸转移率,  $X_B$  为总黄酮醇苷转移率,  $X_C$  为出膏率。选取离心力 (A)、离心时间 (B)、离心次数 (C) 为考察因素, 进行正交试验, 因素水平见表 6, 正交试验结果见表 7, 方差分析见表 8。

表6 银杏叶离心工艺因素水平表  
Table 6. Factor level table of centrifugation process of Ginkgo folium

水平	因素		
	A-离心力 ( $\times g$ )	B-离心时间 (min)	C-离心次数 (次)
1	1 358	5	1
2	1 677	10	2
3	2 029	15	3

表7 银杏叶离心工艺正交试验设计与结果

Table 7. Orthogonal experimental design and results of centrifugation process of Ginkgo folium

试验号	A	B	C	D (空白)	综合评分
1	1	1	1	1	52.36
2	1	2	2	2	63.93
3	1	3	3	3	24.50
4	2	1	2	3	59.06
5	2	2	3	1	28.94
6	2	3	1	2	79.05
7	3	1	3	2	69.91
8	3	2	1	3	56.48
9	3	3	2	1	58.45
$K_1$	46.930	60.443	62.630	46.583	
$K_2$	55.683	49.783	60.480	70.963	
$K_3$	61.613	54.000	41.117	46.680	
R	14.683	10.660	21.513	24.380	

表8 银杏叶离心工艺正交试验方差分析表  
Table 8. Variance analysis of orthogonal experimentl of Ginkgo folium centrifugation process

因素	偏差平方和	自由度	F
A	327.386	2	0.276
B	172.932	2	0.146
C	842.385	2	0.711
误差	1 184.070	2	

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

综上结果分析, 极差最大的是离心次数, 但 3 个因素对综合评分均无显著影响。各因素影响顺序依次为: C (离心次数) > A (离心力) > B (离心时间), 最优离心工艺为:  $A_3B_1C_1$ , 即离心力为  $2\ 029 \times g$ , 离心时间 5 min, 离心 1 次。

### 2.5.3 离心工艺的验证试验

按照以上优选最佳离心工艺进行验证试验, 平行制备 3 份, 总银杏酸的转移率分别为 0.018%、0.016%、0.017%,  $RSD$  为 4.57% ( $n=3$ ); 总黄酮醇苷转移率分别为 27.88%、28.46%、

26.63%,  $RSD$  为 1.23% ( $n=3$ ); 出膏率分别为 16.61%、17.43%、16.53%,  $RSD$  为 2.98% ( $n=3$ ), 结果表明, 最佳纯化工艺稳定可行。

## 3 讨论

本研究参考《中国药典 (2020 版)》银杏叶项下检测方法<sup>[1]</sup>和相关文献报道<sup>[18]</sup>, 分别考察了水煎药液的不同提取溶剂甲醇、甲醇-25% 盐酸溶液 (4:1) 的混合溶液, 结果发现在甲醇-25% 盐酸溶液 (4:1) 的混合溶液条件下, 供试品溶液中目标成分出峰数目多且提取更完全。本试验对供试品溶液进行全波长扫描, 结合文献报道<sup>[19-20]</sup>, 总黄酮醇苷在前 40 min 均被洗脱出来, 最大吸收波长为 360 nm, 总银杏酸在后 35 min 被洗脱出来, 最大吸收波长为 310 nm, 因此对波长进行分段设置。该方法稳定可行, 有效成分和有害成分能被同时检出。

在预试验中, 对银杏叶浸泡条件进行考察, 结果表明, 浸泡与否及浸泡时间对银杏叶中各成

分转移率和出膏率几乎无影响,因此考虑成本因素,提取工艺中选择不浸泡。另按照煎药室管理规范,对银杏叶进行提取,总银杏酸转移率为0.12%。此外还购买了市面上不同厂家售卖的银杏茶,按照其泡茶步骤,检测出银杏茶茶水中总银杏酸的转移率为0.10%~0.54%。而按照本研究优选的提取、纯化工艺,银杏叶水煎药液中总银杏酸平均转移率仅为0.017%。总银杏酸分别在包煎后和水提药液静置离心工艺后,转移率显著降低,同时总黄酮醇苷转移率和出膏率无明显差异,极大地提高了银杏叶入药的安全性,且最大程度地保留了有效性。因此,建议本研究优化的银杏叶提取、纯化方法可应用于实际生产中,以保证含银杏叶的传统中药制剂的安全有效。

#### 参考文献

- 1 中国药典2020年版·一部[S]. 2020: 329-330, 434-436.
- 2 王晓梅,金涛,王霞,等. 银杏叶提取物对糖尿病心肌病患者血清粘附分子的影响[J]. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报, 2022, 43(2): 96-99. [Wang XM, Jin T, Wang X, et al. Effect of Ginkgo biloba extract on diabetic cardiomyopathy and serum adhesion molecule[J]. Journal of Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, 2022, 43(2): 96-99.] DOI: 10.3969/j.issn.2097-0005.2022.02.004.
- 3 刘翠翠,杨晨,杨涛,等. 基于网络药理学和分子对接探讨银杏叶治疗高血压病潜在作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(3): 468-478. [Liu CC, Yang C, Yang T, et al. Exploring the potential mechanism of Ginkgo biloba leaves in the treatment of hypertension based on network pharmacology and molecular docking[J]. Natural Product Research and Development, 2021, 33(3): 468-478.] DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.3.015.
- 4 韩树,钟利群. 银杏叶片对脑梗死合并高血压患者凝血功能及血清MCP-1、MCP1P1的影响[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2023, 15(3): 345-347, 351. [Han S, Zhong LQ. Influence of Ginkgo leaf tablets on coagulation function and levels of serum MCP-1 and MCP1P1 in patients with cerebral infarction complicated by hypertension[J]. Chinese Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine, 2023, 15(3): 345-347, 351.] DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2023.03.22.
- 5 李媛媛,刘胜伟,任忠洋,等. 基于网络药理学探讨银杏叶治疗阿尔茨海默病的潜在作用机制[J]. 中国药物警戒, 2022, 19(9): 967-972. [Li YY, Liu SW, Ren ZY, et al. Potential mechanism of Ginkgo biloba in the treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology[J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2022, 19(9): 967-972.] DOI: 10.19803/j.1672-8629.2022.09.08.
- 6 刘焯. 响应面法优化超声辅助提取银杏叶中总黄酮及其抗氧化研究[D]. 兰州:兰州大学, 2016.
- 7 齐丽娟,李国君,高珊. 白果中银杏酸类化合物的健康危害评估[J]. 毒理学杂志, 2021, 35(4): 267-273, 279. [Qi LJ, Li GJ, Gao S. Health hazard assessment of ginkgolic acids in Ginkgo biloba seeds[J]. Journal of Toxicology, 2021, 35(4): 267-273, 279.] DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2021.04.001.
- 8 肖玉,李芬,陶泽璋. 银杏酸对肿瘤的作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11): 1486-1489. [Xiao Y, Li F, Tao ZZ. Research progress on effect of ginkgolic acid on tumor[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2020, 36(11): 1486-1489.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.11.002.
- 9 沈凤俊,王璐,郭舒航,等. 银杏外种皮中银杏酸对真菌的抑制作用[J]. 大连工业大学学报, 2020, 39(4): 241-244. [Sheng FJ, Wang L, Guo SH, et al. Inhibition of ginkgolic acid on fungi in Ginkgo biloba testa[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2020, 39(4): 241-244.] DOI: 10.19670/j.cnki.dlgydxxb.2020.0402.
- 10 徐京,吴元锋,徐超奕,等. 溶剂萃取法脱除银杏酸工艺研究[J]. 浙江科技学院学报, 2018, 30(5): 370-374, 385. [Xu J, Wu YF, Xu CY, et al. Research on removal of ginkgolic acids through solvent extraction[J]. Journal of Zhejiang University of Science and Technology, 2018, 30(5): 370-374, 385.] DOI: 10.3969/j.issn.1671-8798.2018.05.004.
- 11 唐霖,徐冰婉,范冰冰,等. 超临界CO<sub>2</sub>流体萃取脱除银杏叶提取物中银杏酸工艺的优化[J]. 中成药, 2018, 40(6): 1392-1395. [Tang L, Xu BW, Fan BD, et al. Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction process for ginkgolic acid removal from Ginkgo biloba extract[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(6): 1392-1395.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.06.036.
- 12 毕艳艳,刘健,聂宗恒,等. 银杏叶提取物的树脂柱色谱脱酸工艺研究[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(8): 1929-1934. [Bi YY, Liu J, Nie ZH, et al. Deacidification



- process of Ginkgo biloba extract by resin column chromatography[J]. *Drugs and Clinic*, 2023, 38(8): 1929–1934.] DOI: [10.7501/j.issn.1674-5515.2023.08.016](https://doi.org/10.7501/j.issn.1674-5515.2023.08.016).
- 13 郭丽, 陈皓, 贾明璐, 等. 层次分析法及多指标正交试验优化归芪通脉合剂水提工艺 [J]. *中国现代中药*, 2021, 23(6): 1068–1075. [Guo L, Chen H, Jia ML, et al. Optimization of water extraction process of Guiqi Tongmai mixture by analytic hierarchy process and multi-index orthogonal test[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2021, 23(6): 1068–1075.] DOI: [10.13313/j.issn.1673-4890.20200624002](https://doi.org/10.13313/j.issn.1673-4890.20200624002).
- 14 孙水根, 耿赛龙, 羊健, 等. 基于层次分析法综合评分优选芪灵消积颗粒的提取工艺 [J]. *中国药师*, 2022, 25(10): 1740–1745. [Sun SG, Geng SL, Yang J, et al. Extraction technology optimization of Qiling Xiaoji granules by analytic hierarchy process with comprehensive score[J]. *China Pharmacist*, 2022, 25(10): 1740–1745.] DOI: [10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.10.009](https://doi.org/10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.10.009).
- 15 张桂梅, 岳珠珠, 王慧楠, 等. 基于 AHP-熵权法结合色差原理评价不同辅料大米对米炒党参饮片的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(24): 7447–7454. [Zhang GM, Yue ZZ, Wang HN, et al. Evaluation of effects of different adjuvant rice on rice fried Codonopsis Radix decoction pieces based on AHP entropy weight method and color difference principle[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(24): 7447–7454.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.006](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.006).
- 16 陶彩霞, 肖锷钰, 涂济源, 等. Box-Behnken 响应面法优化姜半夏产地加工炮制一体化工艺 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(19): 2002–2007. [Tao CX, Xiao KY, Tu JY, et al. Optimization of intergrated origin processing and preparing technology of Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Zingibere et Alumine by Box-Behnken response surface methodology[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2022, 42(19): 2002–2007.] DOI: [10.13286/j.1001-5213.2022.19.07](https://doi.org/10.13286/j.1001-5213.2022.19.07).
- 17 冯致, 杨竣茹, 李萌, 等. 银杏酚酸生物活性及合成途径研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(23): 35–43. [Feng Z, Yang JR, Li M, et al. Research progress of the biological activities and synthesis pathways of ginkgo phenolic acids[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(23): 35–43.] DOI: [10.3969/j.issn.0517-6611.2020.23.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.0517-6611.2020.23.009).
- 18 姚建标, 金辉辉, 王如伟, 等. 银杏叶提取物中总银杏酸 HPLC 法限量检测 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(11): 2041–2044. [Yao JB, Jin HH, Wang RW, et al. Limit determination of total ginkgolic acid in Ginkgo biloba extract by HPLC[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2015, 35(11): 2041–2044.] DOI: [10.16155/j.0254-1793.2015.11.30](https://doi.org/10.16155/j.0254-1793.2015.11.30).
- 19 王莽薇, 谢媛媛, 王义明, 等. 银杏叶中银杏酚酸类成分含量测定方法研究 [J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(2): 167–173. [Wang QW, Xie YY, Wang YM, et al. Simultaneous determination of five ginkgolic acids in Ginkgo folium by HPLC[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2015, 50(2): 167–173.] DOI: [10.11669/cpj.2015.02.018](https://doi.org/10.11669/cpj.2015.02.018).
- 20 张育新, 刘伟毅, 杨骏, 等. 银杏叶提取物的制备工艺优化及质量控制 [J]. *中国药师*, 2021, 24(1): 75–80. [Zhang YX, Liu WY, Yang J, et al. Preparation technology optimization and quality control of Ginkgo leaves extract[J]. *China Pharmacist*, 2021, 24(1): 75–80.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-049X.2021.01.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-049X.2021.01.014).

收稿日期: 2023 年 12 月 04 日 修回日期: 2024 年 03 月 20 日  
本文编辑: 钟巧妮 李 阳