中图分类号：R932；R284.2；；TQ460.6　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)07－0059－06
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.07.013

Box－Behnken Design响应面法优化银杏叶提取物醇提水沉工艺*

毕艳艳[1,2]，姜佳峰[2]，孙绍明[3]，刘　健[1,2]，郭田甜[1,2]，孙　艳[1,2]，张　兰[1,2]，郝大伟[1,2△]

（1. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室，山东 临沂　276006；2. 鲁南厚普制药有限公司，山东 临沂　276006；3. 鲁南制药集团股份有限公司，山东 临沂　276006）

摘要：目的　优化银杏叶提取物的醇提水沉工艺。**方法**　在单因素试验基础上，以总黄酮醇苷转移率、萜类内酯转移率及干物质得率为综合评价指标，通过Box－Behnken Design（BBD）响应面法对液料比、提取时间、提取次数、提取液浓缩倍数、加水倍数、冷沉时间进行考察。**结果**　醇提水沉最佳工艺为液料比8∶1（*V*/*m*），提取时间1.0 h，提取次数3次，浓缩倍数3倍，加水倍数3倍，冷沉时间28.0 h。**结论**　BBD响应面法优化得到的银杏叶提取物醇提水沉工艺科学、合理、稳定、可行。

关键词：银杏叶提取物；醇提水沉工艺；Box－Behnken Design响应面法；总黄酮醇苷转移率；萜类内酯转移率；干物质得率

Optimization of Alcohol Extraction and Water Precipitation Process of Ginkgo Biloba Extract by the Box－Behnken Design－Response Surface Methodology

BI Yanyan[1,2], JIANG Jiafeng[2], SUN Shaoming[3], LIU Jian[1,2], GUO Tiantian[1,2], SUN Yan[1,2], ZHANG Lan[1,2], HAO Dawei[1,2]

(1. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Linyi, Shandong, China　276006; 2. Lunan Hope Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi, Shandong, China　276006; 3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi, Shandong, China　276006)

Abstract: Objective　To optimize the alcohol extraction and water precipitation process of Ginkgo biloba extract (GBE). **Methods**　Based on the one－factor experiment, the transfer rate of total flavonol glycosides, and terpene lactones, and the dry matter yield were taken as comprehensive evaluation indicators, the liquid－solid ratio, extraction time, extraction times, concentration times of extraction liquid, water addition times and cryoprecipitation time were comprehensively investigated by the Box－Behnken Design (BBD)－response surface methodology (RSM). **Results**　The optimal alcohol extraction and water precipitation process was as follows: the liquid－solid ratio was 8∶1 (*V*/*m*), the extraction time was 1.0 h, the extraction times were three times, the concentration times were three times, the water addition times was three times, and the cryoprecipitation time was 28.0 h. **Conclusion**　The optimal alcohol extraction and water precipitation process of GBE was designed by BBD－RSM, which is scientific, reasonable, stable and feasible.

Key words: Ginkgo biloba extract; alcohol extraction and water precipitation process; BBD－RSM; transfer rate of total flavonol glycoside; transfer rate of terpene lactonee; dry matter yield

银杏叶提取物是从天然药材银杏叶中提取、分离并富集得到的一类有效物质，主要成分为总黄酮醇苷、萜类内酯、多糖类、银杏酸等[1－2]，已成为治疗心脑血管疾病、痴呆症、糖尿病并发症等的重要药物[3－7]。参考2020年版《中国药典（一部）》银杏叶提取物制备方法，采用稀乙醇回流提取[8]，根据总黄酮醇苷、萜类内酯等有效成分与色素、鞣质、树脂等杂质在水中的溶解度差异，通过低温水沉方法进行分离[9]，去除部分杂质，纯化银杏叶提取物。本研究中通过Box－Behnken Design（BBD）响应面法优化银杏叶提取物的醇提水沉工艺[8,10－15]，为后续提取放大生产及大孔树脂柱层析纯化银杏叶提取物提供参考。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

e2695型高效液相色谱仪（美国Waters公司）；UltiMate 3000型高效液相色谱仪（美国Thermo公司）；R－300型旋转蒸发器（瑞士Buchi公司）；XS204型电子分析天平（瑞士Mettler Toledo公司，精度为十万分之一）；GZX－9240MBE型电热鼓风干燥箱（上海博讯医疗生物仪器股份有限公司）；DTC－15F型超声波清洗仪（鼎泰＜湖北＞生化科技设备制造有限公司，频率为50 kHz）。

1.2　试药

银杏叶采集于山东临沂郯城，经鲁南厚普制药有限公司范建伟高级工程师鉴定为银杏科植物银杏的干燥叶，总黄酮醇苷含量为1.00%，萜类内酯含量为0.38%；槲皮素对照品（批号为100081－201610，纯度为99.10%），山柰酚对照品（批号为110861－202214，纯度为97.4%），异鼠李素对照品（批号为110860－201811，纯度为99.1%），银杏内酯A对照品（批号为110862－202213，纯度为94.7%），银杏内酯B对照品

*基金项目：山东省重点研发计划（重大科技创新工程）项目［2021CXGC010508］；山东省新旧动能转换重大产业攻关项目［鲁动能办〔2021〕23号］。

第一作者：毕艳艳，女，硕士，工程师，研究方向为中药新药研究与工艺优化，（电子信箱）280377223@qq.com。

△通信作者：郝大伟，男，大学本科，工程师，研究方向为中药新药研究与工艺优化，（电子信箱）28199827@qq.com。

（批号为110863－201611，纯度为95.6%），银杏内酯C对照品（批号为110864－201809，纯度为94.0%），白果内酯对照品（批号为110865－202108，纯度为99.8%），均购于中国食品药品检定研究院；95%乙醇（食品级，费县大成酒业有限公司）；磷酸、盐酸（分析纯，南京化学试剂有限公司）；甲醇（色谱纯，天津鑫彩华豪化工有限公司）；四氢呋喃（色谱纯，国药集团化学试剂有限公司）。

2 方法与结果

2.1 银杏叶提取物制备

取500 g银杏叶药材，粉碎，按液料比8∶1（*V*/*m*）加入50%乙醇，提取3次，每次1.0 h，回收溶剂，将银杏叶提取液浓缩为原药材质量的3倍，得稀膏。取1 000 mL稀膏，加3倍纯化水，搅匀，置冷库（0～10 ℃）静置冷沉，取上清液，抽滤，得银杏叶提取物水沉液。

2.2 总黄酮醇苷含量测定

2.2.1 色谱条件[8]

色谱柱：Agilent 20RBAX EXtend－C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇－0.4%磷酸溶液（50∶50，*V*/*V*）；流速：0.8 mL/min；检测波长：360 nm；柱温：45 ℃；进样量：10 μL。

2.2.2 溶液制备

取槲皮素对照品31.30 mg，山柰酚对照品30.49 mg，异鼠李素对照品20.57 mg，精密称定，置50 mL容量瓶中，加甲醇适量，超声使溶解，冷却，定容，混匀，取5.0 mL，置100 mL容量瓶中，定容，即得对照品溶液Ⅰ。

精密移取稀膏或水沉液15.0 mL，置蒸发皿中，水浴蒸干，加25%盐酸溶液－甲醇（1∶4，*V*/*V*）25 mL，超声使溶解，转移至锥形瓶中，85 ℃水浴加热回流0.5 h，迅速冷却，用甲醇转移至50 mL容量瓶中，定容，摇匀，过滤，取滤液，即得供试品溶液。

2.2.3 总黄酮醇苷含量测定

分别精密吸取2.2.2项下对照品溶液Ⅰ和供试品溶液各10 μL，按2.2.1项下色谱条件进样测定，分别计算槲皮素、异鼠李素和山柰酚的含量。按公式（1）计算醇提水沉工艺下银杏叶总黄酮醇苷含量，按公式（2）（3）计算总黄酮醇苷转移率。

总黄酮醇苷含量＝（槲皮素含量＋异鼠李素含量＋山柰酚含量）×2.51 （1）

总黄酮醇苷转移率（%）＝（稀膏总黄酮醇苷含量×稀膏体积）/（药材总黄酮醇苷含量×药材质量）×100% （2）

总黄酮醇苷转移率（%）＝（水沉液总黄酮醇苷含量×水沉液体积）/（稀膏总黄酮醇苷含量×稀膏体积）×100% （3）

2.3 萜类内酯含量测定

2.3.1 色谱条件[8]

色谱柱：Agilent 20RBAX EXtend－C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇－四氢呋喃－水（25∶10∶65，*V*/*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；检测器：蒸发光散射检测器；柱温：40 ℃；进样量：10 μL。

2.3.2 溶液制备

取银杏内酯A对照品18.25 mg，银杏内酯B对照品8.16 mg，银杏内酯C对照品10.09 mg，白果内酯对照品21.18 mg，精密称定，置100 mL容量瓶中，加甲醇适量，超声使溶解，冷却，定容，即得对照品溶液Ⅱ。

精密移取稀膏或水沉液20.0 mL，置蒸发皿中，水浴蒸干，加甲醇适量溶解，转移至10 mL容量瓶中，超声0.5 h，取出，放冷，定容，摇匀，静置；精密移取5.0 mL上清液，上样于酸性氧化铝柱，用25 mL甲醇洗脱，接收洗脱液，旋干，分次用甲醇5 mL转移至10 mL容量瓶中，加4.5 mL水，超声0.5 h，取出，放冷，定容，摇匀，即得供试品溶液。

2.3.3 含量测定

分别精密吸取2.3.2项下对照品溶液Ⅱ10 μL和20 μL及各供试品溶液10 μL，按2.3.1项下色谱条件进样测定，采用外标两点法对数方程分别计算醇提水沉工艺下银杏内酯A、银杏内酯B、银杏内酯C、白果内酯的含量，按公式（4）（5）计算萜类内酯转移率。

萜类内酯转移率（%）＝（稀膏萜类内酯含量×稀膏体积）/（药材萜类内酯含量×药材质量）×100% （4）

萜类内酯转移率（%）＝（水沉液萜类内酯含量×水沉液体积）/（稀膏萜类内酯酯含量×稀膏体积）×100% （5）

2.4 干物质测定

参考2020年版《中国药典（四部）》通则0831 干燥失重测定法[16]测定干物质。精密量取稀膏或水沉液10 mL，置蒸发皿中，称定质量，100 ℃水浴蒸干，105 ℃干燥箱中干燥至恒定质量，干燥器中冷却30 min，称定质量，得干物质。按公式（6）（7）计算稀膏和水沉液中干物质得率。

干物质得率（%）＝（稀膏干物质质量/药材质量）×100% （6）

干物质得率（%）＝（水沉液干物质质量/稀膏干物质质量）×100% （7）

2.5 醇提工艺单因素试验

液料比：按2.1项下提取方法，按不同液料比4∶1、6∶1、8∶1、10∶1（*V*/*m*）加入50%乙醇，提取3次，每次1.0 h，结果见表1。综合考虑，选择液料比为6∶1、8∶1、10∶1（*V*/*m*）进行BBD响应面法优化醇提工艺。

提取时间：按2.1项下提取方法，按液料比为8∶1

（V/m）加入50%乙醇，提取3次，每次提取0.5，1.0，1.5，2.0 h，结果见表1。综合考虑，选择提取时间为0.5，1.0，1.5 h进行BBD响应面法优化醇提工艺。

表1 液料比、提取时间、提取次数对醇提工艺的影响（%）

Tab. 1 Effects of liquid - solid ratio, extraction time, and extraction times on alcohol extraction process (%)

考察因素		总黄酮醇苷转移率	萜类内酯转移率	干物质得率
液料比	4∶1	74.36	71.56	22.50
	6∶1	82.36	80.56	27.50
	8∶1	95.98	92.61	30.64
	10∶1	93.14	90.52	32.98
提取时间	0.5 h	81.46	77.96	20.45
	1.0 h	95.74	91.54	29.97
	1.5 h	93.67	88.02	31.12
	2.0 h	91.15	86.39	34.27
提取次数	1	72.86	74.02	17.78
	2	89.33	85.36	23.72
	3	94.37	90.81	32.64
	4	93.56	89.55	33.95

提取次数：按2.1项下提取方法，按液料比为8∶1（V/m）加入50%乙醇，分别提取1次、2次、3次、4次，每次1.0 h，结果见表1。综合考虑，选择提取次数为2次、3次、4次进行BBD响应面法优化醇提工艺。

2.6 BBD响应面法优化银杏叶提取物醇提工艺

2.6.1 方案设计与试验结果分析

根据响应面法设计原理[17]，以总黄酮醇苷转移率（R_1）、萜类内酯转移率（R_2）、干物质得率（R_3）的综合评分（$R_{综}$）为响应值，以液料比（A）、提取时间（B）、提取次数（C）为考察因素，优化银杏叶提取物醇提工艺。因素与水平见表2。2020年版《中国药典（一部）》银杏叶提取物测定项中的规定，总黄酮醇苷含量≥24%，萜类内酯含量≥6%[8]。故工艺中总黄酮醇苷、萜类内酯转移率越高，提取物中总黄酮醇苷、萜类内酯含量就越高，权重系数均设为40%；干物质得率的权重系数设为20%。按公式（8）计算综合评分（$R_{综}$）。试验设计与结果见表3。

$$R_{综} = (R_1 / R_{1max} \times 40\% + R_2 / R_{2max} \times 40\% + R_3 / R_{3max} \times 20\%) \times 100 \quad (8)$$

表2 醇提工艺因素与水平

Tab. 2 Factors and levels of alcohol extraction process

水平	因素A（V/m）	因素B（h）	因素C（次）
-1	6∶1	0.5	2
0	8∶1	1.0	3
1	10∶1	1.5	4

采用Design - Expert v8.0.6软件对表3中的试验数据进行回归分析，建立回归模型拟合方程$R_{综} = -83.58 + 28.08\,A + 49.24\,B + 19.67\,C + 1.64\,AB + 0.38\,AC + 2.11\,BC - 1.83\,A^2 - 28.57\,B^2 - 3.92\,C^2$，$R^2 = 0.9865$。结果模型$P < 0.0001$，表明醇提工艺模型回归极显著；失拟项$P = 0.3797 > 0.05$，表明失拟项结果不显著。结果显示，回归模型拟合度高，合理可行，可用于对醇提工艺综合评分（$R_{综}$）的预测和分析；因素A，B，A^2，B^2，C^2的P值均小于0.01，因素C、交互项AB的P值均小于0.05，表明对醇提工艺的综合评分（$R_{综}$）影响显著。详见表4。

表3 醇提工艺方案设计与试验结果

Tab. 3 Design scheme and results of alcohol extraction process

序号	A	B	C	R_1	R_2	R_3	$R_{综}$
1	0	0	0	86.33	82.97	31.39	89.99
2	-1	-1	0	80.97	77.26	27.10	82.80
3	0	0	0	88.74	85.56	32.04	92.49
4	1	1	0	79.25	73.03	26.84	80.11
5	0	1	-1	81.16	78.41	25.94	82.71
6	0	0	0	94.46	91.63	30.43	96.56
7	1	0	1	90.00	87.02	34.56	95.10
8	0	0	0	96.11	92.47	31.98	98.51
9	0	-1	-1	93.98	89.50	30.37	95.40
10	-1	0	1	83.09	80.94	29.79	86.83
11	1	0	-1	94.65	90.82	29.92	95.99
12	-1	1	0	87.01	84.38	28.69	89.32
13	0	-1	1	73.44	69.73	25.55	75.51
14	1	-1	0	78.42	71.12	26.15	78.54
15	0	1	1	77.16	72.25	27.06	79.03
16	-1	0	-1	80.47	75.89	27.81	82.41
17	0	0	0	95.55	91.14	31.97	97.69

表4 醇提工艺方差分析结果

Tab. 4 Results of analysis of variance of alcohol extraction process

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
模型	9	935.02	103.89	56.81	< 0.0001
A	1	77.56	77.56	42.42	0.0003
B	1	266.00	266.00	145.46	< 0.0001
C	1	14.04	14.04	7.68	0.0276
AB	1	10.76	10.76	5.88	0.0457
AC	1	2.36	2.36	1.29	0.2937
BC	1	4.43	4.43	2.42	0.1635
A^2	1	226.07	226.07	123.63	< 0.0001
B^2	1	214.80	214.80	117.46	< 0.0001
C^2	1	64.70	64.70	35.38	0.0006
残差	7	12.80	1.83		
失拟项	3	6.42	2.14	1.34	0.3797
纯误差	4	6.39	1.60		
总离差	16	947.82			

2.6.2 等高线图与响应面图分析

采用Design - Expert v8.0.6软件绘制各因素交互

作用对醇提工艺综合评分($R_{综}$)影响的等高线图和响应面图(图1)。由图1 A可知,液料比(A)与提取时间(B)作用的等高线呈明显的椭圆形,且响应面坡度较陡峭,表明2个因素具有较强交互作用,对醇提工艺综合评分($R_{综}$)影响较显著;由图1 B和图1 C可知,液料比(A)与提取次数(C)、提取时间(B)与提取次数(C)作用的等高线呈近圆形,且响应面坡度较平缓,表明各因素交互作用弱,对醇提工艺综合评分($R_{综}$)影响不显著。可见,对综合评分($R_{综}$)影响的顺序从小至大依次为提取次数(C)<提取时间(B)<液料比(A)。

2.6.3 验证试验

通过模型分析得到优化的醇提工艺为液料比8.55∶1(*V*/*m*),提取1.23 h,提取3.26次,结果总黄酮醇苷转移率为95.91%,萜类内酯转移率为92.45%,干物质得率为32.54%,综合评分为98.74。综合成本及实际情况,将醇提工艺优化为液料比8∶1(*V*/*m*),提取3次,每次1.0 h。按优化工艺,完成3批验证试验。结果综合评分为97.81,*RSD*为0.67%(n=3),与预测值98.74基本一致。

2.7 水沉工艺单因素试验

浓缩倍数:按2.1项下处理方法,提取液浓缩1倍、2倍、3倍、4倍,加水倍数3倍,冷沉时间24.0 h进行试验,结果见表5。综合考虑,选择浓缩倍数为2倍、3倍、4倍进行BBD响应面法优化水沉工艺。

加水倍数:按2.1项下处理方法,提取液浓缩倍数3倍,冷沉时间24.0 h,分别加水1倍、2倍、3倍、4倍进行试验,结果见表5。综合考虑,选择加水倍数为2倍、3倍、4倍进行BBD响应面法优化水沉工艺。

表5 浓缩倍数、加水倍数、冷沉时间对水沉工艺的影响(%)

Tab. 5 Effects of concentration times, water addition times, and cryoprecipitation time on water precipitation process (%)

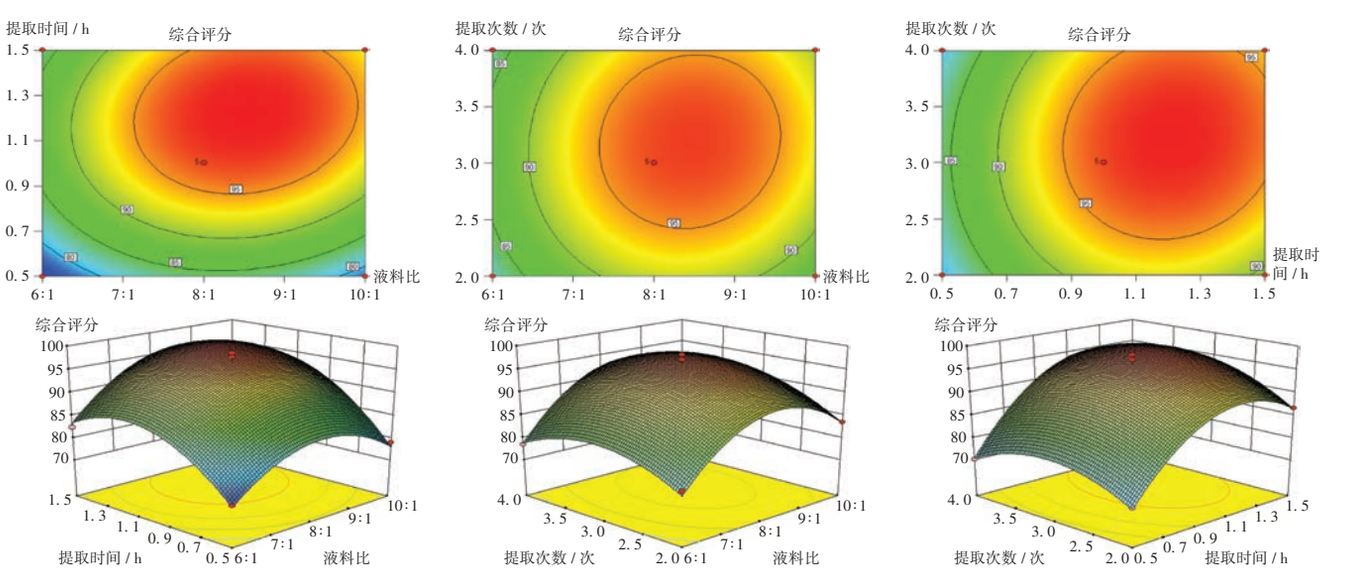
考察因素		总黄酮醇苷转移率	萜类内酯转移率	干物质得率
浓缩倍数	1	74.46	73.28	74.38
	2	80.82	79.00	79.04
	3	90.97	88.44	88.61
	4	86.19	84.94	83.89
加水倍数	1	79.33	79.16	76.00
	2	83.07	81.51	80.84
	3	93.42	91.12	86.85
	4	86.69	85.33	83.36
冷沉时间	12.0 h	82.97	80.06	83.73
	24.0 h	91.68	90.69	85.94
	36.0 h	88.54	87.74	82.50
	48.0 h	85.00	83.55	79.11

冷沉时间:按2.1项下处理方法,提取液浓缩倍数3倍,加水倍数3倍,分别冷沉12.0,24.0,36.0,48.0 h进行试验,结果见表5。综合考虑,选择冷沉时间为12.0,24.0,36.0 h进行BBD响应面法优化水沉工艺。

2.8 BBD响应面法优化水沉工艺

2.8.1 方案设计与试验结果分析

根据BBD响应面法设计原理[17],以银杏叶总黄酮醇苷转移率(Y_1)、萜类内酯转移率(Y_2)及干物质得率(Y_3)的综合评分($Y_{综}$)为响应值,以提取液浓缩倍数



A. 液料比 – 提取时间 B. 液料比 – 提取次数 C. 提取时间 – 提取次数

图1 各因素交互作用对醇提工艺综合评分影响的等高线图与响应面图

A. Liquid – solid ratio – extraction time B. Liquid – solid ratio – extraction times C. Extraction time – extraction times

Fig. 1 Contour and response surface plots of the effects of interaction of various factors on the comprehensive score of alcohol extraction process

(D)、加水倍数(E)及冷沉时间(F)为考察因素，权重系数分别设定为40%，40%，20%，优化银杏叶提取物水沉工艺。按公式(9)计算综合评分($Y_{综}$)，因素与水平见表6，方案设计与结果见表7。

$$Y_{综} = (Y_1 / Y_{1max} \times 40\% + Y_2 / Y_{2max} \times 40\% + Y_3 / Y_{3max} \times 20\%) \times 100 \quad (9)$$

表6 水沉工艺因素与水平

Tab. 6 Factors and levels of water precipitation process

水平	因素D(倍)	因素E(倍)	因素F(h)
-1	2	2	12.0
0	3	3	24.0
1	4	4	36.0

表7 水沉工艺方案设计与试验结果

Tab. 7 Design scheme and results of water precipitation process

序号	D	E	F	Y_1	Y_2	Y_3	$Y_{综}$
1	0	-1	-1	81.64	78.17	78.74	86.84
2	1	0	1	84.25	81.26	79.93	89.57
3	-1	-1	0	70.46	67.01	66.27	74.37
4	1	1	0	80.55	76.49	74.48	84.67
5	-1	1	0	76.60	72.00	67.05	79.34
6	0	1	1	87.25	85.37	81.29	92.96
7	0	0	0	93.56	91.52	87.19	99.67
8	0	1	-1	84.07	82.14	83.27	90.64
9	0	0	0	92.01	90.77	86.72	98.58
10	0	0	0	93.86	89.32	88.06	99.04
11	0	0	0	91.99	90.81	87.24	98.71
12	0	0	0	90.28	88.35	85.85	96.59
13	-1	0	-1	73.94	69.95	73.53	78.78
14	0	-1	1	86.53	84.29	77.69	91.36
15	-1	0	1	74.68	70.53	69.96	78.54
16	1	-1	0	78.00	73.40	70.21	81.27
17	1	0	-1	79.45	75.11	77.60	84.31

采用 Design - Expert v8.0.6 软件对表7试验数据进行回归分析，建立二次回归模型方程 $Y_{综} = -96.80 + 80.79\,D + 36.87\,E + 0.78\,F - 0.39\,DE + 0.11\,DF - 0.05\,EF - 13.13\,D^2 - 5.48\,E^2 - 0.02\,F^2$，$R^2 = 0.9924$。结果模型 $P < 0.0001$，表明水沉工艺模型回归极显著；失拟项 $P = 0.4927 > 0.05$，表明失拟项结果不显著。结果显示，回归模型拟合度高，合理可行，可用于对水沉工艺综合评分($Y_{综}$)的预测和分析。因素D，E，F，D^2，E^2，F^2的 P 值均小于0.01，交互项DF的 P 值小于0.05，表明对水沉工艺综合评分($Y_{综}$)的影响显著。详见表8。

2.8.2 等高线图与响应面图分析

采用 Design - Expert v8.0.6 软件绘制各因素交互作用对水沉工艺综合评分($Y_{综}$)影响的等高线图和响应面图(图2)。由图2 A可知，浓缩倍数(D)与冷沉时间(F)作用的等高线呈明显椭圆形，且响应面坡度较陡峭，呈马鞍形，表明具有较强交互作用，对水沉工艺综合评分($Y_{综}$)的影响较显著；由图2 B和图2 C可知，浓缩倍数(D)与冷沉时间(F)、加水倍数(E)与冷沉时间(F)作用的等高线呈近圆形，且响应面坡度较平缓，表明各因素交互作用弱，对水沉工艺综合评分($Y_{综}$)的影响不显著。可见，对水沉工艺综合评分($Y_{综}$)的影响从小至大依次为冷沉时间(F) < 加水倍数(E) < 浓缩倍数(D)。

表8 水沉工艺方差分析结果

Tab. 8 Results of analysis of variance of water precipitation process

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
模型	9	1 096.20	121.80	92.50	< 0.000 1
D	1	103.61	103.61	78.68	< 0.000 1
E	1	23.70	23.70	18.00	0.003 8
F	1	17.58	17.58	13.35	0.008 1
DE	1	0.62	0.62	0.47	0.515 9
DF	1	7.56	7.56	5.74	0.047 7
EF	1	1.21	1.21	0.92	0.369 7
D^2	1	725.63	725.63	551.05	< 0.000 1
E^2	1	126.34	126.34	95.94	< 0.000 1
F^2	1	28.25	28.25	21.45	0.002 4
残差	7	9.22	1.32		
失拟项	3	3.86	1.29	0.96	0.492 7
纯误差	4	5.36	1.34		
总离差	16	1 105.42			

2.8.3 验证试验

通过模型分析得到优化的水沉工艺为浓缩倍数3.15倍，加水倍数3.14倍，冷沉时间27.73 h，结果总黄酮醇苷转移率为92.96%，萜类内酯转移率为90.87%，干物质得率为87.21%，综合评分为99.15。综合成本及实际情况，将水沉工艺优化为浓缩倍数为3倍，加水倍数为3倍，冷沉时间为28.0 h。按优化工艺，完成3批验证试验，综合评分为98.94，RSD 为0.82%($n = 3$)，与预测值99.15基本一致。

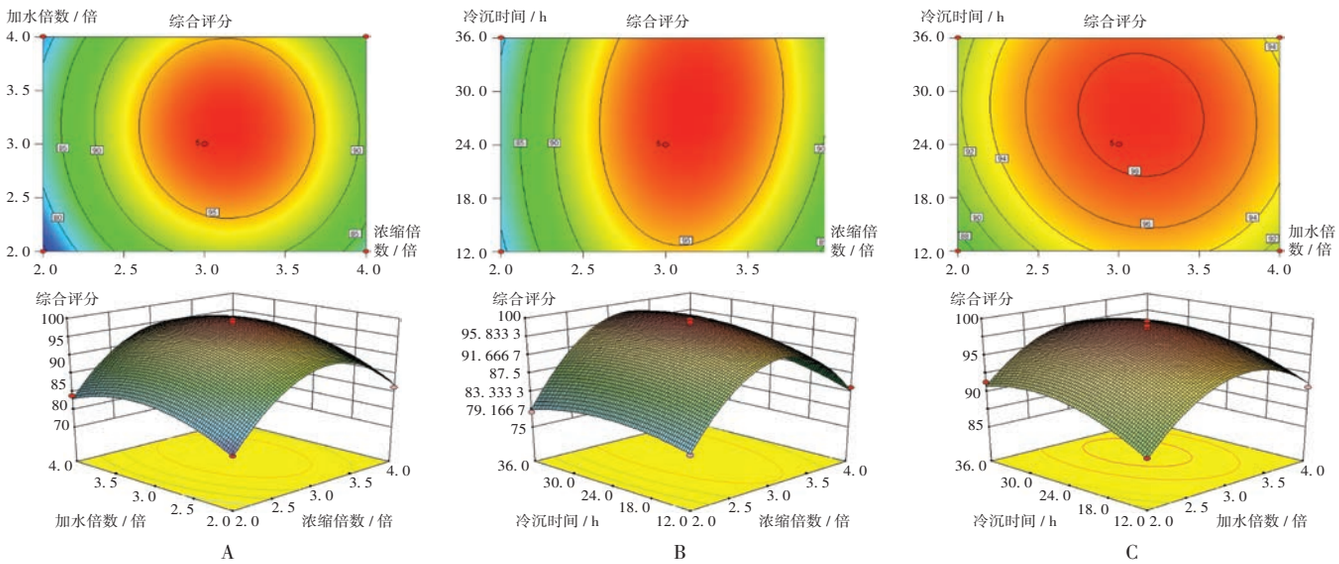
3 讨论

3.1 BBD 响应面法指标选择

目前，关于银杏叶提取物的提取工艺研究多以总黄酮醇苷为评价指标，优化得到最佳工艺，但不够全面。本研究中以总黄酮醇苷转移率、萜类内酯转移率及干物质得率为综合考察指标，通过BBD响应面法综合考察银杏叶提取物的最佳提取工艺，确定整个区域中因素的最佳组合和响应的最优值。

3.2 提取方法选择

有关银杏叶提取物提取方法的报道较多，如使用硫酸铵、盐酸、丙酮等试剂的提取方法[12,18]，但不符合



A. 浓缩倍数 - 加水倍数　B. 浓缩倍数 - 冷沉时间　C. 加水倍数 - 冷沉时间

图2　各因素交互作用对水沉工艺综合评分影响的等高线图与响应面图

A. Concentration times - water addition times　B. Concentration times - cryoprecipitation time　C. Water addition times - cryoprecipitation time

Fig. 2　Contour and response surface plots of the effects of interaction of various factors on the comprehensive score of water precipitation process

2020年版《中国药典(一部)》的要求,也不适合工业化大生产。按《中国药典》的规定,采用稀乙醇回流提取,更适合工业化大生产,影响因素为液料比、提取时间、提取次数,通过BBD响应面法优化得到液料比8∶1(V/m),提取时间1.0 h,提取次数3次,优化的工艺将进一步通过中试放大试验加以验证,可用于工业化大生产。

3.3　水沉方法选择

后续研究中将采用大孔树脂柱层析纯化银杏叶提取物[18-19],但实际生产中大孔树脂易被污染、板结,导致树脂柱堵塞等问题,主要原因为上样液未处理干净,较多杂质吸附在大孔树脂上。本研究中采用加水冷沉的方法尽可能地去除银杏叶提取液中的杂质,提高大孔树脂的使用次数,为后续的工业化大生产节约成本。通过BBD响应面法对银杏叶提取物水沉工艺中提取液浓缩倍数、加水倍数、冷沉时间进行了优化,得到浓缩倍数为3倍,加水倍数为3倍,冷沉时间为28.0 h,可提高有效物质转移,为后续大孔树脂纯化银杏叶提取物提供了数据支持。

参考文献

[1] 杨慧萍,高　睿. 银杏药用成分及药理作用研究进展[J]. 动物医学进展,2017,38(8):96-99.
[2] 徐　芳,李　杰,毛　宇,等. 银杏叶提取物的研究进展[J]. 食品研究与开发,2013,34(16):124-127.
[3] 张鹏飞,廖丽君,邓　祯,等. 银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(2):426-428.
[4] 邵继平,王伯初,陈　欣,等. 银杏叶提取物药用价值的研究进展[J]. 重庆大学学报(自然科学版),2003,26(1):130-134.
[5] 邹　月. 银杏叶提取物对心脑血管药理作用的研究[J]. 内蒙古中医药,2017,36(18):122-123.
[6] 郝新宇. 银杏叶提取物治疗老年痴呆症的疗效观察[J]. 中国老年保健医学,2017,15(1):58-59.
[7] 邓太平,梁玉华,周冰峰,等. 银杏叶提取物注射液辅助治疗非增殖期糖尿病视网膜病变的效果[J]. 内蒙古中医药,2022,41(5):101-102.
[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:329-330.
[9] 于　颖,王小丽,徐桂花,等. 响应面法优化提取银杏叶总黄酮的工艺研究[J]. 中国食品添加剂,2010(4):135-139.
[10] 曹春艳. 响应面法优化银杏叶黄酮提取工艺[J]. 中国食品学报,2014,14(4):78-86.
[11] 林建原,季丽红. 响应面优化银杏叶中总黄酮醇苷的提取工艺[J]. 中国食品学报,2013,13(2):83-90.
[12] 张育新,刘伟毅. 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.
[13] 向采芹,侯丰爵,冯建安,等. 金钱草醇提水沉工艺的优化[J]. 中成药,2018,40(10):2308-2311.
[14] 刘雪飞. 银杏叶提取物总黄酮的提取分离及工艺的研究[J]. 黑龙江医药,2013,26(3):417-420.
[15] 秦俊哲,郭云霞,高存秀. 响应面法优化银杏总黄酮的提取工艺[J]. 陕西科技大学学报,2011,29(6):7-9.
[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:113.
[17] 彭晓霞,路莎莎. 响应面优化法在中药研究中的应用和发展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):296-299.
[18] 童保华,夏晓晖,薛孔方. 大孔吸附树脂纯化银杏叶提取物的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):5-7.
[19] 冯玉康,王文鹏,郝鹏彬,等. 响应曲面法优化银杏叶提取物柱层析精制工艺[J]. 中国现代中药,2015,17(12):1321-1326.

(收稿日期:2023-04-24;修回日期:2023-11-03)