

影响银杏叶黄酮类化合物提取的因素研究

刘怀坤, 王树彬

(甘肃省靖远县农业技术推广中心, 甘肃 靖远 730600)

摘要: 研究了不同提取因素(提取方法、提取溶剂、破碎度、料液比、提取温度和提取时间)对银杏叶中黄酮类化合物提取的影响, 结果表明, 不同提取方法和同一方法的不同提取条件对银杏叶总黄酮类化合物的提取效率有显著差异。以甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、石油醚作为溶剂, 利用常温浸渍法提取24 h后, 发现甲醇和乙醇对银杏叶黄酮类化合物提取效果较好, 并且随着乙醇浓度的升高和破碎度的增加, 提取效果越好, 其中以95%的乙醇、破碎度0.2 mm、料液比为1:100提取时效果最佳。采用索氏提取法时, 提高温度和增加提取时间均能提高银杏叶黄酮类化合物提取效率, 且提取效率高于常温浸渍法。综合比较推断, 银杏叶黄酮类化合物宜采用索氏提取法, 最佳提取条件为以95%乙醇作为溶剂, 提取温度为80 ℃, 破碎度为0.2 mm, 料液比为1:100, 提取时间为24 h。

关键词: 银杏叶; 黄酮类化合物; 提取方法; 提取率

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1001-1463(2016)03-0026-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2016.03.010

银杏(*Ginkgo Liloba* L.)系裸子植物门银杏科, 银杏属, 俗称白果, 公孙树。为我国特有的珍贵树种, 是第四世纪冰川运动所遗留下来的最古老的裸子植物。由于它基本保持了1.5亿年前的生态特征, 又称为活化石植物。目前浙江天目山, 湖北大别山、神农架等地都有野生、半野生态的银杏群落。国外的银杏都是直接或间接从我国传入的^[1-2]。早在20世纪60年代, 国内外学者便开始将银杏叶总黄酮类化合物(FG)用于扩血管活性的研究, 并将其初步应用于临床, 获得了较好疗效。而国内掀起对FG进一步的研究高潮却在近几年。近年来, 国内外学者对银杏叶提取物进行了大量的研究, 发现其主要药用成分为黄酮类化合物FG, 包括银杏双黄酮类化合物(Gilobetin)、异银杏双黄酮类化合物(Isoginkgetin)、白果素(Bilobetin)、槲皮素(Quercetin)、山奈酚(Kaempferol)等。药理实验表明, 银杏黄酮类化合物有使冠状血管扩张的作用, 从而增加心脑血管血液流量, 还有抗炎、镇痛、抗衰老、降血脂、抗肿瘤、抗白血病和调节内分泌等功能, 可用于治疗由于血管老化和脑血管供血不足所导致的外周循环不良、眩晕、耳鸣、头痛、失眠、短期性记忆不良、听力障碍、精神

不振等^[3-4]; 银杏叶的提取物还有解痉、抗过敏及调节新陈代谢的功效, 临床用GBE防治冠心病、心绞痛、脑老化、老年性痴呆、脑功能不全和哮喘等, 已收到良好效果^[5-7]; 银杏总黄酮类化合物有抗自由基、抑制脂质过氧化作用, 也具有降血脂和增加脑血流量等作用。银杏叶提取物(GBE)的主要成分是黄酮类化合物和二萜内酯类, 药理实验表明, 长期服用银杏叶制剂无任何毒副作用, 这是同类西药无法达到的, 此类制剂还可用于生物农药、保健食品、化妆品等方面。银杏叶中所含有的黄酮类化合物成分可以阻碍色素在真皮层的形成与沉着, 对皮肤的美白除皱有特殊的功效, 达到美白肌肤与防治色素斑块的作用。除了黄酮类化合物之外, 银杏叶中的锰、铜等微量元素, 亦能清除氧自由基及抑制黑色素生长^[8-10]。

利用银杏果叶的有效化学成分和特殊医药保健作用加工生产保健食品、药物和化妆品, 正引起国内外研究、开发、生产单位的重视, 各国众多企业竞相研制生产以银杏为原料的天然绿色产品, 从而为中国的银杏资源的开发利用开辟了无比广阔的前景, 提高了银杏的利用价值为社会创造了就业和财富, 为人类带来了健康和长寿^[11-12]。

收稿日期: 2015-09-01

作者简介: 刘怀坤(1974—), 男, 甘肃靖远人, 助理农艺师, 主要从事农业技术推广工作。联系电话: (0)13649300123。

标的筛选及综合评价[J]. 安徽农业科学, 2012, 40

研究[J]. 甘肃农业科技, 2011(6): 10-13.

(9): 5 119-5 120.

[9] 裴怀弟, 陈玉梁, 王红梅, 等. 马铃薯试管耐盐性

(本文责编: 郑立龙)

银杏是中国特有而丰富的经济植物资源。我国银杏资源占世界的3/4以上,所以应致力于这一领域的研究和开发,寻求更好的黄酮类化合物提取工艺,以便有效利用资源。我们以银杏叶为研究材料,通过单因素实验设计,研究不同提取因素(提取方法,提取溶剂、破碎度、料液比、提取温度和提取时间)对银杏叶黄酮类化合物提取的影响,来探讨银杏叶黄酮类化合物的最佳提取条件。

1 材料与方法

1.1 材料

银杏叶采摘后经过分选,剔除有病虫害的叶片,以及混杂的树枝、土石块等,用清水洗净、沥干,放入烘箱80℃烘至恒重,干燥后装在纸袋中密封待用。

1.2 方法

1.2.1 芦丁标准曲线绘制 将芦丁标准品溶液用70%乙醇稀释成0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 μg/mL,各吸取1.0 mL于试管中,加70%乙醇1.0 mL,5% NaNO₂ 0.3 mL,6 min后加入10% Al(NO₃)₃溶液0.3 mL,6 min后再加入4% NaOH 2.0 mL,10 min后于分光光度计波长510 nm处测定OD值,绘制浓度-OD标准曲线^[13-14]。

1.2.2 常温浸渍 每份试样准确称取银杏叶2.0 g,装于150 mL三角瓶中,分别加入甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、石油醚各100 mL,每种溶剂重复3次,封口后置于常温下浸渍提取24 h,然后摇匀过滤后取2 mL提取液,利用紫外/可见分光光度计在510 nm比色,以空白为对照,测得吸光度,计算银杏叶总黄酮类化合物的含量和总黄酮类化合物得率,黄酮类化合物得率=(黄酮类化合物浓度×提取液体积)/银杏叶干重×100%。

1.2.3 乙醇浓度和破碎度对银杏叶黄酮类化合物提取的影响 准确称取破碎度为0、1.0 mm、0.5 mm、0.2 mm的银杏叶样品各2.0 g,分别装入150 mL三角瓶中,再分别加入20%乙醇,50%乙醇,70%乙醇,95%乙醇各200 mL,重复3次,封口后置于常温下提取24 h。然后摇匀过滤后取2 mL提取液,利用紫外/可见分光光度计在510 nm比色,以空白为对照,测得吸光度,计算银杏叶总黄酮类化合物的含量和总黄酮类化合物得率。

1.2.4 料液比对银杏叶中黄酮类化合物提取的影响 准确称取破碎度为0.2 mm的银杏叶,分别装入150 mL三角瓶中,依次按料液比(银杏叶重量

为乙醇体积的95%)1:50、1:100、1:150、1:200向各样品中加入95%乙醇,封口后置于常温下提取24 h。24 h后摇匀过滤,取2 mL提取液,利用紫外/可见分光光度计在510 nm比色,以空白为对照,测得吸光度,计算银杏叶总黄酮类化合物的含量和总黄酮类化合物得率。

1.2.5 提取时间和温度对银杏叶黄酮类化合物提取的影响 准确称取破碎度为0.2 mm的银杏叶,分别装于索氏提取器中,加入200 mL 95%乙醇,分别于80℃、90℃和100℃下提取,提取时间为4 h、8 h、12 h和24 h,浓缩并转入100 mL容量瓶中,用95%乙醇定容,摇匀过滤后取2 mL提取液,利用紫外/可见分光光度计在510 nm比色,以空白为对照,测得吸光度,计算银杏叶总黄酮类化合物的含量和总黄酮类化合物得率。

1.2.6 方差分析 对不同方法提取银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率实验数据,利用DPS version 3.0统计分析软件进行方差分析和Duncan新复极差法多重比较。

2 结果分析

2.1 芦丁标准曲线绘制

根据芦丁标准溶液浓度(μg/mL)与吸光度(OD值)的相关关系,用最小二乘法得出线性回归方程为 $y=357.32x$ ($R^2=0.9803$),其中y代表芦丁标准溶液浓度,x代表吸光度(OD值),从回归系数(R^2)可以看出,该回归方程置信度高,可用于计算银杏叶黄酮类化合物类物质浓度的计算。绘制出的芦丁标准曲线见图1。

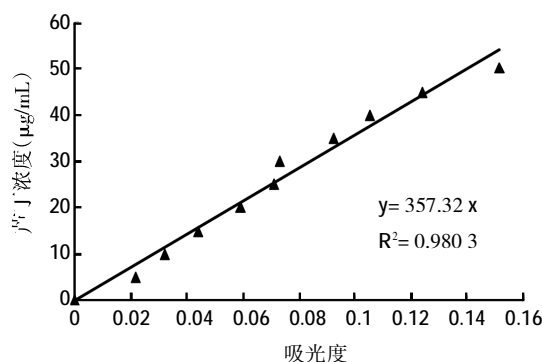


图1 芦丁标准曲线

2.2 常温浸渍法中不同溶剂对银杏叶黄酮类化合物提取的影响

利用常温浸渍法,分别选用甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚和石油醚作为溶剂,在常温条件下浸渍提取24 h后,银杏叶黄酮类化合物的浓度和

得率见表1。经方差分析得出,在分别选用甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、石油醚作为溶剂时,银杏叶黄酮类化合物浓度和得率差异极显著($p=1\%$);其中以甲醇作为溶剂的黄酮类化合物浓度和得率最高,分别达 37.55 mg/L 和 $469.38\text{ }\mu\text{g/g}$;乙醇的黄酮类化合物浓度和得率次之,分别达 36.47 mg/L 和 $455.88\text{ }\mu\text{g/g}$;而乙酸乙酯,乙醚,石油醚的黄酮类化合物浓度和得率较低,分别在 $7.43\sim 21.13\text{ mg/L}$ 和 $92.87\sim 264.13\text{ }\mu\text{g/g}$ 。但以甲醇和乙醇作为提取溶剂时银杏叶黄酮类化合物浓度和得率经多重比较差异不显著。说明银杏叶黄酮类化合物属于极性中等的化合物,以甲醇和乙醇作为提取溶剂的提取效果好。考虑到甲醇很轻、挥发度高、无色、易燃及有毒等缺点,所以综合分析得出,乙醇是银杏叶黄酮类化合物提取的最佳溶剂。

表1 常温浸渍法中不同溶剂对银杏叶黄酮类化合物提取的影响

溶剂	黄酮类化合物浓度(mg/L)	黄酮类化合物得率($\mu\text{g/g}$)
甲醇	$37.55 \pm 2.89\text{ a A}$	$469.38 \pm 15.21\text{ a A}$
乙醇	$36.47 \pm 1.34\text{ a A}$	$455.88 \pm 13.67\text{ a A}$
乙酸乙酯	$21.13 \pm 2.18\text{ b B}$	$264.13 \pm 9.83\text{ b B}$
乙醚	$10.36 \pm 1.25\text{ c C}$	$129.50 \pm 7.64\text{ c C}$
石油醚	$7.43 \pm 1.72\text{ d CD}$	$92.87 \pm 8.92\text{ d CD}$
F值	189.79**	193.46**

2.3 乙醇浓度对银杏叶黄酮类化合物提取的影响

以20%、50%、70%和95%乙醇为提取溶剂,在常温下浸渍提取24h后,银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率见图1和图2。从图1和图2可以看出,随着乙醇浓度的提高,银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率也随之增大。经方差分析得出,采用不同浓度的乙醇、乙酸乙酯作为溶剂时,银杏叶黄酮类化合物浓度和得率差异显著($p=5\%$)或极显著($p=1\%$)。其中以20%乙醇作为溶剂的银杏叶浸提液黄酮类化合物含量和得率最低,分别达 12.56 mg/L 和 $157.00\text{ }\mu\text{g/g}$;而以95%乙醇作为溶剂的银杏叶浸提液黄酮类化合物含量和得率最高,分别达 40.37 mg/L 和 $504.63\text{ }\mu\text{g/g}$;以50%和70%乙醇作为溶剂的银杏叶浸提液黄酮类化合物含量和得率居中。因此可以看出,以乙醇作为溶剂时,95%的浓度是银杏叶黄酮类化合物提取的最佳

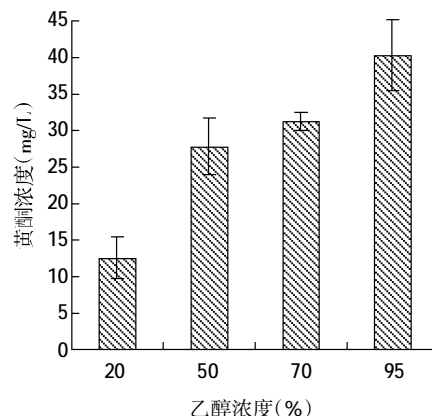


图1 不同浓度乙醇对银杏叶黄酮浓度的影响

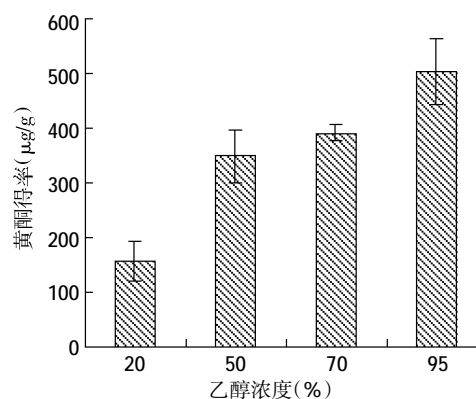


图2 不同浓度乙醇对银杏叶黄酮得率的影响

浓度。

2.4 破碎度对银杏叶黄酮类化合物提取的影响

以95%乙醇作为溶剂,破碎度为0.2 mm、0.5 mm、1.0 mm和未破碎(CK)的银杏叶为实验材料,在常温下浸渍提取24h后,银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率见图3和图4。从图3和图4可以看出,随着银杏叶破碎程度的增加,银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率随之增大。经方差分析得出,不同银杏叶破碎程度的银杏叶黄酮类化合物浓度

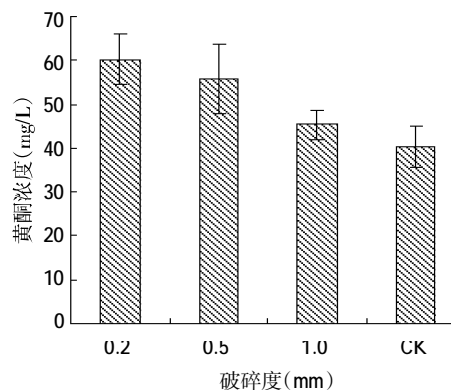


图3 破碎度对银杏叶中黄酮浓度的影响

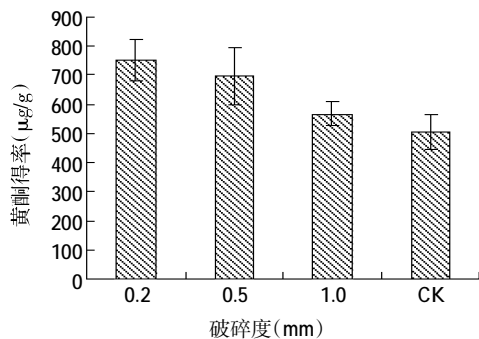


图4 破碎度对银杏叶中黄酮得率的影响

和得率差异显著($p=5\%$)或极显著($p=1\%$);其中以破碎度为0.2 mm的银杏叶黄酮类化合物浓度和得率最高,分别达60.23 mg/L和752.88 $\mu\text{g/g}$;而对对照的最低,分别只有40.37 mg/L和504.63 $\mu\text{g/g}$;破碎度为0.5 mm、1.0 mm的居中。由此可以得出,在以95%乙醇作为溶剂,在常温浸渍提取条件下,以破碎度为0.2 mm时银杏叶提取黄酮类化合物的效果较好。

2.5 不同料液比对银杏叶黄酮类化合物提取的影响

以95%乙醇为提取溶剂,破碎度为0.2 mm,料液比分别为1:50、1:100、1:150、1:200时,在常温下浸渍提取24 h后,银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率见图5和图6。从图3和图4可以看出,在不同料液比条件下,银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率不同,经方差分析达到显著水平($p=5\%$)。经多重比较发现,料液比为1:100时银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率与其它料液比的差异极显著($p=1\%$),而料液比1:50,1:150和1:200时,银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率差异不显著。其中以料液比为1:100的银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率最高,以料液比1:200银杏叶黄酮类化合物的浓度和得率最低。由此

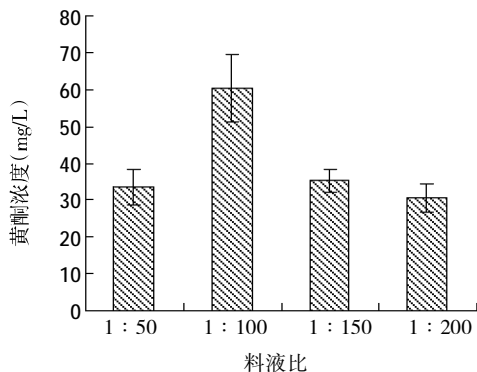


图5 料液比对银杏叶黄酮浓度的影响

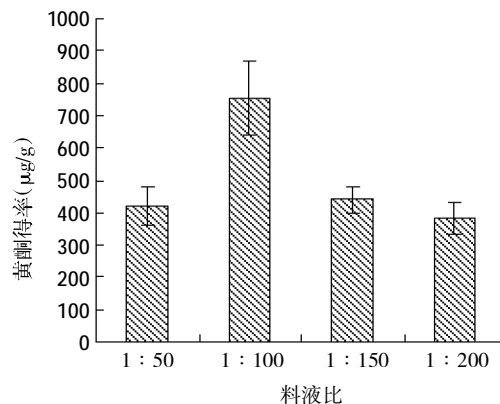


图6 料液比对银杏叶黄酮得率的影响

可以得出,在以95%乙醇作为溶剂,破碎度为0.2 mm,在常温浸渍提取条件下,以料液比为1:100的银杏叶提取黄酮类化合物的效果较好。

2.6 索氏提取法在不同时间和温度条件下银杏叶黄酮类化合物浓度和得率

利用直接索氏提取法以95%乙醇作为溶剂,破碎度为0.2 mm,料液比为1:100,分别于80 $^{\circ}\text{C}$ 、90 $^{\circ}\text{C}$ 和100 $^{\circ}\text{C}$,提取时间为4 h、6 h、12 h和24 h条件下,提取的银杏叶黄酮类化合物浓度和得率见图7-8,经方差分析,均达到显著或极显

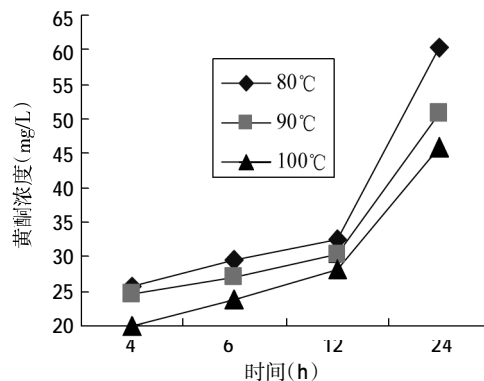


图7 不同时间和温度条件下索氏提取银杏叶黄酮浓度

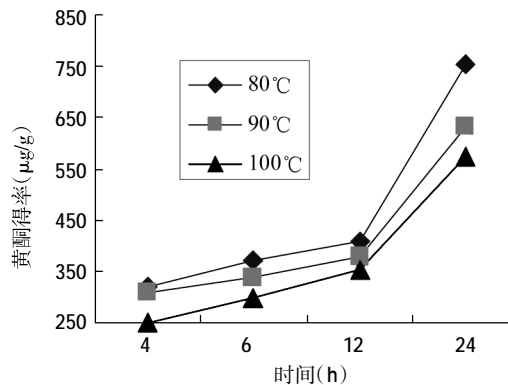


图8 不同时间和温度条件下索氏提取银杏叶黄酮得率

著水平。在同一提取温度条件下,随着提取时间的延长银杏叶黄酮类化合物浓度和得率逐渐增加,且差异达到显著水平。在4种提取温度条件下,银杏叶的浓度和得率在提取时间均为24h时达到最大,提取温度为80℃时,银杏叶的黄酮类化合物浓度和得率都达到最大值。而在同一提取时间条件下,随着提取温度的提高,银杏叶黄酮类化合物浓度和得率逐渐降低,但提取温度为80℃和90℃的差异不显著,而与100℃的差异显著。因此,利用95%乙醇作为溶剂,利用直接索氏提取法提取银杏叶黄酮类化合物的最佳提取温度为80℃,提取时间为24h。

3 讨论

1) 目前,银杏叶的提取方法目前主要有有机溶剂萃取法、水提取法、碱性稀醇或碱性水提取法、超临界萃取法、超声波提取法和酶法等^[3-14]。鉴于银杏黄酮类化合物具有独特的生理作用、临床治疗和保健价值^[1-2],为了充分开发利用我国丰富的银杏资源,探索一种操作方法稳定简便,有效成分提取较完全,杂质较少的工艺,将是本领域研究的热点。本研究发现,不同提取方法和同一方法的不同提取条件对银杏叶总黄酮类化合物的提取效率有显著差异。如在同一时间,同一温度下,选用不同的溶剂对银杏叶进行黄酮类化合物的提取时,甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、石油醚对黄酮类化合物的提取率呈现递减的趋势,且以甲醇,乙醇作为溶剂时提取率提取效果较好,但两者差异不显著。由于甲醇很轻、挥发度高、无色、易燃及有毒,因此以乙醇为提取银杏叶黄酮类化合物的最佳提取溶剂。

2) 提取温度是影响银杏叶黄酮类化合物提取的主要因素之一。本研究发现,利用95%乙醇作为溶剂进行银杏叶黄酮类化合物提取时,随着提取温度的升高银杏叶黄酮类化合物浓度和得率逐渐增加,这可能是提取温度升高可导致溶剂的粘度降低,溶剂的扩散系数增加,增强了溶剂穿透银杏叶组织的能力,从而增大了浸提效率^[9]。但鉴于有效成分的热稳定性,以及温度升高时杂质溶出量也相应增大,在选取浸提温度时不能过高。

3) 材料的破碎度对提取效果也有显著的影响,破碎度越大,产物的提取率越高。可能是因为,破

碎度的增大,有利于溶剂的浸入。溶剂的浓度对浸提效果也有显著影响,这可能是溶剂的浓度越大,与所提取物的有效接触面也越大,提取率也越高。比较该研究所采用的不同黄酮类化合物提取工艺,可以得出:选用95%的乙醇作为溶剂,破碎度为0.2mm,料液比为1:100,温度为80℃的索氏提取为最佳提取条件。

参考文献:

- [1] STICHER O. Quality of Ginkgo preparations [J]. *Planta Medica*, 1993, 5(1): 2-11.
- [2] 梁立兴, 郭大孝. 我国银杏产业发展前景预测及战略调控[J]. *林业科技开发*, 1999, 13(3): 6-7.
- [3] 卢元芳, 官霞. 银杏叶黄酮类化合物类化合物的提取和药理作用[J]. *曲阜师范大学学报*, 1999, 25(3): 95-96.
- [4] 沙怀, 陈桂先, 马莉. 银杏叶中总黄酮类化合物的提取与测定[J]. *中国药房*, 1995, 6(5): 13-14.
- [5] 廖亮. 银杏叶总黄酮类化合物提取方法研究[J]. *食品科学*, 1994, 8(176): 33-35.
- [6] 江苏新医学院. *中药大辞典*[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986: 724-725.
- [7] 杨瑞菊, 陈玉柱. 银杏叶健康饮料研制[J]. *食品科学*. 1990(12): 57-58.
- [8] 中国科学院植物研究所. 北京制药厂药物研究所. 治疗冠心病的银杏叶制剂及其药理实验[J]. *中草药通讯*, 1972(4): 15-18.
- [9] 游松, 姚新生, 陈英杰. 银杏的化学及药理研究进展[J]. *沈阳药学院学报*, 1988, 5(2): 142-148.
- [10] 庄向平, 虞杰英, 杨更生, 等. 银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法[J]. *中草药*, 1992, 23(3): 122-124.
- [11] 胡敏, 张艳红, 胡艳, 等. 银杏黄酮类化合物昔的水浸提方法研究[J]. 1999, 20(3): 101-108.
- [12] 田呈瑞, 李昀. 银杏叶黄酮类化合物的乙醇提取方法研究[J]. *西北植物学报*, 2001, 21(3): 556-561.
- [13] HASLERA, GROSSGA, MEIERB, et al. Complex flavonol glycosides from theleaves of Ginkgo bitoba [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(4): 1391-1394.
- [14] HASLER A, MEIER B. Ginkgo biloba content of flavonoids and terpenes fromleaves during the harvest time and from full extracts determined by chro-mato-graphic and bilolgical methods[J]. *Planta Medica*, 1993, 59(7): 632.

(本文责编: 陈珩)