

超声波辅助提取银杏叶中总黄酮的工艺优化

Optimization on extracting technology of total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves by ultrasonic-assisted method

杜若源^{1,2} 谢 晶^{1,2} 王 婷^{1,2} 车 旭^{1,2} 蓝蔚青^{1,2}

DU Ruoyuan^{1,2} XIE Jing^{1,2} WANG Ting^{1,2} CHE Xu^{1,2} LAN Wei-qing^{1,2}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

(1. College of Food Science & Technology Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing and Preservation, Shanghai 201306, China)

摘要:研究银杏叶中总黄酮的最佳提取工艺条件。在对乙醇浓度、固液比与提取时间进行单因素试验的基础上,设计三因素三水平的 $L_9(3^3)$ 正交试验优化超声辅助乙醇提取银杏叶总黄酮的最佳提取条件。结果表明:银杏叶中总黄酮的最佳工艺条件为:乙醇浓度 60%、固液比 1:50 ($m:V$) 与提取时间 30 min。通过差异性分析可知,乙醇浓度对总黄酮的提取率影响最大 ($P < 0.01$), 其次为固液比 ($P < 0.05$), 提取时间对其提取率影响最小 ($P > 0.05$)。在最佳工艺条件下,银杏叶醇提物中的总黄酮提取量为 8.075 mg/g, 提取率为 80.75%。

关键词:超声波辅助法; 银杏叶; 总黄酮

Abstract: Objective to optimize the technology for extracting process of total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves. Methods Based on the single factor experiments for ethanol concentration, solid-liquid ratio and extracting time, orthogonal experiment $L_9(3^3)$ was designed to optimize the ethanol extracting conditions of total flavonoids by ultrasonic-assisted method. Results the optimal technology for extracting conditions of total flavonoids was as followed: with 60% ethanol concentration, 1:50 ($m:V$) solid-liquid ratio and 30 min of extracting time. Conclusion According to the results of variance analysis, ethanol concentration ($P < 0.01$) had the greatest influence on yield of total flavonoids, followed by solid-liquid ratio ($P < 0.05$), extracting time was the minimal influence ($P > 0.05$). Under these conditions, the yield of total flavonoids was 8.075 mg/g and the extracting rate was 80.75%.

Keywords: ultrasonic-assisted method; *Ginkgo biloba* leaves; total

flavonoids

银杏(*Ginkgo biloba*)又名白果,属裸子植物,素有“活化石”之称。中国是银杏的发源地,除黑龙江、吉林、青海、西藏外,其他各省区均有分布。全国银杏叶产量 2 万 t 以上,占世界总量的 70% 左右^[1]。银杏叶中含有 30 余种黄酮化合物和萜类、酚类、微量元素及氨基酸等有效成分,具有降低血清胆固醇、增加冠脉流量、改善脑循环、解痉、松弛支气管和抑菌等生物作用,临床上对治疗冠心病、心绞痛、心脑血管疾病,保护肝脏,预防脑功能障碍、脑伤后遗症和抗衰老等方面均有效果^[2]。

近年来,研究者围绕银杏叶的抗氧化活性开展了相应研究。银杏叶提取物已被广泛用来生产保健品及功能性饮料^[3]。温啸等^[4]研究发现干酪乳杆菌与银杏叶提取物有协同作用,具有控制小鼠体质量、降血脂、促进胆固醇代谢的功效,可用于预防和治疗高脂血症;X. Q. Tian 等^[5]研究了银杏叶中的活性物质对小鼠诱导氧化应激与神经元凋亡的影响,发现其对小鼠的认知缺损具有良好的预防作用,且能延缓小鼠脑部海马体的衰亡,但对将银杏叶提取液作为天然食品保鲜剂使用的研究还不多。研究^[6-8]证明,银杏叶中的抗氧化成分对果蔬与肉类具有较好的保鲜护色作用,其中抗氧化的有效成分主要为黄酮类化合物。此外,也有部分学者开展了银杏叶中生物活性物质的抑菌性能研究。李虎等^[9]采用抑菌圈法研究了银杏叶黄酮粗提物对细菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌)与真菌(禾谷镰刀菌、烟草赤星病菌)的抑菌性能,结果发现银杏叶黄酮粗提物对 4 种菌均有一定抑制作用,其对大肠杆菌的抑制性能最强,对禾谷镰刀菌与烟草赤星病菌也有较明显的抑制效果。李焰等^[10]研究了银杏叶提取物对畜禽常见致病菌的抑菌效果,结果发现银杏叶提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌与多杀性巴氏杆菌的抑菌性能

基金项目:“十二五”国家支撑计划项目(编号:2012BAD38B09);上海海洋大学科技发展专项基金(编号:A2-0209-14-200061);2014 年上海市大学生创新活动计划项目(编号:A1-2035-14-0007-11-3)

作者简介:杜若源(1994—),女,上海海洋大学在读本科生。

E-mail: 120261330@qq.com

通讯作者:蓝蔚青

收稿日期:2014-11-29

良好。随着国家对植物源生物保鲜剂的开发研究逐渐重视,有必要开展银杏叶天然活性成分的分离纯化工艺优化与活性物质的综合利用研究。

传统的黄酮提取方法主要有浸渍法、回流提取法等,新兴的方法主要有微波辅助提取法、超声波辅助提取法与超临界萃取法^[11]。目前,微波辅助提取法的应用研究还处于初始阶段,且操作过程需要严格把控时间;超声波辅助提取法所用仪器简单,自动化程度极高,便于大规模生产使用^[12]。因此,已有相关学者采用此法分别从紫苏叶^[13]、辣椒叶^[14]、沙棘叶^[15]、甜荞麦^[16]与松籽壳^[17]中提取总黄酮。本研究拟采用超声波辅助乙醇浸提法提取银杏叶中的生物活性物质,课题组在前期选取乙醇浓度、固液比与提取时间进行银杏叶中总黄酮提取量单因素试验的基础上,开展三因素三水平的 $L_9(3^3)$ 正交试验,对提取工艺进行优化,旨在为后期实现植物源产品的高值化开发利用提供理论基础与参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 试验原料

银杏叶:于2014年6月摘自上海海洋大学校园主环路上,新鲜,无病虫害。

1.1.2 药品试剂

芦丁标准品(芸香叶苷):含量 $\geq 98\%$,上海维编科贸有限公司;

乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器设备

超声波清洗器:SB-25-12DT型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

高速多功能粉碎机:HC-500T2型,永康市天祺盛世工贸有限公司;

电热鼓风干燥箱:DHG-9053A型,上海一恒科学仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:V-5100型,上海元析仪器有限公司;

隔膜真空泵:GM-0.33A型,天津市津腾实验设备有限公司;

精密电子天平:XS 225A型,普利赛斯国际贸易(上海)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁(芸香叶苷)标准溶液的配制 参考文献^[18]方法配制芦丁标准溶液。准确称取5.0 mg芦丁标准品,用浓度为70%乙醇溶液溶解,并定量转移至50 mL容量瓶中,稀释至刻度,配置成浓度为0.1 mg/mL的芦丁标准溶液。

1.2.2 标准曲线的绘制 准确吸取0.1 mg/mL的芦丁标准溶液0.00,0.10,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00 mL,分别置

于7个10 mL具塞试管中,加入70%乙醇至2 mL,再加5% NaNO_2 0.3 mL,摇匀,放置6 min;加10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.3 mL,摇匀,放置6 min;加10% NaOH 3.0 mL,摇匀后放置15 min,以试剂空白作为参比,在510 nm处测定吸光度,以芦丁浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线(见图1),得回归方程: $Y=9.4068X-0.0047$, $R^2=0.9958$ 。

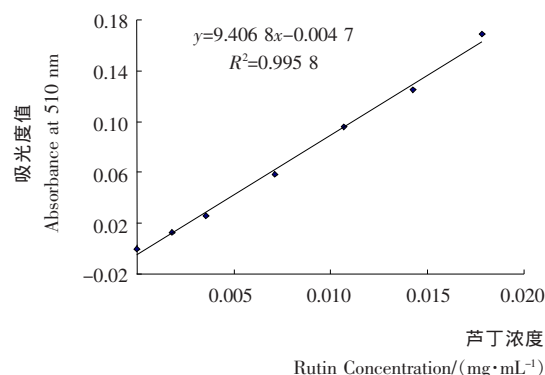


图1 芦丁标准曲线

Figure 1 Rutin standard curve

1.2.3 银杏叶黄酮粗提液提取 将银杏叶用蒸馏水洗净,时间控制在3~5 min,以免有效成分流失,洗净后置于65℃烘箱中烘干至水分含量低于10%,用粉碎机粉碎,过60目筛,得干燥粉末。以70%乙醇按固液比1:20($m:V$)在60℃下超声(400 W)提取40 min,真空抽滤后滤液即为银杏叶提取液样品。

1.2.4 银杏叶粗提液中的总黄酮含量测定 取1 mL样品,按标准曲线建立的方法测定提取液在510 nm条件下的吸光值,通过标准曲线计算出1 mL中样品的总黄酮含量,按式(1)计算得到黄酮提取量值。

$$X = \frac{m \times V}{M} \quad (1)$$

式中:

X ——黄酮提取量,mg/g;

m ——超声后1.0 mL样品中的总黄酮含量,mg/mL;

V ——提取液的总体积,mL;

M ——称取的银杏叶干粉质量,g。

1.2.5 单因素试验设计 采用超声辅助乙醇法进行银杏叶中总黄酮提取的过程中,多种因素如乙醇浓度、固液比、提取时间、提取温度、超声波频率、样品采摘时间与破碎程度等都会对总黄酮提取量产生影响。根据冯金霞等^[6]的研究结果,本课题组以乙醇浓度70%,固液比1:20($m:V$),浸提时间45 min为基础条件,分别选择乙醇浓度、固液比与提取时间3个因素作5个水平的单因素试验,进行银杏叶中总黄酮的提取。

(1) 提取溶剂浓度单因素试验:准确称取3.0 g银杏叶干品,置于200 mL烧杯中。在恒定固液比1:20($m:V$),浸

提时间 45 min 的条件下,分设 30%,40%,50%,60%,70% 共 5 个浓度梯度进行提取。取一定量样品,测其黄酮含量,计算银杏叶中总黄酮的含量,通过总黄酮提取量的高低确定最佳提取溶剂浓度。

(2) 固液比单因素试验:准确称取 3.0 g 银杏叶干品,置于 200 mL 烧杯中。在恒定乙醇浓度 70%,浸提时间 45 min 的条件下,分别使用固液比为 1:15,1:30,1:35,1:40,1:50($m:V$)进行提取。取一定量样品,测出黄酮含量,计算银杏叶中总黄酮的含量,通过总黄酮提取量的高低确定最佳固液比浓度。

(3) 提取时间单因素试验:准确称取 3.0 g 银杏叶干品,置于 200 mL 烧杯中。在恒定乙醇浓度 70%,固液比 1:20 ($m:V$)的条件下,分别选择 30,45,60,75,90 min 进行提取。取一定量样品,测出黄酮含量,计算银杏叶中总黄酮的含量,通过总黄酮提取量的高低确定最佳提取时间。

1.2.6 正交试验 在单因素试验结果的基础上,以黄酮提取量为评价指标进行正交试验,以获得银杏叶中总黄酮的最佳工艺条件。

1.2.7 数据处理 试验数据均采用 3 次平行试验的平均值,使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,利用 Origin 8.0 进行绘图,结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。组间分析采用 t -检验,显著性界值以 $P<0.01$ 为极显著, $P<0.05$ 为显著, $P>0.05$ 为不显著。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 提取溶剂浓度单因素试验 由图 2 可知,随着乙醇

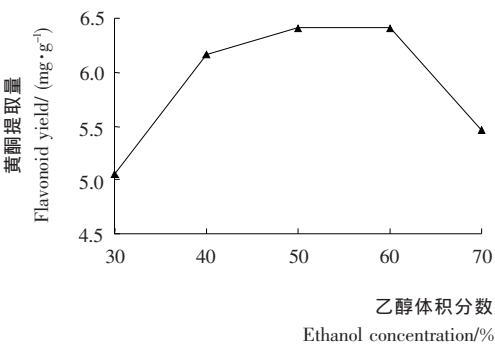


图 2 乙醇浓度对银杏叶总黄酮提取量的影响

Figure 2 Effects of ethanol concentration on total flavonoids yield from *Ginkgo biloba* leaves

浓度的升高,银杏叶中总黄酮的提取量呈现先增后减的趋势,因此选择乙醇浓度 50%,60%,70%作为正交试验中乙醇浓度的 3 个水平。

2.1.2 固液比单因素试验 由表 1 可知,在一定范围内,总黄酮提取量与固液比呈正相关。当固液比达到 1:30($m:V$)时,银杏叶中黄酮提取量明显上升。随着固液比的增加,黄酮提取量显著提高。但从经济适用角度上考虑,并非液料比越高越好。因此选择固液比 1:30,1:40,1:50($m:V$)作为正交试验中固液比的 3 个水平。

2.1.3 提取时间单因素试验 由图 3 可知,随着提取时间的延长,银杏叶中总黄酮的提取量出现先上升后下降的特点。当提取时间为 60 min 时,银杏叶中的黄酮提取率最高。从正交试验的因素选取原则与实际生产应用的可行性方面综合考虑,最终选择提取时间 30,45,60 min 作为正交试验中提取时间的 3 个水平。

表 1 固液比对银杏叶总黄酮提取量的影响

Table 1 Effects of solid-liquid ratio on total flavonoids yield from *Ginkgo biloba* leaves

固液比($m:V$)	1:15	1:30	1:35	1:40	1:50
黄酮提取量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	5.02 ± 0.01	6.03 ± 0.24	6.16 ± 0.20	6.48 ± 0.10	6.74 ± 0.13

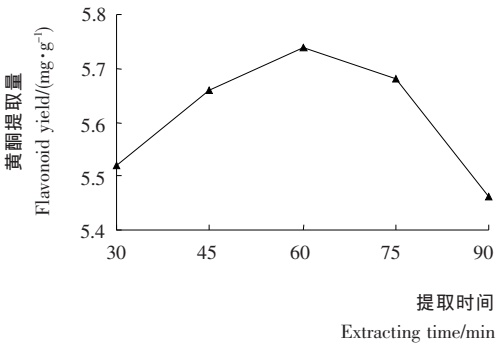


图 3 提取时间对银杏叶总黄酮提取量的影响

Figure 3 Effects of extracting time on total flavonoids yield from *Ginkgo biloba* leaves

2.2 正交试验结果与分析

根据单因素试验结果,选择乙醇浓度、固液比与提取时

间中有意义的水平(表 2),采用 $L_9(3^3)$ 正交试验优化超声辅助乙醇提取银杏叶总黄酮的最佳提取条件。正交试验的结果见表 3,方差分析见表 4。

综合表 3、4 可以看出:影响总黄酮含量的各因素水平按强弱顺序排列: $A_2>A_1>A_3$, $B_3>B_2>B_1$, $C_3>C_1>C_2$ 。乙醇浓度对银杏叶中总黄酮提取率的影响极显著($P<0.01$),固液比对其总黄酮提取率的影响显著($P<0.05$),提取时间

表 2 因素水平表

Table 2 Factors of orthogonal experiment for extracting total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves

水平	A 乙醇浓度/%	B 固液比($m:V$)	C 提取时间/min
1	50	1:30	30
2	60	1:40	45
3	70	1:50	60

表 3 正交试验结果
Table 3 Results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D 空列	黄酮提取量/ (mg · g ⁻¹)
1	1	1	1	1	7.045 5
2	1	2	2	2	7.810 1
3	1	3	3	3	7.881 0
4	2	1	2	3	7.047 1
5	2	2	3	1	7.827 1
6	2	3	1	2	8.075 0
7	3	1	3	2	6.624 6
8	3	2	1	3	6.553 6
9	3	3	2	1	6.642 5
k ₁	7.578 9	6.905 7	7.224 7	7.171 7	
k ₂	7.649 7	7.396 9	7.166 6	7.503 2	
k ₃	6.606 9	7.532 8	7.444 2	7.160 6	
R	1.042 8	0.627 1	0.277 7	0.342 6	

表 4 正交试验方差分析结果

Table 4 Variance analysis results of orthogonal experiment

变异来源	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P
因素间	953.580	1	953.580	8 245.863	0.000
乙醇浓度	4.075	2	2.037	17.618	0.000
固液比	1.306	2	0.653	5.646	0.021
提取时间	0.257	2	0.129	1.112	0.363
误差	1.272	11	0.116		
总计	960.490	18			

对提取率的影响不显著($P>0.05$)。各试验因素对其影响主次顺序为: $A>B>C$,即乙醇浓度 $>$ 固液比 $>$ 提取时间。综合以上分析,乙醇浸提银杏叶黄酮最佳因素水平为 $A_2B_3C_1$,即乙醇浓度为 60%,固液比为 1:50($m:V$),提取时间为 30 min。同时,通过对各影响因素与空列组 R 值的比较,发现因素 C 的 R 值略低于空列组。可能是由于在正交试验设计中对银杏叶黄酮提取量有影响的其他因素,如提取温度、超声波频率或样品破碎程度等有所忽略。对此,课题组还将在后期进一步增加正交试验的影响因素,并结合响应面法进行因素间差异性大小的比较分析。

3 结论

(1) 在前期单因素试验研究的基础上,通过正交试验得出,采用超声波辅助乙醇浸提法提取银杏叶总黄酮的 3 个影响因素的主次顺序依次为:乙醇浓度 $>$ 固液比 $>$ 提取时间。最佳提取工艺条件为:乙醇浓度 60%,固液比为 1:50($m:V$),提取时间 30 min。

(2) 在最佳工艺条件下进行银杏叶总黄酮的提取,其浸提物中的总黄酮含量为 8.075 mg/g,提取率为 80.75%。通过与杨港坚等^[19]采用超声辅助水提法相比,总黄酮的提取

率已有明显提高。刘海鹏等^[20]采用超声波提取银杏叶中总黄酮的最佳得率为 96%,但因其工艺过程需回流提取 3 次,且乙醇浓度为 95%,工业生产上成本较高,操作工艺相对较复杂。因此,本法具有提取时间短、成本低、提取率高等特点,将能为后期银杏叶的开发利用提供更加广阔的发展思路。

参考文献

1 易美华. 生物资源开发与加工技术[M]. 第一版. 北京:化学工业出版社,2009.

2 齐惠珍,周霞瑾,王明霞. 银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J]. 河北中医,2013,35(12):1 899~1 901.

3 张静. 银杏黄酮纯化及生物活性的研究[D]. 无锡:江南大学,2010.

4 温啸,贺大方,倪学勤,等. 干酪乳杆菌与银杏叶提取物对肥胖小鼠血脂及抗氧化功能的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(1):1~6.

5 Tian Xiao-qiang, Zhang Li-da, Wang Jing-mei, et al. The protective effect of hyperbaric oxygen and *Ginkgo biloba* extract on A β 25-35-induced oxidative stress and neuronal apoptosis in rats [J]. Behavioural Brain Research, 2013(242):1~8.

6 冯金霞,何玲,蒲雪梅. 银杏叶提取液对鲜切红富士苹果品质的影响[J]. 食品科学,2013,34(20):302~306.

7 王婵. 中草药植物提取液对鸡蛋涂膜保鲜效果的应用研究[D]. 长沙:华中农业大学,2010.

8 刘爽,付春旭,刘学军. 银杏叶提取物对酱卤制品护色的研究[J]. 当代生态农业,2012,1(2):113~117.

9 李虎,徐奇,李文静,等. 银杏叶黄酮粗提物提取及其抑菌性质研究[J]. 中国酿造,2011(11):107~110.

10 李焰,杨小燕,林跃鑫,等. 银杏叶有效成分提取与抑菌效果研究[J]. 中国畜牧杂志,2006,42(15):54~56.

11 宋丽萍. 银杏叶总黄酮的提取工艺研究[J]. 海峡药学,2013,25(6):37~39.

12 毛火龙,王丽丽,熊英. 微波辅助法提取银杏叶总黄酮的研究[J]. 九江学院学报,2014(1):78~81.

13 陈洪彬,郑金水,蔡英卿. 紫苏叶中总黄酮的超声波辅助提取工艺优化[J]. 食品与机械,2014,30(5):232~236.

14 王艳丽,何煜波,曹晓宁,等. 辣椒叶中总黄酮提取工艺的优化[J]. 食品与机械,2013,29(3):138~140,168.

15 李峰,刘浩,钟媛,等. 沙棘叶中总多酚和总黄酮的提取工艺[J]. 食品与机械,2012,28(4):128~130.

16 张素斌,廖燕婷. 4 种甜荞麦黄酮提取方法的比较研究[J]. 食品与机械,2012,28(6):150~153.

17 董周勇,任辉,周亚军. 松籽壳总黄酮超声提取工艺响应面优化[J]. 食品与机械,2011,27(5):100~102.

18 赖红芳,黄秀香,陆俊宇. 超声波辅助提取山豆根中的黄酮和多糖工艺优化[J]. 食品与机械,2014,30(1):196~198,223.

19 杨港坚,冯达星. 水溶性银杏总黄酮提取工艺研究[J]. 中医临床研究,2010,2(3):120~121.

20 刘海鹏,刘延成,马东升,等. 超声波/回流法银杏叶总黄酮提取的研究[J]. 化学工程师,2005(8):49~50.