

解吸-热提两步法提取银杏叶中的黄酮研究*

Extracting Flavonoids from *Ginkgo biloba* Leaves by Two Steps of Release and Hot-extraction

赵钟兴, 王飞, 韦藤幼**, 童张法

Zhao Zhongxing, Wang Fei, Wei Tengyou, Tong Zhangfa

(广西大学化学化工学院, 广西南宁 530004)

(Coll. of Chem. and Chemical Engi., Guangxi Univ., Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要: 用解吸-热提两步提取法(简称两步法)提取银杏(*Ginkgo biloba*)叶中的黄酮,并与传统的醇提和水提方法进行比较。两步法是在10.00g银杏叶粉末中加入解吸剂乙醇溶液,25℃静置一定时间,再加入沸腾的提取溶剂乙醇溶液提取,提取2次,合并滤液进行分析。结果表明,两步法提取银杏黄酮的最佳操作参数为解吸剂乙醇浓度为60%、用量为样品量的1.6倍,解吸时间15min,溶剂乙醇浓度50%,提取2次,每次15min,溶剂用量为样品量的40倍。两步法提取黄酮的得率为2.69%,比水提法提高了0.57%,比醇提法略高;两步法提取的浸膏黄酮含量为6.91%,比水提法提高了1.89%、比醇提法提高了0.96%;两步法的提取时间比传统法少4~8倍。

关键词: 银杏 黄酮 提取 两步法

中图分类号: O652.1; R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2005)02-0127-03

Abstract Flavonoids in *Ginkgo biloba* was extracted by the method of two-steps of release and hot-extraction (two-steps). This method was compared to extracting with ethanol and extracting with water. In two-steps, first, 10.00g *Ginkgo biloba* was put little release solvent under 25℃ to keep sometime. And then, boiling extraction solvent of ethanol solution was added. The filtrates from two times extracting were mixed and analyzed. The result showed that the best conditions of two-steps were 60% 16 ml ethanol solution using as release solvent, 15 min extracting time for every time and solvent quantity which was 40 times of the weight of sample. The extraction ratio of the two-steps was 2.69%. This result was 1.27 times than extracting with water and equal to extracting with ethanol. The extraction content of the two-steps was 6.91% in extract. This result was 1.38 times than extracting with water in extract 1.15 times than extracting with water in extract. The extraction time of two-steps was only 1/4 and 1/8 of traditional methods.

Key words *Ginkgo biloba*, flavonoids, extraction, two-steps

银杏(*Ginkgo biloba*)又名白果、公孙树,属我国特产植物资源,其产量占世界总量的70%以上。银杏叶提取物中所含的主要生物活性成分银杏黄酮,能有效的防治心脑血管疾病,拮抗血小板活化因子,对与自由基有关的疾病,如老年性痴呆症、衰老等都有明显的改善作用^[1]。银杏黄酮的常规提取方法有水提、

醇提等^[2],但提取时间在2h以上,粗提物杂质多、能耗大。现在广泛关注的现代提取方法,如微波^[3]、超声波^[4]及超临界提取^[5],提取速度快及得率高,但要实现工业化,目前的生产成本还较高。

我们在研究微波预处理提取法^[6,7]时发现,该法省去微波时也有较好的提取效果。从而我们提出了有效成分的解吸-热提两步提取法(简称两步法,已申请国家发明专利)^[8]。该法首先用少量解吸剂把有效成分从植物组织吸附及包埋中释放出来,然后加入热溶液提取。本文用解吸-热提两步提取法提取银杏叶中的黄酮,并与传统的醇提和水提方法进行比较。

收稿日期: 2004-11-24

修回日期: 2005-01-28

作者简介: 赵钟兴(1979-),男,天津人,硕士研究生,主要从事天然产物提取研究。

* 广西大学科学技术研究重点基金项目(编号: 2003 ZD05)资助。

** 联系作者。

1 实验部分

1.1 实验材料

银杏叶购于药材市场,产地为广西

芦丁标准品(ICN),95%乙醇,亚硝酸钠,硝酸铝,氢氧化钠,均为分析纯

1.2 实验设备

PC2501紫外分光光度计(日本岛津公司出品),DF-101B集热式恒温加热磁力搅拌器,101AS-2型不锈钢数显电热鼓风干燥箱,RE-52AA型旋转蒸发器。

1.3 提取步骤

1.3.1 醇提法和水提法

取银杏叶粉末10.00g,放于500ml圆底烧瓶中,加入200ml溶剂(醇提用50%乙醇,水提用蒸馏水)回流提取,改变提取时间,提取2次,合并滤液,分析。

1.3.2 解吸-提取两步法

在10.00g银杏叶粉末中加入一定数量及一定浓度的解吸剂(某个浓度的乙醇溶液),25℃静置一定时间,再加入沸腾的提取溶剂(也是某个浓度的乙醇溶液),提取一段时间,提取2次,合并滤液,分析。

1.3.3 浸膏及其组成测定

对最佳条件下的传统法及两步法滤液用旋转蒸发器进行蒸发浓缩,得到粗浸膏真空干燥,最后称重并分析其黄酮含量。

1.4 分析方法

1.4.1 标准曲线测定

精确称取真空干燥后的芦丁0.0800g,用30%乙醇溶解,定容到250ml容量瓶中,取1ml 2ml 3ml 4ml 5ml于25ml比色管中,用30%乙醇补充至12.5ml,加入0.7ml NaNO₂(1:20),摇匀,放置5min后加入0.7ml Al(NO₃)₃(1:10),摇匀,6min后再加入5ml 1mol/L NaOH,混匀,用30%乙醇定容到刻度,以空白试剂作为参比,用分光光度法在510nm测定吸光度

标准曲线测定结果为:

$$C = 86.91A - 0.2728 (R^2 = 0.9999)$$

1.4.2 分析误差校验

精密度实验: RSD为0.54% (n=5); 待测液稳定性实验: RSD为0.63% (n=5); 操作过程稳定性实验: RSD为0.89% (n=5); 加样回收实验: n=5, 平均回收率为97.0% (RSD=1.1%), 98.8% (RSD=0.97%)和98.2% (RSD=1.6%)

2 结果与分析

2.1 传统提取方法

图1是两种传统提取方法的提取时间对得率的影响。由图1可知,水提法在240min达到最大值2.12%;醇提法在120min达到最大值,为2.67%,醇提法比水提法得率高,提取速度快,因而在工业生产中多采用醇提。

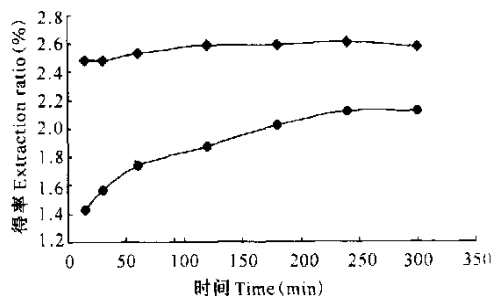


图1 传统醇提法及水提法的提取时间对得率的影响

Fig. 1 The effect of the time of traditional extraction using ethanol and water respective on the extraction ratio

◆: 醇提法; ●: 水提法

◆: Extracting with ethanol; ●: Extracting with water

2.2 两步法解吸过程乙醇浓度、用量及时间的影响

图2图3图4分别是在热提条件(100ml 60%沸乙醇两次提取均为20min)相同下,不同乙醇浓度(乙醇用量为16ml及解吸20min)、乙醇用量(乙醇浓度为60%及解吸20min)及解吸时间(乙醇浓度及用量分别为60%及16ml)对提取得率的影响。从图2~图4知,这些因素对得率的影响都是单调上升的,乙醇浓度增加,其渗透物料及解吸能力也增强,解吸效果变得更好;乙醇用量太少及解吸时间不够会影响物料的渗透及解吸效果,从而影响后续热提。但乙醇浓度达到60%、乙醇用量达到16ml及解吸时间达到15min后,黄酮已充分解吸,提取得率达到了最大值。

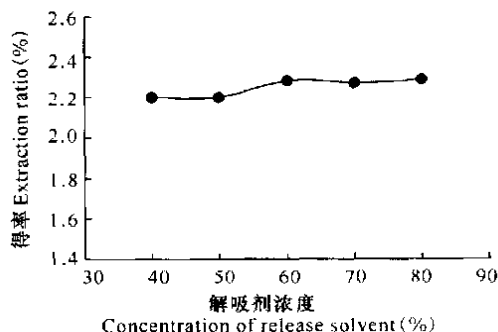


图2 解吸剂浓度对得率的影响

Fig. 2 The effect of concentration of release solvent on extraction ratio

7中黄酮提取得率在 15min时达到最大值。

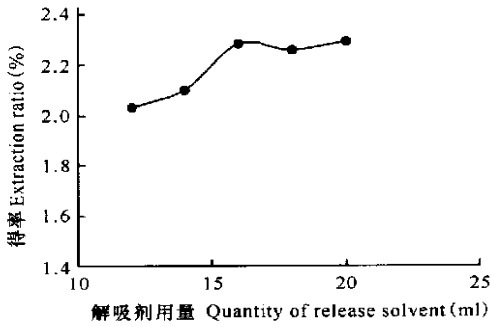


图 3 解吸剂用量对得率的影响

Fig. 3 The effect of quantity of release solvent on extraction ratio

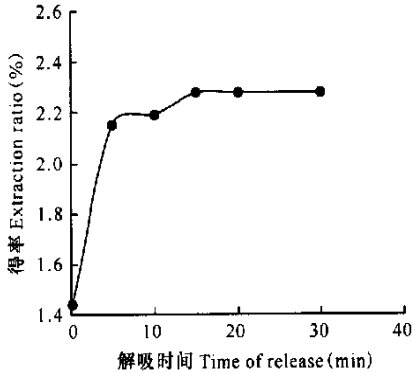


图 4 解吸时间对得率的影响

Fig. 4 The effect of time of release on extraction ratio

2.3 两步法热提过程乙醇浓度、用量及时间的影响

图 5 图 6 图 7 分别是在最佳解吸条件 (16ml 60%乙醇,解吸时间 15min)下,不同乙醇浓度 (提取时间为 20min及用量为 100ml),不同乙醇用量 (提取时间为 20min及乙醇浓度 50%),不同提取时间 (乙醇浓度 50%及单次乙醇用量为 200ml)的提取结果。从图 5可看出,乙醇浓度不同对黄酮提取率有很大的影响,在溶剂浓度为 40%~50%时提取率最高,考虑到乙醇浓度低,蛋白质、淀粉等物质被提出多导致提取过滤困难及浸膏杂质增加,采用 50%乙醇作为热提溶剂。在图 6中黄酮得率随溶剂用量增加而增加,当溶剂用量达 200ml时黄酮得率已增加到最大值 图

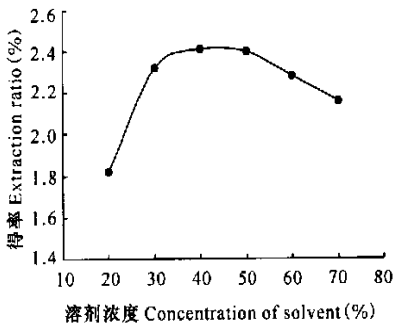


图 5 溶剂浓度对得率得影响

Fig. 5 The effect of concentration of solvent on extraction ratio

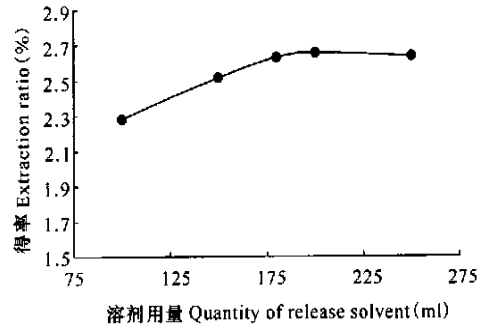


图 6 溶剂用量对得率得影响

Fig. 6 The effect of quantity of solvent on extraction ratio

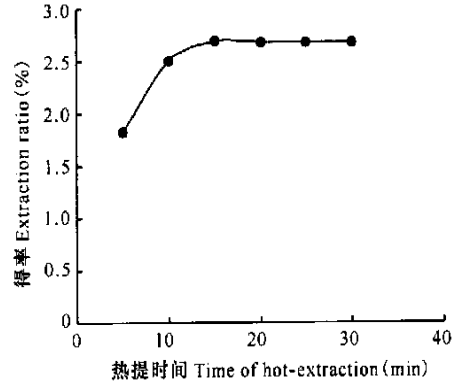


图 7 热提时间对得率得影响

Fig. 7 The effect of time of hot-extraction on extraction ratio

ratio

2.4 两步法与传统方法的比较

表 1为两步法与传统方法的比较。从表 1可以得出: (1)两步法比传统法提取时间少 4~8倍; (2)黄酮得率比水提法提高了 0.57%,比醇提法略高; (3)浸膏黄酮含量比水提法提高了 1.89%、比醇提法提高了 0.96%。两步法的提取效果比传统法要好。

表 1 不同提取方法的结果比较

Table 1 The comparison of results different extracting methods

| 提取方法 Extracting method | 提取时间 Time of extraction (min) | 95%乙醇用量 Quantity of 95% ethanol (ml) | 浸膏黄酮含量 Content of flavonoids in extract (%) | 得率 Extraction ratio (%) |
|---------------------------|----------------------------------|---|--|----------------------------|
| 醇提法 Ethanol extraction | 120 | 210 | 5.95 | 2.67 |
| 水提法 Water extraction | 240 | 0 | 5.02 | 2.12 |
| 两步法 Two-steps | 30 | 220 | 6.91 | 2.69 |

3 结论

(1)两步法提取银杏黄酮的最佳操作参数为解
(下转第 132页 Continue on page 132)

2.5.2 桫欏直链淀粉和支链淀粉的相对分子量测定
按上述步骤将直链淀粉和支链淀粉的样品溶液
进样,记录样品色谱各峰保留时间,由样品的保留时
间,用 $\log M_w - t_R$ 校正曲线计算得桫欏直链淀粉和支
链淀粉的相对分子量。结果见表 2

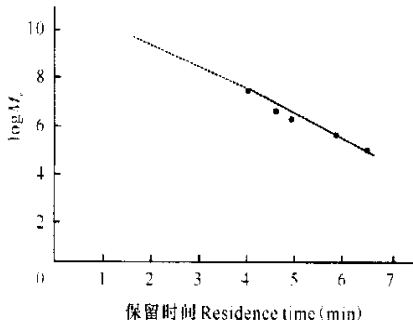


图 3 $\log M_w - t_R$ 曲线

Fig. 3 The $\log M_w - t_R$ curve

表 2 计算结果

Table 2 The result

| 样 品 Samples | 保留时间 Residence time (min) | | | | 相对分子量 Molecular weight |
|---------------------|---------------------------|------|------|----------------|---------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 平均值 Average | |
| 直链淀粉 Amylose | 6.48 | 6.48 | 6.47 | 6.48 | 45000 |
| 支链淀粉 Amylopectin | 4.12 | 4.13 | 4.12 | 4.12 | 5600000 |

3 结论

桫欏淀粉通过碱液分散后,桫欏直链淀粉和支链
淀粉均溶入溶液中,加入正丁醇-异戊醇,利用直链淀
粉和正丁醇形成溶解性小的复合物,形成丝状沉淀。

而支链淀粉结构分枝多,空间位阻大,不能和正丁醇
形成复合物,从而使直链淀粉和支链淀粉得到分离。
在直链淀粉纯化过程中,非常容易老化,因为直淀粉
链之间由于氢键作用相互缔合,缠绕形成丝状结晶。
直链淀粉的结晶不溶于水,甚至加热至沸腾也不溶
解,分离直链淀粉后,溶液经浓缩后必须再用正丁醇
-异戊醇处理 1-2 次,以防小分子量的直链淀粉混
杂到支链淀粉,再经无水乙醇多次洗涤,真空干燥,得
到桫欏直链淀粉结晶和支链淀粉纯品。桫欏直链淀粉
和支链淀粉的 HPLC 图分别只有 1 个单峰,相对分子
质量分布于一个比较窄小的范围内,说明通过上述手
段得到的桫欏直链淀粉和支链淀粉纯度很高。桫欏直
链淀粉的相对分子量是 45000,支链淀粉的相对分子
质量是 5600000

参考文献:

- [1] 莫小曼. 奇异食品桫欏粉 [J]. 中国食品, 2001, 7: 30-31.
- [2] 沈钟芬. 桫欏淀粉理化性质的研究 [J]. 食品科学, 2004, 9: 46-49.
- [3] 何照范. 植物淀粉及其利用 [M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1990.
- [4] 高群玉. 绿豆淀粉颗粒性质的研究 [J]. 食品工业科技, 1997, 5: 36-37.
- [5] 王 航. 椰子淀粉性质的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2002, 7: 1-4.
- [6] 黄立新. 不同品种淀粉分子量分布研究 [J]. 华南理工大学学报, 1997, 7: 30-34.
- [7] 杜先锋. 葛根直链淀粉分子量的测定 [J]. 合肥工业大学学报, 2001, 4: 203-206.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 129 页 Continue from page 129)

吸剂乙醇浓度 60%、用量为样品量的 1.6 倍,解吸时
间为 15min,溶剂乙醇浓度为 50%,提取 2 次,每次
15min 溶剂用量为样品量的 40 倍。

(2) 两步提取法黄酮得率为 2.69%,比水提法提
高了 0.57%,比醇提法略高;两步提取法浸膏黄酮含
量为 6.91%,比水提法提高了 1.89%、比醇提法提高
了 0.96%;两步法的取时间比传统法少 4-8 倍。解吸
热取两步提取法与传统方法相比,具有提取时间短、
得率高及浸膏杂质含量低等优点,有着较好的应用前
景。

参考文献:

- [1] 苏瑞强,周宗仪,辛建玲. 高新技术在银杏叶有效成分提取
中的应用研究 [J]. 时珍国医国药, 1998, 9(6): 549-550.
- [2] 梁立兴. 银杏叶提取物 (GBE) 三种提取工艺比较 [J]. 林
业科技开发, 1998, (1): 11-13.

- [3] 周 谨,闫小燕,贺 高. 红微波提取银杏黄酮苷的方法
研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(1): 42-45.
- [4] 郭国瑞,谢永荣,钟海山,等. 超声波提取银杏黄酮苷的
工艺研究 [J]. 赣南师范学院学报, 2001, (3): 45-48.
- [5] 游 海,陶秉莹,张立麒. 超临界萃取法从银杏叶中提取
黄酮类化合物、萜内酯的工艺研究 [J]. 南昌大学学报
(工科版), 2000, 22(4): 34-38.
- [6] 韦藤幼,赵群莉,阮莉姣,等. 微波预处理法提取金银花
中绿原酸 [J]. 中成药, 2003, 25(7): 534-537.
- [7] 赵群莉,韦藤幼. 微波预处理提取肉桂油工艺的研究
[J]. 广西科学, 2003, 10(3): 223-225.
- [8] 韦藤幼,赵钟兴,林翠梧. 解吸热提两步法提取植物有
效成分的方法 [P]. CN200410051011. 9, 2004-08-02.

(责任编辑: 邓大玉)