

# 银杏叶中黄酮类化合物的提取及其体外抗氧化活性研究

李红军

(永吉县口前镇农业技术推广站,吉林 永吉 132200)

**摘 要:**以银杏叶为原料,研究了单因素(液料比、浸提 pH、提取时间、提取温度)对银杏叶中黄酮提取率的影响,并以硼砂-氢氧化钙-水为溶剂提取银杏叶中的黄酮,用正交实验方法优化了银杏叶中黄酮的提取工艺,用油脂抗氧化试验研究了黄酮的抗氧化性。结果表明:影响黄酮提取因素顺序为:提取温度>液料比>提取时间=浸提液 pH,最佳提取工艺组合为: $A_1B_2C_2D_2$ ,即液料比为 1:30,浸提液 pH 为 8,提取温度为 80℃,提取时间为 3 h,在此工艺条件下银杏叶中黄酮的提取率为 2.67%。银杏叶中的黄酮对猪油的氧化具有明显的抑制作用。随着提取物浓度的增加,抗氧化性初期表现为逐渐增强的趋势,当添加量为 0.20% 时达到最佳抗氧化效果,其抗氧化性不如抗氧化剂维生素 C;当提取物添加量继续增大时,抗氧化效果有所下降。

**关键词:**银杏叶;黄酮类化合物;抗氧化性;正交实验

**中图分类号:**S 567.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)05-0156-04

银杏是我国特有的植物,其种子、根、叶均可入药。是现存种子植物中最古老的植物之一,被称为“活化石”。它集科学、营养、用材、观赏、保健医疗、生态防护诸价值于一体,在我国分布广泛。据现代药理研究,银杏叶对人体和动物体的医疗、保健作用较为广泛,如改善心血管及周围血管循环功能,对心肌缺血有改善作用,具有促进记忆力、改善脑功能的作用。其提取物具有独特的药理活性和巨大的临床应用价值,其应用领域已从医药扩大到食品、保健品、化妆品等。此外,还有降低血黏度、清除自由基等功效<sup>[1-2]</sup>。

现代研究表明,银杏叶中含有多种成分,以黄酮类化合物含量较高,其中以槲皮素、山萘酚和异鼠李素的糖苷为主<sup>[3]</sup>。银杏叶黄酮类物质具有非常广泛的生理和药理活性,如扩张冠状血管、抗炎症、抗氧化、抗病毒、调节免疫功能等。目前,对黄酮类化合物的药理作用进行了深入的研究,发现其具有较强的抗氧化性,可强力清除体内自由基。因此,对其中黄酮的提取工艺条件进行研究,确定黄酮提取的优化条件,可解决银杏叶中黄酮类化合物产量低、纯度低等的问题,使银杏叶中黄酮类化合物的提取率达到一个较高的水平<sup>[4]</sup>。

黄酮类化合物抗脂质氧化和抗衰老,采用 Schaal 烘箱法进行体外抗氧化性的研究,并通过与维生素 C 的清

除自由基抗氧化能力作比较来评价黄酮类化合物清除自由基抗氧化能力<sup>[6-7]</sup>,证明了黄酮类化合物具有很好的体外抗氧化性。为了更好地开发利用银杏叶,介绍了一种操作简单、易于推广的银杏叶黄酮类化合物的提取和定量测定方法,以期对银杏黄酮的利用提供一定的参考<sup>[4-5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

银杏叶采集于吉林农业科技学院,经吉林农业科技学院孙仓教授鉴定为银杏叶,银杏叶经自然风干后粉碎、过筛备用。猪油购买于市场。试验试剂:芦丁(中国药品检定所)、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、硼砂、盐酸、正丁醇均为分析纯。试验仪器:高速粉碎机(FS500Y-3 型)、722 紫外-可见分光光度计(UV1600 型)、恒温水浴锅(DK-S1 型)、电子天平(FA1004A 型)、电子恒温鼓风干燥箱(202-3A 型)等。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 银杏叶中黄酮的提取及鉴定** 准确称取一定质量的银杏叶,加约 20 倍量已煮沸的 0.4% 硼砂水溶液,搅拌下加石灰乳调 pH 到 8~9,并保持此 pH 下煮沸 20~30 min,过滤,收集滤液,滤渣经同样方法再浸提 2 次,合并浸提液,在 60~70℃ 搅拌,并用盐酸调 pH 到 3~4,静置,沉淀完全抽提,水洗至洗液呈中性,60℃ 干燥得黄酮粗品,加 5 倍体积的 95% 乙醇沉淀黄酮粗品,3 000 r/min 离心 10 min,干燥后备用<sup>[6-7]</sup>。

**作者简介:**李红军(1968-),男,本科,农艺师,现主要从事农业技术推广工作。

**收稿日期:**2012-11-19

1.2.2 最大吸收波长的选择 以质量分数 70% 的乙醇为溶剂,以  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{NaOH}$  为显色剂,分别作芦丁标准品和银杏叶黄酮提取液的吸收曲线。银杏叶黄酮提取液在波长 510 nm 附近有较大吸收,芦丁标准溶液的最大吸收波长为 510 nm 附近,由于芦丁标准溶液与银杏叶黄酮溶液之间的吸光度相差不大,因此后续标准曲线的制作及银杏叶黄酮提取液中黄酮的测定均选择 510 nm 为测定波长。

1.2.3 标准曲线的建立 配置 0.2054 mg/mL 芦丁标准溶液,准确吸取芦丁标准溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,置于 25 mL 容量瓶中,加 30% 乙醇补足至 12.5 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 0.7 mL 摇匀,放置 5 min 后,精确加入 10% 硝酸铝溶液 0.7 mL 摇匀,放置 5 min,精确加入 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 5 mL,用 30% 乙醇稀释至刻度,以第 1 容量瓶为空白,于 510 nm 波长下测定吸光度,以吸光度(Y)为纵坐标,芦丁实际浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,建立回归方程。

1.2.4 样品黄酮含量测定 取银杏叶提取液 5 mL,同 1.2.3 项测定方法,测得 510 nm 波长的吸光度(A),代入标准曲线中求得黄酮浓度,并换算成黄酮质量与银杏叶质量的比,即为黄酮的提取率。黄酮提取率=(黄酮浓度×体积×稀释倍数)/原料质量×100%。

1.2.5 黄酮类物质的定性检验 铝盐反应:向黄酮提取物溶液中加入 1% 三氯化铝溶液,观察颜色变化,在 300~800 nm 波长范围内测定色素溶液加入三氯化铝溶液后的吸光度<sup>[10-11]</sup>。

1.2.6 单因素试验 研究液料比(1:20、1:30、1:40、1:50、1:60)、提取液 pH(5、7、9、11、13)、提取时间(1、2、3、4、5 h)、提取温度(60、70、80、90、100℃)对银杏叶中黄酮提取率的影响。

1.2.7 银杏叶中黄酮提取工艺参数优化 在单因素试验的基础上,分别研究料液比(1:30、1:40、1:50)、提取液 pH(7、8、9)、提取时间(2、3、4 h)、提取温度(70、80、90℃)对银杏叶中黄酮提取的影响,作 4 因素 3 水平  $L_9(3^4)$  正交实验,优化银杏叶中黄酮的提取工艺。因素水平见表 1。

表 1 正交实验因素及水平

水平	因素			
	A 液料比	B 浸提液 pH	C 提取温度/℃	D 提取时间/h
1	1:30	7	70	2
2	1:40	8	80	3
3	1:50	9	90	4

### 1.3 项目测定

银杏叶黄酮过氧化值(POV)的测定采用 Schaal 烘箱法进行。新鲜猪板油切成小块,湿法熬炼,双层纱布

过滤除去残渣,冷却密封后放入冰箱备用。添加物用少量乙醇溶解,各加入 50 mL 新鲜猪油中,50℃ 水浴缓慢加热融化油样,并在升温过程中不时搅拌使成匀相,另取一瓶加同样猪油为空白。70℃ 恒温箱中强化保存,每隔 12 h 搅拌 1 次,每 24 h 定时测定 POV 值。每次取样后充分振摇,以混入足够的空气。按 GB 5538-1995 测定 POV 值,进而比较不同浓度、不同抗氧化剂的抗氧化性<sup>[11-12]</sup>。

样品  $\text{POV} = (V_1 - V_2) \times C \times 1\,000 / V$ , 空白  $\text{POV} = (V_0 - V_2) \times C \times 1\,000 / V$ 。式中,POV: 过氧化值,meq/L;  $V_0$ : 对照耗硫代硫酸钠的体积, mL;  $V_1$ : 样品耗硫代硫酸钠的体积, mL;  $V_2$ : 空白耗硫代硫酸钠的体积, mL; C: 硫代硫酸钠的浓度, mol/L; V: 样品的体积, L。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的绘制

以芦丁(0.2054 mg/mL)为标准溶液,于 510 nm 波长下测定吸光度,以吸光度(Y)为纵坐标,芦丁实际浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,建立回归方程为  $Y = 15.821C + 0.0038$ ,  $R^2 = 0.9991$ 。结果见图 1。

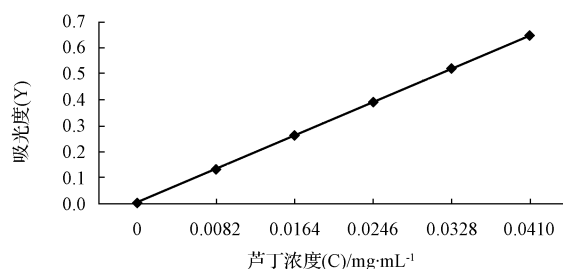


图 1 芦丁标准曲线

### 2.2 黄酮类物质定性鉴定结果

向银杏叶黄酮提取液中加入 1% 三氯化铝溶液,有一种黄色可溶性物质生成,可使溶液吸光度增大,说明有黄酮类物质存在。

### 2.3 单因素试验结果

2.3.1 料液比对银杏叶黄酮提取率的影响 准确称取 5 g 干燥银杏叶粉末,分别加入 pH 9 的氢氧化钙溶液 100、150、200、250、300 mL,用饱和氢氧化钙溶液和硼砂溶液调节溶液 pH,使之维持在 pH 9 在 80℃ 下提取 2 h。由图 2 可知,料液比太小提取的黄酮含量低,给后续操作带来困难,且提取液的消耗量大;随着料液比的降低,提取率也随着增大,但当固液比达到 1:40 后,银杏叶中黄酮的提取率增加不明显,料液比以 1:40 为宜。

2.3.2 浸提液 pH 对银杏叶中黄酮提取率的影响 准确称取 5 g 干燥银杏叶,加入 100 mL pH 分别为 5、7、9、11、13 用硼砂溶液和饱和氢氧化钙溶液调节的氢氧化钙溶液,在 80℃ 下提取 2 h。由图 3 可知, pH 9 时银杏叶中黄酮提取率最高,当 pH 低于 9 时,随着 pH 的增加,

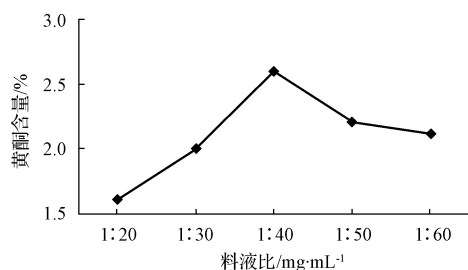


图2 液料比对银杏叶中黄酮提取率的影响

提取率增加,但当 pH 高于 9 时,提取率反而降低。这可能是因为银杏叶中黄酮为多种化合物的混合物,各化合物包含的酸性、碱性基团不同,在不同 pH 溶剂中的溶解度也不同,该试验结果表明,pH 为 7~9 的溶液能更好地提取出银杏叶中的黄酮。

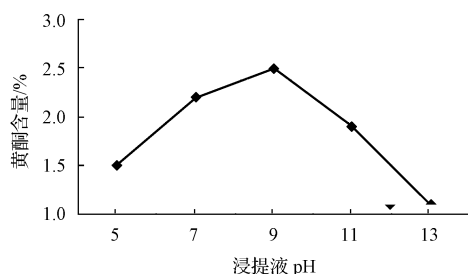


图3 浸提液 pH 对银杏叶中黄酮提取率的影响

2.3.3 提取温度对银杏叶中黄酮提取率的影响 准确称取 5 g 干燥银杏叶,加入 100 mL pH 9 的氢氧化钙溶液,用饱和氢氧化钙溶液和硼砂溶液调节 pH,使之维持在 pH 9,分别在 60、70、80、90、100℃下提取 2 h。图 4 表明,随着提取温度的升高,黄酮提取率增加,在 70~80℃之间,增加较显著;当温度超过 80℃后提取率增加缓慢。综合考虑温度太高可能会使黄酮发生氧化,且杂质溶出较多,不利于黄酮的纯化,因此提取温度选择 80℃。

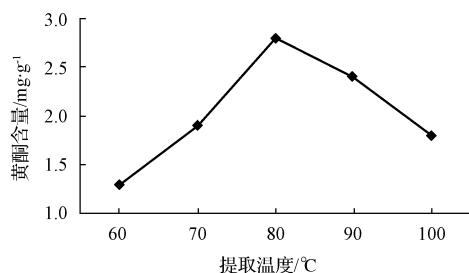


图4 提取温度对银杏叶中黄酮提取率的影响

2.3.4 提取时间对银杏叶中黄酮提取率的影响 准确称取 5 g 干燥银杏叶,加入 100 mL pH 9 的氢氧化钙溶液,用饱和氢氧化钙溶液和硼砂溶液调节溶液 pH,使之维持在 pH 9,在 80℃的条件下分别提取 1、2、3、4、5 h。从图 5 可知,提取时间在 3 h 之前黄酮含量随时间延长

而增加,之后随时间延长反而降低,可能是由于高温下黄酮类化合物与其它物质发生了反应使提取物中黄酮含量降低。综合考虑 3 h 可达到较好的提取效果,提取时间以 3 h 为宜。

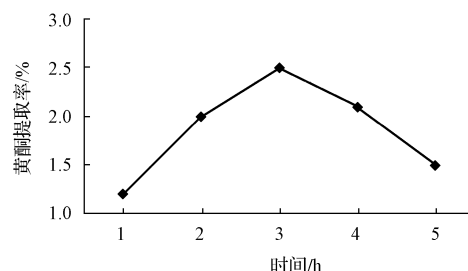


图5 提取时间对银杏叶中黄酮提取率的影响

## 2.4 银杏叶中黄酮提取工艺参数的正交实验

以料液比(1:30、1:40、1:50)、提取液 pH(7、8、9)、提取温度(70、80、90℃)和提取时间(2、3、4 h)对银杏叶中黄酮提取的影响进行正交实验。由表 2 结果可看出,银杏叶中黄酮提取的影响因素主次为:提取温度>液料比>提取时间=浸提液 pH,最佳提取工艺组合为: A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即液料比为 1:30,浸提液 pH 为 8,提取温度为 80℃,提取时间为 3 h,在此工艺条件下银杏叶中黄酮的提取率为 2.67%。

表2 正交实验结果

序号	A 液料比	B 浸提液 pH	C 提取温度/°C	D 提取时间/h	黄酮得率 /%
1	1	1	1	1	1.67
2	1	2	2	2	2.67
3	1	3	3	3	2.00
4	2	1	2	3	2.33
5	2	2	3	1	1.70
6	2	3	1	2	2.00
7	3	1	3	2	1.69
8	3	2	1	3	1.33
9	3	3	2	1	2.33
K1	6.34	5.69	5.00	5.70	
K2	6.03	5.70	7.33	6.36	
K3	5.35	5.00	5.39	5.66	
R	0.99	0.70	2.33	0.70	

## 2.5 黄酮的抗氧化性研究

将银杏叶黄酮精品按猪油质量的 0.02%、0.05%、0.20%、0.50%、1.00% 分别加入到 50 g 猪油中,并与 0.05% 维生素 C 的抗氧化效果进行比较。由表 3 可知,银杏叶中的黄酮对猪油的氧化具有明显的抑制作用。随着提取物浓度的增加,抗氧化性初期表现为逐渐增强的趋势,当添加量为 0.20% 时达到最佳抗氧化效果,其抗氧化性不如抗氧化剂维生素 C;当提取物添加量继续增大时,抗氧化效果有所下降。

表3 不同银杏叶黄酮添加剂量的抗氧化性比较

处理	测定时间/h					
	0	24	48	72	96	120
空白	1.7962	3.1076	6.8043	15.7852	57.8362	162.4240
0.02%提取物	1.7962	2.8082	6.5679	10.028	47.6590	125.5310
0.05%提取物	1.7962	2.6880	5.0066	9.9082	32.1402	82.1882
0.20%提取物	1.7962	2.1851	4.8726	7.0681	8.0545	13.2359
0.50%提取物	1.7962	4.1078	6.6658	8.3517	11.1580	16.2881
1.00%提取物	1.7962	4.8678	8.1912	10.7912	12.4354	23.09102
0.05%维生素C	1.7962	2.1849	3.3461	4.7456	7.0621	11.4321

### 3 结论

以芦丁(0.2054 mg/mL)为标准溶液,于510 nm波长下测定吸光度,以吸光度(Y)为纵坐标,芦丁实际浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,建立回归方程为 $Y = 15.821C + 0.0038$ ,  $R^2 = 0.9991$ 。

正交实验结果表明,影响银杏叶中黄酮提取率各因素的顺序为:提取温度>液料比>提取时间=浸提液pH,最佳提取工艺组合为: $A_1B_2C_2D_2$ ,即液料比为1:30,浸提液pH为8,提取温度为80℃,提取时间为3 h,在此工艺条件下银杏叶中黄酮的提取率为2.67%。

银杏叶中的黄酮对猪油的氧化具有明显的抑制作用。随着提取物浓度的增加,抗氧化性初期表现为逐渐增强的趋势,当添加量为0.20%时达到最佳抗氧化效

果,其抗氧化性不如抗氧化剂维生素C;当提取物添加量继续增大时,抗氧化效果有所下降。

### 参考文献

- [1] 龚盛昭,程江,杨卓如.微波场协同提取芦丁[J].精细化工,2003,20(12):758-760.
- [2] 吴立军.天然药物化学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2003:182-183.
- [3] 丁利君,洗建毅.黄芪中黄酮类化合物的提取及其对羟自由基清除作用[J].食品与机械,2002(3):20-21.
- [4] 周才琼,李书文,万宇波,等.金银花花叶总黄酮类化合物的最佳提取工艺研究[J].西南农业大学学报,2003(3):262-264.
- [5] 杨洋.生姜黄酮的提取及其抗氧化活性的测定[J].中国调味品,2002(7):18-23.
- [6] 许宗运,刘利林,李伟,等.七种植物提取物对猪油的抗氧化性研究[J].塔里木农垦大学学报,2003,15(4):1-5.
- [7] 王绍美,赵讲芬,黄美霞,等.茶多酚与VC对猪油乳化体系协同抗氧化性研究[J].食品工业科技,2000,21(6):24-27.
- [8] 李丹,肖刚,丁霄霖.苦荞黄酮抗氧化作用的研究[J].无锡轻工大学学报,2001,20(1):44-47.
- [9] 徐雅琴.黄树莓叶片中黄酮类的提取及抗氧化性[J].化学研究与应用,2002,14(6):739-741.
- [10] 陈奕,谢明勇.黑灵芝提取物清除DPPH自由基的作用[J].天然产物研究与开发,2006(18):917-921.
- [11] 贾冬英,姚开,吕远平,等.柑桔类黄酮抗氧化活性研究进展[J].广州食品工业科技,2002,18(4):66-68.
- [12] 刘宇红,董银卯,李才广.皮肤化学美白剂抑制酪氨酸酶活性的研究[J].日用化学工业,2001,2(1):21-23.

## Study on Extraction of Flavonoids from *Ginkgo biloba* Leaves and Antioxidant Action *in vitro*

LI Hong-jun

(Agricultural Technology Promotion Station of Kouqian Town of Yongji County, Yongji, Jilin 132200)

**Abstract:** Taking the leaves of *Ginkgo biloba* as material, the single factor (solid-liquid ratio, extraction time, extraction temperature, extraction pH) on extraction rate of flavonoids from *Ginkgo biloba* were studied, using borax-calcium hydroxide water as solvent extraction, and the extraction methods were optimized by orthogonal test; the antioxidation were studied by oil test. The results showed that the effect of flavone content from *Ginkgo biloba* leaves were in the order: extraction temperature > ratio of liquor to material > extraction time = extraction pH, optimum extraction technology for  $A_1B_2C_2D_2$ , namely combination of liquid ratio was 1:30, extraction pH 8, extraction temperature 80℃, the extraction time was 3 h, under the conditions of flavone in *Ginkgo biloba* extraction rate was 2.67%. *Ginkgo biloba* flavonoid on lard oxidation had obvious inhibition effect. With the increasing concentrations of antioxidant properties of extracts, the initial presentation of gradually increasing, when adding 0.20% to achieve the best antioxidant effect, the oxidation resistance of vitamin C as antioxidants; when the extract was added volume continued to increase, the antioxidant effect declined.

**Key words:** *Ginkgo biloba* leaves; flavonoids; antioxidation; orthogonal test