

doi:10.11937/bfyy.20172299

# 银杏叶片中萜内酯的提取工艺

李泽宏, 冯如, 袁红慧, 程华, 程水源

(武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

**摘要:**以银杏叶片为试材,采用乙醇-水浸提法,设计单因素试验,研究了乙醇浓度、提取时间、料液比、提取温度4个提取参数对萜内酯得率的影响,优化了提取工艺。结果表明:提取萜内酯的最佳工艺为料液比1:150 g·mL<sup>-1</sup>,提取温度60℃,60%乙醇,提取2.0 h;最佳洗脱条件是石油醚:乙酸乙酯=1:2(v/v),一次性洗脱。经过HPLC-ELSD分析,该工艺提取率高,操作简便,具有可信度。

**关键词:**银杏叶片;萜内酯;提取工艺

**中图分类号:**S 664.309<sup>+</sup>.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)23-0176-05

银杏(*Ginkgo biloba* L.)属银杏科银杏属落叶乔木,是我国现存特有的种子植物中最古老孑遗植物,具有很高的食用价值<sup>[1]</sup>。我国拥有丰富的银杏资源,银杏树保有量约占全球银杏树资源的90%,是银杏的主产地<sup>[2]</sup>。银杏叶的化学成分非常复杂,种类繁多,很多成分具有生理活性,最主要的是黄酮类和萜内酯类<sup>[3-4]</sup>,银杏萜内酯被认

为是银杏叶中关键的药用活性成分,是血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)的强拮抗剂<sup>[5]</sup>。近年来,有关银杏的食品发展迅猛,银杏茶、银杏叶饮料、银杏面、银杏叶酒等多种对人体有益的保健食品已经广泛存在于人们的日常生活中。

目前,国内外报道的银杏叶萜内酯的提取方法主要有有机溶剂提取法<sup>[6]</sup>、微波提取法<sup>[7]</sup>和超临界二氧化碳提取法<sup>[8-9]</sup>等。实验室研究和商业生产上用的最多的是有机溶剂提取法,常用的溶剂有甲醇、乙醇、丙酮或与水混合的溶剂<sup>[10]</sup>。现就浸提过程的浸提条件以及洗脱剂比例进行了一系列的优化筛选试验<sup>[11-15]</sup>,经过HPLC-ELSD进行萜内酯含量分析<sup>[16-18]</sup>,最终确定了较优的银杏叶片中萜内酯提取工艺,为进一步综合开发银杏类食品打开更广阔的发展前景。

**第一作者简介:**李泽宏(1992-),男,硕士研究生,研究方向为药物化学。E-mail:lee\_zeno@foxmail.com.

**责任作者:**程水源(1965-),男,教授,博士生导师,研究方向为经济林种质资源评价与利用。E-mail:s\_y\_cheng@sina.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31270717, 31400556);湖北省自然科学基金创新群体资助项目(2011CDA117)。

**收稿日期:**2017-07-10

that, in terms of different modes of transportation, van was better than truck on the whole; in terms of different modes of packaging, corrugated box packaging was better than ordinary carton, microporous membranes was better than those without nothing, processing with 1-MCP was better than untreated. It confirmed that carried by van, corrugated box + microporous membranes and 1-MCP treatment could better maintain the freshness of tomatoes, and had a better effect on prolonging the shelf life and storage period of tomato fruit.

**Keywords:** tomato; packaging; transportation; quality; storage under low temperature

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

银杏叶片(武汉轻工大学种植园);白果内酯标准品(BB;纯度 $\geq 98\%$ ;上海源叶生物科技有限公司);银杏内酯 A 标准品(GA;纯度 $\geq 98\%$ ;上海源叶生物科技有限公司);银杏内酯 B 标准品(GB;纯度 $\geq 98\%$ ;上海源叶生物科技有限公司);银杏内酯 C 标准品(GC;纯度 $\geq 98\%$ ;上海源叶生物科技有限公司);柱层析硅胶(西亚试剂);乙醇(色谱纯;国药集团化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯;国药集团化学试剂有限公司);四氢呋喃(色谱纯;国药集团化学试剂有限公司);乙酸乙酯(分析纯;天津市天力化学试剂有限公司);石油醚(分析纯;天津市天力化学试剂有限公司)。

高效液相色谱仪(Agilent 1260Infinity);蒸发光散射检测器(Alltech);恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);电子分析天平(METTLER TOLEDO);超纯水(milli-Q);旋转蒸发仪器(IKA)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent C-18 柱(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm);流动相:甲醇:四氢呋喃:水=20:8:72;流速:1 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$ ;蒸发光散射检测器检测;漂移管温度 90 $^{\circ}\text{C}$ ;载气为氮气;气体流速 2.5 L $\cdot$ min $^{-1}$ ;增阀值:4;进样量:20  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.2.2 线性关系的考察

分别精密称取白果内酯 2.0 mg、银杏内酯 A 1.0 mg、银杏内酯 B 1.0 mg、银杏内酯 C 1.0 mg 于 1 mL 容量瓶内,加甲醇溶解定容,配制成白果内酯浓度 2.0 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 、银杏内酯 A 浓度 1.0 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 、银杏内酯 B 浓度 1.0 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 、银杏内酯 C 浓度 1.0 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的对照品溶液。并用色谱级甲醇稀释为系列浓度,按照上述色谱条件测定,记录峰面积。

#### 1.2.3 供试品溶液的制备

称取银杏叶片约 3.0 g,剪碎后放入圆底烧瓶内,加入一定比例的浸提溶液,摇匀后放入磁力加热搅拌器中浸提,若干小时后对浸提液进行趁热

抽滤,于旋转蒸发仪上蒸发浓缩后上硅胶柱,用洗脱剂洗脱,收集洗脱液于圆底烧瓶并进行蒸发浓缩,待烧瓶液体蒸干后加入 2 mL 甲醇充分溶解即为供试品溶液。

#### 1.2.4 单因素试验

在前期大量预试验的基础上,分别考察料液比、提取温度、提取时间、乙醇浓度 4 个试验参数对银杏叶中萜内酯含量的影响。乙醇浓度对萜内酯含量的影响:称取 6 份银杏叶片(每份约 3 g),剪碎后放入圆底烧瓶内,分别加入 1/2 的浸提溶液(乙醇水溶液),浓度为 10%、30%、50%、60%、70%、90%,浸提液于 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热搅拌 1.5 h,再加入剩余 1/2 浸提溶液继续加热 1.5 h,经洗脱剂洗脱后甲醇充分溶解,HPLC-ELSD 检测内酯含量取平均值。提取时间对萜内酯含量的影响:称取 4 份银杏叶片(每份约 3 g),剪碎后放入圆底烧瓶内,分别加入 1/2 的浸提溶液(60%乙醇水溶液),浸提液于 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 1、2、3、4 h(加热期间在时间过半后加入剩余浸提液),经洗脱剂洗脱后甲醇充分溶解,HPLC-ELSD 检测内酯含量取平均值。料液比对萜内酯含量的影响:称取 6 份银杏叶片(每份约 3 g),剪碎后放入圆底烧瓶内,分别加入 1/2 的浸提溶液(60%乙醇水溶液),料液比分别为 1:30、1:60、1:90、1:120、1:150、1:180 g $\cdot$ mL $^{-1}$ ,于 75 $^{\circ}\text{C}$ 加热 1 h 后加入剩余部分浸提液继续加热 1 h,经洗脱剂洗脱后甲醇充分溶解,HPLC-ELSD 检测内酯含量取平均值。提取温度对萜内酯含量的影响:称取 5 份银杏叶片(每份约 3 g),剪碎后放入圆底烧瓶内,分别加入 1/2 的浸提溶液(60%乙醇水溶液),料液比 1:150 g $\cdot$ mL $^{-1}$ 置于加热磁力搅拌器中,水浴温度分别设为 40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 1 h 后加入剩余部分浸提液并继续加热 1 h,经洗脱剂洗脱后甲醇充分溶解,HPLC-ELSD 检测内酯含量取平均值。

#### 1.2.5 洗脱剂的选择

称取 3 份银杏叶片(每份约 3 g),剪碎后放入圆底烧瓶内,分别加入 1/2 的浸提溶液(60%乙醇水溶液),料液比 1:150 g $\cdot$ mL $^{-1}$ 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 1 h 后加入剩余部分浸提液并继续加热 1 h,浸提后趁热过滤,于旋转蒸发仪上蒸发浓缩后上硅胶柱,以石油醚、乙酸乙酯以及石油醚乙酸乙酯混

合溶液(体积比分别为 20 : 10、10 : 10、9 : 10、8 : 10、7 : 10、6 : 10、5 : 10、4 : 10)分别作为洗脱剂进行洗脱,待烧瓶液体蒸干后加入 2 mL 甲醇充分溶解,经 HPLC-ELSD 检测内酯含量取平均值。

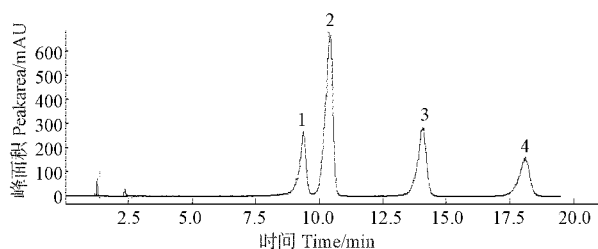
### 1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 软件进行处理和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 线性关系与供试品谱图分析

以对照品浓度为横坐标,对照品峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。白果内酯:  $y = 16\,457x - 3\,533.3$ ,  $R^2 = 0.999\,0$ ; 银杏内酯 A:  $y = 14\,548x - 1\,532.7$ ,  $R^2 = 0.999\,0$ ; 银杏内酯 B:  $y = 10\,657x - 1\,063.8$ ,  $R^2 = 0.999\,6$ ; 银杏内酯 C:  $y = 11\,039x - 915.77$ ,  $R^2 = 0.999\,1$ 。结果表明,4 种内酯在  $0.18 \sim 1.90 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。对照品与供试品高效液相色谱图如图 1、2 所示。



注:1. 银杏内酯 C; 2. 白果内酯; 3. 银杏内酯 A; 4. 银杏内酯 B。下同。

Note: 1. ginkgolide C; 2. bilobalide; 3. ginkgolide A; 4. ginkgolide B. The same below.

图 1 对照品高效液相色谱

Fig. 1 Chromatography for reference substance in HPLC

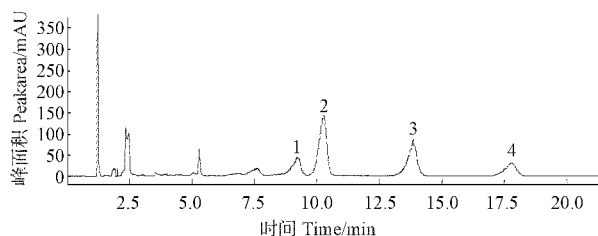


图 2 供试品高效液相色谱

Fig. 2 Chromatography for the test solution in HPLC

### 2.2 乙醇浓度对萜内酯含量的影响

由图 3 可知,当乙醇浓度在 10%~50%时,

随着乙醇浓度的增加,萜内酯含量先增大后减小;当乙醇浓度在 50%~90%时,随乙醇浓度的增加,萜内酯含量先增大后趋于平缓;当乙醇浓度在 60%时,萜内酯含量有最大值。因此该试验确定 60%的乙醇浓度为银杏叶片萜内酯的最佳浸提浓度。

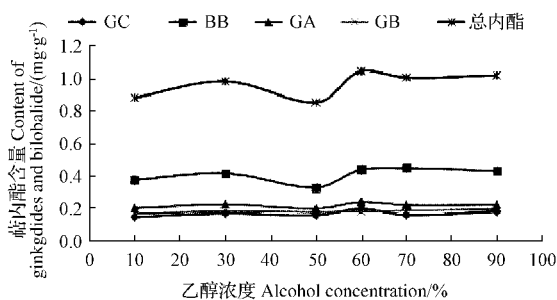


图 3 乙醇浓度对萜内酯含量的影响

Fig. 3 Effect of alcohol concentration on content of ginkgolides and bilobalide

### 2.3 提取时间对萜内酯含量的影响

图 4 表明,随着浸提时间的增加,银杏叶片萜内酯含量先增大后减小,当浸提时间为 2.0 h 时,萜内酯含量最高。因此确定浸提时间 2.0 h 为最佳浸提时间。

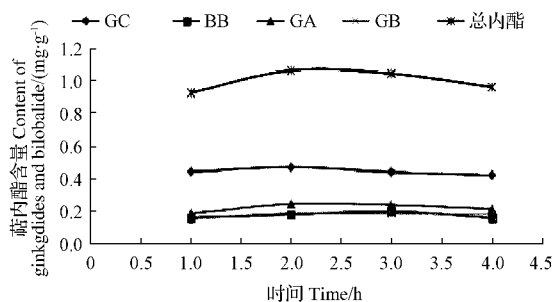


图 4 浸提时间对萜内酯含量的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on content of ginkgolides and bilobalide

### 2.4 料液比对萜内酯含量的影响

从图 5 可以看出,随着浸提溶液体积的增加,银杏叶片萜内酯含量先逐渐增大而后趋于平缓,考虑到成本以及后续旋蒸,综合选取料液比为  $1 : 150 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

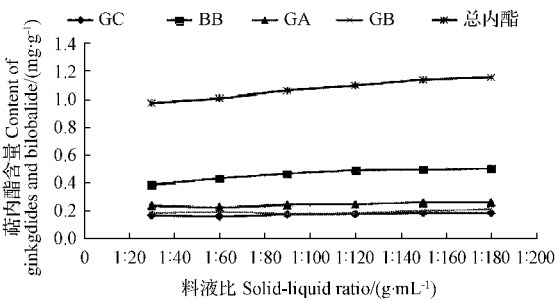


图 5 料液比对萜内酯含量的影响

Fig. 5 Effect of solid-liquid ratio on content of ginkgolides and bilobalide

2.5 提取温度对萜内酯含量的影响

由图 6 可知,随着浸提温度的增高,银杏萜内酯含量先增大后减小,当温度为 60 ℃时,萜内酯量有最大值。因此确定最佳浸提温度为 60 ℃。

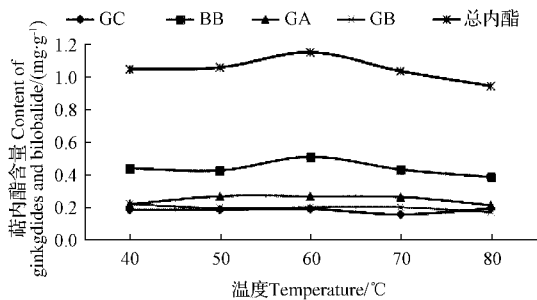


图 6 浸提温度对萜内酯含量的影响

Fig. 6 Effect of extraction temperature on content of ginkgolides and bilobalide

2.6 洗脱结果分析

从表 1 可以看出,当洗脱剂为石油醚,石油醚:乙酸乙酯=20:10(v/v)时,银杏叶片中的萜内酯无法被洗脱下来;随着洗脱剂的极性增大,银杏萜内酯逐渐被洗脱下来;当洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯=5:10(v/v)时,银杏萜内酯含量增加趋于平缓。但当洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯=4:10(v/v)和乙酸乙酯时,检测出大量杂质,故此综合选取洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯=5:10(v/v),一次性洗脱。

3 结论与讨论

选取乙醇水溶液作为浸提溶液,对银杏叶片

中的萜内酯进行提取,对浸提醇浓度、浸提时间、料液比、浸提温度进行了一系列的单因素试验,最终确定银杏叶片萜内酯的最佳浸提工艺为:醇浓度 60%,浸提时间 2 h,料液比 1:150 g·mL<sup>-1</sup>,浸提温度 60 ℃。

表 1 不同洗脱剂的洗脱结果

Table 1 Results of different eluent

洗脱剂 Eluent(v/v)	萜内酯总量 Total content of ginkgolides and bilobalide/(mg·g <sup>-1</sup> )
石油醚 Petroleum ether	0
石油醚:乙酸乙酯=20:10 Petroleum ether: Ethyl acetate=20:10	0
石油醚:乙酸乙酯=10:10 Petroleum ether: Ethyl acetate=10:10	0.86
石油醚:乙酸乙酯=9:10 Petroleum ether: Ethyl acetate=9:10	0.99
石油醚:乙酸乙酯=8:10 Petroleum ether: Ethyl acetate=8:10	1.05
石油醚:乙酸乙酯=7:10 Petroleum ether: Ethyl acetate=7:10	1.10
石油醚:乙酸乙酯=6:10 Petroleum ether: Ethyl acetate=6:10	1.13
石油醚:乙酸乙酯=5:10 Petroleum ether: Ethyl acetate=5:10	1.14
石油醚:乙酸乙酯=4:10 Petroleum ether: Ethyl acetate=4:10	1.14
乙酸乙酯 Ethyl acetate	1.14

试验采用石油醚、乙酸乙酯以及石油醚和乙酸乙酯的混合溶液作为洗脱剂进行了洗脱剂筛选试验,通过硅胶柱进行洗脱分离,经 HPLC-ELSD 分析后,最终确定最佳洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯=1:2(v/v),一次性洗脱,该洗脱方法大大简化了操作步骤,且检测结果良好。

综上所述,利用该浸提工艺及洗脱条件对银杏叶萜内酯的提取工艺进行研究,可以减少工艺操作的盲目性,为进一步银杏食品的研究奠定了基础。

参考文献

[1] 朱俊,许锋,廖咏玲,等. 银杏萜内酯调控研究进展[J]. 中国农学通报,2007(7):301-305.  
[2] 宋洋,于志斌,尤晓敏,等. 我国银杏叶提取物市场发展现

状、挑战与对策[J]. 中国新药杂志, 2015(23): 2651-2655.

[3] 丁东, 张展鹏, 权美平. 银杏叶提取物的化学成分、生物活性及应用研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2015(3): 5-8.

[4] 贾自力, 杨勤兵, 李淑媛, 等. 不同树龄白果中营养成分的比较分析[J]. 中国食物与营养, 2010(7): 72-75.

[5] BRAQUET P. The ginkgolides: potent platelet-activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* leaves; Chemistry, pharmacology and clinical applications[J]. Drugs of the Future, 1987(12): 643-649.

[6] 韩金玉, 颜迎春, 常贺英, 等. 银杏萜内酯提取与纯化技术[J]. 中草药, 2002, 33(11): 2-4.

[7] 赵严, 卢丹. 从银杏叶中高效提取银杏内酯和白果内酯的方法[J]. 国外医药: 植物药分册, 2003, 18(4): 160-161.

[8] van BEEK T A, TAYLOR L T. Sample preparation of standardized extract of *Ginkgo biloba* by supercritical fluid extraction[J]. Phytochemical Analysis, 1996(7): 185-191.

[9] TANG G, WEI X L, YIN C H. Analysis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* L. extract injections by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 33: 811-817.

[10] van BEEK T A. Ginkgolides and bilobalide: Their physical chromatographic and spectroscopic properties[J]. Bioorganic & Medical Chemistry, 2005(13): 5001-5012.

[11] 高翠华, 姜恒. 索氏提取-HPLC-ELSD法检测银杏叶片中萜类内酯的含量[J]. 当代化工, 2012(9): 999-1002.

[12] 何璐, 杨硕, 杨佳年, 等. 银杏根皮中萜内酯提取工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2010(9): 1127-1129.

[13] 罗实, 何正有, 姚洁, 等. 不同干燥方法对银杏叶有效成分的影响[J]. 华西药理学杂志, 2014(6): 678-680.

[14] 吕连媛, 张黎明, 王艳乔, 等. 银杏萜内酯 A、B、C 和白果内酯的热特征分析[J]. 天津科技大学学报, 2011(5): 9-12.

[15] 李保民, 宋亚冰, 袁橙, 等. 银杏萜内酯提取分离工艺研究[J]. 化工时刊, 2007(12): 21-24.

[16] 韩林涛, 黄芳. HPLC 法测定银杏叶片中萜类内酯的含量[J]. 湖北中医杂志, 2009(9): 74-76.

[17] 肖飞, 谭永霞, 王永平, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定银杏叶片中 4 种萜类内酯含量[J]. 医药导报, 2010(5): 675-677.

[18] 刘会, 黄绳武, 郭莹, 等. HPLC 法测定不同厂家银杏叶提取物中黄酮醇苷和萜类内酯含量[J]. 中华中医药杂志, 2015(2): 598-601.

## Extraction Process for Components of *Ginkgo biloba* Ginkgolides and Bilobalide

LI Zehong, FENG Ru, YUAN Honghui, CHENG Hua, CHENG Shuiyuan

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023)

**Abstract:** The effects of four extraction parameters on the ginkgolides and bilobalide yield were optimized by taking *Ginkgo biloba* leaves as material, using ethanol-water extraction, single factor test. The ethanol concentration, extraction time, the ratio of solid-liquid and extraction temperature on the content of ginkgolides and bilobalide were studied. The extraction process was optimized. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows, under the condition of the ratio of solid-liquid 1 : 150 g · mL<sup>-1</sup>, extraction temperature 60 °C, extracting 2.0 hours with 60% ethanol. Petroleum ether : ethyl acetate = 2 : 1(v/v). By the analysis of HPLC-ELSD, the extraction rate was high, simple, with credibility.

**Keywords:** *Ginkgo biloba* leaves; ginkgolides and bilobalide; extraction process