

# 水浸法提取银杏叶总黄酮工艺的方式及药理作用研究

林 明

(成都大学药学院 四川 成都 610044)

**【摘要】**目的：探讨水浸法提取银杏叶总黄酮工艺的方式及药理作用。方法：通过水浸法提取，分析总黄酮工艺影响因素，并总结其药理作用。结果：温度对于银杏叶水浸法黄酮提取工艺影响最大，其次是提取时间，再次是提取次数，影响最小的是料液比。总黄酮具备抗辐射、抗白血病、抗肿瘤、抗炎镇痛、抗衰老及扩血管等药理作用。结论：水浸法可充分提纯银杏叶总黄酮。

**【关键词】**水浸法；银杏叶；黄酮

## 前言

银杏，俗称白果，英文为 *Ginkgo biloba* L.，是我国独有的古生代二叠纪的遗存植物，有“活化石”之称<sup>[1]</sup>。从银杏叶中可提取出黄酮类化合物是自然界中的天然酚类物质，是植物代谢过程中产生的次生产物。研究表明，从植物中提取的黄酮类化合物具有很高的药用价值，如镇痛、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗过敏、降血脂、抗肿瘤、提高免疫力等<sup>[2]</sup>。从植物中提取的黄酮类化合物绿色、环保、安全，在医药和食品加工中具有广阔的应用前景。科学成熟的提取技术和生产工艺可以最大限度地保留黄酮类化合物的活性。因此，本文水浸法提取银杏叶总黄酮工艺的方式及药理作用展开了研究，内容如下：

## 1 材料与方法

### 1.1 设备与材料

仪器：选用 722G 型可见分光光度计（上海仪电分析仪器有限公司）；电热恒温鼓风干燥箱（北京科伟永兴仪器有限公司）；BSA224S 型电子天平（德国赛多利斯公司）；KQ 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；超纯水机（杭州永洁达）。

材料：试剂仪器试剂芦丁为西安惠丰生化厂提供；NaOH、Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 和 NaNO<sub>2</sub> 福建化玻科教仪器有限公司提供。

### 1.2 水浸法提取银杏叶总黄酮

水浸法提取工艺的具体方法为：使用 BSA224S 型电子天平准确称取一定量的已烘干粉碎的银杏叶，置于圆底烧瓶中，加入 200mL 超纯水，在不同时间、料液比、温度条件下水浴提取。用真空泵抽滤分离，精确吸取提取液置于比色管中。黄酮类化合物含量及黄酮提取率的测定。黄酮类化合物含量采用 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 络合吸光法；用分光光度法测定神秘果黄酮类化合物，以芦丁为对照。

## 2 方法

### 2.1 水浸法提取银杏叶总黄酮提取率计算

银杏叶总黄酮提取率(%) = 提取液所含黄酮质量(g) / 银杏叶总质量(g) × 100%。

### 2.2 绘制标准曲线

使用 BSA224S 型电子天平准确称取芦丁 20mg，置 100mL 容量瓶中，以 60% 乙醇溶解定容，取 25mL 用超纯水稀释至 50mL 即芦丁浓度为 0.1mg/mL，准确吸取 0、1.0、3.0、5.0、7.0mL 分别置于 10mL 比色管中，超纯水对照，各加 30% 乙醇至 5mL，先加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3mL，摇匀。放置 6min，再加 10% 硝酸铝溶液 0.3mL，摇匀，再放置 6min，加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL，再各用超纯水定容至 10mL，放置 15 ~ 20 min，在波长 510nm 处测定各试管中溶液的吸光度（超纯水作空白），以吸光度为纵坐标，芦丁取样浓度为横坐标，绘制出标准曲线，并得到芦丁含量与吸光值的线性回归方程。详见图 1。

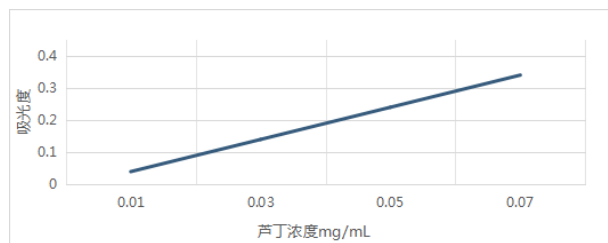


图 1 标准曲线

### 2.3 计算提取液样品总黄酮含量

计算各提取样品的吸光度值，准确吸取样品溶液 5mL，置于 10mL 比色管中。并根据标准曲线从相应的吸光度标准曲线中找出相应的浓度，并计算提取物样品中总黄酮的含量。

## 3 结果

### 3.1 提取时间对提取率的影响

使用 BSA224S 型电子天平称取一定质量的银杏叶粉，加入一定体积的超纯水，制备料液比 (w/V) 为 1:40 的储备液。在 80℃ 下分别提取 1、2、3、4 和 5h。在相同温度、相同料液比下，提取时间不同，提取效果也不同。随着时间的延长，银杏叶提取物中黄酮类化合物的含量增加。然而，当提取时间达到 3h 时，延长提取时间对提取效果的影响相对较小，这可能是因为提取液中黄酮的浓度与叶片中黄酮的浓度趋于平衡。因此，为了节省提取工艺的时间和资源，在实际提取操作中时间不应超过 3 个小时，详见图 2。

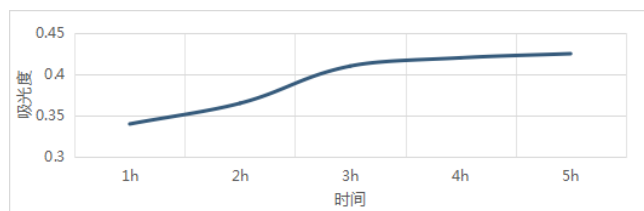


图 2 提取时间对提取率的影响曲线

### 3.2 温度对提取率的影响

料液比为 1:40 的储备液分别在 60℃、80℃ 和 100℃ 的温度下提取 1h，在相同料液比下，银杏叶提取物中黄酮类化合物的含量随温度的升高而增加。详见图 3。

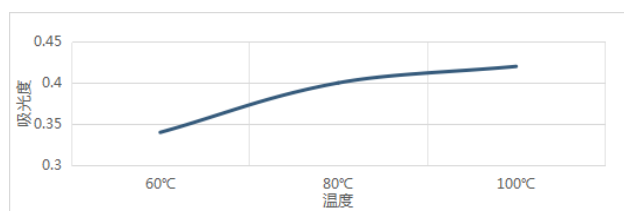


图 3 温度对提取率的影响曲线

### 3.3 料液比对提取率的影响

在 80℃ 条件下，分别提取 1:20、1:30、1:40 和 1:50 的料

液比 1h。在相同的温度和提取时间下,随着液料比的增加,提取效果呈上升趋势。料液比为 1:40 时效果较好。增大料液比对提取效果影响不大。详见图 4。

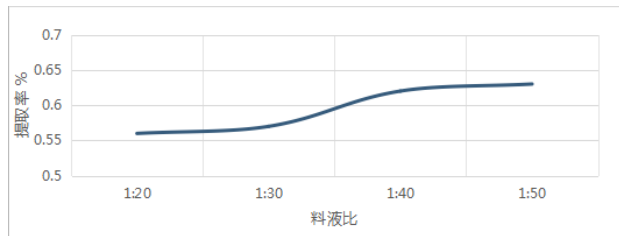


图 4 料液比对提取率的影响曲线

### 3.4 提取次数对提取率的影响

在 80℃条件下,料液比为 1:40 的原液提取 1、2、3、4 次,提取时间为 1h。在相同湿度、相同料液比、相同时间的条件下,随着提取次数的增加,提取效果越来越好,但 3 次后提取效果无明显变化。详见图 5。

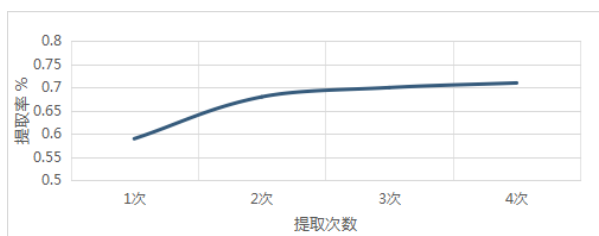


图 5 提取次数对提取率的影响曲线

### 3.5 正交实验

从正交试验结果可以看出,根据极差值 R 对比,水浸法因素影响由大到小顺序为: B>A>D>C,即提取温度对提取率的影响最大,其次是提取时间,再次是提取次数,影响最小的是料液比。详见表 1。

表 1 因素与水平

| 编号 | A<br>提取时间 /h | B<br>提取温度 /℃ | C<br>料液比 | D<br>提取次数 / 次 |
|----|--------------|--------------|----------|---------------|
| 1  | 1            | 60           | 1: 20    | 1             |
| 2  | 2            | 80           | 1: 30    | 2             |
| 3  | 3            | 100          | 1: 40    | 3             |

表 2 正交试验结果

| 编号 | A     | B     | C     | D     | 黄酮苷醇总含量 /mg · g <sup>-1</sup> | 黄酮苷醇提取率 % |
|----|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|-----------|
| 1  | 1     | 1     | 1     | 1     | 4.526                         | 0.598     |
| 2  | 1     | 2     | 3     | 2     | 5.134                         | 0.679     |
| 3  | 1     | 3     | 2     | 3     | 5.843                         | 0.773     |
| 4  | 2     | 1     | 2     | 3     | 4.865                         | 0.644     |
| 5  | 2     | 2     | 3     | 1     | 5.234                         | 0.692     |
| 6  | 2     | 3     | 1     | 2     | 5.632                         | 0.745     |
| 7  | 3     | 1     | 3     | 2     | 4.815                         | 0.637     |
| 8  | 3     | 2     | 2     | 3     | 5.236                         | 0.692     |
| 9  | 3     | 3     | 1     | 1     | 5.425                         | 0.717     |
| K1 | 4.982 | 4.823 | 5.168 | 5.216 | /                             | /         |
| K2 | 5.126 | 5.175 | 5.278 | 5.327 | /                             | /         |
| K3 | 5.043 | 5.364 | 5.126 | 5.135 | /                             | /         |
| R  | 0.183 | 0.824 | 0.056 | 0.115 | /                             | /         |

表 3 方差分析结果

| 方差来源 | 离差平方和 | 自由度 | F  | Fa       | 显著性    |
|------|-------|-----|----|----------|--------|
| A    | 0.056 | 2   | 2  | F0.1=6   | P<0.1  |
| B    | 0.040 | 2   | 40 | F0.05=12 | P<0.05 |
| C    | 0.005 | 2   | 25 | /        | /      |
| D    | 0.010 | 2   | 10 | /        | /      |
| 误差   | 0.000 | 2   | /  | /        | /      |

### 4 讨论

银杏黄酮提取物的制备是现代植物药物开发和研究的热点。为使我国银杏叶相关产业摆脱水平低、质量不稳定的落后局面,参与国际市场竞争。同时,还应该借鉴国外先进经验,用标准

化的原料和标准化的生产工艺生产出高品质的银杏叶提取物及其制剂。

传统的银杏叶中黄酮类化合物的提取工艺主要是有机溶剂法,甲醇、丙酮 z 提取剂由于其具有一定的毒性,残留量小,对最终产品有一定的影响。同时,乙醇萃取具有蒸汽压力高、易燃易爆、成本高等特点;而对于水浸提取法,由于黄酮类化合物在水中的溶解度良好,银杏叶总黄酮的提取率较高。虽然提取率略低于乙醇溶剂法,但该方法的提取液可直接色谱,无需水沉淀。该工艺一方面降低了提取成本,另一方面减少了银杏纯化过程的时间和成本,提高了批量生产的安全性。

相关学者等选取四种产地的牛大力,以水为溶剂,采用加热回流的方式提取总黄酮,通过紫外可见分光光度法测定了黄酮含量。实验表明,样品黄酮含量由大到小依次为:海南万宁>广东云浮>福建古田>广西钦州,含量范围在 32.70 ~ 87.20 μg · mL<sup>-1</sup>之间, RSD 为 1.44% (n=6),平均回收率为 98.87%。

结果表明,提取温度、提取时间、提取次数和料液比对银杏叶黄酮的提取效果有不同的影响,提取温度对银杏叶总黄酮的提取率影响显著,会随着提取温度的升高,提取效果更好。对银杏叶水浸法黄酮提取率的影响由大到小为,提取温度>提取时间>提取次数>料液比。由单因素实验结果得出,银杏叶水浸法提取工艺最好以料液比 1:30 (g/mL) 进行配置,在 100℃ 的温度下提取 3 次,每次提取时间最好为 1h,此时水浸法工艺黄酮提取最大。

总黄酮为银杏叶提取物中重要的有机成分,其具备多方面药理学作用,具体可总结如下:①抗辐射作用:相关学者研究表明,将小鼠作为实验样本,分别加入 100ml 下 10mg、20mg、30mg 的总黄酮水溶液,小鼠的存活率分别有所提升。对小鼠细胞分化情况进行检测,发现其精子畸变率、骨髓微核率有所降低。在一定程度上证明了总黄酮具备抗辐射作用,从而提升了小鼠的免疫力水平。②抗白血病作用:有学者研究显示,将总黄酮用于白血病细胞分化调控中,发现细胞生长受到显著抑制,出现胞浆、胞核扩大的现象,分析原因与总黄酮具备诱导细胞凋亡、阻断细胞周期有关;③抗肿瘤作用:有学者曾体外培养的淋巴瘤细胞中注射总黄酮,结果显示,当注射总黄酮浓度达 2500 μg/ml 时,出现了淋巴瘤细胞生长停滞的现象。可见总黄酮具备一定的抗肿瘤作用;④抗炎镇痛作用:有学者在二甲苯所致机体炎症因子水平提升的小鼠体内应用总黄酮,测定血清学结果后发现体内一氧化氮及致炎因子含量显著降低,说明总黄酮能减少炎症组织中产生过多的氧化物,进而抑制炎症反应进程;镇痛作用:同样借助小鼠模型进行试验,结果显示,总黄酮具备降低甲醛反应、扭体反应所致的镇痛作用。⑤抗衰老作用:总黄酮能够抑制细胞内一氧化氮产生,并能对体内多余自由基予以清除,进而疏通血管,增加脑内血流量;⑥扩血管作用:体外实验结果表明,总黄酮能对体内血管紧张素转化酶活性产生抑制作用,通过抑制机体内皮素而发挥扩血管作用。

综上,研究验证了水浸法提取银杏叶总黄酮工艺的最佳工艺方法,能够对银杏叶总黄酮予以充分提纯,将药理作用充分发挥。

### 参考文献:

- [1] 闫高颖,张必荣,张敏,等.水浸法提取银杏叶总黄酮工艺的研究[J].西北药学杂志,2016,31(6):560-562.
- [2] 王广慧,魏雅冬,于德涵,等.高压热水浸提法提取金纳萜黄酮的纯化及活性测定[J].食品科技,2019,44(9):228-235.