

酶辅助浸提银杏叶中黄酮类物质的工艺研究

闫文乐, 苑仪桢, 王凯瑶, 张紫玉, 司可可, 刘娜*

郑州师范学院化学化工学院, 河南 郑州

收稿日期: 2022年11月15日; 录用日期: 2022年12月27日; 发布日期: 2023年1月3日

摘要

本论文借助紫外可见分光光度计来测定银杏叶中黄酮类化合物的含量, 考察加酶量、酶解温度、酶解时间、超声温度、超声时间、料液比等因素对银杏叶中黄酮类物质提取率的影响。纤维素酶用量0.2%、酶解温度为35℃、酶解时间为2 h, 料液比为1:40, 体积分数为60%乙醇作为提取剂, 在40℃的条件下浸提15 min为银杏叶中黄酮类化合物的较优萃取工艺条件。

关键词

黄酮类物质, 紫外可见分光光度法, 超声波辅助, 酶解法, 银杏叶

Study on Enzyme-Assisted Extraction of Flavonoids from *Ginkgo biloba*

Wenle Yan, Yizhen Yuan, Kaiyao Wang, Ziyu Zhang, Keke Si, Na Liu*

College of Chemistry and Chemical Engineering of Zhengzhou Normal University, Zhengzhou Henan

Received: Nov. 15th, 2022; accepted: Dec. 27th, 2022; published: Jan. 3rd, 2023

Abstract

In this paper, the UV visible spectrophotometer to determine the content of flavonoids in *Ginkgo biloba*, to investigate the extraction temperature, extraction volume, solid-liquid ratio, extraction time, the amount of enzyme, enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time and other factors on the extraction rate of flavonoids in *Ginkgo biloba*. The results show that the optimal extraction process is that the cellulase dosage is 0.2%, the enzymatic hydrolysis temperature is 35℃, enzyme hydrolysis time is 2 h, the solid-liquid ratio is 1:40, ethanol volume fraction is 60%, ultrasonic extraction temperature is 40℃ and ultrasonic extraction time is 15 min.

*通讯作者。

文章引用: 闫文乐, 苑仪桢, 王凯瑶, 张紫玉, 司可可, 刘娜. 酶辅助浸提银杏叶中黄酮类物质的工艺研究[J]. 化学工程与技术, 2023, 13(1): 1-7. DOI: 10.12677/hjct.2023.131001

Keywords

Flavonoids, UV-Vis Spectrophotometry, Ultrasonic Auxiliary, Enzymatic Hydrolysis, *Ginkgo biloba*

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

银杏树，通常也被人们称为“白果树”，是目前已知银杏科银杏属中最古老的一种落叶乔木。因此，它也具有“活化石”、“长寿树”的美称[1] [2]。银杏浑身是宝，《本草纲目》中最早记载了其在咳嗽、哮喘、遗尿、化脓性皮肤感染和肠道蠕虫感染等疾病和治疗方面的疗效[3]。随着现代技术的蓬勃发展，银杏叶中的黄酮类物质在降低心肌耗氧量、消除自由基、增强免疫力、增加脑血管流量等方面发挥作用[4] [5] [6] [7] [8]。我国的银杏叶资源位于世界前列，为了充分发挥黄酮类物质的生理活性，需要发展一种快速、高效、准确地从银杏叶中浸提黄酮类物质的方法。

银杏叶中含有黄酮类物质、萜内酯类物质、酚类、生物碱、氨基酸、多糖类、微量元素等多种物质[9] [10] [11]。目前，从银杏叶中提取的黄酮类物质中生理活性最好的组分为黄酮醇类物质，黄酮类物质的提取方法有溶剂法[7]，超声波辅助提取法[12]，微波法[13]、酶解法[14]、超临界流体提取法[15]。本实验采用酶和超声波辅助提取银杏叶中黄酮类物质的方法，通过考察酶用量、酶解温度、酶解时间、超声温度、超声时间、液料比等因素对银杏叶中黄酮类物质提取率的影响，并对提取工艺进行优化。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

银杏叶；芦丁标准品：安耐吉试剂公司；无水乙醇：天津科密欧化学试剂有限公司；硝酸铝：国药集团化学试剂有限公司；亚硝酸钠：莱阳市双双化工有限公司；氢氧化钠：天津化学试剂有限公司。

2.2. 仪器与设备

FA114 电子分析天平：上海海康电子仪器厂；CJ1513 植物粉碎机：永康铂欧五金制品有限公司；T6 新世纪紫外可见分光光度计：北京普析通用仪器有限公司；EU-K2-10 超纯水机：北京卓信博澳仪器有限公司；KMH1 超声波清洗机：河南信诺仪器设备有限公司。

2.3. 实验方法

2.3.1. 原材料预处理

银杏叶置于烘箱中烘制 4 h，设置烘箱温度为 30℃，取干燥后的银杏叶置于植物粉碎机中进行粉碎，将处理完全后的银杏叶粉末置于避光处备用。

2.3.2. 芦丁标准曲线的绘制

向 50 mL 烧杯中加入准确称取的 10.1 mg 芦丁标准品，加入 60% 乙醇溶液 10.0 mL，搅拌溶解后转移至 50 mL 容量瓶中，加 60% 乙醇溶液至刻度线，摇匀得 0.202 mg/mL 芦丁标准溶液。取洁净干燥的 10 mL 容量瓶 6 个，用吸量管分别准确量取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 芦丁标准溶液于 10 mL 容量瓶中，加

60%乙醇溶液至 5.0 mL。向上述 6 个容量瓶中依次加入 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液, 摇匀后静置 3 min, 再加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL, 摇匀后静置 3 min, 最后加入 5% NaOH 溶液 3.0 mL, 加 60%乙醇溶液至刻度线, 摇匀后的配制成浓度为 0.00、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 的芦丁标准溶液。静置 10 min 后利用紫外可见分光光度计, 在波长为 500 nm 处测定其吸光度 A。以芦丁标准溶液的浓度 C 为横坐标, 对应吸光度 A 为纵坐标, 绘制芦丁标准曲线。

2.3.3. 银杏叶中黄酮类物质的浸提与测定

准确称取 5.0 g (精确到 0.0001 g) 银杏叶粉末于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入一定量的纤维素酶, 按照一定的料液比加入一定量的体积分数为 60% 乙醇作为浸提剂, 在一定温度的磁力搅拌器中, 酶解一定时间, 升温使酶彻底失活, 在一定温度的水浴中超声浸提一定时间。浸提完成后, 趁热进行减压抽滤。准确量取 5.0 mL 滤液置于 10 mL 离心管中离心处理, 用移液枪依次移取 0.0 mL、0.5 mL 待测溶液分别置于 2 个洁净的 10 mL 容量瓶中, 加入 5 mL 体积分数为 60% 的乙醇, 向上述 2 个容量瓶中依次加入 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液, 摇匀并静置 3 min; 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液; 摇匀并静置 3 min; 3 mL 5% NaOH 溶液, 摇匀并静置 10 min, 显色后用体积分数为 60% 乙醇定容; 将第 1 个容量瓶中的溶液作为参照, 利用紫外可见分光光度计在 500 nm 处测定各组试液的吸光度值, 并将结果代入标准曲线方程, 计算试液中银杏叶中黄酮类物质的浓度。再按照下面公式(1), 计算银杏叶中黄酮类物质的提取率。

$$y = \frac{c \times V_0 \times n}{m \times 1000} \times 100\% \quad (1)$$

式中: y——银杏叶中黄酮类物质的提取率%。

c——样液中黄酮类物质浓度 mg/mL。

V₀——浸提液总体积 mL。

n——稀释倍数。

m——称取银杏叶质量 g。

3. 结果与分析

3.1. 芦丁标准曲线的绘制

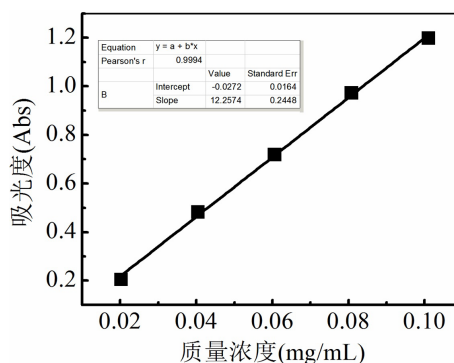


Figure 1. Standard curve of rutin

图 1. 芦丁的标准曲线

以 60%乙醇溶液为空白对照样品, 不同浓度的芦丁标准溶液为样品, 利用紫外可见分光光度计, 在 500 nm 波长处测定其吸光度值 A。以芦丁标准溶液浓度 c 为横坐标, 对应吸光度 A 为纵坐标, 绘制得到芦丁标准曲线。结果如图 1 所示, 芦丁浓度 c (mg/mL)与吸光度 A 在相应浓度范围内具有较好的线性关

系, 线性回归方程为 $A = 12.2574c - 0.0272$, $R^2 = 0.9994$ 。

3.2. 银杏叶中黄酮类物质的最佳浸提工艺

3.2.1. 酶用量对黄酮类物质提取率的影响

准确称取 5 份 5.0 g 银杏叶粉末, 分别按照加酶量为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 加入纤维素酶, 按照料液比 1:20, 加入 100 mL 60% 乙醇溶液, 在 30℃ 下酶解 2 h。酶解结束后在 100℃ 下灭活, 转移至超声仪中在 40℃ 下超声萃取 10 min, 萃取液按照“2.3.3”实验操作进行处理和显色, 测定各试液的吸光度, 考察加酶量对银杏叶中黄酮类化合物萃取率的影响。

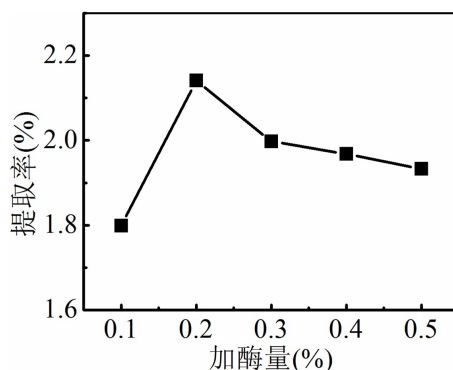


Figure 2. Effect of enzyme dosage on the extraction rate of flavonoids

图 2. 酶用量对黄酮类物质提取率的影响

加酶量对银杏叶中黄酮类物质提取率的影响如图 2 所示, 黄酮类物质的提取率随着纤维素酶的用量增加呈现先升高后降低的趋势。加酶量为 0.2% 时, 黄酮类物质的提取率最高。加酶量过大时, 水解作用受到抑制, 萃取率降低。因此, 最佳加酶量为 0.2%。

3.2.2. 酶解温度对黄酮类物质提取率的影响

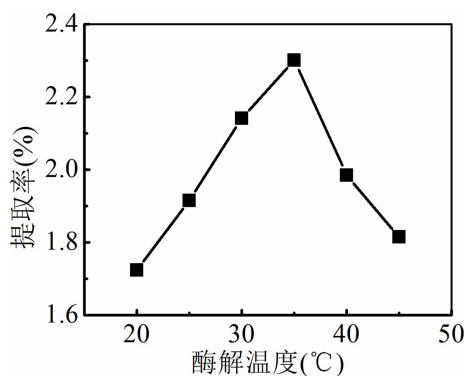


Figure 3. Effect of enzymatic hydrolysis temperature on extraction yield of flavonoids

图 3. 酶解温度对黄酮类物质提取率的影响

准确称取 6 份 5.0 g 银杏叶粉末, 按照加酶量为 0.2% 加入纤维素酶, 加入 100 mL 60% 乙醇溶液, 分别在 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃ 下酶解 2 h。酶解结束后在 100℃ 下灭活, 转移至超声仪中在

40℃下超声萃取 10 min，萃取液按照“2.3.3”实验操作进行处理和显色，测定各试液的吸光度，考察酶解时间对银杏叶中黄酮类化合物萃取率的影响。

酶解温度对银杏叶中黄酮类物质提取率的影响如图 3 所示，黄酮类物质的提取率随着酶解温度的升高呈现先升高后降低的趋势。当酶解温度为 35℃时，黄酮类物质的提取率最高。酶解温度超过 35℃时，纤维素酶的活性降低，水解作用受到抑制，萃取率降低。因此，最佳酶解时间为 35℃。

3.2.3. 酶解时间对黄酮类物质提取率的影响

准确称取 6 份 5.0 g 银杏叶粉末，按照加酶量为 0.2% 加入纤维素酶，加入 100 mL 60% 乙醇溶液，在 35℃ 下分别酶解 1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h 和 4 h。酶解结束后在 100℃ 下灭活，转移至超声仪中在 40℃ 下超声萃取 10 min，萃取液按照“2.3.3”实验操作进行处理和显色，测定各试液的吸光度，考察酶解时间对银杏叶中黄酮类化合物的萃取率的影响。

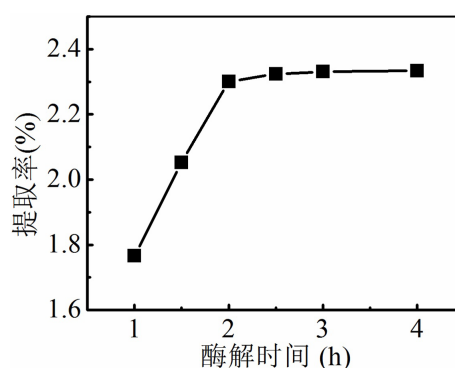


Figure 4. Effect of enzymatic hydrolysis time on extraction yield of flavonoids

图 4. 酶解时间对黄酮类物质提取率的影响

酶解时间对银杏叶中黄酮类物质提取率的影响如图 4 所示，黄酮类物质的提取率随着酶解时间的延长呈现显著增加的趋势。当酶解时间超过 2 h 时，黄酮类物质的提取率增加不明显，因为酶解产物的浓度增大，抑制了水解过程。因此，较佳酶解时间 2 h。

3.2.4. 超声温度对黄酮类物质提取率的影响

准确称取 5 份 5.0 g 银杏叶粉末，按照加酶量为 0.2% 加入纤维素酶，加入 100 mL 60% 乙醇溶液，在 35℃ 下酶解 2 h。酶解结束后在 100℃ 下灭活，转移至超声仪中，分别在 30℃、40℃、50℃、60℃ 和 70℃ 下超声萃取 10 min，萃取液按照“2.3.3”实验操作进行处理和显色，测定各试液的吸光度，考察超声温度对银杏叶中黄酮类化合物的萃取率的影响。

超声温度对银杏叶中黄酮类物质提取率的影响如图 5 所示，黄酮类物质的提取率随着超声温度的升高呈现先升高后降低的趋势。当超声温度为 40℃ 时，黄酮类物质的提取率最高。可能是因为在一些热敏性黄酮类化合物在高温下不稳定，使其溶液中的含量下降，测得的提取率下降。因此，最佳超声温度为 40℃。

3.2.5. 超声时间对黄酮类物质提取率的影响

准确称取 5 份 5.0 g 银杏叶粉末，按照加酶量为 0.2% 加入纤维素酶，加入 100 mL 60% 乙醇溶液，在 35℃ 下酶解 2 h。酶解结束后在 100℃ 下灭活，转移至超声仪中在 40℃ 下，分别超声萃 5 min、10 min、15 min、20 min 和 25 min，萃取液按照“2.3.3”实验操作进行处理和显色，测定各试液的吸光度，考察超声时间对银杏叶中黄酮类化合物的萃取率的影响。

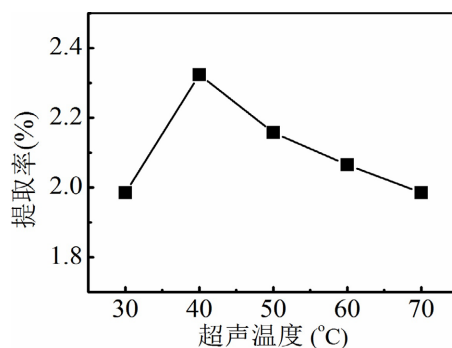


Figure 5. Influence of ultrasonic temperature on the extraction rate of flavonoids

图 5. 超声温度对黄酮类物质提取率的影响

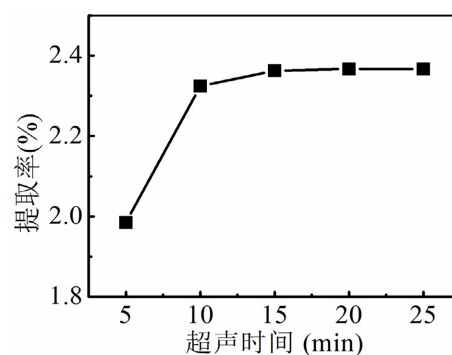


Figure 6. Influence of ultrasonic time on the extraction rate of flavonoids

图 6. 超声时间对黄酮类物质提取率的影响

超声时间对银杏叶中黄酮类物质提取率的影响如图 6 所示, 随着超声时间的延长, 黄酮类物质的提取率呈现显著增加的趋势。当超声时间超过 15 min 时, 黄酮类物质的提取率增加不明显, 因为水解产物的浓度增大, 抑制了水解过程。因此, 较佳超声时间 15 min。

3.2.6. 料液比对黄酮类物质提取率的影响

准确称取 6 份 5.0 g 银杏叶粉末, 按照加酶量为 0.2% 加入纤维素酶, 分别按照料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 和 1:60 (m:v) 加入 60% 乙醇溶液, 在 35℃ 下酶解 2 h。酶解结束后在 100℃ 下灭活, 转移至超声仪中在 40℃ 下超声萃 15 min, 萃取液按照“2.3.3”实验操作进行处理和显色, 测定各试液的吸光度, 考察料液比对银杏叶中黄酮类化合物的萃取率的影响。

料液比对银杏叶中黄酮类物质提取率的影响如图 7 所示, 随着提取剂的用量增大, 黄酮类物质的提取率显著提高。但从经济适用角度上考虑, 并非液料比越高越好。因此, 选择较优的料液比为 1:40。

综上所述, 通过实验探究和对实验数据的分析, 得出最优的萃取工艺条件为 0.2% 的纤维素酶、酶解温度为 35℃、酶解时间为 2 h, 料液比 1:40, 以体积分数为 60% 乙醇作为浸提剂, 在 35℃ 的条件下浸提 15 min, 此时银杏叶中黄酮类物质的提取率为 3.05%。

4. 结论

本文主要通过控制变量法进行单因素实验, 以芦丁标准品为参照物质, 采用紫外可见分光光度法, 建立了快速检测银杏叶中黄酮类物质的定量分析方法, 并对银杏叶中黄酮类物质的提取条件进行筛选和

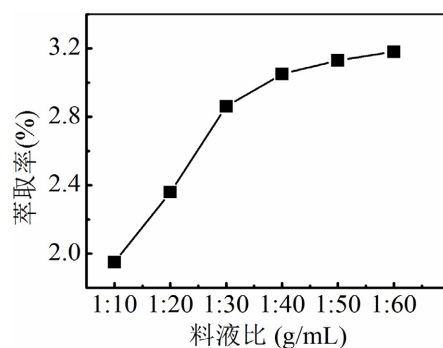


Figure 7. Relation between solid-liquid ratio and flavonoids extraction rate

图 7. 料液比与黄酮类提取率的关系

优化。主要考察了酶用量、酶解温度、酶解时间、超声温度、超声时间等因素对银杏叶中黄酮类物质提取率的影响,最后得到较好的提取条件是:纤维素酶的用量为 0.2%、酶解温度为 35℃、酶解时间为 2 h,料液比 1:40,以体积分数为 60%乙醇作为提取剂,在 35℃的条件下超声提取 15 min,此时银杏叶中黄酮类物质的提取率为 3.05%。

基金项目

河南省高等学校重点科研项目(22B150024)、郑州师范学院大学生创新创业训练计划项目(DCZ2021015)、河南省大学生创新创业训练计划项目(202212949005)和郑州师范学院一流专业建设培育项目(YLZY-211609)资助。

参考文献

- [1] 刘玲玲,于心若. 银杏的药用价值[J]. 中草药, 1994, 12(4): 219-221.
- [2] 曹春月. 银杏叶综合利用工艺研究开发[D]: [硕士学位论文]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [3] 杜少严,尹硕,王意浓,等. 银杏叶的药用与保健价值及其应用[J]. 中国食物与营养, 2020, 26(6): 59-62.
- [4] 柏文,蒋沁. 银杏叶提取物对糖尿病视网膜病变治疗作用的网络药理学分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2022, 40(9): 813-819.
- [5] 姚建标. 银杏叶提取物中有机酸成分分析及其抗脑缺血损伤保护作用的研究[D]: [博士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2022.
- [6] 邵菊芳,龚春生,方婷婷,等. 银杏叶黄酮对大肠杆菌生物膜的抑制作用[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2021, 48(6): 57-63.
- [7] 鲍宇茹,张慧茹,刘来亭. 银杏叶黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(5): 96-99.
- [8] 闫旭宇,李娟,任潘,等. 银杏叶多酚超声辅助提取工艺及其对羟自由基的清除作用[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(19): 99-104.
- [9] 杨谦,张军,杜少杰,等. 银杏叶总黄酮通过抑制 c-Met 介导的上皮-间充质转化对人肺癌细胞迁移和侵袭的影响[J]. 中国药师, 2020, 23(9): 1710-1714.
- [10] 任琪. 银杏叶多糖的提取、分离纯化及生物活性研究[D]: [博士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
- [11] 李明飞,王成章. 银杏叶提取物制备、检测及应用研究进展[J]. 现代化工, 2020, 40(1): 29-32.
- [12] 于德涵,黎莉,苏适,等. 响应面优化银杏叶中总黄酮的超声提取工艺研究[J]. 广州化工, 2020, 48(8): 64-67.
- [13] 于文萃. 微波法提取银杏叶中黄酮类化合物的工艺研究[J]. 吉林化工学院学报, 2014, 31(5): 83-86.
- [14] 初鑫宇. 酶法提取银杏叶中黄酮类化合物的研究[D]: [硕士学位论文]. 石家庄: 河北科技大学, 2015.
- [15] 刘可福. 银杏叶有效成分超临界提取技术[J]. 海峡药学, 2021, 33(3): 49-52.