

银杏叶黄酮的微波提取及其抗氧化性研究

张鹏 (北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要 [目的] 研究银杏叶黄酮类物质的微波提取工艺, 测定银杏叶黄酮的体外抗氧化能力, 为大规模提取、开发黄酮类化合物及综合利用银杏叶资源提供依据。[方法] 采用微波法提取银杏叶黄酮, 单因素试验考察乙醇浓度、料液比、辐射时间、回流温度对银杏叶黄酮提取率的影响。试验测试银杏叶黄酮对超氧阴离子、羟自由基清除作用。[结果] 微波提取的影响因素顺序为乙醇浓度 > 料液比 > 辐射时间 > 回流温度。银杏叶黄酮对超氧阴离子、羟自由基均有较强的清除作用, 且随着黄酮添加量的增大而增强。[结论] 银杏黄酮微波提取的最佳条件为乙醇浓度50%, 料液比1:25, 回流温度70℃, 微波时间120 s, 该条件下总黄酮提取率为11.02%。银杏叶黄酮具有良好的抗氧化作用, 是一种天然有效的抗氧化剂。

关键词 银杏叶; 黄酮; 抗氧化性

中图分类号 S567.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)12-05496-02

Research on the Flavonoids Extracted from Ginkgo Leaf with Microwave and its Antioxidant

ZHANG Peng (College of Biology Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract [Objective] The basis of the large-scale extraction and development of the flavonoids from ginkgo leaf and its integrated utilization was provided through the study on the microwave extraction process of ginkgo leaf flavonoids and the determination of its antioxidant capacity in vitro. [Method] The effect of the concentration of ethanol, the ratio of material to liquid, the radiation time and the refluxing temperature on microwave extraction process of ginkgo leaf flavonoids was researched with single factor experiment. The scavenging effect of ginkgo leaf flavonoids to superoxide anion and hydroxyl radical was tested. [Result] The order of the factors affecting the microwave extraction was the concentration of ethanol > the ratio of material to liquid > the radiation time > refluxing temperature. The ginkgo leaf flavonoids had the strong scavenging function to superoxide anion and hydroxyl radical, which was strengthened with the amount increasing of flavonoids. [Conclusion] The best condition of the ginkgo leaf flavonoids extraction with the microwave was the concentration of ethanol, 50%; the ratio of material to liquid, 1:25; the refluxing temperature, 70℃ and the treatment time of microwave, 120 s, under which, extraction rate of total flavonoids was 11.02%. The ginkgo leaf flavonoids had good anti-oxidation, which was a natural and effective antioxidant.

Key words Ginkgo leaf; Flavonoids; Antioxidant

银杏(*Ginkgo biloba* L.) 又名白果, 银杏科, 银杏属。我国拥有世界70%以上的银杏树资源, 年产干叶约1万t。黄酮类化合物为银杏叶中重要的生理活性物质, 具有防治心脑血管疾病、老年痴呆症、抗氧化等诸多功效, 同时银杏叶提取物可用于研制营养保健品和化妆品等。因此, 银杏叶有效成分的研究与开发越来越引起国内外学者的广泛关注^[1-3]。笔者主要研究了微波提取银杏叶黄酮的方法, 同时进行体外抗氧化性研究, 为大规模提取、开发黄酮类化合物及综合利用银杏叶资源提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂。银杏叶(采自北京林业大学校园); 芦丁标准品(Sigma公司); 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器。FA1104型电子分析天平, spectrum752型紫外可见分光光度计, 格兰仕微波炉(功率700 W), HHS-11-2型电热恒温水箱。

1.2 试验方法

1.2.1 总黄酮含量测定。

1.2.1.1 银杏叶前处理。取北京林业大学校园的银杏叶, 采摘后立刻洗净, 晾干, 于50℃的干燥箱内烘干24 h至恒重。粉碎, 过80目标准筛, 装入磨口瓶待用。

1.2.1.2 标准曲线制作。精密称取芦丁20 ng, 加60%乙醇水溶液定容至100 ml, 取25 ml用蒸馏水稀释至50 ml。分别准确吸取0.1.0.2.0.3.0.4.0.5.0 ml于10 ml具塞试管中, 加含5% NaNO₂水溶液0.3 ml, 摇匀静置6 min; 再加含10% Al(NO₃)₃水溶液0.3 ml, 摇匀静置6 min; 再加含1.0 ml/L

NaOH水溶液4 ml, 用30%乙醇水溶液稀释至刻度, 摇匀静置15 min。在480~540 nm波长范围内扫描, 确定最大吸收波长在510 nm处, 得到芦丁浓度(x)与吸光度(y)的关系的回归方程^[4]:

$$y = 13.8518x + 0.0225 (r = 0.9933) \quad (1)$$

1.2.1.3 乙醇微波法提取银杏叶黄酮。称取银杏叶粉末2.000~6.000 g于300 ml的三角瓶内, 按照一定的比例加入乙醇, 搅拌, 浸泡。将瓶口用保鲜膜覆盖, 放入微波炉中, 解冻档下加热一段时间, 取出提取液进行粗滤和精滤。将过滤后的提取液用石油醚萃取2次, 用旋转蒸发器浓缩至20 ml左右, 最后将提取液定容至25 ml待用^[5]。

1.2.1.4 含量测定。采用NaNO₂-Al(NO₃)₃比色法测量提取率。从定容后的提取液中准确吸取1 ml于10 ml具塞试管中, 加含5% NaNO₂水溶液0.3 ml, 摇匀静置6 min; 再加含10% Al(NO₃)₃水溶液0.3 ml, 摇匀静置6 min; 再加含1.0 ml/L NaOH水溶液4 ml, 用30%乙醇水溶液稀释至刻度, 摇匀静置15 min, 在510 nm处以试剂空白作对照测吸光度。根据标准曲线计算样液总黄酮含量, 并且计算提取率。

1.2.2 正交试验设计。在单因素试验基础上, 以影响银杏黄酮提取率的料液比、微波功率、乙醇浓度和辐射时间为4个影响因素, 取各自的3个水平进行正交试验, 并进行方差分析, 得出银杏黄酮微波提取的最佳工艺参数。试验因素水平如表1所示。

1.2.3 对超氧阴离子的清除作用^[6]。在25℃的恒温水浴锅中, 将pH值8.2 Tris-HCl缓冲液和45 mmol/L邻苯三酚水浴保温10 min后, 取5 ml pH值8.2 Tris-HCl缓冲液, 加5 μl 45 mmol/L邻苯三酚, 摇匀, 在325 nm下立即测定, 每隔0.5 min测一次吸光度(以pH值8.2 Tris-HCl缓冲液为空白), 计算出邻苯三酚的自氧化率, 自氧化速率控制在0.060~0.065

A/min, 一般以测定3.5 min 平均计。加入样品后氧化率测定:取5 ml pH 值8.2 Tris-HCl 缓冲液,另取1~5 号5 只试管,分别添加2 ng/ml 的银杏黄酮溶液1、2、3、4、5 ml,蒸馏水相应为4、3、2、1、0 ml,分别加入5 μl 45 mmol/L 邻苯三酚,摇匀,立即同上测定(以pH 值8.2 Tris-HCl 缓冲液为空白对照)。结果计算公式:

$$\text{抑制率}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (2)$$

式(2)中, A_0 为 OD 自氧化-OD 空白; A_1 为 OD 测定-OD 对照。

1.2.4 对羟自由基的清除作用^[7-8]。分别取1 ml 0.75 mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液于5 只试管中,依次加入2 ml 0.2 ml/L 的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 值7.40)和1 ml 蒸馏水,充分混匀,加入1 ml 新配制的0.75 mmol/L 硫酸亚铁(FeSO_4)溶液,混匀。之后,试管1 中加入1 ml 新配制的0.01% 双氧水(H_2O_2),试管2 中加入1 ml 蒸馏水,试管3 中加入1 ml 0.2 ng/ml 银杏黄酮,试管4 中加入1 ml Vc,试管5 中加入1 ml BHT。分别将5 只试管置于37 ℃ 水浴加热60 min 后,在536 nm 测吸光值,所测得的数据分别为损伤管的吸光值 $A_{\text{损}}$ 、未损伤管的吸光值 $A_{\text{未}}$ 、银杏黄酮的吸光值 $A_{\text{样}}$ 、Vc 的吸光值 A_{V} 、BHT 的吸光值 A_{BHT} 。结果计算公式:

$$\text{清除率}(\%) = (A_{\text{样}} - A_{\text{损}}) / (A_{\text{未}} - A_{\text{损}}) \times 100 \quad (3)$$

表1 乙醇回流法因素水平

Table 1 The factor level of ethanol reflux

水平 Levels	A 乙醇浓度 % Ethanol concentration	B 提取温度 Temperature	C 料液比 Solid:liquid ratio	D 辐射时间 s Irradiation time
1	70	60	1:30	90
2	60	65	1:20	120
3	50	70	1:25	150

表3 不同体积黄酮提取液对超氧自由基的抑制率

Table 3 The inhibition rate of superoxide free radical with different volume flavonoid extract

组别 Groups	时间 Time min								氧化速率 A/min Oxidation rate	O_2^- 抑制率 % O_2^- inhibition rate
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5		
(CK)	0.246	0.275	0.308	0.337	0.369	0.399	0.422	0.463	0.0609	-
	0.260	0.290	0.318	0.347	0.375	0.403	0.432	0.463	0.0575	5.58
	0.380	0.408	0.433	0.455	0.488	0.507	0.530	0.559	0.0504	17.24
	0.517	0.536	0.558	0.572	0.590	0.618	0.637	0.655	0.0397	34.81
	0.694	0.705	0.722	0.738	0.753	0.769	0.783	0.798	0.0303	50.24
	0.754	0.763	0.770	0.783	0.794	0.803	0.816	0.825	0.0208	65.85

表4 不同提取液对羟基清除率的比较

Table 4 The comparisons of hydroxyl clearance rate with different extraction

	损伤 Damifi- cation	未损 Indemi- fication	银杏黄酮 Ginkgo flavone	Vc	BHT
吸光值 A Absorption value	0.033	0.331	0.111	0.106	0.104
清除率 % Clearance rate	-	-	26.17	24.50	23.83

2.2.2 清除羟基自由基试验。羟自由基是对机体危害最大的自由基,是氧化性极强的氧化剂,不仅是膜脂过氧化的罪魁祸首,而且还一直被认为是引起DNA 损伤的重要因素。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果 由表2 可知,乙醇微波法提取银杏叶黄酮的最佳工艺是 $A_3B_3C_3D_2$,各因素对试验的影响顺序为: $A > C > D > B$,即乙醇浓度 > 料液比 > 辐射时间 > 回流温度。

取5 g 银杏黄酮,在最适条件下提取,采用 AB-8 树脂柱吸附法纯化,并将得到的乙醇黄酮溶液进行冷冻干燥。进行3 次试验得到总黄酮固体平均值为0.551 g,即在最适条件下总黄酮提取率为11.02%。

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号 Test number	A	B	C	D	吸光度 A Absorbance	提取率 % Extraction rate
1	1	1	1	1	0.361	3.050
2	1	2	2	2	0.350	2.950
3	1	3	3	3	0.358	3.025
4	2	3	2	3	0.312	2.613
5	2	2	3	1	0.343	2.888
6	2	1	1	2	0.326	2.738
7	3	3	3	2	0.462	3.963
8	3	2	1	3	0.338	2.850
9	3	1	2	1	0.365	3.088
R	0.554	0.304	0.413	0.388	-	-

2.2 抗氧化性的试验结果

2.2.1 邻苯三酚自氧化抑制作用的测定(对邻苯三酚自氧化产生的 O_2^- 的清除作用)。超氧阴离子自由基是机体内寿命最长的自由基,通常作为自由基链式反应的引发剂,产生活性更强的自由基。超氧阴离子自由基可从其生成位置扩散到较远距离,达到靶位置,具有较大的危害性。由表3 可知,银杏黄酮对 O_2^- 有着明显的抑制作用,并且随着银杏黄酮含量的增加,对 O_2^- 的抑制作用明显增强,且在一定范围内银杏黄酮含量与清除率成正相关。

Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 的量和 Fenton 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 量成正比。当给予电子受体后,用试剂显色形成红色物质,其呈色与 $\cdot\text{OH}$ 量成正比。银杏叶黄酮具有较强的清除羟自由基活性,由表4 可知,同体积的银杏黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率高于 Vc 和 BHT。

3 结论

银杏叶提取液中含有黄酮类化合物,以乙醇微波法提取,分光光度法可以测量黄酮的含量。银杏黄酮微波提取的最佳条件为乙醇浓度50%,料液比1:25,回流温度70 ℃,微波时间120 s,该条件下总黄酮提取率为11.02%。抗氧化性试验表明,银杏叶总黄酮具有较好的还原性以及清除羟自由

城文化遗产的构成、内涵及价值,充分肯定其历史地位和重要作用。可以乐观地认为,对古城的保护与开发可使古城建筑及其环境除了拥有其历史价值以外,还可发挥更大的社会效益和经济效益,并且使建筑物焕发出新的生命力。

3.2 府谷古城保护与发展思路 府谷古城是研究我国西北边疆地区,尤其是黄土高原区域,中原社会与游牧民族冲突地带的军事防御体系的典型代表。府谷古城内现存的以鼓楼为代表的古建筑群,按照传统的我国古代城市建设布局,与府谷地区特殊的区域地理背景相映衬,与府谷古城的地形地貌相结合,有突破,又有变化,浑然构为一体,集中体现着长城沿线边疆城市中不同地域城市营建、建筑文化与政治军事之间有机的交叉、融合的特征。保护府谷古城是建设现代化城市的重要资源,历史文化优势是府谷古城最大的优势,是城市发展最有利的资源。

首先,要保护好古城不再遭受破坏。在古城区进行房屋、景观的再开发过程中,应特别注意街坊功能的调整。这些街坊绝大部分仅具有单一居住功能,且相当多的房屋已陈旧落后。根据建设一流旅游城的总目标,逐步对这些街坊进行不同程度的改造,在优先改善人民居住条件的前提下其开发应兼具游憩观赏价值的多种功能。居民住宅的建设和改造,应贯彻“外形保护传统特色,内部设施现代化”的原则,逐步提高人均居住面积和设施成套率,在破旧民居的拆除改建过程中,应注意调整出部分空间开办商店和服务站点。对于有价值的古建筑,应根据政府有关法令和实际条件,分别予以修复、改造和利用,有的可建为博物馆、文化馆和棋社,有的可开办古庭院式的旅馆、餐馆、茶馆等。在街坊改造中应注意保护原有景观和开发新的景观。在所有街坊,尤其是主要街道和河流沿岸,应切实加强对各类建筑物的高度、体量、形态、立面装饰和色彩的控制,务必使每一幢建筑物都与周围环境、街景、河景相和谐。近些年建成的与传统风貌极不协调的建筑物,要根据条件逐步加以妥善处理。今后在古城区内修建各类建筑物,要遵循体量宜小不宜大、色彩宜淡不宜浓、形态要新而不怪、装饰要美而不俗的原则。对古城墙也应进行修葺、保护和绿化,使之形成可供游览的矩形绿带。

其次,要充分认识旅游业的发展是保护古城的重要支撑。良好的经济基础是保护府谷古城的重要因素。作为

(上接第5497页)

基、超氧阴离子的能力,在一定黄酮浓度范围内呈线性关系,且效果优于Vc和人工合成抗氧化剂BHT。

银杏叶黄酮含量高,具有良好的抗氧化作用,是一种很好的功能性食品添加剂,可作为抗衰老、抗癌等功能保健食品的有效成分之一。银杏叶资源丰富,但目前尚未得到有效利用。该研究结果对于促进银杏叶黄酮资源的进一步开发与利用具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 朱平华. 银杏叶中黄酮类化合物的提取工艺研究[J]. 化工生产与技术, 2006, 13(6): 25-27.

一个发展中国家的偏远落后地区,府谷县经济文化等尚不发达,很难从财政中拿出巨额资金投入到了古城的保护中。因此实际中,应立足于现实,走“以城养城”的路子^[3],以旅游业的发展推动地方经济的发展,从而使府谷古城的保护资金有一定的保障。同时,还通过旅游业还能够提高府谷古城的知名度和社会地位,从而使其的保护工作引起各级各界的普遍关注。由此可见,充分利用遗产地的优势,科学合理地发展旅游业,本身就是对遗产保护的重要支撑。

4 小结

新的城市必须赋予旧城以新的职能,保持旧城作为城市应有的活力与繁荣。旧城的功能应该是新城市的有机组成部分,而不是牵强的。旧城保护原有的历史格局风貌,就需要增加一些静态的功能,与历史文化相协调。我国古代小城市亲切、质朴、繁荣、安逸的特点,应该是旧城保护的精神追求。吴良镛先生将美好城市的要素概括为4点,即私密感、邻里感、乡土感和繁荣感^[4]。而保持古城的繁荣,就要使古城具有新的历史条件下的吸引力,使得人们愿意居住生活在旧城。1997年陕西省古建设计研究所制定的《府州古城保护规划》给府谷古城基本定位为:以居住、文物旅游为主的历史风貌区。

文化遗产是人类文明的瑰宝。如果名城的历史文化遗存遭到严重破坏,失去真实性,名城的价值也将不复存在,那就更谈不上保护与发展。因此做好历史文化名城的保护工作,必须切实保护好历史文化的真实遗存。只有这样,才能继承和弘扬历史文化遗产,为现代经济社会发展服务。我们主张保护与发展并举,是强调“寓保护于发展,以发展求保护”,其中保护是核心、是基础,因此,对古城的保护,首先要以保护历史文化的真实遗存为前提,把抢救和维修濒危遗产放在第一位,其次,将其定位于以古城及文物遗存为对象的观光旅游,这是基于府谷古城的历史地位、现状、以及保护修复的基础上做出综合的、谨慎的判断与定位安排。

参考文献

- [1] 任志远. 21世纪城市规划管理[M]. 南京: 东南大学出版社, 2000.
 [2] 刘临安. 建筑百家言[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2001.
 [3] 彭一刚. 传统村镇聚落景观分析[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1994.
 [4] 吴良镛. 吴良镛城市论文集[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1996.
 [2] 苗建英. 银杏叶中黄酮类化合物提取工艺研究[J]. 中成药, 2006, 28(7): 1060-1061.
 [3] 蒋剑波. 银杏根中黄酮类化合物的分离分析[J]. 分析科学学报, 2003, 19(4): 399-400.
 [4] 郭雪峰, 岳永德. 竹叶黄酮的提取纯化工艺及含量测定方法比较研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(2): 279-282.
 [5] 龙春, 高志强, 宋仲容, 等. 银杏叶中有效成分的微波提取及抗氧化活性研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2006, 28(S1): 248-251.
 [6] 盛幼珍, 王丽梅, 余龙江, 等. 几种天然植物黄酮的抗氧化对比研究[J]. 食品科技, 2008(7): 176-178.
 [7] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe²⁺氧化法检测H₂O₂/Fe²⁺产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
 [8] 刘杰超, 焦中高, 周红平, 等. 甜樱桃红色素的体外抗氧化活性[J]. 果树学报, 2006, 23(5): 756-759.