

微波-碱水浸提银杏叶黄酮的研究

吕帮玉, 杨新河, 毛清黎 (孝感学院生命科学技术学院, 湖北孝感 432000)

摘要 [目的] 为银杏叶黄酮的提取提供科学依据。[方法] 利用微波效应, 用氢氧化钙溶液提取银杏叶黄酮, 并确定其最佳工艺条件。[结果] 在0.5~2.0 min内, 黄酮提取率随微波时间的增加而增加。银杏叶含水量在10~20 ml内, 黄酮提取率随含水量的增加而增加。黄酮提取率随液料比的增加而增加, 液料比在16:1~25:1时, 提取率基本恒定。在90~95℃内, 黄酮提取率随温度的升高而显著增加。在30~50 min内, 黄酮提取率随浸提时间的延长而增加。各因素对黄酮提取率的影响依次为: 提取温度>微波时间>含水量>pH值>提取时间>液料比。[结论] 微波-碱水浸提银杏叶黄酮的最佳工艺条件为: 银杏叶5 g、微波功率100%、微波时间2.5 min、含水量25 ml、液料比12:1、浸提温度95℃、浸提2次、每次60 min、pH值为9, 黄酮的提取率达93.6%。

关键词 微波; 氢氧化钙; 银杏叶; 黄酮; 浸提

中图分类号 Q949.64 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)09-04124-04

Research on Extracting Flavone from Ginkgo biloba Leaves by Microwave Alkali Water Extraction

LV Bang-yu et al (College of Life Science and Technology, Xiaogan University, Xiaogan, Hubei 432000)

Abstract [Objective] The purpose of the research was to provide scientific basis for the extraction of flavone from Ginkgo biloba leaves. [Method] Under the help of microwave effect, the flavone was extracted with calcium hydrate solution from G. biloba leaves and the optimum technological condition was confirmed. [Result] In the microwave time from 0.5 min to 2.0 min, the extraction rate of flavone increased as the microwave time increased. When the water content in G. biloba leaves was between 10 and 20 ml, the extraction rate of flavone increased as the water content increased. The extraction rate of flavone increased as the liquid-to-solid ratio increased and it was basically constant when the liquid-to-solid ratio was between 16:1 and 25:1. When the temperature was between 90 and 95℃, the extraction rate of flavone increased significantly as the temperature increased. In the extraction time from 30 min to 50 min, the extraction rate of flavone increased as the extraction time extended. The influences of all the factors on the extraction rate of flavone were as follows: extraction temperature > microwave time > water content > pH value > extraction time > liquor-to-solid ratio. [Conclusion] The optimum technological condition of extracting flavone from G. biloba leaves by microwave-alkali water extraction was as follows: 5 g G. biloba leaves, microwave power of 100%, microwave time of 2.5 min, water content of 25 ml, liquor-to-solid ratio of 12:1, extraction temperature at 95℃, extraction for 2 times and 60 min for each time, pH value of 9. Under this condition, the extraction rate of flavone reached 93.6%.

Key words Microwave; Calcium hydrate; Ginkgo biloba leaves; Flavone; Extraction

银杏树(Ginkgo biloba Linn.) 又称为白果树, 属银杏科银杏属植物, 为现存古代子遗植物之一, 是我国的特有植物。我国的银杏树资源占世界资源总量的70%^[1]。银杏叶提取物(EGB) 具有独特的药理活性和巨大的临床应用价值, 应用的领域从医药扩大到食品、保健品、化妆品、工艺品、植物保护等^[2]。大量研究表明, 银杏叶提取物(EGB) 中主要生理活性成分之一是黄酮类化合物。近年来, 对银杏叶黄酮的提取研究十分活跃, 常见的有有机溶剂提取法, 超临界流体萃取法(SFE法)^[3], 从产品的安全性、提取的高效性及操作的可行性等方面考虑, 这两种提取法均不够理想。微波辅助提取是天然产物提取中一种非常有发展潜力的新型技术^[4], 具有萃取效率高、重现性好、节省时间、节省试剂、污染小等特点。笔者首次以氢氧化钙溶液作为溶剂, 用微波进行预处理, 以黄酮的提取率为指标, 采用单因素和正交试验设计研究了银杏叶中黄酮提取的最佳工艺条件, 为银杏中总黄酮的提取方法提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 植物材料: 银杏叶(湖北安陆)。试剂: 芦丁(购于中国生物药品制品检定所); 无水乙醇、95%乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、氢氧化钙均为A.R级。仪器: 光电分析天平TG328B型(上海第二天平仪器厂); 格兰仕WD900DSL23-2微波炉; SP210UVPC紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); 101A3型干燥箱; JJ2组线捣碎匀浆机; HH6数显恒温水浴锅。

1.2 提取步骤 银杏叶干燥粉碎加入一定体积的氢氧化钙溶液微波处理按一定料液比加入氢氧化钙溶液恒温水浴过滤定容。

1.3 标准曲线的绘制 精确称取干燥至恒重的芦丁(标准对照品)40 ng置于100 ml容量瓶中, 加入70%乙醇溶液定容至100 ml, 即得芦丁标准溶液。分别取5、10、15、20、25 ml芦丁标准溶液用蒸馏水稀释至50 ml, 准确吸取5 ml于10 ml试管中, 各加入10%亚硝酸钠溶液0.3 ml, 摇匀, 放置6 min; 加10%硝酸铝溶液0.3 ml, 摇匀, 放置6 min; 加4%氢氧化钠溶液4 ml, 再用蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 放置15 min。用蒸馏水作空白, 在510 nm处测定吸光度。按照同样方法重复测定3次, 以吸光度为纵坐标, 标准品浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.4 银杏叶总黄酮含量的测定 精确称取银杏粗粉5.000 g, 加入50 ml 70%乙醇水溶液在80℃水浴中回流浸提2 h, 过滤, 滤渣按同样的方法重复提取多次, 至检识滤液中不含黄酮为止。合并各次滤液并用蒸馏水定容至500 ml, 准确吸取5 ml于10 ml试管中, 按“1.3”操作, 测定吸光度, 代入标准曲线方程中求出滤液中黄酮的浓度, 然后计算出银杏叶中总黄酮的含量。

1.5 黄酮提取率的测定 按“1.2”中的操作方法得到溶液后, 用蒸馏水定容至500 ml, 准确吸取5 ml于10 ml试管中, 按“1.3”操作, 测定吸光度, 代入标准曲线方程中求出滤液中黄酮的浓度, 然后计算出银杏叶黄酮的提取率。

2 结果与分析

2.1 绘制标准曲线 以对照品芦丁浓度X(μg/ml)为横坐标, 以吸光度Y为纵坐标进行线性回归, 方程 $y = 0.0092x + 0.0038$, 相关系数 $R^2 = 0.9999$, 芦丁浓度在0~100 μg/ml范

基金项目 孝感学院科研项目(Z2008019)。

作者简介 吕帮玉(1974-), 女, 湖北荆州人, 实验师, 从事天然产物化学方面的研究。

收稿日期 2009-01-15

围内与吸光度线性关系良好。标准曲线如图1所示。

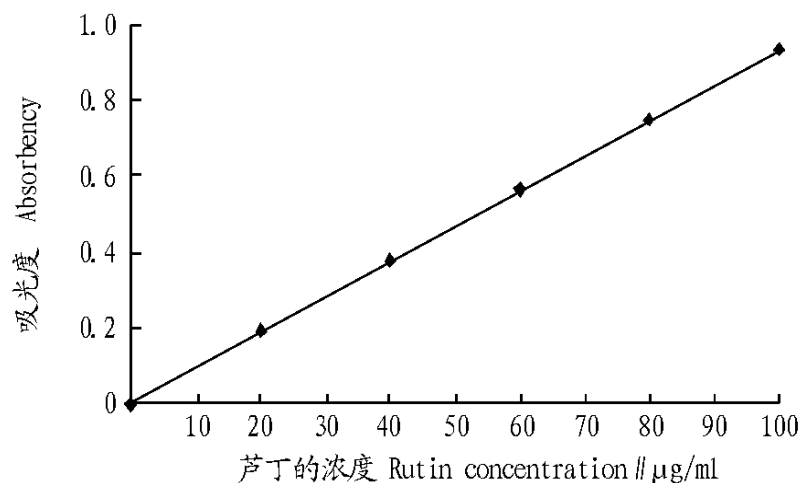


图1 标准曲线

Fig.1 The standard curve

2.2 微波功率对黄酮提取率的影响 分别精确称取银杏粗粉5.000 g 置于5个烧杯中,加入pH值为9的氢氧化钙溶液15 ml,分别在微波功率20%、40%、60%、80%、100%下处理1.5 min,再将银杏叶转入锥形瓶中,各加入pH值为9的氢氧化钙溶液60 ml,置于恒温水浴锅中70℃浸提40 min,过滤,分别得滤液,将滤液按照“1.5”的方法测定,结果见图2。

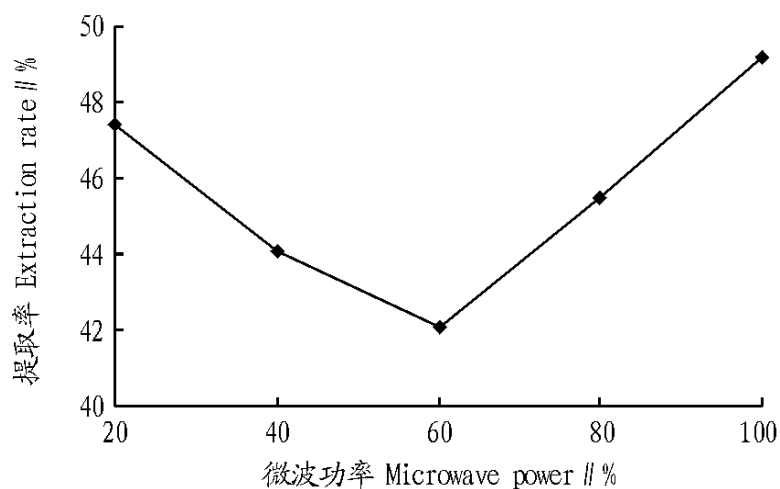


图2 微波功率对提取率的影响

Fig.2 The effects of microwave power on the extraction rate

由图2可见,银杏叶黄酮的提取率随微波功率的增大而呈现出高-低-高的变化趋势,其中微波功率100%时提取效果最好,因此,宜选择微波功率为100%。

2.3 微波时间对黄酮提取率的影响 分别精确称取银杏粗粉5.000 g 置于5个烧杯中,加入pH值为9的氢氧化钙溶液15 ml,在微波功率100%下分别处理0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 min,再将银杏叶转入锥形瓶中,各加入pH值为9的氢氧化钙溶液60 ml,置于恒温水浴锅中70℃浸提40 min,过滤,分别得滤液,将滤液按照“1.5”的方法测定,结果见图3。

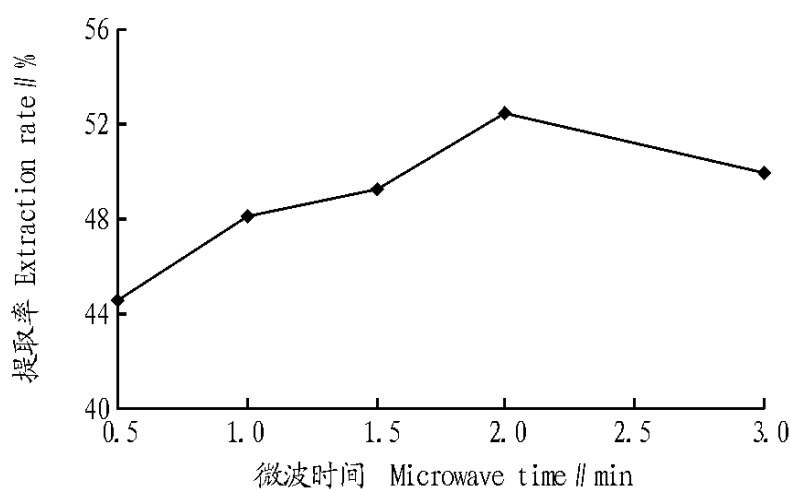
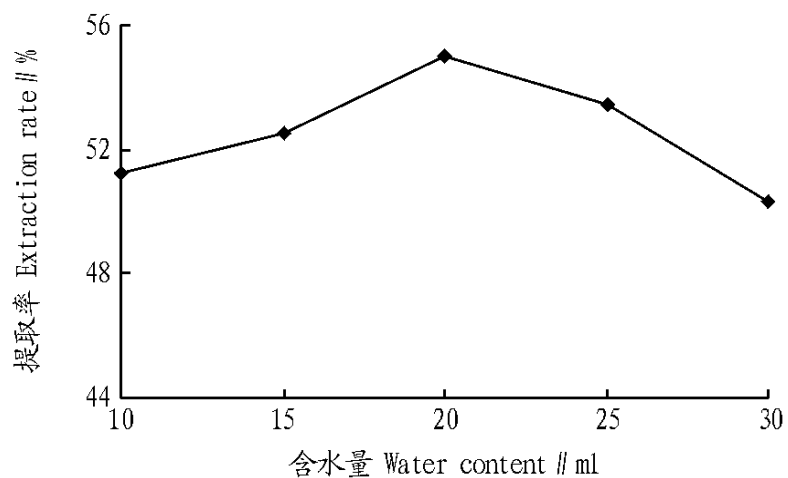


图3 微波时间对提取率的影响

Fig.3 The effects of microwave time on the extraction rate

由图3可见,银杏叶黄酮的提取率在0.5~2.0 min内随微波时间的增加而升高,但时间为3.0 min时反而下降了。因此,微波处理时间以2.0 min左右为宜。

2.4 含水量对黄酮提取率的影响 分别精确称取银杏粗粉5.000 g 置于5个烧杯中,分别加入pH值为9的氢氧化钙溶液10、15、20、25、30 ml,在微波功率100%下处理2.0 min,再将银杏叶转入锥形瓶中,各加入pH值为9的氢氧化钙溶液60 ml,置于恒温水浴锅中70℃浸提40 min,过滤,分别得滤液,将滤液按照“1.5”的方法测定,结果见图4。



注:含水量指银杏叶质量为5 g时加入水的体积。

Note: Water content is the volume of added water in 5 g Ginkgo biloba leaves.

图4 含水量对提取率的影响

Fig.4 The effects of water content on the extraction rate

由图4可见,随银杏叶含水量在10~20 ml范围内的增加,黄酮提取率上升,在含水量大于20 ml时提取率反而下降。这是因为在一定溶剂用量内,溶剂的增加促使溶剂较好地渗透到细胞内部并传递吸收的微波能,使细胞膜破碎程度增大,为黄酮类化合物地溶出创造了有利条件,但溶剂用量继续增大会使微波加热的负荷增大,单位体积的溶剂在固定的时间内吸收的微波能减少,从而降低了有效成分的溶出。因此,银杏叶含水量以20 ml左右为宜。

2.5 液料比对黄酮提取率的影响 分别精确称取银杏粗粉5.000 g 置于5个烧杯中,加入pH值为9的氢氧化钙溶液20 ml,在微波功率100%下处理2.0 min,再将银杏叶转入锥形瓶中,分别加入pH值为9的氢氧化钙溶液40、60、80、100、125 ml,置于恒温水浴锅中70℃浸提40 min,过滤,分别得滤液,将滤液按照“1.5”的方法测定,结果见图5。

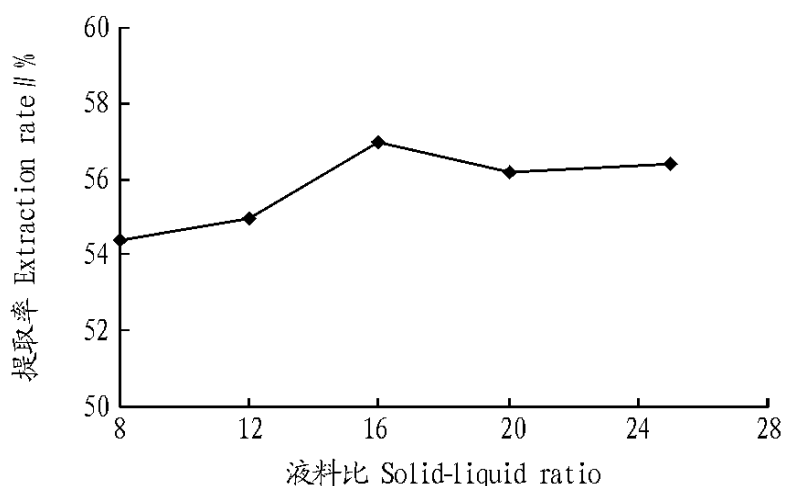


图5 液料比对提取率的影响

Fig.5 The effects of solid liquid ratio on the extraction rate

由图5可知,银杏叶中黄酮的提取率随液料比增加而增加,但液料比在16:1~25:1时,提取率基本恒定。从提取效

果和后续工序(如浓缩)的成本考虑,液料比以16:1左右为宜。

2.6 温度对黄酮提取率的影响 分别精确称取银杏粗粉5.000 g置于5个烧杯中,加入20 mL pH值为9的氢氧化钙溶液,在微波功率100%下处理2.0 min,再将银杏叶转入锥形瓶中,各加入pH值为9的氢氧化钙溶液80 mL,置于恒温水浴锅中浸提40 min,温度分别为60、70、80、90、95。过滤,分别得滤液,将滤液按照“1.5”的方法测定,结果见图6。

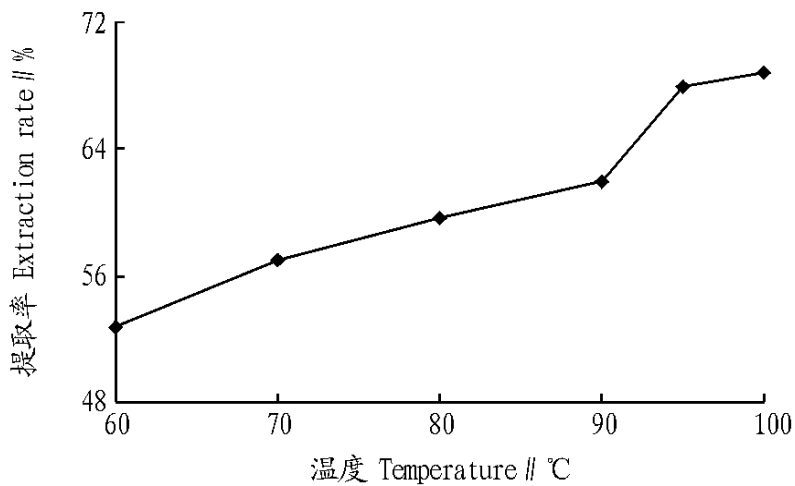


图6 温度对提取率的影响

Fig. 6 The effects of temperature on the extraction rate

由图6可知,在选择的温度范围内,温度的升高使浸提效果呈上升趋势,特别是温度从90到95时,提取效果显著增加,原因可能是因为温度的升高,加快了分子扩散能力,使提取率增加,但100的提取效果与95相当。从提取效果与降低能耗考虑,温度以不超过95为宜。

2.7 提取时间对黄酮提取率的影响 分别精确称取银杏粗粉5.000 g置于5个烧杯中,分别加入20 mL pH值为9的氢氧化钙溶液,在微波功率100%下处理2.0 min,再将银杏叶转入锥形瓶中,各加入80 mL pH值为9的氢氧化钙溶液,置于恒温水浴锅中95分别浸提30、40、50、60、70、80 min,过滤,分别得滤液,将滤液按照“1.5”的方法测定,结果见图7。

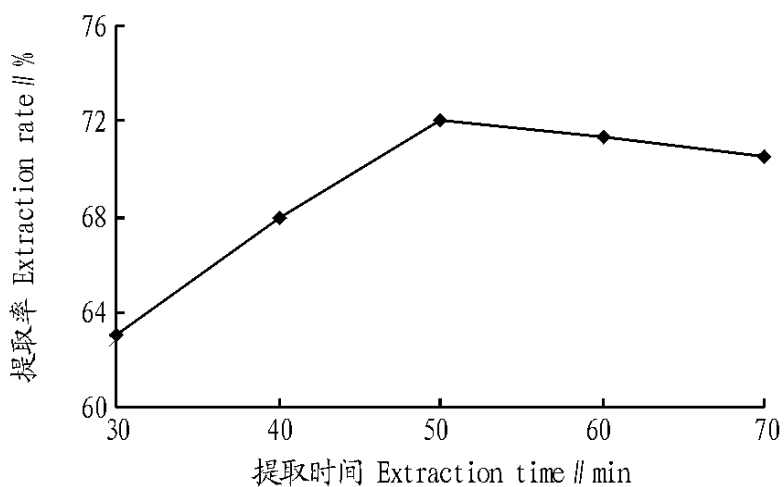


图7 提取时间对提取率的影响

Fig. 7 The effects of extraction time on the extraction rate

从图7可以看出,黄酮的提取率随着浸提时间在30~50 min范围内的延长而提高,但在50 min后提取率基本不变。故提取时间以50 min左右为宜。

2.8 pH值对黄酮提取率的影响 分别精确称取银杏粗粉5.000 g置于5个烧杯中,分别加入20 mL pH值为8、9、10、11、12的氢氧化钙溶液,在微波功率100%下处理2.0 min,再将银杏叶转入锥形瓶中,各加入相应pH值的氢氧化钙溶液80 mL,置于恒温水浴锅中95浸提50 min,过滤,分别得滤液,将滤液按照“1.5”的方法测定,结果见图8。

从图8可以看出,pH值为9时,黄酮的提取率最高。当溶液pH值较低时,黄酮以分子的形式存在的比例随pH值的降低而变大;当pH值较高时,随pH值的加大,母核受到破坏的黄酮所占的比例加大且部分黄酮与钙离子生成络合物或生成钙盐而不溶于水。上述两种情况都直接导致黄酮的提取率降低,因此,溶液pH值宜控制在9左右,可得到较高的提取率。

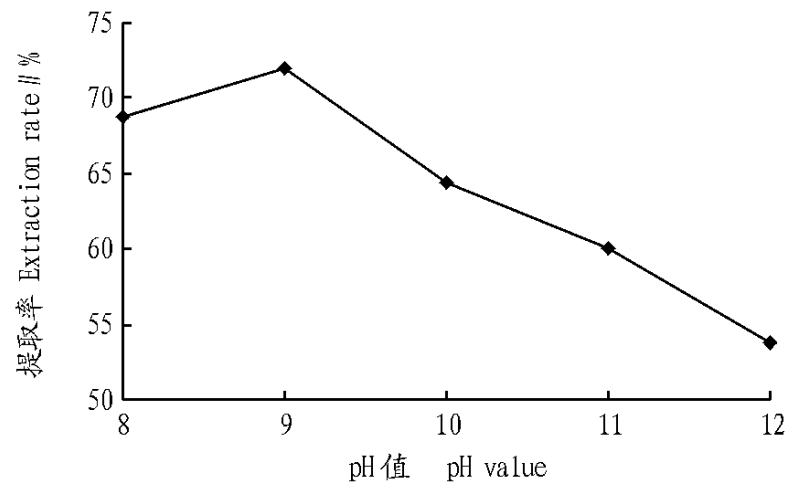


图8 pH值对提取率的影响

Fig. 8 The effects of pH value on the extraction rate

2.9 提取次数对黄酮提取率的影响 分别精确称取银杏粗粉5.000 g置于5个烧杯中,各加入20 mL pH值为9的氢氧化钙溶液,在微波功率100%下处理2.0 min,再将银杏叶转入锥形瓶中,各加入80 mL pH值为9的氢氧化钙溶液,置于恒温水浴锅中95浸提50 min。分别提取1、2、3、4次,过滤,滤液分别合并,将滤液按照“1.5”的方法测定,结果见图9。

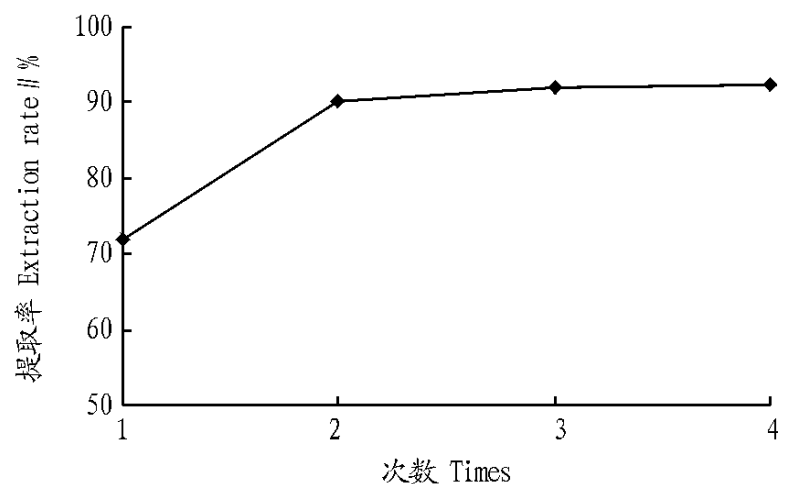


图9 提取次数对提取率的影响

Fig. 9 The effects of extraction times on the extraction rate

从图9可以看出,提取次数为2次与3次相比较,黄酮提取率差别仅相差1.8个百分点,当提取次数超过3次,随提取次数的增加,黄酮提取率的增加可忽略不计。从产率、能耗和纯度方面综合考虑,提取2次为宜。

2.10 正交试验 从以上单因素试验看出,提取率受到微波时间(A)、含水量(B)、液料比(C)、提取温度(D)、提取时间(E)及pH值(F)这6个因素的影响较大,为了全面考察这6个因素的综合影响,在微波功率100%档和浸提2次的前提下进行6因素3水平的正交试验。正交试验结果分析见表1。

由表1可见,各因素对黄酮提取率影响的大小为:提取温度(D) > 微波时间(A) > 含水量(B) > pH值(F) > 提取时间(E) > 液料比(C);最佳条件是A₃B₃C₁D₃E₃F₂,即:在微波功率100%档和浸提2次时,微波时间2.5 min,含水量为25 mL,液料比12:1,浸提温度95,浸提时间60 min,Ca(OH)₂溶液pH值为9浸提效果最好。

表1 正交试验结果

Table 1 The results of the orthogonal experiment

试验号 Test No.	A min	B ml	C	D	E min	F	提取率 Extraction rate %
1	1(1.5)	1(15)	1(12 1)	1(85)	1(40)	1(8)	62.5
2	1(1.5)	2(20)	2(16 1)	2(90)	2(50)	2(9)	75.5
3	1(1.5)	3(25)	3(20 1)	3(95)	3(60)	3(10)	86.1
4	2(2.0)	1(15)	1(12 1)	2(90)	2(50)	3(10)	68.8
5	2(2.0)	2(20)	2(16 1)	3(95)	3(60)	1(8)	80.2
6	2(2.0)	3(25)	3(20 1)	1(85)	1(40)	2(9)	63.1
7	3(2.5)	1(15)	2(16 1)	1(85)	3(60)	2(9)	65.6
8	3(2.5)	2(20)	3(20 1)	2(90)	1(40)	3(10)	73.6
9	3(2.5)	3(25)	1(12 1)	3(95)	2(50)	1(8)	87.8
10	1(1.5)	1(15)	3(20 1)	3(95)	2(50)	2(9)	80.1
11	1(1.5)	2(20)	1(12 1)	1(85)	3(60)	3(10)	63.7
12	1(1.5)	3(25)	2(16 1)	2(90)	1(40)	1(8)	72.0
13	2(2.0)	1(15)	2(16 1)	3(95)	1(40)	3(10)	73.6
14	2(2.0)	2(20)	3(20 1)	1(85)	2(50)	1(8)	64.7
15	2(2.0)	3(25)	1(12 1)	2(90)	3(60)	2(9)	74.7
16	3(2.5)	1(15)	3(20 1)	2(90)	3(60)	1(8)	76.9
17	3(2.5)	2(20)	1(12 1)	3(95)	1(40)	2(9)	88.1
18	3(2.5)	3(25)	2(16 1)	1(85)	2(50)	3(10)	65.5
K ₁	439.9	427.5	445.6	385.1	432.9	444.1	
K ₂	425.1	445.8	432.4	441.5	442.4	447.1	
K ₃	457.5	449.2	444.5	495.9	447.2	431.3	
R	32.4	21.7	13.2	110.8	14.3	15.8	

注:银杏叶为5.000 g。

Note: The weight of Ginkgo biloba leaves is 5.000 g.

2.11 最优条件组合试验。根据以上分析结果得出的最佳条件进行平行3次提取,结果3次黄酮提取率分别为93.2%、93.6%、93.9%,平均提取率为93.6%。由此可知,采用优化的工艺提取黄酮的提取率高于表1中的各工艺组合,因此优化的工艺是可靠的。

3 结论

通过系统地研究微波功率、微波处理时间、银杏叶含水量、溶剂用量、浸提时间、浸提温度、pH值,提取次数等因素对银杏叶黄酮提取率的影响,结果表明,各因素对黄酮提取率影响的大小为:提取温度(D) > 微波时间(A) > 含水量(B) > pH值(F) > 提取时间(E) > 液料比(C);最佳条件是A₃B₃C₁D₃E₃F₂,即在微波功率100%档和浸提2次时,微波时间2.5 min,含水量为25 ml,液料比12:1,浸提温度95℃,浸提时

间60 min/次,Ca(OH)₂溶液pH值9。

用微波-碱水法提取银杏叶黄酮具有操作简便、节省时间、提取率高和用水代替有机溶剂降低了生产成本等优点;同时,钙离子能使含有多羟基的鞣质,或含有羟基的果胶、黏液质等水溶性杂质生成钙盐沉淀,有利于提高提取物中黄酮的纯度等。故该工艺有一定的推广价值。

参考文献

- [1] 程绍玲,杨迎花.银杏叶活性成分提取研究进展[J].化工通讯,2005,39(1):34-38.
- [2] 曾新萍,黄志明,黄维南,等.银杏综合开发利用[J].亚热带植物通讯,2000,29(3):58-63.
- [3] 李国丽,李春霞,王威强.银杏叶黄酮类化合物提取分离研究现状和展望[J].山东轻工业学院学报,2005,19(3):18-23.
- [4] 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.

kg/kg 氮素,每生产100 kg 稻谷只需施1.76 kg 纯氮,比普遍认为的需施纯氮2.0~2.5 kg 低得多。其以当前每千克稻谷1.8元计,比对照增加产值7 762.5元/hm²,每千克纯氮增收45.00元,除去成本价4.35元,则增收40.65元,增收7 012元/hm²,增效相当可观。

参考文献

- [1] 罗志祥,施伏芝,阮新民,等.杂交中粳新组合协优9019[J].杂交水稻,2006,21(3):88-89.
- [2] 罗志祥,施伏芝,阮新民,等.杂交中粳水稻组合协优9019的高产及稳产性研究[J].中国稻米,2008,85(5):31-32.
- [3] 吴文革,阮新民,施伏芝.不同施氮水平对中粳稻氮素吸收利用及其产量的影响[J].安徽农业科学,2007,35(5):1403-1405.

(上接第4090页)

3 结论与讨论

(1) 协优9019的适宜施氮量在172.5~243.45 kg/hm²,其中茎蘖肥分别施69.0 kg/hm²纯氮,茎蘖增长平稳,成穗率高,增产效果最显著。施促花肥有促进有效穗增多、提高成穗率的作用,但无明显增产作用。保花肥有增加穗粒数和提高结实率的作用,但用量不宜过大,以施34.5 kg/hm²纯氮为宜。齐穗期施34.5 kg/hm²纯氮增产显著,有提高结实率和增加千粒重的作用。

(2) 协优9019的氮肥利用率高,增收效益好。在施172.5 kg/hm²纯氮的合理运筹下,其氮素农学利用率为25