

## 银杏叶黄酮提取方法比较\*

梁红 潘伟明 张伟锋

(仲恺农业技术学院, 广州 510225)

**摘要** 比较不同溶剂提取银杏(*Ginkgo biloba* L.)叶黄酮类化合物的提取效率,从成本效益角度考虑,以70%乙醇作为提取溶剂更为有利。在分级沉淀中,黄酮含量与蛋白质含量呈正相关,在乙醇提取液中黄酮和蛋白质含量最高;蛋白质的存在有助于提高黄酮的溶解度。乙醇提取液用饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓缩两次,可使醇相中的黄酮沉淀析出。根据试验结果,提出了银杏叶黄酮的优化提取方法。

**关键词** 银杏;叶;黄酮;提取方法

**The extract technique of flavonoid of *Ginkgo biloba* L. leaves** Liang Hong, Pang Weiming, Zhang Weifeng (Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225), *J. Plant Resour. & Environ.* 1999, 8(3): 12~17

The contents of flavonoid of *Ginkgo biloba* L. leaves from different extract solution with different solvents were compared, and 70% ethanol was suggested for the better solvent according to the consideration of lower cost and better beneficial result. When 3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 75% ethanol was used in turn to extract the same sample, the flavonoid was largely found in the ethanol extract solution, and the flavonoid content was positive relevant to the protein content among different extract solutions. Existence of protein may help the flavonoid to dissolve in the solution. The ethanol extract solution was concentrated twice with the similar volume of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturated solution, and the flavonoid sediment was separated out in  $0\sim 4^\circ\text{C}$ . According to the experimental result, the authors put forward a suggestion about better extracting technical process of the flavonoid from *Ginkgo biloba* leaves.

**Key words** *Ginkgo biloba* L.; leaves; flavonoid; extract technique

银杏(*Ginkgo biloba* L.)原产中国,本世纪60年代以来,有关银杏叶片有效成分及疗效的研究日益受到重视,已开发出药品、保健品、化妆品等多达100余种,形成国际市场上销售额20多亿美元的新兴产业<sup>[1]</sup>。黄酮类化合物是银杏叶的主要有效成分之一,含量占干叶的0.8%~3.5%,随品种、地理分布和季节变化而异<sup>[1~3]</sup>。银杏黄酮有强烈的清除细胞内自由基的作用,能降低细胞的氧化代谢,对脑和四肢动脉血流失调引起的一系列心脑血管疾病有明显和独特的疗效<sup>[4~8]</sup>。银杏黄酮的提取有水提取法、有机溶剂提取法、树脂吸附法和 $\text{CO}_2$ 超临界提取法等,不同提取方法得到的产率有一定差异,但缺乏系统的比较研究。从成本和效益方面考虑,在保证较高提取率的前提下,选用廉价溶剂和简单的提取工艺,对工业化生产,具有重

\* 广东省科学技术委员会星火攻关项目资助(粤科农字[1998]53号文,项目编号9872003)

梁红:男,1958年12月生,副教授,主要从事生物技术和生物活性物质的研究。

收稿日期:1999-05-10

要的实际意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试银杏叶取自广东省南雄市和广州市。1998年4月20日,从南雄市帽子峰林场3年生实生苗上采叶,晾干后于60~80℃烘干至恒重,粉碎后用60目铜网过筛,用塑料薄膜包装,置干燥器中备用。1998年6月22日从广州仲恺农业技术学院农场3年生嫁接苗上采叶,分成两份,一份保存于-20℃低温冰箱中备作鲜叶提取之用(含水量74.50%);另一份按同样方法烘干、粉碎、过筛、包装,置干燥器中备用。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 黄酮类化合物的提取

1.2.1.1 有机溶剂、稀盐溶液一步提取法 在40 mL的甲醇、95%乙醇、70%乙醇、60%丙酮和3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液中分别加入干叶粉末2 g,搅拌30 min,经3 500 r/min离心20 min后收集上清液,进行黄酮和蛋白质含量测定(3次重复)。

1.2.1.2 稀盐溶液和70%乙醇二步提取法 取干叶粉末2 g,加入40 mL 3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,搅拌30 min,经3 500 r/min离心20 min后收集上清液(a),沉淀再加40 mL 70%乙醇搅拌5 min,经3 500 r/min离心20 min,收集上清液(b)。或者先用70%乙醇萃取后,收集上清液(b),再将沉淀用3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液提取,收集上清液(a)。上清液(a)和上清液(b)分别进行黄酮和蛋白质含量测定。

1.2.1.3 分级沉淀法及提取液浓缩 鲜叶50 g(或干叶粉末10 g)加3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液200 mL,研磨匀浆(干叶则搅拌30 min),3 500 r/min离心20 min,得上清液(1),沉淀加6%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液100 mL搅拌5 min,3 500 r/min离心20 min,得上清液(2),沉淀再加75%乙醇100 mL,搅拌5 min,3 500 r/min离心20 min,得上清液(3),沉淀则弃去。对上清液(1)、上清液(2)和上清液(3)分别进行黄酮和蛋白质含量测定(3次重复)。

用饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液与上清液(3)等体积混和,搅拌5 min后静置,收集上层醇相再与等体积饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液混和,搅拌5 min后静置,收集醇相并测定其黄酮和蛋白质含量。

#### 1.2.2 黄酮和蛋白质含量测定

黄酮类化合物用分光光度法测定,取样品0.2 mL加70%乙醇4.8 mL,制成待测样品,以0.1 mg/mL芦丁(Rutin)为标准品(70%乙醇为溶剂),于370 nm处测定(测定值 $C \times 1.25$ )。蛋白质测定采用考马斯亮蓝G-250法<sup>[9]</sup>,蛋白质于595 nm处比色。上述测定均用722型分光光度计进行,为了进一步提高银杏黄酮含量测定的精确度,参照文献[10]用HPLC法测定银杏叶黄酮含量并与比色法进行比较,色谱条件:流动相为甲醇:水:磷酸(体积比55:44.5:0.5);流速1.0 mL/min;柱温25℃;进样体积20  $\mu\text{L}$ ;检测波长370 nm;色谱柱C18柱(250mm  $\times$  4mm)。

为进一步了解提取液中蛋白质含量与黄酮含量之间的关系,用减压蒸馏法浓缩50 mL上述75%乙醇提取物(上清液3)至10 mL,取蛋白质沉淀再用70%乙醇溶解,再减压蒸馏一次,定容至20 mL,测得其蛋白质含量为1.68%,再用水配成不同蛋白质浓度的溶液,分别在10

mL 蛋白质溶液中加入槲皮素 100 mg, 混匀后在冰箱中放置过夜, 取上清液用比色法测定各液中的槲皮素含量。并与水溶性蛋白质溶液(上述上清 1 溶液经减压蒸馏法浓缩后加入槲皮素而制备)进行比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同溶剂提取效果比较

用取自南雄市的银杏叶, 以甲醇、95%乙醇、70%乙醇、60%丙酮和 3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分别进行提取, 上清液中黄酮和蛋白质含量见表 1。可以看出, 以 60%丙酮提取液黄酮含量最高, 提取效果最好, 相当于每 g 干银杏叶含黄酮 18.11 mg; 其余依次为甲醇提取液 (17.96 mg)、70%乙醇提取液 (17.87 mg)、95%乙醇提取液 (16.79 mg); 最差的是 3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  提取液, 相当于每 g 干银杏叶含 6.03 mg。用 70%乙醇成本较低, 提取液中

表 1 银杏叶不同溶剂提取液中的黄酮和蛋白质含量<sup>1)</sup>  
Tab 1 Content of flavonoid and protein from different extract solutions of *Ginkgo biloba* leaves<sup>1)</sup>

溶剂 Solvent	黄酮 Flavonoid (mg/g)	蛋白质 Protein (mg/g)
甲醇 methanol	18.21(17.96)	61.15
95%乙醇 95% ethanol	16.39(16.79)	64.75
70%乙醇 70% ethanol	17.56(17.87)	45.90
60%丙酮 60% acetone	17.94(18.11)	68.25
3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.54( 6.03)	5.73

<sup>1)</sup>括号内为 HPLC 测定的数据 Data in brackets are from HPLC

黄酮含量较高, 且蛋白质含量少(即纯度较高), 是较好的提取溶剂, 值得推广。从表 1 中还可以看出, 用比色法和高效液相色谱法(HPLC)测定的银杏叶黄酮含量比较接近。

70%乙醇萃取后的沉淀再用 3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  进行第二次提取(二步法), 将两次上清液测定值合并计算, 则黄酮含量为 20.64 mg/g, 蛋白质含量为 61.11 mg/g。3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  提取后的沉淀再用 70%乙醇萃取, 将两次上清液测定值合并计算, 则黄酮含量为 19.09 mg/g, 蛋白质含量为 52.22 mg/g。可见, 二步法的提取效果优于单用上述任一种有机溶剂的提取效果。

### 2.2 分级沉淀法的提取效果

用取自广州的银杏鲜叶和干叶粉末, 以 3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、6%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和 75%乙醇依次提取, 各个上清液中的黄酮和蛋白质含量见表 2。可以看出, 经过上述三种溶剂依次提取银杏叶黄酮类物质含量分别达到 24.16 mg/g(干叶)和 5.03 mg/g(鲜叶), 且主要存在于上清液(3)组分中, 含量分别为总黄酮的 78.42%(干叶)和 50.89%(鲜叶)。比较而言, 银杏干叶含有较多的醇溶性蛋白质而鲜叶含有较多的水溶性蛋白质。但在银杏干叶的上清液(3)组分中, 黄酮与蛋白质的比值达到 0.44, 是各组分中纯度最高的。

表 2 银杏叶分级提取液中黄酮及蛋白质含量

Tab 2 Content of flavonoid and protein from grading extract solutions of *Ginkgo biloba* leaves

样品 Sample	上清液 Clear solution	黄酮 Flavonoid (mg/g)	蛋白质 Protein (mg/g)	样品 Sample	上清液 Clear solution	黄酮 Flavonoid (mg/g)	蛋白质 Protein (mg/g)
干叶 dry leaf	(1)	3.38	12.00	鲜叶 fresh leaf	(1)	1.85	4.28
	(2)	0.58	2.18		(2)	0.62	2.82
	(3)	20.20	45.57		(3)	2.56	7.00
	合计 Total	24.16	59.75		合计 Total	5.03	14.01

经烘干后测定,银杏鲜叶的干物质含量为 25.50%,折算成干叶,其黄酮和蛋白质含量分别为 19.73 mg/g 和 55.29 mg/g,均低于直接从干叶粉末中提取的得率。所以,就黄酮类物质提取而言,以银杏干叶粉末为原料将更加有利。

### 2.3 银杏叶乙醇提取液的浓缩

上清液(3)经二次浓缩后黄酮和蛋白质含量见表 3。第二次浓缩后的醇相置于冰箱(0~4℃)中过夜,可见黄酮和蛋白质沉淀物析出。

表 3 银杏叶 70%乙醇提取液用饱和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浓缩的效果

Tab 3 Content of flavonoid and protein from 70% ethanol extract solution of *Ginkgo biloba* leaves after concentrated with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturated solution

样品 Sample	实验步骤 Procedure	体积 Volume (mL)	黄酮含量 Flavonoid (mg)	蛋白质含量 Protein (mg)
干叶 dry leaves	浓缩前 before concentration	172	126.56	544.45
	第一次浓缩 first concentration	149	121.45	439.55
	第二次浓缩 second concentration	132	116.29	323.89
鲜叶 fresh leaves	浓缩前 before concentration	186	227.85	921.84
	第一次浓缩 first concentration	150	221.25	645.00
	第二次浓缩 second concentration	133	213.53	438.60

经过两次浓缩后,干叶提取液中黄酮含量从 0.74 mg/mL 提高到 0.88 mg/mL,上升了 18.92%;蛋白质含量从 3.17 mg/mL 下降至 2.45 mg/mL,降幅达 22.71%。鲜叶提取液中黄酮含量从 1.23 mg/mL 提高到 1.61 mg/mL,上升 30.89%;蛋白质含量从 4.96 mg/mL 下降至 13.30 mg/mL,降幅达 33.46%。可见,经过两次浓缩之后,提取液中黄酮的浓度和纯度明显提高。

### 2.4 不同浓度蛋白质溶液中饱和槲皮素的含量

从表 4 可以看出,在 1.602 mg/mL 的水溶性蛋白质溶液中,饱和槲皮素含量为 0.070 mg/mL;而 1.680 mg/mL 的醇溶性蛋白质溶液中,饱和槲皮素含量为 0.161 mg/mL。在不同浓度的醇溶性蛋白质溶液中,蛋白质含量越高,饱和槲皮素的含量也越高。这些结果说明,蛋白质有助溶槲皮素的作用,而且随着蛋白质含量增加,助溶作用加强。相比之下,醇溶性蛋白质的助溶作用强于水溶性蛋白质。由于银杏叶中盐溶性蛋白质含量低微,分离提纯困难,在本实验中没有与醇溶性蛋白质进行比较。

表 4 不同浓度蛋白质溶液中饱和槲皮素的含量

Tab 4 Content of saturated quercetin in different concentration of protein solutions

蛋白质含量 <sup>1)</sup> (mg/mL) Content of protein	槲皮素含量(mg/mL) Content of quercetin
1.602 WP	0.070
1.680 AP	0.161
1.051 AP	0.093
0.525 AP	0.057
0.263 AP	0.042

<sup>1)</sup>WP: 水溶性蛋白质 water-soluble protein; AP: 醇溶性蛋白质 alcohol-soluble protein.

## 3 讨 论

### 3.1 银杏叶黄酮提取工艺的优化

植物次生代谢物是重要的药物来源,有些天然药物因难以化学合成或成本昂贵,仍需从植

物材料中提取。萃取是利用混合物中各种成分在溶剂中溶解度不同而将它们分开,包括固体物质中各种成分在溶剂中溶解及溶剂与溶质分子相互扩散两个过程<sup>[11]</sup>。目前银杏黄酮提取采用水提取法、有机溶剂提取法、树脂吸附法和 CO<sub>2</sub>超临界提取法等<sup>[1,5]</sup>,但仍以有机溶剂萃取为主。有机萃取既要考虑降低成本,又要简化工艺,符合成本效益原则。本试验推荐 70% 乙醇作为萃取溶剂(工业化生产可用工业酒精),如果结合用 3% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行二步提取,则效果更佳。银杏叶的乙醇提取液经饱和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液两次浓缩后,黄酮损失分别为 8.11% (干叶) 和 6.28% (鲜叶),而蛋白质去掉了 40.51% (干叶) 和 52.42% (鲜叶),提纯效果是明显的。如果再经 2~3 次浓缩,收集沉淀物并将醇相蒸馏,可获得大部分的黄酮。综合本试验的结果,提出较佳的提取方法(图 1)。根据本试验的结果推算,其产品的收率将达到 2.5% (干叶),但可能受产地和季节的影响而有变动。这一提取方法,原则上也适用于其他植物材料中黄酮类化合物的提取。醇相中的乙醇可蒸馏回收反复使用,而硫酸铵溶液则可再饱和后重复使用。

本试验只对提取银杏叶黄酮的溶剂和步骤进行了初步的比较,提出了相应的提取方法,并未涉及银杏叶提取物中的萜内酯成分,这方面的研究将另文报道。

### 3.2 黄酮类化合物与蛋白质的关系

银杏黄酮的主要苷元(黄酮基)有槲皮素、异鼠李黄素和黄色黄酮等,它们都不溶于水;由苷元与双糖构成的糖苷(如芸香苷,即芦丁)则微溶于水,溶解度为 1 g:7 500~8 000 mL<sup>[5]</sup>。本试验进行的分级沉淀中,上清液(1)(含水溶性蛋白质)的体积分别为 200 mL(干叶提取液)和 244 mL(鲜叶提取液),总黄酮含量分别为 33.8 mg(10 g 干叶粉末)和 92.5 mg(50 g 鲜叶),远远超出其在水或稀盐中的溶解度。究其原因,可能与溶液中的蛋白质有关。因为在分级沉淀中,凡蛋白质含量高的组分,其黄酮含量也高。在上清液(1)中,蛋白质的存在可能有助于黄酮的溶解,因为在上清液(1)中加入固体 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 使蛋白质沉淀,则黄酮在溶液中的含量随着下降(表 3),说明有部分黄酮随蛋白质一同沉淀。从表 4 可以看到,在乙醇提取物(含醇溶蛋白质)中,随着蛋白质含量的增加,其饱和和槲皮素的含量也随之相应增加。蛋白质对黄酮的助溶作用,就水溶性蛋白质而言,与蛋白质胶体表面电荷的吸附作用有关;就醇溶性蛋白质而言,应与疏水基相互作用有关。因此,在黄酮类化合物的提取中,选用对蛋白质有较高溶解力的有机溶剂或含水的有机溶剂,可同时提取部分植物蛋白质,因而有利于黄酮的提取。但提取物中的蛋白质将成为银杏黄酮提纯的主要障碍。本试验中用饱和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行浓缩,可提



图 1 银杏叶黄酮提取方法

Fig 1 Extracting technical process of flavonoid of *Ginkgo biloba* leaves

高醇相中黄酮的浓度,降低蛋白质浓度,明显提高银杏黄酮的浓度和纯度,如果加上热处理,效果可能更佳。

### 参 考 文 献

- 1 李兆龙,胡季强,卢耀明. 银杏的开发利用. 上海:上海科学技术出版社,1996. 4,13~61.
- 2 刘克玲,张慧娟,杜希华. 银杏愈伤组织中黄酮含量初步研究. 见:苏全乐,宋朝枢,吴成才主编. 全国第四次银杏学术研讨会论文集. 北京:中国林业出版社,1996. 176~180.
- 3 陈秀珍. 银杏叶不同生长期总黄酮的含量测定. 广西植物,1988,8(4):363~364.
- 4 周维书,黄振安,郑爱云编著. 银杏叶及其制剂. 北京:化学工业出版社,1995. 22~45,73~75.
- 5 Oyama Y, Hayashi A, Ueha T.  $Ca^{2+}$ -induced increase in oxidative metabolism of dissociated mammalian brain neurosis: Effect of extract of *Ginkgo biloba* leaves. Japan J Pharmacol, 1993, 61(2):367~370.
- 6 Oyama Y, Fuchs P A, Katayama N, et al. Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of *Ginkgo biloba* extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and  $Ca^{2+}$ -loaded brain neurons. Brain Research, 1994, 635(1): 125~129.
- 7 Rapin J R, Yoa R G, Bouvier C, et al. Effects of repeated treatments with an extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) and bilobalide on liver and muscle glucogen contents in the non-insulin-dependant rat. Drug Development Research, 1997, 40(1): 68~74.
- 8 Imdronai M, Marcocci L. Peroxyl radica scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. Biochemical Pharmacology, 1995, 49(11): 1649~1655.
- 9 邹 琦主编. 植物生理生化实验指导. 北京:中国农业大学出版社,1995. 68~73.
- 10 李碘鹏,万 宏. 高效液相色谱法测定银杏叶提取物中黄酮含量. 广西植物,1996,16(3):292~294.
- 11 贾贵儒,杨海燕. 从细胞中萃取特定物质机理的研究. 农业工程学报,1998,14(2): 68~71.

(责任编辑:惠 红)

## 欢迎订阅 2000 年《生态农业研究》

《生态农业研究》是中国科学院石家庄农业现代化研究所和中国生态经济学会共同主办的目前国内唯一研究生态农业理论的学术期刊,中国科学院科学出版基金资助,科学出版社出版,系中国科学院引文数据库来源期刊。本刊旨在探索与研究生态农业理论、方向和内容,报道国内外生态农业最新研究成果、实验方法、学术动态和生态农业建设典型经验等。主要刊登具有创造性的生态农业与生态经济研究论文、研究技术报告(包括理论与应用研究、农业生态工程技术与实用生物技术以及有利于农业可持续发展的技术体系研究)、研究简报、综述及生态农业建设典型经验和典型模式等。适于从事生态学、生态经济学、农、林、牧、副、渔、资源与环境保护等科技人员、大中专院校有关专业师

生、管理工作者和基层从事生态农业建设的广大技术人员、干部等阅读。

本刊 1993 年创刊,国内外公开发行,中国标准刊号 ISSN1004-8219,季刊,季末出版,16 开本,80 页。定价:5.00 元/册,全年 20.00 元(含邮资)。邮发代号 18-158,全国各地邮局均可订阅,漏订者可直接汇款至编辑部补订。

本刊现有 1993~1999 年各年度合订本,均为 20.00 元/套(含邮资),需订购者请直接由邮局汇款至编辑部订阅,务请在汇款单上注明订户详细地址及邮政编码。地址:河北省石家庄市槐中路 286 号《生态农业研究》编辑部,邮编:050021,电话:(0311)5818007;传真:(0311)5815093。