

# 银杏外种皮生物活性物质联合提取工艺研究

吴琼, 杜小弟, 雷家珩\*, 张磊, 孙梓涵

武汉理工大学化学化工与生命科学学院化学系, 武汉 430070

**摘要:** 分别以石油醚、80%乙醇、水为溶剂, 依次对银杏外种皮中的银杏酸、黄酮以及多糖进行了联合提取研究。结果表明: 常温条件下银杏外种皮经高速剪切破壁, 石油醚提取银杏酸 40 min, 2 次累计提取率可达 98.5%, 银杏酸含量可达 54.6%, 经硅胶柱纯化后纯度可达到 97.5%; 残渣用 80% 乙醇提取黄酮 60 min, 固液比 1:15, 1 次提取率可达 94.6%, 其中总黄酮含量为 7.5%, 经水沉、大孔树脂纯化, 黄酮苷含量为 24.4%; 最后以水为溶剂, 90 °C 下回流提取剩余残渣 120 min, 固液比为 1:10, 多糖 2 次累计提取率可达 72.7%, 含量为 24.3%, 除去蛋白纯化后纯度可达 64%。

**关键词:** 银杏; 黄酮; 银杏酸; 多糖; 联合提取

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.025

## Integrated Extraction of Biologically Active Substance from *Ginkgo bilobasarcotesta*

WU Qiong, DU Xiao-di, LEI Jia-heng\*, ZHANG Lei, SUN Zi-han

Department of Chemistry, College of Chemistry, Chemical Engineering and Life Science, Wuhan University Of Technology, Wuhan 430070, China

**Abstract:** Petroleum ether, 80% of ethanol and water were respectively used as solvent for integrated extraction of ginkgo acid, flavone and polysaccharide from *Ginkgo biloba sarcotesta* successively. The result showed that: under the ambient temperature conditions, the cytoderm of *Ginkgo biloba sarcotesta* had been broken by high-speed shearing, petroleum ether was used to extract ginkgo acid for 40 min, two-time accumulative extraction rate reached 98.5%, the content reached 54.6%. Its purity after purification with silica gel column chromatography reached 97.5%; then 80% ethanol was used to extract flavone for 60 min from residue, solid-to-liquid ratio was 1:15, the one-time extraction rate reached 94.6%, the content of total flavone was 7.5%, the content of flavonoid glycoside was 24.4% after water precipitation and purification with macroporous resin column chromatography; at last, water was used as solvent to reflux extract the rest residue for 120 min under 90 °C, solid-to-liquid ratio was 1:10, two-time accumulative extraction rate of polysaccharide reached 72.7%, the content was 24.3%, the purity reached 64% after purification by removing protein.

**Key words:** *Ginkgo biloba*; flavone; ginkgo acid; polysaccharide; combined extraction

我国是银杏的故乡, 银杏资源占世界总量的 70% 以上, 每年产银杏干叶 4 万吨, 白果 3 万吨, 同时伴随有约 10 万吨的银杏外种皮被废弃<sup>[1]</sup>。为了开发银杏外种皮资源, 国内开展过大量研究, 主要是对活性成分进行提取分离鉴定, 研究其药理作用, 也有用银杏外种皮制作保健饮料<sup>[2]</sup>、银杏酒<sup>[3]</sup>等的专利和利用银杏酸的杀虫杀菌作用<sup>[4,5]</sup>制作生物农药的报道<sup>[6]</sup>。

银杏外种皮中除含有较高的银杏酸(5.5%<sup>[7]</sup>)

外, 还有 1% 左右<sup>[8]</sup>的黄酮以及 7% 左右的多糖<sup>[9]</sup>。相比于目前文献中对单一活性物质的提取纯化工艺进行探索及优化<sup>[10,11]</sup>, 本文为了充分利用银杏外种皮资源, 采用联合提取工艺, 对外种皮中黄酮、多糖和银杏酸等生物活性物质进行联合提取, 并对提取条件进行了优化。由于外种皮中内酯含量<sup>[12]</sup>低, 不适用于联合提取工艺, 因此本文没有介绍银杏内酯的提取纯化过程。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验材料

干燥的银杏外种皮(产自湖北随州, 经武汉理

工大学生物系鉴定);石油醚(60~90℃);无水乙醇(AR级);芦丁标准品(编号100080-200707);总银杏酸对照品(编号111594-200502,纯度≥98%);银杏酸A(C15:0,C17:1),银杏酸B(C13:0,C15:1,C17:2);槲皮素、山奈素、异鼠李素(纯度均大于99%);以上标准品均购自中国药品生物制品鉴定所。D-无水葡萄糖标准品(纯度>99.5%),购自国药集团(上海)化学试剂有限公司;

## 1.2 实验仪器

梅特勒天平 XP-6, 高效液相色谱仪岛津 LC20A, 紫外可见分光光度计 CRT757, 高速剪切破壁机 HSCS。

## 2 实验方法

### 2.1 联合提取工艺

本文采用先用石油醚提取极性较小的银杏酸, 然后再提取极性较大的黄酮及多糖的技术方案。多糖在热水中溶解度大, 为避免高温对黄酮分子的破坏, 提取完银杏酸后的银杏外种皮残渣, 先以醇-水体系提取黄酮, 再以热水浸提多糖。具体流程如下:

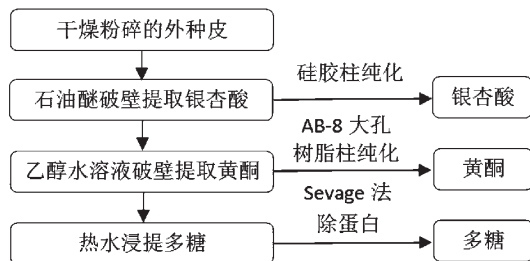


图1 联合提取工艺流程图

Fig. 1 Integrated extraction process flow chart

#### 2.1.1 银杏酸的提取及纯化

将干燥的银杏外种皮粉碎过60目筛, 取100g外种皮粉末, 按一定固液比加入石油醚, 常温下在高速剪切破壁机中破壁提取一定时间, 离心, 残渣再次提取, 将多次的提取液合并, 减压浓缩并真空干燥得银杏酸粗提物。取2.00mg粗提物以10mL甲醇复溶后测定其银杏酸含量。粗提物经硅胶柱纯化, 用石油醚-异丙醇体系洗脱, 收集洗脱液浓缩并真空干燥得到纯化产物。取2.00mg纯化产物以10mL甲醇复溶后测定其银杏酸含量。

#### 2.1.2 黄酮的提取及纯化

将提取完银杏酸的外种皮残渣干燥后, 按一定固液比加入一定浓度的乙醇水溶液, 常温下破壁提

取一定时间, 离心, 残渣再次提取, 将多次的提取液合并, 减压浓缩并真空干燥得黄酮粗提物。取1.00mg粗提物复溶后用分光光度法测定其总黄酮含量。粗提物经AB-8大孔树脂纯化, 以不同浓度的乙醇水溶液进行洗脱, 收集洗脱液浓缩并真空干燥得到纯化产物。用HPLC法测定黄酮醇苷含量。

#### 2.1.3 多糖的提取及纯化

将提取完黄酮的外种皮残渣干燥后, 在一定的固液比下采用回流法以热水浸提多糖, 提取液经浓缩醇沉后用苯酚硫酸法测定粗提物中多糖含量。粗提物经Sevage法脱去蛋白质, 用乙醇重结晶后用苯酚硫酸法测定纯化产品中多糖含量。

### 2.2 提取率及纯度计算

将外种皮粉末分别以相应的溶剂及提取方式单独提取上述三种活性物质, 多次提取至提取液中不再含活性物质, 合并提取液, 浓缩定容后检测得各活性物质的总含量。

提取率 = (提取物中活性物质的含量/原料中活性物质的总含量) × 100%

纯度 = (提取物中活性物质的含量/产物的质量) × 100%

### 2.3 银杏酸检测

用HPLC法测定银杏酸粗提物及纯化产品中的总银杏酸含量。精密称取经五氧化二磷干燥过的银杏酸A和B对照品各1.00mg, 用甲醇溶解并定容至10mL, 得标准溶液。色谱条件: SinoChrom ODS-BP C<sub>18</sub> (200 × 4.6 mm, 5 μm), 柱温30℃, 流动相为甲醇-0.1%的磷酸溶液(90:10), 流速1.000 mL/min, 检测波长310 nm, 进样量10 μL。

以银杏酸A、B标准品的峰面积为对照, 计算银杏酸粗提物及纯化产物样品中总银杏酸含量。

### 2.4 黄酮检测

黄酮粗提物的测定, 以芦丁为标准品, 经显色后用分光光度法<sup>[13]</sup>测定其总黄酮含量。

黄酮纯化产品中总黄酮醇苷的含量以HPLC法进行定量检测。将槲皮素、山奈素和异鼠李素标准品用甲醇溶解分别配置成10~100 ppm的标准溶液系列。色谱条件: SinoChrom ODS-BP C<sub>18</sub> (200 × 4.6 mm, 5 μm), 柱温30℃, 流速1.000 mL/min, 进样量10 μL, 流动相为A:40%甲醇-0.1%磷酸, B:95%甲醇-0.1%磷酸进行梯度洗脱, 初始A100%, 保持2 min, 在20 min内线性改变至B100%, 保持20 min。以360 nm与310 nm双波长分别检测黄酮醇苷及残

留的银杏酸。以三种标准溶液的峰面积为对照,计算纯化产品中总黄酮醇苷含量。

## 2.5 多糖检测

多糖粗提物用  $I_2$ -KI 反应检测淀粉,茚三酮反应检测蛋白质, Molish 反应定性检验多糖,粗提物及纯化产物以苯酚-硫酸法<sup>[14]</sup>测定多糖含量

## 3 结果与讨论

### 3.1 银杏酸提取纯化条件

#### 3.1.1 时间、固液比和提取次数对银杏酸提取效率影响

采用机械破壁-溶剂提取法提取银杏酸时,银杏酸的提取率随提取时间的递增显著增加,在 40 min 时提取率可达 86% 左右,接近饱和。时间继续增加提取率变化不大。故本文选定提取时间每次 40 min。

图 2 为固液比与提取次数对银杏酸提取率的影响。图 2 表明,以石油醚为溶剂,室温下机械破壁提取 40 min,固液比为 1:15,连续提取两次银杏酸累计提取率可达 98.5%,粗提物纯度约为 54.6%。

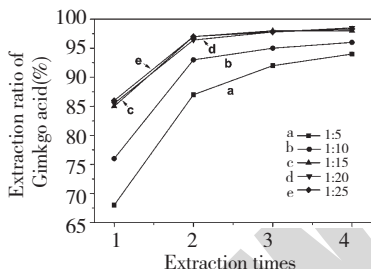


图 2 固液比及提取次数对银杏酸提取率影响

Fig. 2 The effects of solid-liquid ratio and extraction times on the extraction rate of ginkgo acid

#### 3.1.2 银杏酸粗提物纯化及分析

银杏酸提取物经硅胶柱梯度洗脱,洗脱剂为石油醚与异丙醇混合液,异丙醇的体积分数为 5% ~ 30%,流份经 HPLC 分析,收集含银杏酸的流份,浓缩后真空干燥,可得到银杏酸纯品。测定后按 2.2 中纯度计算方法进行计算,银杏酸纯度可达 97.5% (图 3)。在银杏酸的五种化合物中, C15:1、C13:0 和 C17:1 三种酸的含量占样品总银杏酸含量的 95%, C17:2 和 C15:0 两种酸含量较少。

### 3.2 黄酮提取纯化条件

#### 3.2.1 浓度和时间对黄酮提取效率影响

考察了乙醇浓度、提取时间对黄酮提取率的影

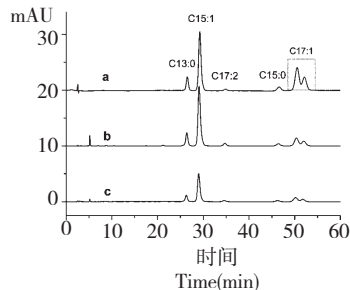


图 3 银杏酸标准品 (a)、银杏酸纯化产物 (b) 及粗提物 (c) 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of ginkgo acid standard (a), purified product (b) and crude extract (c)

响 (图 4)。结果表明,室温条件下,银杏黄酮提取率随乙醇体积分数的增加呈现先上升后下降的变化,当乙醇体积分数为 80% 时,提取率达到最大为 95%。因此,本文确定黄酮的提取溶剂为 80% 乙醇水溶液,提取时间 60 min。

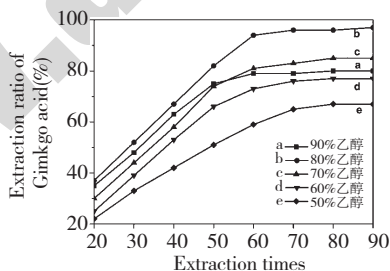


图 4 不同乙醇浓度和提取时间对黄酮提取率影响

Fig. 4 The effect of different ethanol concentration and extraction durations on the extraction rate of flavonoids

#### 3.2.2 固液比及提取次数对黄酮提取效率影响

本文还考察了 80% 乙醇,固液比 (质量体积比,质量单位为 g,体积单位为 mL) 为 1:5、1:10、1:15、1:20 及 1:25 时,多次破壁提取黄酮 60 min,提取率随提取条件的变化 (图 5)。结果表明,固液比为

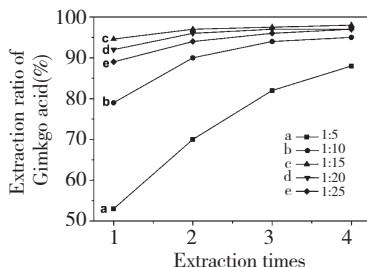


图 5 液固比和萃取次数对黄酮提取率的影响

Fig. 5 The effect of solid-liquid ratio and extraction times on the extraction rate of flavonoids

1:15, 提取 1 次黄酮提取率即可达 94.6%, 粗提物纯度为 7.5%。

### 3.2.3 黄酮粗提物纯化与检测

将黄酮的提取液旋蒸浓缩至原体积的 20%, 静置后离心, 取上清液经 AB-8 大孔树脂纯化, 以 20% 的乙醇水溶液洗脱杂质后, 换 70% 的乙醇水溶液洗脱。收集洗脱液浓缩并真空干燥得到纯化产物。

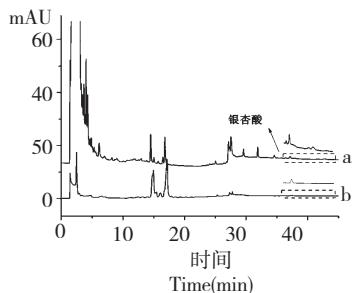


图 6 大孔树脂纯化前(a)、后(b) HPLC 色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms of flavonoids before (a) and after (b) purification by macroporous resin

通过 HPLC 法对比粗提取和纯化产物, 结果如图 6, 纯化后黄酮含量得到明显富集, 杂质峰显著减小。由于黄酮苷种类繁多, 难以直接进行色谱定量, 因此参照药典方法<sup>[15]</sup>进行水解, 以槲皮素、山奈素、异鼠李素三种苷元为标样, 对水解产物中苷元含量进行定量, 从而计算原样中黄酮醇苷含量, 结果见图 7, 经计算, 可水解的苷类在黄酮纯化产品中含量为 24.4%。同时经与银杏酸对照品对比, 纯化产物中总银杏酸含量小于 5 ppm。

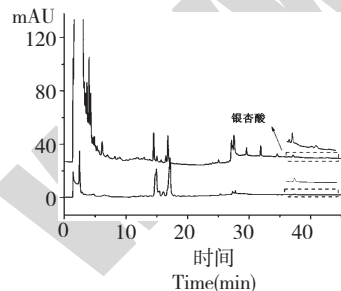


图 7 黄酮标准品(a)、黄酮纯化样(b)、黄酮水解样(c)的 HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of flavonoid standard (a), purified product (b) and hydrolysate (c)

注: 1 为芦丁; 2 为槲皮素; 3 为山奈素; 4 为异鼠李素

Note: 1: rutin, 2: quercetin, 3: kaempferol, 4: isorhamnetin

### 3.3 多糖提取纯化条件

以热水浸提多糖, 提取液  $I_2$ -KI 反应呈阴性, 表

明不含淀粉, Molish 反应与茚三酮反应呈阳性, 表明含多糖与蛋白质。本文考察了温度、固液比、时间及提取次数对多糖提取率的影响。结果见图 8、9。

#### 3.3.1 温度和时间对多糖提取效率影响

图 8 表明, 多糖提取率随温度升高增大, 90 °C (120 min 时达 73%; 温度继续升高, 提取率反而下降。因此, 本文选定银杏多糖提取温度为 90 °C。提取时间为 120 min。

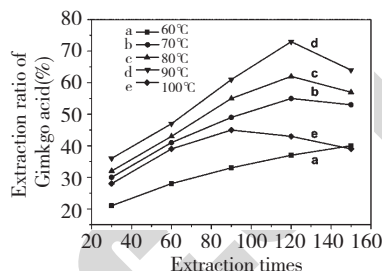


图 8 温度和提取时间对多糖提取率的影响

Fig. 8 The effects of temperature and extraction duration on extraction rate of polysaccharide

#### 3.3.2 固液比和萃取次数对多糖提取效率影响

从图 9 中可以看出, 提取次数 2 次以上, 多糖得率变化不大。结合图 8、图 9 的数据综合分析, 多糖提取的条件为 90 °C 下按固液比 1:10, 提取 2 次。

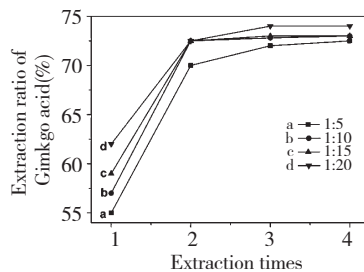


图 9 液固比和萃取次数对多糖提取率的影响

Fig. 9 The effects of solid-liquid ratio and extraction times on extraction rate of polysaccharide

#### 3.3.3 多糖粗提物纯化

将多糖提取物浓缩至原体积的 20%, 加入 4 倍无水乙醇, 5 °C 下静置 24 h, 抽滤, 得粗多糖产品, 用水复溶, 采用 Sevage 法(正丁醇: 氯仿 = 1:3)混合溶剂萃取 3 次, 经茚三酮反应检测蛋白质呈阴性, 离心分离后, 用乙醇重结晶, 得到产品中多糖含量由粗品中的 24.3% 提升至 64.0%。

## 4 结论

常温条件下银杏外种皮经高速剪切破壁, 石油

醚提取银杏酸 40 min, 2 次累计提取率可达 98.5%, 银杏酸含量可达 54.6%, 经硅胶柱纯化后纯度可达到 97.5%; 残渣用 80% 乙醇提取黄酮 60 min, 固液比 1:15, 1 次提取率可达 94.6%, 其中总黄酮含量为 7.5%, 经水沉、大孔树脂纯化, 黄酮苷含量为 24.4%; 最后以水为溶剂, 90 °C 下回流提取剩余残渣 120 min, 固液比为 1:10, 多糖 2 次累计提取率可达 72.7%, 含量为 24.3%, 除去蛋白纯化后纯度可达 64%。

#### 参考文献

- Lin X(林协). Ginkgo product development and market prospect. *J Forest Eng* (林业科技开发), 2003, 17(4): 13-15.
- Suo RZ(索瑞芝). A kind of health drink from the germ of *Ginkgo bilobasacrotesta* (一种银杏外种皮麦胚保健饮料). CN102461961A, 2012-05-23.
- Xu C(徐琛). Ginkgo wine production process (银杏酒生产工艺). CN101519629, 2009-09-02.
- Schultz DJ, Christian O, Cobbs GA, et al. Bioactivity of anacardic acid against colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) larvae. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 7522-7529.
- Muzaffar S, Bose C, Banerji A, et al. Anacardic acid induces apoptosis-like cell death in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 100(1): 1-13.
- Li WH(李稳宏), Wang J(王军), Li DW(李多伟), et al. Technical process of extraction from the testa of *Ginkgo biloba* L. and the application for preparation of biotic pesticide. *Chem Eng* (化学工程), 2004, 32: 69-72.
- Yang LQ(仰榴青), Wu XY(吴向阳), Chen J(陈钧). Determination of ginkgolic acids in sarcotesta of ginkgo biloba by high performance liquid chromatography. *Chinese J Anal*

*Chem* (分析化学) 2002, 30: 901-905.

- Li WH(李稳宏), Wang F(王锋), Li DW(李多伟), et al. Study on the analytical methods of the ginkgo flavonoid in different parts of *Ginkgo biloba* L. *Food Sci* (食品科学), 2005, 23: 187-189.
- Lu P(鲁萍), Ren L(任莉), Xu AH(许爱华), et al. The determination of molecular weight and content of the polysaccharide from the sarcotesta of *Ginkgo biloba*. *J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 22: 29-31.
- Li MC(李春美), He JR(何静仁), Du HX(杜红祥), et al. Study of extraction technology of flavonoids from *Ginkgo ectocarp*. *Food Sci* (食品科学), 2002, 12: 70-74.
- Chen JJ(陈静静), Jiang B(江波), Zhang T(张涛), et al. Study on extraction and purification of *Ginkgo biloba* exocarp polysaccharide. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2011, 7: 242-245.
- Beek TAV. Ginkgolides and bilobalide: Their physical, chromatographic and spectroscopic properties. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 5001-5012.
- Liu DG(刘德录), Gou X(缙星), Cheng FF(程方方), et al. Determination of total flavones from Ginkgo leaves by spectrophotometry. *Chin J Spec Lab* (光谱实验室), 2012, 5: 3001-3004.
- Zhou YX(周燕霞), Tang ML(唐明林), Yin HA(殷辉安), et al. Extraction and content determination of polysaccharides from *poriacocos*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15: 330-333.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 416-417.

(上接第 1038 页)

- Meng ZH(孟子晖), Chen J(陈婧), Xue M(薛敏), et al. A method for extraction of quebrachitol from natural rubber wastewater. CN201210226862. 7, 2012-10-17.
- Deng SM(邓世明). A method for extraction of quebrachitol from natural rubber latex. CN201010624478. 3, 2012-7-11.
- Wang HC(王慧聪), Huang XM(黄旭明), Chen HB(陈厚彬), et al. A method for extraction quebrachitol from litchi and longan (*Sapindaceae*). CN201110038349. 0, 2011-6-15.
- Jiang SK, Zhang GM, Wu Y, et al. Isolation and characterization of l-quebrachitol from rubber factory wastewater. *J Rubber Res*, 2014, 17(1): 23-33.
- Jiang SK(姜士宽), Wu Y(伍英), Zhang GM(张桂梅). Method for extraction quebrachitol from natural rubber indus-

try wastewater. CN201310007459. x, 2015-5-13.

- Wu Y, Jiang SK, Li GH, et al. Method for scale extraction quebrachitol from natural rubber industry waste water. US9422214, 2016-8-23.
- Wang LZ(王丽芝), Liao XX(廖小雪), Liao SQ(廖双泉), et al. Decolorization and deproteinization in the quebrachitol extraction of natural latex. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2014, 36: 956-960.
- Gopal R, Kaur S, Ma Z, et al. Electrospun nanofibrous filtration membrane. *J Membrane Sci*, 2006, 281: 581-586.
- Dowd MK, Stevens ED. The crystal structures of d-pinitol and l-quebrachitol by low-temperature X-RAY diffraction. *J Carbohydr Chem*, 2002, 21: 373-383.