

# 复合酶预处理法对银杏叶总萜内酯提取率的影响

张晓娟<sup>1\*</sup>, 赵正栋<sup>1</sup>, 张辰露<sup>1</sup>, 杨光<sup>2</sup>, 杜林峰<sup>2</sup>, 冯自立<sup>1</sup>

<sup>1</sup>陕西理工大学生物科学与工程学院, 汉中 723001; <sup>2</sup>陕西宇辰生物科技有限公司, 城固 723003

**摘要:**为研究复合酶预处理法对银杏叶总萜内酯浸出率的影响。本文采用单因素实验对银杏叶酶解预处理过程中的酶种类、酶用量、酶解时间、酶解温度、pH 值五个关键因素进行探索, 酶解后用 20% 乙醇-水溶液对银杏叶酶解液进行回流提取, LX-5 型大孔吸附树脂对提取液进行纯化, 浓缩干燥得银杏叶提取物产品。高效液相色谱法检测其总萜内酯含量。结果表明, 银杏叶酶解预处理的最佳工艺为: 复合酶(纤维素酶: 果胶酶 = 1: 1), 用量为银杏叶的 1/300, 酶解时间 4.0 h、酶解温度 50 °C、初始 pH 值 4.0。在该工艺条件下获得的银杏叶总萜内酯提取率为 0.55%, 银杏叶提取物中总萜内酯含量为 8.96%, 高于银杏叶提取物国际商务标准(总内酯含量 ≥ 6%)。说明复合酶预处理条件下银杏叶总萜内酯提取率高, 研究为工业化生产高质量银杏叶提取物提供了理论依据。

**关键词:** 银杏叶; 纤维素酶; 果胶酶; 银杏总萜内酯; 提取率

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.3.014

## Effects of Compound Enzyme Pre-treatment on the Extraction Rate of Total Terpene Lactones in *Ginkgo biloba* Leaves

ZHANG Xiao-juan<sup>1\*</sup>, ZHAO Zheng-dong<sup>1</sup>, ZHANG Chen-lu<sup>1</sup>, YANG-Guang<sup>2</sup>, DU Lin-feng<sup>2</sup>, FENG Zi-li<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Biological Science and Engineering, Shannxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;

<sup>2</sup>Shannxi Yuchen Bio-Technology company, Chenggu 723003, China

**Abstract:** To study the effects of compound enzyme pretreatment on the extraction rate of total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves. Five key factors of enzyme type, enzyme dosage, enzymolysis time, enzymolysis temperature and pH value during the pretreatment of *G. biloba* were studied by single factor experiment. After enzymolysis, *G. biloba* extract was extracted with 20% ethanol solution, purified by LX-5 macroporous adsorption resin, concentrated and dried. Then, *G. biloba* extract product was obtained. High performance liquid chromatography was used to detect the contents of total terpene lactones. The results showed that the enzymolysis effect was the best when the ratio of cellulose to pectinase was 1:1, the ratio of enzyme to *G. biloba* was 1:300, the enzymolysis time was 4.0 h, the enzymolysis temperature was 50 °C and the initial pH was 4.0. The extraction rate of total terpene lactone was 0.55% and the total terpene lactone content in *G. biloba* extract was 8.96% which was higher than *G. biloba* extract international business standards (total lactone content ≥ 6%). The results showed that the extraction rate of total terpene lactones in *G. biloba* leaves was high under the condition of compound enzyme pretreatment. This study provided a theoretical basis for the industrial production of high quality *G. biloba* extract.

**Key words:** *Ginkgo biloba*; cellulase; pectinase; total terpene lactones; extraction rate

银杏叶为银杏科植物银杏(*Ginkgo biloba* L.)的干燥叶,其味苦、甘、涩、性平,有小毒。具益心敛肺、化湿止泻之功效,可用于治疗胸闷心痛、心悸怔忡、痰喘咳嗽、泻痢等症<sup>[1,2]</sup>。银杏叶中富含萜内酯、黄酮类、氨基酸、维生素和矿物质等多种成分<sup>[3]</sup>。药

理研究表明,银杏叶中主要的生物活性成分为黄酮类和萜内酯类化合物<sup>[4]</sup>。其中萜内酯类化合物有银杏内酯 A、B、C 和白果内酯等<sup>[5]</sup>。研究表明,银杏内酯可选择性抵抗血小板活化因子,对心血管、脑血管、动脉硬化、高血压等疾病具有特殊的疗效<sup>[6-10]</sup>。因此,探索符合国际标准的高萜内酯含量的银杏叶提取物工艺技术成为目前研究的一个热点。银杏叶总萜内酯的提取方法主要有溶剂萃取法、超临界流

体萃取法、微波辅助提取法、超声波辅助提取法等。吴昊等研究了超声-微波协同萃取银杏叶黄酮与内酯 B 的最佳工艺条件,即料液比 1:20(g/mL),提取温度 50 ℃,乙醇体积分数为 70% 和提取时间 4 min,在此条件下,银杏叶黄酮及内酯 B 的得率分别为 2.25% 和 0.81%<sup>[3]</sup>。银杏叶中萜内酯类物质包裹在细胞壁内,银杏叶细胞壁对细胞内物质阻碍作用较大。传统方法大多不能完全破碎细胞壁,限制了萜内酯类物质的溶出,严重影响了提取效率<sup>[11,12]</sup>。近年来,酶法提取由于其温和、提取率高,被广泛应用于植物有效成分的提取分离研究。其中,纤维素酶能将组成细胞壁的纤维素骨架逐级降解成葡萄糖<sup>[13,14]</sup>,果胶酶可分解植物细胞壁上的多聚糖类物质<sup>[15]</sup>,也可将果胶分解成果胶酸等小分子物质,从而破坏细胞壁结构<sup>[16]</sup>,促进细胞内活性成分的溶出。张伟等<sup>[11]</sup>通过纤维素酶浸解提高了银杏叶黄酮类物质的提取率。研究得出,在酶解温度为 45 ℃、酶处理 pH 为 4、酶用量为 0.3 mg/mL、酶解时间为 2 h 条件下,银杏叶总黄酮提取率为 2.80%,较对照组增加了 45.83%。

目前,复合酶预处理对银杏叶总萜内酯提取率的研究尚未见报道。因此,本文通过单因素实验对银杏叶酶解预处理工艺进行探索,以期提高银杏叶中总萜内酯的溶出率,为工业化生产高质量银杏叶提取物提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

银杏叶于 2015 年 8 月中旬采摘自陕西汉中宁

强县,经陕西省资源生物重点实验室鉴定为合格品,60 ℃ 烘干、粉碎后过 40 目筛备用;纤维素酶( $5 \times 10^4$  U/g)、果胶酶( $3 \times 10^4$  U/g)(食品级,深圳恒生生物科技有限公司);银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯对照品(HPLC $\geq$ 98%,陕西乐博生化科技有限公司);正丙醇、四氢呋喃(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);乙酸乙酯、盐酸、碳酸钠;LX-5 型大孔吸附树脂。

### 1.2 仪器与设备

AL204 型电子天平;JB90-D 型电动强力搅拌机;XMTD-4000 型恒温水浴锅;RE-2000A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III 型循环水式多用真空泵;BS50-1A 型双通道恒流泵;101A-3E 型电热鼓风干燥箱;7D5A-WS 台式低速离心机;Lab Tech 高效液相色谱仪 ELSD-UM5000(上海通微分析技术有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 银杏叶酶解实验

银杏叶粉末按表 1 实验设计进行酶解实验,分别以酶种类、酶用量、酶解时间、酶解温度、酶解 pH 值为影响因素考察其对银杏叶中总内酯提取率的影响。即在酶用量为 1/400、酶解时间、温度和 pH 分别为 2.0 h、45 ℃ 和 7.0 的条件下,研究酶种类对提取率的影响,和以复合酶为水解剂,分别控制其用量为银杏叶粉末的 1/200、1/300、1/400、1/500,酶解时间为 2.0~4.0 h,温度为 45~50 ℃ 和 pH 为 3.0~7.0,研究酶用量,酶解时间、温度和 pH 对银杏叶中总内酯提取率的影响。实验结果见表 1。

表 1 银杏叶酶解单因素实验设计( $n=3$ )

Table 1 Single factor experiment of enzymolysis on *G. biloba* leaves ( $n=3$ )

因素 Factor	水平 Level				
	-2	-1	0	1	2
酶种类 Enzyme types	空白组 Blank group	纤维素酶 Cellulase	果胶酶 Pectinase	复合酶(纤维素酶 :果胶酶=1:1) Complex enzyme (Cellulose:pectinase=1:1)	-
酶用量 Enzyme dosage	0	1/500	1/400	1/300	1/200
酶解时间 Enzymolysis time (h)	1	2	3	4	5
酶解温度 Enzymolysis temperature ( ℃ )	20	30	40	50	60
酶解 pH 值 Enzymolysis pH	3	4	5	6	7

### 2.2 银杏叶总萜内酯类化合物的提取

预处理后的银杏叶酶解液按 1:10 的料液比用

20% 的乙醇水溶液回流提取 3 次,每次 3.0 h,合并 3 次提取液,过滤、浓缩至无醇味后加水调整至 800

mL,用 LX-5 型大孔吸附树脂进行吸附,分别用 ddH<sub>2</sub>O 和 15% 的乙醇水溶液洗脱除杂,然后用 70% 的乙醇进行洗脱,洗脱液于 60 °C 减压浓缩,75 °C 恒温干燥得银杏叶提取物,用 HPLC 法进行检测提取物中总萜内酯含量。

## 2.3 样品溶液的配制

### 2.3.1 总萜内酯对照品的制备

制备得每 1mL 溶液分别含白果内酯 1.6 mg、银杏内酯 A 1.6 mg、银杏内酯 B 1.6 mg 和银杏内酯 C 1.6 mg 的混合对照品甲醇溶液。然后分别将混合对照品甲醇溶液用甲醇稀释至 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍,摇匀、过滤,取续滤液即得浓度为 0.8、0.4、0.2、0.1 mg/mL 的总萜内酯对照品溶液。

### 2.3.2 供试品溶液的配制

取酶预处理法制备的银杏叶提取物 150.0 mg,精密称定,加水 10 mL,置水浴中加热至 70 °C 使样品充分溶解,加 2.0% 的盐酸 0.5 mL,用乙酸乙酯提取 4 次(15、10、10、10 mL),合并提取液,用 5% 醋酸钠溶液 20 mL 洗涤,分取醋酸钠溶液,用乙酸乙酯 10 mL 洗涤。合并乙酸乙酯提取液及洗涤液,用水洗涤 2 次,每次 20 mL,分取水液,用乙酸乙酯 10 mL 洗涤,合并乙酸乙酯提取液,回收溶剂至干,残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液即得<sup>[17]</sup>。

### 2.3.3 色谱条件

Lab Tech 高效液相色谱仪,ELSD-UM5000 检测器,Ultimate® XB-C<sub>18</sub> 5 μm 4.6 × 150 mm 色谱柱,柱温 25 °C,漂移管温度 85 °C,载气流量 25 L/min,流动相为正丙醇:四氢呋喃:水 = 1:15:84,流速 1 mL/min。

## 2.4 含量计算

银杏叶提取物中总萜内酯的含量按《中国药典》2015 版国标方法测定。银杏叶总萜内酯提取率按公式(1)进行计算,提取物中总萜内酯的含量按公式(2)进行计算。

注:萜内酯含量 = 白果内酯含量 + 银杏内酯 A 含量 + 银杏内酯 B 含量 + 银杏内酯 C 含量

## 3 结果与讨论

### 3.1 总萜内酯对照品标准曲线的绘制

按 2.3.1 中对照品溶液的配制方法对白果内酯(BB)、银杏内酯 A(GA)、银杏内酯 B(GB)、银杏内酯 C(GC)对照品混合溶液进行高效液相色谱检测,

以浓度(mg/mL)为 X 轴,峰面积(mAU \* s)为 Y 轴,绘制标准曲线。其中白果内酯的线性方程为  $Y = 693130X - 9938$ ;  $R^2 = 0.9982$ 。银杏内酯 A 的线性方程为  $Y = 1560852X - 11343$ ;  $R^2 = 0.9989$ 。银杏内酯 B 的线性方程为  $Y = 1041988X - 7213$ ;  $R^2 = 0.9986$ 。银杏内酯 C 的线性方程为  $Y = 5445050X - 46673$ ;  $R^2 = 0.9993$ 。以上对照品溶液在 0.0 ~ 0.8 mg/mL 范围内均呈现出良好的线性关系。见图 1。

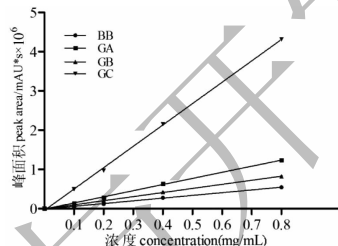


图 1 银杏内酯对照品标准曲线

Fig. 1 Standard curves of ginkgo lactone reference substance

## 3.2 银杏叶酶解单因素实验

### 3.2.1 酶种类对银杏叶中总萜内酯提取率的影响

图 2 是酶种类对银杏叶中总萜内酯提取率的影响。从该图可知,空白组总萜内酯提取率仅为 0.20%,说明银杏叶细胞壁阻碍了细胞内萜内酯类物质溶出。果胶酶组总萜内酯提取率为 0.23%。纤维素酶组总萜内酯提取率为 0.28%。复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:1)组的总萜内酯提取率为 0.29%,高于空白组、果胶酶组和纤维素酶组,说明果胶酶和纤维素酶能较大程度破坏银杏叶细胞壁,促进细胞内活性成分的溶出,因此后续实验选择复合酶进行酶解预处理。

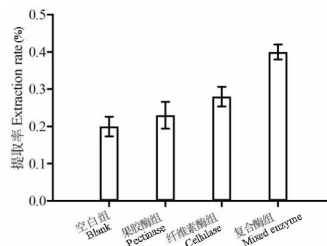


图 2 酶种类对银杏叶总萜内酯提取率的影响

Fig. 2 Effect of enzyme types on the extraction rate of total lactones in *G. biloba* extract

### 3.2.2 酶用量对银杏叶总萜内酯提取率的影响

图 3 是酶用量对银杏叶中总萜内酯提取率的影响。从该图可知,空白组总萜内酯提取率仅为 0.18%,在酶用量为 1/500 ~ 1/300 区间,增加酶用

量有利于银杏叶内酯类物质溶出细胞。当酶用量为 1/300 时,总萜内酯提取率达到最大 0.28%,此后再增加酶的用量总萜内酯的提取率也不再上升。因此,1/300 为银杏叶酶解预处理的最佳酶用量。

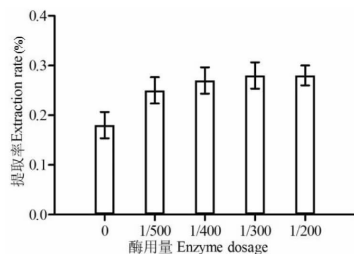


图3 酶用量对银杏叶总萜内酯提取率的影响

Fig. 3 Effect of enzyme dosage on the extraction rate of total lactones in *G. biloba* extract

### 3.2.3 酶解时间对银杏叶总萜内酯提取率的影响

酶解时间实验结果如图4所示。随着酶解时间的增加,总萜内酯提取率呈明显的增长趋势。3.0 h时提取率达到0.33%,此后随着酶解时间的延长增长趋于平缓,4.0 h时提取率达到0.34%,再增加酶解时间浸提效率没有增加,因此4.0 h为银杏叶酶解的最佳时间。

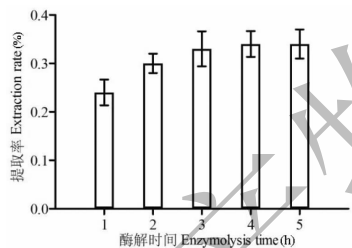


图4 酶解时间对银杏叶总萜内酯化合物提取率的影响

Fig. 4 Effect of enzymolysis time on the extraction rate of total lactones in *G. biloba* extract

### 3.2.4 酶解温度对银杏叶总萜内酯提取率的影响

图5是温度对银杏叶总萜内酯提取率的影响。从该图可知,在低于50℃区间,随着酶解温度升高,

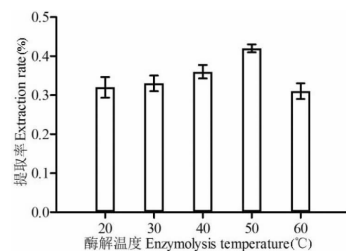


图5 酶解温度对银杏叶中总萜内酯提取率的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the extraction rate of total lactones in *G. biloba* extract

总萜内酯提取率升高,在50℃时,总内酯提取率达到最大值0.42%;当温度超过50℃,达到60℃时,总萜内酯提取率急剧下降至0.31%。因此,选择50℃为银杏叶酶解的最佳温度。

### 3.2.5 酶解 pH 值对银杏叶总萜内酯提取率的影响

图6是pH对银杏叶总萜内酯提取率的影响。从该图可知,在pH为4时,总萜内酯提取率最高,达到0.54%;低于或高于pH4,总萜内酯提取率均急剧降低。说明过高或过低的pH值都会降低酶的活力。因此,选择pH值4.0作为酶解的最适pH值。

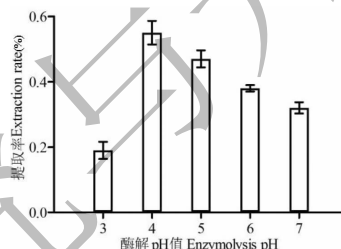


图6 酶解 pH 值对银杏叶总萜内酯化合物提取率的影响

Fig. 6 Effect of pH value on the extraction rate of total lactones in *G. biloba* extract

## 3 讨论与结论

通过银杏叶酶预处理单因素实验得出,银杏叶总萜内酯提取最佳条件为复合酶(纤维素酶:果胶酶=1:1)、酶用量为银杏叶的1/300、酶解时间为4.0 h、酶解温度为50℃、初始pH值为4.0。在上述条件下银杏叶总萜内酯提取率为0.55%。研究表明复合酶在对银杏叶进行酶解预处理过程中表现出协同作用,能更好的破坏银杏细胞壁,有效促进细胞内成分浸出。研究获得的银杏叶提取物中总内酯含量达8.96%。其总萜内酯含量高于银杏叶提取物国际商务标准(银杏叶提取物中总萜内酯含量 $\geq 6\%$ ),这是由于首先,本研究采用酶解预处理,提高了有效成分的溶出;其次,根据极性相似相溶原理,在酶法预处理后采用20%乙醇溶液对总萜内酯进行提取;最后,通过吸附类数脂(LX-5大孔数脂)对总萜内酯进行富集,除去杂质,从而提高了提取物中总萜内酯含量。

酶解预处理法提取中草药中的有效成分具有特异性强、条件温和可控、提取时间短、提取效率高等诸多优点已经引起国内外研究人员广泛关注,虽然

该方法引入的纤维素酶、果胶酶能将组成细胞壁的纤维素骨架降解成葡萄糖、果胶、果胶酸等物质,增加了提取物纯化的难度,但是通过 LX-5 型大孔吸附树脂对提取液进行纯化仍可获得高萜内酯含量的银杏叶提取物。研究为生产高质量银杏叶提取物,开发银杏叶深加工产品提供了理论依据,提高了银杏叶提取物研制水平,促进了银杏产业发展。

## 参考文献

- 1 Wang SJ(汪素娟),Kang A(康安),Di LQ(狄留庆),*et al.* Progress in pharmacokinetic study on main active ingredients of *Ginkgo biloba* leaf extract[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2013,44:626-631.
- 2 Zhang QQ(张群群),Li HF(李慧芬),Zhang XL(张学兰),*et al.* Simultaneous determination of four terpene lactones in *Ginkgo Semen* from different growing areas by HPLC-ELSD[J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药),2016,38:133-136.
- 3 Wu H(吴昊),Zong ZM(宗志敏),Li XX(李秀秀). Extraction of flavonoids and ginkgolide B from *Ginkgo biloba* by ultrasonic wave and microwave synergistic technology[J]. *China Brew* (中国酿造),2016,35:153-156.
- 4 Singh B,Kaur P,Gopichand,*et al.* Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*[J]. *Fitoterapia*,2008,79:401-418.
- 5 Zhou GS(周桂生),Yao X(姚鑫),Yu TP(唐于平),*et al.* Study on chemical constituents of *Ginkgo biloba* Kernel[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志),2012,47:1362-1366.
- 6 Bruce JD,Mary RB. *Ginkgo biloba* indications, mechanisms, and safety[J]. *Psychiatr Clin North Am*,2013,36:73-83.
- 7 Guo RX(郭瑞霞),Li Z(李鹭),Li LG(李力更),*et al.* Historical story on natural medicinal chemistry of ginkgolides [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2013,44:641-645.
- 8 Stromgaard K,Nakanishi K. Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba* [J]. *Angew Chem Int*,2004,43:1640-1658.
- 9 Boonkaew T,Camper ND. Biological activities of *Ginkgo* extracts[J]. *Phytomedicine*,2005,12:318-323.
- 10 Beek TA. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts[J]. *J Chromatogr A*,2002,967:21-55.
- 11 Zhang W(张伟),Zhang HX(张焕新),Shi S(施帅),*et al.* Research on extraction technology of flavonoids from *Ginkgo biloba*[J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发),2014,35(7):48-51.
- 12 Hu XP(胡选萍),Zhang XJ(张晓娟),Ren PB(任鹏斌),*et al.* Effects of different hormones on flavonoids accumulation in *Ginkgo biloba* Callus[J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药),2015,37:2787-2790.
- 13 Valjamae P. The kinetics of cellulose enzymatic hydrolysis: implications of the synergism between enzymes[D]. Sweden: Uppsala University,2002:3-25.
- 14 Dong XY(董孝元),Fang DF(方冬芬),Yang M(杨梅),*et al.* Extraction and antioxidant activity of *Asparagus* flavonoids [J]. *Food Sci* (食品科学),2014,35(6):17-23.
- 15 Wu Q(吴琼),Yu SY(于淑艳),Zou XF(邹险峰),*et al.* Ultrasonic-assisted pectinase extraction of polysaccharide from *Auricularia polytricha*[J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发),2014,35(10):33-36.
- 16 Cui W(催玮),Zhang Y(张勇),Gao HN(高海宁),*et al.* Optimization of pectinase-assisted extraction of proanthocyanidin from *Cynomorium songaricum* Rupr. using response surface methodology [J]. *Food Sci* (食品科学),2016,37(14):18-32.
- 17 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部). Beijing:China Medical Science Press,2015,Vol I:416-417.