

银杏叶多酚的机械力辅助提取及其体外抗氧化活性研究

丁立好¹, 黄彬¹, 何敏¹, 陈小明^{1,2}, 罗小芳^{1,2}, 王宗成^{1,2*}

¹湖南科技学院化学与生物工程学院; ²湖南省银杏工程技术研究中心, 永州 425199

摘要:为优化银杏叶多酚提取工艺,通过单因素试验考察填充率、球磨转速、球磨时间、乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间七个因素对机械力辅助提取银杏叶多酚得率的影响,以银杏叶多酚得率为响应值,采用 Box-Behnken 三因素三水平响应面设计优化工艺,同时比较了4种提取方法对银杏叶多酚提取得率和抗氧化活性的差异。结果表明,机械力辅助提取银杏叶多酚的最佳工艺条件为:填充率26%、球磨转速为400 rpm、球磨时间为15 min。在此条件下,银杏叶多酚的得率为7.33%。机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚得率低于碱水提取法,但是抗氧化活性高于碱水法提取的银杏叶多酚;抗氧化活性与乙醇回流法提取的银杏叶多酚相当,但是提取得率高于乙醇回流法。此提取工艺高效可行,具有一定的参考价值。

关键词:银杏叶多酚;机械力辅助提取;响应面分析法;抗氧化活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)7-1147-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.7.005

Mechanically assisted extraction and antioxidant activity *in vitro* of polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves

DING Li-Hao¹, HUANG Bin¹, HE Min¹, CHEN Xiao-ming^{1,2}, LUO Xiao-fang^{1,2}, WANG Zong-cheng^{1,2*}

¹College of Chemical and Biological Engineering, Hunan University of Science and Engineering;

²Hunan Provincial Engineering Research Center for *Ginkgo biloba*, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China

Abstract: To optimize the extraction process, polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves was extracted with the mechanically assisted extraction method. Through single factor experiment, the effect of filling rate, ball milling speed, ball milling time, ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction temperature and extraction time on the yield of polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves was examined. Box-Behnken three factors three levels experiment by response surface design was carried out. Besides, the differences of extraction rate and antioxidant activity of polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves by four extraction methods were compared. Results showed that the optimum extraction conditions of mechanically assisted extraction of polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves were filling rate 26%, ball milling speed 400 rpm and ball milling time 15 min. Under these conditions, the yield of polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves was 7.33%. The extraction yield of polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves by mechanically assisted ethanol extraction method was lower than that extracted by alkaline water extraction method, but the antioxidant activity was higher than that extracted by alkaline water extraction method. The antioxidant activity of polyphenols of *Ginkgo biloba* leaves by mechanically assisted ethanol extraction method was similar to that extracted by ethanol reflux extraction method, but the extraction rate was higher than that by ethanol reflux extraction method. The extraction process was efficient, feasible and worth using for reference.

Key words: polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves; mechanically assisted extraction; response surface method; antioxidant activity

银杏叶,具有活血化瘀,敛肺平喘,化浊降脂的功效^[1,2],常用于肺虚咳喘,胸痹心痛,高脂血症等疾病^[3,4]。银杏叶中含有十分复杂的化学成分,据不完全统计,从银杏叶中分离提取出来的化合物有140多种,其中主要的药效成分是银杏黄酮为代表

收稿日期:2019-03-08 接受日期:2019-06-04

基金项目:湖南省自然科学基金(2018JJ2146);湖南省科技厅重点研发计划(2016NK2098);湖南省普通高等院校校企合作创新创业教育基地项目(2018-380);湖南科技学院科研项目(17XKY009)

*通信作者 Tel:86-746-6381164; E-mail:wangzongche@163.com

的多酚类物质和萜内酯化合物^[5,6]。多酚类物质具有抗炎、抗病毒、抗菌、抗癌以及降血脂等多种生物活性^[7,8],此外多酚类物质中有很多的邻位酚羟基,具有捕获活性氧等自由基的能力,所以银杏叶多酚具有较强的抗氧化活性和清除自由基的能力^[9],是一类很有开发前景的天然有效抗氧化剂。多酚的提取方法主要有有机溶剂回流提取、微波辅助提取、超临界流体萃取、超声波辅助提取等方法^[10]。常用甲醇、乙醇、盐酸水溶液、NaOH 水溶液等为溶剂,提取银杏叶中多酚等有效成分^[11-15],然而当前这些提取方法存在提取效率不高,可能破坏有效成分等不足,为了寻求一种高效提取,同时较少对银杏多酚破坏的提取方法,本文研究用机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚的工艺,并比较了机械力辅助乙醇提取、酸水提取、碱水提取和乙醇回流提取的提取效果和提取的银杏叶多酚抗氧化活性差异,以期找到一种高效提取和对有效成分破坏小的提取方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料及仪器

银杏叶:于2017年9月采自湖南科技学院校园内的银杏树,清洗干净并于40℃下烘箱中烘干,然后用高速粉碎机粉碎,过40目筛得细粉备用。

试剂:没食子酸、无水碳酸钠、无水乙醇、DPPH、ABTS、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)等为AR分析纯;福林酚试剂为BR生化试剂。

电子天平:TE124S型,赛多利斯科学仪器有限公司;行星球磨仪:Pulverisette 6,不锈钢球磨罐250 mL,不锈钢球磨珠10 mm,德国Fritsch公司;分光光度计:UV2800S型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚

取银杏叶干燥粉末30.0 g,采用行星球磨仪球磨一定时间,取5.0 g细粉末加至圆底烧瓶中,用乙醇溶液加热提取,过滤得提取液,并用50%乙醇定容到100 mL,作为银杏叶多酚提取液,并精密量取1.0 mL提取液用蒸馏水稀释1 000倍得到银杏叶多酚提取待测液。

1.2.2 多酚含量测定

参考文献^[12],采用福林酚法测定银杏叶多酚提取待测液的多酚浓度*c*,计算得率。

$$\text{银杏叶多酚的得率} = \frac{c \times N \times V}{m} \times 100\%$$

*c*代表待测液中多酚的浓度;*N*代表提取液到待测液稀释的倍数,1 000;*V*表示定容的体积;*m*表示银杏叶粉末质量。

1.2.3 机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚的单因素试验

研究球磨过程的工艺条件时,固定提取条件:乙醇浓度50%、料液比1:10、70℃提取1 h,依次考察填充率(以研磨介质与空腔的体积比为10%、20%、30%、40%、50%)、球磨转速(200、300、400、500、600 rpm)和球磨时间(5、10、15、20、25 min)对多酚得率的影响;研究提取过程中的工艺条件时,固定球磨条件:填充率20%、球磨转速300 rpm,球磨时间15 min,依次考察乙醇浓度(30%、40%、50%、60%、70%)、料液比(1:6、1:8、1:10、1:12、1:14)、提取温度(40、50、60、70、80℃)和提取时间(40、60、80、100、120 min)对多酚得率的影响。

1.2.4 机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚工艺条件优化

在单因素试验基础上,以银杏叶多酚得率为响应值,选取影响较大的因素为自变量,进行响应面中心组合试验,确定较佳工艺条件。

1.2.5 提取方法对比

1.2.5.1 机械力辅助乙醇提取

按照1.2.4中优化的较佳工艺条件,采用机械力辅助乙醇提取获得提取液,定容测定多酚含量,并计算多酚得率。

1.2.5.2 酸水提取

以3%的盐酸溶液为溶剂,料液比1:10,加热至80℃,提取2 h,得到提取液^[13],调至中性后,定容测定多酚含量,并计算多酚得率。

1.2.5.3 碱水提取

以pH值为10.0的NaOH溶液为溶剂,料液比1:40,加热至95℃,提取1 h,得到提取液^[14],调至中性后,定容测定多酚含量,并计算多酚得率。

1.2.5.4 乙醇回流提取

以35%的乙醇为溶剂,料液比1:40,加热至70℃,提取2 h,得到提取液^[11],定容测定多酚含量,并计算多酚得率。

1.2.6 抗氧化活性研究

将四种提取方法获得的提取液稀释成不同浓度,进行抗氧化活性测定。

1.2.6.1 银杏叶多酚DPPH清除能力的测定

参考文献^[16],以BHT作为对照,测定四种提取

方法获得的多酚提取液的 DPPH 清除能力, DPPH 的清除率按下列公式计算。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\%$$

A_0 代表不加银杏叶多酚的吸光度; A_i 为测定液的吸光度; A_j 为银杏叶多酚的本体的吸光度。

1.2.6.1 银杏叶多酚 ABTS 清除率的测定

参照文献^[17], 以 BHT 作为对照, 测定四种提取方法获得的多酚提取液的 DPPH 清除能力, ABTS 的清除率按下列公式计算。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\%$$

A_0 为不加银杏叶多酚的吸光度; A_i 为样品的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 填充率对得率的影响

如图 1 所示, 多酚的得率随填充率的增大呈先上升后下降的趋势, 填充率在 30% 时多酚得率最大, 填充率大于 30% 后显著下降, 因为随球磨填充率增加, 球磨效果提升, 但是当填充率过大时, 磨球运动空间减小, 球磨效果反而减小^[18]。故宜选填充率为 30% 左右。

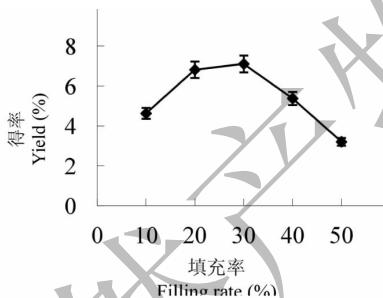


图 1 填充率对得率的影响

Fig. 1 Effect of filling rate on the yield

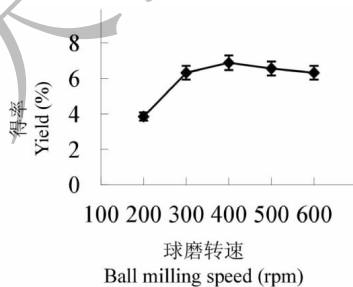


图 2 球磨转速对得率的影响

Fig. 2 Effect of ball milling speed on the yield

2.1.2 球磨转速对得率的影响

如图 2 所示, 多酚的得率随球磨转速的增大先显著增大, 超过 400 rpm 后多酚的得率变化不明显, 因为随球磨转速增加, 球磨效果提升, 但是球磨转速过快时, 产生过多能量, 可能会使体系温度过高, 破坏有效成分^[18], 所以球磨转速 400 rpm 为宜。

2.1.3 球磨时间对得率的影响

如图 3, 多酚的得率随球磨时间的增大逐渐增大。球磨时间超过 15 min 后, 得率趋向于稳定。球磨时间太长, 由于塑性变形的产生, 颗粒便不会再被磨细, 因此没必要延长研磨时间, 而且球磨时间过长产生过多能量, 可能会使体系温度过高, 破坏有效成分^[18]。宜选球磨时间 15 min。

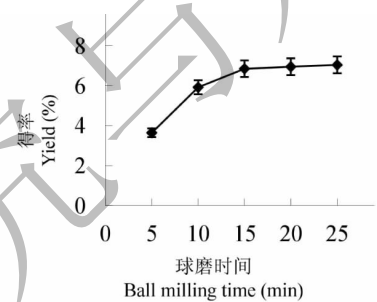


图 3 球磨时间对得率的影响

Fig. 3 Effect of ball milling time on the yield

2.1.4 乙醇浓度对得率的影响

由图 4 知, 随乙醇浓度的增大, 多酚的得率呈递增趋势。乙醇浓度为 60% 时, 多酚的得率最大, 小于 60% 时, 多酚的得率逐渐增大, 大于 60% 时有下降的表现。因此选择乙醇浓度 60%。

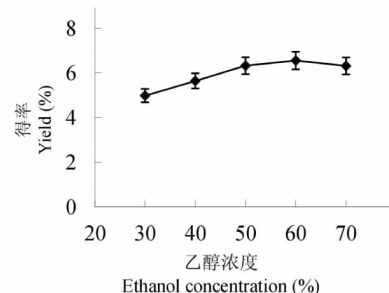


图 4 乙醇浓度对得率的影响

Fig. 4 Effect of ethanol concentration on yield

2.1.5 料液比对得率的影响

如图 5 可以看出, 多酚的得率随着料液比的增大呈现递增趋势, 料液比为 1:10 时, 接近于稳定。考虑到溶剂过大, 加热成本增加, 提取设备容积也需要更大, 为了节省成本, 选取料液比 1:10 为宜。

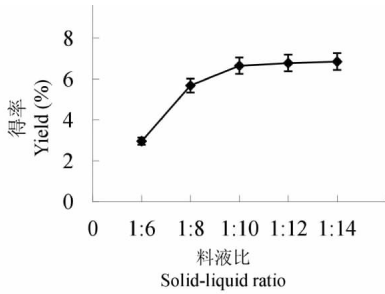


图5 料液比对得率的影响

Fig. 5 Effect of solid-liquid ratio on the yield

2.1.6 提取温度对得率的影响

如图6所示,60℃时多酚的得率最大,温度低于60℃多酚的得率有一个上升趋势,这是由于温度较低时,提取不完全。温度大于60℃得率呈缓慢下降的趋势,可能由于高温会破坏成分的化学结构从而使得率下降。因此选择提取温度60℃。

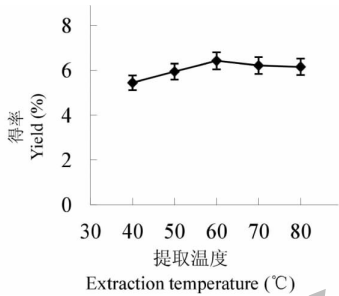


图6 提取温度对得率的影响

Fig. 6 Effect of extraction temperature on yield

2.1.7 提取时间对得率的影响

从图7可以看出,提取时间对得率影响并不明显。提取时间小于60min得率随时间的增大缓慢上升。提取时间大于60min多酚的得率有减少趋势,可能是由于提取时间过长,成分结构被破坏导致收率下降。为了节约时间,宜选提取时间为60min。

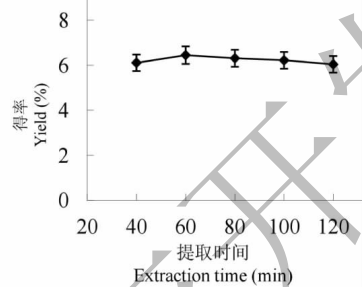


图7 提取时间对得率的影响

Fig. 7 Effect of extraction time on yield

2.2 响应面设计试验结果及其分析

2.2.1 设计方案及试验结果

对单因素试验结果分析,由于料液比大于等于1:8后,乙醇浓度、提取时间和提取温度对银杏叶多酚的得率影响不明显,可见球磨阶段对银杏叶多酚得率的影响较大,因此固定乙醇浓度60%、料液比1:10,60℃提取1h,选择球磨阶段填充率、球磨转速和球磨时间3个因素进行响应面优化银杏叶多酚提取工艺,具体因素及水平见表1,试验设计及结果见表2。

表1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the response surface design

因素 Factors	水平 Level		
	-1	0	1
A 填充率 Filling rate (%)	20	30	40
B 球磨转速 Ball milling speed (rpm)	300	400	500
C 球磨时间 Ball milling time (min)	10	15	20

表2 响应面法试验设计及结果

Table 2 The experimental design and results of response surface method

试验号 No.	A 填充率 Filling rate (%)	B 球磨转速 Ball milling speed (rpm)	C 球磨时间 Ball milling time (min)	得率 Yield (%)
1	-1	-1	0	6.58
2	1	-1	0	5.95
3	-1	1	0	6.58
4	1	1	0	6.28

续表 2 (Continued Tab. 2)

试验号 No.	A 填充率 Filling rate (%)	B 球磨转速 Ball milling speed (rpm)	C 球磨时间 Ball milling time (min)	得率 Yield (%)
5	-1	0	-1	7.01
6	1	0	-1	6.62
7	-1	0	1	7.08
8	1	0	1	6.62
9	0	-1	-1	6.29
10	0	1	-1	6.48
11	0	-1	1	6.38
12	0	1	1	6.35
13	0	0	0	7.24
14	0	0	0	7.21
15	0	0	0	7.31
16	0	0	0	7.28
17	0	0	0	7.25

2.2.2 数据模型的建立和分析

根据响应面试验数据,采用软件 Design-Expert 8.0.6 进行多元回归拟合,得到银杏叶多酚得率(Y)对试验因素的二次多项回归方程为: $Y = 7.26 - 0.22A + 0.061B + 0.00375C + 0.083AB - 0.018AC - 0.055BC - 0.23A^2 - 0.68B^2 - 0.20C^2$ 。

方程中各项系数绝对值的大小直接反映各因素对响应值的影响程度,系数的正、负反映了影响的方向。方程中的二次项系数为负值,得知抛物面的开

口向下,成倒 V 字形,每个面上,存在一个最大值,因此可推测出最优提取条件。由方程的一次项可得出,影响银杏叶多酚得率因素的主次顺序为:填充率 > 球磨转速 > 球磨时间。

2.2.3 回归模型的方差分析

为了检验回归方程的有效性,进一步确定各因素对总得率的影响程度,对回归模型进行了方差分析,结果见表 3。

表 3 响应曲面回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance of response surface regression equation

方差来源 Source of variation	平方和 Quadratic sum	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Patterns	2.99	9	0.33	197.09	< 0.000 1	**
A	0.40	1	0.40	234.85	< 0.000 1	**
B	0.030	1	0.030	17.80	0.003 9	**
C	1.125×10^{-4}	1	1.125×10^{-4}	0.067	0.803 6	
AB	0.027	1	0.027	16.14	0.005 1	**
AC	1.225×10^{-3}	1	1.225×10^{-3}	0.73	0.422 3	
BC	0.012	1	0.012	7.17	0.031 6	*
A^2	0.22	1	0.22	128.09	< 0.000 1	**
B^2	1.97	1	1.97	1 168.10	< 0.000 1	**
C^2	0.17	1	0.17	98.87	< 0.000 1	**
残差 Residuals	0.012	7	1.686×10^{-3}			
失拟项 Lack of Fit	5.925×10^{-3}	3	1.975×10^{-3}	1.34	0.378 8	
纯误差 Pure Error	5.880×10^{-3}	4	1.470×10^{-3}			
总和 Sum	3.00	16				
$R^2 = 0.996 1$	$R^2_{adj} = 0.991 0$					

注: ** $P < 0.01$ 为极显著; * $P < 0.05$ 为显著。

Note: ** $P < 0.01$ Highly Significant; * $P < 0.05$ Significant.

结果显示,模型的显著性 $P < 0.0001$, 是极显著的,说明模型是有意义的,失拟项 > 0.05 , 不显著,说明模型与试验的差异值较小, $R^2_{adj} = 0.9910$, 说明该模型能解释 99.10% 的响应值的变化,相关系数 $R^2 = 0.9961$, 说明该模型拟合程度良好,预测值与实测值之间有良好的相关性,试验误差较小,可以用回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析和预测。 P_A 、 P_B 、 P_{AB} 、 P_{A_2} 、 P_{B_2} 和 P_{C_2} 均小于 0.01, P_{BC} 小于 0.05, 说明填充率和球磨转速的一次项、填充率与球磨转速的交互项、球磨转速和球磨时间的交互项、以及三个因素的二次项均存在显著性,由表中的 P 值可以看出,填充率对银杏叶多酚得率的影响最大,其次是球磨转速,球磨时间对银杏叶多酚得率的影响不显著。

2.2.4 响应面分析

通过 Design-Expert 8.0.6 软件模拟三因素之间的等高线图,如图 8~10,从等高线图可以看出,各个因素对银杏叶多酚得率的影响程度。等高线的形状可以反映两因素间交互作用的强弱,圆形表示两因素间交互作用较弱,椭圆表示两因素间交互作用较强^[19],图 8 的等高线是椭圆形,说明填充率和球磨转速的交互作用较大。

2.2.5 提取条件的优化

用 Design-Expert 8.0.6 软件选择逐步回归方法对二次多项式回归方程做进一步优化,由以上试验的结果分析,银杏叶多酚的最佳的提取工艺是填充率 26.10%、球磨转速为 400.28 rpm、球磨时间为 15.14 min,结合实际情况最佳工艺条件修订为:填充率 26%、球磨转速为 400 rpm、球磨时间为 15 min。

2.3 提取方法比较

如表 4 所示,4 种提取方法得率之间都具有显著性差异,机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚的得率

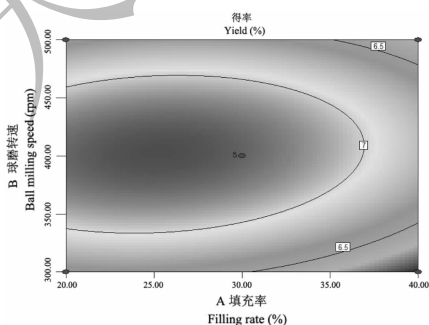


图 8 填充率和球磨转速的等高线图

Fig. 8 Contour plot of filling rate and ball milling speed

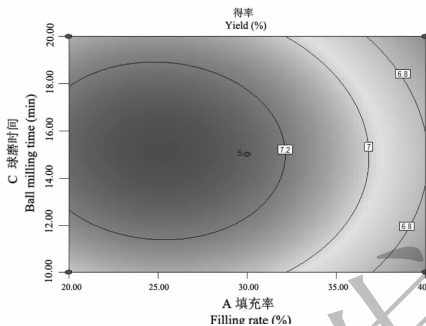


图 9 填充率和球磨时间的等高线图

Fig. 9 Contour plot of filling rate and ball milling time

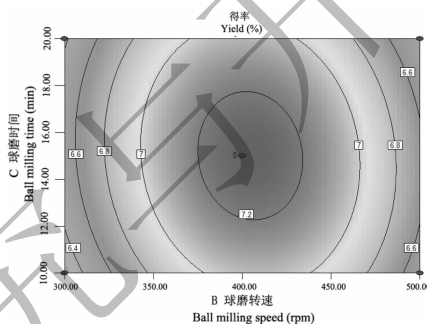


图 10 球磨转速和球磨时间的等高线图

Fig. 10 Contour plot of Ball milling speed and ball milling time

为 7.33%, 低于碱水提取银杏多酚,但高于酸水提取法和乙醇回流提取法,因为银杏叶多酚显一定的酸性,易溶于碱性溶液,因此碱水提取法收率最高;由于机械力对银杏叶的球磨破碎作用,导致细胞壁的破碎,有利于有效成分的提取出来,因此机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚高于乙醇回流提取法。

2.4 抗氧化活性研究

2.4.1 银杏叶多酚的 DPPH 的清除能力

如图 11,银杏叶多酚对 DPPH 的清除能力强于 BHT,并且与浓度呈正相关。比较四种提取方法获得的银杏叶多酚对 DPPH 清除能力,可知机械力辅助乙醇提取和乙醇回流提取获得的银杏叶多酚对 DPPH 清除能力相当,酸水提取的银杏叶多酚次之,碱水提取的银杏叶多酚活性最差,原因可能为采用酸碱水溶液提取银杏叶多酚对多酚有破坏作用,机械力辅助乙醇提取法和乙醇回流提取法相比较,条件更温和,活性更佳。

2.4.2 银杏叶多酚的 ABTS 的清除能力

如图 12,银杏叶多酚对 ABTS 的清除能力强于 BHT,并且与浓度呈正相关。比较四种提取方法获得的银杏叶多酚对 ABTS 清除能力,可知机械力辅助乙醇提取和乙醇回流提取获得的银杏叶多酚对

表 4 不同提取方法的银杏叶多酚得率

Table 4 The yield of polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves by different extraction methods

序号 No.	机械力辅助乙醇提取 MAE method (%)	酸水提取 AcW method (%)	碱水提取 AIW method (%)	乙醇回流提取 ER method (%)
1	7.25	6.78	7.54	6.58
2	7.39	6.86	7.68	6.42
3	7.36	6.91	7.72	6.39
平均得率 Average yield	7.33 ^b	6.85 ^c	7.65 ^a	6.46 ^d

注:同行中不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same line indicate significant difference ($P < 0.05$).

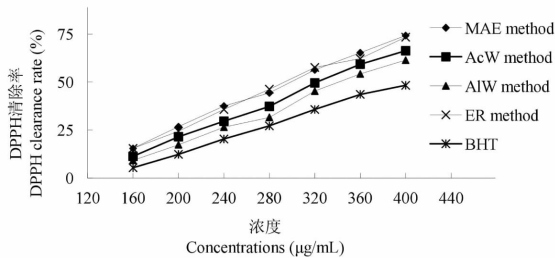


图 11 不同浓度的银杏叶多酚和 BHT 的 DPPH 清除能力

Fig. 11 DPPH clearance rate of different concentrations of polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves and BHT

ABTS 清除能力相当,并且机械力辅助乙醇提取法活性略高,酸水提取的银杏叶多酚活性稍差,碱水提取的银杏叶多酚活性最差,原因可能为采用酸碱水溶液提取银杏叶多酚对多酚有破坏作用,机械力辅助乙醇提取法和乙醇回流提取法相对来说,条件更加温和,且机械力辅助乙醇提取法温度稍低、提取时间稍短,活性更佳。

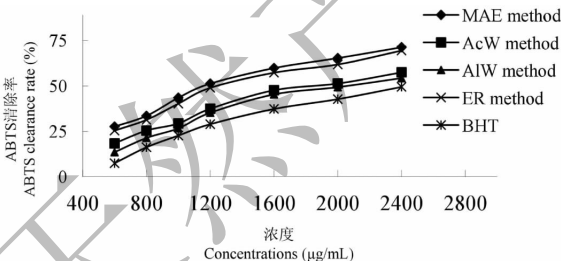


图 12 不同浓度的银杏叶多酚和 BHT 的 ABTS 清除能力

Fig. 12 ABTS clearance rate of different concentrations of polyphenols from *Ginkgo biloba* leaves and BHT

3 结论

本文通过单因素试验和响应面法优化了银杏叶多酚的机械力辅助乙醇提取工艺条件,采用 Box-Behn 设计方案建立的二次多项数学模型能较准确的预测机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚的得率,得出机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚的最佳提取工艺

为填充率 26%、球磨转速为 400 rpm、球磨时间为 15 min。在此条件下,银杏叶多酚的得率为 7.33%,与文献^[12]相比,得率明显高于报道的 6.34%,并且不需要用到有毒溶剂甲醇进行提取。

比较了四种提取方法对银杏叶多酚提取的得率和抗氧化活性差异,机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚得率低于碱水法提取,但是抗氧化活性高于碱水法提取的银杏叶多酚;抗氧化活性与乙醇回流法提取的银杏叶多酚相当,但是提取得率高于乙醇回流法。与文献^[11-14]相比,机械力辅助乙醇提取银杏叶多酚具有提取时间较短、温度较低、不需要用到甲醇等有毒溶剂、不易对有效成分产生破坏、提取效率高优点,对银杏叶多酚的应用开发具有一定的指导意义。

参考文献

- 1 Yang Y, Zhou B, Zhao WJ. *Ginkgo biloba* leaves history: a model of research and development for Chinese materia medica/phytomedicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 2579-2591.
- 2 He FL, Chen XM, Zhang R, et al. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* Linn[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1141-1147.
- 3 Zhu XY, Mang YL, Xie J, et al. Response surface optimization of mechanochemical-assisted extraction of flavonoids and terpene trilactones from *Ginkgo* leaves[J]. Ind Crop Prod, 2011, 34: 1041-1052.
- 4 Li L, Yan XY. Study on the optimization of ultrasonic assisted extraction and stability of pigments obtained from leaves of *Ginkgo biloba* L. [J]. Food Mach (食品与机械), 2017, 33: 179-183.
- 5 Wang SJ, Kang A, Di LQ, 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.

- 6 Ni LJ, Yan WT, Zhang LG. Effects of flavonoid content in *Ginkgo biloba* leaves on macroporous resin purification process of *Ginkgo biloba* extract[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:2097-2103.
- 7 Lin YJ, Zhao P, Wang Y. Progress of the extraction methods and biological activities of plant polyphenols[J]. Shanxi Agric Sci(陕西农业科学), 2009, 55:105-107.
- 8 Zuo LL, Wang ZY, Fan ZL, et al. Progress research of plant polyphenols and functions [J]. Forest By-Prod Spec China(中国林副特产), 2012, 5:39-43.
- 9 Guo PP, Zhang XJ, Ma YZ, et al. Effects of antioxidation and antibacterial activities of polyphenols from *Ginkgo* fruit sarcotesta separation by macroporous resin[J]. Hubei Agric Sci(湖北农业科学), 2018, 57(11):75-78.
- 10 Feng L, Song SH, Zhao L, et al. Progress on plant polyphenol and the extract methods[J]. Food Nutr China(中国食物与营养), 2007, 10:39-41.
- 11 Zhang CS, Tian Y, Zhang P, et al. Orthogonal experimental design optimization study of *Ginkgo biloba* polyphenols extraction conditions [J]. Farm Prod Proc(农产品加工), 2017, 5:34-36.
- 12 Wang TY, Qiu YX, Wang JL, et al. Optimisation of extraction conditions for polyphenols from the leaves of *Ginkgo biloba* by response surface methodology and their inhibition on soil urease activity [J]. Chem Res Appl(化学研究与应用), 2013, 25:999-1005.
- 13 Yang Y, Zhou B, Zhao WJ. Analysis and consideration on *Ginkgo Folium* event [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47:2397-2407.
- 14 Liu JX, Wang SX, Fan QS. Study on total *Ginkgo biloba* flavonoids extraction with alkali-solution and acid-isolation[J]. Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2008, 36:11386-11388.
- 15 Wang Y. Application of mechanical force method in extraction of plant active components[D]. Dalian: Liaoning Normal University(辽宁师范大学), 2008.
- 16 Shao JH, Ma YQ, He FL, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharide from *ardisia mamillata* and the evaluation of its antioxidant activity [J]. Food Mach(食品与机械), 2016, 32:166-169.
- 17 Wu HT, Zhang YZ, Huang LS, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of polyphenols in *Acalypha wilkesiana* leaves [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:944-950.
- 18 Yu JB, Wang YY, Su WK. Optimization of mechanically assisted extraction of phenolic compounds in *Senecio scandens* Buch.-Ham. by response surface methodology [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2017, 38:215-222.
- 19 Yang CH, Zhao DQ, Wang DH, et al. Response surface optimized extraction of protein from *Lycium ruthenicum* Murr. and anti-aging activity research [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2019, 40:98-104.
- 20 Wang X, Bai H, Zhang X, et al. Inhibitory effect of oleanolic acid on hepato-cellular carcinoma via ERK-p53-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptosis [J]. Carcinogenesis, 2013, 34:1323-1330.
- HepG2 cell [J]. Central South Pharmacy(中南药学), 2019, 17:399-404.
- 19 Mohammad GI, Alam K, Nawaz MI, et al. Mutual enhancement between high-mobility group box-1 and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species mediates diabetes-induced upregulation of retinal apoptotic markers [J]. J Physiol Biochem, 2015, 71:359-372.
- 20 Wang X, Bai H, Zhang X, et al. Inhibitory effect of oleanolic acid on hepato-cellular carcinoma via ERK-p53-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptosis [J]. Carcinogenesis, 2013, 34:1323-1330.

(上接第 1129 页)

- 16 Lu M, Xia L, Hua H, et al. Acetyl-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis through a death receptor 5-mediated pathway in prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2008, 68:1180-1186.
- 17 Li YL, Wang GF, Peng H, et al. Research of inhibitory mechanism of salidroside B on proliferation and metastasis of gastric cancer SNU-1 cells [J]. Chin J Immun(中国免疫学杂志), 2017, 33:1815-1827.
- 18 Mu W, Cheng XF, Zhang X, et al. Effect of hinokiflavone on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma