

· 中药工业 ·

复合酶法优化提取银杏叶总黄酮的工艺研究[△]李凤艳¹, 王凯², 朱鹏¹, 孙国平^{1*}

(1. 深圳市坪山区人民医院, 广东 深圳 518118; 2. 河南大学护理与健康学院, 河南 开封 475000)

[摘要] **目的:** 研究纤维素酶/果胶酶/半纤维素酶复合酶解提取银杏叶中黄酮类化合物的最佳工艺条件。**方法:** 以黄酮得率为考察指标, 通过单因素试验及正交试验确定最佳提取工艺。**结果:** 复合酶法提取银杏叶总黄酮的最佳工艺条件为酶用量 0.4%, 酶解温度 40 ℃, 酶解时间 120 min, pH 5.5, 纤维素酶/果胶酶/半纤维素酶的配比 2:3:1 时对银杏叶的细胞组织具有较强的破壁力; 与不加酶相比, 总黄酮提取率提高了 36.6%。**结论:** 采用复合酶法, 可以降低酶的使用量, 提取条件温和, 提高了总黄酮提取率。

[关键词] 银杏叶; 复合酶; 总黄酮; 优化; 提取率

Optimization of Flavonoids Extraction from Ginkgo Biloba Leaves by Compound Enzymatic Method

LI Feng-yan¹, WANG Kai², ZHU Peng¹, SUN Guo-ping^{1*}

(1. Shenzhen Pingshan people's hospital, Shenzhen 518118, China;

2. Nurse care and Healthy management College, Henan University, Henan 475004, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the optimum process conditions of the cellulose enzyme/pectin enzyme/hemicellulase composite enzyme for extracting flavonoids from ginkgo biloba. **Methods:** The flavonoid yield was selected as the examining index, the best extraction process was determined through the single factor experiment and orthogonal experiment. **Results:** The results showed that the temperature of enzymatic hydrolysis was 40 ℃, pH = 5.5, consumption of enzyme dosage was 0.4%, the time of enzymatic hydrolysis was 120 min, ratio of cellulose enzyme/pectin enzyme/hemicellulase was 2:3:1. On this condition, the extraction yield of flavonoids from *G. biloba* leaves was increased by 36.6% compared with the non-using cellulase-assistant technology. **Conclusion:** Compound enzymatic method can reduce the usage of enzyme, improve the flavonoids extraction yield with extraction of mild conditions.

[Keywords] *Ginkgo biloba* leaves; compound enzyme; flavonoids; optimization; extraction yield

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180309005

银杏叶总黄酮具有调节血糖血脂, 增加胰岛素敏感性, 改善肝功能; 能够提高抗氧化能力, 减轻脂质过氧化, 增加抗氧化酶活性的作用; 有效地抑制血小板凝聚, 在抗菌、肿瘤、抗癌和神经系统也有保护作用显示较好的生物活性^[1]。目前, 银杏叶总黄酮的提取工艺主要有传统的水提取、有机溶剂提取和新技术辅助提取法, 如微波辅助提取、超声波辅助提取、闪式提取、超临界流体萃取、酶辅助提取等提取技术^[2-3]。其中, 酶法提取技术近年来受到关注, 与传统提取方法相比, 酶制剂能有效地破坏植物细胞壁的纤维组织, 破坏细胞壁完整性, 加快植物中的成分溶出, 提高生产效率。较多文

献^[4-10]仅探讨某一种酶对总黄酮提取率的影响, 对复合酶的应用也只是简单的组合进行探讨^[11]。因此, 本研究将选择三种酶(纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶)通过正交试验, 以总黄酮提取率为指标, 探讨三种酶组合的配比, 并对组合后的复合酶的最佳提取工艺进行深入研究, 为银杏叶总黄酮的提取工艺改进提供科学依据。

1 材料、试剂与方法

1.1 材料与试剂

银杏叶, 2017年10月采摘于广西壮族自治区桂林, 经中国科学院广西植物研究所宁德生助理研究

[△] [基金项目] 坪山新区卫生系统科研资助项目(201610)

* [通信作者] 孙国平, 主任医师, 研究方向: 中药研究; Tel: (0775)89318331, E-mail: lifengyan2012@yeah.net

员鉴定为正品银杏叶 *Ginkgobiloba*; 芦丁对照品, 购自中国食品药品检定研究院, 纯度为 99.99%; 纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶, 均购自上海金穗生物科技有限公司; 硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、甲醇、乙醇等试剂均为分析纯, 购自西陇化工股份有限公司。

1.2 仪器与设备

T6 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; XS205 型、XS225A-SCS 型赛多利斯电子天平, 北京赛多利斯天平有限公司; HHW-4 数显恒温水浴锅, 上海双捷实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品预处理 采摘后的银杏叶经分选后, 放入烘箱, 于 105 ℃ 杀青 15 min, 后于 70 ℃ 烘干至恒重, 然后放入中草药粉碎机粉碎后过 60 目筛, 即得银杏叶粉末。

1.3.2 对照品制备 精密称取芦丁对照品 2.46 mg, 置于 5 mL 容量瓶中, 加入乙醇超声溶解, 定溶至刻度, 即得对照品溶液。

1.3.3 样品溶液制备 分别精密称 2 g 的银杏叶粉末置于锥形瓶中, 然后加入一定质量的酶和 15 mL 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 在一定温度下酶解一定时间后, 加入 35 mL 无水乙醇于 70 ℃ 水浴中提取 1 h 后, 将提取液过滤, 滤液定溶于 50 mL 容量瓶, 即得样品待测液。

1.3.4 总黄酮的含量测定 分别精密吸取 0.2 mL 样品待测溶液置于 5 mL 容量瓶中, 分别加入 0.2 mL 5% NaNO_2 溶液, 摇匀, 静置 6 min 后加入 0.2 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摇匀, 静置 6 min 后, 再加入 2 mL 4% NaOH 溶液, 摇匀, 用纯水定容, 静置 15 min, 以试剂为空白, 于 504 nm 波长处测定吸光值^[12]。总黄酮提取率按式(1)计算。

提取率(%) = 提取液中总黄酮的含量(mg)/提取所用银杏叶粉末的质量(mg) × 100% (1)

2 结果与分析

2.1 标准曲线建立

分别精密吸取 0.04、0.08、0.12、0.16、0.2、0.3、0.5、0.7 mL 对照品溶液置于 5 mL 容量瓶中, 分别加入 0.2 mL 5% NaNO_2 溶液, 摇匀, 静置 6 min 后加入 0.2 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摇匀, 静置 6 min 后, 再加入 2 mL 4% NaOH 溶液, 摇匀, 用甲

醇定容, 静置 15 min, 以试剂为空白, 于 504 nm 波长处测定吸光值。以芦丁的量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 进行回归分析, 得到回归方程: $Y = 0.0027X - 0.0208$ ($r = 0.9994$), 表明芦丁浓度与吸光度具有良好相关性。

2.2 复合酶配比正交试验

为了确定组成得复合酶(纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶)的配比, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。分别精密称 2 g 银杏叶粉末 9 份, 按表 1 分别加入相应的酶和 15 mL pH 为 4.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 于 50 ℃ 水浴中酶解 1 h, 然后按 1.3.3 项下“加入 35 mL 无水乙醇”进行样品制备。

结果如表 1 所示, 由相关系数 R 值由大小可知影响银杏叶总黄酮提取率的次序为: 纤维素酶 > 果胶酶 > 半纤维素酶, 最佳的试验方案为 $A_2B_3C_2$, 即由纤维素酶: 果胶酶: 半纤维素酶 = 2:3:1 的配比组成的复合酶。

表 1 复合酶配比正交试验结果

试验号	A (纤维素酶)	B (果胶酶)	C (半纤维素酶)	总黄酮提取率 (%)
1	1(2 mg)	1(2 mg)	1(1 mg)	2.62
2	1	2(4 mg)	2(2 mg)	2.66
3	1	3(6 mg)	3(3 mg)	2.72
4	2(4 mg)	1	2	2.82
5	2	2	3	2.94
6	2	3	1	2.93
7	3(6 mg)	1	3	2.70
8	3	2	1	2.64
9	3	3	2	2.97
K1	2.667	2.713	2.73	
K2	2.897	2.747	2.817	
K3	2.77	2.873	2.787	
极差	0.23	0.16	0.087	
主次顺序	A > B > C			
优水平	$A_2B_3C_2$			

由于最佳的配比组合不在实验方案中, 因此进行验证实验, 同时做未加酶的空白对照。结果复合酶法提取银杏叶总黄酮得率为 3.12%, 而空白对照提取率为 2.62%。由此可见, 复合酶能够有效地提高银杏叶总黄酮的提取率。

2.3 复合酶提取工艺优化

影响银杏总黄酮得率的因素主要是复合酶的

用量、酶解时间、酶解温度、酶解溶液的 pH 等,为了探索最佳的提取工艺,进行以下单因素试验。

2.3.1 复合酶用量考察 由图 1 可知,在 pH 为 4.5,温度 50 ℃ 和酶解 2 h 条件下,银杏叶总黄酮得率随着复合酶用量的增加而提高,当复合酶用量大于 0.5% 以后,增涨缓慢,还有下降趋势,因此复合酶用量以 0.5% 为宜。

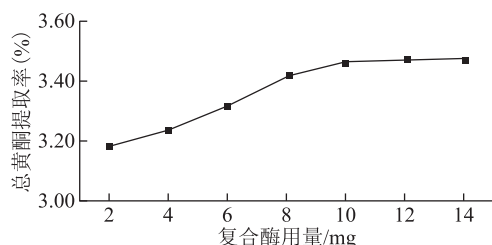


图 1 复合酶用量对黄酮得率的影响

2.3.2 酶解时间的影响 由图 2 可知,银杏总黄酮得率随着酶解时间的增加而增大,但 120 min 以后,总黄酮得率增加放缓。这是因为酶解时间越长,酶反应进行越完全,越有利于总黄酮成分的溶出,使黄酮得率提高。因此,酶解时间以 120 min 为宜。

2.3.3 酶解温度的影响 由图 3 可知,酶解温度在 30 ~ 40 ℃ 时,银杏叶总黄酮得率随着酶解温度上升

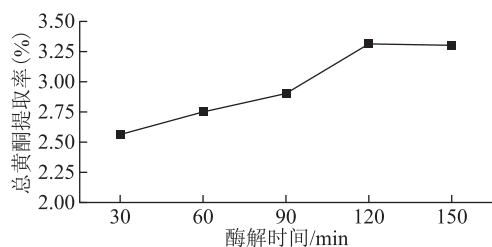


图 2 酶解时间对总黄酮得率的影响

而增加,40 ℃ 达到顶点,随后得率随着温度升高而减低,这由于温度升高,有利于提高酶解反应速度,但同时也会破坏酶的活力。因此,酶温度为 40 ℃ 为宜。

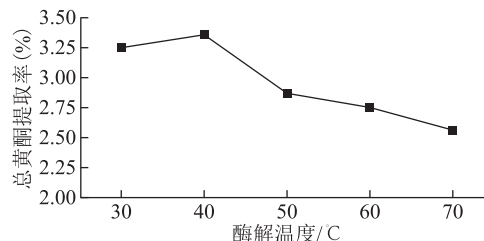


图 3 酶解温度对总黄酮得率的影响

2.3.4 pH 的影响 由图 4 可知,pH 的变化对黄酮得率的影响比较明确,pH 值在 4.0 ~ 5.5 之间,总黄酮得率随着 pH 的上升而提高,但当 pH 超过 5.5 以后,总黄酮得率开始下降,因此适宜的 pH 为 5.5。

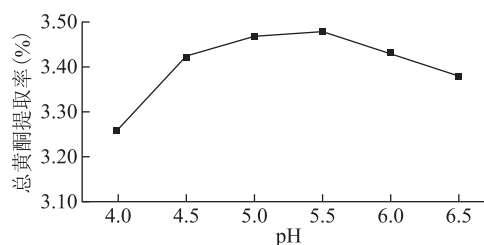


图 4 pH 对总黄酮得率的影响

2.3.5 复合酶提取工艺优化 在上述单因素试验的基础上,选取 4 因素 3 水平 L₉(3⁴) 表头设计,对复合酶用量(0.3%、0.4%、0.5%)、酶解温度(35、40、45 ℃)、酶解时间(90、120、150 min)以及 pH(5.0、5.5、6.0)进行正交实验,以探索各因素的相互作用对银杏叶总黄酮提取率的影响,从而明确复合酶提取工艺的最佳条件。结果如表 2 所示。

表 2 复合酶提取工艺正交实验结果

因素	A(酶用量)	B(酶解温度)	C(酶提时间)	D(pH)	总黄酮提取率(%)
实验 1	1(0.3%)	1(35 ℃)	1(90 min)	1(5.0)	3.152
实验 2	1	2(40 ℃)	2(120 min)	2(5.5)	3.423
实验 3	1	3(45 ℃)	3(150 min)	3(6.0)	3.223
实验 4	2(0.4%)	1	2	3	3.258
实验 5	2	2	3	1	3.546
实验 6	2	3	1	2	3.127
实验 7	3(0.5%)	1	3	2	3.337
实验 8	3	2	1	3	3.235
实验 9	3	3	2	1	3.163
均值 1	3.266	3.249	3.171	3.287	

续表 2

因素	A(酶用量)	B(酶解温度)	C(酶提时间)	D(pH)	总黄酮提取率(%)
均值 2	3.310	3.401	3.281	3.296	
均值 3	3.245	3.171	3.369	3.239	
极差	0.065	0.230	0.198	0.057	
主次顺序	B > C > A > D				
优水平	A2B2C3D2				

由相关系数 R 值和优水平可知,酶法提取银杏叶总黄酮的最佳工艺条件为:酶用量 0.4%,酶解温度 40℃,酶时间 120 min, pH 5.5。但该条件并不在实验组里,因此,进行验证实验,结果银杏叶总黄酮的提取率为 3.58%。由此可见,优化后的提取工艺能够显著提高了银杏叶总黄酮的提取率(3.58%),与不加酶(2.62%)相比,总黄酮提取率提高了 36.6%。

3 讨论

在上述的单因素研究的基础上,结合正交试验分析,表明复合酶对银杏叶总黄酮提取具有增效作用。纤维素酶/果胶酶/半纤维素的配比为 2:3:1 时对银杏叶的细胞组织具有较强的破壁力。进一步的优化研究表明,优化后的提取工艺能够显著提高银杏叶总黄酮的提取率,与不加酶相比,总黄酮提取率提高了 36.6%,而且应用复合酶法,可以降低酶的使用量^[13],提取条件温和。

参考文献

- [1] 刘秀萍,臧恒昌,于洪利,等.银杏叶提取物的研究进展与应用前景[J].药学研究,2014,33(12):721-723.
- [2] 胡春苗,刘晋仙,郭瑞齐,等.银杏叶总黄酮提取纯化技术的研究进展[J].时珍国医国药,2015,26(9):2225-2227.

- [3] 邵婷婷.响应曲面法优化酶法提取银杏叶总黄酮[J].中国现代中药,2016,18(3):396-400.
- [4] 王敏,陆兆新,吕凤霞,等.响应曲面法优化酶法提取银杏叶总黄酮[J].食品科学,2007,28(3):117-121.
- [5] 王蕙,付燕,郎久义,等.酶法及半仿生法提取银杏黄酮的工艺研究[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(2):146-148.
- [6] 赵一璐,许云峰,周建芹,等.内生青霉菌纤维素酶在银杏总黄酮提取中的应用研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):13-17.
- [7] 李超.纤维素酶提取银杏叶总黄酮的工艺优化[J].农业机械,2013(9):94-97.
- [8] 石会军,王文丰,戴余军.银杏叶黄酮酶法提取工艺的优化[J].食品科技,2014,39(10):208-211.
- [9] 李保同,徐永霞,李娟,等.纤维素酶-微波辅助提取银杏叶总黄酮及抗氧化性能研究[J].现代化工,2016,36(3):67-70.
- [10] 王旭,王志,蔡梦宇,等.纤维素酶 Umce19y-1 在银杏叶总黄酮提取中的增效作用[J].安徽农业大学学报,2017,44(1):22-26.
- [11] 张晓娟,赵正栋,张辰露,等.复合酶预处理法对银杏叶总黄酮和总内酯提取率的影响[J].中成药,2018,40(8):1848-1851.
- [12] 薛志彬,承伟.银杏叶黄酮提取工艺的优化[J].安徽农业科学,2011,39(10):5751-5754.
- [13] 李保同,徐永霞,李娟,等.纤维素酶-微波辅助提取银杏叶总黄酮及抗氧化性能研究[J].现代化工,2016,36(3):67-70.

(收稿日期 2018-03-09)

(上接第 1141 页)

- [15] 赵纳,侯大斌,刘向宏.不同炮制方法对附子中乌头总碱和双酯型生物碱含量的影响[J].中药材,2011,34(1):39-41.
- [16] 四川省彰明县概况[M].民国 30 年(1941 年),石印本:40.
- [17] 中国医学科学院防治克山病科研小分队.卤碱的毒性、化学成份及药理作用[J].卫生研究,1973(4):77-89.
- [18] 周林,李飞,任玉珍,等.附子中胆巴含量随浸泡时间的变化趋势研究[J].中华中医药学刊,2013,31(13):42-45.

- [19] 舒晓燕,赵祥升,侯大斌,等.两种炮制方法对附子品质的影响[J].湖北农业科学,2009,48(3):705-706.
- [20] 舒晓燕,赵祥升,侯大斌,等.附子不同贮藏条件下相关品质的变化分析[J].中药材,2009,32(1):29-31.
- [21] 石万银.无胆附片加工工艺及其质量控制研究[D].成都:成都中医药大学,2012.
- [22] 张菊花,张晓艳.探析不同炮制方法对附子药理作用及毒性的影响[J].海峡药学,2008,20(10):89-90.

(收稿日期 2017-12-20)