DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.019
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
1272 2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)14-1272-03

从银杏叶中提取银杏黄酮甙的工艺比较及实验优化

张梦军[1],覃仁辉[2],聂金媛[2],李志良[2] ([1]第三军医大学医学检验系分析化学教研室,重庆 400038;[2]重庆大学化学化工学院分析化学教研室,重庆 400044)

提 要:目的 选择微波辅助提取银杏黄酮甙的最佳条件,并对银杏黄酮甙的微波辅助提取法与常用的热浸泡法进行对比研究。方法 采用热浸泡法及微波辅助法提取银杏黄酮甙,同时对微波法进行正交和均匀实验优化,并用分光光度法测定提取干膏中的黄酮甙含量。结果 正交和均匀实验优化获得的最佳条件下的提取率和黄酮纯度基本相当。正交实验的最佳提取率为212.4 mg/g,纯度为61.9%;均匀实验的最佳提取率为216.2 mg/g,纯度为57.1%。而热浸泡的提取率仅为114.6 mg/g,纯度为40.1%。结论 微波辅助提取法的提取率和产物纯度均有显著提高,结果表明它是一种合适的提取法。

关键词:银杏黄酮甙;微波辅助提取法;均匀设计;正交设计
中图法分类号:R282.71;R284.2 文献标识码:A

Extraction of flavones from leaves of *Ginkgo biloba L.* by microwave technique and optimized by experimental design and optimization

ZHANG Meng-jun[1], QIN Ren-hui[1], NIE Jing-yuan[1], LI Zhi-liang[1]([1]Department of Analytical Chemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Analytical Chemistry College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To select the best condition for microwave-assisted extraction (MAE) of flavones from leaves of *Ginkgo biloba L.* and compare this method with the most conventional extraction way. Methods Both microwave-assisted extraction and theat maceration were adopted for flavones from leaves of *Ginkgo biloba L.*, and the total content was determined by spectrophotometry. Results Under appropriate MAE conditions, both the recovery and purity of total flavones obtained from the experiments by uniform design and the orthogonal design were very similar. The optimal recovery and purity by orthogonal experimental design were 212.4 mg/g and 61.9%, respectively. The optimal results by orthogonal experimental design were 216.2 mg/g and 57.1%, respectively. However, the results by maceration were only 114.6 mg/g and 40.1%, respectively. Conclusion MAE is a more suitable method for the extraction of flavones from leaves of *Ginkgo biloba L.* because of its higher extraction rate and purity.

Key words: *Ginkgo biloba L.* flavone glycoside; microwave-assisted extraction; homogenous/uniform design; orthogonal experimental design

银杏(*Ginkgo biloba L.*)为银杏科银杏属,是侏罗纪的子遗植物[1],基本保持了1.5亿年前的生态特征,被誉为"活化石",为我国的特产植物[2]。银杏叶提取物中主要含黄酮、内酯两大部分活性成分。总黄酮以山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercitrin)、异鼠李素(lsorhamntin)的甙为主;萜内酯则以银杏内酯(ginkgolide A. B. C)和白果内酯(bilodalide)为主。20世纪60年代以来,国内外学者对银杏叶的药理做了大量的研究工作,结果表明银杏叶中的黄酮具有改善心脑血管循环、解痉、抗过敏及调节新陈代谢、抗病毒、抗菌消炎等作用[3],可用于治疗冠心病、心绞痛、早老性痴呆[4]等多种病症,防治皮肤疾病,增强记忆。由于它为纯天然药物,无毒副作用,因此应用范围日益广泛。如临床表明口服银杏叶提取物银可络,对于缓解老年人心绞痛,预防心肌梗死及猝死效果良好[5]。目前,国内大多数银杏叶提取物厂采用高温回流提取法或低温冷泡法

基金项目:教育部春晖计划启动基金资助项目(1999-38);重庆市应用基础基金资助项目(2001-01-15-36)
Supported by the "Chunhui Projects" of State Education Ministry of China (1999-38) and the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (2001-01-15-36)

作者简介:张梦军(1973-),女,湖南省涟源市人,硕士,助教,主要从事药物分析、中药提取和微波化学方面的研究。电话:(023)68752306

收稿日期:2003-12-23;修回日期:2004-03-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

提取银杏黄酮甙, 王成章等[6]对其提取条件进行了比较研究发现其最佳浸提工艺条件为: 浸提剂为 50%～60%EtOH, 液固比为 8∶1～6∶1, 60～70 ℃热浸泡 2 次, 时间分别为 3 h 和 1 h。近年来, 发现微波辅助提取法是一种有效的提取方法[7,8]。本研究旨在通过微波辅助提取法与热浸泡法提取银杏黄酮甙的对比研究, 寻找提取银杏黄酮甙的最佳工艺。

1　材料与方法

1.1　仪器、药材与试药

市售药材银杏叶, 经 FZ102 型微型植物试样粉碎机(湖北省黄骅市中兴仪器有限公司)磨碎, 粉碎室内径 102 mm。95%乙醇为 AR 级, 重庆化学试剂总厂生产。亚硝酸钠为三级, 重庆化学试剂厂; 硝酸铝 $Al(NO_3)_3$ 为 AR 级, 北京化工厂生产; 氢氧化钠为 AR 级, 北京化工厂生产。格兰仕 WP800 型微波炉, 额定功率 800 W(广东格兰仕电器厂有限公司)(已由本实验室自行改装); LD4-2 低速离心机(北京医用离心机厂, Q/IBL001-91 低速离心机); TG328B 光学分析天平(湘仪天平仪器厂); 722 光栅分光光度计(RASTER, 四川仪表九厂); TN-100B 型托盘扭力天平(上海第二天平仪器厂)。

1.2　实验方法

1.2.1　银杏黄酮甙的提取与分离

1.2.1.1　热浸泡法　　称取一定量的银杏叶粉末, 在 60 ℃下, 固液比为 8∶1, 用 50%乙醇浸提 3 h, 在同样条件下再提取 1 次。然后合并滤液, 减压蒸馏浓缩, 得黑褐色干膏。

1.2.1.2　微波辅助提取法　　根据正交设计 $L_{16}(4^4)$ 正交表及因素水平安排的实验条件和四因素 16 水平均匀设计称取一定量的银杏叶粉末, 加 50 ml 相应浓度的乙醇溶液, 在相应功率的微波炉中加热相应的时间, 然后离心分离, 留取上清液, 下层残留物在同样条件下再提取 1 次, 合并提取液, 浓缩至干, 得黑褐色干膏。

1.2.2　银杏黄酮总含量测定

1.2.2.1　标准曲线的绘制　　据文献[9], 精密称取干燥至恒重的芦丁 2.5 mg, 于 25 ml 容量瓶中, 加 30%乙醇溶解, 并稀释至刻度, 精密吸取 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml 置 10 ml 容量瓶中, 用 30%乙醇补充至 5 ml, 加入 0.3 ml $NaNO_2$(1∶20), 摇匀, 放置 5 min 后加入 0.3 ml $Al(NO_3)_3$(1∶10), 6 min 后再加入 2 ml 1 mol/L NaOH, 混匀, 用 30%乙醇稀释至刻度, 10 min 后于波长 510 nm 处进行比色测定, 试剂空白参比。回归方程: Y= 0.896 5X－0.001 403, R= 0.999 8, n= 6。

1.2.2.2　银杏提取物中总黄酮的测定　　精密称取各法提取物, 相当于银杏黄酮 2.5 mg, 置 25 ml 容量瓶中, 加 30%乙醇溶解至刻度, 精密吸取 1.0 ml 至 10 ml 容量瓶中, 按 1.2.2.1 项操作, 然后在 510 nm 长处测定吸收度。从标准曲线上换算出银杏黄酮的含量。

2　结果与讨论

正交实验设计的结果见表 1, 从中可以看出大部分 MAE 法的提取率比热浸泡法的要高。MAE 法第一次提取的 16 号实验中有 12 号实验的提取率和纯度都比热浸泡的要高, 其中以第 15 号实验为最佳。热浸泡的提取率为 114.6 mg/g, 纯度为 40.1%, 而微波辅助提取法的最佳提取率为 212.4 mg/g, 纯度为 61.9%。微波辅助提取法的最佳提取条件为: 固液比 1∶35; 乙醇浓度为 70%; 微波输出功率百分比 40%(相当于实际功率 320 W); 时间为 13 min。微波辅助提取法的第二次提取的提取率和纯度也大部分比热浸泡法要高。均匀实验设计的结果见表 2, 从中可看出其实验结果比正交实验设计得到的结果更好, 这是由于均匀设计的水平翻盖面更广。微波辅助提取法的均匀设计第 1 次提取的 16 号实验中有 15 号实验的提取率和纯度都比热浸泡的要高, 综合来看以第 2 号实验为最佳, 其提取率为 216.2 mg/g, 纯度为 57.1%。其最佳提取条件为: 固液比 1∶47; 乙醇浓度为 59%; 微波输出功率百分比 70%; 时间为 18 min。从上述可以看出, 微波辅助提取法确实能成倍提高有效成分的提取率, 大大地缩短提取时间, 同时提高其纯度。

表 1　正交实验设计数据及结果

Tab 1　Results and data of orthogonal experiment design

No	W(g)	V_1	V_2	A_1	A_2	W_1	B_1%	W_2	B_2%	X_1	X_2	X
1	10.00	5	5	0.336	0.528	1.335	36.1	1.081	38.5	48.2	41.6	111.8
2	10.00	5	2.5	0.485	0.704	1.380	61.9	1.023	57.5	85.4	58.8	171.5
3	10.00	5	2.5	0.499	0.634	1.328	56.7	1.018	48.8	75.3	49.7	150.0
4	10.00	5	2.5	0.508	0.552	1.193	57.6	0.685	41.4	68.7	28.4	116.5
5	3.33	2.5	5	0.542	0.427	0.769	58.8	0.267	65.2	135.8	52.3	188.1
6	3.33	2.5	5	0.683	0.439	0.793	59.6	0.250	52.0	141.9	39.0	180.9
7	3.33	5	5	0.385	0.481	0.705	54.9	0.283	49.1	116.2	41.7	157.9
8	3.33	5	5	0.263	0.332	0.700	35.9	0.233	32.9	75.5	23.0	98.5
9	2.00	5	5	0.542	0.297	0.569	52.9	0.144	34.2	150.5	24.6	175.1
10	2.00	5	5	0.599	0.394	0.550	59.6	0.145	31.1	163.9	22.5	186.4
11	2.00	2.5	5	0.394	0.179	0.470	48.8	0.158	27.6	114.7	21.8	136.5
12	2.00	2.5	5	0.444	0.136	0.464	36.8	0.148	34.5	85.4	25.5	110.9
13	1.43	2.5	5	0.680	0.155	0.418	57.5	0.087	53.6	168.1	32.6	200.7
14	1.43	5	5	0.315	0.113	0.413	58.4	0.037	44.2	168.7	11.4	180.1
15	1.43	5	5	0.720	0.095	0.423	61.5	0.097	44.9	181.9	30.5	212.4
16	1.43	5	5	0.432	0.142	0.318	50	0.088	51.0	111.2	31.4	142.6

W(g): weight of comminuted leaves of *Ginkgo biloba* L; V_1 and V_2(ml) are sampling volume of the first and second extract from leaves of *Ginkgo biloba* L respectively; A_1 and A_2: absorbance value; W_1 and W_2: weight of the first and second dry brown extract respectively; X_1 and X_2(mg): flavones quantity of the first and second extract per gram leaves of *Ginkgo biloba* L respectively; X(mg): total extracted flavones quantity per gram leaves of Ginkgo biloba L; B_1 and B_2: percentage of *Ginkgo biloba* L flavones in dry extract.

Calculation formula:

$$B_1\% = \frac{A1 + 0.001403 \times \frac{10}{V_1} \times 25}{m} = X_1 = B_1\% \times W_1 \times 1\,000$$

$$B_2\% = \frac{A2 + 0.001403 \times \frac{10}{V_2} \times 25}{m} \quad X_2 = B_2\% \times W_2 \times 1\,000$$

$$X = X_1 + X_2$$

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 均匀实验设计数据及结果

Tab 2 Results and data of the uniform experiment design

No	W(g)	V_1	V_2	A_1	A_2	W_1(g)	B_1%	W_2(g)	B_2%	X_1	X_2	X
1	1.000	5	5	0.181	0.114	0.297	56.9	0.052	66.0	169.2	34.3	203.5
2	1.064	5	5	0.191	0.127	0.315	57.1	0.095	52.5	169.1	47.1	216.2
3	1.136	5	5	0.124	0.111	0.321	38.2	0.089	48.8	107.9	38.2	146.1
4	1.220	5	5	0.160	0.225	0.332	44.2	0.090	53.1	120.3	39.2	159.5
5	1.316	5	5	0.374	0.150	0.357	59.6	0.068	73.4	161.7	37.9	199.6
6	1.429	5	5	0.180	0.260	0.327	42.5	0.038	30.8	97.3	8.2	105.5
7	1.563	5	5	0.160	0.141	0.442	60.2	0.042	48.6	170.2	13.1	183.3
8	1.724	5	5	0.439	0.288	0.397	52.1	0.055	72.1	120.1	23.0	143.1
9	1.923	5	5	0.301	0.195	0.467	50.3	0.044	54.8	122.2	12.5	134.7
10	2.174	5	5	0.372	0.057	0.440	45.2	0.060	19.9	91.5	5.5	97.0
11	2.500	5	5	0.398	0.826	0.547	40.9	0.096	44.9	89.5	17.2	106.7
12	2.941	5	5	0.390	0.351	0.661	50.8	0.148	23.1	114.2	11.6	115.8
13	3.571	5	5	0.197	0.461	0.635	40.8	0.207	64.5	72.6	37.4	110.0
14	4.545	5	5	0.469	0.479	0.877	34.4	0.325	43.2	66.4	30.9	97.3
15	6.250	5	5	0.553	0.660	1.195	47.1	0.427	40.6	90.2	30.7	108.4
16	10.00	2.5	5	0.787	0.543	1.759	58.2	0.860	55.1	102.4	47.4	165.0
17 (maceration)	6.25	5	5	1.437	0.870	1.126	47.1	0.424	43.4	85.2	29.4	114.6

Abbr same as in Tal 1

为了比较正交实验中四个实验因素对实验结果的影响，确定哪些或哪个参考因素对实验提取结果的影响是最显著的或比较显著的，从而寻找出最佳实验操作条件，进行了方差分析。

根据从方差分析结果可获得如下信息：以银杏叶黄酮类化合物提取量为指标，则 A、B、C、D 四因素都为极显著性因素。表明实验选定的四个参考因素都对提取结果有比较大的影响。

且对于 A：Ⅳ＞ Ⅱ＞ Ⅲ＞ Ⅰ

B：Ⅱ＞ Ⅰ ＞ Ⅲ＞ Ⅳ

C：Ⅱ＞ Ⅳ＞ Ⅲ＞ Ⅰ

D：Ⅳ＞ Ⅲ＞ Ⅱ＞ Ⅰ

因此，最佳提取条件应为 $A_4B_2C_2D_4$，即提取时每次固液比为 1∶35，所加乙醇浓度为 50%，微波输出功率选择百分比为 40%档输出，反应时间长为 13 min，在此微波条件下，提取率和产物纯度均明显优于常规热浸泡法。

参考文献：

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M] 上册. 上海：上海科学技术出版社，1986. 724－725.

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京：科学出版社，1978. 18－21.

[3] 梁立兴. 银杏叶的开发利用及研究进展[J]. 世界林业研究，1996(3)：44－51.

[4] Le-Bars P L, Katz M M, Berman N, *et al*. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia[J]. J Am Med Assoc, 1997, 278(16)：1327－1332.

[5] 王 静，吴 晶. 银杏叶提取物对老年冠心病患者血液流变学的影响[J]. 长春中医学院学报，2001，17(1)：11.

[6] 王成章，郁 青，陈 祥，等. 银杏叶黄酮甙浸提工艺的研究[J]. 天然产物与开发，1998，10(2)：66－70.

[7] Pare J R, Belanger J M, Stafford S S. Microwave-assisted process (MAPTM) a: a new tool for the analytical laboratory[J]. Trends Anal Chem, 1994, 13(4)：176－184.

[8] Carro N, Garcia C M, Cela R. Optimization and Comparision of two microwave-assisted extraction procedures of terpenic compounds in Vitis Vinifera must samples[J]. Spectroscopy, 1997, 13(1)：61－70.

[9] 庄向平，虞杏英，杨更生，等. 银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法[J]. 中草药，1992，23(3)：122－124.

（编辑 刘洪娥）

（上接 1268 页）

125～150 mmHg [(135±15) mmHg]，部分患者高血压症状明显好转，应用洛沙坦期间，无 1 例发生心慌、头晕等低血压并发症。

3 讨论

通常将 HCT≥0.51 视为红细胞增多症，其主要的危害包括血栓形成、高血压、心衰、中风和患者自觉头晕等。过去对重症患者的治疗包括静脉放血、原肾切除等，但放血不仅导致铁的丢失，而且不是恒久的治疗方法；原肾切除对患者打击大、疗效也不确切。已有大量证据表明肾素血管紧张素系统可以影响促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的合成[1]。EPO 产生于肾皮质的毛细血管内皮细胞，其分泌量受局部氧浓度的调节。肾素血管紧张素系统可能是通过这一环节调节 EPO 的合成，因此，人们成功地用血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制剂治疗红细胞增多症。然而 ACE 抑制剂虽然有效地降低了过高的血红蛋白，却不影响其血中 EPO 的浓度，特别是不少红细胞增多症患者其血中 EPO 浓度是正常的，甚至还低于正常。显然 ACE 抑制剂通过降低 EPO 的产生从而治疗红细胞增多症的假设不能适用于所有病人。

本实验显示血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂洛沙坦能有效地降低红细胞增多症患者的 HCT，由此推测肾移植后红细胞增多症并不是由于血中过多的 EPO 所致，而可能是由于血管紧张素Ⅱ直接作用于原红细胞的结果。但当 HCT 降至正常后，HCT 不因继续使用洛沙坦而持续下降；在非红细胞增多症病人中也没有发现洛沙坦能导致患者贫血，这些原因尚不清楚。

本组病人对洛沙坦耐受良好，除 HCT 降低外，血中白细胞和血小板无明显改变。无贫血、无低血压病例发生。虽然洛沙坦和 ACE 抑制剂都可治疗肾移植后红细胞增多症，但洛沙坦不干扰血管紧张素转化酶的功能，故患者服用洛沙坦后不会发生象使用 ACE 抑制剂时出现咳嗽等激肽系统的副作用。

关键词：肾移植；红细胞增多症；洛沙坦

中图法分类号：R555.105 文献标识码：B

参考文献：

[1] Singh V, Sud K, Mittal B R, *et al*. Postrenal transplant erythrocytosis: risk factors and effectiveness of angiotensin receptor antagonists[J]. Transplant Proc, 2002, 34(5)：3191－3192.

[2] Pabico R C, McKenna B A, Yoo K, *et al*. Successful reversal of post-renal transplant (PRT) erythrocytosis (ERY) with angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEi)[J]. Am J Hypertens, 2001, 14(4)：A95.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net