

银杏叶总黄酮正交提取工艺优化及其抗氧化能力 与抑制亚硝化反应研究

尹丽*, 郭小慧

(漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

[摘要] 目的:测定银杏叶总黄酮抗氧化能力、对亚硝酸盐的清除能力及对亚硝胺合成的抑制能力。并考察各指标相关性。**方法:**正交设计试验确定从银杏叶中提取黄酮类物质的最佳条件,测定 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,2.0 g·m⁻¹银杏叶总黄酮总抗氧化能力血浆铁还原能力(FRAP),二苯代苦味酰基自由基(DPPH·自由基)清除率,亚硝酸盐清除率及对二甲基亚硝胺(NDMA)阻断作用。**结果:**浸提温度 80 ℃,浸提 1 h,乙醇浓度 75%,料液比 1:15 是提取银杏叶总黄酮的最佳条件,提取率为 8.86%。总抗氧化能力和 DPPH·清除率随总黄酮质量浓度增高而增强;对亚硝酸盐有很强的清除作用并能阻断亚硝胺的合成,和总黄酮质量浓度成正相关。**结论:**银杏叶总黄酮有很强的抗氧化及清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的能力。

[关键词] 银杏;抗氧化;抑制亚硝酸;正交设计

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0260-03

[doi] 10.11653/syfj2013180260

Optimization of Flavonoid Extraction Technology of Orthogonal from Ginkgo Folium and its Antioxidation Ability

YIN Li*, GUO Xiao-hui

(Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

[Abstract] **Objective:** To define the optimum flavonoid extract program from Ginkgo Folium leaf and its antioxidant activity. **Method:** Orthogonal experiment was applied to define the optimum extract program. The ability of oxygen radical absorbance capacity was determined by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) method, Total antioxidant capacity was evaluated by Ferric reducing antioxidant power (FRAP) value. Inhibition of nitrosation reaction was predicated by the cleaning of nitrite and the blocking rate of nitrosodimethylamine (NDMA). **Result:** The optimum extraction program (8.65%) could be obtained under the condition of 80 ℃, material ratio 1:15 by the 75% alcohol for 1 h. The ability of total antioxidant capacity and DPPH·clearance is enhanced at a dose-dependent manner with the concentration of the extract. **Conclusion:** The flavonoid extract from Ginkgo Folium have strong antioxidation ability and could block nitrosamine synthesise.

[Key words] Ginkgo Folium; antioxidation; nitrosation synthesise inhibition; orthogonal experiment

银杏是银杏科植物,我国总量占世界 70% 以上。银杏叶的主要成分有银杏黄酮和萜类内酯等,有抗氧化清除自由基、提高机体免疫力、延缓衰老等作用^[1-5]。亚硝胺是 1 种广泛存在的致癌物质,能导致各种器官的癌变。虽然其在食物中的含量不高,但其前体物质亚硝酸盐和胺类却在食物中广泛存在。阻断由其前体

向亚硝胺合成的过程是预防癌症的有效方法之一。目前有关从天然植物中提取黄酮类物质抑制亚硝化反应的报道较少。本文研究了银杏叶总黄酮清除自由基和抑制亚硝化反应的作用及其相关性。

1 材料

1.1 药材与试剂 银杏叶采自漯河医学高等专科学校内银杏树,经漯河医学高等专科学校李先佳副教授鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo Biloba* L. 的干燥叶,DPPH·(2,2-二苯-1-苦肟基)、TPTZ(三吡啶三吡啶)均购自美国 Sigma 公司,批号 095K1452,其余

[收稿日期] 20121015(024)

[通讯作者] 尹丽,硕士,讲师,从事生物活性物质提取及鉴定,
Tel:15903952600, E-mail:igravity@163.com

试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器 752型紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂),HH-8型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),BT25S型电子天平(赛得利斯集团,德国)。

2 方法

2.1 银杏叶中黄酮类物质的提取 提取工艺:银杏叶→烘干→粉碎→乙醇回流→浸提→抽滤→定容→黄酮含量测定。取银杏叶1 000 g,置于烘箱中在70℃下烘干12 h,取出粉碎,过80目筛。准确称取10 g放入乙醇中浸泡。再恒温水浴浸提,抽滤。

2.2 正交试验方案设计 乙醇回流提取银杏叶中的黄酮类物质受很多因素的影响。为了取最优条件,在查阅资料的基础上,以浸提度(A),提取时间(B),乙醇浓度(C),料液比(D)4种因素,每个因素设立3个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计。设计见表1,具体安排见表2。

表1 银杏叶总黄酮提取工艺正交试验因素水平

水平	A 浸提温度 /℃	B 提取时间 /h	C 乙醇浓度 /%	D 料液比 /g·mL ⁻¹
1	60	1	50	10
2	70	2	60	15
3	80	3	75	20

2.3 总黄酮含量测定 采用文献方法^[6]平行测定3次,取平均值。

2.4 清除自由基能力 DPPH·的测定 准确称取DPPH 50 mg并用甲醇定容至250 mL,得到DPPH溶液。配制银杏叶提取物的甲醇溶液,分别为0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,2.0 g·L⁻¹,分别取样品液250 μL各加入2 mL 0.5 mmol·L⁻¹ DPPH·甲醇溶液,充分混匀,反应30 min,517 nm测定吸光度(A)。每个样品平行测定3次。空白以磷酸盐缓冲液替代样品。

$$\text{清除率} = [1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

2.5 总抗氧化能力血浆铁还原能力(FRAP)测定 银杏叶提取物加入3 mL TPTZ工作液(0.3 mol·L⁻¹醋酸盐缓冲液25 mL+10 mmol·L⁻¹TPTZ溶液2.5 mL+20 mmol·L⁻¹ FeCl₃溶液2.5 mL)。混匀后反应20 min,593 nm读取A,以1 mmol·L⁻¹ FeSO₄为对照,样品抗氧化活性以达到同样A所需的FeSO₄每升含摩尔量表示。平行测定3次,取平均值。

2.6 抑制亚硝化反应的测定 清除亚硝酸钠(NaNO₂)和阻断二甲基亚硝胺(NDMA)合成的实验参照文献^[7]进行。选取0.1,0.5,1.0,1.5,2.0 g·L⁻¹,5个不同质量浓度梯度的银杏叶提取液观察

其对NaNO₂的清除和对NDMA的阻断作用,反应时间分别为10,30,60 min。

2.7 统计学方法 采用SPSS 15.0软件进行相关性分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 总黄酮测定标准曲线 $Y = 0.8259X - 0.0052$ [$R^2 = 0.9996$,Y为吸光度,X为样品中总黄酮相当于芦丁的量(mg)]。

3.2 银杏叶黄酮类物质提取工艺正交设计试验结果 影响银杏叶提取率最主要的因素是浸提温度和提取时间。其最优的提取条件是 $A_3B_1C_3D_2$,也就是浸提温度80℃,浸提1 h,乙醇浓度75%,料液比1:15。按照这个组合对银杏叶进行总黄酮提取,3次测定平均值为86.25 g·kg⁻¹。见表2。

表2 银杏叶黄酮类物质提取工艺正交试验安排及结果

No.	A	B	C	D	黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	8.07
2	1	2	2	2	8.12
3	1	3	3	3	7.95
4	2	1	2	3	8.42
5	2	2	3	1	8.36
6	2	3	1	2	8.27
7	3	1	3	2	8.86
8	3	2	1	3	8.57
9	3	3	2	1	8.21
K_1	24.14	25.35	24.91	24.64	
K_2	25.05	25.05	24.75	25.25	
K_3	25.63	24.43	25.17	24.94	
R	1.49	0.92	0.42	0.61	

3.3 对总抗氧化能力FRAP和DPPH·自由基清除率的影响 银杏叶总黄酮对DPPH·有着很好的清除作用,银杏叶总黄酮在0.1~1.0 g·L⁻¹时,随着总黄酮质量浓度的增加,清除率也逐渐增加,但继续增加总黄酮质量浓度到2.0 g·L⁻¹,对DPPH·的清除率已经变化很小,几乎成零级反应。DPPH·清除率和银杏叶总黄酮质量浓度的回归方程为 $Y = 29.11X + 43.38$ ($r = 0.749$),显示良好的量效关系。FRAP随银杏叶总黄酮质量浓度的变化和对DPPH·自由基的清除有着大致相同的规律,随总黄酮质量浓度增高,总抗氧化能力也越来越强,但其增高幅度低于DPPH·清除率增高幅度。其 $r = 0.7577$ 。这说明引起总抗氧化能力和清除DPPH·自由基最主要的是银杏叶总黄酮中的黄酮类物质。总抗氧化能力和DPPH·的清除率之间有着很大的相关性,其回归方程为 $Y = 0.2688X - 38.835$ ($r = 0.9769$),这说明这二者都由总黄酮中同一种或几种成分起作用。见表3。

表 3 银杏叶总黄酮对 DPPH·清除率和总抗氧化能力的影响

银杏叶总黄酮 质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	DPPH·清除率 /%	FRAP / $\text{mmol}\cdot 100\text{g}^{-1}$
0.1	32.45	263.26
0.2	45.36	302.58
0.4	56.32	365.23
0.6	63.59	398.65
0.8	75.68	426.35
1.0	88.96	456.84
2.0	89.75	480.36

3.4 对 NaNO_2 及 NDMA 的阻断作用 在一定条件下,二甲胺与 NaNO_2 可生成 NDMA,当银杏叶总黄酮中加入二甲胺与 NaNO_2 时,银杏叶黄酮类物质会首先结合 NaNO_2 而阻止二甲胺和 NaNO_2 的结合,从而阻止 NDMA 的生成。生成的 NDMA 的量越少,说明银杏叶总黄酮的阻断能力越强,生成的 NDMA 越多,则阻断能力越弱。 NaNO_2 先与氨基苯磺酸反应后,接着和萘乙二胺盐酸盐反应生成 1 种红色化合物。而测定这种红色化合物的变化可反映银杏叶总黄酮对 NaNO_2 清除能力的强弱。随着浓度增大和时间延长,银杏叶总黄酮对 NaNO_2 的清除作用和对 NDMA 的阻断作用都随之增大,但增幅逐渐减慢。其中在反应时间 60 min、质量浓度 $2.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,二者都达到最大, $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时已接近最大值。说明银杏叶总黄酮对致癌物亚硝酸盐有着很好的清除能力并对 NDMA 的合成有很强的阻断能力。见表 4。

表 4 银杏叶总黄酮对 NaNO_2 清除率及对 NDMA 阻断作用/%

银杏叶总黄酮质量 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	NaNO_2 的清除率			NDMA 的阻断作用		
	10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min
0.1	23.65	36.29	46.34	18.65	32.63	46.34
0.2	28.69	42.36	68.29	29.23	43.74	68.93
0.5	35.15	54.27	83.62	36.28	68.67	86.31
1.0	42.28	78.46	95.36	52.36	81.76	94.66
2.0	48.63	81.35	96.95	65.83	83.94	96.37

4 讨论

实验表明,银杏叶黄酮最佳的提取条件是,浸提温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$,浸提 1 h,乙醇浓度 75%,料液比 1:15,得率平均为 8.86%。

自由基具有强氧化性,可损害机体的组织和细胞,进而引起慢性疾病并且和衰老有关^[7]。抗氧化剂能有效清除自由基。实验表明银杏叶提取物有很好的抗氧化能力,对 DPPH·自由基有着很强的清除能力并随着质量浓度增高而增强。提取物总抗氧化能力也随质量浓度增高而增强。所以银杏叶提取物在抗氧化方面有很好的应用前景。

NaNO_2 已经证实和癌症的发生有关,而 NaNO_2 在食品中作为护色剂广泛应用。而大量的 NaNO_2 可以导致血液中的血红蛋白变为高铁血红蛋白,使之失去携带氧气功能,进而导致组织缺氧。同时, NaNO_2 是亚硝胺类化合物的前体物质。而亚硝胺是一种强致癌物,可以诱发多种癌症,并可以通过胎盘诱发后代肿瘤^[8-9]。所以寻求天然活性物质减弱或消除 NaNO_2 毒害尤为重要。本实验表明,银杏叶总黄酮对 NaNO_2 有很好的清除作用,并且处理时间越长,清除作用越大,对 NDMA 的阻断作用也越强。这说明银杏叶的抗氧化能力和清除 NaNO_2 能力主要和其黄酮含量有关。

综上,银杏叶总黄酮是一种很好的抗氧化剂,可以从多个方面抑制机体氧化应激状态。这为我国广阔的银杏资源的开发利用提供参考。另外,银杏叶中除了含有银杏黄酮之外还含有银杏多糖、银杏多肽等物质,为了更好的利用银杏资源,应进一步研究银杏多糖等的生物学活性。

[参考文献]

- [1] Puttaraju N G, Venkateshaiah S U, Dharmesh S M. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(26): 9764.
- [2] 夏晓辉,张宇,郝砚彬,等. 银杏叶化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 15(9): 100.
- [3] 牟玲丽,寇俊萍,朱丹妮,等. 银杏叶的化学成分及其抗氧化活性[J]. 中国天然药物, 2008, 6(1): 26.
- [4] Menghao Huang, Yisong Qian, Teng Guan, et al. Different neuroprotective responses of Ginkgolide B and bilobalide, the two Ginkgo components, in ischemic rats with hyperglycemia[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 677(1/3): 71.
- [5] 耽秀芬,庞秀英,李桂芝. 银杏叶总黄酮近期研究进展[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(6): 488.
- [6] 涂华,陈碧琼,张燕军,等. 天然类黄酮物质的提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 277.
- [7] 袁毅桦,陈忻,陈纯馨,等. 柚皮提取物对亚硝化反应抑制作用研究[J]. 化学世界, 2004, 45(1): 26.
- [8] 高良才,陈婉蓉. 自由基与衰老[J]. 生物学教学, 2001, 26(1): 8.
- [9] 马俪珍,张健斌,孟培培. 食品中亚硝胺类化合物的危害及控制研究进展[J]. 保鲜与加工, 2012, 12(2): 1.

[责任编辑 李玉洁]