

• 制剂工艺 •

银杏叶黄酮的酶法强化提取工艺条件研究

许明淑¹, 邢新会^{1*}, 罗明芳¹, 黄璐琦²

(1. 清华大学化学工程系生物化工研究所, 北京 100084; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 银杏叶总黄酮在植物细胞中以苷元和苷的形式存在, 在低浓度的醇/水体系中苷元不易被提取。利用转苷酶和糖等糖基供体将极性低的黄酮苷元转为黄酮苷以提高总黄酮在醇水中的溶解率。利用 *Suhong*475 转苷酶强化银杏叶总黄酮提取的研究结果表明, 总黄酮的提取率比未加酶对照组增加了 44%, 温度 55~60℃, pH 6.0~6.5, 反应时间 10h 的提取条件有利于总黄酮的提取。结果表明利用转苷反应可以在低乙醇浓度的乙醇溶液中得到较高的总黄酮提取率。

[关键词] 银杏叶黄酮; 酶法提取; 转苷酶

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)04-0002-03

银杏叶黄酮类化合物是心血管疾病的天然药物, 具降低全血粘稠度、扩张血管、增加血流量、抗氧化等作用^[1], 其提取过程的研究具有较大工业意义。

黄酮类化合物在银杏叶中以两种形态存在^[2], 一是脂溶性成分如黄酮苷元类物质, 二是水溶性成分如黄酮苷成分。为了充分提取不同极性的黄酮化合物, 在实际生产中要采用极性低的有机溶剂或水提等方法提取^[3], 由于对医药产品和保健品的安全要求, 醇水多成为常用提取溶剂, 避免对机体有害的其他有机溶剂。而目前生产提取过程中效率偏低、提取时间长。为了解决这些问题, 需要确立高效清洁的植物提取技术。近年, 酶法提取药用植物已成为中药提取研究的重要方法, 需要从基础和应用上深入研究酶反应在植物成分转化和提取过程的作用。由于所述银杏叶总黄酮在植物细胞中以苷元和苷的形式存在, 在醇水体系中苷元由于其极性低不易被提取, 黄酮苷元以 90~95% 高浓度乙醇提取, 黄酮苷以 60% 左右乙醇才能进行提取^[4]。本研究的目的是利用转苷酶和糖等糖基供体将极性低的黄酮苷元、黄酮苷转为更高极性的黄酮苷, 从而提高总黄酮在醇水中的提取率。同时, 由于被提取的物质极性的增加, 可望在低浓度的纯水体系中进行提取, 从而

可以减少乙醇用量, 降低成本。

本文利用 *suhong*475 转苷酶的转苷反应探讨了在醇水体系中对银杏叶总黄酮提取过程及相关影响因素。

1 材料和方法

1.1 材料 实验中使用的银杏叶 (*Folium Ginkgo*) 由河南省医药公司提供鉴定, *Suhong GA 475* 葡萄糖苷酶液 (标准活力 475AGU/g) 由诺维信生物技术有限公司提供, 总黄酮定量用的标准品芦丁购自 sigma 公司 (批号: 020620)。

1.2 方法 将干燥银杏叶粉碎过筛后, 称取一定量, 一定体积的乙醇和水作为溶剂加入酶液, 在一定温度、pH 条件下进行黄酮的提取。提取条件的研究包括不同溶剂、糖基供体、温度、pH、时间、药材粒度等。为探讨转苷反应的糖基供体对银杏叶总黄酮提取率的影响, 选择了麦芽糖、糊精和可溶性淀粉进行对比实验。

达到预定的提取时间后将提取液过滤除渣, 对滤液中的总黄酮进行分析。根据黄酮的测定方法^[5]对提取液进行显色反应, 在 510nm 测吸光度, 由以芦丁作为标准物质的标准曲线计算得出溶液中的总黄酮浓度。

银杏叶的总黄酮提取率按以下的公式计算得到:

$$\text{提取率} = \frac{\text{溶液中的总黄酮质量}(\text{g})}{\text{银杏干叶质量}(\text{g})} \times 100\%$$

2 结果

[收稿日期] 2005-07-07

[基金项目] 教育部高校博士点基金 (NO: 20020003057) 和自然科学基金 (NO: 20176025)

[通讯作者] 邢新会, Tel: (010) 62772294

2.1 酶法对银杏叶总黄酮提取率的影响 取 30 克粒度为 0.6~ 0.28mm 银杏叶, 加入 500 mL 的去离子水 500 mL 的 30% 乙醇、500mL 的 30% 乙醇加入 0.36 mL *Suhong GA 475* 转苷酶液和 2.4 g/L 麦芽糖, 在 50 °C, pH 6.0 条件下提取 30h, 测定提取液中的总黄酮浓度, 计算提取率, 结果依次为水提总黄酮提取率为 1.18 ± 0.14%, 30% 乙醇提取结果为 1.42 ± 0.13%, 30% 乙醇加 *Suhong GA 475* 转苷酶液提取结果为 2.05 ± 0.19%。30% 乙醇对银杏叶总黄酮的提取率大于纯水体系。在 30% 乙醇水体系中加入 *Suhong GA 475* 转苷酶后, 总黄酮提取率比未加酶对照组增加了 44%。

2.2 不同乙醇浓度对酶法提取银杏叶总黄酮的影响 称取 30 g 粒度为 0.6~ 0.28mm 银杏叶, 加入 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% 乙醇各 500mL, *Suhong GA 475* 来源的葡糖苷酶液 0.36mL 和 2.4 g/L 麦芽糖, 调 pH 为 6.0, 在 50 °C 条件下提取 30 h, 测定提取液中的总黄酮浓度。总黄酮提取率和乙醇浓度的关系如图 1。由图可见, 无论有无酶的加入, 乙醇浓度 70% 时银杏叶总黄酮的提取率达到最高。随着乙醇量的增加黄酮类化合物的提取率也增加, 但加酶和未加酶的差距越来越低, 是因为随着体系中乙醇量增加会夺去酶活性结构所需的水分子导致酶逐渐失去活性。由图 1 可以得知, 在加酶条件下 30% 乙醇体系提取率接近未加酶时 60% 乙醇体系的提取率。由此预测, 通过加入转苷酶可降低黄酮的工业提取工艺中乙醇的浓度。

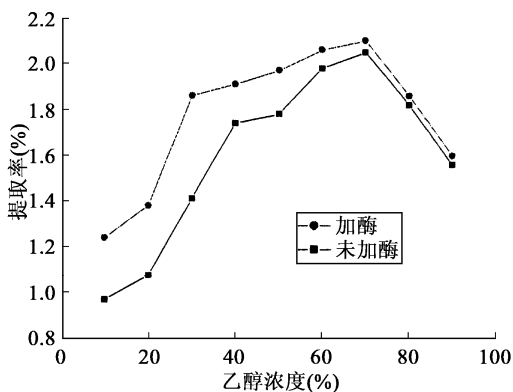


图 1 不同乙醇浓度对银杏叶黄酮的影响

2.3 转苷酶作用糖基供体对银杏叶总黄酮提取率的影响 称取 30 g 粒度为 0.6~ 0.28mm 银杏叶, 加入 500 mL 30% 乙醇, *Suhong GA 475* 葡糖苷酶液 0.36mL 和不同酶的作用糖基供体, 根据葡萄糖苷酶的酶作用性质, 采用麦芽糖或糊精或可溶性淀粉等带有葡萄糖的多糖物质作为糖基供体进行研究, 在

50 °C 条件下提取 30 h。对照组为不加转苷酶的糖基供体外, 其他提取条件相同。转苷酶的糖基供体对银杏叶总黄酮提取率的影响结果如图 2 所示。从图中可以看出, 在相同提取条件下, 不加入糖基供体的总黄酮提取率为 1.41%, 与对照的 30% 乙醇水体系的总黄酮提取率基本相同, 表明在转苷酶体系中无糖基供体时, 仅转苷酶的加入不能提高总黄酮提取率, 说明转苷反应本身对提高总黄酮的提取率具有重要作用。另外, 图 2 的结果还表明, *Suhong GA 475* 葡糖苷酶以麦芽糖作为糖基供体优于糊精和可溶性淀粉。这一结果说明利用转苷酶反应强化银杏叶总黄酮的提取时糖基供体的选择很重要。

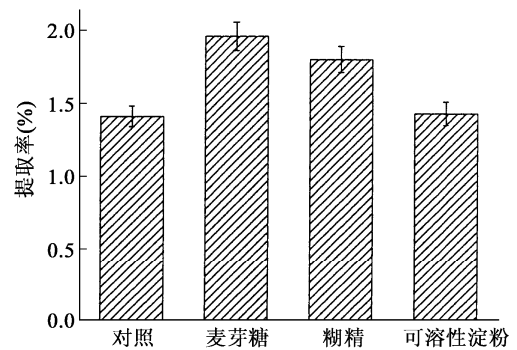


图 2 转苷酶糖基供体对银杏叶总黄酮提取率的影响

2.4 温度对酶法提取银杏叶总黄酮提取率的影响 称取 30g 粒度为 0.6~ 0.28mm 银杏叶, 加入 500 mL 30% 乙醇, *Suhong GA 475* 葡糖苷酶液 0.36mL 和 2.4 g/L 麦芽糖, 在 pH 6.0, 不同温度条件下, 提取 30 h, 测定提取液中的总黄酮浓度, 计算得到的总黄酮提取率的变化如图 3 所示。在提取温度为 40~ 60 °C 范围内, 随着提取温度的升高, 总黄酮提取率增加。在提取温度为 50~ 55 °C 时, 加酶提取体系的总黄酮提取率与没有加酶的提取体系的总黄酮提取率差别最大。这一差异是由转苷反应产生, 但在 55 °C 以上, 加酶和未加酶的提取率相差不大, 可能由于酶的失活所致。从图 3 的结果可知, 在温度为 50~ 55 °C 时转苷酶的转苷效果最优, 因此转苷反应的实验均在 50 °C 进行。

2.5 pH 对酶法提取银杏叶总黄酮的影响 分别称取 30g 粒度为 0.6~ 0.28mm 银杏叶, 加入 500 mL 30% 乙醇, *Suhong GA 475* 来源的葡糖苷酶液 0.36mL 和 2.4 g/L 麦芽糖, 调 pH 为 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 在 50 °C 条件下提取 30 h, 测定提取液中的总黄酮浓度。总黄酮提取率和 pH 的关系如图 4 所示。随着 pH 的一定范围增高, 提取率也随之增加, 由图可见, 在 pH 6.0~ 6.5 时总黄酮提取率最高, 此范围

是转苷反应适宜的 pH 值。

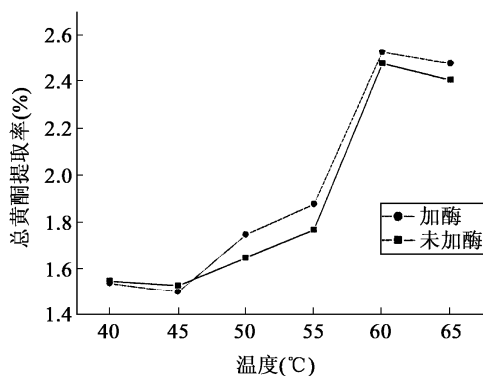


图 3 温度对银杏叶总黄酮提取率的影响

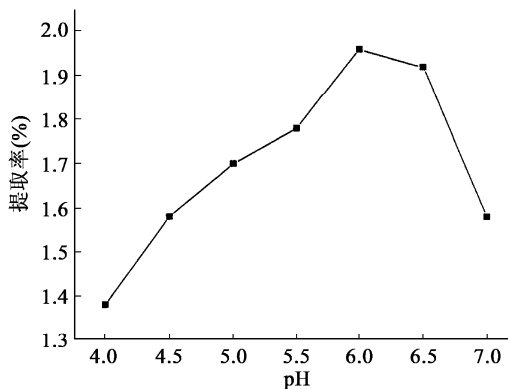


图 4 pH 对酶法提取银杏叶总黄酮的影响

2.6 提取时间和银杏叶粒度对酶法提取银杏叶总黄酮提取率的影响 称取 30 g 粒度分别为 2~0.6mm, 0.6~0.28mm 和 0.28~0.154mm 的银杏叶, 加入 500 mL 30% 乙醇, *Suhong GA 475* 葡糖苷酶液 0.36 mL 和 2.4 g/L 麦芽糖, 在 pH 6.0 的条件下, 测定提取液中的总黄酮提取率随提取时间的变化, 结果如图 5 所示。结果表明, 随着提取时间的增加银杏叶总黄酮的提取率也增大, 提取 10 h 左右提取率不再增加。另外, 图 5 的结果还表明, 银杏叶粒度越小, 相同提取时间下银杏叶总黄酮的提取率越高。

3 讨论

本论文通过研究酶法提取银杏叶总黄酮获得以下几个结论: 加入转苷酶可以显著促进银杏叶总黄

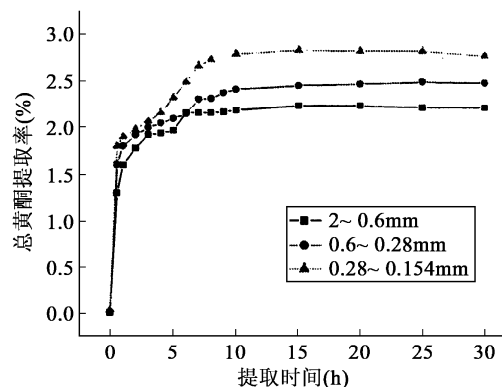


图 5 提取时间对不同粒度银杏叶总黄酮提取率的影响

酮成分的提取率。转苷酶可通过其糖基供体转苷作用改变银杏叶中黄酮苷元水溶性以促进其提取, 通过加入转苷酶可以提高银杏叶总黄酮提取率 44%。银杏叶总黄酮提取利用转苷酶 *suhong 475* 时, 通过以上条件的初步筛选研究中得到了结论, 作用温度为 50~55 °C, pH 6.0~6.5, 反应时间 10h, 转苷糖基供体为麦芽糖时效果较好。

实验根据银杏叶黄酮类化合物的化学性质, 采用转苷酶改变极性, 为银杏叶黄酮类化合物提取提供了新途径。

[参考文献]

- [1] Teissedre P L, Frankel E N, Water house A L et al. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines [J]. *Sci. Food Agric*, 1996, 70: 55.
- [2] 庄玲华, 李晖. 银杏叶活性成分的提取分离研究概况 [J]. *华西药学杂志*, 2002, 17(6): 437.
- [3] 王槐三, 付忠. 银杏叶黄酮提取工艺研究现状 [J]. *四川化工与腐蚀控制*, 2002, 5(2): 13.
- [4] 李苑, 张敏. 中草药中黄酮类化合物提取工艺的研究概况 [J]. *广东药学*, 1999, 9(2): 4.
- [5] 李刚, 岳仁芳. 苦楝和银杏叶中总黄酮含量测定和比较 [J]. *广西农业科学*, 2004, 35(6): 448.