

银杏叶黄色素提取及稳定性研究

文赤夫¹, 向小奇¹, 刘旋¹, 桂克印², 夏凯¹, 杨通¹

(1. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000; 2. 吉首大学城乡资源与规划学院, 湖南 张家界 427000)

摘要: 为充分利用银杏资源, 增加其经济附加值及为寻找新的天然食品着色剂提供依据, 从提取剂选择、液料比、提取温度、时间等条件对银杏叶黄色素的提取工艺及色素的耐光、热、pH 的稳定性进行研究。结果表明, 该色素的石油醚溶液在可见区 445nm 处有最大吸收; 适宜的提取工艺条件为: 以乙酸乙酯对石油醚的体积分数为 70% 的混合溶剂、液料比 25:1(mL/g)、提取温度 40℃、提取时间 30min, 以此方法提取 4 次较为彻底; 经初步纯化的得率为 3.0%, 色价 20.49。稳定性研究结果表明, 银杏叶黄色素对光不稳定, 宜避光保存; 该色素在 60℃ 以下加热 1h 降解率较小, 但在 70℃ 加热 1h 降解率较大; 该色素在弱酸和弱碱条件下较稳定。

关键词: 银杏叶; 天然色素; 提取工艺; 稳定性

Extraction and Stability of Yellow Pigments from *Ginkgo biloba* Leaves

WEN Chi-fu¹, XIANG Xiao-qi¹, LIU Xuan¹, GUI Ke-yin², XIA Kai¹, YANG Tong¹

(1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, China;

2. College of Resources and Planning Sciences, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China)

Abstract: To make full utilization of *Ginkgo biloba* leaf resource, enhance its added value and provide experimental reference for exploration of natural food colorants, critical parameters affecting extraction of yellow pigments from *Ginkgo biloba* leaves including extraction solvent kind, liquid/material ratio and extraction time and temperature were investigated by orthogonal array design and the light, temperature and pH stability of the product obtained were evaluated. Results indicated that the pigments dissolved in petroleum ether exhibited a maximum absorption at 445 nm wavelength. Four-time extraction for 30 min each time using a mixture of ethyl acetate and petroleum ether (70:30, V/V) as extraction solvent at 40 °C and a liquid/material ratio of 25:1 (mL/g) gave an optimal yield of yellow pigments of up to 3.0% and the color value of the products obtained was 20.49. The pigments had poor light stability and consequently should be stored in the dark. After 1 h exposure to a temperature below 60 °C, a low degradation ratio was observed in the pigments, whereas 1 h exposure to 70 °C led to a high degradation ratio. The pigments were stable in acidic and alkine media.

Key words: *Ginkgo biloba* leaves; natural pigment; extraction process; stability

中图分类号: Q664.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)08-0043-03

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科(Ginkgoaceae)银杏属植物, 在我国分布广泛。60 年代以来, 国内外学者对其化学成分、药理作用及临床应用做了大量研究^[1]。结果表明, 银杏叶提取物可扩张冠状动脉血管、增加脑血流量、改善脑营养, 有明显的抗血小板活化因子及抗菌作用^[2]。2007 年, 全世界有 130 多个国家销售银杏叶制剂, 加上银杏保健食品与含银杏提取物成分的化妆品等, 总销售额已超过 50 亿美元^[3]。我国是银杏的主产国, 占世界资源总量的 70% 以上, 但利用率较低, 对银杏叶的利用较为集中在银杏黄酮、银杏内酯等方

面, 产品主销美国及欧洲。2008 年, 美国修订了银杏叶制剂质量标准(银杏黄酮含量 $\geq 24\%$, 银杏内酯含量 $\geq 6\%$, 银杏酸含量 $< 1 \times 10^{-6} \text{mg/kg}$), 企业产品质量难达标而面临困境^[4-5], 农民种植银杏收入降低而伐树毁林^[6]。对此, 本研究从银杏叶黄色素提取及色素的稳定性入手, 旨在为拓展银杏叶的利用范畴、寻找天然食品着色剂提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

收稿日期: 2009-06-02

基金项目: 湖南省教育厅项目(07C529)

作者简介: 文赤夫(1964—), 男, 副教授, 硕士, 主要从事植物资源化学和天然产物研究。E-mail: zjjlyw@21cn.com

银杏叶采自吉首大学张家界校区,由廖博儒研究员鉴定为银杏科(Ginkgoaceae)银杏属植物(*Ginkgo biloba* L.)。60℃烘至恒重,粉碎过24目筛。

所用试剂均为AR级,其中石油醚沸程为60~90℃。

UV-160紫外-可见分光光度计、340HW分析天平日本岛津公司;BS-220恒温水浴锅北京长安科学仪器厂;CS11-3D冰柜重庆试验设备厂;HM-60V酸度计上海虹益仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色素提取

1.2.1.1 检测波长的确定及提取剂的选择

称取处理好的银杏叶1.00g/份,以不同溶剂为提取剂水浴浸提,提取液稀释至适当倍数,以相对应的提取剂为空白,用紫外-可见分光光度计在波长范围为800~200nm内扫描,确定其最大吸收峰后,在此波长处进行提取液吸光度的测定,以吸光度大小代表色素相对含量^[7]。

1.2.1.2 银杏叶黄色素提取工艺研究

根据本试验特点设置:提取温度、提取时间、提取剂比例、液料比进行单因素多水平预试,再根据单因素预试结果拟定4个水平,选择 $L_{16}(4^5)$ 进行多因素多水平试验,筛选优水平组合。

1.2.2 银杏叶黄色素稳定性研究

1.2.2.1 光照对银杏叶黄色素稳定性的影响

参考文献[8]操作,取银杏叶黄色素无水乙醇溶液3份,放置在不同光照强度下:A-避光处理,B-6000~7500LX,C-12000~15000LX,定期取出测定 A_{445nm} 。

1.2.2.2 温度对银杏叶黄色素稳定性的影响

取黄色素无水乙醇溶液5份,分别于不同温度水浴中加热1h,冷却至室温,测定 A_{445nm} 。

1.2.2.3 pH值对银杏叶黄色素稳定性的影响

参考文献[9]操作,取黄色素无水乙醇溶液14份,以HCl溶液、NaOH溶液调节pH值分别为1.0~14.0,测定 A_{445nm} 。

按下式计算色价:

$$\text{色价 } E_{1cm}^{1\%}(\lambda_{\max}) = AV/100m$$

式中: E 表示用1cm比色皿在相应 λ_{\max} 处溶液质量分数为1%时的色价; A 为溶液的在波长 λ_{\max} 处的吸光度; V 为溶液的体积/mL; m 为产品质量/g。

$$\text{得率}/\% = \frac{\text{纯化后干粉质量}}{\text{用于提取的银杏总质量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 色素提取

2.1.1 检测波长的确定

选择石油醚、无水乙醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、水为提取剂浸提材料,结果表明,提取剂不同,提取液吸收峰有差异,有3个吸收峰:I(316~336nm)、II(443~454nm)、III(470~481nm)。其中,水提取物呈乳白色,在可见区没有吸收。本实验目标是提取黄色素,且峰II高于峰III,故选择吸收峰II的波长为测定波长。以石油醚作提取剂,提取液颜色鲜艳,杂质含量少,吸收峰I的吸光度较小,吸收峰II波长445nm,故选择定容的溶剂为石油醚,检测波长选择445nm。

2.1.2 银杏叶黄色素提取适宜条件组合的确定

单因素水平预试结果表明,提取剂以体积分数为60%乙酸乙酯-石油醚为优水平、提取温度为65℃、时间为20min、液料比为20:1(mL/g),对此,选用 $L_{16}(4^5)$ 进行试验,进一步探索最佳工艺参数。因素、水平安排作随机处理^[10],试验结果及方差分析见表1、2。

表1 银杏叶黄色素提取条件的正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal array design matrix and experimental results of absorbance of yellow pigments from *Ginkgo biloba* leaves at 445 nm wavelength

| 试验号 | A 时间/min | B 空白 | C 温度/℃ | D 提取剂体积分数/% | E 液料比(mL/g) | A_{445nm} |
|-------|----------|-------|--------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 30(1) | 1 | 40(1) | 80(1) | 15:1(1) | 0.732 |
| 2 | 30 | 2 | 25(2) | 50(2) | 10:1(2) | 0.59 |
| 3 | 30 | 3 | 65(3) | 60(3) | 25:1(3) | 0.666 |
| 4 | 30 | 4 | 55(4) | 70(4) | 20:1(4) | 0.718 |
| 5 | 10(2) | 1 | 25 | 60 | 20:1 | 0.641 |
| 6 | 10 | 2 | 40 | 70 | 25:1 | 0.784 |
| 7 | 10 | 3 | 55 | 80 | 10:1 | 0.401 |
| 8 | 10 | 4 | 65 | 50 | 15:1 | 0.275 |
| 9 | 40(3) | 1 | 65 | 70 | 10:1 | 0.35 |
| 10 | 40 | 2 | 55 | 60 | 15:1 | 0.623 |
| 11 | 40 | 3 | 40 | 50 | 20:1 | 0.705 |
| 12 | 40 | 4 | 25 | 80 | 25:1 | 0.735 |
| 13 | 20(4) | 1 | 55 | 50 | 25:1 | 0.699 |
| 14 | 20 | 2 | 65 | 80 | 20:1 | 0.264 |
| 15 | 20 | 3 | 25 | 70 | 15:1 | 0.745 |
| 16 | 20 | 4 | 40 | 60 | 10:1 | 0.501 |
| k_1 | 0.676 | 0.605 | 0.680 | 0.533 | 0.594 | |
| k_2 | 0.525 | 0.565 | 0.678 | 0.567 | 0.461 | |
| k_3 | 0.603 | 0.629 | 0.389 | 0.608 | 0.721 | |
| k_4 | 0.552 | 0.557 | 0.610 | 0.649 | 0.582 | |
| r | 0.151 | 0.072 | 0.291 | 0.116 | 0.260 | |

表2 方差分析结果

Table 2 Analysis of variance for absorbance of yellow pigments from *Ginkgo biloba* leaves at 445 nm wavelength with different extraction conditions

| 方差来源 | 偏差平方和 | 自由度 | F值 | $F_{0.05}$ 临界值 | 显著性 |
|-----------|-------|-----|--------|----------------|-----|
| A 时间 | 0.053 | 3 | 3.786 | 9.280 | |
| C 温度 | 0.227 | 3 | 16.210 | 9.280 | 显著 |
| D 提取剂体积分数 | 0.030 | 3 | 2.143 | 9.280 | |
| E 液料比 | 0.136 | 3 | 9.714 | 9.280 | 显著 |
| 误差 | 0.01 | 3 | | | |

表4 pH值对银杏叶黄色素的影响效果
Table4 pH stability of yellow pigments from *Ginkgo biloba* leaves

| pH | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 4.0 | 5.0 | 6.0 | 7.0 | 8.0 | 9.0 | 10.0 | 11.0 | 12.0 | 13.0 | 14.0 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A_{445nm} | 1.138 | 0.997 | 0.643 | 0.667 | 0.683 | 0.673 | 0.945 | 0.963 | 1.068 | 1.112 | 1.159 | 1.239 | 1.455 | 1.420 |
| 颜色 | 乳黄色 | 乳黄色 | 乳黄色 | 黄色 | 黄色 | 黄色 | 黄色 | 黄色 | 黄色 | 黄绿色 | 黄绿色 | 黄绿色 | 黄绿色 | 黄绿色 |

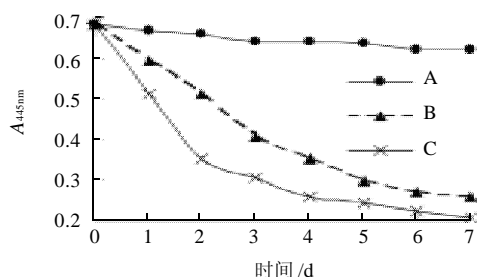
由表1、2可见,影响该色素提取的因素:温度>液料比>时间>提取剂体积分数,其中温度、液料比达到了显著水平,是在该试验设计条件下影响该色素提取的主要因素。适宜的提取条件为 $A_1C_1D_4E_3$,即以液料比25:1(mL/g)、温度40℃,乙酸乙酯对石油醚的体积分数70%、提取时间30min为最佳提取工艺组合。取1.0g材料(平行5份),按此工艺提取银杏叶黄色素,结果平均值 $A_{445nm}=0.793$ (大于正交表中最大值),标准偏差为4.37%,说明了该工艺的有相对稳定性和重现性。材料以此方法提取4次后提取液的吸光度较小,说明提取较为彻底。

2.2 色素的稳定性研究

2.2.1 色素提取与初步纯化

取200.0g银杏叶干粉,按2.1.2节确定的条件提取银杏叶黄色素,减压浓缩后冷冻干燥得到色素提取物粗品,色价为7.36,得率14.52%。粗品以聚酰胺树脂吸附,装入聚酰胺树脂柱($h=60cm$, $\phi=2.5cm$)上层,用4BV水洗除杂,再用4BV 95%的乙醇溶液以流速1BV/h洗脱,收集洗脱液,减压浓缩后冷冻干燥得到初步纯化的黄色素,色价20.49,得率3.0%。

2.2.2 光照对银杏叶黄色素稳定性影响



A.避光; B.6000~7500LX; C.12000~15000LX。

图1 光照对银杏叶黄色素稳定性的影响

Fig.1 Light stability of yellow pigments from *Ginkgo biloba* leaves

如图1所示,银杏叶黄色素在避光条件下较稳定,随光照强度和光照时间的延长,银杏叶黄色素溶液的吸光度逐渐变小,说明银杏叶黄色素对光不稳定,宜避光保存。

2.2.3 温度对银杏叶黄色素稳定性的影响

表3表明,银杏叶黄色素溶液在30~60℃加热1h,吸光度降低较少,降解率较低;在70℃加热1h降解率增加,为了减少对黄色素破坏,使用时应注意尽量避免70℃以上高温。

表3 温度对银杏叶黄色素稳定性的影响效果

Table 3 Temperature stability of yellow pigments from *Ginkgo biloba* leaves

| 温度/℃ | 空白 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A_{445nm} | 0.683 | 0.682 | 0.676 | 0.673 | 0.667 | 0.640 |
| 降解率/% | | 0.15 | 1.02 | 1.46 | 2.34 | 7.00 |

2.2.4 pH值对银杏叶黄色素稳定性的影响

由表4可见,银杏叶黄色素在pH4~9范围内颜色比较稳定为黄色,在pH1~3时溶液颜色为乳黄色,pH>10为黄绿色。说明该色素在弱酸、中性及弱碱性条件下稳定性较好。

3 结论

3.1 银杏叶黄色素提取以70%乙酸乙酯-石油醚(体积分数)为提取剂,液料比为25:1在40℃条件下提取30min较为适宜。经初步纯化,色价为20.49,得率为3.0%。

3.2 光照对银杏叶黄色素影响较大,提取、加工及保存应注意避光;色素在30~60℃加热1h,降解率较低,在70℃加热1h降解率较大,应避免70℃以上高温;色素在弱酸和弱碱的条件下较稳定,须避免强酸强碱。

3.3 银杏是古老的树种,是植物活化石,长寿逾数千年,再生周期长。银杏树如果被大量砍伐,将导致大量资源的浪费。目前,银杏叶制剂销售面临困境,银杏叶黄色素应具研发潜力。

参考文献:

- [1] 张迪清,何照范.银杏叶资源化学研究[M].北京:中国轻工业出版社,2000:1-19.
- [2] 游松,姚新生.银杏叶化学成分和药理研究[J].沈阳药学院学报,1988,5(2):142-148.
- [3] 美国修订银杏叶提取物质量标准[N].中国质量报,2008-7-16(8).
- [4] 成吉昌,张建荣.泰兴万吨银杏果期盼“消化”[N].江苏经济报,2008-11-29(1).
- [5] 徐铮奎.我国银杏出口将迎战“高考”[N].医药经济报,2008-5-26(9).
- [6] 房德华,田慧.果农呼吁:给银杏“把把脉”吧[N].农民日报,2008-10-28(5).
- [7] 王海荣,田子俊,阳勇,等.陈海涛小米黄色素的研究II:提取工艺及稳定性[J].中国粮油学报,2005,20(5):40-44.
- [8] 文亦夫,赵虹桥,田春莲,等.樟树熟果红色素提取工艺及稳定性研究[J].食品科学,2006,27(4):157-160.
- [9] 李维利,许立松,杨玉婷,等.马樱杜鹃花色素的提取及其性质研究[J].食品科学,2008,29(8):205-207.
- [10] 邓远北,周润兰.应用概率统计[M].北京:科学出版社,2001:197-201.