

植物源农药银杏酚酸提取工艺研究

张翠翠¹, 于蓓蓓¹, 闫雪生¹, 王芳², 林慧彬^{1*}

(1. 山东省中医药研究院, 山东济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 山东济南 250013)

摘要 [目的]利用正交设计优化从银杏外种皮中提取银杏酚酸的工艺条件,为植物源农药的开发奠定基础。[方法]采用二氯甲烷回流提取方法,以银杏酚酸的提取量为指标,采用正交试验设计的方法,系统考察提取时间、料液比、提取温度和提取次数4个因素对银杏酚酸提取工艺的影响,用高效液相色谱法测定银杏酚酸的含量。[结果]以二氯甲烷为提取溶剂,采用1:10(g:mL)的料液比,在60℃条件下回流提取2次,每次1h为最优提取条件;相关因素方差分析表明,提取温度对提取效果有显著影响。[结论]该提取工艺稳定可靠、成本低,具有应用价值。

关键词 银杏酚酸;植物源农药;回流提取;工艺优化;正交试验

中图分类号 R284.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)20-0151-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.20.039



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Extraction Process of Ginkgo Phenolic Acid from Botanical Pesticide

ZHANG Cui-cui, YU Bei-bei, YAN Xue-sheng et al (Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014)

Abstract [Objective] Orthogonal design was used to optimize the technological conditions for extracting ginkgolic acids from ginkgo seed coats, laying a foundation for the development of plant-derived pesticides. [Method] The extraction amount of ginkgo phenolic acid was measured by dichloromethane reflux method, and the method of orthogonal experimental design was used to systematically extract. The effects of extraction time, solid-liquid ratio, extraction temperature and extraction times on the extraction process of ginkgo phenolic acid were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). [Result] Using dichloromethane as extraction solvent, using 1:10 (g:mL) solid-liquid ratio, refluxing at 60 °C for 2 times, each time for 1 h was the optimal extraction condition. Correlation factor analysis showed that the extraction temperature had a significant effect on the extraction effect. [Conclusion] The extraction process is stable and reliable, low cost and has application value.

Key words Ginkgo phenolic acid; Botanical pesticides; Reflux extraction; Process optimization; Orthogonal test

银杏(*Ginkgo biloba* L.)俗称白果,为银杏科银杏属落叶乔木,是裸子植物中最古老的孑遗植物,被誉为“活化石”,是我国特有的药用植物,其药用成分主要包括黄酮类、内酯类、有机酚酸类等,目前银杏黄酮和内酯在临床上主要用于延缓衰老、改善血液循环、治疗心脑血管疾病、提高机体免疫力等方面^[1-2]。长期以来,人们只重视银杏的医疗价值,含有对人体有强致敏和致突变作用^[3-4]银杏酚酸的外种皮经常被作为有毒有害物质而脱除。随着研究的不断深入,研究人员发现银杏酚酸性化合物具有杀菌抑菌^[5]、抗炎抗氧化^[6]、抗肿瘤^[7]、防治病虫害^[8]的药理作用,尤其是在农业害虫防治方面具有广阔应用前景^[9]。郑许松等^[10]研究了银杏叶粗提物对桃蚜种群的影响,结果表明,银杏叶提取物对桃蚜有较强的拒食作用、胃毒毒杀作用和生长发育抑制作用。Jacobson^[11]研究发现银杏叶和根的提取物对亚洲玉米螟有致死和拒食活性。邓业成等^[12]测定了银杏叶及外种皮提取物对褐飞虱、桃蚜和菜粉蝶幼虫的触杀毒力,结果表明,它们对褐飞虱和桃蚜有很高的触杀活性,对菜粉蝶有一定的触杀活性。张素军等^[13]研究银杏酚酸对甜瓜白粉病的防治作用,结果表明,10%银杏酚酸悬浮剂对甜瓜白粉病具有良好防效,防

效优于80%多菌灵可湿性粉剂,且对甜瓜生长安全,是防治甜瓜白粉病较理想的生物药剂之一。因此,将其提取出来作为一种具有药效作用的物质应用于农业害虫防治是十分必要的。目前,银杏酚酸提取工艺有浸提法、超临界CO₂萃取法、回流提取法和超声萃取法等方法^[14-16],该研究将对银杏外种皮中银杏酚酸的提取方法进行优化,最终以二氯甲烷作为提取溶剂进行加热回流提取,提取效率较高,可行性较好,以期银杏外种皮中银杏酚酸的提取提供一个较好的方法,更好地开发银杏的价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器。LC-350A 超声波中药处理机(济宁市中区鲁超仪器厂);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HH-S4 数显电子恒温水浴锅(江苏金坛市晶玻实验仪器厂);DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);Sartorius BP211D 电子天平(上海卓精电子科技有限公司);Waters 600 高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司)。

1.1.2 试剂。白果新酸(纯度≥98%,成都普思生物科技股份有限公司,批号PS000113);总银杏酸A(纯度≥98%,成都普思生物科技股份有限公司,批号11594-201605);总银杏酸B(纯度≥98%,成都普思生物科技股份有限公司,批号111594-201605);95%乙醇、石油醚和二氯甲烷为分析纯,水为屈臣氏饮用水,甲醇、冰乙酸为色谱纯。

1.1.3 试材。银杏外种皮购于山东济南,经山东省中医药研

基金项目 国家重点研发计划(2017YFC1701500, 2017YFC1701502, 2017YFC1701504, 2017YFC1702701);中央本级重大增减支项目(2060302);济南市农业应用技术创新计划项目(CX202112)。

作者简介 张翠翠(1996—),女,山东德州人,硕士研究生,研究方向:中药资源与质量控制。*通信作者,研究员,博士,博士生导师,从事中药资源与质量控制研究。

收稿日期 2021-12-07;修回日期 2022-01-18

究院中药资源室林慧彬研究员鉴定为银杏科植物银杏的外种皮。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的制备。将购买来且经过专家鉴定合格的银杏外种皮放在烘箱中,将烘箱温度调至 70 ℃ 烘干,粉碎过 60 目筛,作为后续取样的样品。

1.2.2 银杏外种皮中银杏酚酸的含量方法的建立。

1.2.2.1 对照品溶液的配制。精密称取对照品 2 mg 置 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤即得银杏酚酸对照品溶液。

1.2.2.2 供试品溶液的配制。精密称取银杏粉 0.2 g 置 100 mL 圆底烧瓶,加二氯甲烷 50 mL,称定加入银杏粉和二氯甲烷的圆底烧瓶重量,70 ℃ 加热回流提取 3 h,称重并补足失重,过滤取续滤液 3 mL,用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤即得银杏酚酸供试品溶液。

1.2.2.3 色谱条件。lichrospher C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm) 高效液相色谱柱;流动相为甲醇-3% 乙酸水 (92:8),流动相流速为 1 mL/min,检测波长为 310 nm,柱温为 30 ℃。银杏酚酸混合物、白果新酸对照品及样品色谱图见图 1。

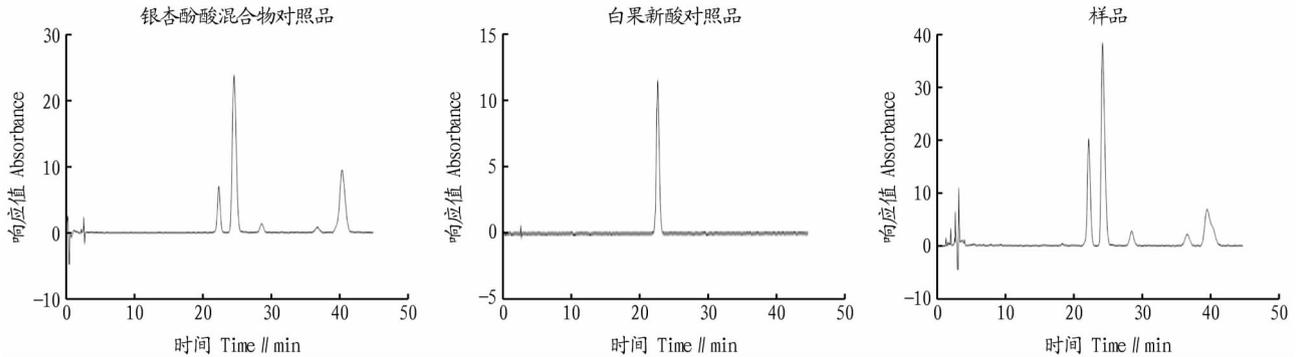


图 1 对照品及样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of reference substance and sample

1.2.2.4 线性关系考察。精密称取 2 mg 白果新酸置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,精密吸取 0.1、0.3、0.5、1.0、1.5 mL 分别置于 2 mL 容量瓶中,用甲醇定容,分别用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得不同浓度的对照品溶液,以峰面积为纵坐标 (Y)、白果新酸对照品浓度 (mg/mL) 为横坐标 (X) 进行线性回归,得回归方程为 $Y=86.828X-0.0538$ ($r=0.9996$),结果表明白果新酸在 0.010 35~0.207 00 mg/mL 具有良好的线性关系。

1.2.2.5 精密度试验。精密吸取对照品溶液,在 310 nm 连续测定峰面积 6 次,记录峰面积。结果显示峰面积的 RSD 为 0.6%,表明仪器精密度良好。

1.2.2.6 稳定性试验。取同一供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 进样,记录 HPLC 色谱图,结果发现银杏酚

酸含量的 RSD 为 1.22%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

1.2.2.7 重复性试验。取银杏粉末 6 份,每份约 0.2 g,精密称定重量,按照“1.2.2.2”方法制备供试品溶液,并按“1.2.2.3”色谱条件进样。结果发现银杏酚酸含量的 RSD 为 1.94%,表明试验重复性良好。

1.2.2.8 加样回收率试验。精密称取已知含量的银杏粉末 6 份,每份约 0.1 g,加入白果新酸对照品,按照“1.2.2.2”方法制备供试品溶液,并按“1.2.2.3”色谱条件进样,使用高效液相色谱法进行含量测定^[17],并计算回收率。从表 1 可以看出,平均回收率为 97.83%,RSD 为 1.96%,表明该测定方法回收率良好。

表 1 加样回收率试验结果

Table 1 Results of sample addition recovery test

序号 No.	样品含量 Sample content//g	对照品加入量 Dosage of reference substance//mg	测得量 Measured quantity//mg	回收率 Recovery rate//%	平均回收率 Mean recovery rate//%	RSD//%
1	10.70	10.70	20.55	96.04	97.83	1.96
2	10.70	10.70	20.59	96.20		
3	10.70	10.70	20.57	96.13		
4	10.70	10.70	21.19	99.02		
5	10.70	10.70	21.25	99.28		
6	10.70	10.70	21.46	100.30		

1.2.3 单因素试验。按“1.2.2.2”方法对提取工艺中各因素进行考察:①以提取时间 1、2、3、4、5 h 分别提取;②以提取温度 40、50、60、70、80 ℃ 分别提取;③以料液比 1:4、1:6、1:8、1:10、1:12 (g:mL) 分别提取;④以提取次数 1、2、3、4、5 次分别提取。

1.2.4 正交试验优化提取工艺。由文献研究^[18-21]和单因素试验结果可知各因素对银杏外种皮银杏酚酸提取的影响,采用 L₉(3⁴) 正交设计表,以银杏酚酸提取量为评价指标,对提取温度、提取时间、料液比、提取次数进行考察。

1.3 数据处理 利用正交试验助手及 Excel 等数据处理软

件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验 从图 2 可以看出,随着提取时间的延长,提取效率有降低趋势,所以结合实际情况,选择提取时间 1~3 h 作为后续正交试验的因素水平。提取温度为 60 °C 时提取效率最高,选择提取温度 40~80 °C 作为后续正交试验的因

素水平。料液比在 1:8 之前提取效率略有降低趋势,1:8 之后提取效率大幅提升,所以结合实际情况,选择料液比 1:6~1:10 作为后续正交试验的因素水平。提取次数 3 次时提取效率最高,所以结合实际情况,选择提取次数 1~3 次作为后续正交试验的因素水平。

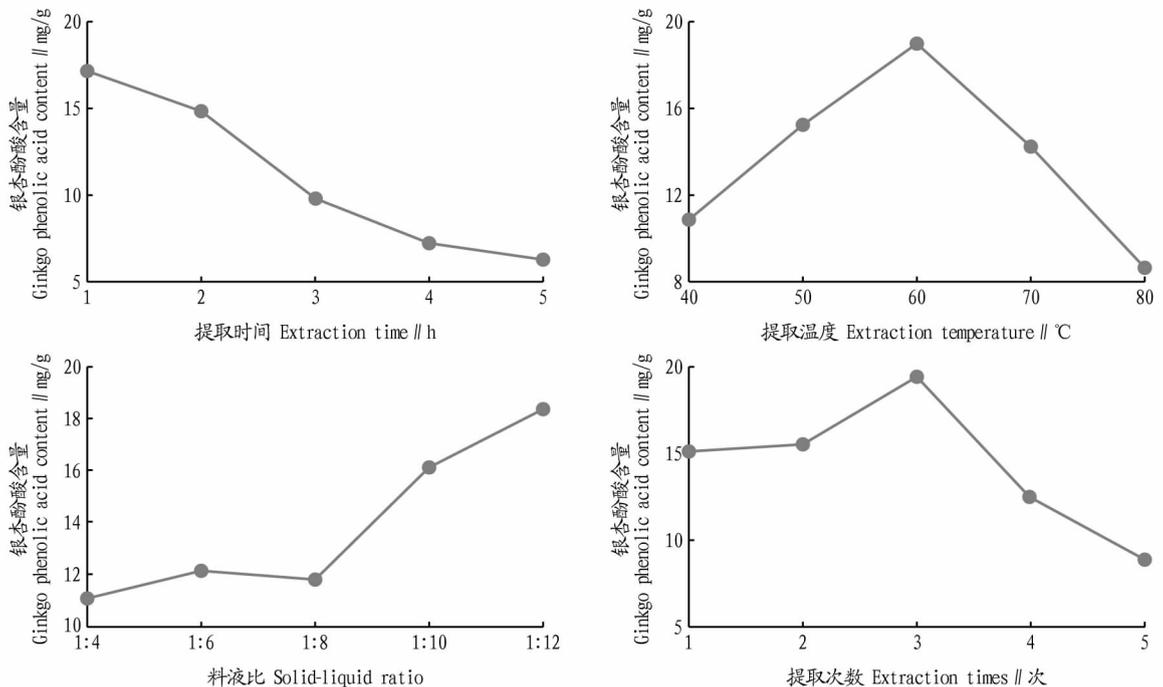


图 2 单因素试验结果

Fig.2 Single factor test results

2.2 正交试验 从正交试验结果的极差分析(表 2)可知,二氯甲烷提取银杏外种皮中银杏酚酸的主次影响因素为 B>D>C>A,即提取温度>提取次数>料液比>提取时间。方差分析表明,提取温度对银杏酚酸提取量有显著影响,而提取时间

对提取量几乎没影响,提取次数和料液比有影响。结合试验结果和生产成本,该试验可以得出最佳的提取工艺条件为 A₁B₂C₃D₂,即提取时间为 1 h,提取温度为 60 °C,料液比为 1:10,提取次数为 2 次。

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results

试验号 Test No.	A(提取时间 Extraction time//h)	B(提取温度 Extraction temperature//°C)	C(料液比 Solid-liquid ratio)	D(提取次数 Extraction times//次)	银杏酚酸含量 Ginkgo phenolic acid content//mg/g
1	1(1)	1(40)	1(1:6)	1(1)	8.15
2	1	2(60)	2(1:8)	2(2)	17.66
3	1	3(80)	3(1:10)	3(3)	20.17
4	2(2)	1	2	3	10.27
5	2	2	3	1	16.53
6	2	3	1	2	15.79
7	3(3)	1	3	2	14.60
8	3	2	1	3	16.40
9	3	3	2	1	11.75
k ₁	15.33	11.01	13.45	12.14	
k ₂	14.20	16.86	13.23	16.02	
k ₃	14.25	15.90	17.10	15.61	
R	1.13	5.85	3.87	3.88	

2.3 工艺验证试验 经过 3 次工艺验证,银杏酚酸含量的 RSD 为 0.8%,表明在试验范围内正交试验优选的提取工艺稳定可行、重现性好。

3 结论与讨论

该试验选用加热回流法提取银杏外种皮中银杏酚酸,利用 HPLC 测定其含量。通过单因素筛选主要影响因素,正交

试验对提取的最佳工艺条件进行优化。确定银杏酚酸最佳提取工艺:提取溶剂为二氯甲烷,提取温度为60℃,料液比为1:10,提取时间为1h,提取次数为2次。经试验验证,该工艺稳定可行、重现性好、成本低,银杏酚酸提取量较高,为银杏外种皮中银杏酚酸的提取提供方法学依据。

银杏因其自身经过自然选择进化而来的高效防卫系统,很少受到昆虫和其他有害生物的伤害,而这种防卫作用与植物各器官或部位所具有的次生化学物质有着密切关系,经研究发现这一切均源于银杏的酚酸类成分。长期以来人们只重视银杏的医疗价值,含有大量有毒酚酸类成分的银杏外种皮在加工过程中经常被当作废物遗弃,既污染环境又浪费资源。将银杏外种皮中酚酸类成分提取出来,使其变废为宝,为植物源农药的开发奠定了良好基础,为银杏的综合开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 杨慧萍,高睿.银杏药用成分及药理作用研究进展[J].动物医学进展,2017,38(8):96-99.
- [2] 高华荣.银杏叶提取物的药理作用[J].中国实用医药,2010,5(16):168-169.
- [3] 刘欣,党娅,耿敬章.银杏酸的药理活性及应用研究进展[J].中国西部科技,2012,11(2):32-33,11.
- [4] 刘平平,潘苏华.银杏叶制剂中银杏酚酸研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(3):274-277.
- [5] 冯致,杨竣茹,李萌,等.银杏酚酸生物活性及合成途径研究进展[J].安徽农业科学,2020,48(23):35-43.
- [6] 邵泽艳,姜艳秋.银杏酸的药理作用及银杏叶提取物脱酸方法研究进展

(上接第147页)

- [15] YAO Y P,LI Y,HUANG Z L,et al.Targeted selection of *Trichoderma* antagonists for control of pepper *Phytophthora* blight in China[J].Journal of plant diseases and protection,2016,123(5):215-223.
- [16] 李泽锋,李娜,刘金华,等.生物炭对辣椒果实品质和产量的影响[J].吉林农业大学学报,2016,38(6):686-692.
- [17] 汪坤,魏跃伟,姬小明,等.生物炭基肥与哈茨木霉菌剂配施对烤烟和植烟土壤质量的影响[J].作物杂志,2021(3):106-113.
- [18] 吕娜,沈宗专,王东升,等.施用氨基酸有机肥对黄瓜产量及土壤生物学性状的影响[J].南京农业大学学报,2018,41(3):456-464.
- [19] 柳晓磊,齐钊,闫臻,等.复合微生物菌剂与氨基酸水溶肥组合施用对

(上接第150页)

烤烟生长中后期缺钾,从而提高中上部烟叶的产质量。

针对目前烤烟种植强调适产提质的背景下,烤烟增产的同时要注重烟叶品质的提升,因此笔者认为将硝酸钾、硫酸钾推迟到现蕾初期追施完将有利于提升赣州烟叶的产质量,提高烟叶的工业可用性。

参考文献

- [1] 朱显灵.论我国烟叶生产持续发展战略[J].安徽农学通报,1996,2(2):14-17.
- [2] 胡鸾堂.植物营养遗传学(下册)[M].北京:北京农业大学出版社,2004.
- [3] 金辽,李伟,章友爱,等.不同追施钾肥模式对烤烟生长的影响[J].南方农业,2018,12(28):44-49.
- [4] 郭春燕.钾肥施用方式及配施不同有机酸对烤烟烟叶生理特性及产质量的影响研究[D].郑州:河南农业大学,2013.
- [5] 刘会杰,赵钦铭,闻刚,等.种植密度和施钾量对烤烟品质的影响[J].西南农业学报,2013,26(2):653-658.
- [6] 蔡永占,韩小女.生物钾肥对烤烟含钾量及品质影响的研究进展[J].农学学报,2016,6(11):37-41.
- [7] 胡鹏翔.不同施用钾肥烟草中挥发油成分变化研究[D].郑州:郑州大

- [J].乡村科技,2018(11):111-113.
- [7] LI H,MENG X F,ZHANG D,et al.Ginkgolic acid suppresses the invasion of HepG2 cells via downregulation of HGF/c-Met signaling[J].Oncology reports,2019,41(1):369-376.
- [8] 石启田.银杏酚酸类物质防治农业害虫的研究[J].林产化学与工业,2004,24(2):84-87.
- [9] 刘刚.银杏酚酸在农业害虫防治上具有广阔应用前景[J].北京农业,2009(25):48.
- [10] 郑许松,俞晓平,吕仲贤,等.银杏叶粗提物对桃蚜种群的抑制作用[J].浙江农业学报,2002,14(5):260-264.
- [11] JACOBSON M.USDA agriculture handbook[M].Washington DC:Govt. Printing Office,1975.
- [12] 邓业成,徐汉虹,雷玲.银杏提取物对3种农业害虫的触杀活性[J].华南农业大学学报,2004,25(3):61-63.
- [13] 张素军,田枫,刘延刚,等.银杏酚酸悬浮剂防治甜瓜白粉病的效果研究[J].中国果菜,2018,38(11):43-46.
- [14] 韩军成.银杏外种皮中银杏酸的提取纯化、抗菌活性及安全性评价研究[D].合肥:合肥工业大学,2013.
- [15] 赵东亚,唐进根,陈利红,等.银杏外种皮提取银杏酸工艺的优化试验[J].林业科技开发,2012,26(5):79-82.
- [16] 何康.银杏生物活性物质提取的工艺优化及应用研究[D].武汉:武汉理工大学,2016.
- [17] 吴向阳,仰榴青,陈钧.高效液相色谱法测定银杏叶提取物及其制剂中银杏酸的含量[J].药学学报,2003,38(11):846-849.
- [18] 刘茂顺,葛乃嘉,苏益平,等.正交设计优化碱提朝鲜淫羊藿总黄酮的工艺研究[J].吉林医药学院学报,2018,39(6):426-429.
- [19] 李文超,梁启超,巩丽虹,等.芦竹根总生物碱提取工艺优选的正交试验设计[J].中国现代中药,2018,20(5):604-608.
- [20] 王文军.银杏叶中银杏酸的高效提取方法研究[D].长沙:湖南师范大学,2017.
- [21] 孙耀冉,郭娜娜,袁绪宝,等.正交设计法优化藜藜中总黄酮回流提取工艺[J].工业技术创新,2014,1(4):428-431.

- [1] 151-158.
- [20] 王蓓,高旭,王甜甜,等.叶面喷施含氨基酸水溶肥料在辣椒和豇豆上的肥效[J].土壤,2017,49(4):692-698.
- [21] 张瑞福,沈其荣.抑菌型土壤的微生物区系特征及调控[J].南京农业大学学报,2012,35(5):125-132.
- [22] SCHLATTER D,KINKEL L,THOMASHOW L,et al.Disease suppressive soils:New insights from the soil microbiome[J].Phytopathology,2017,107(11):1284-1297.
- [23] 齐钊,张曼丽,闫臻,等.联合施用微生物菌剂和氨基酸水溶肥对哈密瓜土壤性质及细菌群落结构的影响[J].热带生物学报,2019,10(4):352-359.

学,2012.

- [8] 王树会,张卫民,李润.云南红河红壤上施钾对烤烟品质的影响[J].南京农业大学学报,1999,22(3):117-119.
- [9] 常爱霞,杜咏梅,付秋娟,等.烤烟主要化学成分与感官质量的相关性分析[J].中国烟草科学,2009,30(6):9-12.
- [10] 胡文智,王晴,苗慧莹,等.钾肥施与叶面喷施对烤烟含钾量的影响[J].西北农业学报,2010,19(9):119-123.
- [11] 曹志洪,周秀如,李仲林,等.我国烟叶含钾状况及其与植烟土壤环境条件的关系[J].中国烟草,1990,11(3):6-13,20.
- [12] 郑传刚,吴昊,余祥文,等.钾肥调控对烤烟光合作用和产量及品质的影响[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2015,41(6):621-626.
- [13] 刘润生,许成,彭耀东,等.复合肥和硝酸钾前后追施对烤烟产质量的影响[J].安徽农业科学,2019,47(22):160-163.
- [14] 解燕,王文楷,赵杰,等.烟草钾素营养与钾肥研究[J].中国农学通报,2006,22(8):302-307.
- [15] 王同朝,刘作新,高致明,等.分期追施钾肥对烤烟生长和品质的影响[J].河南农业大学学报,2002,36(4):348-351.
- [16] 欧阳锋声,苏国栋,罗建新,等.施肥方法对烤烟氮磷钾利用率及产量品质的影响[J].湖南农学院学报,1992,18(S2):425-434.
- [17] 徐敏.不同品种烤烟磷利用反应差异的研究[D].郑州:河南农业大学,2006.
- [18] 刘好宝,吕作新,刘彩萍,等.烤烟不同生育期的钾素营养对烟叶产量和含钾量的影响[J].中国烟草学报,1998,4(1):60-64.