**银杏叶黄素皂化工艺研究**

作者：彭晓燕，彭燕妮，沈燕艳，王珉，袁文秀，康玲丽

指导教师：吴彩娥，范龚健

[摘 要]叶黄素广泛存在于蔬菜、花卉和水果等植物中，是一种重要的天然抗氧化剂。本文以银杏叶石油醚萃取物为原料，考察皂化时间、皂化温度和液料比对银杏叶黄素得率的影响，在单因素实验基础上设计Box-Behnken试验，通过对银杏叶黄素得率二次多项数学模型解逆矩阵，得出最佳皂化条件为：皂化时间2.5 h，皂化温度58℃，液料比为3∶1，此时叶黄素得率达到1.293 mg/ml。经高效液相色谱分析，皂化后银杏叶黄素纯度达到90.1%。

[关键词]银杏；叶黄素；皂化

**Saponification process from of lutein from ginkgo biloba leaf**

PENG Xiao-yan, PENG Yan-ni,SHEN Yan-yan, WANG Min,YUAN Wen-xiu,KANG Ling-li

WU Cai-e,FAN Gong-jian

Abstract: Lutein, which is widely present in vegetables, flowers and fruit and other plants, is a kind of important natural antioxidant. In this paper, the extract of petroleum ether from Ginkgo biloba leaf were used as raw material, the influence of the saponification time, hydrolysis temperature and ratio of material to liquid on the yield of Ginkgo lutein were investigated. On the basis of single factor experiment, the Box-Behnken test was designed.It was indicated that the optimum saponification conditions: the saponification time 2.5 h, saponification temperature 58 ℃, solid-liquid ratio was 3∶1, the lutein yield reached 1.19 mg/ml. Analyzed by HPLC, the saponification of Ginkgolutein purity reached 90.1%.

Key words:Ginkgo biloba; Lutein; saponification

1. 引 言

叶黄素是类胡萝卜素的一种，系统名称为3,3'-二羟基-胡萝卜素。它广泛存在于自然界的植物体中，如万寿菊[1]，金盏花[2]、菊花[3]等，其中万寿菊中含量最多。叶黄素用途非常广泛，可广泛应用于食品、化妆品、医药、烟草和禽类饲料等领域[4]。早在20世纪80年代中期，西方医学人员即发现：植物所含天然叶黄素是一种性能优异的抗氧化剂。近年来国外对于提取叶黄素的研究发展非常快，专利报道[5]也很多。在国际市场上，1 g叶黄素的价格与1 g黄金相当，所以人们把它称为“植物黄金”。

银杏叶作为药用研究，主要是对银杏叶中黄酮甙和萜内酯的提取利用，国内外都已有规模化专业化生产，但对于银杏叶及提取了黄酮甙和萜内酯后的废弃物中所含类胡萝卜素的研究则较少[6]。银杏叶中除了大量的黄酮甙和萜内酯外，还含有部分类胡萝卜素。当GBE生产过程中采用高浓度的乙醇作溶剂时，银杏叶中的部分脂溶性色素与黄酮类物质同时被萃取[7]。这些萃取液在进行浓缩回收乙醇，分离黄酮后，留下废弃的脂溶性物质和部分叶绿素，这些物质与目前国内外市场流通的辣椒油树脂、万寿菊油树脂等基本相似，可称其为银杏叶油树脂，如经科学加工，合理利用，作为类胡萝卜素着色剂。本文以银杏叶石油醚提取物为原料，考察皂化时间、皂化温度和皂化液料比对银杏叶黄素得率的影响，在单因素基础上设计Box-Behnken响应面试验，通过对银杏叶黄素得率二次多项数学模型解逆矩阵，得出叶黄素提纯的最佳条件。在此基础上，通过高效液相色谱分析银杏叶黄素的纯度，为银杏叶黄素的开发利用提供技术支持。

1. 材料与方法
   1. 试验材料

银杏叶，于2012年采自南京林业大学银杏园。

* 1. 银杏叶石油醚提取物制备

将银杏叶洗净、烘干后粉碎，按1∶100的比例加入石油醚，在常温下萃取24 h，萃取液浓缩后的到银杏叶石油醚提取物。

* 1. 银杏叶黄素酯皂化单因素实验
     1. 皂化温度的选择

准确称取5 ml的银杏叶石油醚提取物，和10 ml 20%的氢氧化钠溶液放入25 ml的三角烧瓶内，摇动几分钟直到溶液混匀。然后将三角烧瓶放入水浴锅中，水浴1 h。皂化温度分别为55℃，60℃，65℃，70℃和75℃，考察不同皂化温度对银杏叶黄素得率的影响，每组实验重复做3次，计算银杏叶黄素得率。

* + 1. 皂化时间的选择

准确称取5 ml的银杏叶石油醚提取物，和10 ml的氢氧化钠溶液放入25 ml的三角烧瓶内，摇动几分钟直到溶液混匀。然后将三角烧瓶放入水浴锅中，在最适的皂化温度下皂化，选择皂化时间为0.5 h，1 h，1.5 h，2 h和2.5 h，考察不同皂化温度对银杏叶黄素得率的影响，每组实验重复做3次，计算银杏叶黄素得率。

* + 1. 皂化液料比的选择

准确称取5 ml的银杏叶石油醚提取物，分别按1∶1，2∶1，3∶1，4∶1和5∶1的液料比加入的20%氢氧化钠溶液，摇动几分钟直到溶液混匀。然后将三角烧瓶放入水浴锅中，在最适的皂化温度和时间下皂化，考察不同皂化液料比对银杏叶黄素得率的影响，每组实验重复做3次，计算银杏叶黄素得率。

* 1. Box-Behnken响应面优化

在单因素试验基础上，选取皂化温度（X1），皂化时间（X2）和液料比（X3）作为试验因素，以银杏叶黄素得率为的衡量指标，采用Box-Behnken试验设计，将各因素按其水平及取值范围进行编码，得因素水平编码表，如表1所示。结合响应面分析法，进行回归方程拟合度检验和显著性检验，建立银杏叶黄素得率的回归模型，根据拟合模型绘制的等高线图，分析各试验因素及交互作用对叶黄素得率的影响规律。

表1 试验因素水平编码表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 水 平 | 因 素 | | |
| 皂化温度X1（℃） | 皂化时间X2（h） | 液料比X3∶1 |
| -1 | 55 | 1.5 | 2 |
| 0 | 60 | 2.0 | 3 |
| 1 | 65 | 2.5 | 4 |

* 1. 银杏叶黄素组分分析

采用Xbridge-C18柱（4.6×250 mm，5 μm），35℃，进行HPLC分离，检测器为二极管检测器（DAD）。进液量为20 μl，洗脱液A为甲醇，洗脱液B乙腈，流速为1.0 ml/min，等度洗脱，洗脱剂比例为90∶10。检测波长为474 nm。

* 1. 测定指标

叶黄素得率（mg/ml）：样品皂化结束后，静止等待澄清后，取上清液。用紫外可见分光光度计，以正丁醇为对照，在474 nm下测定叶黄素的吸光值[8]。叶黄素（mg/ml）=21.1864×A，（A=在474 nm处的吸光值，21.1864为叶黄素在474 nm处的消光系数）。

1. 结果与分析
   1. 单因素试验结果分析
      1. 皂化温度对银杏叶黄素得率的影响

皂化温度对银杏叶黄素得率的影响见图1。银杏叶黄素得率随着皂化温度的升高呈先增加后降低的趋势。在55℃到60℃时，叶黄素得率从0.917 mg/ml增加到1.200 mg/ml，温度超过60℃，银杏叶黄素得率随着皂化温度的增加呈下降趋势，皂化温度70℃和75℃之间差异不显著。因此，本研究选取的最佳皂化时间为60℃。



图1 皂化温度对银杏叶黄素得率的影响

* + 1. 皂化时间对银杏叶黄素得率的影响

皂化时间对银杏叶黄素得率的影响见图2。如图所示，银杏叶黄素的得率随着皂化时间的延长呈先增加后降低的趋势。皂化时间2.0 h时，银杏叶黄素得率达到最大值为1.233 mg/ml，继续延长皂化时间，银杏叶黄素开始下降。因此，本研究选择2.0 h为银杏叶黄素皂化的最适时间。



图2 皂化时间对银杏叶黄素得率的影响

* + 1. 液料比对银杏叶黄素得率的影响

如图3所示，银杏叶黄素的得率随着液料比的增加呈先上升后趋于平缓的趋势，液料比为3∶1时，银杏叶黄素的得率达到最大值，为1.197 mg/ml。继续增加液料比，银杏叶黄素得率差异不显著（*P*>0.05）。因此，选择3∶1作为银杏叶黄素的最适的皂化液料比。



图3 液料比对银杏叶黄素得率的影响

* 1. Box-Behnken试验结果分析

在单因素试验基础上，选取皂化温度（X1），皂化时间（X2）和料液比（X3）作为试验因素，以银杏叶黄素得率为衡量指标，采用Box-Behnken试验设计，试验方案及结果如表2所示。

表2 响应面试验设计及结果分析

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 试验号 | 编码水平 | | | 叶黄素得率  （mg/ml） |
| X1（℃） | X2（h） | X3（g/ml） |
| 1 | -1 | 1 | 0 | 1.16 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 1.16 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 1.16 |
| 4 | 1 | 0 | 1 | 1.03 |
| 5 | -1 | -1 | 0 | 1.02 |
| 6 | -1 | 0 | 1 | 1.02 |
| 7 | 0 | 1 | -1 | 1.07 |
| 8 | 0 | 1 | 1 | 1.13 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 1.03 |
| 10 | 0 | -1 | 1 | 1.01 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 1.16 |
| 12 | 1 | -1 | 0 | 1.04 |
| 13 | 1 | 0 | -1 | 0.94 |
| 14 | -1 | 0 | -1 | 1.05 |
| 15 | 1 | 1 | 0 | 1.05 |

利用Design expert软件对表2数据进行多元回归拟合，得到叶黄素的率Y对影响叶黄素纯度的关键因素（X1、X2和X3）的二次多项回归模型为：

Y=1.16-0.023X1+0.039X2+0.012X3-0.032X1X2+0.030X1X3+0.021X2X3-0.072X12-0.021X22-0.076X32。

表3 Box-Behnken试验回归模型方差分析

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F值 | P值 |
| 模型 | 0.065 | 9 | 7.205E-003 | 268.35 | <0.0001 |
| A | 4.174E-003 | 1 | 4.174E-003 | 155.44 | <0.0001 |
| B | 0.012 | 1 | 0.012 | 449.05 | <0.0001 |
| C | 1.160E-003 | 1 | 1.160E-003 | 43.20 | 0.0012 |
| AB | 4.124E-003 | 1 | 4.124E-003 | 153.59 | <0.0001 |
| AC | 3.581E-003 | 1 | 3.581E-003 | 133.36 | <0.0001 |
| BC | 1.718E-003 | 1 | 1.718E-003 | 63.99 | 0.0005 |
| A2 | 0.019 | 1 | 0.019 | 721.11 | <0.0001 |
| B2 | 1.703E-003 | 1 | 1.703E-003 | 63.44 | 0.0005 |
| C2 | 0.021 | 1 | 0.021 | 786.47 | <0.0001 |
| 残差 | 1.343E-004 | 5 | 2.685E-005 |  |  |
| 失拟项 | 9.585E-005 | 3 | 3.195E-005 | 1.66 | 0.3967 |
| 纯误差 | 3.840E-005 | 2 | 1.920E-005 |  |  |
| 总和 | 0.065 | 14 |  |  |  |

注：R2=0.9979，校正R2=0.9942，预测R2=0.9751，相当精度=50.307.

回归方程模型F值= 268.35 >F0.01(9, 10)=4.95，*P*<0.0001，回归是极显著的；复相关指数R2为0.9976，表明约有99.76%叶黄素得率可以用模型解释。单因素中，各因素的分析均达到极显著水平。皂化温度和皂化时间的交互作用对叶黄素得率的影响极显著（*P*﹤0.0001）。皂化温度和料液比的交互作用对叶黄素得率影影响极显著（*P*<0.0001）；皂化时间和料液比的交互作用对叶黄素得率影响显著（*P*=0.0005<0.01）；

* 1. 银杏叶黄素皂化工艺响应面优化

应用Design Expert 8.06软件，对表2中的试验结果进行响应面分析，各因素对叶黄素得率的影响如图4-图6所示。

由图4可知，皂化时间和皂化温度交互影响叶黄素的得率。因为等高线的形状反映交互效应的强弱大小，椭圆形表示两因素交互作用显著。皂化液料比为3∶1，皂化时间一定时，随着皂化温度的增加，叶黄素得率为减少后逐渐增加的趋势；皂化温度一定时，随着皂化时间的延长，叶黄素的率逐渐减少的趋势。

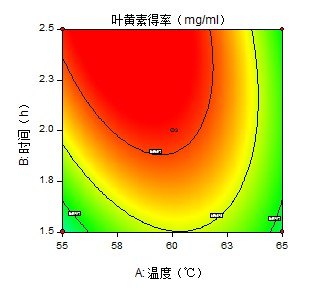


图4 皂化时间和皂化温度对叶黄素得率的影响

皂化液比和温度交互影响叶黄素得率见图5。皂化时间为2.0 h，在本试验水平范围内，随着皂化温度的增加，叶黄素得率先增加，当达到最高值后，随着皂化温度的继续增加，叶黄素得率迅速下降。皂化温度一定，随着料液比的增加，叶黄素得率呈先增加后降低的趋势。

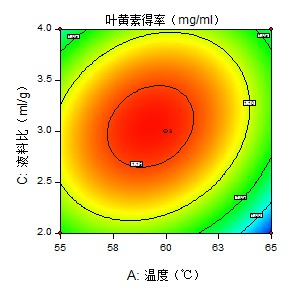


图5 皂化液料比和皂化温度对叶黄素的率的影响

Fig. 5 effect of liquid-to-solid ratio and saponification temperature on the yield of ginkgo lutein

由图7可见，液料比和时间交互影响叶黄素得率。液料比为3∶1时，随着皂化时间的延长，叶黄素得率呈明显降低的趋势，而且随着时间的升高叶黄素得率越低。皂化时间一定，随着料液比的增加，叶黄素得率呈先上升趋势，但是趋势不明显。所以，在适当的时间和料液比一定时，叶黄素的得率最大。

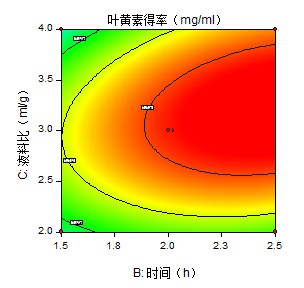


图6 皂化液比和皂化时间对叶黄素的率的影响

综上分析，对银杏叶黄素得率的二次多项数学模型解逆矩阵，用Box-Behnken响应面优化得到叶黄素得率的最适皂化温度为58℃，皂化时间为2.5 h，液料比为3∶1，在此条件下，叶黄素得率达到最大值，得率为1.293 mg/ml。

* 1. 银杏叶黄素液相分析

银杏叶黄素皂化前后的液相图谱见图7和图8。银杏叶黄素皂化前，溶液中存在较多的吸收峰，在4.00 min后有吸收峰，和已有文献比较发现，此吸收峰为叶黄素。皂化后，溶液中的吸收峰明显减少，在4.00 min后的吸收峰含量显著增加。可见，皂化后银杏叶黄素纯度较高，液相结果表明，皂化后的纯度达到90.1%。



图7 银杏叶黄素皂化前液相图谱



图8 银杏叶黄素皂化后液相图谱

1. 结 论

本研究运用响应面法对银杏叶黄素皂化工艺进行了优化，建立的银杏叶黄素得率的二次多项数学模型具有显著性（*P*<01001），且有99.76%银杏叶黄素得率可以用次模型解释；由模型解逆矩阵得到：在皂化温度58℃，皂化时间2.5 h，液料比为3∶1时，银杏叶黄素得率达到最大值，得率为1.293 mg/ml，经高效液相色谱分析，银杏叶黄素的纯度达到90.1%。

[参考文献]

[1]王闯 ，李大婧，宋江峰，刘春泉. 万寿菊花中反式叶黄素提取皂化工艺的优化[J]. 食品科学，2010,31（24）：95-101.

[2]罗进，刘思曼，边清泉.七种菊花叶黄素含量比较[J]. 中药材，2005,28（12）：1056-1058.

[3]周彦芳, 刘强, 杨宪忠, 张秀华. 金盏花黄色素提取工艺的研究[J].安徽农业科学，2009,37（18）：8680-8681.

[4]杨铃，陈金伟. 叶黄素的提取及应用研究进展[J]. 食品科技，2012,37（5）：199-203.

[5]李芬芳. 一种催化皂化万寿菊油膏制备叶黄素晶体的方法[P]. 中国CN102887848A，2013年1月23日.

[6]喻林华，王义强，蓝华，王爽. 银杏叶或银杏叶提取物药理作用机制的研究进展[J]. 北方园艺，2012，（10）：188-190.

[7]尹晴红，谢一芝，周丽英，陈明，蔺定运. 银杏叶类胡萝卜素的研究[J]. 金陵科技学院学报，2006,22（2）：65-68.

[8]申利英. 高纯度叶黄素的制备及其衍生物的合成[D].兰州：兰州理工大学，2009.