

葛金涛,吴秋月,刘兴满,等. 银杏雄株叶片聚戊烯乙酸酯水解的最佳工艺研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(16):170-173.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.16.043

银杏雄株叶片聚戊烯乙酸酯水解的最佳工艺研究

葛金涛¹, 吴秋月², 刘兴满¹, 王丽丽¹, 赵统利¹

(1. 连云港市农业科学院, 江苏连云港 222006; 2. 连云港市海州区农林水利局, 江苏连云港 222006)

摘要:银杏聚戊烯醇是银杏叶中重要的药用、保健作用的有效成分,其主要以乙酸酯的形式存在,少量以游离醇的形式存在,在提取银杏聚戊烯醇的过程中将聚戊烯乙酸酯水解为聚戊烯醇,可提高银杏叶中聚戊烯醇的含量。在单因素试验的基础上,利用响应面法优化银杏雄株叶片聚戊烯乙酸酯水解的工艺,以影响聚戊烯乙酸酯水解的料液比、时间、温度为主要作用因子,采用高效液相色谱法(HPLC)测定聚戊烯醇含量,经 Design-Expert 软件分析数据,得到银杏雄株叶片聚戊烯乙酸酯水解的最佳条件为料液比 1 g : 3 mL、水解时间 90 min、水解温度 37 ℃,在此最佳工艺组合条件下,银杏雄株叶片中聚戊烯醇得率的实际测定值达 1.536%。

关键词:银杏雄株;聚戊烯乙酸酯;聚戊烯醇;响应面法;HPLC

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)16-0170-04

银杏聚戊烯醇是由 15~21 个异戊烯单元构成的线性类脂化合物,具有重要的药用和保健价值^[1]。研究表明,银杏聚戊烯醇是人体多萜醇的结构类似物,是合成人体多萜醇及其衍生物的最佳中间体,代谢后可形成多萜醇以补充人体内多萜醇的不足,而多萜醇是人体生理活动不可缺少的元素之一,因此,银杏聚戊烯醇具有重要的生理和药用价值,可以提高人体的免疫功能^[2]、抑制癌细胞转移^[3]、促进肝细胞再生^[4]以及增强膜的融合^[5]等。

收稿日期:2016-04-06

基金项目:江苏省连云港市科技局农业科技攻关项目(编号:CN1301)。

作者简介:葛金涛(1987—),男,山东潍坊人,硕士,助理研究员,主要从事果树与观赏树木遗传育种研究。E-mail:672643419@qq.com。

通信作者:吴秋月,硕士,农艺师,主要从事果树与观赏树木遗传育种研究。E-mail:709728218@qq.com。

的 MR 曲线和试验的 MR 之间是非常吻合的。其他物料如番茄切片^[5]、苹果渣^[6]、茄子切片^[8]等干制过程也与 Page 方程拟合度很高。

3 结论

热风温度对热烫油豆角薄层热风干燥特性的影响是显著的。在试验温度范围内,温度越高、油豆角的干燥速率越快,干燥时间越短。油豆角薄层热风干燥过程以降速干燥为主,没有发现恒速干燥阶段。5 种经验薄层干制数学模型的拟和结果表明,由 Page 模型拟和所得 r^2 最高, χ^2 、RMSE 最小,是模拟油豆角薄层热风干燥过程最适合的数学模型。

参考文献:

- [1] 刘大军,冯国军,杨光. 东北油豆角生产形势及发展策略[J]. 北方园艺,2006(3):44-45.
- [2] 王伟. 油豆角贮藏保鲜技术研究进展[J]. 农产品加工·学

银杏聚戊烯醇主要以乙酸酯(polyprenyl acetates, PPAs)的形式存在于银杏叶片中,少量以游离醇(polyprenyl alcohols, PPs)的形式存在。因此,采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析聚戊烯醇时,需对样品进行水解处理,将 PPAs 转变为 PPs。水解采用的皂化剂一般有 2 种,一种是水-碱溶液,如 NaOH-H₂O、KOH-H₂O 等;另一种是醇-碱溶液,如 NaOH-乙醇/甲醇等。Tateyama 等采用浓度较高的 KOH 溶液在 70 ℃ 以上进行水解^[6-7]。Huh 等采用弱碱 K₂CO₃ 溶液水解,反应时间长达 12 h^[8]。杨克迪等采用 5% NaOH 甲醇溶液在常温下水解样品,聚戊烯乙酸酯完全水解的时间仅需 2.5 h^[9]。综合前人的研究经验,本试验采用 5% NaOH 甲醇溶液作为皂化剂,利用单因素试验和响应面法(response surface methodology, RSM)探讨料液比、水解时间及水解温度 3 个影响因子及各影响因子之间的交互作用对银杏雄株叶片中聚戊烯乙酸酯水解的影响规律,进而得到最佳的工艺组合。

刊,2008(7):128-130.

- [3] Vega A, Fito P, Andres A, et al. Mathematical modeling of hot-air drying kinetics of red bell pepper (var. *Lamuyo*) [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79(4):1460-1466.
- [4] 韩涛,李丽萍,艾启俊. 漂烫对蔬菜果实质地的影响及低温漂烫作用的机理[J]. 食品工业科技, 2003, 24(2):89-91.
- [5] Demiray E, Tulek Y. Thin-layer drying of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rio Grande) slices in a convective hot air dryer [J]. Heat and Mass Transfer, 2012, 48(5):841-847.
- [6] Wang Z F, Sun J H, Liao X J, et al. Mathematical modeling on hot air drying of thin layer apple pomace [J]. Food Research International, 2007, 40(1):39-46.
- [7] Erbay Z, Icier I. A review of thin layer drying of foods: theory, modeling, and experimental results critical [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2010, 50(5):441-464.
- [8] Doymaz İ, Göl E. Convective drying characteristics of eggplant slices [J]. Journal of Food Process Engineering, 2011, 34(4):1234-1252.

1 材料与方法

1.1 试验材料

银杏(*Ginkgo biloba* L.)叶片,于2011年9月取自扬州大学银杏园内栽培管理一致的20株十三年生雄株,每株采集100片。采摘后洗净,沥干,105℃杀青,80℃烘干,粉碎过80目筛得银杏叶粉末,置于-18℃密封保存。聚戊烯醇标准品(C₉₀-Prenol),购自瑞典Larodan公司;水解用的石油醚、正己烷、乙酸乙酯,均为分析纯,HPLC用的甲醇、异丙醇、正己烷为色谱纯,200~300目硅胶,HPLC用水为超纯水,其他用水为双蒸水。

高效液相色谱仪(Shimadzu LC-10A),购自日本岛津公司;紫外检测器(SPD-10A),购自日本岛津公司;电热恒温鼓风干燥箱,购自上海森信实验仪器有限公司;超声波清洗器,购自江苏省昆山市超声仪器有限公司;旋转蒸发仪,购自上海亚荣生化仪器厂;高速冷冻离心机,购自湖南长沙平凡仪器仪表有限公司。

1.2 银杏叶聚戊烯醇提取液的制备

称取3g银杏叶粉末进行超声波提取(正己烷为提取溶剂,料液比1g:12mL,超声时间60min,温度38℃),过滤得正己烷提取液,超声波水解(皂化剂为5%氢氧化钠甲醇溶液),取上层黄色澄清液体,旋转蒸发,硅胶柱层析(洗脱液为石油醚和乙酸乙酯,体积比为9:1,收集20mL),蒸发至膏状,溶于2mL正己烷中,制备成聚戊烯醇提取液,即正己烷浸提液。

1.3 聚戊烯醇标准曲线的绘制

1.3.1 色谱条件 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶柱(150mm×4.6mm,5μm),流动相:异丙醇、甲醇、正己烷、水,体积比为50:25:10:2,流速1mL/min,于215nm处检测,柱温27℃,进样量为10μL。

1.3.2 聚戊烯醇标准曲线的制作 研究发现,采用不同链长的聚戊烯醇标准品测试样品,对样品测试结果的相对标准误差小于3%,在使用HPLC定量分析聚戊烯醇时,可以认为不同链长的聚戊烯醇对应的各色谱峰具有相同的响应因子^[10]。因此,本试验选取C₉₀-Prenol作为外标物来建立聚戊烯醇HPLC的定量方法。

精确称取20mgC₉₀-Prenol标准品,溶于100mL正己烷中,得浓度为0.20mg/mL的C₉₀-Prenol标准液。分别吸取5、10、20、40mLC₉₀-Prenol标准液至50mL容量瓶中,用正己烷定容,得0.02、0.04、0.08、0.16mg/mL标准溶液,取各标准溶液进样10μL,测定其峰面积,得到聚戊烯醇标准曲线: $y=5\times10^{-7}x-2.9506, r^2=0.9987$ ^[11]。

1.3.3 聚戊烯醇得率的计算 聚戊烯醇得率:

$$y = \frac{[(s_1 + s_2 + s_3) - B] \times n \times V}{A \times m} \times 100\%$$

式中: s_1 、 s_2 、 s_3 分别为HPLC中C₈₅、C₉₀、C₉₅聚戊烯醇的峰面积; B 为标准曲线回归方程的截距; n 为稀释倍数; V 为样品体积; A 为标准曲线回归方程的斜率; m 为银杏雄株叶片的质量^[11]。

1.4 单因素试验

聚戊烯醇的水解为液-液两相反应,本试验采用超

声波,使两相可以充分接触,料液比、水解温度和水解时间对聚戊烯醇的水解有很大的影响,因此,设计以料液比、水解时间、水解温度为因子的单因素试验,根据聚戊烯醇的得率,考察各因素对银杏雄株叶片中聚戊烯醇水解的影响。在本试验中,料液比是超声提取得到的聚戊烯醇的正己烷浸提液和皂化剂的体积比,皂化剂采用5%NaOH-甲醇溶液。

1.4.1 料液比对银杏雄株叶片聚戊烯醇水解的影响

准确称取3g银杏雄株叶片粉末5份,根据“1.2”节中的试验方法得到5份聚戊烯醇的正己烷浸提液,设置正己烷浸提液与5%NaOH-甲醇溶液的体积比分别为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,在45℃下水解120min,每个处理重复3次。

1.4.2 水解时间对银杏雄株叶片聚戊烯醇水解的影响

准确称取3g银杏雄株叶片粉末5份,根据“1.2”节中的试验方法得到5份聚戊烯醇的正己烷浸提液,然后在正己烷浸提液与5%NaOH-甲醇溶液料液比为1g:3mL、水解温度为45℃条件下分别水解60、90、120、150、180min,每个处理重复3次。

1.4.3 水解温度对银杏雄株叶片聚戊烯醇水解的影响

准确称取3g银杏雄株叶片粉末5份,根据“1.2”节中的试验方法得到5份聚戊烯醇的正己烷浸提液,然后在正己烷浸提液与5%NaOH-甲醇溶液料液比为1g:3mL的条件下,分别在25、35、45、55、65℃水解温度下水解120min,每个处理重复3次。

1.5 响应面优化试验

响应面优化试验采用Box-Behnken中心组合试验设计原理^[12-13],在单因素试验的基础上,为了获取最佳的水解工艺条件,将影响聚戊烯醇水解较大的3个因素作为试验因素进行优化试验,因素编码及变量水平如表1所示。

表1 Box-Behnken中心组合试验设计的因素和水平

水平	A:料液比 (g:mL)	B:水解时间 (min)	C:水解温度 (℃)
-1	1:3	60	35
0	1:4	90	45
1	1:5	120	55

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 料液比对聚戊烯醇得率的影响 由图1可知,随着料液比的增大,聚戊烯醇的得率总体呈增大的趋势,当料液比为1g:4mL时,聚戊烯醇得率达到最大,继续增大料液比,聚戊烯醇的得率无明显变化。因此,确定银杏叶中聚戊烯醇水解的最佳料液比为1g:4mL。

2.1.2 水解时间对聚戊烯醇得率的影响 由图2可知,随着水解时间的延长,聚戊烯醇的得率呈先上升后下降的趋势,当水解时间为90min时,聚戊烯醇的得率达到最大值。聚戊烯醇的水解时间对聚戊烯醇的得率有明显的影响,水解时间过短,聚戊烯醇不能完全水解,水解时间过长,可能会破坏聚戊烯醇的结构,导致聚戊烯醇的得率降低。因此,确定银杏叶聚戊烯醇水解的最佳时间为90min。

2.1.3 水解温度对聚戊烯醇得率的影响 由图3可知,随着水解温度的上升,聚戊烯醇的得率逐渐增大,当水解温度为

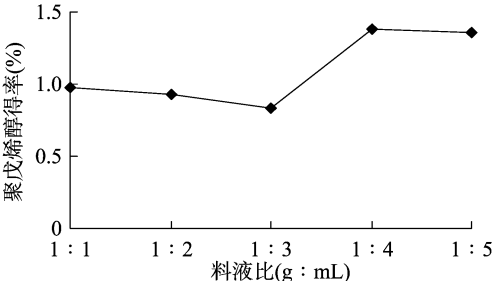


图1 料液比对聚戊烯醇得率的影响

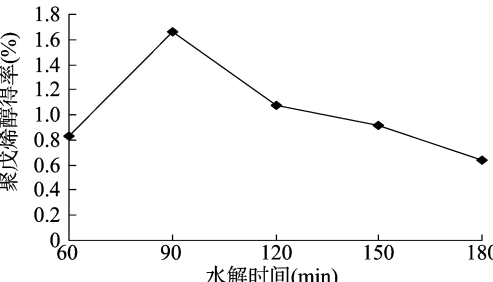


图2 水解时间对聚戊烯醇得率的影响

55 ℃时,聚戊烯醇的得率达到最大值,随后继续升高水解温度,聚戊烯醇的得率反而下降,这是由于聚戊烯乙酸酯水解反应是一个吸热的过程,水解温度越高,越有利于聚戊烯乙酸酯水解,但是水解温度过高,正己烷挥发加快,使得聚戊烯醇得率降低。因此,确定银杏叶聚戊烯乙酸酯水解的最佳温度为 55 ℃。

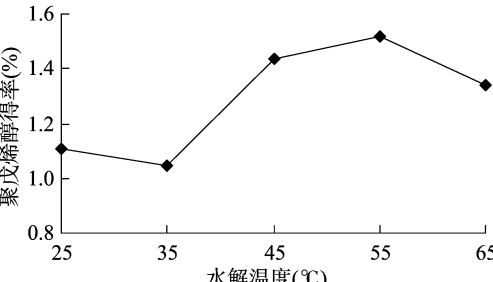


图3 水解温度对聚戊烯醇得率的影响

2.2 响应面优化试验结果与分析

根据 Box - Behnken 中心组合试验设计,以料液比(A)、水解时间(B)和水解温度(C)为自变量,以聚戊烯醇得率(Y)为响应值,设计了 17 组试验,试验设计及结果如表 2 所示。

2.2.1 回归模型建立及方差分析 采用 Design - Expert 软件对表 2 中的试验数据进行回归分析,经过拟合得到 3 个因素(A、B、C)与响应值(Y)之间的回归方程为 $Y = 1.280 - 0.069A + 0.120B - 0.330C - 0.063AB - 2.917 \times 10^{-3}AC + 0.190BC + 0.240A^2 - 0.350B^2 - 0.200C^2$, $R^2 = 0.934$,说明该回归方程的拟合程度较好,试验误差小,能较好地分析和预测聚戊烯醇的得率随水解条件变化而变化的情况,因此,可使用该方程模拟真实的 3 因子 3 水平的分析^[14-15]。

由表 3 可知,模型的 F 值为 11.07, P 值为 0.002 3,表示该模型是极显著的($P < 0.01$),各个试验因素的 F 值和 P 值表示各因素对响应值的影响程度。综合来看,在这个模型中,C、 A^2 、 B^2 有较高的显著性($P < 0.05$),说明水解温度对聚戊烯乙酸酯水解反应的影响最为显著,料液比、水解时间、水解

表 2 Box - Behnken 试验设计及结果

试验号	A:料液比 (g : mL)	B:水解时 间 (min)	C:水解温 度 (℃)	Y:聚戊烯醇 得率 (%)
1	1 : 3	120.00	45	1.471
2	1 : 4	90.00	55	0.783
3	1 : 5	120.00	45	1.051
4	1 : 3	60.00	55	0.306
5	1 : 4	90.00	55	0.749
6	1 : 4	90.00	55	0.952
7	1 : 4	140.45	55	0.289
8	1 : 4	90.00	55	0.447
9	1 : 2.32	90.00	55	1.547
10	1 : 4	90.00	35	1.420
11	1 : 3	60.00	45	1.108
12	1 : 4	90.00	55	0.803
13	1 : 5.68	90.00	55	1.339
14	1 : 5	120.00	35	1.182
15	1 : 5	60.00	45	1.068
16	1 : 5	60.00	35	1.336
17	1 : 3	120.00	35	1.312

表 3 二次回归模型的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2.350	9	0.260	11.07	0.002 3
A	0.045	1	0.045	1.92	0.208 8
B	0.110	1	0.110	4.60	0.069 1
C	0.790	1	0.790	33.49	0.000 7
AB	0.021	1	0.021	0.91	0.372 9
AC	5.350×10^{-5}	1	5.350×10^{-5}	2.27×10^{-3}	0.963 4
BC	0.130	1	0.130	5.43	0.052 6
A^2	0.720	1	0.720	30.38	0.000 9
B^2	0.620	1	0.620	26.20	0.001 4
C^2	0.100	1	0.100	4.29	0.077 0
残差	0.170	7	0.024		
失拟项	0.029	3	9.660×10^{-3}	0.28	0.835 7
纯误差	0.140	4	0.034		
总和	2.520	16			

温度对聚戊烯乙酸酯水解影响的显著性表现为水解温度 > 水解时间 > 料液比。

2.2.2 因素间交互作用的分析 根据回归方程利用 Design - Expert 软件作出不同影响因子的等高线,由图 4 可知,水解时间与水解温度的交互作用明显,对聚戊烯乙酸酯水解的影响较为显著;由图 5、图 6 可知,料液比与水解时间、料液比与水解温度之间的交互作用均不显著。

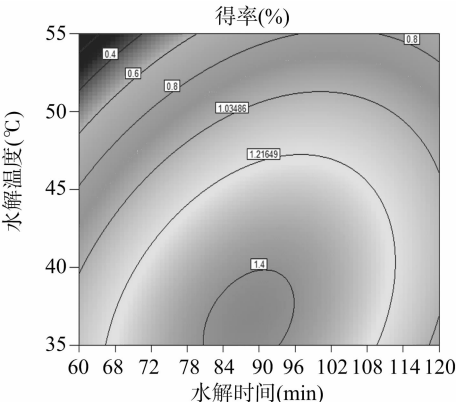


图4 水解时间与水解温度交互影响聚戊烯醇得率的等高线

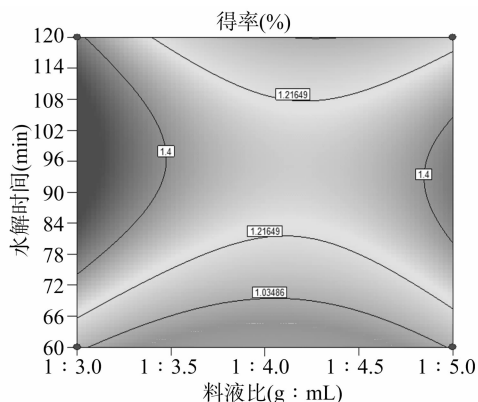


图5 水解时间与料液比交互影响聚戊烯醇得率的等高线

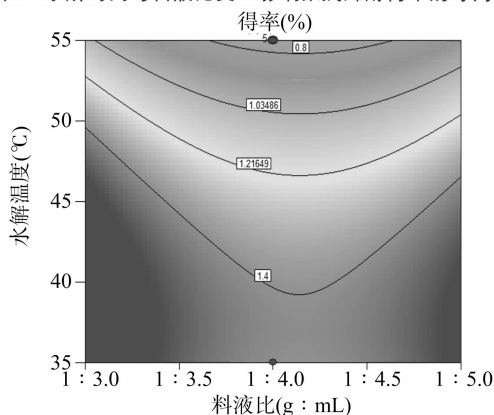


图6 水解温度与料液比交互影响聚戊烯醇得率的等高线

利用 Design - Expert 软件对回归方程求解,得到聚戊烯乙酸酯水解的最佳方案,最佳条件为料液比 1 g : 3 mL、水解时间 91.32 min、水解温度 37.07 °C,此时聚戊烯醇的理论最佳得率为 1.728%。

2.3 最佳工艺参数组合验证

为了进一步验证该回归模型的准确性和有效性,按上述最优水解组合进行聚戊烯乙酸酯水解反应^[16-17],同时考虑到实际操作,在料液比为 1 g : 3 mL、水解温度为 40 °C、水解时间为 95 min 的条件下水解聚戊烯乙酸酯,重复 3 次。由表 4 可知,3 组聚戊烯醇的得率均较高,平均值达到 1.536%,与理论预测值相比绝对误差为 0.192%,说明在该最佳工艺参数组合条件下,聚戊烯乙酸酯的水解率较高。

表 4 验证试验结果

重复	聚戊烯醇得率 (%)
1	1.519
2	1.610
3	1.479

3 讨论

响应面设计法是一种最优化的统计学试验设计方法,目前已广泛应用于各种生物技术领域^[15-16]。采用单因素试验结合响应面设计法,对聚戊烯乙酸酯水解过程中的各因素进行了优化,并建立了拟合度较高的数学模型,得出最佳水解条件为料液比 1 g : 3 mL、水解时间 95 min、水解温度 40 °C,在此最佳工艺组合条件下,银杏雄株叶片中聚戊烯醇的得率实际测定值可达 1.536%。

参考文献:

- [1] Rezanka T, Votruba J. Chromatography of long chain alcohols (polyprenols) from animal and plant sources [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 936(1/2): 95-110.
- [2] Hartley M D, Imperiali B. At the membrane frontier: a prospectus on the remarkable evolutionary conservation of polyprenols and polyprenyl-phosphates [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2012, 517(2): 83-97.
- [3] Trompezinski S, Bonneville M, Pernet I, et al. Ginkgo biloba extract reduces VEGF and CXCL-8/IL-8 levels in keratinocytes with cumulative effect with epigallocatechin-3-gallate [J]. Archives of Dermatological Research, 2010, 302(3): 183-189.
- [4] Janas T, Chojnacki T S E, Walinska K. Modulation of properties of phospholipid membranes by the long-chain polyprenol (C₁₆₀) [J]. Chemistry & Physics of Lipids, 2000, 106(1): 31-40.
- [5] Carlson T, Skorupinska-Tudek K, Hertel J, et al. Single polyprenol and dolichol isolation by semipreparative high-performance liquid chromatography technique [J]. Journal of Lipid Research, 2000, 41(7): 1177-1180.
- [6] Tateyama S, Wititsuwannakul D, Sagami H K, et al. Dolichols of rubber plant, ginkgo and pine [J]. Phytochemistry, 1999, 51(1): 11-15.
- [7] Bamba T, Fukusaki E, Nakazawce Y, et al. Analysis of long-chain polyprenols using supercritical fluid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 995(1/2): 203-207.
- [8] Huh H, Staba E J, Singh J. Supercritical fluid chromatographic analysis of polyprenols in Ginkgo biloba L. [J]. Journal of Chromatography A, 1992, 600(2): 364-369.
- [9] 杨克迪, 陈 钧, 欧阳臻, 等. 高效液相色谱/大气压化学电离质谱分析银杏叶中聚戊烯醇化合物 [J]. 分析化学, 2003, 31(8): 937-940.
- [10] 王成章. 银杏叶聚戊烯醇 GP 的分离和衍生物合成机理及生物活性研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
- [11] 吴秋月, 陈 鹏, 仲月明, 等. 响应面法优化提取银杏雄株叶片聚戊烯醇的工艺研究 [J]. 中成药, 2013, 35(2): 267-272.
- [12] Hinkelmann K, Jo J. Linear trend-free Box-Behnken designs [J]. Journal of Statistical Planning and Inference, 1998, 72(1/2): 347-354.
- [13] 程桂茹, 王淑娟, 邹 岩, 等. Box-Behnken 中心组合设计法优化达卡巴嗪脂质体制备工艺 [J]. 长春工业大学学报(自然科学版), 2011, 32(4): 348-353.
- [14] Kasankala L M, Yan X, Yao W, et al. Optimization of gelatin extraction from grass carp (Catenopharyngodon idella) fish skin by response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(17): 3338-3343.
- [15] 吴雪艳, 罗 鹏, 叶建方, 等. 响应面法优化竹荪菌托多糖的提取工艺 [J]. 南方农业学报, 2015, 46(3): 480-485.
- [16] 张 豪, 乙 引, 洪 鲲, 等. 响应面法优化酶促脂肪酸甲酯化工艺条件 [J]. 农业工程学报, 2011, 27(2): 125-130.
- [17] 赵少杰, 叶盛英, 欧春风, 等. 超临界 CO₂ 法制备褪黑素脂质体的工艺优化 [J]. 农业工程学报, 2014, 30(3): 251-258.