

银杏外种皮抗氧化物提取工艺优化、活性成分及抗氧化活性分析

于海冬¹, 秦慧妮¹, 姜艺航¹, 周昱杭¹, 吴培源¹, 刘艳丽², 王朝宇^{1*}, 王桃云^{1*}

(1. 苏州科技大学化学与生命科学学院, 江苏苏州 215091) (2. 苏州大学药学院, 江苏苏州 215123)

摘要: 银杏外种皮抗氧化物 (Antioxidants of *Ginkgo biloba* exocarp, AGE) 具有良好的开发与应用前景, 但其研究鲜见报道。为实现银杏外种皮 (*Ginkgo biloba* exocarp, GBE) 废弃资源的高值化利用, 挖掘其抗氧化活性物质应用潜力, 本研究以 GBE 为原料, 选取总还原力作为评价指标, 采用中心组合响应面法优化银杏外种皮抗氧化物的超声辅助提取工艺, 利用液相色谱-高分辨质谱对其活性组分进行定性分析, 系统开展体外抗氧化活性评价。优化得到 AGE 的最佳提取工艺参数为超声温度 59 °C、超声时间 49 min、超声功率 312 W、液料比 21:1 (mL g⁻¹), 该条件下样品总还原力达 3.10±0.02。从 AGE 中鉴定出 211 种化合物, 其中有机酸类 (43.70%)、酚类 (20.68%)、萜类 (16.60%) 为主要活性成分, 且(2R,3S)-枇杷酸和 4-羟基香豆素首次在 GBE 中发现。AGE 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (ABTS) 自由基、超氧阴离子 (O₂⁻·) 均具有良好的清除效果, 半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 215.60、48.19 和 823.00 μg·mL⁻¹, 铁离子还原力值为 2.63 mmol g⁻¹。本研究可为银杏外种皮功能活性成分的深度开发与天然抗氧化产品研制提供理论依据。

关键词: 银杏外种皮; 抗氧化物; 响应面法; 液相色谱-高分辨质谱法; 抗氧化活性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.8.0902

Optimization of Extraction Process, Active Components and Antioxidant Activity Analysis of Antioxidants from *Ginkgo biloba* Exocarp

YU Haidong¹, QIN Huini¹, JIANG Yihang¹, ZHOU Yuhang¹, WU Peiyuan¹, LIU Yanli², WANG Zhaoyun^{1*},
WANG Taoyun^{1*}

(1.School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China)(2. School of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: AGE (Antioxidants of *Ginkgo biloba* exocarp) possess excellent application and development potential, while related studies are rarely documented. To realize the high-value utilization of discarded *Ginkgo biloba* exocarp (GBE) and explore the application potential of its antioxidant active substances, GBE was used as the raw material in this study. With total reducing power taken as the evaluation index, central composite design-response surface methodology was adopted to optimize the ultrasound-assisted extraction process of AGE. Liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry was applied for the qualitative analysis of active components, and the *in vitro* antioxidant activity was systematically evaluated. The optimal extraction parameters of AGE were determined as follows: ultrasonic temperature 59 °C, ultrasonic time 49 min, ultrasonic power 312 W, and liquid-to-solid ratio 21:1 (mL g⁻¹). Under these conditions, the total reducing power reached 3.10±0.02. A total of 211 compounds were identified from AGE, among which organic acids (43.70%), phenolic compounds (20.68%) and terpenoids (16.60%) were the dominant active components. Moreover, (2R,3S)-euscaphic acid and 4-hydroxycoumarin were discovered in GBE for the first time. AGE exhibited excellent scavenging effects on DPPH radical, ABTS radical and superoxide anion radical, with IC₅₀ values of 215.60 μg·mL⁻¹, 48.19 μg·mL⁻¹ and 823.00 μg·mL⁻¹, respectively, and the ferric ion reducing power was 2.63 mmol g⁻¹. This study can provide a theoretical basis for the further development of functional active components in GBE and the research and development of natural antioxidant products.

收稿日期: 2026-06-14; 修回日期: 2026-08-10; 接受日期: 2026-08-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82073912)

作者简介: 于海冬 (2001-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物活性研究, E-mail: 2411121004@post.usts.edu.cn

通讯作者: 王桃云 (1973-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 药食同源植物资源与生物纳米材料的开发与应用, E-mail: wangtaoyun@mail.usts.edu.cn; 共同通讯

作者: 王朝宇 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化与营养健康, E-mail: biowzy@126.com

Key words: *Ginkgo biloba* exocarp; antioxidants; response surface methodology; liquid chromatography-high resolution mass spectrometry; antioxidant activity

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 为银杏科银杏属植物, 素有“活化石”之称, 兼具药用价值与经济价值。银杏白果外种皮 (通称银杏外种皮, GBE) 是银杏种子硬壳外侧的肉质部分, 富含酚酸类、内酯类、黄酮类等生物活性成分, 现代药理研究证实其具有显著的抗氧化、抗菌、抗炎及抗肿瘤等多种生物活性^{[1],[2]}。而在食品领域, 天然抗氧化成分是绿色食品添加剂研发与食品保鲜护色的核心原料, GBE 的成分特征使其具备成为食品用天然活性原料的潜力。目前与银杏相关的研究与开发多聚焦于叶片、内种皮等部位, GBE 常作为农业废弃物丢弃, 既造成资源浪费, 也带来环境问题^[3], 因此对 GBE 开展资源化利用研究, 对农业废弃物高值化开发及食品新型天然原料挖掘具有重要意义。

GBE 提取物的多种生物活性均与其总抗氧化力密切相关, 其抑菌、杀虫、防腐、保鲜等功能本质上依赖于提取物中活性成分的供电子能力与自由基清除能力^[4], 因此总还原力是评价其开发价值的重要指标^[1]。而 GBE 中丰富的多酚、萜类成分使其具备成为天然抗氧化剂的良好开发前景。当前食品领域正面临合成抗氧化剂的安全性争议, 开发天然、安全、可持续的食品用抗氧化剂已成为重要发展趋势, GBE 的开发利用高度契合这一需求。但现有研究多聚焦于 GBE 抑菌、杀虫等实用功能的验证, 针对银杏外种皮抗氧化物 (AGBE) 的提取工艺系统优化、核心抗氧化成分解析及其体外抗氧化作用的系统性研究尚未见报道, 限制了其在食品领域的深度应用。

本研究以 GBE 为原料, 采用响应面中心组合设计法优化 AGBE 提取工艺, 以总还原力为指标筛选最优参数, 通过液相色谱高分辨质谱 (LC-HRMS) 对 AGBE 核心活性成分进行定性与初步定量分析。通过 DPPH 自由基、ABTS 自由基、超氧阴离子自由基的清除率及 FRAP 值综合评价其体外抗氧化活性, 验证其作为食品用抗氧化剂的应用潜力。以期为 GBE 的高效资源化利用提供理论与技术支撑, 为食品领域新型天然抗氧化剂、保鲜剂研发提供候选原料与思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

银杏外种皮, 苏州科技大学校园内收集, 由植物学博士王金虎鉴定为银杏 (*Ginkgo Biloba* L.) 种子的外种皮; DPPH, 东京化成工业株式会社; ABTS, 上海麦克林生化科技有限公司; 抗坏血酸 (Vc)、焦性没食子酸, 国药集团化学试剂有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

FA2004 电子天平, 常州市幸运电子有限公司; SB-600GV 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; UV-5300PC 紫外-可见分光光度计, 上海分析仪器有限公司; TGL-18M 高速冷冻离心机, 上海捷辰仪器有限公司; N-1100 型旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统, 配有可加热电喷雾电离离子源 (HESI) 及 Xcalibur1.2 数据处理系统, 美国 Thermo Scientific 公司; UltiMate 3000 超快速高效液相色谱系统, 配有 Xbridge premier BEH C18 色谱柱及可变波长紫外检测器, 美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 银杏外种皮材料制备

于 2023 年 11 月采集银杏白果, 采摘后 24 h 内去除中种皮和内种皮, 洗净后于 45 °C 烘箱干燥, 粉碎后过 60 目筛得到银杏白果外种皮 (通称为银杏外种皮) 粉末, 密封避光保存。

1.3.2 响应面优化试验

响应面中心组合设计 (CCD) 法充分覆盖单因素试验考察的各实验水平梯度数量与区间跨度, 将单因素实验与响应面实验融合在一起, 在实验测试次数较少的情况下达到优化目标物质提取工艺条件的目的。因此, 本实验参照 Sudarsini^[5]和 Abohassan 等^[6]的实验设计方法, 以 AGBE 总还原力为响应值, 将超声温度、超声时间、超声功率和液料比设为自变量, 设计四因素五水平的响应面中心组合设计试验, 系统评估各因素及其交互作用对 AGBE

总还原力的影响, 实验设计如表 1 所示。

表 1 响应面中心组合试验设计

Table 1 Central composite design of response surface methodology

因素	水平				
	-2	-1	0	1	2
A (超声温度/℃)	40	50	60	70	80
B (超声时间/min)	30	40	50	60	70
C (超声功率/W)	100	200	300	400	500
D (液料比/(mL g ⁻¹))	10:1	15:1	20:1	25:1	30:1

1.3.3 总还原力测定

参照 Wu 等^[7]的方法, 总还原力以测定 700 nm 处的吸光值表示, 并略作修改。吸取 1 mL 样液与 2.5 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 mmol mL⁻¹, pH 值为 6.6)、2.5 mL 10 mg mL⁻¹ 铁氰化钾溶液混合, 在 50 ℃ 下反应 20 min, 急速冷却后加入 2.5 mL 10 wt.% 三氯乙酸停止反应, 离心后将 2.5 mL 上清液与 0.2 mL 0.1 wt.% FeCl₃ 溶液、2.5 mL 蒸馏水混合, 静置 10 min。于 700 nm 处测定吸光值, 以蒸馏水代替样品作为空白对照, 根据式 (1) 计算总还原力。

$$Y = A - A_0 \quad (1)$$

式中:

Y——总还原力;

A——样品与溶液体系反应后的吸光度值;

A₀——蒸馏水代替样品与溶液体系混合后的吸光度值。

1.3.4 LC 条件

采用 Waters Xbridge Premier BEH C18 色谱柱 (2.1×100 mm, 2.5 μm), 柱温 25 ℃, 流量 0.2 mL·min⁻¹; 流动相 A 为乙腈、B 为 0.1% (φ) 甲酸水溶液; 进样体积 10 μL。梯度洗脱程序如下: 0~1 min, 5% (φ) A; 1~18 min, 5%~37% (φ) A; 18~25 min, 37%~55% (φ) A; 25~27 min, 55%~63% (φ) A; 27~34 min, 63%~95% (φ) A; 34~40 min, 95% (φ) A; 40~40.1 min, 95%~5% (φ); 40.1~45 min, 5% (φ) A。

1.3.5 HRMS 条件

采用可加热电喷雾电离 (HESI) 离子源收集数据: 雾化气 40 arb, 辅助气 10 arb。正离子模式下为 3 500 V, 负离子模式下则为 3 000 V。离子传输毛细管温度 320 ℃, 辅助气 350 ℃。扫描模式选用正负离子切换的 Full MS/dd-MS² 模式: Full MS 一级扫描分辨率 70 000, dd-MS² 二级扫描分辨率为 17 500, 扫描范围为 m/z 150~1 000。

1.3.6 DPPH 自由基清除率测定

参考 Cui 等^[8]的方法并稍作改动, 将 0.1 mL 的待测液与 3.9 mL 0.1 mmol L⁻¹ 的 DPPH 溶液避光反应 10 min, 在 517 nm 处测定吸光度值。以 Vc 为阳性对照。根据式 (2) 计算 DPPH 自由基清除率。

$$S_D = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c} \right) \times 100 \quad (2)$$

式中:

S_D——DPPH 自由基清除率, %;

A_s——样品与 DPPH 反应后的吸光度值;

A_b——甲醇与样品混匀后溶液的吸光度值;

A_c——DPPH 与甲醇混匀后溶液的吸光度值。

1.3.7 ABTS 自由基清除率测定

按照 Liu 等^[9]的方法略作修改。将 0.2 mL 待测液与 3.8 mL ABTS 工作液在室温下避光反应 10 min, 在 734 nm 处测定吸光值。以 Vc 为阳性对照。根据式 (3) 计算 ABTS 自由基清除率。

$$S_A = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c} \right) \times 100 \quad (3)$$

式中:

S_A ——ABTS 自由基清除率, %;

A_s ——样品与 ABTS 工作液反应后的吸光度值;

A_b ——样品与无水乙醇混匀后溶液的吸光度值;

A_c ——ABTS 工作液与无水乙醇混匀后溶液的吸光度值。

1.3.8 铁离子还原能力

根据 Jessica 等^[10]所述方法并稍作改动, 采 FRAP 法评估样品的铁离子还原能力。将 2.7 mL FRAP 溶液与 0.15 mL 待测液混合, 并在 37 °C 下孵育 8 min, 于 593 nm 处测定吸光度值。以硫酸亚铁为标准品制作标准曲线, 标准曲线方程为 $y=0.622\ 9x-0.005\ 079$ (其中 y 为吸光值, x 为 Fe^{2+} 浓度, $R^2=0.998\ 9$); 将样品测得的吸光度值代入标准曲线方程, 得到样品还原的 Fe^{2+} 毫摩尔数后计算得样品的 FRAP 值。

1.3.9 超氧阴离子清除率测定

根据 Tong 等^[11]描述的方法并稍作修改, 以 Vc 为阳性对照, 取 1.0 mL 待测液与 1.8 mL 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 值为 8.2) 混合, 25 °C 水浴加热 15 min, 添加 25 °C 预热的 3 mmol L⁻¹ 的邻苯三酚 0.2 mL, 迅速混匀, 于波长 325 nm 处测定样品吸光值, 每 30 s 测定一次, 共测定 6 min, 绘制时间-吸光度曲线, 并计算出氧化速率 ($\Delta A/\min$)。根据式 (4) 计算 O_2^- 清除率。

$$S_O = \frac{K_0 - K_i}{K_0} \times 100 \quad (4)$$

式中:

S_O ——超氧阴离子清除率, %;

K_0 ——邻苯三酚自氧化速率, $\Delta A/\min$;

K_i ——样品存在时的氧化速率, $\Delta A/\min$ 。

1.4 数据处理和分析

上述所有实验均重复 3 次, 数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差。利用 IBM SPSS Statistics 27.0 和 Design-Expert 13.0 进行统计分析, $P<0.05$ 表示差异显著, 使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件作图。

2 结果与分析

2.1 响应面试验结果

2.1.1 响应面法试验设计与结果

以 AGBE 的总还原力作为参考指标, 使 Design-Expert 13 软件设计四因素五水平 CCD 实验, 实验结果如表 2 所示。

表 2 响应面实验设计与结果

Table 2 Response surface experimental design and results

序号	A 超声温度/°C	B 超声时间/min	C 超声功率/W	D 液料/(mL g ⁻¹)	Y 总还原力
1	70	40	400	15:1	2.25 $\pm$ 0.01
2	60	50	300	20:1	2.93 $\pm$ 0.03
3	70	60	400	15:1	1.82 $\pm$ 0.02
4	80	50	300	20:1	1.33 $\pm$ 0.03
5	60	50	300	30:1	2.38 $\pm$ 0.05
6	60	50	100	20:1	1.86 $\pm$ 0.06

7	40	50	300	20:1	1.45±0.05
8	50	40	200	25:1	2.23±0.09
9	60	30	300	20:1	2.67±0.04
10	60	70	300	20:1	2.55±0.02
11	70	40	400	25:1	1.89±0.05
12	50	60	400	15:1	1.95±0.05
13	70	60	200	25:1	1.76±0.09
14	60	50	300	20:1	3.28±0.03
15	70	60	400	25:1	1.68±0.07
16	70	40	200	15:1	2.08±0.04
17	60	50	500	20:1	1.84±0.09
18	50	40	400	25:1	2.28±0.05
19	60	50	300	20:1	3.17±0.07
20	60	50	300	20:1	3.06±0.04
21	60	50	300	10:1	2.18±0.06
22	50	40	200	15:1	1.68±0.05
23	50	60	200	15:1	1.88±0.02
24	60	50	300	20:1	3.05±0.03
25	50	60	400	25:1	2.33±0.01
26	60	50	300	20:1	3.16±0.04
27	50	60	200	25:1	2.44±0.03
28	70	60	200	15:1	1.20±0.02
29	70	40	200	25:1	2.09±0.05
30	50	40	400	15:1	2.04±0.02

2.1.2 回归方程与方差分析

使用 Design-Expert 13 软件对数据进行拟合分析，得到 AGBE 的总抗氧化力（Y）的回归方程：

$$Y=3.11-0.061\ 4A-0.038\ 8B+0.002\ 5C+0.058\ 9D+0.089\ 2AB-0.041\ 1AC+0.155\ 2AD+0.043\ 0BC-0.006\ 9BD+0.048\ 2CD-0.425\ 9A^2-0.125\ 7B^2-0.315\ 2C^2-0.209\ 2D^2。$$

根据表 3 方差及显著性分析的结果，该回归模型极显著（ $P<0.000\ 1$ ），模型 R^2 为 0.984 9。变异系数 C.V.=4.05%<5%，表明该回归模型的稳定性好，可用于精准优化 AGBE 提取过程。回归方程中 A（超声温度）、B（超声时间）系数为负，表明温度过高、时间过长在加速传质的同时导致总还原力下降，推测由于黄酮、多酚等还原成分因热敏性成分降解；D（液料比）系数为正，表明适当增加溶剂用量可提升提取效率，但超过 1:21（g mL⁻¹）后推测体系达到传质平衡因此增幅减缓。回归模型中回归模型中一次项 A、D 和二次项 A²、B² 对 AGBE 的总还原力影响均达到极显著水平。其中，温度通过改变液体的黏度、表面张力和蒸气压等物性参数，影响超声空化阈值与空化强度，适度升温降低黏度和表面张力，有利于空化泡的生成与传质增强，但过高温度增大蒸气压，缓冲空化泡崩溃的冲击力，削弱空化效应的机械破碎作用。表 3 中的 F 值表明，单因素中超声温度对 AGBE 的总抗氧化力影响最大，各单因素对 AGBE 的总还原力的影响程度从大到小依次为：A>D>B>C。

表 3 响应面结果的方差分析

Table 3 Analysis of variance for response surface results

变异源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
模型	8.080 0	14	0.576 9	69.88	<0.000 1	**
A-温度	0.090 5	1	0.090 5	10.97	0.004 7	**
B-时间	0.036 0	1	0.036 0	4.370 0	0.054 1	
C-功率	0.000 1	1	0.000 1	0.018 2	0.894 6	
D-液料比	0.083 3	1	0.083 3	10.090 0	0.006 3	**

AB	0.127 4	1	0.127 4	15.44	0.001 3	**
AC	0.027 1	1	0.027 1	3.280 0	0.090 3	
AD	0.385 6	1	0.385 6	46.710 0	<0.000 1	**
BC	0.029 6	1	0.029 6	3.580 0	0.077 8	
BD	0.000 8	1	0.000 8	0.091 6	0.766 3	
CD	0.037 2	1	0.037 2	4.510 0	0.050 7	
A ²	5.060 0	1	5.060 0	613.01	<0.000 1	**
B ²	0.433 2	1	0.433 2	52.470 0	<0.000 1	**
C ²	2.720 0	1	2.720 0	330.020 0	<0.000 1	**
D ²	1.200 0	1	1.200 0	145.360 0	<0.000 1	**
残差	0.123 8	15	0.008 3			
失拟误差	0.050 7	10	0.005 1	0.346 6	0.927 7	不显著
纯误差	0.073 1	5	0.014 6			
总和	8.200 0	29				

注：**表示差异极显著 ($P<0.01$)。

2.1.3 响应面交互作用分析

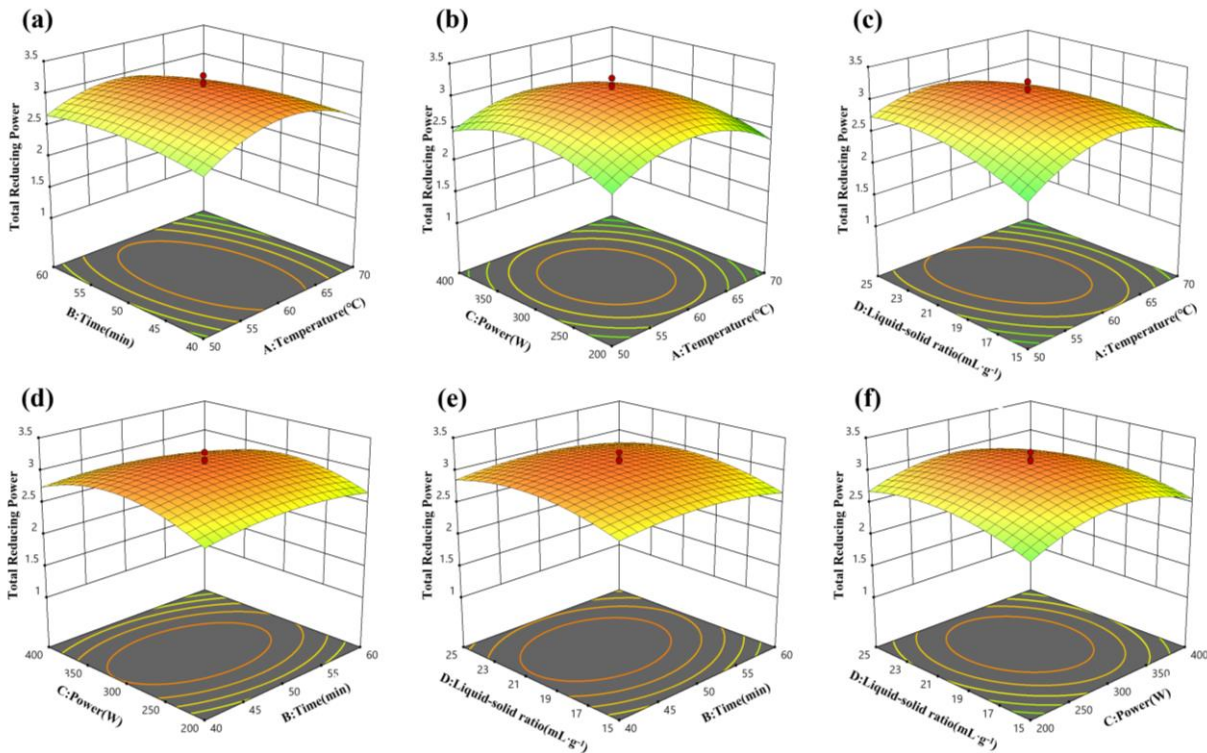


图 1 AGBE 总还原力各因素交互作用响应面图

Fig.1 Response surface plots of the interaction effects of various factors on the total reducing power of AGBE

基于响应曲面方差分析结果（表 3）及对应的三维响应曲面图（图 1）可知，各因素间交互作用对提取效果的影响存在显著差异。响应曲面的陡峭程度与等高线的椭圆化趋势均反映了因素间交互作用的强弱。如图 1c 所示，该响应面坡度最陡且等高线呈显著的椭圆状，由此可见其交互作用最为显著。这表明超声温度与液料比之间存在强烈的协同效应。温度直接影响分子热运动速度和溶剂扩散能力，而液料比则决定了传质浓度梯度与溶剂总量，两者共同调控着目标成分从物料内部向溶剂中溶解、扩散的动态平衡。这一结果与交互项 AD ($P<0.000\ 1$) 的显著水平结果一致。交互项 AB（图 1a）的响应曲面较为陡峭，等高线呈椭圆状。这说明在固定的超声功率和液料比下，温度与时间需合理匹配。温度过高或时间过长可能导致部分热敏性活性物质降解，而温度不足则需要更长时间以实现充分提取，两者交互影响着提取过程的热效应与时间效应。相比之下，交互项 CD（图 1f）的曲面起

伏与等高线椭圆趋势相对平缓, 超声功率影响空化效应强度, 而液料比影响体系稠度与传质阻力, 两者的交互作用对传质效率有一定影响, 但效应弱于交互项 AD 与 AB。其余交互项未达显著水平, 其响应曲面平缓, 等高线接近圆形, 表明在实验设定的水平范围内, 这两组因素间的交互效应不明显。而 BD (图 1e) 的曲面最为平缓, 说明单纯改变超声时间与液料比的配比, 其协同增效作用有限。

2.1.4 最佳提取工艺的确定与验证

通过回归模型预测出银杏外种皮抗氧化物总还原力最强的提取工艺条件为: 超声温度 59.09 °C、超声时间 48.82 min、超声功率 312 W、液料比 20.86 mL g⁻¹, 此模型预测值银杏外种皮抗氧化物总还原力为 3.12。由于实验可操作性, 选取超声温度 59 °C、超声时间 49 min、超声功率 312 W、液料比 21 mL g⁻¹ 进行三次验证试验, 测得总还原力为 3.10±0.02, 优于樊素芹等^[12]研究的口蘑提取物的还原活性 (其最大总还原力为 2.75)。该结果与模型预测结果的吻合度达到 99.4%, 这表明响应面模型具有很好的预测准确性和可行性。同时, 最佳提取工艺下 AGBE 得率 (AGBE 质量/银杏外种皮质量) 为 (19.15±0.37) %。

2.2 AGBE 的 LC-HRMS 分析

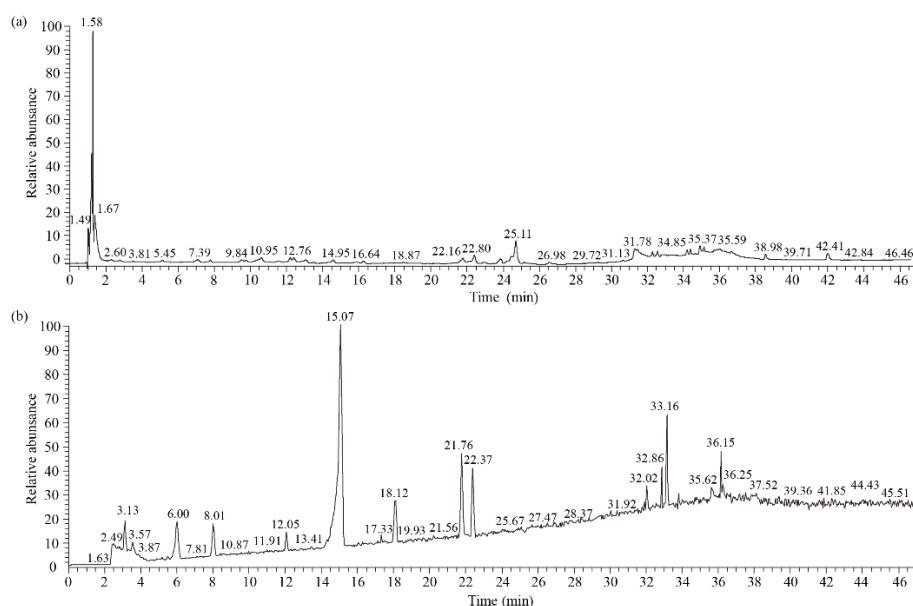


图 2 正负离子模式色谱图

Fig.2 Chromatograms in positive and negative ion modes

注: A.正离子模式色谱图; B.负离子模式色谱图。

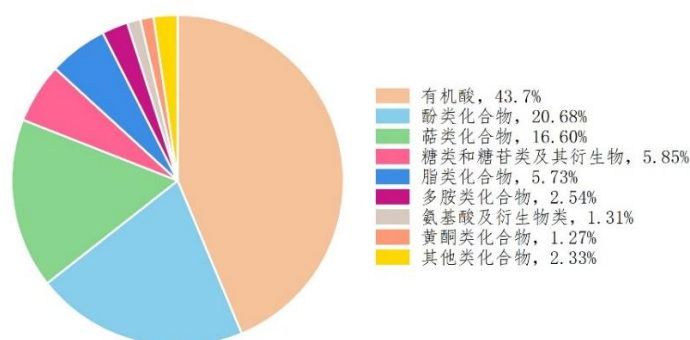


图 3 AGBE 中各类化合物的相对峰面积百分比

Fig.3 Relative peak area percentages of various compounds in AGBE

LC-HRMS 技术因其能够精确测定物质的分子量、获取丰富结构信息的技术优势, 成为解析天然产物组成的核心手段。图 2 展示了其在正、负离子模式下的色谱图, 其中横坐标为代谢物的保留时间, 纵坐标为相应离子流

强度。本研究通过 LC-HRMS 在 AGBE 中初步鉴定出的 211 种相对峰面积百分比>0.01%的化合物,涵盖有机酸类、酚类、萜类、黄酮类等 8 大类,其中有机酸类(43.70%)、酚类化合物(20.68%)、萜类化合物(16.60%)为占比前三的类别(图 3),黄酮类虽相对含量占比为 1.27%,但与酚类、有机酸类共同构成了 AGBE 抗氧化活性的核心物质基础,各类成分通过自身结构特征赋予的抗氧化能力及组分间的协同效应^[13],是 AGBE 表现出良好体外抗氧化活性的关键原因。

有机酸类化合物中,(1R,6R)-6-羟基-2-琥珀酰基环己-2,4-二烯-1-羧酸根相对峰面积百分比达 12.07%,为提取物中相对含量最高的活性成分,有机酸分子结构中具有羟基与羧基可通过提供氢质子发挥基础抗氧化作用^[14];酚类与黄酮类化合物作为植物源抗氧化物的核心类别,其分子中的酚羟基、共轭苯环体系是清除自由基的关键结构^[15],酚羟基上的氢原子(H)不稳定,易脱落去捕捉并中和自由基转化为稳定的分子,母体失去 H 后,自身会变成一个苯氧自由基,自由基能与苯环上的 π 电子云发生共轭,使得整个分子的能量降低,变得相对稳定,终止继续引发新的自由基链式反应,从而发挥抗氧化作用^[16]。如本研究中检出的反式咖啡酸、原儿茶酸等酚类,以及芹菜素、芦丁、蒿咕吨三酮等黄酮类,这些化合物均可通过酚羟基的氢供体作用清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基等活性氧^[17],萜类中的银杏内酯 C、J、A 等标志性成分,其多羟基环烷结构兼具抗氧化与抗炎活性^[18],可与多酚类成分形成协同,减少氧化应激引发的次级损伤。

此外,通过 LC-HRMS 技术首次在 AGBE 中银杏外种皮中鉴定出酚类化合物(2R,3S)-枇杷酸和 4-羟基香豆素,进一步丰富了 AGBE 抗氧化活性的物质内涵。其中(2R,3S)-枇杷酸作为天然酚酸类化合物,其分子结构中具有酚羟基;4-羟基香豆素具备香豆素母核的共轭体系及酚羟基结构,既能通过酚羟基的氢转移机制清除自由基,又能有效稳定自由基中间体^[19],二者均可与提取物中已鉴定的有机酸、多酚及萜类等活性成分形成协同效应,进一步强化 AGBE 的抗氧化网络。此发现不仅为深入挖掘银杏外种皮的药用价值、开发其作为天然抗氧化剂及功能性食品原料的应用潜力提供了新的理论依据与研究方向,同时也为银杏属植物次生代谢产物的多样性及其生物活性研究增添了新的认知维度。

Table 4 Analysis and Identification Results of Main Active Ingredients of AGBE

9

20		IV 型氰脂 22:1 酯 (Type IV cyanolipid 22:1 ester)	34.78	418.37	-1.28	72.3	0.47		
21	多胺类	亚精胺 (Spermidine)	48.38	146.16	-1.77	86.8	1.81		
22	化合物	精胺 (Spermine)	48.56	203.22	-1.44	91.1	0.73	抗氧化	[26]
23		(4S,5R)-5-[(1R,2S)-1-Acetamido-2-methoxy-2-methylpentyl]-4-[(1Z)-1-propen-1-yl]-D-proline	39.26	327.23	-4.55	75.0	0.66		
24	氨基酸及	苯丙氨酸 (Phenylalanine)	6.11	166.09	-1.46	87.8	0.20	抗氧化	[27]
25	衍生物类	4-氧代脯氨酸 (4-Oxoproline)	2.44	128.03	-4.92	79.5	0.19		
26		N-乙酰-D-别异亮氨酸 (N-Acetyl-D-alloisoleucine)	15.92	172.10	-4.85	74.9	0.15		
27		芹菜素 (Apigenin)	29.80	269.05	-0.2	79.0	0.15		
28	黄酮类化	芦丁 (Rutin)	22.91	609.15	-0.17	85.1	0.14		
29	合物	蒿咕吨三酮 (Artomunoxanthentrione)	21.77	443.11	-4.97	72.1	0.12	抗氧化	[15]
30		6-羟基杨梅素-6,3',5'-三甲醚-3-O-葡萄糖苷 (6-Hydroxymyricetin 6,3',5'-trimethyl ether 3-glucoside)	17.32	537.12	0.04	77.4	0.11		

2.3 AGBE 的抗氧化活性

2.3.1 DPPH 自由基清除率

AGBE 导致 DPPH 自由基减少, 测定液颜色由紫色变为淡黄色。如图 4 所示, 在 AGBE 质量浓度为 150~350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的范围内, 其 DPPH 自由基清除率与浓度呈正相关, 经过拟合分析, AGBE 的 IC_{50} 为 215.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。尽管 AGBE 对 DPPH 自由基的清除效果低于 Vc, 但显著强于李超峰等^[28]提取的银杏果外种皮总黄酮和赵浩晨等^[29]提取的银杏果外种皮多糖对 DPPH 自由基的清除效果, 其 IC_{50} 分别为 280.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和约为 1 700 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当 AGBE 质量浓度为 350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, DPPH 自由基清除率达到了 74.29%, 表现出良好的 DPPH 自由基清除能力。

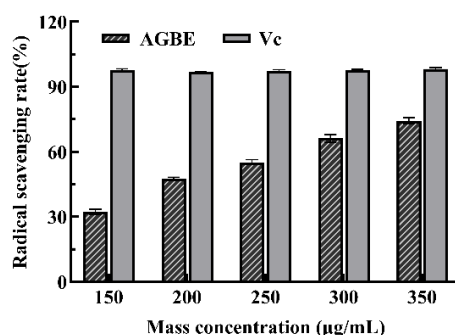


图 4 AGBE 的 DPPH 自由基清除活性

Fig.4 DPPH radical scavenging activity of AGBE

2.3.2 ABTS 自由基清除率

由图 5 的结果可知, 在 AGBE 质量浓度范围为 30~70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 清除率与 ABTS 自由基的清除效果呈正相关关系, 浓度越高, 清除效果越强, 拟合分析得出 IC_{50} 为 48.19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在质量浓度为 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, AGBE 的清除效果较弱, 与 Vc 相比差距明显。然而, 随着质量浓度的增加, 二者之间的差距逐渐缩小, 且当质量浓度为 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, AGBE 的清除率可达到 77.61%。AGBE 对 ABTS 自由基的清除效果要优于张跃超等^[30]从银杏叶中获得的芦丁单体化合物 (IC_{50} 为 801.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 及李小军等^[31]获得的兰州百合多糖 (IC_{50} 为 0.76 mg mL^{-1})。因此, AGBE 具有良好的 ABTS 自由基清除能力。

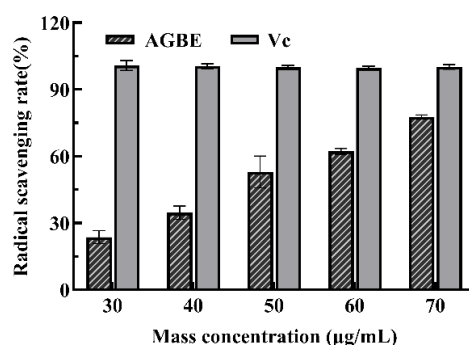


图 5 AGBE 的 ABTS 自由基清除活性

Fig.5 ABTS radical scavenging activity of AGBE

2.3.3 FRAP 抗氧化能力

FRAP 值是衡量样品总抗氧化活性的核心指标, 指每毫克样品所能还原产生的 Fe^{2+} 的毫摩尔数。FRAP 值越大, 表明样品还原 Fe^{3+} 的能力越强, 即总还原力越强^[10]。如图 6 所示, 在 50~250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质量浓度范围内, AGBE 还原所得的 Fe^{2+} 毫摩尔数呈现显著的浓度依赖性递增特征, FRAP 值为 2.63 mmol g^{-1} , 高于 Cui 等^[1]采用不同溶剂提取的银杏叶外果皮主要成分 (其中活性最高的甲醇提取物 FRAP 值为 0.135 mmol g^{-1})。因此, AGBE 作为天然活性物质, 其显著的剂量依赖性特征及良好的铁离子还原能力, 为 AGBE 的抗氧化应用奠定了良好基础。

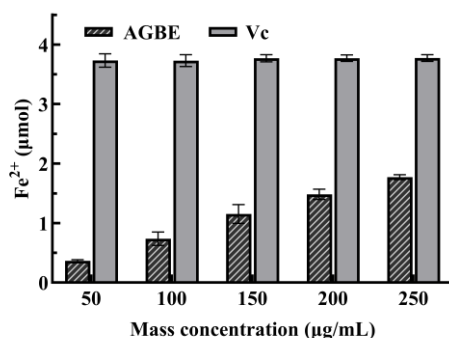


图 6 AGBE 的铁离子还原能力

Fig.6 Ferric ion reducing capacity of AGBE

2.3.4 超氧阴离子清除率

在碱性 Tris-HCl 缓冲液中,邻苯三酚自氧化过程会产生超氧阴离子,并进一步促进其自氧化。通过测定 AGBE 对该自氧化过程的抑制程度,即可反映其对超氧阴离子的清除能力。测试结果如图 7 所示,在测试质量浓度范围内,AGBE 对超氧阴离子的清除率呈现出显著的质量浓度依赖性递增特征,其 IC_{50} 为 $823 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,结果与李思斯等^[32]提取的银杏外种皮黄酮的超氧阴离子清除 IC_{50} 值相近 ($851.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。随着质量浓度逐步升高至 $1100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,其清除率进一步提升至 58.63%,清除能力实现了翻倍增长。因此,AGBE 具有良好的超氧阴离子清除能力,充分体现了其良好的抗氧化活性。

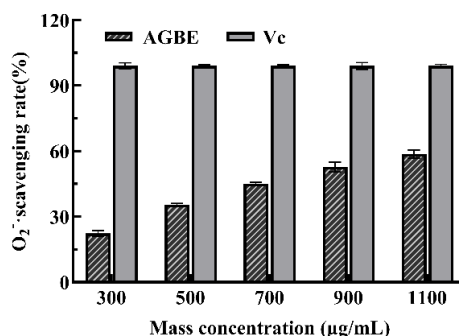


图 7 AGBE 的超氧阴离子清除活性

Fig.7 Superoxide anion scavenging activity of AGBE

对比三种自由基清除实验可以看出,超氧阴离子清除实验的 IC_{50} 值远高于 DPPH 和 ABTS 自由基清除实验 IC_{50} 值。造成这一现象的原因是本研究采用水作为溶剂提取,主要获得的是亲水性成分,极性大,如多酚、黄酮苷等。DPPH 和 ABTS 这两种方法都依赖于抗氧化剂的供氢或供电子能力。水提取物中富含的多酚、黄酮是优秀的氢/电子供体,因此在清除 DPPH 和 ABTS 方面表现出色。超氧阴离子清除实验不仅要求抗氧化剂供氢/电子能力,更看重抗氧化剂是否具有类似 SOD 的酶活性,或特定的分子结构。水提取物中的多酚虽然有效,但可能不是清除超氧阴离子最有效的结构类型。同时,水提法可能未能将一些对超氧阴离子清除能力较强的非极性或弱极性成分提取出来,从而导致 AGBE 对超氧阴离子清除能力较弱。

3 结论

本研究通过响应面法优化了 AGBE 的超声辅助提取工艺,并系统评价了其活性成分、体外抗氧化潜力。通过 CCD 响应面实验获得了稳定、高效的 AGBE 的提取工艺,最佳提取工艺参数为:超声温度 59°C 、超声时间 49 min、超声功率 312 W、液料比 21:1 (mL g^{-1}),在该工艺条件下得到的抗氧化物总还原力为 3.10 ± 0.02 。通过 LC-HRMS 技术从 AGBE 中初步鉴定出 211 种化合物,涵盖有机酸类(相对峰面积百分比 43.70%)、酚类化合物(20.68%)、萜类化合物(16.60%)等 8 大类,其中(2R,3S)-枇杷酸和 4-羟基香豆素为首次在银杏外种皮中发现的酚类活性成分。活性评价结果表明,AGBE 对 DPPH 自由基、ABTS 阳离子自由基和超氧阴离子均具有良好的清除能力,尤

其对 ABTS 自由基的清除效果最强 ($IC_{50}=48.19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。同时其显著的 Fe^{3+} 还原能力进一步证实了其强大的抗氧化活性, 是一种极具潜力的天然抗氧化剂来源。AGBE 具有的丰富的酚类、有机酸及萜类等抗氧化成分, 可作为天然抗氧化剂应用于食品保鲜、延缓脂质氧化等场景, 为开发相关功能性食品或保健品奠定了坚实的理论依据和数据支撑。然而 AGBE 中存在银杏酸等潜在有毒成分, 会引起皮肤红肿, 恶心、呕吐、头晕等症状, 仍需采用有机萃取、生物降解等方式对 AGBE 进行进一步分离纯化, 以获得高纯度的无毒活性单体成分, 并深入开展中试提取与体内抗氧化活性研究, 为其在食品工业中的规模化应用提供更充分的科学依据。

参考文献

- [1] CUI N, ZHANG L, QUAN M, et al. Profile of the main bioactive compounds and *in vitro* biological activity of different solvent extracts from *Ginkgo biloba* exocarp [J]. RSC Advances, 2020, 10(73): 45105-45111.
- [2] WANG H, SHI M, CAO F, et al. *Ginkgo biloba* seed exocarp: A waste resource with abundant active substances and other components for potential applications [J]. Food Research International, 2022, 160: 111637.
- [3] LIU Y, XIN H, ZHANG Y, et al. Leaves, seeds and exocarp of *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae): a comprehensive review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, resource utilization and toxicity [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 298: 115645.
- [4] 朱梦莹,任佳妮,沈娜,等.银杏外种皮化学成分、生物活性和资源利用的研究进展[J].华西药学杂志,2022,37(5):587-593.
- [5] SUDARSINI B, INDIRA M. Optimization of medium composition for enhanced biomass production of probiotic bacteria using response surface methodology [J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2026, 16: 53.
- [6] ABOHASSAN M, FAYZULLAEV N, EDRIS G, et al. Supercritical extraction of salicin, aspirin precursor, from the willow bark, laboratory optimization via response surface methodology and mathematical modeling [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2025, 219: 106540.
- [7] WU D T, LIU W, HAN Q H, et al. Physicochemical characteristics and antioxidant activities of non-starch polysaccharides from different kiwifruits [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 136: 891-900.
- [8] CUI P, GUAN G, GAN Z, et al. Diversity, antibacterial and antioxidant activities of fungi associated with *Apis cerana* [J]. PeerJ, 2025, 13: e19762.
- [9] LIU S, HOU Y, ZHENG K, et al. Exploring the diversity, bioactivity of endophytes, and metabolome in *Synsepalum dulcificum* [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1258208.
- [10] RUMPF J, BURGER R, SCHULZE M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 233: 123470.
- [11] TONG T, WANG Y, ZHANG C, et al. *In vitro* and *in vivo* antihypertensive and antioxidant activities of fermented roots of *Allium hookeri* [J]. Chinese Herbal Medicines, 2021, 13(4): 541-548.
- [12] 樊素芹,闫亚敏,莫转林,等.七株巨大口蘑活性成分含量比较及提取物抗氧化活性[J].食用菌学报,2025,32(5):86-91.
- [13] 唐青,严子军,陈莲芬,等.微波辅助提取紫玉盘叶总黄酮条件优化及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2025,46(17):146-153.
- [14] ZHANG D, NIE S, XIE M, et al. Antioxidant and antibacterial capabilities of phenolic compounds and organic acids from *Camellia oleifera* cake [J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 29(1): 17-25.
- [15] SHEN N, WANG T, GAN Q, et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132531.
- [16] 陈琪,王伯初,唐春红,等.黄酮类化合物抗氧化性与其构效的关系[J].重庆大学学报,2003,26(17):48-51+55.
- [17] DENG M, JIA X, DONG L, et al. Structural elucidation of flavonoids from Shatianyu (*Citrus grandis* L. Osbeck) pulp and screening of key antioxidant components [J]. Food Chemistry, 2021, 366(2022): 130605.
- [18] KIM H, KANG S, GO G-W. Exploring the multifaceted role of ginkgolides and bilobalide from *Ginkgo biloba* in mitigating metabolic disorders [J]. Food Science and Biotechnology, 2024, 33: 2903-2917.
- [19] KOTALI A, NASIOPOULOU D, TSOLERIDIS C, et al. Antioxidant Activity of 3-[N-(Acyldiazono)ethyl]-4-hydroxy-coumarins [J]. Molecules, 2016, 21(2): 138.
- [20] ASHRAF H, QAMAR A, MAHESHWARI N. Attenuation of hexaconazole induced oxidative stress by folic acid, malic acid and ferrocenecarboxaldehyde in an invertebrate model *Bombyx mori* [J]. Heliyon, 2023, 8: e12577.

- [21] SAAD K M, ELMASRY K, BABAN B, et al. Protocatechuic acid ameliorates cisplatin-induced inflammation and apoptosis in mouse proximal tubular cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(9): 4115.
- [22] JIN Q, LIU T, QIAO Y, et al. Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: Role of polyphenols [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1185317.
- [23] WEI C J, HUA F, CHEN Y H, et al. Muscone alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of oxidative stress and enhancement of SIRT3 [J]. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2021, 35(1): 85-96.
- [24] CHEN S, WANG L, RONG S, et al. Extraction, purification, chemical characterization, and in vitro hypoglycemic activity of polysaccharides derived from *Rosa laevigata* Michx [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 279: 135116.
- [25] WATTANALAORSOMBOON S, MANSALAI P, PAYAKA A, et al. The inhibition effect of oleamide for acetylcholinesterase and α -glucosidase from edible wild mushroom by *in vitro*, *in silico* and fluorescence analysis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 308: 142681.
- [26] KORBAS A, KUBIŚ J, RYBUS-ZAJĄC M, et al. Spermidine modify antioxidant activity in cucumber exposed to salinity stress [J]. Agronomy, 2022, 12(7): 1554.
- [27] AKBAŞ B, DİNÇ G, AKBAŞ A, et al. Protective role of spermidine against diabetes-induced ovarian and endometrial injury via LC3 and Beclin-1 modulation [J]. Antioxidants, 2025, 14(11): 1294.
- [28] 李超峰,吴雯雯,王靖雯,等.银杏果外种皮总黄酮提取工艺和抗氧化活性[J].江苏农业科学,2021,49(6):150-155.
- [29] 赵浩晨,王婉婷,雷佳美,等.银杏果外种皮多糖的脱色工艺及抗氧化活性研究[J].江苏农业科学,2020,48(10):228-231.
- [30] 张跃超,谢普军,张彩虹,等.超声波辅助低共熔溶剂提取银杏叶酚类化合物工艺优化及其抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2026,52(6):173-181.
- [31] 李小军,马晓辉,段国建,等.兰州百合多糖铁(III)配合物制备工艺的 Box-Behnken 响应面法优化及其体外抗氧化活性评价[J].现代食品科技,2024,40(12):201-208.
- [32] 李思斯,江波,张涛,等.银杏外种皮总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2011,32(8):291-294.