

深山含笑叶片总酚超声波提取工艺的优化

毕慧敏¹, 何开跃^{1,①}, 李晓储²

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153)

摘要: 采用单因素实验方法研究了超声波辅助提取过程中乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间对深山含笑 (*Michelia maudiae* Dunn) 叶片总酚提取率的影响, 并采用正交实验方法确定了最佳提取工艺条件。结果表明, 深山含笑叶片总酚超声波辅助提取的最佳提取工艺为: 按 1:30 (质量-体积比) 的料液比加入体积分数 70% 的乙醇, 于 65 °C 条件下用超声波辅助提取 30 min。采用最佳的超声波提取工艺, 深山含笑叶片的总酚提取率可达到 11.41%。定性分析结果显示, 深山含笑叶片的总酚提取物具有典型的酚类化合物特性, 并显示出鞣质类成分、黄酮类成分和香豆素类成分的定性反应特征。

关键词: 深山含笑叶片; 总酚; 超声波提取; 提取工艺

中图分类号: S792.99; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2008)04-0041-05

Optimization on ultrasonic extraction technology of total phenols in *Michelia maudiae* leaf BI Hui-min¹, HE Kai-yue^{1,①}, LI Xiao-chu² (1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(4): 41-45

Abstract: The effects of ethanol concentration, ratio of solid to liquid, extraction temperature and extraction time in ultrasonic-assisted extraction procedure on the extraction rate of total phenols in *Michelia maudiae* Dunn leaf were researched by single factor experiment, and the optimal ultrasonic-assisted extraction technology was determined by orthogonal experiment. The result shows that the optimal ultrasonic-assisted extraction technology of total phenols in *M. maudiae* leaf is: mixing the material with 70% ethanol according to ratio of solid to liquid 1:30 (W/V), and ultrasonic-assisted extracting 30 min at 65 °C condition. The extraction rate of total phenols reaches 11.41% with the optimal ultrasonic-assisted extraction technology. The qualitative analysis result of chemical constituents shows that the total phenol extracts exhibit the typical feature of phenols, and also show the qualitative reaction characteristics of tannins, flavonoids and coumarins.

Key words: *Michelia maudiae* Dunn leaf; total phenols; ultrasonic extraction; extraction technology

天然酚类物质在植物中分布广泛, 大量的研究表明, 植物多酚具有较强的抗氧化作用以及明显的抑菌、抗癌、抗老化和抑制胆固醇升高等功效, 摄取一定量的植物多酚可有效预防和抑制疾病发生, 因此, 植物多酚已被人们称作人类健康的“第 7 营养素”^[1]。植物多酚对多种细菌、真菌及酵母菌有明显的抑制作用, 尤其对霍乱菌 (*Vibrio cholerae*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等常见的致病菌有很强的抑制能力^[2]。Kuete 等报道^[3], 山榄科 (Sapotaceae) 植物 *Tridesmostemon omphalocarpoides* 的茎皮提取物对 2 种酵母菌和 7 种细菌有抑菌作用, 该提取物中具有

抑菌活性的有效成分主要为生物碱类、类固醇类、单宁酸、多酚类及黄酮类等成分。

超声波是一种弹性机械振动波, 当大量的超声波作用于提取介质时将产生极高的瞬时压力, 破坏植物的细胞壁和细胞结构, 从而使细胞中的有效成分得以释放, 并直接溶解在提取溶剂中, 从而提高植物细胞中有效成分的提取率^[4-5]。由于超声波提取

收稿日期: 2008-01-04

基金项目: 南京林业大学科技创新基金资助项目 (163010036)

作者简介: 毕慧敏 (1982—), 女, 山东新泰人, 硕士, 主要从事植物生理生化方面的研究。

① 通讯作者 E-mail: hekaiyue2002@yahoo.com.cn

法具有操作简便快捷、提取温度低、提取率高、不破坏提取物结构等特点,该方法近年来已广泛应用于植物天然有效成分的提取^[6-10]。

深山含笑(*Michelia maudiae* Dunn)别名光叶白兰、莫夫人含笑花,系木兰科(Magnoliaceae)含笑属(*Michelia* L.)常绿阔叶树种,特产于中国,是珍稀的优良景观绿化树种,广泛应用于城市绿化和景观建设。相关研究表明,深山含笑提取物具有良好的抗氧化活性和抗菌杀虫活性^[11-13]。为了合理开发利用这一珍贵的植物资源,作者采用单因素实验和正交实验方法,以超声波作为辅助提取手段,对深山含笑叶片中总酚提取物的提取条件进行了筛选,并对叶片总酚提取物的超声波辅助提取工艺进行了优化,以期为深山含笑的可持续利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用深山含笑叶片采自南京市中山陵,阴干后粉碎,置于-18℃冰箱中保存、备用。

实验用试剂均为分析纯;原儿茶酸标准品购自上海友思公司。所用仪器有:KS-120D超声波清洗机(宁波海曙科声超声设备有限公司)、ZFQ85B旋转蒸发器(上海医械专机厂)、HH-2型恒温水浴锅(国华电器有限公司)、SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂)、SP-2100P型可见光分光光度计(上海光谱仪器有限公司)及电动粉碎机(成都每时乐电器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的绘制 以原儿茶酸为标准品,参照田文礼等^[14]的方法绘制标准曲线。配制浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的原儿茶酸标准品溶液,分别精确量取原儿茶酸标准品溶液0.0、0.1、0.2、0.3和0.4 mL,各加入6 mL水,摇匀后,再加入0.5 mL福林试剂^[14],充分摇匀后,放置1 min;加入1.5 mL质量体积分数20%的 Na_2CO_3 溶液,混匀后用水定容至10 mL;在75℃条件下反应10 min后,于765 nm波长下测定不同浓度原儿茶酸标准品溶液的吸光度。以浓度为横坐标 x 、吸光度(A_{765})为纵坐标 y 得到具有良好线性关系的原儿茶酸标准品回归方程 $y = 0.1044x + 0.0014$ ($R^2 = 0.9996$)。

1.2.2 单因素实验方法 为了研究乙醇浓度对总

酚提取率的影响,精确称取深山含笑叶片干粉6份,每份1.000 g,分别加入30 mL体积分数为30%、40%、50%、60%、70%和80%的乙醇溶液,50℃条件下超声波辅助提取30 min,抽滤,滤渣以相同条件再提取1次,抽滤,合并滤液,用旋转蒸发器减压浓缩并回收乙醇,得到浓缩的提取液,待测。

为了研究料液比对总酚提取率的影响,精确称取深山含笑叶片干粉5份,每份1.000 g,分别加入10、20、30、40和50 mL体积分数70%的乙醇溶液,50℃条件下超声波辅助提取30 min,抽滤,滤渣以相同条件再提取1次,抽滤,合并滤液,用旋转蒸发器减压浓缩并回收乙醇,得到浓缩的提取液,待测。

为了研究提取温度对总酚提取率的影响,精确称取深山含笑叶片干粉6份,每份1.000 g,分别加入30 mL体积分数70%的乙醇溶液,分别于45℃、50℃、55℃、60℃、65℃和70℃条件下超声波辅助提取30 min,抽滤,滤渣以相同条件再提取1次,抽滤,合并滤液,用旋转蒸发器减压浓缩并回收乙醇,得到浓缩的提取液,待测。

为了研究提取时间对总酚提取率的影响,精确称取深山含笑叶片干粉5份,每份1.000 g,分别加入30 mL体积分数70%的乙醇溶液,在50℃条件下分别超声波辅助提取10、20、30、40和50 min,抽滤,滤渣以相同条件再提取1次,抽滤,合并滤液,用旋转蒸发器减压浓缩并回收乙醇,得到浓缩的提取液,待测。

将上述浓缩后的提取液分别用体积分数70%的乙醇溶液定容至100 mL,即得到样品提取液。取0.25 mL样品提取液按标准品溶液的处理方法制备样品待测液并于765 nm波长下测定吸光度,根据原儿茶酸标准曲线的回归方程计算样品溶液中的总酚含量,并据此计算总酚提取率。

1.2.3 正交实验设计 在上述单因素实验结果的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交表,选取乙醇浓度、料液比、提取温度及提取时间4个因子,每个因子设置3个水平进行正交实验。其中,乙醇浓度分别设置体积分数60%、70%和80%3个水平;料液比(质量-体积比)分别设置1:20、1:30和1:403个水平;提取温度分别设置55℃、60℃和65℃3个水平;提取时间分别设置20、30和40 min3个水平。按照上述单因素实验中的样品提取步骤进行叶片总酚的提取和待测液的制备,根据标准曲线的回归方程计算

样品溶液中的总酚含量,并据此计算总酚提取率。

利用正交实验优选出的最佳超声波提取工艺进行3次重复实验,以验证深山含笑叶片总酚超声波辅助提取工艺的可操作性和重现性。

1.2.4 提取物的定性分析 按照文献[15]的方法,根据酚类成分的特性对深山含笑叶片提取液中的总酚成分进行定性分析,初步鉴定出总酚提取物中所含酚类成分的类型。

1.3 数据处理

根据下列公式计算深山含笑叶片的总酚提取率:总酚提取率 = (总酚质量/叶片干粉质量) × 100%。采用 Excel 软件进行实验数据处理,并用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行方差分析。

2 结果和讨论

2.1 不同因素对深山含笑叶片总酚提取率的影响

2.1.1 乙醇浓度对提取率的影响 不同乙醇浓度对深山含笑叶片总酚提取率的影响见图1。由图1可见,在体积分数30%~80%的范围内,深山含笑叶片的总酚提取率随乙醇浓度的提高呈现出先升高后下降的趋势,以体积分数70%的乙醇溶液提取率最高,体积分数60%和80%的乙醇溶液的提取率也较高。因此,用于深山含笑叶片总酚超声波辅助提取的乙醇浓度为体积分数60%~80%。

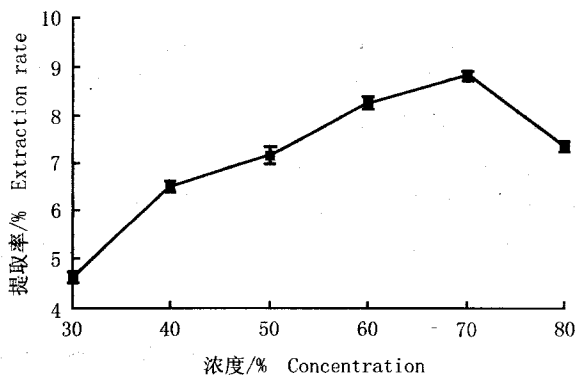


图1 在超声波辅助提取过程中不同的乙醇浓度对深山含笑叶片总酚提取率的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of ethanol on the extraction rate of total phenols in *Michelia maudiae* Dunn leaf in ultrasonic-assisted extraction procedure

2.1.2 料液比对提取率的影响 不同料液比(质量-体积比)对深山含笑叶片总酚提取率的影响见

图2。由图2可见,料液比在1:10~1:30范围内,随乙醇用量的增多(料液比减小),总酚提取率不断增高,且增幅较大;但当料液比大于1:30时,总酚的提取率则基本不变。从提高总酚的提取率、减少乙醇用量和缩短浓缩过程等方面综合分析后认为,乙醇用量不宜过大,故在深山含笑叶片总酚超声波辅助提取过程中适宜的料液比为1:20~1:40。

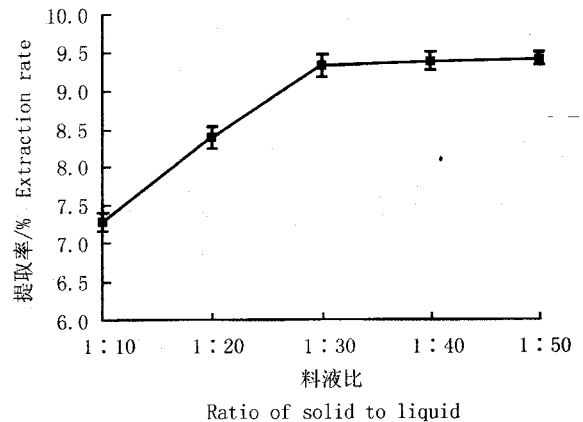


图2 在超声波辅助提取过程中不同料液比对深山含笑叶片总酚提取率的影响

Fig. 2 Effect of different ratios of solid to liquid on the extraction rate of total phenols in *Michelia maudiae* Dunn leaf in ultrasonic-assisted extraction procedure

2.1.3 提取温度对提取率的影响 不同温度对深山含笑叶片总酚提取率的影响见图3。由图3可见,在低于65℃条件下,随着提取温度的升高,总酚的提取率不断增高,但超过65℃后,总酚的提取率则有所下降。这可能是由于酚类物质在乙醇中的溶解度随着温度的升高而增加,同时由于温度升高,提取液粘度减小,扩散系数增加,促使提取速度加快,但过高的温度则会导致乙醇挥发,致使提取率不再继续增加反而降低。根据深山含笑叶片总酚提取物的热稳定性,同时兼顾杂质溶出问题以及溶剂损失等各方面因素,确定深山含笑叶片总酚超声波辅助提取过程中的提取温度以不高于65℃为宜。

2.1.4 提取时间对提取率的影响 不同提取时间对深山含笑叶片总酚提取率的影响见图4。由图4可知,用超声波辅助提取10~30 min,总酚的提取率变化较大;随着提取时间的延长,提取率不断增加;提取时间超过30 min后,提取率增加很缓慢,基本达到平衡状态。因此,在深山含笑叶片总酚提取过程中用超声波辅助提取的时间以20~40 min为宜。

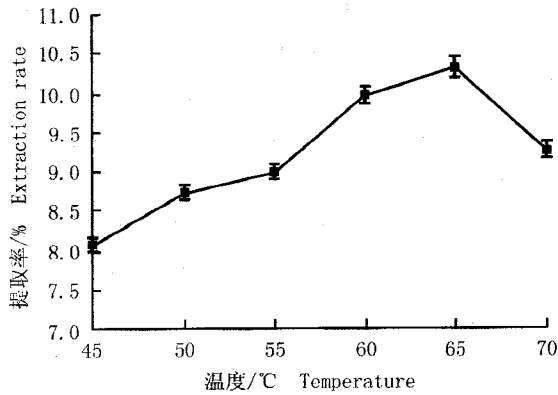


图3 在超声波辅助提取过程中不同的提取温度对深山含笑叶片总酚提取率的影响

Fig. 3 Effect of different temperatures on the extraction rate of total phenols in *Michelia maudiae* Dunn leaf in ultrasonic-assisted extraction procedure

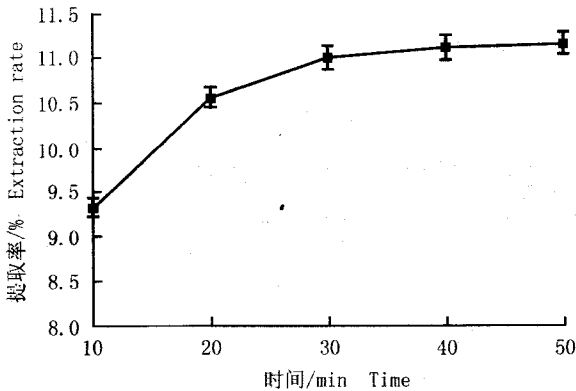


图4 超声波辅助提取不同时间对深山含笑叶片总酚提取率的影响
Fig. 4 Effect of different times of ultrasonic-assisted extraction on the extraction rate of total phenols in *Michelia maudiae* Dunn leaf

2.2 深山含笑叶片总酚提取的正交实验结果

通过以上的单因素实验,确定了深山含笑叶片总酚超声波辅助提取过程中乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间的合理范围,并据此设计了正交实

验,以确定深山含笑叶片总酚超声波辅助提取的最佳提取条件,结果见表1。

表1 深山含笑叶片总酚超声波辅助提取的正交实验结果
Table 1 The orthogonal experiment result of ultrasonic-assisted extraction of total phenols in *Michelia maudiae* Dunn leaf

处理号 Treatment No.	因素与水平 ¹⁾ Factor and level ¹⁾				提取率/% Extraction rate
	A	B	C	D	
1	60	1:20	55	20	8.46
2	60	1:30	60	30	9.02
3	60	1:40	65	40	9.62
4	70	1:20	60	40	9.81
5	70	1:30	65	20	11.39
6	70	1:40	55	30	10.98
7	80	1:20	65	30	9.66
8	80	1:30	55	40	11.03
9	80	1:40	60	20	10.05
K_1	27.10	27.93	30.47	29.90	
K_2	32.18	31.44	28.88	30.46	
K_3	30.74	30.65	30.67	30.31	
k_1	9.03	9.31	10.16	9.97	
k_2	10.73	10.48	9.63	10.15	
k_3	10.25	10.22	10.22	10.10	
R	1.69	1.17	0.60	0.19	

¹⁾ A: 乙醇浓度 Ethanol concentration(%); B: 料液比 Ratio of solid to liquid; C: 提取温度 Extraction temperature(°C); D: 提取时间 Extraction time(min).

极差分析结果显示(表1),在超声波辅助提取过程中,影响深山含笑总酚提取率的因素从大至小依次为:乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间。根据表1的正交实验结果,确定深山含笑叶片总酚超声波辅助提取的最佳条件为:按质量体积比1:30的料液比加入体积分数70%的乙醇,于65 °C条件下用超声波辅助提取30 min。

通过直观分析发现,对深山含笑叶片总酚提取率影响最小的因素是提取时间,故以提取时间作为误差进行方差分析,结果见表2。由表2可知,对深

表2 深山含笑叶片总酚超声波辅助提取正交实验结果的方差分析¹⁾

Table 2 Variance analysis of the orthogonal experiment result of ultrasonic-assisted extraction of total phenols in *Michelia maudiae* Dunn leaf¹⁾

变异来源 Source	离差平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
乙醇浓度 Ethanol concentration	4.570	2	2.285	40.674 *	19.00	99.00
料液比 Ratio of solid to liquid	2.260	2	1.130	20.117 *		
提取温度 Extraction temperature	0.641	2	0.321	5.708		
提取时间(误差) Extraction time (Error)	0.112	2	0.056			
合计 Total	7.584	8				

¹⁾ *: $P < 0.05$.

山含笑叶片总酚提取率有显著影响的因素是乙醇浓度和料液比($P < 0.05$)。

采用上述最佳提取工艺条件进行3次重复实验,深山含笑叶片中的总酚提取率分别为11.37%、11.42%和11.45%,总酚提取率的均值为11.41%,相对标准偏差(RSD)为0.35%。由此可见,经过正交实验筛选出来的深山含笑叶片总酚超声波辅助提取的工艺条件合理可行,稳定可靠,具有较好的可操作性和重现性。

2.3 深山含笑叶片总酚提取物的定性分析结果

利用显色反应对深山含笑叶片总酚提取物的化学成分进行定性鉴定,结果显示,深山含笑叶片总酚提取物的 FeCl_3 实验显绿色, KMnO_4 实验出现褪色现象,重氮化实验显红色,确定提取物中含有酚类化合物;明胶实验出现混浊或白色沉淀,生物碱实验也有沉淀出现,表明提取物中含有鞣质;盐酸锌粉反应显红色,与 NaOH 反应后反应液颜色加深,表明提取物中含有黄酮类化合物;异羟肟酸铁实验显棕红色, KOH 实验显红色,表明提取物中含有香豆素类化合物。综上所述,深山含笑叶片总酚提取物中含有黄酮类、香豆素类及鞣质等酚类化合物。

3 结论和讨论

本实验以总酚提取率为指标,对深山含笑叶片总酚超声波辅助提取的提取工艺进行了优化,结果表明:按质量-体积比1:30的料液比加入体积分数70%的乙醇溶液,于65℃条件下用超声波辅助提取30 min,深山含笑叶片总酚的提取率较高。

极差分析和方差分析结果表明,在超声波辅助提取过程中,影响深山含笑叶片总酚提取率的因素从大至小依次为乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间,其中乙醇浓度和料液比对总酚提取率的影响显著($P < 0.05$)。按照最佳提取工艺条件进行重复性实验,总酚的平均提取率为11.41%,RSD仅为0.35%,表明经正交实验优化的提取工艺流程合理可行、稳定可靠,具有较好的可操作性和重现性。

采用福林试剂测定深山含笑叶片中的总酚成分是一种既快速又精确的方法,测定过程中总酚提取

液不需要经过任何前处理即可直接与福林试剂作用,避免了前处理过程中酚类物质的损失。并且,该测定方法操作简单,适合大批样品的分析。超声波辅助提取法不仅可使酚类化合物得到有效的提取和分离,而且还能节约能源(提取温度低、提取时间短),因而更有利于资源的综合利用,可应用于工业化生产。

参考文献:

- [1] 赵扬帆,郑宝东. 植物多酚类物质及其功能学研究进展[J]. 福建轻纺, 2006(11): 107-110.
- [2] 裘爱泳,刘军海,张海晖. 植物多酚提取和应用[J]. 粮食与油脂, 2003(6): 10-11.
- [3] Kuete V, Tangmouo J G, Beng V P, et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridestemon omphalocarpoides* (Sapotaceae) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 104(1/2): 5-11.
- [4] 陈业高. 植物化学成分[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 3.
- [5] 黎海彬,李琳,郭祀远,等. 药用植物有效成分提取技术[J]. 现代化工, 2002, 22(5): 59-68.
- [6] 靳素荣,姚礼峰,卢威,等. 超声波法提取荷叶多酚工艺研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 20-22.
- [7] 葛蕾,李志西,司翔宇,等. 超声波提取苹果渣多酚工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 79-81.
- [8] 刘祥义. 超声波提取元宝枫叶总黄酮方法研究[J]. 云南化工, 2003, 30(1): 27-28.
- [9] 谢明杰,宋明,邹翠霞,等. 超声波提取大豆异黄酮[J]. 大豆科学, 2004, 23(1): 76-77.
- [10] 吴菊兰,任冰如,李维林,等. 不同产地乌非地上部分总黄酮含量的比较分析[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(1): 77-78.
- [11] 何开跃,樊亚苏,李晓储,等. 4种含笑叶片提取物对大豆油的抗过氧化活性[J]. 林业科学, 2007, 43(11): 157-162.
- [12] 何开跃,李晓储,张双全,等. 深山含笑和阔瓣含笑叶片提取物成分及其抗氧化自由基活性研究[J]. 世界林业研究, 2006, 19(增刊1): 108-111.
- [13] 操璟璟,陈凤美,龚玉霞,等. 深山含笑叶片的挥发油成分及其生物活性研究[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(3): 27-30.
- [14] 田文礼,孙丽萍,董捷,等. Folin-Ciocalteu 比色法测定蜂花粉中的总酚[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 258-260.
- [15] 王俊儒. 天然产物提取分离与鉴定技术[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2005.