

文章编号:1673-1689(2006)03-0104-04

番石榴叶丙酮提取物中酚类物质的提取与鉴定

张添, 梁清蓉, 钱和*, 袁炜, 姚卫蓉

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:研究了丙酮提取番石榴叶中多酚类物质的最佳条件:体积分数50%丙酮浸提,浸提温度60℃,浸提时间1h,原料粒度40目;在该条件下总酚得率为14.54%。利用RP-HPLC鉴定了番石榴叶丙酮提取物中多酚类物质,发现了8种酚类物质:山奈素、绿原酸、没食子酸、原儿茶酸、阿魏酸、咖啡酸、槲皮素和卢丁,其中山奈素、绿原酸、没食子酸在番石榴叶中的存在迄今未见报道。

关键词:丙酮;番石榴叶;多酚;RP-HPLC

中图分类号:Q 949.762.2

文献标识码:A

Extraction and Identification of Phenolic Compounds in Acetone Extract from Guava Leaf

ZHANG Tian, LIANG Qing-rong, QIAN He*, YUAN Wei, YAO Wei-rong

(School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract:In this paper, the condition of extracting polyphenolic compounds by different solvents was discussed. The optimum extracting condition was determined as: 50% acetone solution, extraction temperature 60℃, extraction time 1h, 40 Mu and the total phenols recovery was 14.54%. In addition, 3 new compounds (gallic acid, chlorogenic acid kaempferol) and 5 known compounds (procatechuic acid, ferulic acid, caffeic acid, quercetin and rutin) were identified in the guava leaf extract by RP-HPLC analysis.

Key words: acetone; guava leaf; polyphenolic compounds; RP-HPLC

番石榴(*Psidium guajava*)为桃金娘科番石榴属植物,是热带常绿小乔木或灌木,原产于热带美洲,几个世纪前传入我国,在我国广东、广西等地有广泛的种植,常用它来治疗糖尿病,控制体重;另外番石榴叶煎煮物还具有消炎、止血和治疗腹泻的作用^[1-3]。

番石榴叶中的多酚类化合物有很多的生理作用,包括抗氧化作用,有助于延缓生物体的过氧化进程^[4-5]。现代研究表明,番石榴叶中含有多种重

要的芳香类二级代谢产物如多酚化合物,有学者认为正是这些酚类化合物赋予番石榴叶多种药用功效。

目前对番石榴叶的研究还较少,有限的几篇报道中主要是对其药用价值进行研究^[1],尚未有对多酚类物质丙酮法提取工艺和酚类物质鉴定的研究报道。作者对番石榴叶中酚类物质的提取工艺进行研究,并且进行了鉴定,为开发利用番石榴叶提供一定的依据。

收稿日期:2005-03-29; 修回日期:2005-05-18.

作者简介:张添(1959-),男,江苏无锡人,工程师;*责任作者.

万方数据

1 材料与方法

1.1 实验原料

番石榴干叶:购自广西药材公司。

1.2 实验试剂

没食子酸、原儿茶酸、邻苯二酚、阿魏酸、山奈素、咖啡酸、绿原酸、黄酮类槲皮素二水物和卢丁三水物:色谱级, Sigma 公司产品; 甲醇: 色谱级, Merk 公司产品; 福林试剂: 自行配制; 没食子酸、丙酮、无水乙醇、无水碳酸钠, 均为分析纯。

1.3 实验仪器

HH-2 数显恒温水浴锅: 江苏金坛荣华仪器制造有限公司产品; THZ-82 恒温振荡器: 国华公司产品; SHB-III 循环水式多用真空泵: 郑州长城科工贸有限公司产品; R-501 旋转蒸发器: 上海申顺生物科技有限公司产品; RP-HPLC: Waters 公司产品; UV-2000 型可见光分光光度计: 尤尼可(上海)仪器有限公司产品; 真空干燥器: 上海实验仪器厂产品。

1.4 实验方法

1.4.1 原料处理 将番石榴叶粉碎并筛分成不同的粒度, 置于真空干燥器中(40 ℃)干燥至恒重, 备用。

1.4.2 浸提实验 将番石榴叶粉碎, 置于真空干燥箱(40 ℃)干燥至恒重, 准确称取已烘干的番石榴叶粉 10 g, 加入 100 mL 一定体积分数的丙酮溶液, 置于恒温振荡水浴器中, 提取一定时间后, 真空抽滤, 得滤液, 滤液 40 ℃下浓缩后, 真空干燥保存。

1.4.3 总酚类物质的测定 采用福林-酚法测定。以没食子酸为标样, 根据多酚类物质与福林试剂一定条件下反应, 生成的物质在 765 nm 下有吸收, 得到的工作曲线为: $y=1\ 197.1x+19.188$ (x 为吸光度值; y 为总酚质量分数)。总酚质量分数以没食子酸计算^[6-7]。

1.4.4 酚类物质的鉴定

1) 色谱条件: RP-HPLC 系统用 XDB-C18 柱 ($D\ 3.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$), 流动相包括溶剂: A (体积分数 0.1% 甲酸), B (体积分数 80% 甲醇); 梯度为: 0~5 min, A: 100%, B: 0%; 5~50 min, A: 100% → 0%, B: 0% → 100%; 体积流量: 1.0 mL/min; 样品加入量: 10 μL ; 检测波长: 280 nm。

2) 方法: 真空干燥过的番石榴叶丙酮提取物 30 mg 溶解在 10 mL 甲醇和水中, 超声 10 min 后, 溶液经过 0.45 μm 滤孔过滤 (Milli-pore, MSD) 注入 HPLC 系统进行分析 (Waters Associates, USA)。

标准溶液包括没食子酸、原儿茶酸、邻苯二酚、阿魏酸、山奈素、咖啡酸、绿原酸、黄酮类槲皮素二水物和卢丁三水物, 均制成质量浓度为 0.05 mg/mL 的甲醇溶液。

2 结果与分析

2.1 酚类物质提取溶剂的选择

丙酮和乙醇是常见的植物活性成分的提取溶剂, 乙醇由于其安全无毒被广泛使用, 而丙酮常用来酚类物质的浸出。根据材料与方法中的提取方法, 分别加入体积分数 30%、50%、70% 的乙醇、丙酮溶液, 其它条件固定(浸提时间 2 h, 温度 45 ℃, 原料粒度 40 目)进行实验, 考察这两种有机溶剂对番石榴叶中酚类物质浸出效果, 总酚得率见图 1。

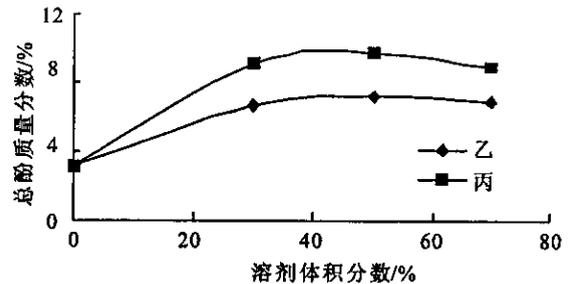


图 1 不同溶剂对多酚浸提率的影响

Fig. 1 Effect of solvent on total phenolics recovery

从图 1 可以看出, 丙酮相比于乙醇, 在其它相同的作用条件下, 番石榴叶中浸出的酚类物质含量要高一些。因此, 选用丙酮作为提取溶剂。另外还可以看出, 酚类物质含量并没有随溶剂体积分数升高而升高, 在溶剂体积分数超过 60% 时, 得率反而下降, 由此推断出番石榴叶中浸出的酚类物质具有中等极性。

2.2 酚类物质提取单因素实验

2.2.1 浸提温度的影响 温度对于细胞内物质的溶出起着重要作用, 温度过低, 溶出速率慢, 效率低, 但温度过高, 对于热敏性物质性质产生影响, 同时能量消耗大。作者设计温度 40~70 ℃, 其它条件固定(浸提时间 2 h, 丙酮体积分数 50%, 原料粒度 40 目)进行实验^[8-9]。

由图 2 可以看出, 随温度的升高, 多酚质量分数(得率)提高, 但温度过高, 得率反而下降。温度过高, 可能主要是酚类物质的容易被氧化, 因而选择温度在 60 ℃ 左右。

2.2.2 丙酮体积分数对浸提得率的影响 由于多酚类物质属于中极性化合物, 因此, 一定体积分数的丙酮溶液有助于细胞内物质的溶出, 但体积分数过高, 有机溶剂消耗大, 因此选择体积分数为 25%

~85%的丙酮溶液,其它条件固定(浸提时间 2 h, 温度 45 ℃, 原料粒度 40 目)进行实验。

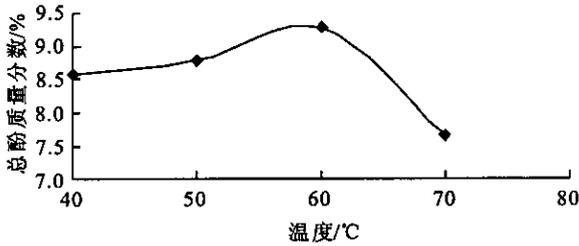


图2 不同温度对浸提得率的影响

Fig. 2 Effect of temperature on total phenolics recovery

由图3可知,丙酮溶液体积分数在50%适合多酚类物质,溶剂体积分数提高,提取率下降,酚类物质的极性属于中等极性。

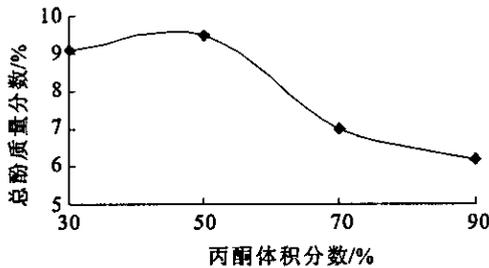


图3 不同体积分数对浸提得率的影响

Fig. 3 Effect of solvent concentration on total phenolics recovery

2.2.3 浸提时间对浸提得率的影响 浸提时间长短直接影响提取效率的高低,浸提时间短,可以提高效率,但提取率低;提取时间过长,对提取效率低,作者选择 1~4 h,其它条件固定(丙酮体积分数 50%, 温度 45 ℃, 原料粒度 40 目)进行实验,结果见图4。

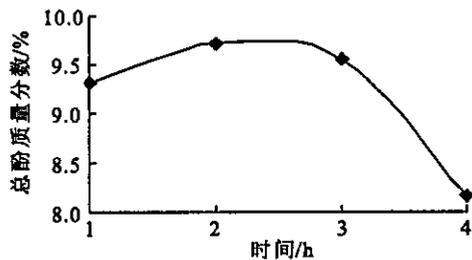


图4 浸提时间对浸提得率的影响

Fig. 4 Effect of time on total phenolics recovery

由图4可知,时间延长,在没有充氮情况下,易造成酚类物质的氧化。因此,提取时间选择在 2 h 内比较合适^[8-9]。

2.2.4 原料粒度对浸提得率的影响 原料粒度对于细胞内物质的溶出有重要影响,粒度小,与溶剂接触的比面积大,但分散性差;粒度大,分散性好,但与溶剂接触的比面积小。采用 20~80 目的番石榴叶,其它条件固定(丙酮体积分数 50%, 浸提时间

2 h, 温度 45 ℃)进行实验,结果见图5。

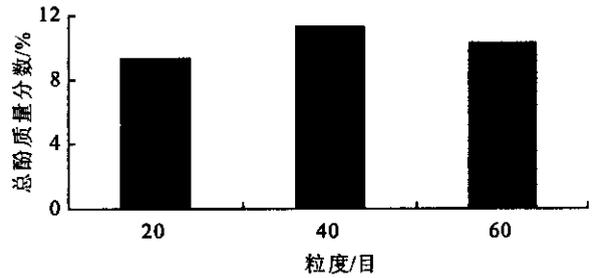


图5 不同原料粒度对浸提得率的影响

Fig. 5 Effect of particle size on total phenolics recovery

由图5可知,粒度对提取率的影响很大。主要是因为粒度小,与溶剂接触面大,但分散性差;粒度大,分散性好,但与溶剂接触少。从实验结果看,选择 40 目较好。

2.3 酚类物质提取正交实验

根据单因素的实验,发现浸提温度、时间、溶剂体积分数、粒度等 4 个因素都对浸提得率有重要影响,为获得最佳的提取工艺,作者采用正交实验寻求最佳的工艺条件。设计 4 因素 3 水平的正交实验,见表1,表2和图6。

表1 试验因素水平 $L_9(3^4)$ 表

Tab. 1 The design of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	温度 A/℃	时间 B/h	丙酮体积分数 C/%	粒度 D/目
1	40	1.0	30	20
2	50	1.5	50	40
3	60	2.0	70	60

表2 正交实验结果

Tab. 2 The result of $L_9(3^4)$ orthogonal test

	A	B	C	D	总酚质量分数/%
1	1	1	1	1	8.21
2	1	2	2	2	11.67
3	1	3	3	3	7.95
4	2	1	2	3	13.84
5	2	2	3	1	8.47
6	2	3	1	2	8.59
7	3	1	3	2	13.32
8	3	2	1	3	11.62
9	3	3	2	1	12.03
K_1	27.83	35.37	28.42	28.71	
K_2	30.90	31.76	37.54	33.58	
K_3	36.97	28.57	29.74	33.41	
R	9.14	6.80	9.12	4.87	

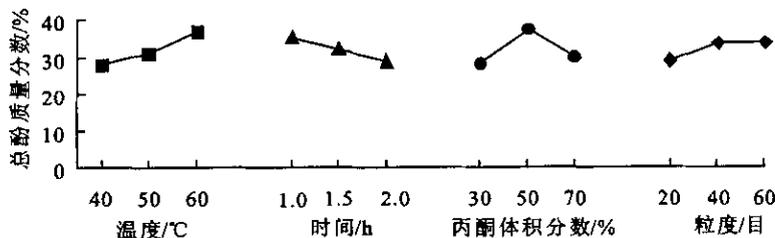


图6 趋势图

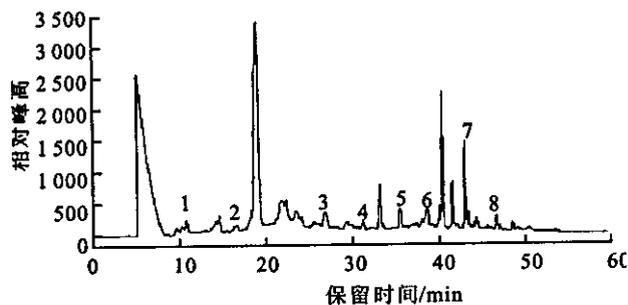
Fig. 6 The tendency figure

从表2和图6分析可知,各极差为: $R_A=9.14$, $R_B=6.80$, $R_C=9.12$, $R_D=4.87$ 。按极差大小,决定因素的主次因素为 $A>C>B>D$ 。因此温度为影响浸提得率最大的因素,其次为丙酮的体积分数。从图6看出,温度越高,总酚质量分数越高,但从单因素结果可以看出,温度不应超过 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

根据正交实验结果,得出最优的提取工艺条件为 $A_3B_1C_2D_2$ 即:浸提温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,浸提 1 h ,丙酮体积分数 50% ,原料粒度 40 目。在此工艺下进行实验,浸提得率为 14.54% 。

2.4 酚类物质的 RP-HPLC 鉴定

从丙酮提取最佳工艺可知,番石榴叶中含有大量的酚类物质。但是根据目前的研究报道可知,植物中酚类物质的种类有上千种。槲皮素、山奈素、卢丁等是重要的具有生理活性的酚类物质,因此,作者利用 RP-HPLC 法,选用这 9 种酚类物质作为对照品,鉴定存在于番石榴叶中的酚类物质,结果见图 7。



1. 没食子酸; 2. 原儿茶酸; 3. 咖啡酸; 4. 绿原酸; 5. 阿魏酸; 6. 卢丁; 7. 槲皮素; 8. 山奈素

图7 番石榴叶提取物的 RP-HPLC 图谱

Fig. 7 RP-HPLC profile of guava leaf extract

番石榴叶丙酮提取物含有以下酚类物质:没食子酸、原儿茶酸、阿魏酸、山奈素、咖啡酸、绿原酸、槲皮素和卢丁。山奈素、绿原酸、没食子酸为新鉴定存在于番石榴叶中的酚类物质,没有发现邻苯二酚的存在。其中,从已有的标准品对照来看,槲皮素是以上 8 种酚类物质中含量最高的成分,这与已报道的研究一致。绿原酸、槲皮素、阿魏酸、山奈素和卢丁都是重要的具有生理活性的酚类物质,证明了它们的存在可以很好作为番石榴叶具有多种生理活性的科学依据之一。

另外,除了以上 8 种酚类被鉴定存在于番石榴叶中,还有一些物质由于没有对照品,暂时无法鉴定,有待进一步的研究。

3 结 论

1) 通过溶剂对比实验,确定丙酮水溶液为浸提的较佳溶剂。

2) 通过单因素实验可知,浸提时间、温度和溶剂体积分数、原料粒度对浸提有影响;通过正交实验及极差分析,确定了丙酮水溶液最佳的工艺参数为:提取温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,提取 1 h ,丙酮体积分数为 50% ,物料过 40 目。该工艺的总酚质量分数为 14.54% 。

3) 通过 RP-HPLC 分析,鉴定了 8 种酚类物质(没食子酸、原儿茶酸、阿魏酸、山奈素、咖啡酸、绿原酸、槲皮素和卢丁)存在于番石榴叶中。

参考文献:

[1] Jaiarj P, Khoohaswan P, Wongkrajang Y, et al. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* linn leaf extract [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 67: 203-212.

[2] Jaiarj P, Wongkrajang Y, Thongpraditchote S, et al. Guava leaf extract and topical haemostasis [J]. *Phytotherapy Research*, 2000, 14: 388-391.

- [3] Lutterodt D G. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as possible mode of action of *Psidium guajava* leaves [J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 1989, 24: 235-247.
- [4] Bhati A.. Terpene chemistry: A preliminary study of the new sesquiterpene isolated from the leaves of guava, *Psidium guajava* [J]. **Perfume Essential Oil Record**, 1967, 58: 707-709.
- [5] 刘大川,汪海波.大豆胚芽中大豆皂甙、异黄酮甙的提取工艺研究[J]. **食品科学**, 2000, 21(10): 28-31.
- [6] 严守雷,王清章,彭光华.藕节中总酚含量的福林法测定[J]. **华中农业大学学报**, 2000, 22(4): 412-414.
- [7] Harborne J B. *Plant Phenolics* [M]. New York: Academic Press, 1989.
- [8] 赵文军,吴雪苹,王旭.葡萄籽中低聚原花青素提取条件的研究[J]. **食品科学**, 2004, 25(2): 117-120.
- [9] 戚向阳,黄红霞,巴文广.苹果中原花青素提取工艺的研究[J]. **食品工业科技**, 2003, 24(3): 63-65.

(责任编辑:朱明)

(上接第97页)

- [3] Kitahara Koji, Ookita Kazumi, Kobayashi Yoshimi. Recovery of viscous substances from seeds by non-extractive process [P]. 日本专利:JP 03179001 A 25, 1991-06-30.
- [4] Fedeniuk R W, Biliaderis C G. Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1994, 42(2): 240-247.
- [5] 王惠芳,尉蕊仙.亚麻籽中提取亚麻胶的工艺探讨[J]. **西部粮油科技**, 2002, (5): 23-24.
- [6] Cui W, Mazza G, Oomah B D. Optimization of an aqueous extraction press for flaxseed gum by response surface methodology[J]. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, 1994, 27(4): 363-369.
- [7] Wanasundara P K, Shahidi F. Removal of flaxseed mucilage by chemical and enzymatic treatments[J]. **Food Chemistry**, 1997, 59(1): 47-55.
- [8] 叶垦,张铁军,张存芳.用浸提法提取亚麻籽胶的中试研究[J]. **中国油脂**, 2001, 26(4): 8-9.
- [9] Bhatti R S. Further compositional analyses of flax: mucilage, trypsin inhibitors and hydrocyanic acid[J]. **JAACS**, 1993, 70, (9): 899-904.
- [10] Mazza G, Biliaderis C G. Functional properties of flax seed mucilage[J]. **J Food Sci**, 1989, 54(5): 1302-1305.
- [11] 陈海华,许时婴.亚麻籽胶中多糖含量的测定[J]. **粮食加工与食品机械**, 2003, 11: 116-117.
- [12] 陈海华,许时婴,王璋.亚麻籽胶化学组成和结构的研究[J]. **食品工业科技**, 2004, 25(1): 103-105.
- [13] Garden J A. Flaxseed gum: extraction, characterization, and functionality[J]. **Dissertation Abstracts International**, 1993, 55(5): 17-20.

(责任编辑:朱明)