

## 超声波辅助提取毛杨梅树皮原花色素工艺研究



WU Dong-mei

吴冬梅, 陈笏鸿\*, 汪咏梅, 徐曼, 吴在嵩

(中国林业科学研究院林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室;  
国家林业局林产化学工程重点开放性实验室, 江苏南京 210042)

**摘 要:** 研究了用超声波辅助手段、以水为提取剂从毛杨梅树皮中提取原花色素的工艺方法。最佳提取条件为: 超声波频率 20 kHz, 超声波功率 800 W, 液料比 10:1 (mL:g), 提取温度 60 °C, 每次提取时间 75 min, 提取 2 次, 提取率为 28.2%。该法与常规提取方法相比, 具有温度低、用时少、液体处理量小等特点。产物中有效成分质量分数大于 60%。定性检测确认是局部糖酰化的原翠雀素。

**关键词:** 毛杨梅树皮; 超声波辅助提取; 原花色素; 原翠雀素

中图分类号: TQ351.014; TQ941

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2009)S0-0105-05

### Study on Ultrasound-assisted Extraction of Proanthocyanidins from *Myrica esculenta* Bark

WU Dong-mei, CHEN Jia-hong, WANG Yong-mei, XU Man, WU Zai-song

(Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization;  
Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA, Nanjing 210042, China)

**Abstract:** The ultrasound-assisted technique was researched for extraction of proanthocyanidins from *Myrica esculenta* bark with water as extracting agent. The suitable extraction conditions were: ultrasonic frequency 20 kHz, ultrasonic power 800 W, material/liquid ratio 1:10 (g:mL), temperature 60 °C, extraction time 75 min, duplicate extraction. The extraction yield was 28.2%. By comparison with single-batch extraction, this method has the distinguishing features of: low-temperature, time saving and low liquid amount. The proanthocyanidin content in extract was 60%, and it was determined as prodelpinidin through qualitative examination.

**Key words:** *Myrica esculenta* bark; ultrasound-assisted extraction; proanthocyanidins; prodelpinidin

毛杨梅 (*Myrica esculenta* Buch. -Ham) 是我国南方地区有广阔资源分布的树种。其树皮富含植物多酚, 主要成分为局部糖酰化的聚原翠雀素<sup>[1]</sup>, 它与当前极受推崇的天然抗氧化剂原花青素同属于原花色素类 (proanthocyanidins)。1951 年法国 Jacques Masquelier 首次从海岸松树皮中提取原花青素<sup>[2]</sup>, 并发现其具有抗氧化性能。其后几十年特别是从 20 世纪 80 年代至今, 国外对原花青素的提取及其抗氧化、清除自由基生物活性的研究日益广泛深入, 在医药、保健品、食品、化妆品中得到多方面应用, 如从海岸松树皮提取的 pycnogenol 和从葡萄籽、皮中提取的 grapenol 等<sup>[3-6]</sup>。我国近年来对原花青素的提取、应用及产品开发已取得很大进展, 近年来又对拓宽原花青素原料资源开展研究, 例如: 以落叶松树皮、马尾松树皮、地榆根等作为提取原花青素的原料<sup>[7-9]</sup>, 但对本研究对象聚原翠雀素, 却未被足够关注。已知原花色素类植物多酚的生物活性是基于分子中含有众多活性酚羟基, 即酚羟基的多寡和取代位置对其活性强弱起决定作用<sup>[10-11]</sup>。从原花青素和原翠雀素的分子结构单元看, 前者为儿茶素, 后者为槲儿茶素, 且在后者分子中 C 环 C<sub>3</sub> 的羟基约有 40% 糖酰化。亦即后者分子中含有比前者更多的活性酚羟基, 据此推理原翠雀素应具有强的生物活性。作者对从毛杨梅树皮中提取原翠雀素及其抗脂质氧化、清

收稿日期: 2009-05-19

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划资助 (2006BAD18B0403)

作者简介: 吴冬梅 (1957-), 女, 江苏南京人, 高级实验师, 从事植物资源化学利用研究; E-mail: wdm0207@163.com

\* 通讯作者: 陈笏鸿, 研究员, 主要从事植物资源化学利用研究; E-mail: chen-jiahong@163.com。

除自由基生物活性研究已取得一定进展<sup>[12]</sup>,并获得国家发明专利<sup>[13]</sup>。超声波作为一种辅助和强化手段,在植物有效成分的提取中已得到广泛应用<sup>[14]</sup>。超声波产生的强烈的振荡、空化作用等机械效应能破坏植物细胞壁,有利于溶剂的快速渗透和有效成分的溶出,具有操作温度低、省时、高效等特点。本研究以水作为提取剂,采用超声波辅助的工艺方法提取毛杨梅树皮中的原花色素,并对超声波辅助提取的工艺条件进行了优选。

## 1 实验

### 1.1 材料、试剂与仪器

材料:毛杨梅树皮由广西武鸣栲胶厂提供的风干样,筛去灰土,经植物粉碎机粉碎(过2 mm筛),含原花色素27.2%,水分14%(按LY/T 1083-2008方法测定)。试剂:壳聚糖、铬皮粉、乙酸、甲醇、正丁醇、盐酸、硫酸铁铵等均为国产分析纯;标准样品:槲儿茶素-3-O-鞣酸酯,上海有思生物技术有限公司制备;水(一级水)。仪器设备:FZ 102 微型植物粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司;CTXNW-2B 组合式超声波提取机,超声波频率20 kHz,北京弘祥隆生物技术开发有限公司;SENCO-R 型旋转真空蒸发器,上海申生科技有限公司;FD-1 型冷冻干燥机,日本EYELA公司;Nicolet-FT-IR 550 型红外光谱仪,美国尼高力公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 超声波辅助提取** 在提取罐中投入毛杨梅树皮粉100 g,按一定液料比加入水作为提取溶剂,在设定的超声波功率和温度下,按设定的时间和次数进行提取。

**1.2.2 常规提取** 在提取罐中投入毛杨梅树皮粉100 g和1 000 mL水,80 °C下浸提1 h后滤出提取液;重新加1 000 mL水浸提1 h。共进行4次浸提,提取液进行后处理。

**1.2.3 提取液的后处理** 将提取液经减压蒸发浓缩至约5 °Be',趁热加入1%的壳聚糖-乙酸溶液作为絮凝剂,充分搅拌后于约5 °C冰箱中静置沉降24 h,分出上层清液,适度浓缩后通过真空冷冻干燥即得粉状产物。

#### 1.2.4 产物的定性鉴别

**1.2.4.1 花色素反应** 根据Porter提出的方法<sup>[15]</sup>,按比例将产物的甲醇溶液与正丁醇-盐酸溶液和硫酸铁铵-盐酸溶液混合,在95 °C下反应40 min,生成的深红色花色素溶液,用分光光度计在波长550 nm处测定吸光值。

**1.2.4.2 红外光谱结构鉴定** 对产物和作为参照物的槲儿茶素-3-O-鞣酸酯标准样品分别作红外谱图,并进行比较和鉴别。

**1.2.5 产物中有效成分的定量分析** 按LY/T 1082-2008进行测定。

**1.2.6 提取率的计算** 提取率根据提取液经絮凝冷冻沉降去除树胶等黏性物质后制得的产物进行计算。分离去除的沉降物中夹带了部分有效成分,会对收集到的实际产物量造成一定损失。因此提取率仅在不同工艺条件试验中作为提取效果相互比较的依据。按下式进行计算:

$$\text{得率} = \text{提取物质量} / \text{原料质量} \times 100\%$$

$$\text{提取率} = \text{提取的有效成分质量} / \text{原料中的有效成分质量} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 超声波辅助提取工艺条件的单因素试验

影响提取效果的因素主要包括原料有效成分含量、原料粒度、提取剂溶解性能、超声波频率及功率、液料比、提取温度、提取时间和提取次数等。本研究中原料、提取剂(水)和超声波频率(20 kHz)等均为固定条件,选择可变的超声波功率、提取时间、提取次数、提取温度、液料比等工艺条件进行单因素试验。

**2.1.1 超声波功率的影响** 设定试验条件为:液料比7:1(mL:g,下同)、室温、提取时间为30 min,提取1次。观察使用不同超声波功率对产物得率的影响,结果见图1。从图1曲线的趋势可见,得率随着

功率的增加而增加。当功率增加到 800 W 时得率达到最大值。由于超声波还具有瞬时高温的热效应,功率过强有可能导致产物解聚或氧化变质。

**2.1.2 超声波提取时间的影响** 设定试验条件为:液料比 7:1、室温、超声波功率 800 W,提取 1 次。观察提取时间长短对得率的影响,结果见图 2。从图 2 曲线的趋势可见,得率随时间延长而增长。提取时间为 75 min 时得率达到最大值。继续延长时间,得率反而略有降低,这可能是由于操作误差或产物不能长时间经受高功率超声波作用的缘故。

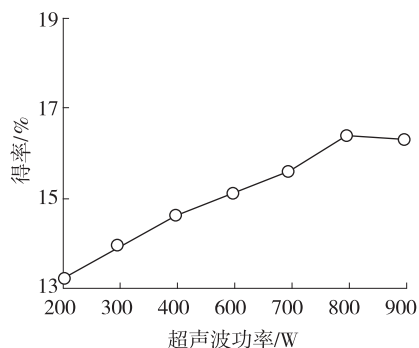


图 1 超声波功率对得率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic power on yield

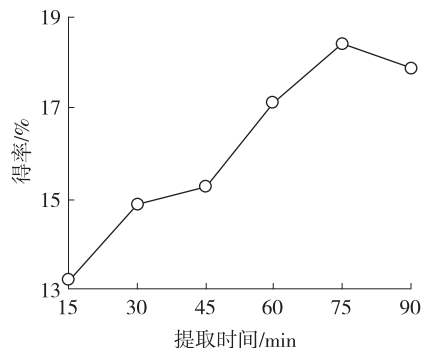


图 2 提取时间对得率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on yield

**2.1.3 提取次数的影响** 设定试验条件为:液料比 10:1、超声波功率 800 W、室温,提取时间 75 min,进行多次提取,每次提取条件相同。测定每次提取产物并计算得率,结果见图 3。从图 3 曲线的趋势可见,第 1 次提取获得产物得率最多,第 2 次、第 3 次提取获得产物得率已大为减少。继续增加提取次数获得产物更少。从工作效率考虑,提取 2 次较为适宜。

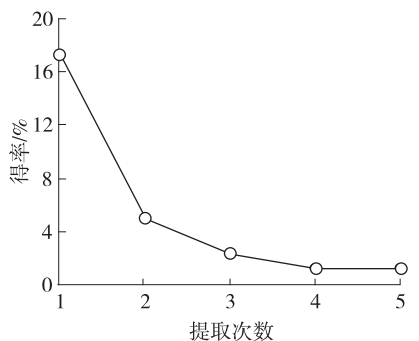


图 3 提取次数对得率的影响

Fig. 3 Effect of extraction times on yield

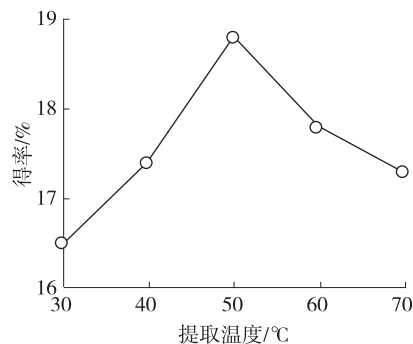


图 4 提取温度对得率的影响

Fig. 4 Effect of extraction temperature on yield

**2.1.4 提取温度的影响** 设定试验条件为:液料比 10:1、超声波功率 800 W、提取时间为 75 min,提取 1 次。考察不同提取温度对提取得率的影响。由于超声波的热效应会导致料液升温,使罐中的实际温度高于设定温度,为消除由此产生的混淆,在整个提取过程中通过控温保持温度恒定,结果见图 4。从图 4 曲线的趋势可见,当温度上升至 50 °C 时得率最高,继续升温得率反而下降,其原因可能是由于产物具有热敏性,有效成分在较高温度和超声波热效应双重作用下遭受破坏。

**2.1.5 液料比的影响** 设定试验条件为:超声波功率 800 W,超声波作用时间 75 min,室温,提取 1 次。考察不同液料比对得率的影响,结果见图 5。从图 5 曲线的趋势可见,在液料比从 5.5:1 增

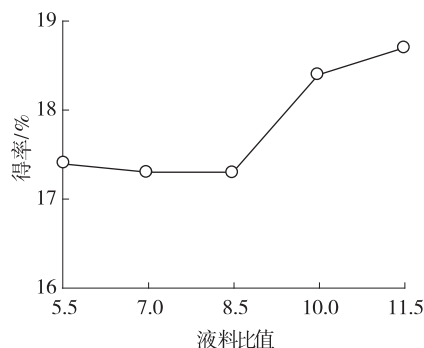


图 5 液料比对得率的影响

Fig. 5 Effect of liquid/material ratio on yield

大至 10:1 的条件下,得率连续增长。从 10:1 至 11.5:1 时增长量已不大。提取是传质过程,增加溶液量有利传质效果,但溶液量应适度,否则会增加后处理的工作量,增加处理成本。

## 2.2 超声波辅助提取条件的优选

根据上述单因素试验结果,按  $L_9(3^4)$  正交表进行 4 因素、3 水平的正交试验,结果见表 1。

表 1 正交试验设计与结果分析

Table 1 Results and analysis of orthogonal test

序号 No.	A 超声波功率/W ultrasonic power	B 时间/min time	C 温度/℃ temperature	D 液料比 (mL: g) liquid: material	提取率/% extraction yield
1	700	60	40	5:1	11.1
2	700	75	50	7.5:1	16.7
3	700	90	60	10:1	23.1
4	800	60	50	10:1	17.5
5	800	75	60	5:1	25.2
6	800	90	40	7.5:1	14.1
7	900	60	60	7.5:1	16.2
8	900	75	40	10:1	14.1
9	900	90	50	5:1	17.5
$k_1$	17.0	14.9	13.1	17.9	
$k_2$	18.9	18.7	17.2	15.7	
$k_3$	15.9	18.2	21.5	18.2	
R	3.0	3.8	8.4	2.5	

由极差可知 4 个因素对提取率的影响程度的顺序为  $C > B > A > D$ 。最佳试验条件组合  $A_2B_2C_3D_3$ , 为超声波功率 800 W, 提取时间 75 min, 温度 60 ℃, 液料比 10:1。又根据提取次数的单因素试验结果, 定为提取 2 次。以这些条件进行验证实验, 2 次平行试验提取率的平均值为 28.2 %。

## 2.3 超声波辅助提取与常规提取方法的比较

常规提取方法是一种低成本的常用方法, 不需要专用设备。作者此前曾采用常规提取方法进行杨梅树皮原花色素的提取工艺条件的优选实验。表 2 是常规提取实验结果和本研究超声波辅助提取实验结果的比较。

表 2 常规提取与超声波辅助提取试验条件和结果比较

Table 2 Comparison of test conditions and results by single-batch extraction with ultrasound-assisted method

提取方法 methods	温度/℃ temp.	提取时间/min extraction time	提取次数 extraction times	提取液总量/mL total liquid	提取率/% extraction yield
常规提取方法 common extraction	80	60 × 4 = 240	4	1000 × 4 = 4000	29.3
超声波辅助提取方法 ultrasound-assisted extraction	60	75 × 2 = 150	2	1000 × 2 = 2000	28.2

从表 2 可见, 与常规提取方法相比, 在产物提取率同一水平的情况下, 超声波辅助提取方法具有温度低、时间短、次数少、提取液处理量少等优点, 这对保护原花色产物物的生物活性非常有利。

## 2.4 产物的检测

采用花色反应方法进行产物有效成分定性分析, 生成深红色的花色素, 表明产物为原花色素。

产物的红外谱图与作为参照物的槲儿茶素-3-O-鞣酸酯标准样品的红外谱图相比, 可看出二者有相同的特征吸收峰, 具有相同分子结构特征, 并且在 C 环  $C_{-3}$  为局部酰化。结果表明产物为原翠雀素<sup>[12]</sup>。

产物有效成分定量测定结果, 质量分数 > 60 %。

## 2.5 存在的问题与改进设想

提取液通过絮凝沉降去除树胶等黏性杂质, 有利于后续的纯化处理, 但本研究使用的静置分层法会

损失一些有效成分。如果改用高速离心分离方法,可弥补这一缺陷,从而提高提取率。

### 3 结论

**3.1** 采用超声波辅助提取方法对毛杨梅树皮原花色素进行水提取,在超声波频率 20 kHz 条件下,最佳工艺条件是:超声波功率 800 W,超声波作用时间 75 min,液料比 10:1 (mL:g),提取温度 60 ℃,重复提取 2 次。提取率为 28.2 %。

**3.2** 产物的定性和定量检验结果表明提取产物属于原花色素类型的原翠雀素,产物中有效成分质量分数 60 % 以上。产物已去除树胶等黏性杂质,可以满足后续纯化的要求。

**3.3** 超声波辅助提取方法和常规提取方法相比,具有提取温度低、时间短、提取液处理量少的优点,有利于保护原花色素产物的生物活性。

#### 参考文献:

- [1] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京:中国林业出版社,1992.
- [2] 王建基,李汝雄. 国外对寡聚原花色素的研究与应用[J]. 现代化工,2002,22(增刊):91-94.
- [3] 张冰若,劳业兴,苏薇薇. 原花青素的研究现状及开发前景[J]. 中药材,2003,26(12):905-908.
- [4] 崔介君,孙培龙,马新. 原花青素的研究进展[J]. 食品科技,2003(2):92-95.
- [5] 石碧,杜晓. 植物原花色素研究利用进展与发展趋势[J]. 四川大学学报:工程科学版,2006,38(5):16-24.
- [6] 吕丽爽. 天然抗氧化低聚原花青素的研究进展[J]. 食品科学,2002,23(2):147-150.
- [7] 杨磊,苏文强,李艳杰,等. 正交试验法优选低聚原花青素的提取工艺[J]. 林产化学与工业,2004,24(2):57-60.
- [8] 郑光耀,王成章,谢衡,等. 马尾松树皮提取物抗脑缺血和抗脑肿瘤作用的研究[J]. 林产化学与工业,2007,27(增刊):21-23.
- [9] 姜贵全,方桂珍,庞久寅. 地榆根提取聚原花青素的研究[J]. 林产化学与工业,2007,27(增刊):129-132.
- [10] HAGERMAN A E, RIEDL K M, JONES G A, et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants[J]. J Agric Food Chem,1998,46(5):1887-1892.
- [11] 王丽娟,王鉴,王焱鹏,等. 酚类抗氧化剂结构特征与发展方向[J]. 四川化工,2005,8(4):16-19.
- [12] 陈笏鸿,汪咏梅,吴冬梅,等. 毛杨梅树皮提取物抗氧化及清除自由基活性初步研究[J]. 林产化学与工业,2007,27(增刊):1-7.
- [13] 陈笏鸿,汪咏梅,吴冬梅,等. 从毛杨梅树皮提取分离天然抗氧化活性物质的方法:中国,CN 1850133A[P]. 2006-10-25.
- [14] 毕良武,赵振东,VINATORU M,等. 超声波技术在生物质资源加工领域的应用研究进展[J]. 林产化学与工业,2007,27(增刊):138-142.
- [15] PORTER L J. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin[J]. Phytochemistry,1986,25(1):223-230.