

庞庭才,熊 拯,胡上英,等. 银叶树果壳木质素提取及抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):385-388.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.113

银叶树果壳木质素提取及抗氧化性

庞庭才¹,熊 拯¹,胡上英²,廖燕青¹

(1. 钦州学院食品工程学院,广西钦州 535099; 2. 钦州学院电子与信息工程学院,广西钦州 535099)

摘要:采用碱液提取法对银叶树果壳木质素进行提取分离,以单因素试验和正交试验法研究提取温度、KOH 浓度、料液比、提取时间对银叶树果壳木质素提取效果的影响,并对所提取木质素进行紫外光谱分析和抗氧化性研究。结果发现,银叶树果壳木质素最佳提取工艺参数为:提取温度 60 ℃、KOH 浓度 0.5 mol/L、料液比 1 g : 55 mL、提取时间 2 h,在此条件下木质素得率达到 10.78%。银叶树果壳木质素浓度对羟基自由基、超氧阴离子自由基和对 DPPH 自由基均有明显的清除作用,且清除率随木质素浓度增加而增大。

关键词:银叶树果壳;木质素;抗氧化性

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2016)06-0385-04

银叶树(*Heritiera littoralis*)属梧桐科植物,是热带、亚热带海岸红树林中的乔木树种,主要分布于我国广东、广西和台湾等地区,是比较典型的水陆两栖红树植物种类^[1]。银叶树的根为板状根,茎高而大,叶背银白色,果实形状奇特,为近心形或近椭圆形或扁圆形,果皮木质化,外果皮坚硬^[2]。有关银叶树的研究主要集中在地理分布与形态特征^[3-4]、生物化学与遗传多样性^[5-6]、抗性生理^[7-8]、育苗造林技术^[9-10]、资源利用^[11-12]等方面,而对于银叶树果壳的研究还比较少。目前银叶树果壳常常在果实被采摘之后当作垃圾遗弃,这不仅造成资源的浪费,还对环境造成了一定的危害。因此,为了高效利用银叶树资源,有必要开展银叶树果壳木质素的研究。木质素是一种在酸作用下难以水解、具有复杂空间网状结构的聚芳基化合物,主要存在于木质化植物的细胞中,是工业上

唯一能从可再生资源中获取的芳香族化合物^[13],具有较高地利用价值。但是由于木质素自身理化性质不均一、结构复杂、分离提取困难等因素,使得木质素至今没有被很好的利用。近年来,随着研究的深入,从花生壳、核桃壳、造纸废液中提取木质素的研究开始增多^[14-16],但从银叶树果壳中提取木质素的研究国内外尚未见报道。本研究采用一般碱法提取银叶树果壳中的木质素,并对所提取木质素进行紫外光谱分析和抗氧化性研究。通过对银叶树果壳木质素的研究,为提高银叶树的综合利用价值,进一步开发和利用红树资源提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

银叶树果实外种壳,产自广西防城港北仑河口红树林保护区。

试验用氢氧化钾、盐酸、乙醇等试剂均为 AR,1,1-二苯基-2-苦肟基为 BR。主要仪器有紫外可见分光光度计(UV-3200),上海美谱达仪器有限公司;电子天平(EL204)梅特勒-托利多(上海)有限公司;高速离心机(H1850),湖南湘仪实验仪器开发有限公司;旋转蒸发器(RE-3000),上

收稿日期:2015-05-10

基金项目:广西高校科学技术研究(编号:2013YB260;2013LX161);

钦州学院校级科研项目(编号:2014XJKY-58C);大学生创新创业训练计划(编号:201411607064)。

作者简介:庞庭才(1985—),男,硕士,实验师,研究方向为植物有效成分提取与分析。E-mail: pangtingcai@126.com。

2009,121(2):313-317.

[9] Jang D S, Lee G Y, Kim Y S, et al. Anthraquinones from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on protein glycation and aldose reductase[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(11): 2207-2210.

[10] 郝延军,桑育黎,赵余庆. 决明子蒽醌类化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(1): 18-19.

[11] 戴迎春,邓楠,刘文,等. 决明子中橙黄决明素的提取、分离及纯化方法的研究[J]. 中南药学, 2011, 9(3): 179-182.

[12] 张晶. 对决明子橙黄决明素的分离提取的研究分析[J]. 中外医学研究, 2012, 10(20): 153.

[13] Yang J H, Ye H Y, Lai H J, et al. Separation of anthraquinone compounds from the seed of *Cassia obtusifolia* L. using recycling counter-current chromatography[J]. Journal of Separation

Science, 2012, 35(2): 256-262.

[14] Shu X K, Duan W J, Liu F, et al. Preparative separation of polyphenols from the flowers of *Paonia lactiflora* Pall. by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 947/948: 62-67.

[15] 谢亚. 中药决明子有效成分提取分离及结构的电喷雾串联质谱(ESI-MSⁿ)研究[D]. 广州:华南师范大学, 2007.

[16] 张云峰,魏东,郭祀远,等. 决明子活性成分的高速逆流色谱分离[J]. 华南理工大学学报:自然科学版, 2009, 37(10): 129-134.

[17] 唐力英,王祝举,傅梅红. 决明子中游离蒽醌类化学成分研究[J]. 中药材, 2009, 32(5): 717-719.

[18] Guo S Y, Feng B, Zhu R N, et al. Preparative isolation of three anthraquinones from *Rumex japonicus* by high-speed counter-current chromatography[J]. Molecules, 2011, 16(2): 1201-1210.

海亚荣生化仪器厂;循环水式真空泵[SHZ-D(Ⅲ)],巩义市予华仪器有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理 银叶树果壳在 60℃ 下干燥至恒质量,粉碎,过 80 目筛。用甲苯与乙醇混合溶液(体积比为 2:1)浸提 10 h 后过滤,回收甲苯-乙醇溶剂,滤渣 40℃ 烘干至恒质量,得样品备用。

1.2.2 银叶树果壳中木质素的提取 称取预处理后的银叶树果壳粉末 1.0 g,按一定的料液比加入一定浓度的 KOH 溶液,在设定的水浴温度条件下浸提一定时间,抽滤取滤液,用 6 mol/L 乙酸将滤液 pH 值调至 5.5,减压蒸馏得样品浓缩液,加入浓缩液 3 倍体积的 95% 乙醇,混匀后静置,待沉淀完全后,抽滤。滤液通过减压蒸馏除去乙醇,用 6 mol/L HCl 将样液 pH 值调至 1.5,静置后过滤,所得滤渣用 pH 值为 2 的 HCl 溶液洗涤,低温干燥,即得到碱木质素^[17]。

木质素得率 = $\frac{\text{木质素产量}}{\text{原料质量}} \times 100\%$ 。(1)

1.2.3 单因素试验 提取温度对木质素得率的影响在提取时间 1.5 h、料液比 1 g:55 mL、KOH 浓度 0.5 mol/L 条件下,研究不同温度(40、50、60、70、80℃)对木质素得率的影响。

1.2.3.1 KOH 浓度对木质素得率影响 在提取温度 60℃、提取时间 1.5 h、料液比 1 g:55 mL 条件下,研究不同 KOH 溶液浓度(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mol/L)对木质素得率的影响。

1.2.3.2 料液比对木质素得率的影响 在提取温度 60℃、提取时间 1.5 h、KOH 浓度 0.5 mol/L 条件下,研究不同料液比(1:25、1:35、1:45、1:55、1:65, g/mL)对木质素得率的影响。

1.2.3.3 提取时间对木质素提取得率的影响 在提取温度 60℃、料液比 1 g:55 mL、KOH 浓度 0.5 mol/L 条件下,研究不同提取时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)对木质素得率的影响。

1.2.4 正交试验设计 以银叶树果壳木质素得率为指标,在单因素试验的基础上进行 L₉(3⁴) 正交试验(表 1),以确定最佳的银叶树果壳木质素提取工艺参数。

表 1 银叶树果壳木质素提取正交试验因素与水平

水平	A:温度 (℃)	B:KOH 浓度 (mol/L)	C:料液比 (g/mL)	D:时间 (h)
1	50	0.3	1:45	1.5
2	60	0.5	1:55	2.0
3	70	0.7	1:65	2.5

1.2.5 紫外光谱的测定 取一定量提取所得木质素样品,溶于适量乙醇溶液中,以乙醇溶液为空白,用紫外可见分光光度计测其在 200~400 nm 范围内的吸收光谱。

1.2.6 木质素抗氧化性研究

1.2.6.1 DPPH 自由基的清除^[18] 称取 0.003 8 g 的 DPPH 用无水乙醇溶解,定容至 50 mL,摇匀得到浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液,放于冰箱内备用。在具塞试管中分别加入 2 mL 浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL 的木质素样品溶液,再加入 2 mL 的 DPPH 溶液作为试验组,避光反应 30 min 后在波长 517 nm 处测定其吸光度。以 2 mL 样品

溶液加入 2 mL 的无水乙醇作对照组,以 2 mL 的 DPPH 溶液加入 2 mL 蒸馏水中作为空白,计算对 DPPH 自由基的清除率。

清除率 = $\frac{D_0 - (D_i - D_{a0})}{D_0} \times 100\%$ 。

式中:D_i 为试验组吸光度;D_{a0} 对照组吸光度;D₀ 为空白吸光度;以无水乙醇作为参比。

1.2.6.2 羟基自由基(·OH)的清除^[19] 称取 0.083 4 g FeSO₄·7H₂O 溶于少量蒸馏水中,定容至 50 mL,得到 6 mmol/L FeSO₄ 溶液;称取 0.041 4 g 水杨酸溶于少量无水乙醇中,用无水乙醇准确定容至 50 mL,得到 6 mmol/L 的水杨酸-乙醇体系;用微量移液器量取 166.7 μL 30% 的 H₂O₂ 用蒸馏水定容至 50 mL 容量瓶中,得到 0.1% 的 H₂O₂。在 15 mL 的具塞试管中分别加入 2 mL 6 mmol/L FeSO₄ 溶液,2 mL 6 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液,再分别加入 2 mL 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL 样品溶液,最后加入 2 mL H₂O₂ 启动反应,37℃ 水浴反应 30 min 后,以 4 000 r/min 速度离心 5 min,取上清液在 510 nm 处测定吸光度,以此作为试验组。以蒸馏水代替 H₂O₂ 作为对照组,以蒸馏水代替样品作为空白。

清除率 = $\frac{D_0 - (D_i - D_{a0})}{D_0} \times 100\%$ 。

式中:D_i 为样品组;D_{a0} 为对照组;D₀ 为以蒸馏代替样品的空白。

1.2.6.3 超氧阴离子自由基(O₂⁻·)的清除^[20] 在 25℃ 的恒温水浴锅中,将 pH 值 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液和 45 mmol/L 邻苯三酚保温 20 min 后,取 4.5 mL pH 值 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液,加 0.3 mL 45 mmol/L 邻苯三酚,振荡器混匀,在 25℃ 水浴中反应 4 min,加入 8 mol/L HCl 终止反应,在 325 nm 测吸光度,计算出邻苯三酚的自氧化率 V₀。取 4.5 mL Tris-HCl 缓冲液,加入不同浓度(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mg/mL)的银叶树果壳木质素溶液 2 mL 在 25℃ 恒温水浴中放置 20 min 后,加入 0.3 mL 的 25℃ 预热的邻苯三酚溶液,振荡混匀,在 25℃ 水浴中反应 4 min,加入 6 mol/L HCl 终止反应,在 325 nm 测吸光度,计算出加入样品后邻苯三酚的自氧化率 V₁。

清除率 = $[(V_0 - V_1)/V_0] \times 100\%$ 。

式中:V₀ 为对照组;V₁ 为样品组。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取温度对木质素得率的影响 在 40~60℃ 范围内,随着温度的升高,木质素的得率呈明显上升趋势,在 60℃ 时达到最大值;当温度继续升高时,得率反而有所下降(图 1)。其原因可能是当温度较低时,由于纤维素上木质素结构结合紧密,结构破坏力大,使木质素分离不彻底,部分木质素还残留在果壳纤维中^[21],所以木质素的得率略低;当提取温度超过 60℃ 时,会导致部分木质素分解,从而影响了木质素得率。因此,最佳提取温度为 60℃。

2.1.2 KOH 浓度对木质素得率的影响 随着碱液浓度的增大,木质素得率呈上升趋势,碱液浓度为 0.5 mol/L 时木质素

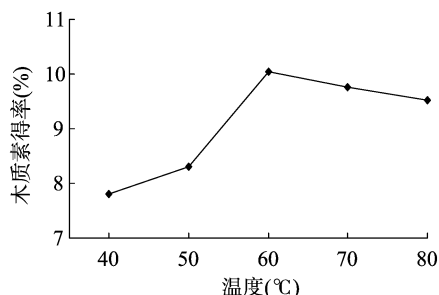


图1 提取温度对木质素得率的影响

得率达到最大值,之后得率趋于平稳(图2)。结果表明,适宜的碱浓度可断裂木质素与糖聚物之间的酯键和醚键,而碱浓度较高时,木质素可能发生氧化和自身缩合反应造成损失。因此,最佳 KOH 浓度为 0.5 mol/L。

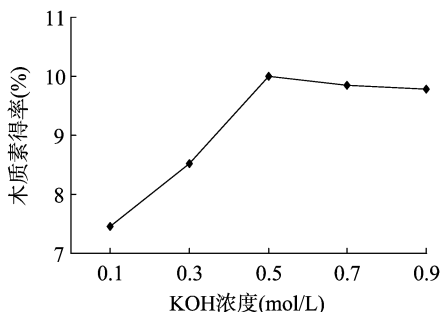


图2 KOH 浓度对木质素得率的影响

2.1.3 料液比对木质素得率的影响 料液比在 1 g : (25 ~ 55) mL 之间,木质素得率逐渐升高,料液比 1 g : 55 mL 时得率达到最大值,之后随着料液比的继续增大,木质素得率反而有所降低(图3)。其原因可能是当料液比较小时,随着提取溶液的增加有利于木质素的溶出;但当料液比超过 1 g : 55 mL 时,木质素得率趋于平稳,基本不再提高。因此,最佳料液比为 1 g : 55 mL。

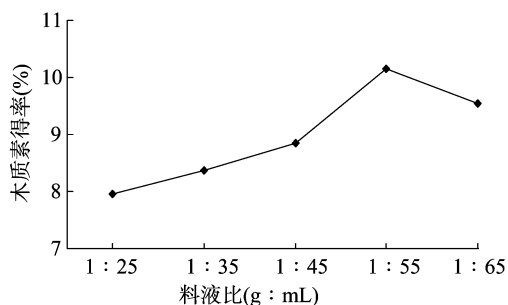


图3 料液比对木质素得率的影响

2.1.4 提取时间对木质素得率的影响 随着提取时间的增加,木质素得率呈上升趋势,当提取时间为 2 h 时,木质素得率达到最大值,之后随着提取时间继续增加,得率反而有所降低(图4)。其原因可能是在一定的时间范围内,随着提取时间的延长,木质素与纤维素分离程度逐渐提高,使得木质素得率也随之增大;而当提取时间达到 2.0 h 后,样品中木质素基本已经全部溶出,之后随着提取时间的继续延长,木质素得率也趋于平稳。因此,最佳提取时间为 2.0 h。

2.2 正交试验结果与方差分析

影响银叶树果壳木质素得率的因素主次为:KOH 浓度

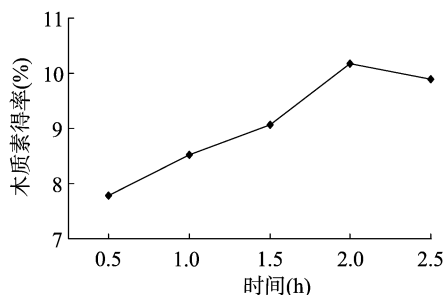


图4 提取时间对木质素得率的影响

(B) > 提取温度(A) > 料液比(C) > 提取时间(D)。提取木质素的最佳工艺参数为: A₂B₂C₃D₂, 即提取温度为 60 °C、KOH 浓度为 0.5 mol/L、料液比为 1 g : 65 mL、提取时间为 2.0 h。在此条件下对最佳提取工艺进行验证试验,验证试验得到的木质素平均得率分别是 10.68%、10.79%、10.80%、10.90%、10.74% (表2)。因此,银叶树果壳木质素得率为 10.78%,说明该木质素提取工艺稳定可行。

表2 正交试验结果与分析

试验号	A	B	C	D	得率(%)
1	1	1	1	1	7.47
2	1	2	2	2	9.57
3	1	3	3	3	8.51
4	2	1	2	3	8.64
5	2	2	3	1	10.30
6	2	3	1	2	9.21
7	3	1	3	2	8.02
8	3	2	1	3	9.61
9	3	3	2	1	8.59
k_1	8.517	8.043	8.763	8.787	
k_2	9.383	9.827	8.933	8.933	
k_3	8.740	8.770	8.943	8.920	
R	0.867	1.783	0.180	0.147	

2.3 紫外吸收光谱分析

在 200 ~ 400 nm 范围内扫描,测得本试验所提取的木质素的紫外吸收光谱(图5)。在 216 nm 处产生最大吸收峰,这些是苯环物质典型的特征吸收峰,说明所提取得到的木质素为芳香族化合物。由紫外光谱分析表明,所提取的木质素含有苯环结构,具有较好的化学活性。

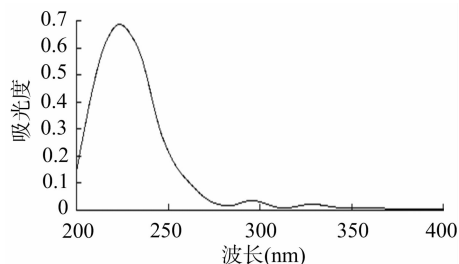


图5 银叶树果壳木质素紫外光谱分析

2.4 抗氧化性研究结果

2.4.1 对 DPPH 自由基的清除效果 银叶树果壳木质素对 DPPH 自由基具有明显的清除作用,DPPH 的清除率随着木质素浓度的提高而升高,当银叶树果壳木质素浓度达到

0.25 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率可达 80.6% (图 6),说明银叶树果壳木质素具有较强的 DPPH 自由基清除能力。

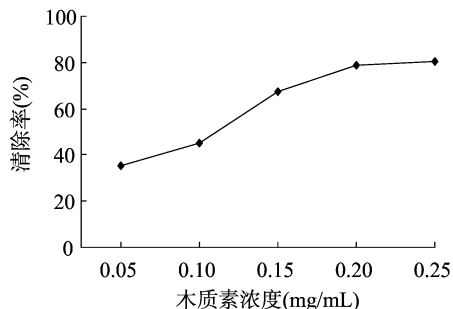


图6 银叶树果壳木质素对 DPPH 自由基的清除效果

2.4.2 对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除效果 银叶树果壳木质素对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 具有明显的清除作用,羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除率随着木质素浓度的提高而升高,当银叶树果壳木质素浓度为 0.5 mg/mL 时,对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除率为 26.8%,当浓度达到 2.5 mg/mL 时,清除率可达 83.7% (图 7),说明银叶树果壳木质素具有较强的羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除能力。

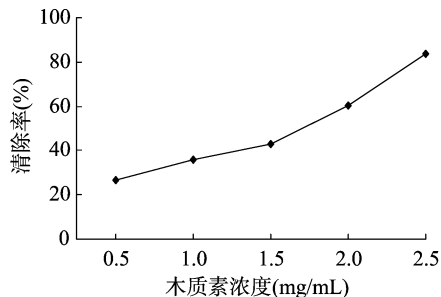


图7 银叶树果壳木质素对羟基自由基的清除效果

2.4.3 对超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的清除效果 银叶树果壳木质素对超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 具有明显的清除作用,超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的清除率随着木质素浓度的提高而升高,当银叶树果壳木质素浓度为 0.1 mg/mL 时,对超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的清除率为 45.1%,当浓度达到 0.9 mg/mL 时,清除率可达 89.8% (图 8),说明银叶树果壳木质素具有较强的超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 清除能力。

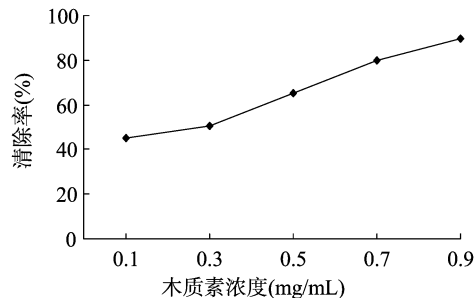


图8 银叶树果壳木质素对超氧阴离子自由基的清除效果

3 结论

(1) 经正交试验分析,得到最佳提取工艺条件:提取温度为 60 ℃、KOH 浓度为 0.5 mol/L、料液比 1 g : 65 mL、提取时

间为 2 h,在此条件下木质素得率达到 10.78%。各因素对木质素得率的影响顺序为:KOH 浓度 > 提取温度 > 料液比 > 提取时间。

(2) 紫外光谱分析表明,在 216 nm 附近有较强的吸收带,所提取的木质素含有苯环结构,具有较好的化学活性。

(3) 抗氧化性研究表明,对 DPPH 自由基、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)、对超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的清除率随着银叶树果壳木质素的浓度提高而提高,清除率最高分别为 80.6%、83.7%、89.8%。

参考文献:

- [1] 韩维栋,王秀丽. 银叶树研究进展[J]. 广东林业科技,2013,29(6):80-84.
- [2] 曾 聪,范航清. 红树植物银叶树果实和种子的形态结构研究[J]. 广西科学,2006,13(2):147-150.
- [3] 冯国楣. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1996:140-143.
- [4] 简曙光,韦 强,唐 恬,等. 深圳盐灶银叶树种群的生物学特性研究[J]. 华南农业大学学报,2005,26(4):84-87,91.
- [5] 牟美蓉,蒋巧兰,王文卿. 真红树和半红树植物叶片氯含量及叶性状的比较[J]. 植物生态学报,2007,31(3):497-504.
- [6] Tian Y, Wu J, Zhang S. Flavonoids from leaves of *Heritiera littoralis* [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2004, 13(3): 214-216.
- [7] 栾建国,杜灿坤,何德善. 深圳地区红树植物淡水种植试验[J]. 水生态学杂志,2011,32(2):63-68.
- [8] 杨盛昌,林 鹏,中须贺常雄. 5 ℃夜间低温对红树幼苗光合速率和蒸腾速率的影响[J]. 植物研究,2001,21(4):587-591.
- [9] 韩 静. 几种半红树植物的育苗技术研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2010.
- [10] 高秀梅,韩维栋. 银叶树育苗试验研究[J]. 福建林业科技,2006,33(3):140-143,174.
- [11] 邱凤英. 几种半红树植物生物学特性、耐盐、耐水淹及造林试验研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2009.
- [12] 张艳军,彭重威,钟秋平,等. 广西红树植物银叶树不同部位提取物体外抗氧化性分析[J]. 南方农业学报,2013,44(12):2066-2070.
- [13] 蒋挺大. 木质素[M]. 北京:化学工业出版社,2001.
- [14] 唐婷范,刘雄民,郭占京,等. 蒜头果木质素提取及成分分析[J]. 精细化工,2013,30(5):591-594.
- [15] 张 莹,雷中方. 造纸黑液提取木质素的抗氧化性研究[J]. 复旦学报:自然科学版,2010,49(1):60-65.
- [16] 潘英明,梁 英,王恒山,等. 超声波法从罗汉果渣中提取碱木质素的研究[J]. 林产化学与工业,2004,24(4):73-76.
- [17] 崔晓芳,李伟阳,魏婷婷,等. 微波辅助提取油茶果壳木质素工艺优化[J]. 食品科学,2011,32(8):98-102.
- [18] 张海德,黄玉林,范燕忠. 槟榔提取物对 DPPH 自由基的清除作用研究[J]. 食品科学,2008,29(8):74-77.
- [19] 赵 璐. 山竹果壳中抗氧化活性物质的研究[D]. 天津:天津科技大学,2009.
- [20] 吴伟杰. 文冠果壳总皂苷分离工艺及其抗氧化活性的研究[D]. 北京:北京林业大学,2010.
- [21] 田维亮,葛振红,孙 辉. 棉籽壳木质素提取工艺的初步研究[J]. 作物杂志,2013(2):130-133.