

丁香挥发油的提取工艺及化学成分分析

付振喜, 王建清, 金政伟, 杨志岩 (天津科技大学, 天津 300222)

摘要 [目的]优化丁香挥发油提取工艺,为企业生产工艺改造提供依据。[方法]采用超声波辅助法从丁香中提取挥发油,以挥发油得率为指标,用正交试验 $L_9(3^4)$ 对丁香挥发油的超声提取工艺进行优选。[结果]最佳工艺为:料液比 1:20,提取时间 90 min,乙醇浓度 75%,提取温度 65℃,丁香挥发油的提取率为 9%。用 GC-MS 技术对所提取的丁香挥发油进行成分鉴定,共分离鉴定出 21 种化学成分,占提取油总含量的 99.867%;其中丁香酚含量为 65.710%,异丁香酚含量为 19.920%,石竹烯含量为 9.332%。[结论]超声提取所得丁香挥发油的主要成分为丁香酚、异丁香酚和石竹烯,应用超声提取法,从丁香中提取挥发油简单易行,可操作性强。

关键词 丁香挥发油;超声提取;成分鉴定;正交试验;GC-MS

中图分类号 O629.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2010)11-05628-03

Orthogonal Extraction of Clove Essential Oil with Ultrasound-assisted Method and Chemical Analysis

FU Zhen-xi et al (Tianjin University of Science&Technology, Tianjin 300222)

Abstract The extraction of clove essential oil by ultrasonic technology were studied. Using the yield of clove essential oil as an index, the extracting technology of essential oil from clove was studied by ultrasound-assist method $L_9(3^4)$. The results showed that with the other same conditions, when the ethanol volume fraction was 75%, solid-liquid ratio of 1:20, ultrasonic time of 90 min, ultrasonic temperature at 65℃, clove essential oil yield was up to 9%. By the application of GC-MS techniques, constituents of clove essential oil extracted were identified, and isolated 21 kinds of chemical composition covering 99.867% of the total content. The major components of clove essential oils used ultrasonic extraction was eugenol, isoeugenol and caryophyllene. Eugenol content was 65.71%; isoeugenol content was 19.92% while that of caryophyllene was 9.332%.

Key words Clove essential oil; Ultrasound extraction; Component identification; Orthogonal test; GC-MS

丁香为桃金娘科植物丁香(*Eugenia caryophyllata* Thun.)的干燥花蕾。其味辛、性温,具有温中将逆、补肾助阳的功效,可用于治疗脾胃虚寒、呃逆呕吐、食少吐泻、心腹冷痛、肾虚阳痿等症^[1]。丁香中主要含有有机酸类、苷类和挥发油类等有效成分。

目前提取天然产物的方法较多,有水蒸汽蒸馏法、超临界 CO_2 萃取法、微波辅助提取法等^[2-4]。超声波提取是目前国内外正在研究开发的一种新型辅助溶剂提取技术。超声提取法利用超声波产生的强烈振动、高的加速度、强烈的空化、搅拌等特殊作用,破坏植物的细胞,与传统提取方法相比,其提取效率明显提高^[5-7]。据报道,丁香花蕾中含挥发油 15%~20%,而目前生产上用于提取丁香挥发油的得率不高,提取工艺优化试验研究不多见。为此,笔者设计了以丁香挥发油得率为评价指标的正交试验对提取挥发油的工艺进行了优选,并用 GC-MS 分析技术对提取的丁香挥发油进行了成分鉴定^[8]。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 原材料。丁香花蕾,购自祁澳中药饮片有限公司,产地为云南。

1.1.2 主要试剂。无水乙醇(AR),由天津市北方天医化学试剂厂生产;正己烷(AR),由天津基准化学试剂有限公司生产;丁香酚标准品,由中国药品生物制品检定所生产。

1.1.3 主要仪器。Varian GC-MS 色谱仪,由美国瓦里安公司生产;FW177 型中草药粉碎机,由天津泰斯特仪器有限公司生产;HWS12 型恒温水浴锅,由上海恒科仪器有限公司生产;KH-600DB 型数控超声波清洗器,由昆山禾创超声仪器有限公司生产;RE-52A 型旋转蒸发仪,由上海亚荣生化仪器厂

生产;SHZ-D(III)型循环水式真空泵,由巩义市子华仪器有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 丁香挥发油的提取。将丁香花蕾烘干并用中草药粉碎机粉碎,过 30 目筛。取 100 g 加入到适量的一定浓度的乙醇溶液中,于恒温水浴锅中浸泡 12 h。超声频率设定为 40 kHz,设定超声时间进行提取,过滤除去滤渣,滤液置于旋转蒸发仪中浓缩至无乙醇析出,再将浓缩液用正己烷萃取,然后将萃取液旋转浓缩,直至正己烷完全蒸发,剩余的为丁香挥发油。

$$\text{丁香挥发油得率} = \frac{\text{丁香挥发油的质量}}{\text{丁香粗粉的质量}} \times 100\%$$

1.2.2 丁香挥发油提取的单因子试验。

1.2.2.1 提取液浓度的筛选。设定超声时间 60 min,超声功率 40 kHz,超声温度 60℃,料液比 1:15 的条件下,分别用 30%、50%、75%、85%、95% 乙醇提取丁香挥发油,通过比较丁香挥发油的得率,以确定合适的乙醇浓度。

1.2.2.2 提取温度的筛选。设定超声时间 60 min,超声功率 40 kHz,料液比 1:15,乙醇浓度 50% 的条件下,设定提取温度分别为 35、45、55、65、75、85℃ 进行试验,以确定合适的提取温度。

1.2.2.3 料液比的筛选。设定超声功率 40 kHz,超声温度 60℃,超声时间 60 min,乙醇浓度 50% 的条件下,将料液比分别设定为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 进行试验,以确定合适的固液比。

1.2.2.4 提取时间的筛选。设定超声功率 40 kHz,超声温度 60℃,料液比 1:15,乙醇浓度 50% 的条件下,分别超声提取 30、60、90、120、150 min 进行试验,以确定合适的超声时间。

1.2.3 丁香挥发油提取的正交试验。选取料液比、超声时间、提取液浓度、超声温度 4 个因素,每个因素 3 个水平,采

基金项目 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD30B02)。

作者简介 付振喜(1982-),女,山东肥城人,硕士研究生,研究方向:包装材料与包装技术。

收稿日期 2010-01-04

用 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验,对超声辅助提取丁香挥发油的条件进行优化。 $L_9(3^4)$ 正交试验表的因素与水平设计见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素与水平设计

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test				
水平 Lev- els	料液 比(A) solid-liquid ratio	超声时 间(B)//min Ultrasonic time	乙醇浓 度(C)//% Ethanol concentration	超声温 度(D)//℃ Ultrasonic temperature
1	1:10	30	50	45
2	1:15	60	75	55
3	1:20	90	95	65

1.2.4 丁香挥发油的成分分析。采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对丁香挥发油成分进行分析。

1.2.4.1 GC 条件。色谱柱型号:VF-5 ms,30.00 m×0.25 mm×0.25 μm;进样口温度为 300 ℃;分流比为 100;载气为 He,99.999%;流速为 1 ml/min;程序升温,初始为 60 ℃,然后以 5 ℃/min 升至 200 ℃,再以 10 ℃/min 升至 300 ℃,保持 3 min。

1.2.4.2 MS 条件。离子源为 EI,质量分析器为离子阱,阱温为 220 ℃,传输线温度为 280 ℃;扫描方式为全扫描,扫描范围为 50~1 000 m/z。

利用 NIST05 标准质谱库-计算机联机检索结合有关文献^[9-10]进行分析。

2 结果与分析

2.1 丁香挥发油提取的单因素试验结果

2.1.1 提取液浓度对丁香挥发油提取率的影响。由图 1 可知,当乙醇浓度从 20% 增大到 95% 时,丁香挥发油得率随着乙醇浓度的增大而增大。其中,乙醇浓度从 20% 增大到 75% 时,得率上升趋势明显;当乙醇浓度从 75% 增大到 95% 时,得率变化不明显。考虑到随着乙醇浓度的提高会使得一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量增加,以及提高成本,故选用乙醇浓度为 50%、75%、95% 进行正交试验。

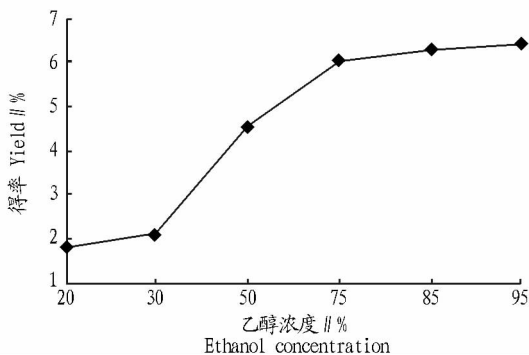


图 1 乙醇浓度对丁香挥发油提取率的影响

Fig. 1 Effect of concentration of ethanol on the extraction ratio of clove essential oil

2.1.2 超声温度对丁香挥发油提取率的影响。由图 2 可知,当超声温度从 35 ℃ 增加到 65 ℃ 时,丁香挥发油得率呈明显上升趋势,而当超声温度从 65 ℃ 增加到 85 ℃ 时,丁香挥发油得率反而有所降低。但超声温度从 55 ℃ 上升至 65 ℃ 时,挥发油得率上升并不明显,故选用超声温度为 45、55、65 ℃ 进行正交试验。

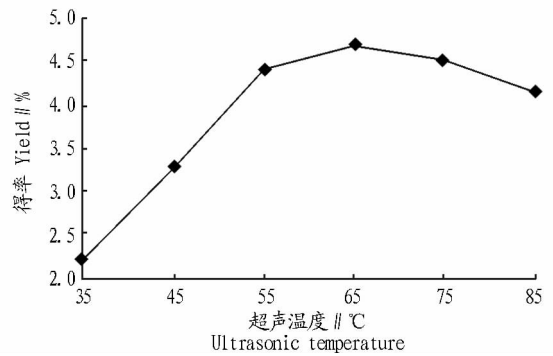


图 2 超声温度对丁香挥发油提取率的影响

Fig. 2 Effects of ultrasonic temperature on the extraction ratio of clove essential oil

2.1.3 料液比对丁香挥发油提取率的影响。由图 3 可知,料液比的提高有利于丁香挥发油得率的提高,当料液比达到 1:25 时,得率达到最高值。但是,当料液比从 1:10 提高到 1:25 的过程时,得率提高并不明显。考虑到料液比越高,需要的乙醇越多,旋转蒸发时间越长,萃取时候要用到的有机溶剂(正己烷)越多,故选用料液比为 1:10、1:15、1:20 进行正交试验。

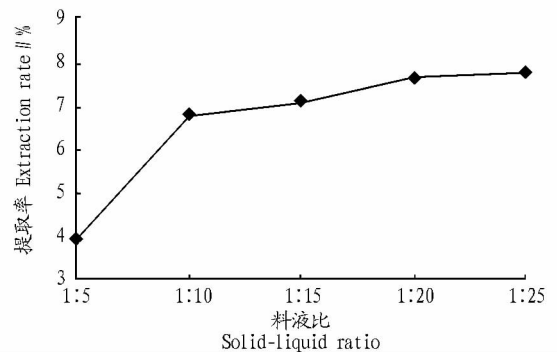


图 3 料液比对丁香挥发油提取率的影响

Fig. 3 Effects of solid-liquid ratio on the extraction ratio of clove essential oil

2.1.4 超声时间对丁香挥发油提取率的影响。由图 4 可知,超声时间从 30 min 延长到 90 min 时,得率依次提高,且 90 min 时的得率最高,以后随着超声时间的延长得率反而下降。考虑到超声时间为 60~90 min 时,提取率提高不明显,因此为了节约时间,缩短提取周期,选择时间为 30、60、90 min 进行正交试验。

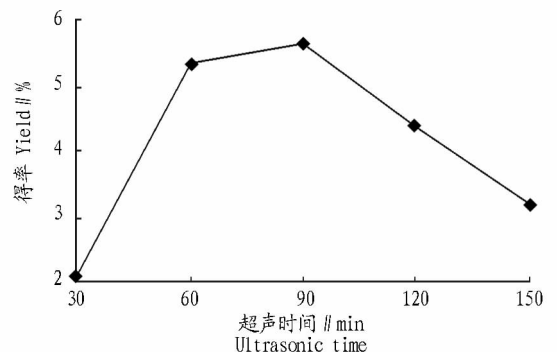


图 4 超声时间对丁香挥发油提取率的影响

Fig. 4 Effects of ultrasonic time on the extraction rate of clove essential oil

2.2 丁香挥发油提取的正交试验结果 由表 2 可知,4 个

因素对提取丁香挥发油得率的影响程度的大小为:乙醇浓度 > 料液比 > 超声温度 > 超声时间。进一步对试验结果进行方差分析,结果 C 因素各水平之间差异达极显著水平 (F_c 值为 5.973, $P < 0.01$); A、B 因素各水平之间差异达显著水平 (F 值为 0.6261, F_B 值为 0.5561, $P < 0.05$); D 因素各水平之

间差异不显著。因此,最佳组合为 $A_3B_3C_2D_3$,即最佳工艺条件为:料液比 1:20,超声时间 90 min,乙醇浓度 75%,超声温度 65℃。在此最佳工艺条件下进行验证试验,丁香挥发油的得率为 9.00% 以上。

表 2 超声辅助提取丁香挥发油的正交试验结果

Table 2 The orthogonal test results for the ultrasonic assisted extraction of clove essential oil

试验号 Test No.	A	B	C	D	得率//% Yield
1	1	1	1	1	1.40
2	1	2	2	2	8.30
3	1	3	3	3	6.00
4	2	1	2	2	9.19
5	2	2	3	3	4.96
6	2	3	1	1	4.70
7	3	1	3	3	5.20
8	3	2	1	1	5.80
9	3	3	2	2	9.80
R	1.70	1.57	5.12	1.60	

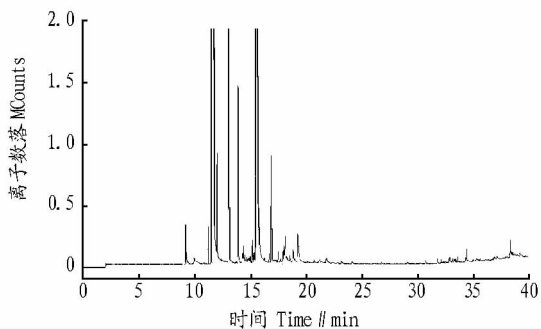
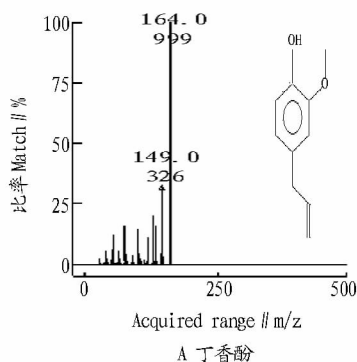
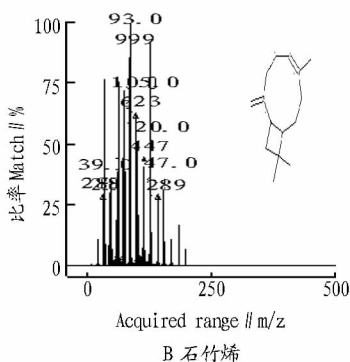


图 5 超声提取的丁香挥发油总离子流图

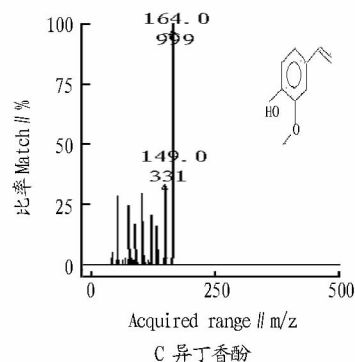
Fig. 5 Total ion chromatogram of clove essential oil by using ultrasonic extraction



A 丁香酚



B 石竹烯



C 异丁香酚

图 6 几种主要物质的质谱图与结构式

Fig. 6 The mass spectrum and structural formula of several kinds of main materials

表 3 超声提取的丁香挥发油的化学成分

Table 3 The chemical composition of clove essential oil

峰号 Peak No.	化合物名称 Compounds	分子式 Molecular formula	保留时间 Retention time	相对含量//% Relative content
1	对烯丙苯酚 α -allylphenol	$C_9H_{10}O$	9.234	0.383
2	茴香脑 anethole	$C_{10}H_{12}O$	9.992	0.042
3	α -cubebene	$C_{15}H_{24}$	11.294	0.241
4	丁香酚 Eugenol	$C_{10}H_{12}O_2$	11.699	65.710
5	α -蒎烯 Copaene	$C_{15}H_{24}$	11.997	0.599
6	石竹烯 caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	13.038	9.332
7	α -石竹烯 α -caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	14.383	0.090
8	(-)-Isolodene	$C_{15}H_{24}$	14.854	0.024
9	Valencene	$C_{15}H_{24}$	14.948	0.028
10	α -法呢烯 α -Famesene	$C_{15}H_{24}$	15.159	0.159
11	β -Cadinene	$C_{15}H_{24}$	15.415	0.571
12	(z)-2-methoxy-4-(prop-1-enyl)phenol	$C_{10}H_{12}O_2$	15.565	19.920
13	2-(1-propenyl)-6-methoxyphenol	$C_{10}H_{12}O_2$	15.654	0.108
14	反式丁香酚 trans-isoeugenol	$C_{10}H_{12}O_2$	15.728	0.050
15	Humulen-	$C_{15}H_{24}$	16.651	0.058
16	α -檀香醇 α -santalol	$C_{15}H_{24}O$	16.839	0.729
17	长叶蒎烯 (+)- α -longipinene	$C_{15}H_{24}$	17.895	0.067
18	β -Humulene	$C_{15}H_{24}$	18.530	0.048
19	2,4,6-trimethoxy-acetophenone	$C_{11}H_{14}O_4$	19.289	0.327
20	longifolinaldehyde	$C_{15}H_{24}O$	21.843	0.048
21	β -甾醇 β -Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	38.344	0.163

2.3 精密度试验结果 测得 $RSD = 0.78\%$, 表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验结果 测得 $RSD = 1.68\%$, 表明供试品溶

液在 60 min 内基本稳定。

2.5 回收率试验结果 平均回收率为 99.54% , $RSD = 0.95\%$, 表明方法准确、可靠。

表 1 回收率试验结果

Table 1 The result of recovery rate test

样品号 Sample No.	总黄酮含量//mg Total flavonoid content	槲皮素加入量//mg Adding amount of quercetin	测定量//mg Determination amount	回收率//% Recovery rate	平均回收率//% Average recovery rate	RSD//%
1	8.410	8.105	16.603	101.08	99.54	0.95
2	8.410	7.843	16.162	98.84		
3	8.410	7.561	15.874	98.72		
4	8.410	6.536	14.931	99.77		
5	8.410	6.384	14.751	99.33		

2.6 样品总黄酮含量测定结果 样品中总黄酮平均含量为 8.41% , $RSD = 0.94\%$ 。

表 2 样品总黄酮含量测定结果

Table 2 Determination result of total flavonoid content in sample

样品号 Sample No.	总黄酮含量//% Total flavonoid content	平均含量//% Mean content	RSD %
1	8.38	8.41	0.94
2	8.46		
3	8.41		
4	8.51		
5	8.30		

3 结论与讨论

该研究结果表明,总黄酮浓度在 $0.007143 \sim 0.07143$ mg/ml 范围内与吸光度呈良好的线性关系,加样回收率为 99.54% , $RSD = 0.95\%$ 。这说明该方法操作简单方便、快速,其准确性、重现性、线性关系、回收率均能满足科研和生产的要求,可用于梭洞学中总黄酮含量的测定。

该研究中梭洞学总黄酮的平均含量为 8.41% , 比相关文

献报道的总黄酮含量高很多^[3-4], 分析原因可能是因为所选择的显色方法不同造成的。在采用比色法进行测量时,要注意考察吸光度值的稳定性,在 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 体系中,碱性条件经常会影响结果的准确性和稳定性,只有当物质中含有邻二酚羟基,并且邻二酚羟基的邻位没有取代时, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法才在波长 510 nm 左右有最大吸收。中草药的成分十分复杂,因此在进行黄酮含量测定时要根据具体条件选择适当方法。

参考文献

- [1] 王慧春. 蓼属植物的黄酮类化合物研究[J]. 青海草业, 2008, 17(3): 38-41.
- [2] 马陶陶, 张群林, 李俊. 中药总黄酮的含量测定方法[J]. 安徽医药, 2007, 11(11): 1030-1032.
- [3] 董玉, 王爱民, 陈朝军, 等. 文冠木中总黄酮的含量测定方法研究[J]. 内蒙古医学院学报, 2008, 30(5): 364-370.
- [4] 王祥培, 万德光, 王祥森, 等. 不同产地野生与栽培头花蓼中总黄酮的含量分析[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1713-1714.
- [5] 杜明凤, 陈庆富. 不同居群不同部位头花蓼总黄酮含量研究[J]. 广西植物, 2008, 28(4): 561-565.

(上接第 5630 页)

2.3 丁香挥发油提取物的成分鉴定 由图 5 可知,共分离出 23 种化合物。利用 NIST05 标准质谱库-计算机联机检索,共鉴定出了 22 种化合物,占挥发油总量的 99.918% , 同时鉴定出了 3 种主要物质的结构式(图 6)。

由丁香挥发油组分分析结果(表 3)可知,丁香挥发油组分主要有抑菌成分丁香酚所占比例为 65.710% , 异丁香酚所占比例为 19.920% ; 石竹烯所占比例为 9.332% 。

3 结论与讨论

(1) 提取液浓度从 20% 增大到 95% , 丁香挥发油得率随着乙醇浓度的增大而增大。其中乙醇浓度从 20% 增大到 75% 时,得率上升趋势明显;当乙醇浓度从 75% 增大到 95% 时,得率变化不明显。这可能是因为温度的升高,加速了分子运动速率,有利于溶剂渗透到细胞中,从而使大量内容物析出,使得挥发油得率提高,当浓度增加到一定程度时此效应就不再明显。

(2) 当提取温度从 35°C 增加到 65°C 时丁香挥发油得率呈明显上升趋势,而当温度从 65°C 增加到 85°C 时丁香挥发油得率反而有所降低。出现这种现象的原因可能是,温度的升高使得更多的杂质、亲脂性强的成分溶出量增加,不利于挥发油的溶出,且挥发油在高温下分子运动速率加剧,导致

散失到空气当中,而使得率下降。

(3) 应用超声辅助从丁香中提取挥发油的方法简单易行,有利于挥发油的提取。超声辅助提取挥发油的最佳提取条件是料液比 $1:20$, 超声时间 90 min , 乙醇浓度 75% , 超声温度 65°C , 丁香挥发油的提取率为 9.00% 。采用 GC-MS 技术,共分离鉴定出 22 种化学成分,其中主要成分为丁香酚 (65.710%)、异丁香酚 (19.920%) 和石竹烯 (9.332%)。丁香酚的含量为 65.710% , 与大部分文献报道一致^[11]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 高锦明. 植物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [3] 董丽萍, 许松林. 天然香料的提取分离技术[J]. 天津化工, 2006, 20(5): 1-5.
- [4] 中国香料植物栽培与加工编写组. 中国香料植物栽培与加工[M]. 北京: 轻工业出版社, 1985.
- [5] ZAYAS J F. Effect of ultrasonic treatment on the extraction of chymosin[J]. Dairy Sci, 1986, 69: 1767-1775.
- [6] KIM S M, ZAYAS J F. Effects of ultrasound treatment on the properties of chymosin[J]. Food Sci, 1991, 56(4): 926-930.
- [7] 王晓玲, 杨伯伦, 张尊听, 等. 新型分离技术在天然有机物提取及纯化中的应用[J]. 化工进展, 2002, 21(2): 131-135.
- [8] 段文录, 尹卫平. 小叶丁香挥发油化学成分的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(28): 12075, 12084.
- [9] 贾红丽, 计巧灵, 艾力, 等. 新疆异株百里香挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 中国调味品, 2008(6): 60-63.
- [10] 张继, 刘阿萍, 杨永利, 等. 百里香挥发性成分的研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2004(8): 890-892.
- [11] 孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998.