

葵叶挥发油的提取 及抗氧化和抑菌活性研究

吕纪行¹ 纪明慧^{2*} 郭飞燕^{2*} 陈光英² 翟富荣²

(1. 南京大学化学化工学院, 江苏南京 210023;

2. 海南师范大学化学与化工学院, 海南海口 571158)

摘要: 采用水蒸气提取法对葵叶挥发油进行提取, 在单因素实验的基础上, 以正交实验筛选最佳的提取工艺条件; 同时考察葵叶挥发油抗氧化和抑菌活性。结果表明, 葵叶挥发油提取的最佳工艺条件为: 料液比 $m_{\text{干葵叶粉}}: V_{\text{水}} = 50: 1000$ (g/mL), 超声时间为 30 min, 超声温度 70 °C, 超声功率 192 W, 加热回流提取 4 h, 葵叶挥发油的得率为 2.96%。葵叶挥发油清除 DPPH· 和 ·OH 的 IC_{50} 分别为 33.19、71.11 $\mu\text{g/mL}$; 挥发油对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、四联球菌、藤黄八叠球菌、白色葡萄球菌、黑曲霉、毛霉、青霉均有明显的抗菌活性, 其 MIC 分别为 0.625、1.25、0.625、0.625、0.625、2.50、1.25、0.313、0.625、0.313 mg/mL, 故葵叶挥发油具有较强的抗氧化和抑菌活性。

关键词: 葵叶, 挥发油, 抗氧化, 抑菌

Extraction, antioxidant capacity and antibacterial activities of essential oil from *Piper betle* L.

LV Ji-xing¹, JI Ming-hui^{2*}, GUO Fei-yan^{2*}, CHEN Guang-ying², ZHAI Fu-rong²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract: The essential oil was extracted by hydrodistillation, and the best extraction technology were studied through single factor experiment and orthogonal experiment. The antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Piper betle* L. were investigated. The results indicated that the optimal conditions were solid-to-liquid ratio 50:1000 g/mL, ultrasonic time of 30 min, extraction temperature of 70 °C, ultrasonic power of 192 W, heated refluxed of 4 h, the extraction rate of *Piper betle* L. essential oil was 2.96%. The IC_{50} of the oil for scavenging activities against DPPH free radical and hydroxyl free radical were 33.19 $\mu\text{g/mL}$ and 71.11 $\mu\text{g/mL}$. The oil had certain antibacterial activity on the microorganisms, the minimal inhibitory concentration of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus tetragenus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus albus*, *Aspergillus niger*, *Mucor*, *Penicillium* were 0.625, 1.25, 0.625, 0.625, 0.625, 2.50, 1.25, 0.313, 0.625, 0.313 mg/mL, respectively. In conclusion, the essential oil from *Piper betle* L. had strong antioxidative and antibacterial activities.

Key words: *Piper betle* L.; essential oil; antioxidant activity; antimicrobial activity

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)09-0075-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.006

葵叶 (*Piper betle* L.) 别名青蒟、芦子、大芦子、槟榔蒟、槟榔葵, 是我国南方大量生长和民间广泛使用的一种具有特殊芳香气味的胡椒科胡椒属药用植物, 其根、籽、叶皆可入药, 具有祛风散寒、行气化痰、消肿止痒之功效, 外用可治皮肤湿疹、脚癣等疾病^[1-2]。现代研究表明, 葵叶富含挥发油、生物碱、木脂素和一些酚类化合物^[3-6], 具有复杂的化学成分

和广泛的药理活性^[7-8]。但是, 目前, 葵叶更多的是被用与槟榔一起嚼食, 没有其它的研究和开发利用, 为了充分利用这一资源, 本文试图通过提取葵叶挥发油、抑菌性实验和抗氧化性实验来探明其医药和保健作用的内在本质, 从而为葵叶的进一步开发和利用提供科学依据, 为综合开发利用海南葵叶提供方向和新的思路。

收稿日期: 2016-10-21

作者简介: 吕纪行 (1995-) 男, 在读本科生, 研究方向: 化学, E-mail: lvjixing2008@vip.qq.com。

* 通讯作者: 纪明慧 (1968-) 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 天然产物研究与应用, E-mail: jimh66@163.com。

郭飞燕 (1963-) 女, 本科, 副教授, 研究方向: 天然产物研究与应用, E-mail: 56801582@qq.com。

基金项目: 海南省社会发展科技专项 (2015SF48)。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

葵叶 采集于海南省万宁市,经海南师范大学生命科学学院钟琼芯老师鉴定为胡椒科植物,将葵叶烘干粉碎成粉末备用;枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、四联球菌、藤黄八叠球菌、黑曲霉、毛霉、青霉 由海南师范大学生命科学学院微生物教研室提供;二甲基亚砷、氯化钠、无水硫酸钠、邻二氮菲 分析纯,天津市化学试剂一厂;石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇 分析纯,西陇化工股份有限公司;30% H_2O_2 溶液 分析纯,广州化学试剂厂;Tris-HCl 三羟甲基氨基甲烷 (pH6.0);维生素 C,七水合硫酸亚铁 分析纯,天津市同鑫化工有限公司;胰蛋白胨、酵母浸膏、琼脂粉、改良马丁、营养肉汤。

KDM 型调温电热套 山东省埭城永兴仪器厂;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;DZF-6050 真空干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;pHS-3C 精密 pH 计 上海康仪仪器有限公司;Sartorius BT-124S 精密天平 赛多利斯科学仪器有限公司;HP6890/5973MSD 毛细管气相色谱-质谱联用仪 美国 Hewlett-Packard 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件的选择 气相色谱条件:石英毛细管柱 HP-FFAP(30 m × 0.25 mm, 0.25 μ m),程序升温:从 60 $^{\circ}$ C 开始,以 4 $^{\circ}$ C/min 升到 150 $^{\circ}$ C,再以 8 $^{\circ}$ C/min 升温到 250 $^{\circ}$ C,保留 3 min,载气为 He (99.99%) 柱流量 1.0 mL/min,进样口温度 250 $^{\circ}$ C,分流比 80:1。

质谱条件:EI 源;电离电压 70 eV,离子源温度 230 $^{\circ}$ C 扫描范围 40~500 aum,进样量 0.5 μ L。

1.2.2 葵叶挥发油提取的工艺研究

1.2.2.1 料液比对葵叶挥发油提取的影响 把葵叶晾干粉碎,各取 6 份 50.0 g 葵叶干粉置于 2000 mL 圆底烧瓶中,分别加入:300、400、700、1000、1300、1600 mL 水在超声时间 30 min、超声温度 60 $^{\circ}$ C、超声功率 192 W 的条件下进行超声处理,以加快提取速度,然后再进行水蒸气蒸馏提取葵叶挥发油 2 h,提取完毕,用少量乙醚洗涤和萃取,挥干乙醚后用减量法计算挥发油质量,通过公式:葵叶挥发油的得率(%) = 挥发油质量(g) / 葵叶质量(g),计算葵叶挥发油的得率。用 GC-MS 测定其挥发油的化学成分。

1.2.2.2 超声时间对葵叶挥发油提取的影响 在料液比 50:1000 g/mL、超声温度 60 $^{\circ}$ C、超声功率 192 W、水蒸气蒸馏提取葵叶挥发油 2 h 不变的条件下,改变超声时间 10、20、30、40、50、60 min 对葵叶挥发油进行提取,提取完毕按 1.2.2.1 节对挥发油进行处理,计算挥发油得率。

1.2.2.3 超声温度对葵叶挥发油提取的影响 在料液比 50:1000 g/mL、超声时间 30 min、超声功率 192 W、水蒸气蒸馏提取葵叶挥发油 2 h 不变的条件下,改变超声温度 40、50、60、70、80 $^{\circ}$ C 对葵叶挥发油进行提取,提取完毕按 1.2.2.1 节对挥发油进行处理,计算挥发油得率。

1.2.2.4 超声功率对葵叶挥发油提取的影响 在料液比 50:1000 g/mL、超声时间 30 min、超声温度 70 $^{\circ}$ C、水蒸气蒸馏提取葵叶挥发油 2 h 不变的条件下,改变超声功率 48、96、144、192、240 W 对葵叶挥发油进行提取,提取完毕按 1.2.2.1 节对挥发油进行处理,计算挥发油得率。

1.2.2.5 水蒸气蒸馏提取时间对葵叶挥发油提取的影响 在料液比 50:1000 g/mL、超声时间 30 min、超声温度 70 $^{\circ}$ C、超声功率 192 W 不变的条件下,改变水蒸气蒸馏提取时间 1、2、3、4、5、6、7 h 对葵叶挥发油进行提取,提取完毕按 1.2.2.1 节对挥发油进行处理,计算挥发油得率。

1.2.2.6 葵叶挥发油提取的正交实验 通过单因素实验得知,料液比(A)、超声时间(B)、超声温度(C)、超声功率(D)、水蒸气蒸馏提取时间(E)对葵叶挥发油的提取有一定的影响。故设计五因素五水平的正交实验。取 50.0 g 葵叶干粉置于 2000 mL 圆底烧瓶中,按比例加入一定量的水进行超声处理,以加快提取速度,然后再进行水蒸气蒸馏提取葵叶挥发油,提取完毕按 1.2.2.1 节对挥发油进行处理,计算挥发油得率。用表 $L_{25}(5^6)$ 安排实验,因素水平见表 1,用 GC-MS 测定其挥发油的化学成分。

1.2.3 葵叶挥发油的抗氧化活性测定

1.2.3.1 挥发油对 \cdot OH 的清除作用 精确称取 100.0 mg 的葵叶挥发油,加无水乙醇溶解,定容至 10 mL 容量瓶中,配制成 10.0 mg/mL 葵叶挥发油乙醇溶液,然后不断稀释配制浓度分别为 50.0、60.0、70.0、80.0、100.0、120.0 μ g/mL 的葵叶挥发油乙醇溶液。同时配制相同浓度的 V_c 水溶液,考察挥发油和 V_c 对 \cdot OH 清除作用。参照文献 [9-10] 的方法进行

表 1 $L_{25}(5^6)$ 正交实验因素水平表

Table 1 The level of factor of $L_{25}(5^6)$ orthogonal experiment

水平	因素				
	A 料液比(g/mL)	B 超声时间(min)	C 超声温度($^{\circ}$ C)	D 超声功率(W)	E 水蒸气蒸馏提取时间(h)
1	50:400	10	40	48	1
2	50:700	20	50	96	2
3	50:1000	30	60	144	3
4	50:1300	40	70	192	4
5	50:1600	50	80	240	5

测定。

1.2.3.2 挥发油对 DPPH· 的清除作用 精确称取 100.0 mg 的萹叶挥发油于 10 mL 的容量瓶中,加入无水乙醇溶解并定容,得 10.0 mg/mL 萹叶挥发油乙醇溶液,然后不断稀释配制浓度分别为 10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 萹叶挥发油乙醇溶液,同时配制相同浓度的 V_c 水溶液,考察挥发油和 V_c 对 DPPH· 的清除作用。参照文献 [9-10] 的方法进行测定。

1.2.4 抑菌活性的测定

1.2.4.1 抑制细菌活性测定 分别称取胰蛋白胨 (25 g)、酵母提取物 (12.5 g)、NaCl (25 g) 和蒸馏水 (2500 mL) 配制约 2500 mL 的液体培养基。然后进行液体培养基接种各种菌种,将液体培养的枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、四联球菌、藤黄八叠球菌用培养液按 1:1000 比例进行稀释。

配制 50.0 mg/mL 的萹叶挥发油 DMSO 溶液,采用二倍稀释法用上述含菌的稀释培养液进行稀释,配制成浓度为 10.00、5.00、2.50、1.25、0.625、0.312、0.156、0.078 mg/mL 的萹叶挥发油 DMSO 溶液,以不加样品的 DMSO 为空白,参照文献 [11-12] 的方法,采用 96 孔板法测定其对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、四联球菌、藤黄八叠球菌的抑制活性,实验平行 3 次,观察记录 MIC 值。

1.2.4.2 抑制真菌活性测定 参照文献 [11-12] 的方法,用倾注平板法测定挥发油对黑曲霉、毛霉和青霉的抑制活性。

分别称取改良马丁 (16.8 g)、琼脂粉 (9.0 g) 于烧杯中,加入 600 mL 蒸馏水加热溶解制备约 600 mL 培养基,灭菌备用。用已灭菌的移液管 (5 mL) 取不同浓度 (100.0、50.00、25.00、12.50、6.250、3.125、1.563、0.781 mg/mL) 的萹叶挥发油乙醇溶液各 5 mL,以不加样品的无水乙醇为空白对照进行实验,分别置于无菌的空培养皿 (直径 9 cm) 内,再加入经过高压灭菌后温度冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右的培养基 20 mL,总体积为 25 mL,充分拌匀,使受试溶液在培养基中的浓度依次为 20.0、10.0、5.00、2.50、1.25、0.625、0.313、0.156 mg/mL。待培养基凝固后,用接种环分别挑取已活化的黑曲霉、毛霉和青霉,划 S 线接种于含样品溶液平板的表面,划好后放在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 48 h,观察记录 MIC 值,实验平行 3 次。

2 结果与分析

2.1 萹叶挥发油提取工艺研究

2.1.1 料液比对萹叶挥发油提取的影响 料液比对萹叶挥发油提取质量的影响结果如图 1 所示。

由图 1 可知,当料液比 50:300~50:1000 (g/mL) 时,萹叶挥发油提取质量随着加水量的增大而增加;但当料液比大于 50:1000 (g/mL) 时,挥发油提取质量随着水量的增加而缓慢下降。加水量过小时,由于萹叶样品量大,萹叶没有得到充分浸提,挥发油提取量也相应较小;加水量过大时,提高了挥发油溶于

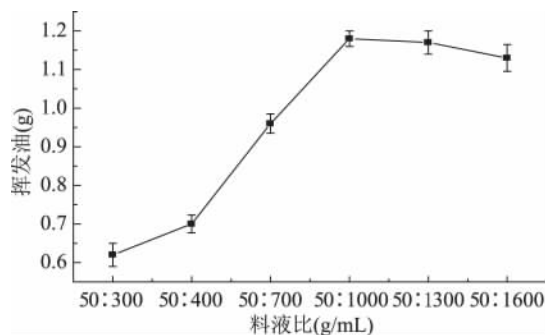


图 1 料液比对萹叶挥发油提取的影响

Fig.1 Effect of solid-to-liquid ratio on extraction of the essential oil from *Piper betle* L.

热水中的速度和质量,从而造成了一定的损失,且水量的增加同时也增加了加热时间,增加了能耗。因此,最佳料液比为 50:1000 (g/mL)。

2.1.2 超声时间对萹叶挥发油提取的影响 超声时间对萹叶挥发油提取质量的影响结果如图 2 所示。

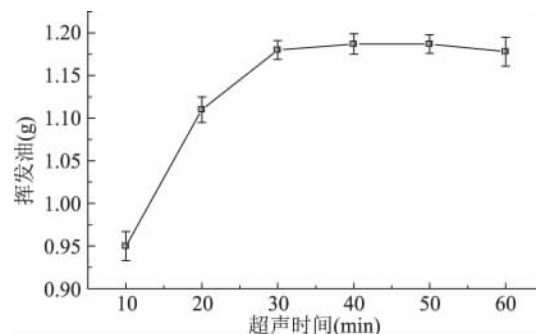


图 2 超声时间对萹叶挥发油提取的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic time on extraction of the essential oil from *Piper betle* L.

由图 2 可知,当超声时间在 10~30 min 时,萹叶挥发油提取量随着超声时间的增加而增加;当超声时间大于 30 min 时,挥发油的提取量随着超声时间的增加趋于稳定。这是因为超声波强化萹叶挥发油提取在 30 min 即可获得最佳提取质量,增加超声时间对挥发油质量的提高并不明显,故超声时间为 30 min。

2.1.3 超声温度对萹叶挥发油提取的影响 超声温度对萹叶挥发油提取质量的影响结果如图 3 所示。

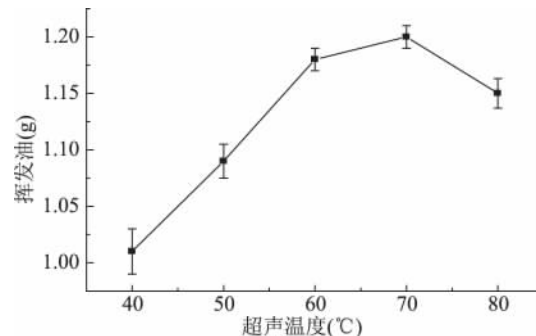


图 3 超声温度对萹叶挥发油提取的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic temperature on extraction of the essential oil from *Piper betle* L.

由图3可知,当超声温度在40~70℃时,萹叶挥发油提取质量随着超声温度的升高而增加;当超声温度大于70℃时,挥发油提取质量随着超声温度的增加而呈下降的趋势。超声温度的增加加大了挥发油的释放速度,有利于提取,但温度过高会导致挥发油分子的快速挥发和氧化而造成一定的损失。同时能耗也随之增大,因此,超声温度为70℃时是最佳选择。

2.1.4 超声功率对萹叶挥发油提取的影响 超声功率对萹叶挥发油提取质量的影响结果如图4所示。

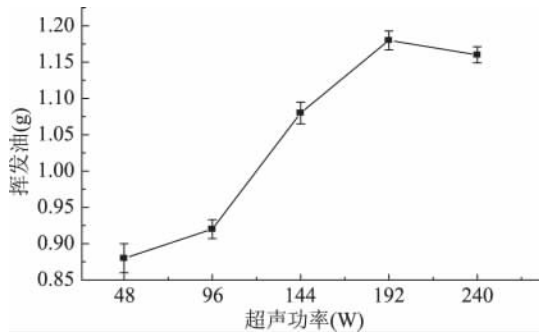


图4 超声功率对萹叶挥发油提取的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic power on extraction of the essential oil from *Piper betle* L.

由图4可知,当超声功率为48~192W时,萹叶挥发油提取质量随着超声功率增大而增加;当超声功率大于192W时,挥发油提取质量随着超声功率的增大而降低。功率过低,提取效率慢,随着超声功率的增大,加大挥发油分子的运动速度,使挥发油提取更充分,因此选择192W为最佳超声功率。

2.1.5 水蒸气蒸馏提取时间对萹叶挥发油提取的影响 水蒸气蒸馏提取时间对萹叶挥发油提取质量的影响结果如图5所示。

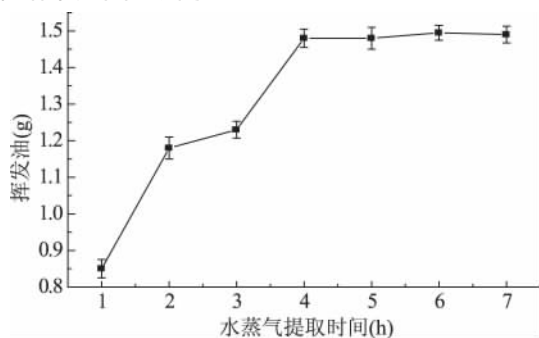


图5 水蒸气提取时间对萹叶挥发油提取的影响

Fig.5 Effect of hydrodistillation time on extraction of the essential oil from *Piper betle* L.

由图5可知,以水蒸气提取法对萹叶挥发油进行提取,当提取时间为1~4h时,挥发油提取质量随着提取时间的延长而增加;而后再增加提取时间对挥发油的提取量影响不大。提取时间过短,挥发油成分不能被充分提取;提取时间太长会造成挥发油的氧化或分解,从而降低提取量,因此,提取时间为4h是最佳选择。

2.1.6 萹叶挥发油提取工艺研究的正交实验 在单因素的基础之上,通过正交实验对料液比、超声时

间、超声温度、超声功率、水蒸气蒸馏提取时间条件进行优化。正交实验结果见表2,方差分析见表3。

表2 $L_{25}(5^6)$ 正交实验设计和结果极差分析

Table 2 $L_{25}(5^6)$ orthogonal experiment design and the range analysis for the experiment result

实验号	A	B	C	D	E	挥发油(g)
1	1	1	1	1	1	0.56
2	1	2	2	2	2	0.68
3	1	3	3	3	3	0.83
4	1	4	4	4	4	1.00
5	1	5	5	5	5	0.81
6	2	1	2	3	4	0.98
7	2	2	3	4	5	1.05
8	2	3	4	5	1	0.99
9	2	4	5	1	2	0.75
10	2	5	1	2	3	0.83
11	3	1	3	5	2	1.02
12	3	2	4	1	3	1.30
13	3	3	5	2	4	1.47
14	3	4	1	3	5	1.12
15	3	5	2	4	1	1.07
16	4	1	4	2	5	0.81
17	4	2	5	3	1	0.93
18	4	3	1	4	2	1.39
19	4	4	2	5	3	1.05
20	4	5	3	1	4	0.98
21	5	1	5	4	3	0.92
22	5	2	1	5	4	0.75
23	5	3	2	1	5	0.79
24	5	4	3	2	1	0.96
25	5	5	4	3	2	1.13
K_1	3.88	4.29	4.65	4.38	4.51	
K_2	4.60	4.71	4.57	4.75	4.97	
K_3	5.98	5.47	4.84	4.99	4.93	
K_4	5.16	4.88	5.23	5.43	5.18	
K_5	4.55	4.82	4.88	4.62	4.58	
R	0.42	0.24	0.12	0.21	0.14	

表3 正交实验结果方差分析

Table 3 Analysis of variance for the experiment result of orthogonal experiment

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F值	F_{α}
A	0.491	4	0.123	2.278	
B	0.141	4	0.035	0.648	$F_{0.05}(4, 4) = 6.39$
C	0.050	4	0.013	0.241	$F_{0.01}(4, 4) = 16.0$
D	0.125	4	0.031	0.574	
E	0.061	4	0.015	0.278	
误差	0.216	4	0.054		

超声波辅助提取萹叶挥发油的正交实验结果与分析见表2和表3。从表2直观分析结果可知,极差

表4 水蒸气蒸馏提取萹叶挥发油的化学成分 GC-MS 分析结果

Table 4 Chemical composition of the volatile oil analyzed by GC-MS

序号	保留时间 (min)	化合物	分子式	分子量	含量 (%)
1	9.939	Eucalyptol 桉叶油醇(桉树脑)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.272
2	10.380	3,7-dimethyl-1,3,7-Octatriene 3,7-二甲基-1,3,7-十八烷三烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.055
3	11.873	3,7-dimethyl-1,6-Octadien-3-ol-3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.057
4	14.422	Estragole 对烯丙基苯甲醚	C ₁₀ H ₁₂ O	148	0.676
5	16.205	4-(2-propenyl)-Phenol 4-烯丙基苯酚(胡椒酚)	C ₉ H ₁₀ O	134	13.453
6	17.909	4-(2-peopenyl)-Phenol acetate 乙酸丁香酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	176	3.281
7	18.265	Eugenol 丁香香酚	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	0.479
8	18.839	(z)-2-methoxy-4-(1-propenyl)-Phenol 2-甲氧基-4-(1-丙烯基)-苯酚	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	67.141
9	19.238	1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-Benzene 异丁香酚甲醚	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178	1.172
10	19.576	Caryophyllene 石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.634
11	19.788	未鉴定			0.260
12	20.301	alpha-Caryophyllene a-石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.303
13	20.748	1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methyl-1-(1-methylethyl)-Naphthalene 1,2,4a,5,6,8a-六氢-4,7-二甲基-1-(2-甲基丙基)萘	C ₁₅ H ₂₄	204	0.647
14	20.869	[3aS-(3a.alpha.3b.beta.4.beta.7.alpha.7aS*0)]-octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene [3aS-(3.alpha.3beta.4beta.7.alpha.7aS)]-八氢-7-甲基-3-亚甲基-4-丙基-环戊烯并[1,3]环丙[1,2]苯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.333
15	21.226	(1.alpha.4a.alpha.8a.alpha.)-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-Naphthalene(1.alpha.4.alpha.8.alpha.)-1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢-7-甲基-4-亚甲基-1-(1-异丙基)萘	C ₁₅ H ₂₃	203	0.140
16	21.365	(S)-1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-Cyclohexene (S)-1-甲基-4-(5-甲基-1-亚甲基-4-己烯)-1-环己烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.086
17	21.836	Phenol 2-methoxy-4-(1-propenyl)-acetate 2-甲氧基-4-丙烯基乙酸酚酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	206	9.617
18	22.990	3,4,4a,5,6,7-hexahydro-6-methyl-1(2H)-Naphthalenone 3,4,4a,5,6,7-六氢-6-甲基-1(2H)-萘酮	C ₁₁ H ₁₆ O	164	0.117
19	23.854	[1S-(1.alpha.4.alpha.7.alpha.)]-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4,9,9-tetramethyl-4,7-Methanoazulene [1S-(1.alpha.4.alpha.7.alpha.)]-1,2,3,4,5,6,7,8-八氢-1,4,9,9-四甲基-4,7-亚甲基奥	C ₁₅ H ₂₄	204	0.050
20	24.102	4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene 4-烯丙基-1,2-双乙酸基苯	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	234	0.975
21	28.905	Hexadecanoic acid methyl ester 十六酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	0.135
22	31.684	(E)-9-Octadecenoic acid methyl ester 油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296	0.077
23	32.071	Octadecenoic acid methyl ester 十八烷酸甲酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	0.040

R_A > R_B > R_D > R_E > R_C, 因素影响次序为 A > B > D > E > C, 即萹叶与水的比例为主要影响因素, 对萹叶挥发油提取结果影响最大, 超声波温度影响最小。表3的方差分析结果表明, 料液比、超声时间、超声温度、超声功率和水蒸气蒸馏提取时间对实验结果没有显著性影响 (p > 0.05)。虽然所选择的五个因素对实验结果没有显著性差异, 但根据单因素实验和正交实验结果可知, 不同的水平因素对实验结果有一定的影响, 因此, 最佳工艺条件为 A₃B₃C₄D₄E₄, 即 m_{萹叶粉}: V_水 = 50: 1000 (g/mL), 超声时间为 30 min, 超声温度 70 °C, 超声功率 192 W, 水蒸气蒸馏提取 4 h, 挥发油提取效果较好。以此工艺条件验证 3 次, 萹叶挥发油的平均提取质量为 1.48 g, 萹叶挥发油的得率为 2.96%。

2.2 萹叶挥发油的 GC-MS 分析

上述方法提取所得的挥发油化学成分用毛细管

气相色谱法进行分析, 分离出 23 个组分(图 6)。用 Hewlett-packard 软件按峰面积归一化法计算各峰峰面积的相对强度, 并对化合物进行定量分析。根据 GC/MS 联用所得的质谱信息, 用 NBS 数据库检索与标准谱图对照、分析, 鉴定了萹叶挥发油中的化学成分。结果列于表 4。

从表 4 中可知, 水蒸气蒸馏法提取的萹叶挥发油中共检测出 23 种组分, 鉴定出化合物 22 种, 占总峰面积的 99.74%; 萹叶挥发油中有酚类、醇类、烯炔类等有机物, 含量较高的组分为: 2-甲氧基-4-(1-丙烯基)-苯酚(含量 67.141%); 4-烯丙基苯酚(胡椒酚)(含量 13.453%); 2-甲氧基-4-丙烯基乙酸酚酯(含量 9.617%)。其中 2-甲氧基-4-(1-丙烯基)-苯酚可用于配制香精和制备香兰素, 在化妆品、食品行业有广泛的用途^[13]; 4-烯丙基苯酚(胡椒酚)具有抗菌、解痉、镇静及升高白细胞的作用^[14]。

表5 萹叶挥发油对细菌抑菌作用的最小抑菌浓度

Table 5 The MIC values to Bacteria of the essential oil from *Piper betle* L.

样品	质量浓度 (mg/mL)	金黄色 葡萄球菌	枯草杆菌	大肠杆菌	蜡状 芽孢杆菌	四联球菌	藤黄 八叠球菌	白色 葡萄球菌
萹叶挥发油	10.00	-	-	-	-	-	-	-
	5.00	-	-	-	-	-	-	-
	2.50	-	-	-	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-	-	+	-
	0.625	-	+	-	-	-	+	+
	0.313	+	+	+	+	+	+	+
	0.156	+	+	+	+	+	+	+
	0.078	+	+	+	+	+	+	+

注 “+”表示有菌生长，“-”表示无菌生长 表6同。

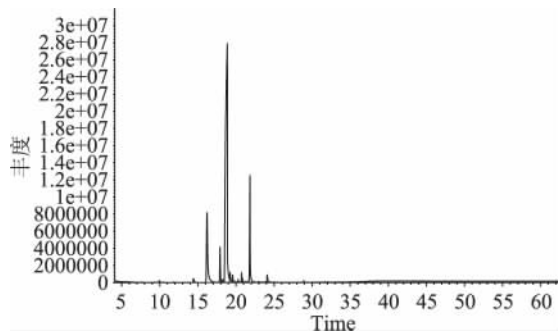
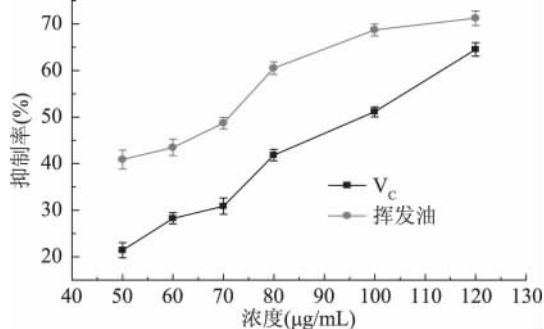


图6 水蒸气蒸馏提取萹叶挥发油的 GC-MS 离子总图

Fig.6 GC-MS total ion current chromatogram of the essential oil from *Piper betle* L.

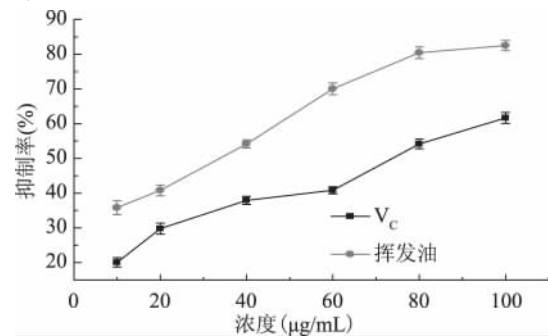
2.3 萹叶挥发油抗氧化活性研究

2.3.1 萹叶挥发油对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用 由图7可知,萹叶挥发油对 $\cdot\text{OH}$ 有一定的清除能力,随着浓度的增加,清除率也增加,浓度与清除率有一定正量效关系。萹叶挥发油清除 $\cdot\text{OH}$ 的 $\text{IC}_{50} = 71.11 \mu\text{g/mL}$,同时测定了 V_c 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力,其 $\text{IC}_{50} = 97.76 \mu\text{g/mL}$,萹叶挥发油对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力大于 V_c 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力。

图7 萹叶挥发油对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用Fig.7 Scavenging capacity against $\cdot\text{OH}$ of the essential oil from *Piper betle* L.

2.3.2 萹叶挥发油对DPPH \cdot 的清除作用 由图8可知,萹叶挥发油对DPPH \cdot 有一定的清除能力,随着浓度的增加,清除率也增加,浓度与清除率有一定正量效关系。萹叶挥发油清除DPPH \cdot 的 $\text{IC}_{50} = 33.19 \mu\text{g/mL}$,同时测定了 V_c 对DPPH \cdot 的清除能力,其 $\text{IC}_{50} = 73.74 \mu\text{g/mL}$,萹叶挥发油对DPPH \cdot 清除能力好

于 V_c 。

图8 萹叶挥发油对DPPH \cdot 的清除作用Fig.8 Scavenging capacity against DPPH \cdot of the essential oil from *Piper betle* L.

实验结果表明,萹叶挥发油具有较强的抗氧化活性,其抗氧化活性高于 V_c ,这可能与萹叶挥发油中含有大量的酚类化合物有关,据文献报导,酚类化合物具有很强的抗氧化活性,而酚类抗氧化剂的作用机制主要是通过酚羟基的抽氢反应直接清除自由基^[15],这些化合物与自由基之间进行一系列反应,可阻断自由基对人体生物大分子的损伤和氧化,减少人体心血管等一些疾病的发病^[16]。

2.4 萹叶挥发油抑菌活性研究

2.4.1 萹叶挥发油对细菌抑菌作用的最小抑菌浓度 从表5中可知,萹叶挥发油对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、四联球菌、藤黄八叠球菌、白色葡萄球菌均有一定的抑制作用,其中最小抑菌浓度分别为0.625、1.25、0.625、0.625、0.625、2.50、1.25 mg/mL。因此,萹叶挥发油对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、四联球菌的抑制效果较佳。

2.4.2 萹叶挥发油对真菌抑菌作用的最小抑菌浓度 从表6可知,萹叶挥发油对黑曲霉、毛霉、青霉均有明显的抗菌活性,其最小抑菌浓度分别为0.313、0.625、0.313 mg/mL,因此,萹叶挥发油对黑曲霉、青霉抑制效果较佳。

实验结果表明,萹叶挥发油对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、藤黄八叠球菌、四联球菌、白色葡萄球菌、黑曲霉、毛霉、青霉均有明显的抑菌活性,萹叶挥发油中含有大量的活性物质,

如4-烯丙基苯酚(胡椒酚)、丁子香酚这些天然的有机分子可阻碍细菌等微生物代谢作用和生理活动,破坏菌体的结构,最终导致菌体的生长繁殖被抑制^[17-18]。这就是为什么葵叶在民间作为对防寄生虫、细菌性传染病有作用^[1-2]而被广泛运用的科学原因。

表6 葵叶挥发油对真菌抑菌作用的最小抑菌浓度

Table 6 The MIC values to Fungi of the essential oil from *Piper betle* L.

样品	质量浓度 (mg/mL)	黑曲霉	毛霉	青霉
葵叶挥发油	20.00	-	-	-
	10.00	-	-	-
	5.00	-	-	-
	2.50	-	-	-
	1.25	-	-	-
	0.625	-	-	-
	0.313	-	+	-
	0.156	+	+	+

3 结论

通过用水蒸气提取法对葵叶进行提取,并用GC-MS分析其成分,寻找出最合适的提取工艺。水蒸气蒸馏法提取的葵叶挥发油中共检测出23种组分,鉴定出化合物22种,占总峰面积的99.74%;葵叶挥发油中有酚类、醇类、烯烃类等有机物,含量较高的组分为:2-甲氧基-4-(1-丙烯基)-苯酚(含量为67.141%);4-烯丙基苯酚(胡椒酚)(含量为13.453%);2-甲氧基-4-丙烯基乙酸酚酯(含量为9.617%)。当料液比为 $m_{\text{干葵叶粉}}:V_{\text{水}}=50:1000\text{ g/mL}$,超声时间为30 min,超声温度70℃,超声功率192 W,水蒸气蒸馏提取4 h,挥发油提取效果较佳,葵叶挥发油的得率为2.96%。

葵叶挥发油清除DPPH·自由基和·OH自由基的 IC_{50} 分别为33.19、71.11 $\mu\text{g/mL}$;挥发油对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、四联球菌、藤黄八叠球菌、白色葡萄球菌、黑曲霉、毛霉、青霉均有明显的抗菌活性,其最小抑菌浓度分别为0.625、1.25、0.625、0.625、0.625、2.50、1.25、0.313、0.625、0.313 mg/mL,故葵叶挥发油是很好的抗氧化剂和抑菌物质。

葵叶富含挥发油,其挥发油具有特殊芳香气味,可用于制做香精香料,结合其优良抗氧化和抑菌活

性,可广泛应用于化妆品、食品、日用品和药品行业中。

参考文献

- [1]中国科学院华南植物研究所等编辑.海南植物志[M].北京:科学出版社,1964:331.
- [2]郭声波.药酱(葵叶)的历史与开发[J].中国农史,2007(1):8-17.
- [3]廖超林.泰国葵叶精油化学成分的研究[J].香料香精化妆品,2000(2):3-6.
- [4]尹燕,黄相中,王炯,等.葵叶茎化学成分研究[J].中药材,2009,32(6):887-889.
- [5]朱芸,戴云,黄相中,等.葵叶的化学成分研究[J].云南中医中药杂志,2010,31(9):56-58.
- [6]黄相中,尹燕,黄文全,等.葵叶茎中生物碱和木脂素类化学成分研究[J].中国中药杂志,2010,35(17):2285-2288.
- [7]梁辉,尹燕,杨青昧,等.葵叶提取物的抗氧化与抑菌活性研究[J].云南中医中药杂志,2011,32(5):57-59.
- [8]纪明慧,郭飞燕,王呈文,等.葵叶抗氧化活性成分的提取及活性测定体系的优化[J].食品工业科技,2012,33(21):246-248.
- [9]孟繁磊,陈瑞战,张敏,等.刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J].食品科学,2010,31(10):168-174.
- [10]王吉鸿,纪明慧,舒火明,等.沙煲暗罗根乙醇提取物的抗氧化活性和抗菌活性研究[J].中成药,2012,34(4):617-620.
- [11]强毅,王政军,陈克克,等.费菜多酚含量的测定及体外抗菌活性研究[J].食品工业科技,2013,34(5):53-56.
- [12]黄筱娟,纪明慧,舒火明,等.菠萝叶乙醇提取物的抑菌活性及其稳定性研究[J].食品工业科技,2014,35(11):166-169.
- [13]徐明.异丁香酚氧化制备香兰素工艺优化[J].生物质化学工程,2009,43(3):34-36.
- [14]袁晋芳,郑维凡,曹立伟,等.烯丙基作为保护基团合成对烯丙基苯酚[J].中国医药工业,1989,20(11):518-519.
- [15]张红雨,陈德展.酚类抗氧化剂清除自由基活性的理论表征与应用[J].生物物理学报,2000,16(1):1-9.
- [16]赵宝路编著.氧自由基和天然抗氧化剂[M].北京:科学出版社,1999.
- [17]林碧芳.蟛蜞药活性成分分离及抑菌作用研究[D].福州:福建农林大学,2010.
- [18]姚永红,秦娇,张柏林,等.毛竹挥发油抑菌活性研究[J].食品工业科技,2010,31(1):71-73.

因本刊已被《中国知网》

(包括“中国知网”优先数字出版库)

独家全文收录,所以所付稿酬中

已包含该网站及光盘应付的稿酬。