

循环超声法提取万寿菊中叶黄素的研究

王静钰, 程小波, 刘丽娟, 李 赫, 陈 敏*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 研究了循环超声技术在万寿菊中叶黄素提取中的应用。实验以万寿菊发酵造粒为原料, 对比了不同提取溶剂的提取效果; 实验还采用正交试验研究了料液比、超声波功率、超声作用时间对提取率的影响; 比较了超声提取与静态溶剂提取法的提取效果。结果显示, 最佳提取溶剂为丙酮: 石油醚=1:1 (V/V); 较理想的提取条件为料液比 1:70、超声作用时间为 20min、超声功率为 800W; 在此条件下超声循环提取法的提取率为 98%, 而溶剂静态浸提法仅为 42%。

关键词: 万寿菊; 叶黄素; 循环超声提取

Study on Ultrasonic and Circulated Extraction of Xanthophyll from Marigold Flower (*Tagetes erecta* L.)

WANG Jing-yu, CHENG Xiao-bo, LIU Li-juan, LI He, CHEN Min*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The use of ultrasonic and circulated process was investigated for extraction of xanthophyll from marigold flower. The technical factors of the xanthophylls extraction from marigold flower were researched. The influence of the following factors on the ultrasonic and circulated extraction yield was discussed: selection of solvent, extraction period, ultrasonic power and the ratio between material and solvent. The results showed that 98% of xanthophyll contents could be achieved when optimal ultrasonic and circulated extraction conditions were 1:70 for ratio of material to liquid, 20 min for ultrasonic time and 800 W for ultrasonic power. Compared with ultrasonic and circulated extraction, the normal quiescent solvent extraction could only achieve 42% of xanthophyll contents.

Key words marigold flower; xanthophylls; ultrasonic and circulated extraction

中图分类号: 0658

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0124-05

万寿菊(Marigold, 学名 *Tagetes erecta* L.) 属菊科一年生草本, 含有类胡萝卜素等生物活性成分, 各种类胡萝卜素万寿菊干花含量为 0.6%~20%, 其中叶黄素酯约占总类胡萝卜素的 88%~92%^[1-2]。Philip 和 Berry 报道万寿菊花中叶黄素占类胡萝卜素的 85%, 在常见类胡萝卜素来源植物中浓度是最高的^[3-4]。

现代医学研究结果表明, 人眼视网膜黄斑色素由叶黄素(xanthophyll)组成, 它能吸收对视网膜有损害作用的蓝光, 同时能阻止自由基对生物膜的侵害具有特定的抗氧化作用^[5]。叶黄素还有降低患老年性黄斑衰退症(age-related macular degeneration, AMD) 的可能性^[6-9]。

从万寿菊中提取叶黄素的工艺已有报道, 主要是关于有机溶剂的提取方法, 例如溶剂萃取法^[10]、超临界流体萃取法^[11-12]、普通超声波辅助法^[3]等。

超声波提取是目前国内外正在研究开发的一种辅助

溶剂提取技术, 它的优点是提取速度快、效率高、溶剂用量少等。采用超声波法从植物中提取天然活性物质, 在提取过程中将细胞破碎使被提取物能够快速、高效地进入提取介质, 缩短提取时间, 增加提取效率。而没有超声辅助的普通静态溶剂提取法的主要问题是提取时间长, 溶剂用量大, 在研究中为了了解万寿菊中自然存在及加工中每种类胡萝卜素对应的真实含量, 必须要有较高的提取率来保证后续研究的准确性, 所以静态溶剂提取法经常要多次更新溶剂和多次离心以获得较高的提取效率, 而循环超声提取法的优点是不仅节约溶剂用量而且大大降低了提取时间, 提高了提取效率, 同时降低了后续浓缩而造成类胡萝卜素降解的可能性。

本研究的目的是采用循环超声技术, 用石油醚和丙酮混和溶剂从万寿菊造粒中提取叶黄素, 探讨循环超声提取的理想工艺参数。

收稿日期: 2007-07-25

作者简介: 王静钰(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: dolphin1312@163.com

* 通讯作者: 陈敏(1956-), 教授, 硕士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: minc19@163.com

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

万寿菊颗粒 青岛赛特香料有限公司。

石油醚(沸程 60~90℃)、丙酮、正己烷、二氯甲烷、无水乙醇、二叔丁基羟基甲苯(BHT),均为分析纯 北京化工厂;甲醇、乙腈为进口分装,色谱纯 Dikma 公司。其中色谱用二氯甲烷、正己烷在实验室做了蒸馏纯化。

1.2 仪器与设备

UV1901 紫外双光束分光光度计 北京普析通用公司;旋转蒸发仪 RE-52 上海亚荣生化仪器厂;SHB-3 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;TDL-5-A 型低速台式大容量离心机 上海安亭科学仪器厂;AR1530 电子精密天平 上海奥豪斯公司;LD-02 二两装高速中药粉碎机 中国浙江温岭市大海药材机械厂;250H 超声波清洗器(800W) 上海科导超声仪器有限公司;HF-2.0B 型循环超声提取机 北京弘祥隆生物技术开发有限公司;高效液相色谱仪 SPD-M10AVP 日本岛津公司;色谱柱为 Diamonsil™-C₁₈(4.6×250mm, 5μm) Dikma 公司。

1.3 方法

1.3.1 紫外分光光度法测定波长的选择

先将万寿菊颗粒粉碎,准确称取万寿菊粉 1.000g,置于烧杯中,在室温下,用丙酮和石油醚为混合溶剂,浸泡 10min,将提取液倾入分液漏斗中,分次加入少量蒸馏水洗去水溶性杂质,用旋转蒸发仪,在 35℃ 下真空浓缩含类胡萝卜素的石油醚层,用适当的石油醚溶解。用紫外-可见分光光度计对样品进行扫描,确定分光光度法测定的最佳吸收波长。

1.3.2 超声辅助提取单因素试验

由于循环超声仪器设备较大,所以本试验先采用普通超声条件考察各因素对提取的影响。

1.3.2.1 提取溶剂的影响

选用不同比例的丙酮与石油醚、不同比例的水乙醇与石油醚、不同比例的丙酮与正己烷混合溶剂为提取溶剂,按 1.3.1 步骤在超声条件下提取 10min,提取温度为室温 19℃,料液比为 1:60,提取 1 次并测定吸光度。

1.3.2.2 不同料液比的影响

按 1.3.1 步骤,在料液比为 1:30、1:40、1:50、1:70、1:80、1:100 下以 1.3.2.1 选取的最佳提取溶剂,在室温 19℃ 下超声提取 10min,提取 1 次,均稀释到同样容积,测定吸光度进行比较。

1.3.2.3 不同提取时间的影响

按 1.3.1 步骤,提取的时间分别为 5、10、15、20、30min,以 1.3.2.1 选取的最佳提取溶剂,料液比为 1:50,在室温 19℃ 下超声提取 1 次,均稀释到同样容积,测定吸光度进行比较。

1.3.3 万寿菊类胡萝卜素的循环超声提取正交试验

本试验采用 HF-2.5B 型循环超声提取机,循环超声提取方法,通过正交试验来优化提取条件。通过上述的单因素试验,选择在超声提取过程中影响较大的料液比、提取时间、超声功率三个因素。按 1.3.1 步骤和选定水平,进行提取测定吸光度进行比较。参数设定为:功率转速 1000r/min,超声波工作 4s、间隔 0.5s。

1.3.4 静态溶剂提取

称取万寿菊粉 30g,置于烧杯中,在室温下,用丙酮和石油醚为混合溶剂 2100ml,浸泡 15min,按 1.3.1 步骤,提取 1 次,稀释测定吸光度;把上述提取液离心,残渣取出,按第一次步骤重复,合并 2 次提取液,为 2 次提取,稀释测定吸光度;再将上述提取液离心,残渣取出,按以上步骤重复,合并 3 次提取液,进行 3 次提取,稀释测定吸光度。三次均稀释到同样容积,并与循环超声提取的稀释倍数保持一致。

1.3.5 高效液相色谱分析

检测器:二极管阵列检测器(PAD),色谱柱:Diamonsil™ 反相 ODS-C₁₈(250mm×4.6mm; 5μm) 色谱柱,迪马公司;流动相:甲醇-乙腈-二氯甲烷-正己烷(20:45:20:15, V/V);柱温 25℃,流速 1.0ml/min,等度洗脱,444nm 波长检测。

2 结果与分析

2.1 紫外分光光度法测定波长的选择

通过光谱扫描来确定总类胡萝卜素的最大吸收波长,

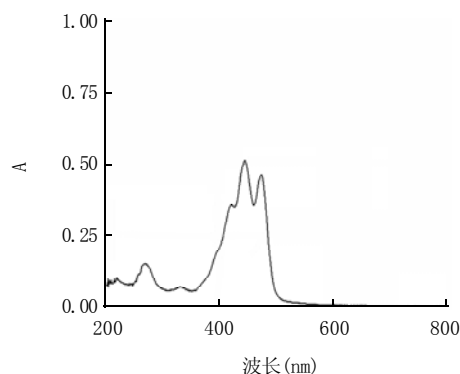


图1 叶黄素在石油醚中的可见光光谱图
Fig.1 Visible spectrum of xanthophyll in petroleum aether

表1 不同提取溶剂提取样品时的比较
Table 1 Comparison of extraction with different solvents

提取试剂	丙酮:石油醚 1:2	丙酮:石油醚 1:1	丙酮:石油醚 2:1	乙醇:石油醚 1:2	乙醇:石油醚 1:1	乙醇:石油醚 2:1	丙酮:正己烷 1:2	丙酮:正己烷 1:1	丙酮:正己烷 2:1
A_{440nm}	0.410	0.479	0.390	0.370	0.298	0.213	0.391	0.386	0.393

见图1。从图中可以看出以石油醚(沸点: 60~90℃)为溶剂时, 最大吸收波长为 444 nm。

2.2 超声循环提取方法各因素的确定

2.2.1 提取溶剂的影响

根据以往发表的文献, 提取溶剂主要有二氯甲烷、苯、乙醚、丙酮、石油醚、正己烷或四氯化碳等有机溶剂提取^[13]。万寿菊中各类胡萝卜素酯的种类较多, 且极性差别较大, 是一类复杂的混合物, 因此对于不同结构的类胡萝卜素要使用不同的溶剂进行萃取, 如极性较大的含氧类胡萝卜素主要使用极性强的有机试剂(丙酮等), 极性小的类胡萝卜素主要使用极性弱的有机试剂(石油醚等)。所以类胡萝卜素的提取常用混合提取, 万寿菊中叶黄素的提取常用的混和溶剂有正己烷、丙酮、甲醇^[14], 石油醚、乙醇混合溶剂^[15]。考虑溶剂的安全性和成本, 本实验采用了以上几种混和溶剂作为提取溶剂。从上表1可以看出, 乙醇和石油醚做混合溶剂时只有在石油醚的比例较高时提取的效果较好, 而丙酮和正己烷做混合溶剂时只有在丙酮的比例较高时提取的效果较好, 而且差别不明显。相比之下, 石油醚和丙酮混合溶剂做提取液, 特别是丙酮:石油醚=1:1时, 提取效果最佳, 所以下面研究选择丙酮:石油醚=1:1为提取溶剂。

2.2.2 不同料液比的影响

按照 1.3.2.2 提取, 不同料液比的影响结果见图2。

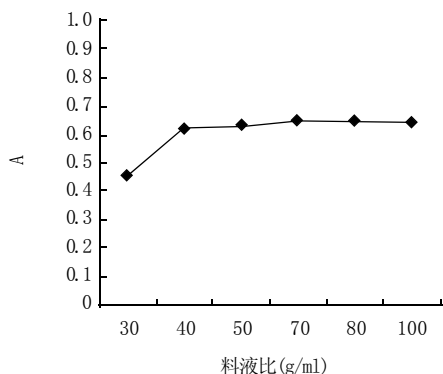


图2 料液比对提取效果的影响

Fig.2 Effects of solid-liquid ratio on extraction

由图2可以看出, 当液固比大于40时, 随着溶剂量的增加, 提取效果增加不明显。说明当料液比为1:40

时, 类胡萝卜素与提取溶剂之间基本达到了溶解平衡, 所以即使继续增加溶剂量, 提取率不会有明显增大。

2.2.3 不同提取时间的影响

按照 2.2.1 选取的最佳提取溶剂, 料液比 1:50, 以不同提取时间提取, 影响结果见图3。

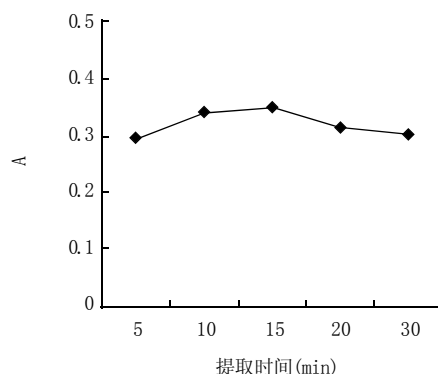


图3 浸提时间对提取效果的影响

Fig.3 Effects of time on extraction

由图3可以看出, 当提取时间较短时, 类胡萝卜素与提取溶剂之间还未达到溶解平衡, 所以吸光度较小; 当提取时间较长时, 由于叶黄素对热不稳定^[16], 超声产生的热量对叶黄素具有一定的破坏作用, 所以超过一定的提取时间, 吸光度反而稍有下降。当提取时间为15 min时, 吸光度最大, 提取效果最好。

2.3 万寿菊类胡萝卜素提取正交试验结果

在以上单因子试验的基础上, 以石油醚-丙酮(1:1, V:V)为提取溶剂, 对循环超声提取的三个参数: 即提取时间、液料比及超声功率进行四因素三水平进行正交试验, 正交试验结果见表2。

表2 正交试验设计表
Table 2 Table of orthogonal test design

水平	因素		
	A时间 (min)	B料液比 (g/ml)	C 功率 (W)
1	10	1:70	400
2	15	1:80	600
3	20	1:100	800

在单因素试验的基础上的正交试验中, 由于本试验操作时当液固比小于60时, 循环超声仪器的循环泵无法完全带动物料, 产生物料沉积, 堵塞循环管道, 不能

达到循环超声的目的, 所以本试验根据仪器特性采用大于60的三个水平的液固比。实际超声时, 由于超声波发生器随着工作时间的延长, 产生热量温度升高, 并且发生器位于提取溶剂中, 会造成溶剂挥发, 影响提取, 所以提取时间选择在15min左右, 使试验过程中的溶剂挥发减少。

表3 正交提取试验结果
Table 3 Results of orthogonal test

试验序号	A时间(min)	B料液比(g/ml)	C功率(W)	空白	吸光度
1	1	1	1	1	0.556
2	1	2	2	2	0.376
3	1	3	3	3	0.277
4	2	1	2	3	0.681
5	2	2	3	1	0.512
6	2	3	1	2	0.383
7	3	1	3	2	0.719
8	3	2	1	3	0.563
9	3	3	2	1	0.496
I	0.403	0.652	0.501	0.521	
II	0.525	0.484	0.518	0.493	
III	0.593	0.385	0.503	0.507	
R	0.190	0.267	0.017	0.028	

表4 方差分析表
Table 4 Variance analysis

变异来源	SS	df	F	Fa	显著性
A 时间	0.055	2	55.00	$F_{0.05}(2, 2)=19.00$	*
B 料液比	0.109	2	109.00	$F_{0.01}(2, 2)=99.00$	**
C 功率	0.001	2	1.00		
误差	0.001	2			

由表3、4可知, 料液比的影响达到了极显著水平, 提取时间的影响也达到了显著水平, 各个因素的影响顺序应是料液比B > 提取时间A > 超声功率C, 较佳组合为A₃B₁C₃, 即以1:70的料液比、提取时间为20min、超声功率为800W时, 可以得到较好的提取效果。

2.4 循环超声提取法与静态溶剂提取法的比较

2.4.1 提取率的比较

表5 循环超声提取法与静态溶剂提取法的比较

Table 5 Comparison of ultrasonic and circulated extraction with static solvent extraction

提取方法	静态溶剂提取法			循环超声提取法
提取次数	1	2	3	1
提取率(%)	42	65	82	98

由表5可见, 利用循环超声提取法提高了万寿菊中叶黄素的提取效率, 而静态溶剂提取法的最高提取率只达到了82%, 并且要经过3次提取, 循环超声提取法的一次提取效率可达98%, 明显高于静态溶剂提取法。

2.4.2 高效液相色谱的比较

将按照1.3.4处理样品的2次提取液和A₃B₁C₃条件循环超声处理样品的提取液进行高效液相色谱测定, 可以得出循环超声提取法与静态溶剂提取法对所提取出的物质的结果一致, 即两种提取法所提取出的物质基本相同, 循环超声法没有造成主要成分的降解。

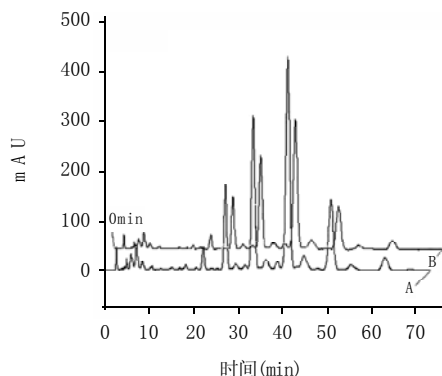


图4 循环超声提取法与静态溶剂法提取高效液相色谱图的比较
Fig.4 Chromatogram of ultrasonic and circulated extraction with static solvent extraction

由图4可以看出, 超声提取法A与静态提取法B中类胡萝卜素的种类和组成比例基本一致。通过色谱峰面积的大小比较, 两次静态提取法得到的B的各组分峰面积仅为超声提取法A的65%左右。

3 结论

目前提取植物中叶黄素的常规方法是直接用有机溶剂进行提取, 但由于植物细胞内叶黄素不太容易直接释放进入有机溶剂, 提取效率低。采用超声波则可大大提高提取效率。本研究结果显示, 提取溶剂为丙酮: 石油醚=1:1(V/V), 在超声波功率800W、超声波作用时间为20min, 料液比1:70时, 可以得到较好的提取效果。将该方法验证示范用于产业化生产, 对于充分利用万寿菊资源, 降低生产成本, 提高产品产量具有重要的意义。由此可见, 超声波强化提取技术可作为天然活性物质提取和开发利用的优选技术, 具有广阔的利用价值和应用前景。

参考文献:

- [1] HADDEN W L, WATKINS R H, LEVY L W, et al. Carotenoids in marigold flower extract[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(10): 4189-4193.
- [2] 胡晓丹, 谢笔钧. 金盏菊类胡萝卜素的提取及性质研究[J]. 食品科技, 2001(3): 35-37.
- [3] 李大婧, 刘春泉, 王振宇. 超声波法提取万寿菊花中叶黄素的工艺条件优化[J]. 江苏农业学报, 2005, 21(4): 374-377.
- [4] 李大婧, 刘春泉. 万寿菊叶黄素的提取及分析方法研究进展[J]. 食

- 品科学, 2005, 26(9): 582-586.
- [5] CHEW B P, PARK J S. Carotenoid action on the immune response[J]. Journal of Nutrition, 2004, 134(1): 257-261.
- [6] BRUNO R S, MEDEIROS D M. Lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration[J]. Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods, 2002, 3(1): 79-85.
- [7] KRINSKY N I, LANDRUM J T, BONE R A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye[J]. Annual Review of Nutrition, 2003, 23: 171-201.
- [8] KRINSKY N I. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls[J]. Journal of Nutrition, 2002, 132(3): 540-542.
- [9] MARES-PERTMAN J A, MILLEN A E, FIECK T L, et al. Body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic diseases[J]. Journal of Nutrition, 2002, 132(3): 518-524.
- [10] 李高阳, 单杨. 柑桔类胡萝卜素的研究概况[J]. 湖南农业科学, 2004(4): 60-61.
- [11] 黄文, 谢笔钧. 白果中类胡萝卜素的分析与鉴定[J]. 营养学报, 2003, 25(3): 324-326.
- [12] 陈效忠, 李守君. 枸杞中提取色素工艺条件的探讨[J]. 黑龙江医药科学, 2005, 28(3): 22-23.
- [13] 李大婧, 刘荣, 方桂珍. 超临界CO₂萃取物玉米黄色素着色分和脂肪酸成分的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 62-65.
- [14] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 32-34; 73-77; 90-91.
- [15] 盛爱武, 陈翠云, 谢应毅, 等. 万寿菊色素浸提方法及其性质的初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2001, 14(4): 38-41.
- [16] 牛桂玲, 朱海滨. 万寿菊叶黄素的提取及稳定性研究[J]. 承德石油高等专科学校学报, 2005, 7(4): 15-18.