

# 超声波辅助双水相提取条斑紫菜黄酮类物质及其抗氧化活性研究

陈利梅

(聊城大学农学院食品科学与工程系, 山东 聊城 252059)

**摘要:** 利用超声波辅助丙醇-硫酸铵双水相体系提取紫菜中总黄酮, 并优化提取条件, 测定总黄酮提取物对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )的抑制活性。结果表明: 本方法可有效地从紫菜中提取总黄酮, 紫菜总黄酮提取率为0.148%, 明显高于乙醇-水回流提取法。最优提取条件为醇水比为0.6、硫酸铵质量浓度0.30g/mL、超声时间20min、料液比0.04。紫菜中含有较丰富的黄酮类物质, 提取物对 $\cdot\text{OH}$ 具有良好的抑制作用, 是一种有效的天然自由基清除剂, 具有很大的开发利用前景。

**关键词:** 超声波辅助双水相分离; 紫菜; 总黄酮; 抗氧化活性

## Ultrasonic-Assisted Aqueous Two-Phase Extraction and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Porphyra yezoensis*

CHEN Li-mei

(Department of Food Science and Engineering, College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**Abstract:** An ultrasonic-assisted aqueous two phase extraction method was presented for extracting total flavonoids from *Porphyra yezoensis* and the extraction conditions were optimized by an orthogonal array experimental design. Meanwhile, the hydroxyl free radical scavenging activity of total flavonoids from *Porphyra yezoensis* was determined. The results indicated that the method allowed effective extraction of total flavonoids. The extraction yield was 0.148%, which was significantly higher than that obtained by ethanol-water reflux extraction. The optimal extraction conditions were obtained as follows: n-propanol-to-water ratio 0.6, ammonium sulphate concentration 0.30 g/mL, ultrasonic treatment time 20 min and material-to-liquid ratio 0.04. *P. yezoensis* abundantly contained flavonoids and the total flavonoid extract from it had excellent hydroxyl free radical scavenging activity thus providing a good natural free radical scavenger.

**Key words:** ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction; *Porphyra yezoensis*; flavonoids; antioxidant activity

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0041-06

紫菜为红藻门(Rhodophyta), 红毛菜科(Bangiaceae)紫菜属中叶状藻体可食的种群, 是最重要的经济藻类之一<sup>[1]</sup>。在中国大陆被大规模栽培的紫菜有坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)和条斑紫菜(*P. yezoensis*)。其中条斑紫菜(*P. yezoensis*)为北太平洋西部特有的种类, 主要分布于我国黄海、渤海和东海北部沿岸以及日本列岛和朝鲜半岛沿岸, 是我国北方主要的紫菜栽培品种, 也是日本和韩国的主要栽培品种<sup>[2]</sup>。条斑紫菜是一种高蛋白、低脂肪含量的高营养海藻<sup>[3-7]</sup>, 具有较高的药用价值, 可以用于治疗甲状腺肿、高血压、支气管炎、喉炎、水肿、麻疹等<sup>[8]</sup>。最近几年人们对紫菜的多糖

和蛋白质开展了广泛的研究<sup>[9-11]</sup>, 但是对其黄酮的研究较少。

黄酮类化合物(flavonoids)是植物经光合作用产生的一大类化合物, 又称生物类黄酮, 是指具有2-苯基色原酮结构的一类化合物的总称, 是多酚类化合物中最大的一个亚类。黄酮类化合物是人体必需营养素, 人体不能合成, 只能从食物中摄取, 是一类不可或缺的调节机体生理功能的重要物质。研究表明, 黄酮类化合物具有抗癌、抗病毒、消炎、抗过敏、抑制糖尿病并发症等作用, 同时还具有清除自由基, 抗衰老, 增加机体免疫力的生理活性<sup>[12-13]</sup>。

收稿日期: 2011-01-08

基金项目: 聊城大学科研基金项目(x09020)

作者简介: 陈利梅(1977—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事天然产物提取及其性质研究。E-mail: chenlimei@lcu.edu.cn

双水相萃取(aqueous two-phase extraction, ATPE)技术始于20世纪60年代,因该方法分离条件温和、过程易放大、生物亲和性好等优点被广泛应用。低级醇-盐双水相水体系<sup>[14-16]</sup>克服了传统聚合物-盐双水相中因使用黏度较大的聚合物而出现的成本高、相分离时间长、易乳化、后续处理困难等不足,具有提取时间短,反应条件温和,溶剂易回收等众多优点,该技术已被应用于天然产物的提取。而超声波技术用于辅助低级醇-盐双水相提取技术可以有效提高分离效率。

本实验将超声波辅助和丙醇-硫酸铵双水相分离集成用于提取紫菜中总黄酮,确定了其最佳工艺条件,同时对提取液进行了羟自由基清除作用的研究。本研究为紫菜的开发利用和发展先进提取分离技术提供了有益的启示。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜条斑紫菜由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供。

正丙醇 天津市福晨化学仪器厂;石油醚、无水乙醇、氢氧化钠 天津市大茂化学试剂厂;水杨酸、硫酸亚铁 天津市化学试剂一厂;硫酸铵 河南焦作市化工三厂;硝酸铝 上海振欣试剂厂;亚硝酸钠 天津市塘沽区德华化学试剂厂;芦丁 美国Sigma公司。以上药品均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

旋转蒸发器 RE52cs 上海亚荣生化仪器厂;HH-8 恒温水浴锅 金坛市新航仪器厂;SHB-IV 双A循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;KQ5200DB 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;UV-1800 紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;TGL-16G 台式高速离心机 上海安亭科学仪器厂;FD-1A-50 冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 丙醇-硫酸铵双水相相图的绘制

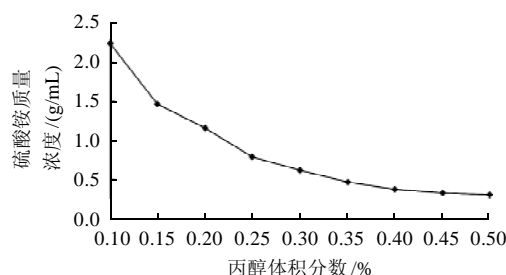


图1 丙醇-硫酸铵双水相相图

Fig.1 Relationship between ammonium sulphate concentration and initial *n*-propanol volume for phase equilibrium

取小锥形瓶,加入总体积10mL的一定比例的正丙醇和蒸馏水混合液,振摇使其形成均一溶液,然后缓慢加入硫酸铵固体,边加边振荡锥形瓶,使硫酸铵固体溶解,溶液为无色透明液体,直至产生分相为止<sup>[17]</sup>。分相平衡时,所需的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量与丙醇初始体积的关系如图1。

从图1可知,丙醇初始体积与盐水相初始体积之比即醇-水比不同,分相所需的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 不同,醇-水比越大,所需的硫酸铵就越少。丙醇能与水无限互溶,但在丙醇-水体系中加入某种析相盐时可形成双水相,常用的析相盐主要有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaAc}$ 或 $\text{NaCl}$ 等。本实验选择 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为析相盐,其优点是价格便宜,室温溶解度高,温度效应低。

#### 1.3.2 总黄酮含量的测定

参考文献[18]方法绘制芦丁标准曲线。

对照品溶液的制备:准确称取芦丁对照品0.0060g,用体积分数30%乙醇溶液将芦丁溶解,定容到100mL容量瓶中,摇匀。

标准曲线的绘制:准确吸取0.06mg/mL芦丁对照品溶液0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0mL,分别置于25mL容量瓶中,各加质量分数5%  $\text{NaNO}_2$ 溶液1.0mL,混匀,放置6min;加质量分数10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液1.0mL,混匀,放置6min;加质量分数4%  $\text{NaOH}$ 溶液10mL,再加30%乙醇溶液至刻度,摇匀,放置15min。按照分光光度法在510nm波长处,以试剂空白作参比测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标、芦丁质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线。

根据测定的不同质量浓度芦丁对照品溶液的吸光度,绘制出芦丁标准曲线图,测量数据及曲线图如图2。用最小二乘法经线性回归,得回归方程: $A=0.059x-0.0558$ ,相关系数 $R^2=0.999$ ,表明在2.4~19.2mg/L范围内,芦丁质量浓度与吸光度有良好的线性关系。

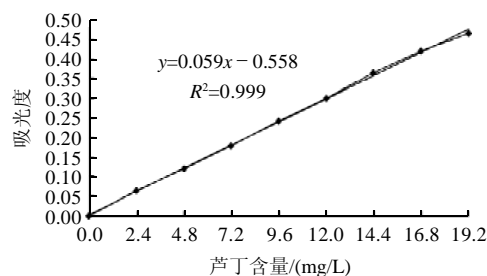


图2 芦丁标准曲线图

Fig.2 Rutin standard curve

提取物中黄酮含量以总黄酮计算,以芦丁为标准,参照绘制芦丁标准曲线的方法,在总黄酮提取液中加入

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液, 使黄酮化合物与铝盐形成稳定的有色络合物, 在波长 510nm 处测定吸光度, 用标准曲线法计算总黄酮含量。准确吸取上层提取液 2.0mL, 分别置于 25mL 容量瓶中, 对照组加入蒸馏水 2.0mL, 依次各加质量分数 5% 的  $\text{NaNO}_2$  溶液 1.0mL, 混匀, 放置 6min; 加质量分数 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 1.0mL, 混匀, 放置 6min; 加质量分数 4%  $\text{NaOH}$  溶液 10mL, 再加 30% 乙醇溶液至刻度, 摇匀, 放置 15min。按照分光光度法在 510nm 波长处, 以试剂空白作参比测定吸光度。

### 1.3.3 黄酮提取工艺的优化

取新鲜的条斑紫菜冷冻至  $-40^\circ\text{C}$  过夜, 取出冻好样品置于冷冻干燥机中冷冻干燥。将干燥的条斑紫菜置于植物粉碎机中, 粉碎至 120 目备用。

#### 1.3.3.1 醇-水比对提取的影响

准确称取紫菜粉 4 份, 各 1.0g, 置于 50mL 锥形瓶中, 分别加入 10mL 石油醚, 用超声波辅助提取 20min 以除去脂溶性成分、过滤, 滤渣室温挥发干燥除去残存的石油醚。

取双水相总体积为 30mL, 加入硫酸铵 10.5g, 分别取醇-水比为 0.4、0.5、0.6、0.7, 形成稳定的双水相体系, 加入紫菜粉, 超声辅助提取 30min, 抽滤除去紫菜渣, 滤液与分液漏斗中静置分层, 上层液含有总黄酮, 上层丙醇相清液以 30% 乙醇溶液定容, 此溶液为总黄酮提取液, 减压蒸馏至近干, 真空冷冻干燥, 测定总黄酮含量, 按照下式计算总黄酮得率。

$$\text{提取率}/\% = \frac{\text{总黄酮质量}}{\text{样品质量}} \times 100$$

#### 1.3.3.2 硫酸铵质量浓度对提取的影响

准确称取紫菜粉 4 份, 各 1.0g, 置于 50mL 锥形瓶中, 分别加入 10mL 石油醚, 用超声波辅助提取 20min 以除去脂溶性成分, 过滤, 滤渣室温挥发干燥除去残存的石油醚。

设定双水相总体积为 30mL, 选择醇水比为 0.6 的比例, 加入正丙醇 11.25mL、蒸馏水 18.75mL, 分别加入硫酸铵 7.5、9.0、10.5、12.0g, 形成稳定的双水相体系, 加入紫菜粉, 超声辅助提取 30min, 抽滤除去紫菜渣, 滤液与分液漏斗中静置分层, 取上层清液, 总黄酮含量测定参照 1.3.2 节方法。

#### 1.3.3.3 超声萃取时间对提取的影响

准确称取紫菜粉 4 份, 各 0.5g, 置于 50mL 锥形瓶中, 分别加入 10mL 石油醚, 用超声波辅助提取 20min 以除去脂溶性成分, 过滤, 滤渣室温挥发干燥除去残存的石油醚。

设定双水相总体积为 15mL, 加入水 9.375mL, 正

丙醇 5.625mL, 加入硫酸铵 4.5g, 形成稳定的双水相体系, 加入紫菜粉, 分别超声辅助提取 20、30、40、50min, 抽滤除去紫菜渣, 滤液于分液漏斗中静置分层, 取上层清液, 总黄酮含量测定参照 1.3.2 节方法。

#### 1.3.3.4 料液比对提取的影响

准确称取紫菜粉 4 份, 各 0.4、0.5、0.6、0.7g, 置于 50mL 锥形瓶中, 分别加入 10mL 石油醚, 用超声波辅助提取 20min 以除去脂溶性成分, 过滤, 滤渣室温挥发干燥除去残存的石油醚。

设定双水相总体积为 15mL, 加入水 9.375mL, 正丙醇 5.625mL, 加入硫酸铵 4.5g, 即醇水比为 0.6, 硫酸铵质量浓度为 0.3g/mL, 料液比分别为 0.027、0.033、0.040、0.047 形成稳定的双水相体系, 加入紫菜粉, 分别超声辅助提取 30min, 抽滤除去紫菜渣, 滤液于分液漏斗中静置分层, 取上层清液, 总黄酮含量测定参照 1.3.2 节方法。

#### 1.3.3.5 正交试验确定最佳提取水平

表 1 正交试验因素水平表  
Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	因素			
	A 醇-水比	B 硫酸铵质量浓度/(g/mL)	C 超声时间/min	D 料液比(g/mL)
1	0.5	0.25	20	0.033
2	0.6	0.30	30	0.040
3	0.7	0.35	40	0.047

为了对超声提取工艺进行深入研究, 选择醇-水比、硫酸铵质量浓度、超声时间、料液比四因素进行  $L_9(3^4)$  正交试验, 正交试验因素水平见表 1。以提取液吸光度为考察指标, 研究各因素对提取率的影响, 从而确定最佳的提取工艺条件。

#### 1.3.4 乙醇-水回流法提取紫菜黄酮

准确称取 1.0g 干紫菜粉, 用脱脂滤纸包好, 置于索氏抽提器中, 先用石油醚于  $90^\circ\text{C}$  水浴回流脱去脂溶性色素等, 直到石油醚层无色为止, 弃去石油醚层, 待石油醚挥干后, 按料液比(g/mL)1:40 的比例用 70% 乙醇溶液于  $80^\circ\text{C}$  水浴中连续提取 2h。同样的方法提取 2 次, 合并 2 次提取液。并用 70% 乙醇溶液洗涤样品粉末 2~3 次, 将洗液过滤, 将提取液和洗液合并, 测量其体积, 再用旋转蒸发器浓缩提取液, 回收乙醇。用 30% 乙醇溶液定容在 100mL 容量瓶中, 准确吸取试液 4.0mL, 分别置于 25mL 容量瓶中, 对照组加入蒸馏水 4.0mL, 各加质量分数 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 1.0mL, 混匀, 放置 6min; 加质量分数

10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 1.0mL, 混匀, 放置 6min; 加质量分数 4%  $\text{NaOH}$  溶液 10mL, 再加 30% 乙醇溶液至刻度, 摇匀, 放置 15min。按照分光光度法在 510nm 波长处, 以试剂空白作参比测定吸光度。

总黄酮含量  $/(mg/L) = \text{稀释倍数} \times C$

式中:  $C$  为测定样品液中芦丁的含量。

### 1.3.5 黄酮提取液抗氧化活性的测定<sup>[19-20]</sup>

总黄酮对  $\cdot\text{OH}$  的清除率的测定, 利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  对  $\text{Fe}^{2+}$  混合产生  $\cdot\text{OH}$ , 在体系内加入水杨酸捕捉  $\cdot\text{OH}$  并产生有色物质, 该物质在 510nm 波长处有最大吸收。反应体系中含有 8.8mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  2mL、9mmol/L  $\text{FeSO}_4$  2mL、9mmol/L 水杨酸 - 乙醇 2mL。不同质量浓度的紫菜总黄酮溶液 2mL, 最后加  $\text{H}_2\text{O}_2$  启动反应, 37℃ 反应 0.5h, 以蒸馏水为参比, 在 510nm 测量各质量浓度的吸光度, 考虑到本身的吸光度, 以 9mmol/L  $\text{FeSO}_4$  溶液 2mL, 水杨酸 - 乙醇 2mL, 不同质量浓度的紫菜黄酮溶液 2mL 为黄酮的本底吸收。

$\cdot\text{OH}$  清除率  $\% = [A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0 \times 100$

式中:  $A_0$  为空白对照液的吸光度;  $A_x$  为加入黄酮溶液后的吸光度;  $A_{x_0}$  为不加  $\text{H}_2\text{O}_2$  黄酮溶液本底的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 醇 - 水比对提取的影响

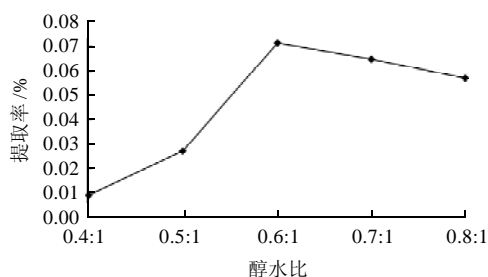


图3 醇水比对提取的影响

Fig.3 Effect of *n*-propanol-to-water ratio on the extraction yield of total flavonoids

由于盐析作用, 丙醇和水体系中加入一定量的硫酸铵后会出现醇相和含水盐相两相。由图 3 可知, 随着醇 - 水比的增加, 丙醇相体积增加, 总黄酮提取率逐渐增加, 在醇 - 水比为 0.6 时达到最大值, 超过 0.6 时, 更多的水从丙醇相中分离进入到硫酸铵相中, 这样导致总黄酮的提取率反而降低, 因此出现提取率随着醇 - 水比的增加呈递减趋势。

### 2.2 硫酸铵质量浓度对提取的影响

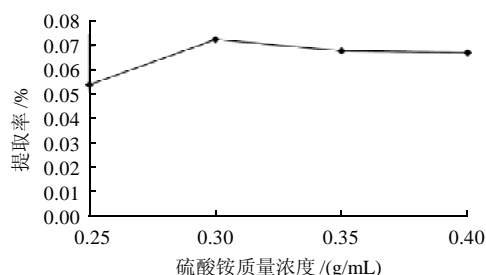


图4 硫酸铵质量浓度对提取的影响

Fig.4 Effect of ammonium sulphate concentration on the extraction yield of total flavonoids

因硫酸铵与丙醇争夺水分子, 随着硫酸铵含量的增加, 硫酸铵对水的束缚能力增强, 这样上相中的水会离开丙醇而进入硫酸铵相, 因此, 在成相范围内, 硫酸铵质量浓度越大, 上相丙醇质量浓度越大。由图 4 可知, 随着硫酸铵质量浓度的增大, 上相丙醇质量浓度增大, 上相极性随之降低, 因此总黄酮提取率逐渐增大, 在 0.30g/mL 时提取率达到最大值, 当硫酸铵质量浓度继续增加时, 大量水分离离开上相, 反而降低提取率, 因此出现随着硫酸铵质量浓度的增加提取率逐渐减小的现象。

### 2.3 超声萃取时间对提取的影响

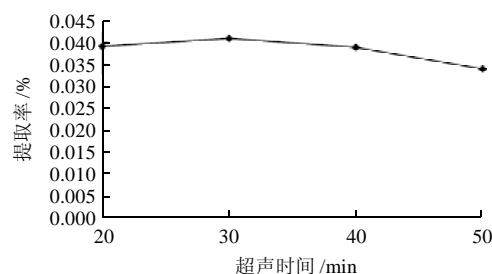


图5 超声时间对提取的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic treatment time on the extraction yield of total flavonoids

由图 5 可知, 采用超声波提取时, 随着超声时间的增加总黄酮得率增大, 超声时间在 20~40min 时总黄酮得率较大, 但当超声时间从 20min 增加到 30min 后, 总黄酮提取率仅增加 0.0018%, 且超声时间增加到 40min 的结果与超声 20min 处理时相差不大, 当超声时间超过 40min 后总黄酮得率开始减少, 可能是由于超声时间过长, 对样品中的总黄酮结构产生了破坏作用, 不利于总黄酮的提取。

### 2.4 料液比对提取结果的影响

由图 6 可知, 料液比在 0.033~0.040 之间时, 提取率增加较明显, 大于 0.040 时得率几乎不再增加, 料液

比增加导致溶剂用量增加,也给后续处理带来不必要的麻烦,因此,不宜选择较大的料液比浸提。

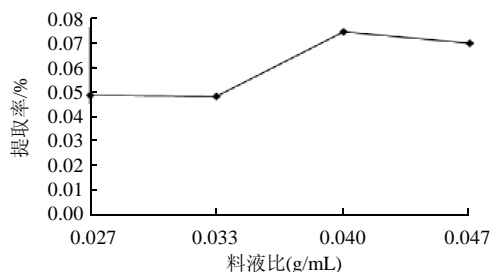


图6 料液比对提取率的影响

Fig.6 Effect of material-to-liquid ratio on the extraction yield of total flavonoids

## 2.5 正交试验优化提取条件

根据上述试验得到的提取条件用正交试验优化醇-水比、硫酸铵质量浓度、超声时间、料液比等提取条件,选取最佳处理与浸提条件,确定影响因素并设计正交试验。表2为正交试验结果,表3为正交试验方差分析结果。

表2 超声波辅助双水相提取紫菜黄酮类物质  
正交试验设计与结果

Table 2 Orthogonal array design and results

试验号	A	B	C	D	$A_{510nm}$		
1	1	1	1	1	0.300	0.293	0.292
2	1	2	2	2	0.362	0.370	0.378
3	1	3	3	3	0.240	0.256	0.252
4	2	1	2	3	0.399	0.396	0.390
5	2	2	3	1	0.350	0.343	0.354
6	2	3	1	2	0.480	0.486	0.484
7	3	1	3	2	0.333	0.336	0.340
8	3	2	1	3	0.591	0.594	0.595
9	3	3	2	1	0.358	0.343	0.350
$k_1$	0.3048	0.3421	0.4572	0.3314			
$k_2$	0.4091	0.4374	0.3718	0.3966			
$k_3$	0.4267	0.3610	0.3116	0.4126			
R	0.1219	0.0953	0.1456	0.0812			
因素顺序	$C > A > B > D$						

表3 正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis for the experimental results of orthogonal array design

方差来源	平方和	自由度	均方和	F值	P值
A	0.100	2	0.050	1573.285	$6.231879352652 \times 10^{-21}$
B	0.042	2	0.021	655.739	$1.528696043839 \times 10^{-17}$
C	0.096	2	0.048	1513.864	$8.794934762217 \times 10^{-21}$
D	0.050	2	0.025	784.474	$3.107334499588 \times 10^{-18}$
误差	0.001	2	$3.185 \times 10^{-5}$		

试验采用直观分析法,对各因素的 $k$ 及 $R$ (极差)值的大小进行有关的分析。根据正交试验结果分析,可得到如下结果:

极差 $R$ 由大到小的顺序是 $C > A > B > D$ ,极差值越大,反映该因素对指标值的影响越大,说明在萃取过程中影响紫菜总黄酮萃取的主要因素是超声时间,其次是醇-水比、硫酸铵质量浓度,最后为料液比。

从方差分析结果看出,醇-水比、超声时间、料液比、硫酸铵质量浓度对紫菜总黄酮提取率影响极显著,综合以上单因素试验、正交试验结果与分析,从实用性和节约能源等角度考虑,选择 $A_2B_2C_1D_2$ 为最佳方案工艺条件,即用丙醇-硫酸铵双水相体系提取紫菜总黄酮的最优提取条件为醇水比0.6、硫酸铵质量浓度0.30g/mL、超声时间20min、料液比0.04,在最佳提取工艺条件下进行验证实验,紫菜总黄酮提取率为0.148%,说明最佳提取工艺条件是可信的。

## 2.6 乙醇-水回流法提取紫菜黄酮

将本法与常规乙醇-水回流提取法进行比较研究,本法使用的是 $L_9(3^4)$ 试验得出的最佳提取条件,即醇水比0.6、硫酸铵质量浓度0.30g/mL、超声时间20min、料液比0.04,乙醇-水回流法的最优提取工艺为料液比(g/mL)1:40、乙醇体积分数70%、水浴温度80℃、提取时间2h、提取次数2次,再用旋转蒸发器浓缩提取液,用30%乙醇定容至100mL容量瓶中,获得总黄酮得提取液,测量其吸光度,得出提取率。

表4 不同提取方法的比较

Table 4 Comparison of different methods for extracting total flavonoids from *Porphyra yezoensis*

方法	提取时间/min	温度/℃	提取率/%
本实验方法	20	60	0.148
乙醇-水回流法	240	80	0.089

由表4可知,本法提取率为0.148%,乙醇-水回流法提取率0.089%,本法的得率高于乙醇-水回流法。

## 2.7 黄酮提取液抗氧化活性的测定

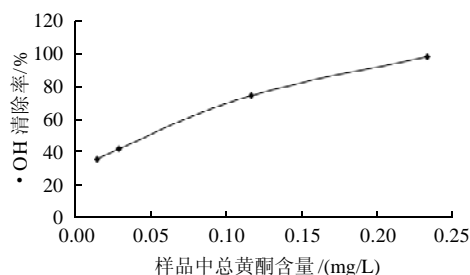


图7 紫菜总黄酮对·OH的清除作用

Fig.7 Concentration dependent scavenging activity of total flavonoids from *Porphyra yezoensis* against hydroxyl free radicals

总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率的测定,利用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对 $\text{Fe}^{2+}$ 混合产生 $\cdot\text{OH}$ ,在体系内加入水杨酸捕捉 $\cdot\text{OH}$ 并产生有色物质,该物质在510nm溶液有最大吸收。

从图7可以看出,紫菜总黄酮对 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系通过反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 具有清除作用,且紫菜总黄酮清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力随着浓度的增加而上升,即清除率与黄酮的用量存在着一定的量效关系,说明紫菜总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 具有一定的清除作用。

### 3 结 论

本研究利用超声集成丙醇-硫酸铵双水相体系对紫菜中总黄酮进行提取分离。结果表明,本方法可有效地从紫菜中提取总黄酮,紫菜总黄酮提取率为0.148%,明显高于乙醇-水回流提取法。最优提取条件是醇水比0.6、硫酸铵质量浓度0.30g/mL、超声时间20min、料液比0.04。实验表明紫菜中含有较丰富的黄酮类物质,提取物对 $\cdot\text{OH}$ 具有良好的抑制作用,是一种有效的天然自由基清除剂,具有很大的开发利用前景。但所提取的黄酮类物质的组份结构目前还不清楚,需要进一步的研究确定。

本研究将超声提取与双水相分离技术耦合集成,充分利用了超声波的高效提取及双水相体系的分离作用,有效缩短提取时间、提高得率,降低提取温度,在抗氧化等活性物质的提取分离领域具有良好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 张学成,秦松,马家海,等.海藻遗传学[M].北京:中国农业出版社,2005:184.
- [2] 张卫兵,许璞,王汉清,等.日韩两国紫菜产业分析及启示[J].中国食物与营养,2005,11(11):32-34.
- [3] 仲明,张锐.条斑紫菜不同采收期主要营养成分变化情况[J].中国饲料,2003(23):30-31.
- [4] FAO/WHO. Energy and protein requirements[S].
- [5] 吕雪娟.游离氨基酸含量对食品风味特征的影响[J].食品科学,1996,17(3):10-12.
- [6] AMINOT A, KEROUEL R. The determination of total dissolved free primary amines in seawater: Critical factors, optimized procedure and artifact correction[J]. Marine Chemistry, 2006, 98(2/4): 223-240.
- [7] KYOSUKE N, HIROFUMI F, TAKESHI Y. Changes of growth characteristics and free amino acid content of cultivated *Porphyra yezoensis* Ueda (*Bangiales rhodophyta*) blades with the progression of the number of harvests in a nori farm[J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(5): 687-693.
- [8] 高淑清,单保恩.条斑紫菜生物学作用的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2004,13(12):1661-1662.
- [9] YOSHIKAWA Y, ENOMOTO A, TODOH H, et al. Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine alga (*Porphyra yezoensis*)[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1993, 57(11): 1862-1866.
- [10] ZHANG Weiyun, CHEN Hao, WANG Shuijuan, et al. An acidic polysaccharide with xylose branches from *Porphyra yezoensis*[J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(3): 207-210.
- [11] SCHAEFFER D J, KRYLOV V S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2000, 45(3): 208-227.
- [12] BERET A, CAZENAVE J P. Plant flavonoids in biology and medicine [M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1988: 187-200.
- [13] ZHU Q Y, HUANG Y, CHEN Z Y. Interaction between flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol in human low density lipoprotein[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2000, 11(1): 14-21.
- [14] LIU Xiaohai, GAO Yuntao, TANG Runsheng, et al. On the extraction and separation of iodide complex of cadmium(II) in propyl-alcohol ammonium sulfate aqueous biphasic system[J]. Separation and Purification Technology, 2006, 50(2): 263-266.
- [15] 高云涛,吴立生.丙醇-硫酸铵-水液-液体系萃取分离铂、钨、铋和金[J].分析化学,2001,29(8):901-903.
- [16] 高云涛,戴云,李世月,等.灯盏花素在丙醇-硫酸铵双水相体系中的分配行为研究[J].云南民族大学学报:自然科学版,2010,19(2):106-115.
- [17] LI Q, ZHAO W, LIU G. Indirect determination of thiamazole with the n-propyl alcohol-ammonium sulfate- $\text{H}_2\text{O}$  system by the extraction-flotation of  $\text{CuSCN}$ [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2008, 63(8): 730-773.
- [18] 吴春霞,古丽巴哈尔·阿巴拜克力,阿不都拉·阿巴斯.2种菊科植物总黄酮的抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2008,34(2):108-112.
- [19] 莫开菊,柳圣,程超.生姜黄酮的抗氧化活性研究[J].食品科学,2006,27(9):110-115.
- [20] 程超,李伟,汪兴平.平菇水溶性多糖结构表征与体外抗氧化作用[J].食品科学,2005,26(8):55-57.