

超声协同双水相体系提取路边青总多酚工艺

欧阳玉祝^{1,2}, 张辞海², 薛 慧², 吴道宏²

(1. 林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000; 2. 吉首大学食品科学研究所, 湖南 吉首 416000)

摘 要: 采用超声协同乙醇-铵盐双水相体系提取路边青总多酚, 通过单因素和正交试验考查料液比、乙醇初始体积与水初始体积比、提取温度和提取时间对总多酚提取率的影响。结果表明: 最佳工艺为料液比 1:20(g/mL)、乙醇初始体积与水初始体积比 0.8、硫酸铵质量浓度 0.27g/mL、提取温度 60℃、超声提取时间 60min, 总多酚提取率为 3.04%。本法是一种提取效率高, 时间短, 能耗低, 不影响提取物活性的新工艺。

关键词: 双水相体系; 超声波; 路边青; 总多酚

Ultrasonic-assisted Two-phase Aqueous Extraction of Total Polyphenols from the Shoot of *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* F. Bolle

OUYANG Yu-zhu^{1,2}, ZHANG Ci-hai², XUE Hui², WU Dao-hong²

(1. Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Zhangjiajie 416000, China;

2. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: The shoot of *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* F. Bolle was ultrasonified in ethanol-ammonium salt two-phase aqueous system to accelerate the extraction of total polyphenols. Operating parameters such as solid-to-liquid ratio, volume ratio of initial ethanol to initial water, temperature and extraction time were optimized by one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods for maximizing the extraction yield of total polyphenols. Solid-to-liquid ratio of 1:20 (g/mL), volume ratio of initial ethanol to initial water of 0.8, ammonium sulfate concentration of 0.27g/mL, extraction temperature of 60 °C and extraction time of 60 min were found optimal. Under the optimal extraction conditions, the extraction yield of total polyphenols was 3.04%. This method can provide a novel approach for the extraction of total polyphenols with highly efficient, time-saving and energy-saving benefits and no impact on the biological activity of extracts.

Key words: two-phase aqueous system; ultrasonic; *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* F. Bolle; total polyphenols
中图分类号: TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)16-0089-04

路边青(*Herba gei*)的叶和茎中含有丰富的植物多酚和黄酮化合物, 具有清热解毒, 抗菌消炎, 活血解毒等功能^[1], 广泛用于医药、日用化工和食品添加剂领域。目前, 国内外对路边青的研究主要是药物的临床应用^[2-3], 化学成分分析^[4], 多酚和黄酮提取及其抗氧化性^[5-10]。超声波辅助提取是一种提取时间短, 提取效率高, 能耗低的新提取技术, 广泛用于天然产物活性物质的提取^[11-12]; 双水相体系是一种新型的分离技术^[13-17], 广泛应用于天然产物中生物活性物质的分离。本实验将超声辅助提取法与乙醇-硫酸铵双水相体系结合提取路边青总多酚, 探讨提取工艺条件。研究结果能为路边青的利用和天然食品添加剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

路边青于7月采自湖南衡山, 新鲜路边青采回后, 经洗净、去根、晾干、切碎后于60℃、0.1MPa真空干燥, 用植物粉碎机粉碎至30目左右备用。无水乙醇、硫酸铵、磷酸氢二钠、没食子酸、酒石酸钾钠、硫酸亚铁、磷酸二氢钾均为国产分析纯试剂。

UV-2450型紫外可见分光光度计 日本岛津公司; KQ-250E型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; SHB-III循环水式多用真空泵、DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器 郑州长城科工贸有限公司; FZ102型微型植物粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; JA2003N型

收稿日期: 2011-05-06

基金项目: 林产化工工程湖南省重点实验室开放基金资助项目(JDZ201107)

作者简介: 欧阳玉祝(1956—), 男, 教授, 硕士, 主要从事天然产品开发与功能食品研究。E-mail: ouyang1227@126.com

电子天平 上海精密仪器厂; 中量制备仪 天津玻璃厂。

1.2 方法

1.2.1 双水相体系的制备

乙醇-硫酸铵双水相体系按照文献[16-17]制备。在无水乙醇中加入一定量的硫酸铵水溶液, 利用硫酸铵的盐析作用形成双水相体系, 通过改变乙醇与水的比例和硫酸铵的用量控制双水相体系的形成。本实验选择双水相体系的乙醇初始体积与水初始体积比为0.67(醇水比), 硫酸铵质量浓度0.27g/mL 配制双水相。

1.2.2 双水相提取路边青总多酚

以总多酚提取率为目标, 从提取时间、料液比、乙醇初始体积与水初始体积比(醇水比)和提取温度4个方面进行单因素试验和正交试验。称取1.0g 干燥路边青粉末于100mL 圆底烧瓶中, 按一定的料液比加双水相体系溶液, 在一定温度下超声提取一定时间, 抽滤, 滤液静置, 分液, 取上层用60% 乙醇定容至50mL 做为待测液。

1.2.3 标准曲线的绘制

用没食子酸作标样, 按参考文献[5]配制系列没食子酸标准溶液, 用紫外可见分光光度计测波长543nm 处的吸光度, 绘制质量浓度-吸光度标准曲线, 经线性回归得回归方程:

$$C=1.7386A, R^2=0.9998$$

式中: C 为总多酚质量浓度/(mg/mL); A 为溶液的吸光度。

1.2.4 样品中总多酚的分析

按参考文献[5]取1mL 待测液置于25mL 容量瓶中, 以酒石酸亚铁比色法测定总多酚的含量。用紫外可见分光光度计测波长543nm 处的吸光度, 结合回归方程计算提取液中总多酚质量, 并计算总多酚提取率。

$$\text{总多酚提取率}/\% = \frac{\text{提取液中总多酚质量}}{\text{路边青粉末质量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取时间对总多酚提取率的影响

称取干燥路边青粉末1.00g, 以乙醇作溶剂, 采用1.2节方法按醇水比0.67, 分相盐质量浓度(硫酸铵质量浓度)0.27g/mL 配制双水相溶液, 并按料液比1:25(g/mL)加双水相溶液, 于50℃温度超声提取, 考查提取时间对总多酚提取率的影响, 结果见图1。

由图1可知, 随提取时间的增加, 总多酚的提取率先增大后减少, 45min 时达到最大值2.86%。这是因为多酚化合物受热时间过长被氧化所致。

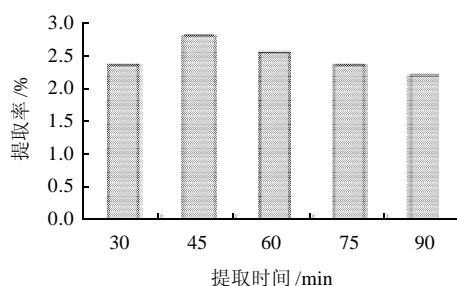


图1 提取时间对总多酚提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction time on total polyphenol yield

2.1.2 料液比对总多酚提取率的影响

料液比是指路边青质量与双水相溶液体积之比, 提取溶剂包括双水相中的乙醇和水(下同), 因此, 料液比的大小将直接影响提取效果的好坏。为了考查料液比对总多酚提取率的影响, 称取干燥的路边青粉末1.00g, 以乙醇作为溶剂, 采用1.2节方法按醇水比0.67, 分相盐质量浓度(硫酸铵质量浓度)0.27g/mL 配制双水相溶液, 并按不同料液比添加双水相溶液, 于50℃温度超声提取30min, 结果见图2。

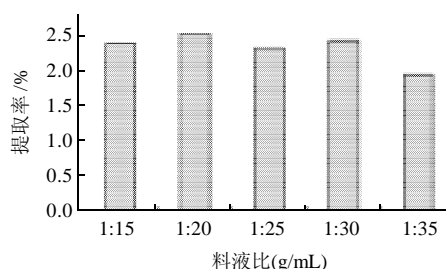


图2 料液比对总多酚提取率的影响

Fig.2 Effect of solid-to-liquid ratio on total polyphenol yield

由图2可知, 料液比太小或太大都不利于总多酚的提取。料液比以1:20最好, 总多酚提取率为2.57%。因为植物多酚在细胞内与糖、蛋白质或生物碱通过苷键、酯键或氢键等疏水键结合, 要将总多酚浸出, 必须破坏疏水键。料液比小, 溶剂渗透并扩散到植物细胞内的速度以及黄酮化合物向溶剂中扩散的速度小, 料液比太大, 虽然有利于溶剂进入细胞内, 也有利于黄酮化合物向溶剂中扩散, 但溶剂用量多, 会造成分相盐用量增大, 影响双水相的稳定性, 导致黄酮提取率减小。

2.1.3 醇水比对总多酚提取率的影响

醇水比直接影响双水相的稳定性, 对总多酚提取率有较大的影响。为了考察醇水比对总多酚提取率的影响, 称取干燥的路边青粉末1.00g, 以乙醇作为溶剂, 采用1.2节方法按分相盐质量浓度(硫酸铵质量浓度)0.27g/mL, 在不同醇水比时配制双水相, 并按料液比1:25加双水相溶液, 于50℃超声提取30min, 抽滤, 滤

液按 1.3 节方法测定总多酚的含量, 计算总多酚提取率, 结果见图 3。

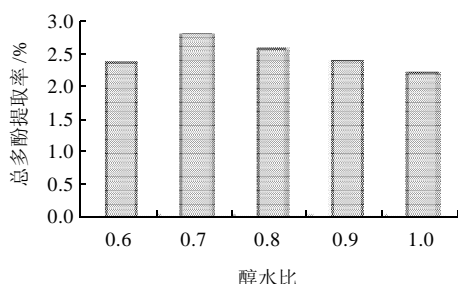


图 3 醇水比对总多酚提取率的影响

Fig.3 Effect of volume ratio of initial ethanol to initial water on total polyphenol yield

由图 3 可知, 醇水比为 0.7 时最好, 总多酚提取率为 2.86%。因为醇水比太大, 水量过多, 进入植物细胞内的提取溶剂对总多酚疏水键的断键能力弱, 提取率低; 醇水比太小, 乙醇用量过多, 溶剂进入植物细胞的能力差, 总多酚提取率也低。

2.1.4 提取温度对总多酚提取率的影响

温度升高, 分子内能增大, 有利于溶剂分子渗透到植物细胞内破坏疏水键, 因此, 温度对总多酚提取率有较大的影响。称取干燥的路边青粉末 1.00g, 以乙醇作为溶剂, 采用 1.2 节方法按醇水比 0.67, 分相盐质量浓度(硫酸铵质量浓度)0.27g/mL 配制双水相, 并按料液比 1:25 添加双水相溶液, 于超声波清洗器中加热超声提取 30min, 抽滤, 滤液测定总多酚含量, 计算总多酚提取率, 考查提取温度对总多酚提取率的影响, 结果见图 4。

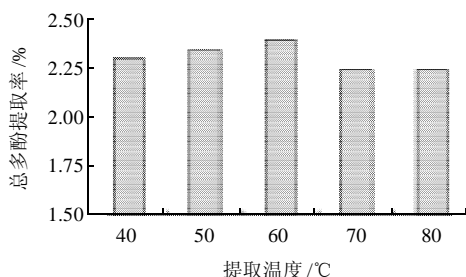


图 4 提取温度对总多酚提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on total polyphenol yield

由图 4 可知, 随着超声提取温度的升高, 总多酚提取率增大, 到 60°C 时达最大值 2.4%, 随后稍有减小。因为温度升高, 分子内能增大, 分子运动加快, 有利于溶剂分子渗透到细胞内破坏疏水键, 同时, 也有利于被提取物质向溶液中扩散。但温度高于 60°C, 双水相体系稳定性变差总多酚物质的氧化加快。

2.2 正交试验

2.2.1 正交试验因素水平表

根据双水相提取总多酚的单因素试验结果, 选择提取温度、双水相醇水比、提取时间和料液比 4 因素为影响因素, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 正交试验因素水平见表 1。

表 1 路边青总多酚提取正交试验因素水平表

Table 1 Factors and their coded levels in orthogonal array design

水平	因素			
	A 提取温度/°C	B 醇水比	C 超声时间/min	D 料液比(g/mL)
1	50	0.7	30	1:15
2	60	0.8	45	1:20
3	70	0.9	60	1:25

2.2.2 路边青总多酚提取正交试验结果与分析

表 2 路边青总多酚提取 $L_9(3^4)$ 正交试验结果与分析

Table 2 Orthogonal array design $L_9(3^4)$ and corresponding experimental results

试验号	A 提取温度/°C	B 醇水比	C 超声时间/min	D 料液比(g/mL)	总多酚提取率/%
1	50	0.7	30	1:15	2.48
2	50	0.8	45	1:20	2.87
3	50	0.9	60	1:25	2.86
4	60	0.7	45	1:25	2.95
5	60	0.8	60	1:15	2.99
6	60	0.9	30	1:20	3.05
7	70	0.7	60	1:20	2.97
8	70	0.8	30	1:25	2.94
9	70	0.9	45	1:15	2.86
K_1	8.21	8.4	8.47	8.33	
K_2	8.99	8.8	8.68	8.89	
K_3	8.77	8.77	8.82	8.75	
k_1	2.74	2.8	2.82	2.78	
k_2	3.00	2.93	2.89	2.96	
k_4	2.92	2.92	2.94	2.92	
极差	0.26	0.13	0.12	0.18	
优水平	A_2	B_2	C_3	D_2	
因素主次	$A > D > B > C$				

由表 2 中正交试验直观分析表明: 各因素影响程度由大到小依次为: $A > D > B > C$, 最优水平为 $A_2B_2C_3D_2$, 即用乙醇作提取溶剂, 在料液比 1:20、醇水比 0.8、温度 60°C 条件下超声提取 60min。

2.3 验证实验

为了考查最佳提取条件下总多酚的提取效果, 用乙醇为提取溶剂, 在醇水比 0.8, 硫酸铵质量浓度 0.27g/mL 时配制双水相, 于料液比 1:20、温度 60°C、提取时间 60min 条件下做验证实验, 结果表明, 在最佳条件下, 采用超声协同乙醇-铵盐双水相体系提取路边青总多酚, 提取率为 3.04%, 实验结果的平均标准相对误差(RSD)为 1.039%。

3 结 论

超声协同双水相体系提取路边青中总多酚具有耗时短、操作简单、提取与分离同时完成,不影响多酚活性的优点。结果表明,用乙醇为提取剂,在乙醇初始体积与水初始体积比0.8、硫酸铵质量浓度0.27g/mL配制双水相,按料液比1:20(g/mL)添加双水相溶液,于60℃温度条件下超声提取60min,总多酚提取率为3.04%。

参考文献:

- [1] 刘塔斯, 裔秀琴. 四种大青叶的生药研究[J]. 中药材, 1986, 9(4): 28-29.
- [2] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 151-153.
- [3] 蔡文涛, 韩凤梅. RP-HPLC 测定穿心莲、路边青配伍药液中脱水穿心莲内酯在小鼠血浆中的浓度[J]. 湖北大学学报, 2005, 27(1): 74-77.
- [4] 高玉琼, 王恩源, 赵德刚, 等. 柔毛路边青挥发性成分研究[J]. 生物技术, 2005, 15(2): 52-54.
- [5] 欧阳玉祝, 陈小东, 唐红玉, 等. 路边青中总多酚的提取与分离研究[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 44-46.
- [6] SHAHID I, SABA H, MUBEENA A, et al. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions [J]. Food Research International, 2008, 41(2): 194-200.
- [7] LI Yunfeng, GUO Changjiang, YANG Jijun, et al. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract [J]. Food Chemistry, 2006, 96(2): 254-260.
- [8] KAKARLA P, VADLURI G, REDDY K S. Vulnerability of the mid aged rat myocardium to the age-induced oxidative stress: Influence of exercise training on antioxidant defense system[J]. Free Radical Research, 2005, 39(11): 1211-1217.
- [9] 高雪丽, 高愿军, 李建光, 等. 桦褐孔菌多酚对食用油脂的抗氧化效应研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 135-137.
- [10] 吕程丽, 欧阳玉祝, 林嵘, 等. 路边青多酚提取液对花生油抗氧化性能的影响[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 62-65.
- [11] SUN R E, TOMKINSON J. Comparative study of lignins isolated by alkali and ultrasound assisted alkali extractions from wheat straw[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2002, 9(2): 85-93.
- [12] 牛波, 邱海霞, 田景振, 等. 超声强化提取技术[J]. 山东中医杂志, 2000, 19(10): 629-630.
- [13] KARAKATSANISA A, LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M. Comparison of PEG/fractionated dextran and PEG/ industrial grade dextran aqueous two-phase systems for the enzymic hydrolysis of starch[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(4): 1213-1217.
- [14] ZHI Wenbo, DENG Qiuyun. Purification of salvianolic acid B from the crude extract of *Salvia miltiorrhiza* with hydrophilic organic/salt-containing aqueous two-phase system by counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2006, 1116(1/2): 149-152.
- [15] DALLORA N L P, KLEMZ J G D, FILH P A P. Partitioning of model proteins in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium carbamate[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 34(1): 92-97.
- [16] LIU Xiaohai, GAOYuntao, 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 & Purification Technology, 2006, 50(2): 263-266.
- [17] 高云涛, 李干鹏, 李正全, 等. 超声集成丙醇-硫酸铵双水相体系从苦荞麦苗中提取总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 110-113.