

羽衣甘蓝叶黄素提取纯化研究

王向东, 赵国建

(山西师范大学食品科学与工程系, 山西 临汾 041000)

摘 要: 以羽衣甘蓝冻干粉末为原料, 采用 THF 浸提(10:1)、10% KOH-C₂H₅OH 溶液皂化(6.5:1)的方法, 研究提取羽衣甘蓝叶黄素的最佳条件; 采用重结晶法纯化叶黄素粗品, 通过 HPLC 测定纯度。结果表明, 在 40Hz 超声波作用下, 提取温度 30℃、提取时间 20min, 叶黄素的提取量最高, 达到 3289.42μg/100g; 游离态叶黄素纯度达到 88.13%。

关键词: 叶黄素; 羽衣甘蓝; 超声波; 提取; 纯化

Research on Extraction and Purification of Lutein from *Brassic oleraced var. acephala* DC.

WANG Xiang-dong, ZHAO Guo-jian

(Department of Food Science and Engineering, Shanxi Normal University, Linfen 041000, China)

Abstract: The aim of this study is to determine the best conditions extracting lutein from *Brassic oleraced var. acephala* DC., based on its dried powder being soaked in THF(10:1) and saponified through 10% KOH-C₂H₅OH (6.5:1). Raw lutein was purified through recrystallization and its purity was measured with HPLC. The results showed that under the circumstances of 40Hz ultrasonic wave, the extracted lutein rate reached 3289.42 μg/100 g with the extracted temperature 30 °C and the extracted time 20 min. The purity of lutein in free state reached 88.13%.

Key words lutein; *Brassic oleraced var. acephala* DC.; ultrasonic wave; extraction; purification

中图分类号: S635

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0145-04

叶黄素(lutein)是α-胡萝卜素的衍生物, 分子式 C₄₀H₅₆O₂。叶黄素具有多种生理功能, 已被建议用作癌症预防剂、生命延长剂、溃疡抑制剂、心脏病发作与冠状动脉疾病的抑制剂^[1-2], 特别在预防视网膜黄斑老化方面具有明显作用^[3]。叶黄素广泛存在于动植物体内, 分为游离态和酯化态。游离态叶黄素可被人体直接吸收利用, 叶黄素酯必须在体内水解成游离叶黄素才能被吸收。生产上主要从万寿菊中提取叶黄素, 其产品成分主要是叶黄素酯, 直接皂化后的叶黄素不适合作为食品、药物添加剂等^[4]。

羽衣甘蓝(*Brassic oleracea var. acephala* DC.)原产地中海和小亚西亚一带, 二年生或多年生草本植物, 属十字花科芸苔属甘蓝种的一个变种, 是一种最接近甘蓝野生种的观叶植物, 现在多做菜用栽培^[5]。羽衣甘蓝含有大量游离态叶黄素^[6], 至今尚未见到从羽衣甘蓝中提取纯化游离态叶黄素的报道。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用羽衣甘蓝叶采自山西临汾樊下菜园, 采摘定植 60 d 的叶片, 洗净、切碎、冻干至恒重, 粉碎, 过 40 目筛, 得到羽衣甘蓝冻干粉末备用。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器

GD-0.2 型真空冷冻干燥机、Waters1525 型高效液相色谱仪、2487 型双波长紫外检测器、超声波发生器、离心机、RE-52AA 型旋转蒸发仪、UV755B 型紫外分光光度计。

1.2.2 试剂

石油醚、醋酸、氢氧化钾、硅胶(5 μm)、甲醇、石油醚。

1.3 方法

1.3.1 叶黄素的提取

称取羽衣甘蓝冻干粉末 5g 放入三角瓶中, 加入 50ml THF 和 32.5ml 10% KOH-CH₃CH₂OH 溶液。将三角瓶放入恒温水浴锅提取皂化或在超声波发生器中强化提取。

收稿日期: 2007-05-20

基金项目: 山西省自然科学基金项目(2007011099)

作者简介: 王向东(1957-), 男, 教授, 主要从事天然产物的活性提取和生物活性的研究。

超声波提取在 40Hz 下进行, 超声 0.5min, 间歇 0.5min。

将提取皂化液以 4000r/min 离心 10min, 除去残渣, 分离上清液加入分液漏斗中, 再依次加入 25ml 石油醚, 40ml 50% (V/V) CH₃CH₂OH 溶液, 充分摇匀, 静置分层, 将下层液加入另一分液漏斗中, 继续萃取, 直至石油醚层无色。

将萃取液合并, 进行旋转蒸发除去溶剂。将蒸发瓶中的粘稠膏体溶解于石油醚中, 以 4000r/min 离心 10min, 除去上清液, 沉淀为粗叶黄素。

将粗叶黄素溶解于适量 THF 中, 室温下搅拌 10min, 置 -15℃ 析出晶体, 4000r/min 离心 10min, 除去溶剂。用乙醇洗涤沉淀两次, 将洗涤液合并后, 以 4000r/min 离心 10min, 将沉淀物在室温下, 真空干燥 24h, 得到叶黄素晶体。

1.3.2 叶黄素提取量的测定及计算

准确称取 0.50mg 叶黄素标品, 用 5.00ml 无水乙醇溶解, 配制成质量浓度为 100.00mg/L 的工作液。用工作液分别配制 0.4、0.8、1.2、1.5、2.0μg/L 的标准液。吸取叶黄素 1.2μg/L 标准液 3.0ml, 采用紫外分光光度计测其不同波长下的吸光度, 确定最大吸收波长。吸取 0.4、0.8、1.2、1.5、2.0μg/L 的标准液 10ml, 在最大吸收波长处分别测其吸光度, 以吸光度 - 质量浓度作图, 建立标准曲线, 确定回归方程。将制得的晶体用无水乙醇溶解, 定容至 50ml, 在最大吸收波长处测定其吸光度。

利用回归方程并按照公式 $w = (Y/W) \times 100$, 计算某条件下 100g 样品中叶黄素的提取量。

式中, w 为 100g 样品中叶黄素的提取量; W 为实际提取样品重量; Y 为提取液 474nm 吸光度在回归方程中对应的回归值。

1.3.3 叶黄素纯度测定

取叶黄素标品适量, 用甲醇溶解, 制成 13μg/ml 的溶液, 采用高效液相色谱仪、双波长紫外检测器在 200~500nm 的波长范围内扫描, 确定最大吸收波长。精密称取叶黄素标品 13.77mg 置 100ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容。精密量取 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4ml 分别置 10ml 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀。在室温、WatersC₁₈ 硅胶色谱柱 (5μm; 150mm × 4.6mm)、甲醇 (流动相) 流速 0.7ml/min、检测波长 446nm 的色谱条件下, 进样 20μl, 建立标准曲线; 以叶黄素峰面积 (A) 对进样浓度 C (μg/ml) 进行回归, 确定回归方程。将制得的纯化晶体 1.09mg、叶黄素标品 1.03mg 分别用甲醇定容至 50ml, 上机测定并利用回归方程确定纯度。

1.3.4 正交设计试验方案

根据单一提取条件对叶黄素提取率的影响实验结

果, 选取对提取率影响较大的超声波强度、提取温度、提取时间三个因素, 安排 L₉(3³) 正交试验, 对试验条件进行优化。正交试验的因素和水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels table of orthogonal test

水平	因素		
	A 温度 (°C)	B 时间 (min)	C 超声波 (Hz)
1	20	20	0
2	30	30	40
3	40	40	

2 结果与分析

2.1 单一提取条件对叶黄素提取效果的影响

2.1.1 超声波对提取效果的影响

控制提取温度 20℃, 提取时间 30min, 进行超声波的单因素试验 (表 2)。无超声波处理的叶黄素提取量为 1308.82μg/100g, 40Hz 超声波处理的叶黄素提取量为 1739.86μg/100g。40Hz 超声波提取量高于无超声波处理。

表 2 超声波对提取率的影响
Table 2 Effects of ultrasonic wave on extract rate

超声波 (Hz)	40	0
叶黄素含量 (μg/100g)	1739.82	1308.86

2.1.2 温度对提取效果的影响

采用 40Hz 超声波, 分别在 20、30、40℃ 温度下, 提取 30min (表 3)。20℃ 提取量为 2047.33μg/100g, 30℃ 提取量为 2629.27μg/100g, 40℃ 提取量为 2585.61μg/100g。提取量在 30℃ 时最高。

表 3 不同温度对提取率的影响
Table 3 Effects of different temperatures on extract rate

温度 (°C)	20	30	40
叶黄素含量 (μg/100g)	2047.33	2629.27	2585.61

2.1.3 时间对提取效果的影响

采用 40Hz 超声波, 在 30℃ 下, 分别提取 20、30、40min (表 4)。20min 提取量为 3162.53μg/100g, 30min 提取量为 3345.16μg/100g, 40min 提取量为 3348.28μg/100g。随着提取时间的增加, 提取量也相应提高。

表 4 不同时间对提取率的影响
Table 4 Effects of different time on extract rate

时间 (min)	20	30	40
叶黄素含量 (μg/100g)	3162.53	3345.16	3348.28

2.2 叶黄素提取条件的优化

2.2.1 正交试验

表6 最佳组合重复试验结果
Table 6 Results of repeated test under best conditions

提取条件	提取量(μg/100g)				
	1	2	3	4	5
40Hz, 30℃, 20min	3193.71	3338.42	3279.54	3289.60	3345.83
					平均值
					3289.42

对提取量的分析结果见表5。通过极差分析得出, $C > A > B$, 即超声波对提取效果影响最大, 其次是温度, 最后是时间。最佳组合为 $A_2B_1C_2$, 即40Hz 超声波, 30℃提取20min 为最佳条件。采用最佳条件进行五次提取重复试验(表6), 平均提取量为3289.42 μg/100g。

表5 正交试验分析表
Table 5 Analysis of orthogonal test

试验号	因素			提取量(μg/100g)
	A	B	C	
1	1	1	1	1156.78
2	1	2	2	1708.69
3	1	3	3(2)	1768.22
4	2	1	3(2)	3162.46
5	2	2	1	1338.93
6	2	3	2	2585.64
7	3	1	2	3036.18
8	3	2	3(2)	2047.25
9	3	3	1	1308.79
K_1	4633.69	7355.42	3804.50	
K_2	7087.03	5094.87	14308.46	
K_3	6392.23	5662.67		
k_1	1544.56	2451.80	1268.17	
k_2	2362.34	1698.29	2384.75	
k_3	2130.74	1887.55		
R	817.78	753.51	1116.58	

叶黄素提取量的分光光度计测定: 标准曲线为图1, 最大吸收波长为474nm, 回归方程为 $Y=1.2704X-0.018$, $R^2=0.9995$ 。

叶黄素纯度测定: 最大吸收波长为446nm, 回归方程为 $A=-36.925+8.117C$, $r=0.9998$; 标品及纯化产品的谱图见图2、3, 叶黄素标品的谱峰位置(甲醇洗脱剂)为5.767min, 纯化产品的出峰位置为5.746min。定量HPLC的结果(表7)为叶黄素纯化产品的纯度88.13%。

表7 产品纯度的测定计算结果
Table 7 Results of the sample purity measurement

	质量(mg)	溶液体积(ml)	峰面积	纯度(%)
标品	1.03	50	18434054	93.00
纯化产品	1.09	50	17468744	88.13

吸取0.4、0.8、1.2、1.5、2.0 μg/L 的标准液10ml, 在最大吸收波长处分别测其吸光度, 以吸光度—质量浓度作图, 建立标准曲线, 确定回归方程。

3 结论

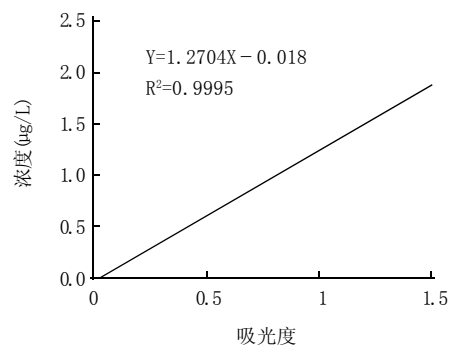


图1 叶黄素标准曲线图
Fig.1 Standard curve of lutein

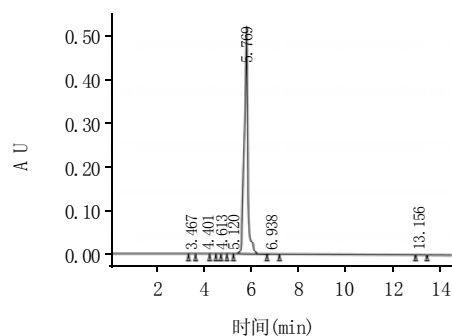


图2 叶黄素标品的HPLC谱图
Fig.2 HPLC of lutein standard sample

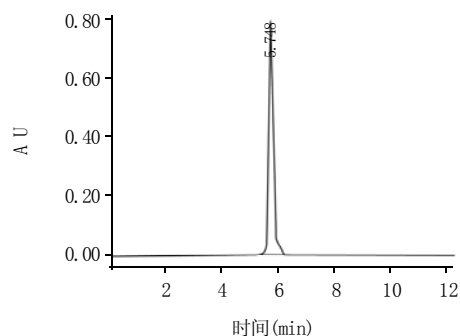


图3 纯化产品的HPLC谱图
Fig.3 HPLC of lutein purified sample

将真空冷冻干燥、40目粉碎的羽衣甘蓝叶粉, 在30℃、40Hz 超声波的条件下, 进行THF(10:1)、10% KOH-C₂H₅OH 溶液(6.5:1)浸提皂化20min 的处理, 可以得到最高提取量, 五次重复的平均提取量达到3289.42 μg/100g。经过重结晶处理, 可以得到纯度88.13%的游离态叶黄素结晶。

THF 具有良好的挥发性和扩散性, 是高级性、低

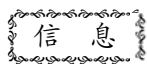
沸点的溶剂。在常用的提取溶剂中,对叶黄素有着最高的溶解度,达到8000mg/L。THF 沸点65.6℃,极易除去。乙醇是良好的有机溶剂,有较强的渗透性,对叶黄素的溶解度为300mg/L,沸点78.5℃。美国公职分析化学家协会(AOAC)公定分析方法中采用的提取皂化剂是正己烷和甲醇^[7]。考虑到正己烷对叶黄素的溶解度仅为20mg/L,明显低于THF;甲醇毒性大,易挥发,不利于保护操作者的安全。故本次研究选择的浸提皂化剂为THF和乙醇。浸提温度在20~40℃范围内,叶黄素提取量增加。说明随着温度的升高,溶剂的渗透性增强,有利于叶黄素的渗出。30℃时,提取量最高。当温度达到40℃时,提取量开始下降,说明游离叶黄素的热稳定性较差,在较高温度下,会发生降解和异构化^[8]。同时,考虑到THF、乙醇的低沸点特性,最高浸提温度以30℃为宜。

在HPLC测定谱图2、3中,羽衣甘蓝叶黄素纯化产品的谱峰时间,与叶黄素标品的谱峰时间基本一致。说明叶黄素纯品中的成分是游离叶黄素,与参考文献[6]的表述相同。目前生产上提取叶黄素的主要原料是万寿菊,其叶黄素含量是植物中最高的。参考文献[6]记载,经HPLC分析表明,万寿菊叶黄素中存在游离叶黄素和8种叶黄素酯,其中80%~100%为叶黄素酯。游离叶黄素含量0~18.74mg/100g,平均值仅3.51mg/100g,而羽衣甘蓝中游离叶黄素含量几乎达到100%,平均值5.12~15mg/100g,远高于万寿菊的含量。不少文献认为,万寿菊中的叶黄素酯,经皂化后,虽可转变为游离叶黄素,但皂化产物杂质含量高,直接皂化后的叶黄素不适合作为食品及药物添加剂,须经进一步分离纯化才能达到要求。而羽衣甘蓝本身含有几乎100%的游离叶黄素,不需要进行复杂的分离纯化工艺。加上羽衣甘蓝为二年生或多年生草本植物,喜冷凉气候,极

耐寒,可忍受多次短暂的霜冻;耐热性也很强,生长势强,栽培容易,产量高。在我国北方地区,秋末到早春进行保护地栽培,春、夏、秋季进行露地栽培,能做到周年生产和周年供应。生产叶黄素时,应该把羽衣甘蓝作为优良的原料加以考虑。当然,采用羽衣甘蓝提取叶黄素,需要考虑叶绿素的去除和游离叶黄素的不稳定性。根据已经进行的研究,在皂化时,可以使叶绿素转变成可溶性的叶绿素钾盐,溶于乙醇而被除去;游离叶黄素不稳定,可以在分离过程中,采用VC抗氧化、 β -环糊精包埋等措施进行保护。另外,本次研究中,叶黄素的提取量比较低,可能与采集的叶片生长期比较长有关,今后应该进行全生长期的跟踪测定,以确定生长期与叶黄素含量之间的关系。

参考文献:

- [1] GSZIANO J M, MANSON J E, RIDKER P M, et al. β -Carotene and heart disease[J]. Circulation, 1990, 82: 796.
- [2] CUTLER R G. Carotenoids and retinol: Their possible importance in determining longevity of primate species[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1984, 87: 7627-7631.
- [3] SNODDERLY D M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins[J]. Am J Clin Nutr, 1995, 62(suppl.): 1448s-1461s.
- [4] KHACHIK. Process for isolation, purification, and recrystallization of lutein from saponified marigold oleoresin and uses thereof: US 5382714[P]. 1995-01-17.
- [5] 李式军, 刘凤生. 珍稀名优蔬菜80种[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 54-57.
- [6] 朱海霞, 郑建仙. 叶黄素(Lutein)的结构、分布、物化性质及生理功能[J]. 中国食品添加剂, 2005(5): 48-55.
- [7] 美国公职分析化学家协会(AOAC)公定分析方法[M]. 中华人民共和国国家进出口商品检验局AOAC编译委员会编译. 北京: 中国科学技术出版社, 1990.
- [8] 杜桂彩, 郭群群, 滕大为, 等. 高纯度叶黄素的制备及稳定性研究[J]. 精细化工, 2004, 21(6): 447-449.



信息

科学家发现幽门螺杆菌和弯曲菌的共同祖先

日本研究人员最近在美国《国家科学院学报》(PNAS)网络版上报告说,他们研究了生活在深海底的两种微生物的基因组,发现它们是幽门螺杆菌和弯曲菌共同的祖先。

日本海洋研究开发机构日前发布新闻公报说,该机构研究人员从水深1000米的热液喷涌口附近采集了这两种微生物。在很多这样的海底热液喷涌区域都能发现它们的身影,它们获取能量以及体内合成有机物的方式相同。

研究人员分析了两种微生物基因组的碱基序列。结果显示,其中一种微生物拥有2466个基因,其基因组有约256万个碱基对,另一种微生物有1857个基因,其基因组共有约188万个碱基对。对比这两种微生物与幽门螺杆菌、弯曲菌的基因组,研究人员发现它们的基因亲缘关系非常接近,幽门螺杆菌和弯曲菌可以说是这两种微生物的直系“子孙”。

幽门螺杆菌和弯曲菌是同一类型的细菌,科学家认为它们是由共同的祖先进化而来的。该项成果为研究病原菌的进化提供了帮助。