

超声提取葵花绿原酸研究

阳元娥¹, 谭 伟²

(1. 广东轻工职业技术学院, 广州 510300; 2. 广东工业大学, 广州 510006)

摘要: 研究了超声强化提取葵花绿原酸中主要参数-乙醇浓度、液料比、超声功率、超声辐照方式、超声提取时间以及超声提取次数等-对绿原酸萃取率的影响。通过在单因素实验基础上进行的三因素三水平的 Box-Behnken 实验, 得到了优化的工艺条件: 在乙醇浓度为 70% 辐照方式占空比 9s:6s、超声提取 30min 的条件下, 液料比为 27.3ml/g, 超声功率为 200W, 提取 3 次, 绿原酸的萃取率可达到 98.87%。

关键词: 超声提取; 葵花; 绿原酸

中图分类号: TQ645.96

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2008)-01-0053-05

Research on ultrasound-assisted extraction of chlorogenic acid from sunflower seeds

YANG Yuan-e¹, TAN Wei²

(1. Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China;

2. Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Effect of factors such as ethanol concentration, ratio of solvent to sample, ultrasound power, mode of ultrasound irradiation, extraction duration and operation times on extraction yield of chlorogenic acid has been investigated. On the basis of experimental results of single factor, experimental design of Box-Behnken is carried out and optimum extraction conditions are obtained. Extraction yield of chlorogenic acid reaches 98.87% under the following conditions: using ethanol of 70% concentration, 30 minutes of ultrasound irradiation with 9s/6s of on/off ratio, 27.3ml/g of solvent to sample ratio, 200W ultrasound power, and of 3 times.

Key words: ultrasound assisted extraction; sunflower seeds; chlorogenic acid

1 引 言

绿原酸(chlorogenic acid, CGA)是植物在有氧呼吸过程中经磷酸戊糖途径中间产物合成的一种苯丙素类物质。绿原酸具有广泛的生物活性。传统的研究表明,绿原酸对急性咽喉炎症和化脓性皮肤病疗效显著,具有抗菌、抗病毒、止血、增高白血球,缩短血凝和出血时间等^[1]。近来又有报道绿原酸是强的 MMP-9 抑制剂,对抗肿瘤侵袭和转移效果显著^[2]。传统的绿原酸提取方法有加热、煮沸和回流法等。传统

方法提取的缺点有二,其一是由于萃取过程中绿原酸的离子化、水解和氧化而损失较大^[3];另外,有机溶剂的消耗大,萃取时间长^[4,5]。而作为现代提取技术的超声强化萃取已经应用到植物生物活性成分的提取^[6-8],并表现出良好的效果。近年来,双频超声提取的研究也取得了一定的成效^[9,10]。从葵花中提取绿原酸的研究也有相关报道^[11],而本文是以葵花为原料研究了超声场对有机溶剂提取绿原酸的影响,并在此基础上进行了工艺优化。

2 实 验

2.1 实验原料与仪器设备

原料: 葵花, 采用超临界 CO₂ 萃取方法除去葵

收稿日期: 2007-01-27; 修回日期: 2007-5-22

作者简介: 阳元娥(1974-), 女, 湖南人, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为应用生物技术与天然产物提取。

通讯作者: 阳元娥, E-mail: ouyangyuane@163.com.

花籽油, 含油量<1%, 过 40 目筛备用; 绿原酸标准品; 其余试剂均为分析纯。

仪器设备: 752 紫外分光光度计; 精密天平 FA2004; 探头式超声波, 功率 200W, 频率 25kHz; RE-52A 旋转蒸发器。

2.2 实验方法

准确称取过 40 目筛的葵粕 0.5g 样品, 加入一定量的萃取溶剂, 放置到水浴恒温槽中。超声作用 30min, 采用 0.45 μm 的微孔膜过滤后, 收集滤液。滤渣又加入相同量的有机溶剂继续萃取。在固定其他参数的情况下, 分别考察了乙醇浓度、液料比、超声功率、超声辐照方式、超声提取时间以及超声提取次数对绿原酸萃取率的影响。

2.3 分析方法

2.3.1 绿原酸标准曲线^[12]

称取对照品绿原酸 4.5mg, 放入到 50ml 容量瓶中, 用 95%乙醇定容至刻度, 摇匀。取 0.5ml、0.75ml、1.00ml、1.25ml、2.00ml、2.50ml 分别置于 10ml 比色管中, 稀释至刻度。以 95%乙醇作为参比溶液, 用 1cm 比色管在 328nm 处测定各浓度的吸光值 A。以质量浓度对吸光值作图, 得到标准曲线(见图 1)。以浓度与吸光值进行线性回归, 得到回归方程 $A = 0.0544C - 0.0076$, 相关系数为 $r^2 = 0.9995$ 。根据标准曲线则可计算出提取液中绿原酸的含量。

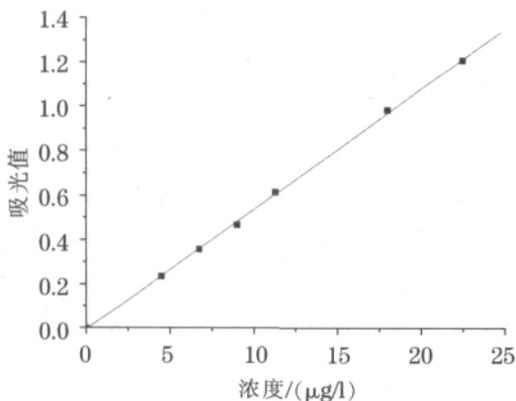


图 1 绿原酸紫外吸收标准曲线

Fig.1 Standard curve of ultraviolet absorption for CGA

2.3.2 葵粕中绿原酸含量的测定

称取 1.0g 样品, 参照回流方法^[13], 加入新鲜配制的 70%甲醇, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 5 \times 60min, 过滤后用旋转蒸发器浓缩, 定容分析。

2.3.3 绿原酸的萃取率计算方法

萃取率公式:

$$EY (\%) = M_t / (M_0 X_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中 EY 为绿原酸的萃取率; M_t 为超声强化萃取得到的绿原酸的质量, 单位: g; M_0 为葵粕样品质量, 单位: g; X_0 为葵粕样品中绿原酸含量。经测定, 葵粕中的绿原酸含量 X_0 为 4.87%。

3 结果与讨论

3.1 乙醇浓度的影响

在超声功率为 100W, 超声辐照方式占空比为 6s:6s(即超声连续作用 6s 后停止 6s, 再作用 6s, 如此循环), 料液比为 20:1ml/g, 超声作用 30min 的条件下, 考察了浓度为 50%、60%、65%、70%、75%、80%、90%乙醇对葵粕绿原酸提取的影响, 结果见图 2。

从图 2 可以看到, 随着乙醇浓度的增加, 乙醇溶解绿原酸的能力也增强, 因此绿原酸萃取率先是呈上升趋势, 乙醇浓度达到 70%时萃取率最高, 而后萃取率又呈下降趋势。究其下降的原因, 可能是由于长时间的超声波热效应使乙醇的温度上升导致萃取溶剂快速挥发的缘故, 乙醇浓度越高越容易挥发, 使得高浓度的乙醇挥发较快而萃取率下降。也可能是由于葵粕中蛋白质含量较高, 而蛋白质在高浓度的乙醇中更易于变性, 变性后的蛋白质包裹住绿原酸使得提取率下降。

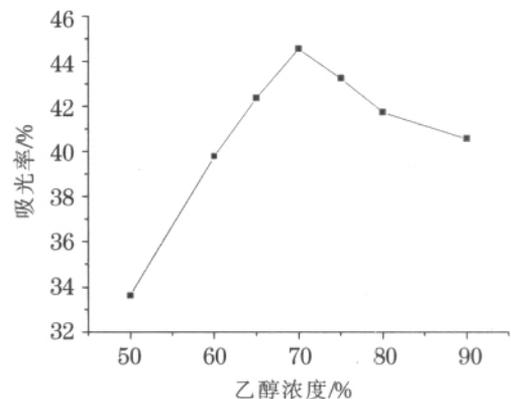


图 2 乙醇浓度对绿原酸萃取率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on EY of CGA

3.2 液料比的影响

根据 3.1 的结果, 选择 70%的乙醇, 考察了乙醇体积与样品重量比(单位: ml/g) 分别为 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 时对葵粕绿原酸提取的影响, 其他条件同 3.1。

一般情况下, 在样品量一定时, 萃取溶剂的体积越大, 则萃取率就会越高。但是溶剂体积的增大又会带来提取成本的增加。因此有必要找到一个比较合适的溶剂提取体积。图 3 即为液料比对绿原酸萃

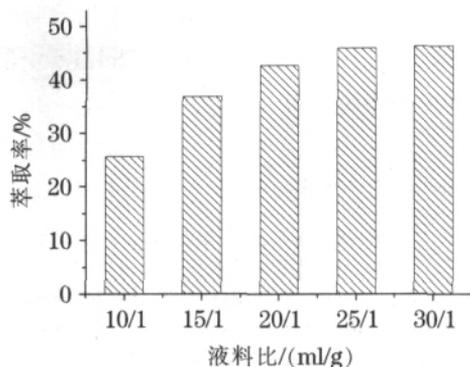


图3 液料比对绿原酸萃取率的影响

Fig.3 Effect of ratio of solvent to sample on EY of CGA

萃取率的影响结果,从图可知,随着液料比的增大,绿原酸的萃取率也逐渐升高,25:1时萃取率达到45.83% 30:1与25:1相比萃取率非常接近。溶剂萃取的主要推动力是物料及溶剂边界层的有效成分浓度差,当萃取溶剂体积增大,这种浓度梯度就会增大,扩散就更快,提取效率也就相应要高。当萃取溶剂达到一定的剂量时,有效成分浓度差就不明显,于是萃取率也就变化不大了。

3.3 超声功率的影响

根据 3.2 实验结果,选择 70%乙醇,液料比为 25ml/g,考察功率为 0W、50W、100W、150W 和 200W 超声对萘柏绿原酸提取的影响,其他条件同 3.1。

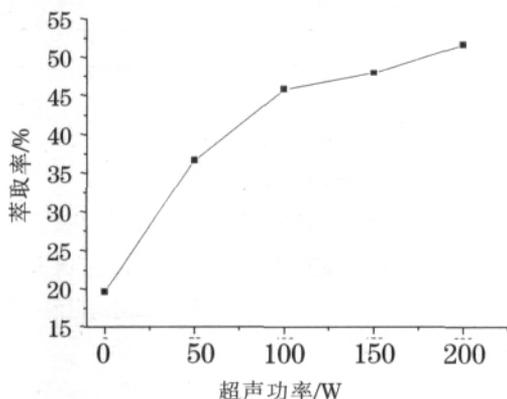


图4 超声功率对绿原酸萃取率的影响

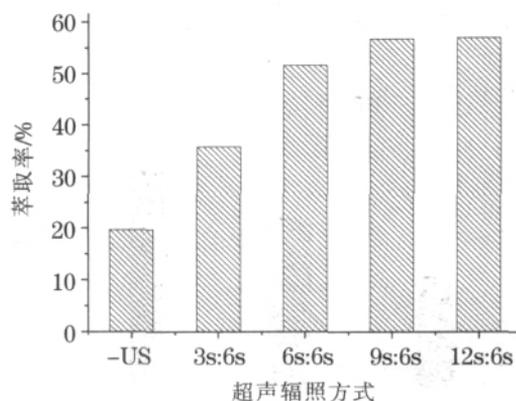
Fig.4 Effect of ultrasound power on EY of CGA

由图 4 可见,在没有超声作用时,绿原酸的萃取率只有 19.65% 而超声作用后绿原酸的萃取率明显提高,且随着超声功率的增大,绿原酸的萃取率也随着增大,最大萃取率达到了 51.67%。超声能够产生空化作用,这种空化效应对物料的细胞结构产生破坏,使得有效成分很容易渗出,从而萃取率明显提高;同时,超声对萃取溶剂起到搅拌作用,减小界面阻力从而促进物料与溶剂边界层的物质交换。另一方面,对于某一固定的超声设备,其超声发射面积也

是一定的,超声功率越大,声强也越大,而声强 $I = (1/2) \rho c v^2$, 式中 ρ -流体密度; c -声速; v -质点振动速度。对于特定的媒质, ρ 和 c 都是常数,超声功率越大,质点的振动速度越大,物料内部的传质更为剧烈,待萃取物就更容易被萃取。

3.4 超声辐照方式的影响

根据 3.3 实验结果,选择 70%乙醇,液料比为 25:1ml/g,功率 200W,考察超声辐照方式占空比分别为 3s:6s、6s:6s、9s:6s、12s:6s 对萘柏绿原酸提取的影响,其他条件同 3.1。

图5 超声辐照方式对绿原酸萃取率的影响(-US,没有超声作用)
Fig.5 Effect of mode of ultrasound wave irradiation on EY of CGA(-US, No by ultrasound)

如图 5 所示,没有超声作用时,萃取率只有 19.65% 附加超声场后的萃取率比不加超声场的萃取率明显要高,当采用超声辐照方式占空比为 3s:6s 时,绿原酸萃取率提高到 35.86%,与未加超声萃取相比,萃取率提高了 16.21% 随着超声辐照占空比增大,萃取率上升,6s:6s、9s:6s 和 12s:6s 时萃取率分别达到了 51.67%、56.83% 和 57.05% 12s:6s 与 9s:6s 相比萃取率增加不明显,因此从节省能量的角度考虑,最佳的超声辐照方式占/空比为 9s:6s。

3.5 超声提取时间的影响

选择 70%乙醇,液料比为 25:1ml/g,超声功率 200W,超声辐照方式占空比 9s:6s,考察超声提取时间对绿原酸萃取率的影响。由图 6 可知,在 0~30min 内,随着时间的延长,绿原酸萃取率显著提高,而在 30min 后,萃取率增加不明显,故提取时间选择 30min 为佳。

3.6 超声提取次数的影响

根据 3.4 实验结果,选择 50%、60%和 70%乙醇,液料比为 25/1,超声功率 200W,超声辐照方式占空比 9s:6s,考察超声提取次数对萘柏绿原酸提取的影响。结果见图 7。

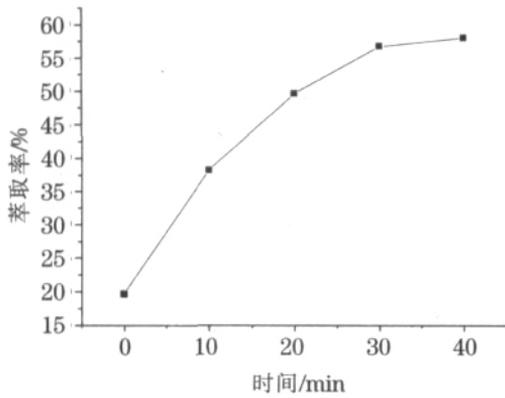


图6 超声提取时间对绿原酸萃取率的影响

Fig.6 Effect of ultrasound assisted extraction time on EY of CGA

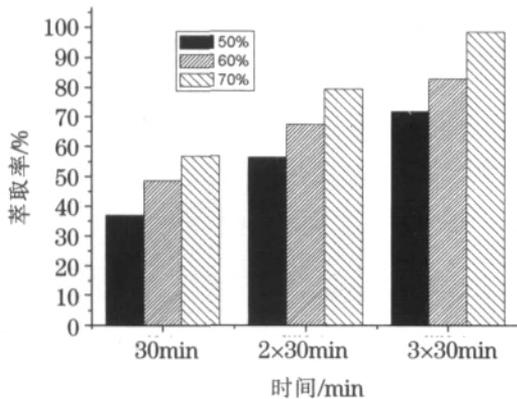


图7 50%、60%和70%乙醇在不同提取次数时的绿原酸萃取率
Fig.7 Extraction yield of CGA with 50%, 60% and 70% ethanol, respectively as extraction solvent for different extraction times

结果表明,50%、60%和70%三种不同浓度的乙醇萃取绿原酸时,提取次数增加,萃取率显著提高。50%、60%和70%乙醇超声萃取30min得到萃取率分别为36.95%、48.69%和56.83%,而采用3x30min超声萃取时,萃取率分别达到了71.84%、82.92%和98.61%。由此可见,超声提取次数对绿原酸的萃取率的影响是比较大的。

3.7 超声提取绿原酸的工艺优化

在单因素实验的基础上,本实验选择了料液比、超声功率和提取次数三个主要参数对超声提取绿原酸的工艺进行优化,采用了Design-expert(V7.0)实验设计软件,根据Box-Behnken中心组合设计原理,进行三因素三水平响应曲面法(Response surface methodology, RSM)实验设计。RSM是结合了特定数学与统计方法之集合所衍生出的方法论,RSM试验设计是一种优化实验过程的综合技术,采用该法不仅可以建立连续变量曲面模型,对影响实验过程的因子及其交互作用进行评价,确定最佳水平范围,而且所需的试验组数相对较少,可节省人力

物力。RSM可以避免传统的单变量优化试验不考虑各因子之间交互作用的不足。Box-Behnken是适合于三水平三到十个因素以上的实验设计。其他参数乙醇浓度、超声辐照方式和超声提取时间分别固定为70%、9s/6s和30min。实验设计及结果见表1。

表1 三因素三水平Box-Behnken设计以及绿原酸萃取率的实验值与预测值

Table 1 Three levels Box-Behnken design with three independent variables, and the experimental and predicted yields of CGA

编号	料液比/(ml/g)	超声功率/W	提取次数/次	萃取率/%	
				实验值	预测值
1	20	100	2	66.65	66.66
2	30	100	2	71.76	71.66
3	20	200	2	74.86	74.96
4	30	200	2	80.15	80.14
5	20	150	1	45.78	45.76
6	30	150	1	51.65	51.75
7	20	150	3	89.24	89.14
8	30	150	3	93.32	93.33
9	25	100	1	47.75	47.75
10	25	200	1	56.83	56.74
11	25	100	3	90.75	90.84
12	25	200	3	98.61	98.61
13	25	150	2	74.86	75.22
14	25	150	2	75.53	75.22
15	25	150	2	75.36	75.22
16	25	150	2	75.89	75.22
17	25	150	2	74.45	75.22

由实验结果可得到二次回归方程:

$$Y = -67.93775 + 6.01125R - 5.92000E - 003P + 34.57225T + 1.80000E - 004RP - 0.089500RT - 6.10000E - 003PT - 0.10701R^2 + 3.24900E - 004P^2 - 2.54525T^2 \quad (2)$$

其中R为液料比(ml/g),P为超声功率(W),T为超声提取次数(次),相关系数 $r^2=0.9997$ 。对表1实验数据进行参数优化,得到优化后的条件为液料比为27.3ml/g,超声功率为200W,提取次数为3次,预测最高萃取率为99.03%。通过验证实验得到萃取率为98.87%。实验值与预测值非常接近,无显著差异。

4 结 论

(1) 超声强化提取萹柏绿原酸中主要参数包括乙醇浓度、液料比、超声功率、超声辐照方式、超声提取时间以及超声提取次数对绿原酸萃取率都具有—

定的影响。单因素实验结果表明,乙醇浓度在 70% 时有最大萃取率;合适的液料比为 25:1;超声功率越大,强化作用越显著,本实验超声功率 200W 时萃取率最高;超声辐照方式以占/空比 9s:6s 为宜;超声提取时间 30min;超声提取次数为 3 次。

(2) 通过 Box-Behnken 实验得到优化后的工艺条件为:在乙醇浓度为 70% 辐照方式占/空比 9s:6s、超声提取 30min 的条件下,液料比为 27.3ml/g,超声功率为 200W,提取次数为 3 次,并在优化工艺条件下绿原酸的萃取率达到了 98.87%。

参 考 文 献

- [1] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986. 209-210.
Chinese Herbal Medicine Information Junction Centre of State Pharmaceutical Administration. Effective component handbook of vegetable drug[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986: 209-210.
- [2] Un-Ho Jin, Ji-Young Lee, Sung-Koo Kang, et al. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*[J]. *Life Sciences*(0024-3205), 2005, 77: 2760-2769.
- [3] Ohmishi M, Morishita Hm, Iwahashi H, et al. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis[J]. *Phytochemistry*(0031-9422), 1994, 36: 579-583.
- [4] YAN X, Suzuki M, Ohnishi-Kameyama M, et al. Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*)[J]. *J. Agric. Food Chem.* (0021-8561), 1999, 47: 4711-4713.
- [5] YU J, Vasanthan T, Temelli F. Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography[J]. *J. Agric. Food Chem.* (0021-8561), 2001, 49: 4352-4358.
- [6] Hemwimol S, Pavasant P, Shotipruk A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*[J]. *Ultrasonics Sonochemistry* (1350-4177), 2006, 13: 543-548.
- [7] Rodrigues S, Pinto G A S. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut(*Cocos nucifera*) shell powder[J]. *Journal of Food Engineering*(0260-8774), 2007, 80: 869-872.
- [8] 张喜梅, 程亮光, 李琳, 等. 超声提取葛根总黄酮成分的研究[J]. *声学技术*, 2006, 25(2): 110-112.
ZHANG Ximei, CHENG Lianguang, LI Lin, et al. Extraction of total flavones from *pueraria lobata* ohwi with ultrasound[J]. *Technical Acoustics*, 2006, 25(2): 110-112.
- [9] 曾荣华, 丘泰球, 陆海勤. 双频超声空化效应强化提取中药有效成分的实验研究[J]. *声学技术*, 2005, 24(4): 219-222.
ZENG Ronghua, QIU Taiqiu, LU Haiqin. Increasing extraction of traditional Chinese medicine with cavitation using dual-frequency ultrasound[J]. *Technical Acoustics*, 2005, 24(4): 219-222.
- [10] 贲永光, 丘泰球, 阎杰. 双频超声强化从海金沙中提取黄酮的实验研究[J]. *声学技术*, 2006, 25(3): 209-213.
BI Yongguang, QIU Taiqiu, YAN Jie. Extracting flavone from *Iygodium japonicum* (Thunb.) Sw. assisted by bifrequency ultrasound[J]. *Technical Acoustics*, 2006, 25(3): 209-213.
- [11] 杜延兵, 裘爱泳, 逯昕. 葵花粕中绿原酸提取工艺的研究[J]. *中国油脂*, 2006, 31(2): 37-40.
DU Yanbing, QIU Aiyong, LU Xin. Extraction of chlorogenic acid from sunflower seed meal[J]. *China Oils and Fats*, 2006, 31(2): 37-40.
- [12] 郑喜群, 蒋继丰, 刘晓兰, 等. 水提醇沉法从葵花籽中提取绿原酸[J]. *食品科学*, 2006, 27(1): 159-161.
ZHENG Xiqun, JIANG Jifeng, LIU Xiaolan, et al. Extraction of chlorogenic acid from sunflower seeds by water solution and alcohol sedimentation[J]. *Food Science*, 2006, 27(1): 159-161.
- [13] Palma M, Barroso C G. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products[J]. *Analytica Chimica Acta*(0003-2670), 2002, 458: 119-1.