

万寿菊干花颗粒中叶黄素酯的超临界 CO₂ 萃取初探

惠伯棣^{1*}, 唐粉芳¹, 李京², 裴凌鹏³

(1. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100083;

2. 首都师范大学生命科学院, 北京 100037; 3. 中国中医研究院, 北京 100009)

摘要: 从万寿菊花中萃取叶黄素酯是制备叶黄素过程中的重要技术。本项研究对叶黄素酯的超临界 CO₂ 萃取进行了初步探索。实验结果表明, 提高萃取压力、减小样品颗粒粒径以及减小萃取介质的极性均可增加叶黄素酯的萃取率。今后如果能在破坏叶黄素酯与花瓣组织介质的关联程度和降低萃取介质极性两个方面取得进展, 超临界流体萃取有可能成为一种应用于叶黄素酯萃取的技术。

关键词: 万寿菊, 叶黄素, 超临界二氧化碳萃取

Abstract: This study is a preliminary investigation into the extraction of lutein esters by supercritical CO₂. Results suggested that an increased pressure, reduced sample particle size and polarity of extraction medium resulted in an increased extraction yield. If progresses can be made in liberating lutein esters out from the flower tissues and the polarity reduction of extraction fluid, supercritical fluid extraction (SFE) can be a promising extraction technique for lutein ester extraction.

Key words: Marigold; lutein; supercritical carbon dioxide extraction

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2006)06-0096-04

叶黄素是一种类胡萝卜素(Carotenoid), 习惯命名为叶黄素或叶黄质(Lutein), 系统命名为 3,3'-二羟基-β-α-胡萝卜素(3,3'-dihydroxy-β-α-carotene), 分子式为 C₄₀H₅₆O₂, 分子量为 568.88。由于分子结构中烯键的存在, 叶黄素分子可以发生几何异构。叶黄素全反式异构体的分子结构见图 1。叶黄素为有机化合物, 能溶于大多数有机试剂中。由于叶黄素含羟基, 具有较强的极性, 因此, 在极性有机试剂中的饱和溶解度较高。叶黄素可在人体内发挥多种重要的

防治疾病功能。例如: 它能清除自由基, 阻止脂质的过氧化, 延缓老年期动脉粥样硬化的形成^[1]、预防老年性黄斑衰退、减低蓝光对视网膜的损伤^[2,3], 调节人体免疫力^[4]等。因此, 叶黄素在功能食品和药品中的应用具有良好前景。

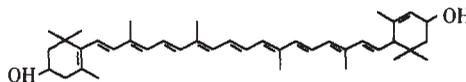


图 1 叶黄素全反式异构体的分子结构

万寿菊(*Tagetes erecta* L.) 为菊科(*Compositae*) 万寿菊属(*Tagetes* L.) 的植物, 原产于中美洲, 其花含有丰富的类胡萝卜素化合物, 可超过鲜重的 0.2%(W/W)。万寿菊花中的主要类胡萝卜素化合物为叶黄素酯^[5]。叶黄素酯可通过水解成叶黄素单体。因此, 万寿菊的花被认为是制备叶黄素的理想天然资源。

从万寿菊花中制备叶黄素时, 首先须从花中萃取叶黄素酯。目前, 我国制备叶黄素酯的产业主要采用的是有机试剂萃取法。常用的萃取剂为正己烷和醚类。这种方法已被采用多年, 其产率和产品质量相当稳定。但由于产品中萃取剂的残留影响了产品的安全性, 改造和完善萃取技术的努力一直在持续。超临界流体萃取技术是一种使用超临界流体作为萃取剂的萃取技术, 具有许多优点, 如: 高效、降低了运行成本、产品中无有毒试剂残留等。常用的超临界流体为 CO₂, 其极性非常低, 与正己烷相当。同时, 叶黄素酯也是一类低极性的化合物(明显低于叶黄素单体)。因此, 应用超临界 CO₂ 流体萃取叶黄素酯是可能的。本项研究的目的即为进行这一探索。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

万寿菊干花颗粒 来自于莲春色素公司, 其含水量为 13%(V/W), 在萃取前, 使用粉碎机将干花颗

收稿日期: 2005-09-22

作者简介: 惠伯棣(1959-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 类胡萝卜素化学与功能性食品。

基金项目: 北京市教育委员会科技发展计划面上项目(200411417003)资助。

粒粉碎,过标准筛,收集不同粒径的组分用于萃取;正己烷(分析纯)、乙醇等均购自北京化工厂;乙腈、乙酸乙酯均为色谱纯试剂,购自迪马公司(Dikma Technologies)。

超临界流体萃取设备购自日本分光公司(JASCO),由图2所示部件组成;HPLC购自于Waters Co.,包括Waters 600E溶剂输送系统、PDA-996二极管阵列检测器等;紫外-可见分光光度计为SHIMADZU Multispec-1501型。

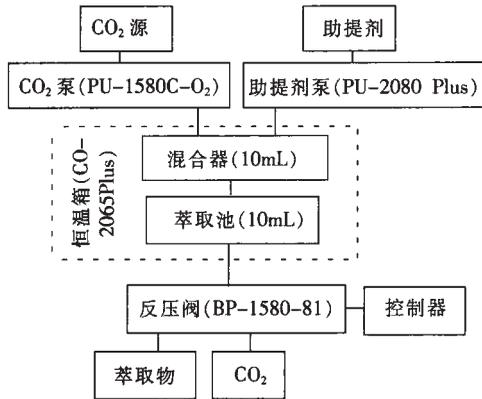


图2 超临界流体萃取设备

1.2 实验方法

1.2.1 正己烷萃取 取一定量的万寿菊干花颗粒于研钵中加入2~4倍体积(V/W)的正己烷研磨4~6遍,收集、合并上清液。使用真空旋转干燥仪,在45℃、-0.08MPa、60r/min条件下浓缩萃取液至原体积的1/4(V/V),定容。

1.2.2 超临界流体萃取 在本项研究中,对万寿菊干花颗粒粉末进行了一系列动态超临界CO₂萃取。萃取操作过程包括恒定压力和恒定温度过程。在所有过程中,超临界流体的流速始终恒定。萃取物收集在反压阀后的收集管中。在每个萃取过程完成后,用2mL左右的正己烷冲洗整个流路,包括萃取池和反压阀。合并收集清洗液于样品收集管中。将萃取物的正己烷溶液定容,待分析。

1.2.3 萃取物中总叶黄素酯含量分析 在紫外-可见分光光度计上测定干花颗粒正己烷萃取液和SFE萃取物正己烷溶液的吸收光谱,并在最大吸收波长处测定其吸光值,根据下式计算其中叶黄素酯的浓度:

$$x = (A \times y) \times (A^{1\%}_{1\text{cm}} \times 100) \quad (1)$$

其中:

x=样品中所含的叶黄素类化合物数量(g),

y=样品溶液的体积(mL)

A=样品的光密度值

$A^{1\%}_{1\text{cm}}$ =吸光系数,为在1cm光程长的比色杯中1%(W/V)浓度溶质的理论吸收值。在此,采用值为

2200。

1.2.4 数据处理与表达 在本项研究中,每个萃取过程重复3次,3次重复值的离差<5%,取3次的平均值为结果。

2 结果与讨论

2.1 干花颗粒中的总叶黄素酯含量

由于万寿菊干花颗粒中的总类胡萝卜素中叶黄素酯占有很大的比例,因此,在本项研究中采用了测定总类胡萝卜素含量的方法来测定样品中总叶黄素酯的含量。图3为干花颗粒正己烷萃取物的紫外-可见吸收光谱图,其最大吸收峰在445nm处。根据该处的吸光值,按公式(1)计算出干花颗粒中总叶黄素酯的正己烷萃取率为13.504mg/g干重。

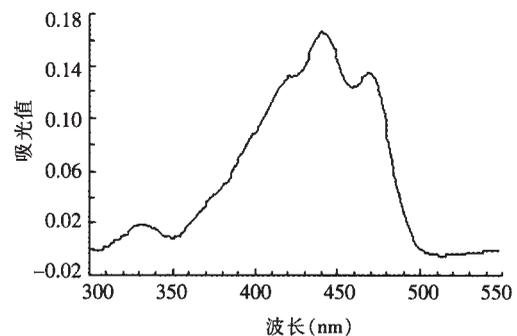


图3 叶黄素酯的电子吸收光谱图

2.2 压力变化对超临界CO₂流体萃取率的影响

在进行恒定温度的超临界流体萃取时,当CO₂的压力从15MPa上升至45MPa时,萃取率呈明显上升趋势,见图4。由于超临界CO₂流体的压力与密度存在的正相关关系,而超临界流体的密度又与其溶解力呈正相关关系,因此,图4表明的结果,即增加CO₂的压力导致萃取率的上升是可以解释的。

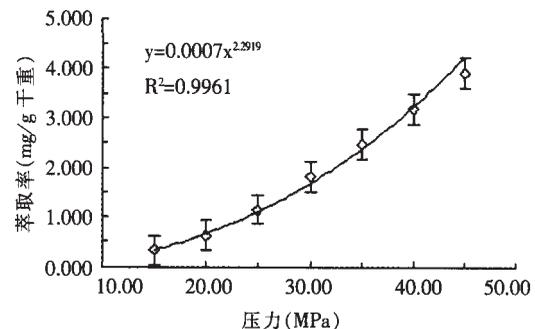


图4 压力对萃取率的影响

萃取条件:超临界流体CO₂温度45℃,流速4.0mL/min;样品量0.5g,样品粒径<0.015mm;总萃取时间20min。

2.3 温度变化对超临界CO₂流体萃取率的影响

在进行恒定压力的超临界流体萃取时,当CO₂的温度由35℃升至60℃时,萃取率变化不明显,见图5。鉴于超临界CO₂流体的温度与密度存在的负相关

关系,随着萃取温度的升高,萃取率应当呈下降趋势。图5所表明结果可能是由于温度的升高导致了叶黄素酯分子吸收了能量,使之更易于进入CO₂相所致。这种情况在萃取其它化合物时亦可见到。众所周知,叶黄素酯是热不稳定化合物,高温可导致其发生几何异构和降解。所以,在本项研究中,所选择的最高温度为60℃。

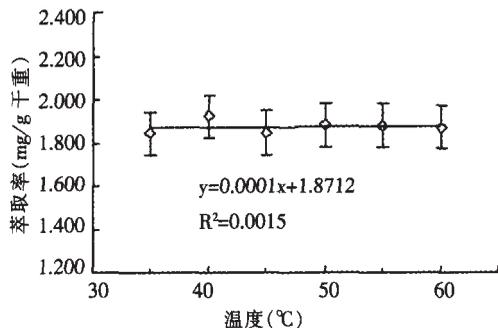


图5 温度对萃取率的影响

萃取条件:超临界流体 CO₂;压力 30MPa;流速 4.0mL/min; ;
样品量 0.5g;样品粒径<0.015mm;总萃取时间 20min。

2.4 样品粒径的变化对超临界 CO₂ 流体萃取率的影响

本项研究的结果表明,除压力和温度变化外,样品粒径的变化对萃取率也有明显的影响。图6显示,在恒定压力和温度下,样品的粒径越小,萃取率越高。这一结论在工业规模的生产中应用时会有一定的局限性。在用于工业生产的超临界流体萃取设备上,很难在萃取釜的出口部使用烧结板,而多采用筛网。如果物料的粒径太小,物料中的小颗粒就有进入分离釜的可能性,最终导致产品纯度的下降。

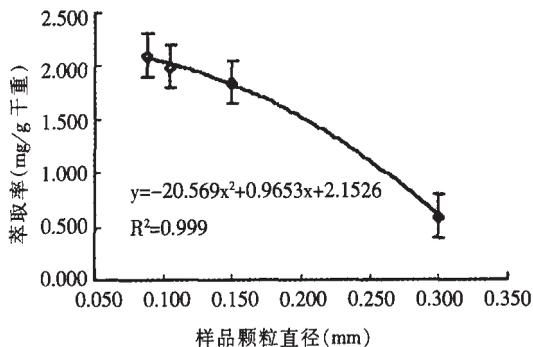


图6 样品粒径对萃取率的影响

萃取条件:超临界流体 CO₂;压力 30MPa;温度 45℃;
流速 4.0mL/min;样品量 0.5g;总萃取时间 20min。

2.5 助提剂的使用对超临界 CO₂ 流体萃取率的影响

向萃取剂中添加助提剂是超临界流体萃取技术中的一种常用手段,目的是提高萃取率和萃取效率。常用的助提剂一般为小分子有机化合物,它们的作用是改变萃取介质的极性。考虑到产品的安全性,在本项研究中只采用两种有机试剂作为助提剂,即乙

醇和正己烷,而且也并未进行使用量变化的尝试。因此,在本项研究中对助提剂进行的尝试,准确地讲,是对助提剂种类对萃取率的影响进行的调查,结果详见图7。

图7显示,在恒定压力、温度和样品粒径的条件下,使用助提剂可以比不使用助提剂明显地提高萃取率。同时,使用2.5%(V/V)的正己烷可以获得较高的萃取率。在分析这一观察结果时,首先考虑的因素是助提剂破坏叶黄素酯与花瓣组织介质的关联作用。助提剂的这一作用使叶黄素酯能更有效地进入CO₂相,从而提高了萃取率。其次,助提剂的极性也应当被考虑。正己烷的极性只有0.01(AI₂O₃),它的使用导致了较高的萃取率。这一结果提示,进一步降低萃取介质的极性可以提高萃取率。

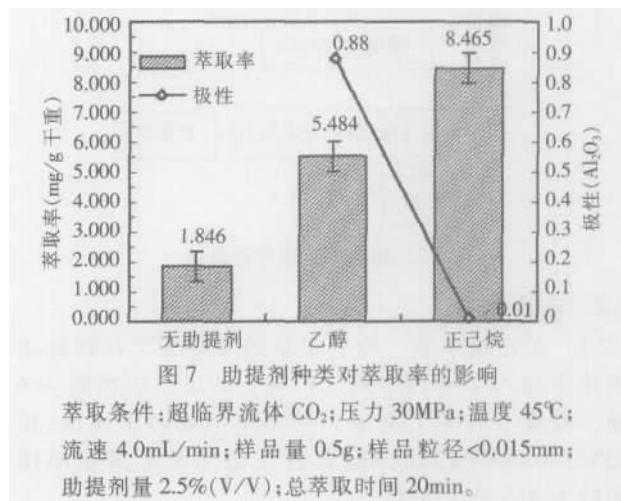


图7 助提剂种类对萃取率的影响

萃取条件:超临界流体 CO₂;压力 30MPa;温度 45℃;
流速 4.0mL/min;样品量 0.5g;样品粒径<0.015mm;
助提剂量 2.5%(V/V);总萃取时间 20min。

2.6 正己烷与超临界流体萃取法产率的比较

本项研究的即为探讨应用超临界 CO₂ 萃取法萃取叶黄素酯的可能性。因此,与现有制备技术(溶剂萃取法)在萃取率等方面进行比较是十分必要的。考虑到我国国产超临界流体萃取设备的工作压力上限和产品的安全性,在本项研究中,选择使用2.5%(V/V)乙醇助提剂所得到的萃取率与正己烷萃取的产率进行了比较(见图8)。图8显示,在30MPa和45℃的条件下,使用乙醇作为助提剂所获得的萃取率与正己烷萃取法的萃取率分别为5.484和13.504mg/g干重。

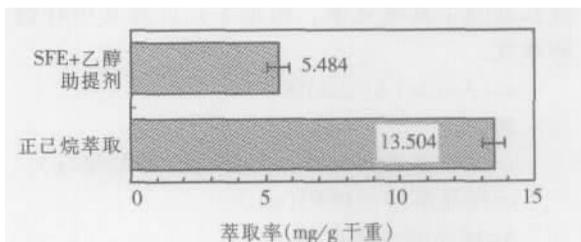


图8 正己烷萃取法与超临界流体萃取法的萃取率比较

注:萃取条件同图7。(下转第107页)

宜的发酵工艺,在正交实验确定的最佳用量下,分别进行先糖化24h再入罐发酵和不经糖化直接入罐发酵两个实验,发酵20d后,对比出酒率,并测定酒醅的残糖量和酸度,结果见表3。

表3 不同工艺的出酒率及酒醅残糖量、酸度

实验号	发酵工艺	出酒率 (%)	酒醅残糖量 (%)	酒醅酸度 (%)
1	先糖化24h 后密封发酵	38.82	2.60	3.76
2	直接密封发酵	44.50	3.01	1.24

在表3中可看到,两种工艺的出酒率有明显的差异,直接发酵的出酒率比先糖化后发酵的提高了5.68%,且酒醅酸度也明显低于经糖化的酒醅。这个实验结果进一步证实了先糖化后发酵工艺会使原料受到杂菌的污染,因此,确定木豆酒适宜的工艺应该是原料经蒸制、摊凉、加曲后直接入罐发酵。另外,表中1号样出酒率为38.82%,均高于正交实验中的9个样品,也验证了正交实验的准确性和重现性。

2.3 发酵时间的确定

在已确定的最佳原料、酒曲用量和直接入罐发酵工艺条件下,设计不同的发酵时间,根据出酒率确定适宜的发酵时间,结果如图2所示。随着发酵时间的延长,出酒率也在不断增加,从15d延长至25d,出酒率增加幅度较大,从35.32%到52.82%,增加了17.5%;到30d时,出酒率为54.8%,即25d后出酒率

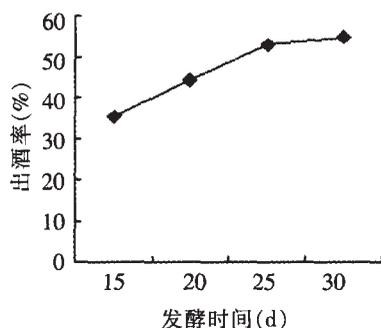


图2 不同发酵时间的出酒率

增加幅度不大,30d后趋于平稳,所以发酵时间30d较适宜。

3 结论

3.1 木豆淀粉平均含量为54.7%,且容易栽培,产量高、成本低,是酿造小曲白酒的较好原料,但木豆营养成分十分丰富,生产过程中容易被杂菌污染,因此,木豆小曲酒的生产应采用不经保温糖化,直接入罐发酵的工艺。

3.2 为了使木豆酒口感丰富,香气更加浓郁,需在木豆原料中加入一定比例的高粱,通过正交实验确定木豆与高粱用量比为1:1,小曲用量为1.2%,糖化酶用量为0.4%,高活性酵母用量为0.5%,在此条件下发酵30d,出酒率以50%(v/v)计可达到54.8%。

3.3 用以上工艺酿造的木豆小曲白酒,酒体无色、清亮透明、无悬浮物、无沉淀;香气清香纯正;口感柔和、有木豆独特回味。本次实验选用的酒曲为市售的传统小曲,对木豆这种新型原料缺乏针对性,因此出酒率偏低。下一步有待对木豆的淀粉结构进行深入研究,筛选出适宜的、针对性较强的菌种,进一步提高出酒率,研制出更加完善的木豆蒸馏酒,这样不仅有利于木豆资源的综合利用,也为酒类市场增添一个新的品种。

参考文献:

- [1] 宗绪晓.木豆[M].大连:大连出版社,2003.204~221.
- [2] 刘秀贤,李正红,张建云.不同种皮色木豆蛋白质淀粉含量的研究[J].林产化学与工业,2002,22(3):49~52.
- [3] 章克昌.酒精与蒸馏酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2004.
- [4] 黄伟坤.食品检验与分析[M].北京:中国轻工业出版社,1989.
- [5] 赵文红,李明南,常杰林.酿酒发酵基质的比较实验[J].中国酿造,2003(6):29~31.
- [6] 王民俊.小曲米酒生产工艺(一)[J].酿造科技,2003(1):114~116.

(上接第98页) 3 结论

本项研究的结果表明,提高萃取压力、减小样品颗粒粒径以及减小萃取介质的极性均可增加叶黄素酯的萃取率。进一步破坏叶黄素酯与花瓣组织介质的关联程度和降低萃取介质极性的技术是今后提高萃取率的关键,也是目前利用超临界流体萃取技术萃取叶黄素酯研发的主要内容。

参考文献:

- [1] 惠伯棣(主编).类胡萝卜素化学及生物化学[M].北京:中国轻工业出版社,2005.267~269.

- [2] Schupp C, Olano-Martin E, Gerth C, et al. Lutein, zeaxanthin, macular pigment and visual function in adult cystic fibrosis patients[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79: 1045~1052.
- [3] Stahl W. Macular carotenoids: lutein and zeaxanthin [J]. Dev Ophthalmol, 2005, 38:70~88.
- [4] Park J S, Chew B P, Wong T S. Dietary lutein absorption from marigold extract is rapid in BALB/c mice[J]. Nutr, 1998, 128(10): 1802~1806.
- [5] 廖萍泰,惠伯棣,裴凌鹏,等.叶黄素的体外抗氧化功能[J].食品与发酵工业,2005,31(4):46~49.