

万寿菊中叶黄素的提取皂化工艺

王振^{1,2} 韩鲁佳^{1,2} 王唯涌^{1,2,3}

(1. 中国农业大学工学院, 北京 100083; 2. 现代精细农业系统集成研究教育部重点实验室, 北京 100083;
3. 中国水产科学研究院, 北京 100039)

摘要 以四氢呋喃为提取剂,对常温下万寿菊中叶黄素的同时提取皂化工艺进行研究。分别考察了溶剂倍量、反应时间、KOH乙醇溶液质量浓度对叶黄素提取率的影响,结果表明溶剂倍量和反应时间对叶黄素提取率有较显著的影响。在单因素试验的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察3种因素对叶黄素提取率的影响,以提取率和HPLC检测量为指标综合考虑,优化工艺参数为:溶剂倍量50 mL/g,反应时间6 h, KOH乙醇溶液质量浓度0.15 g/mL,此条件下叶黄素提取率达到90%以上。

关键词 叶黄素; 万寿菊; 皂化; 正交试验

中图分类号 R 284.2

文章编号 1007-4333(2006)02-0031-04

文献标识码 A

Extracting and saponifying technologies of lutein from marigold

Wang Zhen^{1,2}, Han Lujia^{1,2}, Wang Weiyong^{1,2,3}

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Key Laboratory of Modern Precision Agriculture System Integration, Ministry of Education, Beijing 100083, China;

3. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039)

Abstract Using tetrahydrofuran (THF) as extracting solvent, extracting and saponifying technologies from marigold were studied at room temperature. The effects of THF volume, reaction time and concentration with potassium hydroxide in ethanol on the yield of lutein extraction were researched. The results show that THF volume, reaction time have a remarkable effect on the yield of lutein extraction. Based on the experiments, the orthogonal experimental design was adopted in the extraction process. The effects of THF volume, reaction time, and concentration of potassium hydroxide in ethanol on the yield of lutein extraction and the lutein detection content with the HPLC method were investigated by the orthogonal experiments of $L_9(3^4)$, which suggests an optimum extracting technology that THF volume is 50 mL/g, reaction time 6 h, and concentration with potassium hydroxide in ethanol 0.15 g/mL. The lutein yield is more than 90% using the optimized technology.

Key words lutein; marigold; saponification; orthogonal experiment

万寿菊是富含叶黄素类物质的天然原料^[1],万寿菊提取物在国际上已商业化。

叶黄素属于类胡萝卜素类的四萜类化合物^[2],广泛存在于花卉、水果、蔬菜等植物中。纯度较高的叶黄素为橙黄色粉末,有弱的干草气味,难溶于水、甲醇等极性较高的溶剂,易溶于四氢呋喃、乙酸乙酯、石油醚等极性较低的有机溶剂中^[3]。叶黄素的潜在价值包括提高免疫功能、抑制细胞质自身氧化、

保护细胞单元免受氧化剂带来的破坏,治疗癌症、以及防治老年人视黄斑退化等^[4]。目前叶黄素类物质的制备工艺,如化学合成^[5]和发酵工艺^[6]等,都面临着化学合成中不能有效除去毒性溶媒,以及得率低的问题^[5]。可行的方法就是改进叶黄素类物质的制备方法。通过改进提取工艺提高叶黄素类物质提取率已有报道^[3,7],但处理过程需较高的温度(70)和较长的处理时间,从而导致叶黄素的降解

收稿日期: 2005-10-25

基金项目: 北京市科技计划项目课题(Y0704003040511)

作者简介: 王振,硕士研究生;韩鲁佳,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事生物质资源开发与利用研究, E-mail: hanlj@cau.edu.cn

和异构体的出现^[8]。另外,万寿菊中游离叶黄素含量非常低,大部分与月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸等饱和脂肪酸结合成为叶黄素酯^[9]。游离叶黄素可被人体和禽类直接吸收利用,而以叶黄素酯形式存在的叶黄素不易被人体和动物吸收^[7],因此提取和分离游离叶黄素已成为研究焦点之一。

Philip^[10]于1977年进行提取叶黄素的研究,最终得到的产品以叶黄素酯的形式存在,得率为2.1%、提取率约51%。随后,其他研究人员^[3,11]从西方雪果、红辣椒、羽衣甘蓝和菠菜中分离出游离的叶黄素,其质量分数约为70%~80%,但提取和分离过程费时费力且需要大量的有机溶剂。本研究以四氢呋喃为提取剂,在常温下对万寿菊中叶黄素的同时提取皂化工艺进行研究,旨在获得一种提取率高,提取皂化过程中损失少的游离叶黄素提取皂化工艺。

1 材料与方 法

1.1 试验原料、试剂及仪器

原料:万寿菊花瓣,产自内蒙古赤峰,经真空冷冻干燥、粉碎后过20目筛。

试剂:氢氧化钾(KOH)、乙醇、正己烷、四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)、丙酮、甲苯、乙酸、乙酸乙酯,分析纯;叶黄素标准品购自美国 Chromadex 公司;乙腈、乙酸乙酯,色谱纯。

仪器:电子精密天平,奥豪斯国际贸易公司;AB204-E型电子分析天平,瑞士梅特勒公司;LXI-B型低速大容量多管离心机,上海华亨科学仪器厂;LG-18型冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;高效液相色谱仪(MODEL L-7200自动进样器, L-7420/L-7420S型紫外可见检测器, MODEL L-7300柱温箱, MODEL L-7100泵; L-7610真空脱气机,日立);TU1800SPC紫外可见光光度计,北京普析通用公司。

1.2 标准曲线的绘制

色谱柱为 SupelocosiTM C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);紫外检测波长 447 nm;柱温 26 °C;流动相 A 为乙酸乙酯,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱的时间范围:0~35 min 内乙腈体积比从 100%降低到 0, 35.1~40 min 内乙腈体积比保持 100%不变;流速 1 mL/min,进样量 10 μL。

精确称取 8.7 mg 叶黄素标准品,THF 溶解后,用乙酸乙酯定容至 25 mL,使其质量浓度为 0.348 0

mg/mL;用乙酸乙酯分别稀释,其质量浓度为:0.174 0、0.104 4、0.069 6、0.034 8 和 0.013 9 mg/mL。在紫外可见光光度计上用乙酸乙酯作对照,对叶黄素标准品在 200~600 nm 波段扫描,确定最大吸收波长。

1.3 万寿菊中叶黄素提取皂化试验设计

提取皂化工艺为:将冷冻干燥后的万寿菊粉碎过筛,按比例加入提取剂 THF 和 KOH 的乙醇溶液,在氮气保护下反应,后经过滤,淋洗,浓缩,将得到的提取液调 pH 至中性,离心(3 000 r/min) 10 min,得到主要含叶黄素的沉淀物,用乙酸乙酯溶解沉淀物,定容后用 HPLC 法测定叶黄素含量。

$$\text{叶黄素得率} = \frac{\text{叶黄素质量}}{\text{万寿菊质量}} \times 100\% \quad (1)$$

叶黄素提取率 =

$$\frac{\text{叶黄素质量}}{\text{万寿菊质量} \times \text{万寿菊中叶黄素含量}} \times 100\% \quad (2)$$

本研究选择 THF 为提取溶剂,而没有选择常用的正己烷:理论上,THF 沸点低、毒性小、容易除掉,对类胡萝卜素有很强的溶解性,而且在 THF 溶剂中加入碱性物质,可以使万寿菊中叶黄素提取皂化在同一步骤中完成,这样可以减少叶黄素与空气接触时间而减少叶黄素的损耗(试验中,笔者采用正己烷为提取溶剂,以同时提取皂化工艺提取,得到的叶黄素极少或根本得不到)。根据美国食品与医药管理部门(FDA)对物质中残留溶剂的规定,乙醇和 THF 都属于三等级限制使用溶剂。

1.3.1 单因素试验

1) THF 溶剂倍量对叶黄素得率的影响。精确称取 4 份各 1 g 的万寿菊干粉样品,分别加入 20、30、40 和 50 mL 的 THF,并各加入 25 mL 0.1 g/mL KOH 的乙醇溶液。反应器中充入氮气后密封,在室温条件下充分混合均匀;反应 16 h 后停止,过滤除去残渣;滤液减压浓缩几乎为固体,将得到的固体溶解于 100 mL 乙醇水溶液(体积比 1:1)中,用乙酸调节 pH 至中性;离心除去上清液,得到的沉淀物用乙酸乙酯溶解并定溶到 25 mL。

2) 反应时间对叶黄素得率的影响。精确称取 4 份各为 1 g 的万寿菊干粉样品,分别加入 40 mL 的 THF 和 25 mL 0.1 g/mL 的 KOH 乙醇溶液,反应器充入氮气后密封,在室温条件下充分混合均匀,反应时间分别为 4、6、8 和 10 h;以下操作同 1)。

3) KOH 乙醇溶液的质量浓度对叶黄素得率的

影响。精确称取 4 份各为 1 g 的万寿菊干粉样品, 分别加入 40 mL THF 后, 再分别加入 25 mL 0.05、0.1、0.15 和 0.20 g/mL 的 KOH 的乙醇溶液, 反应器充入氮气后密封, 在室温条件下充分混合均匀, 反应 8 h; 以后操作同 1)。

1.3.2 正交试验

在单因素基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计进行试验, 研究提取皂化叶黄素的最佳工艺参数。

1.4 检测分析方法

叶黄素含量的测定, 前处理提取方法按 AOAC 970.64^[12], 提取液 pH 调至中性后, 采用 HPLC 法测定叶黄素含量。试验数据用 SPSS 软件分析, 单因素试验以叶黄素得率为指标, 正交试验以叶黄素提取率和 HPLC 检测量为指标。

2 结果与讨论

叶黄素对光和温度敏感极易被氧化, 因此叶黄素的提取分离需在避光、密封、低温条件下进行。乙酸酸性较弱, 调 pH 时浮动较小; 用乙醇水溶液 (体积比 50%) 洗涤, 除去花青素和反应生成的钾盐, 同时除去沉淀中的甾醇类物质。Khachik^[11] 在研究中采用体积比为 50% 的乙醇水溶液多次大量洗涤皂化后的产物, 使其至中性, 而不用乙酸调节 pH; 笔者在研究中发现采用 Khachik 的方法洗涤会带走大量叶黄素, 用乙酸调节产物酸碱度会避免这种情况。

2.1 标准曲线

经紫外可见分光光度计扫描, 叶黄素标准品最大波长为 447 nm。此波长下采用 HPLC 法测定标准溶液中叶黄素的质量浓度, 叶黄素标准曲线见图 1。可见, 叶黄素质量浓度为 13.9 ~ 174.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 峰面积与叶黄素质量浓度呈良好的线性关系, 回归方程为 $y = 0.0622x - 0.0294$, $R^2 = 0.9995$ 。

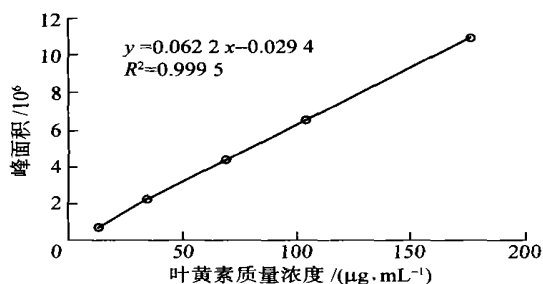


图 1 叶黄素标准曲线

Fig. 1 The standard curve of lutein

2.2 单因素试验

图 2 示出溶剂倍量、反应时间和 KOH 乙醇溶液的质量浓度对叶黄素得率的影响。

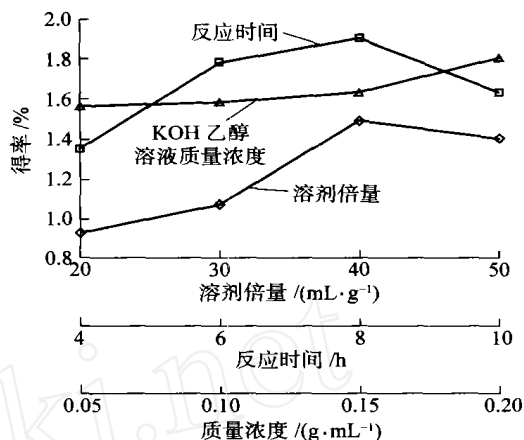


图 2 溶剂倍量、反应时间和 KOH 乙醇溶液质量浓度对叶黄素得率的影响

Fig. 2 Effect of different solvent, reaction time and concentration with potassium hydroxide in ethanol on the yield of lutein

1) THF 溶剂倍量对叶黄素得率的影响。

当 THF 溶剂倍量为 40 mL/g 时, 叶黄素得率最高, 为 1.48%; 进一步增大溶剂倍量到 50 mL/g, 叶黄素得率不再增加, 而稍有下降, 为 1.39%。

2) 反应时间对叶黄素得率的影响。

当反应时间为 8 h 时, 叶黄素得率最高, 达 1.90%。这是由于反应时间过短时, 一部分叶黄素酯没有提取出来, 而已提取出来的叶黄素酯没有皂化完全 (可从提取液的液相色谱图检测); 当时间过长时, 有一部分游离叶黄素转化成玉米黄质, 在空气中氧化而使叶黄素得率降低, 反应时间 10 h 的得率为 1.63%。

3) KOH 乙醇溶液的质量浓度对叶黄素得率的影响。

KOH 乙醇溶液的质量浓度越大, 叶黄素得率越高, 质量浓度为 0.2 g/mL 时得率为 1.81%。但 KOH 在乙醇中较难溶解, 当其质量浓度为 0.2 g/mL 时几乎达到其溶解的最大限度, 所以实验中不再有提高浓度。

2.3 正交试验

正交试验提取皂化叶黄素结果见表 1。

在所设因素水平下, 溶剂倍量越大, 叶黄素检测量和提取率越大。主要原因是: 溶剂倍量越大, 万寿菊中叶黄素酯提取越充分, 提取的叶黄素酯与碱性分子接触面积越大, 其酯与碱反应就越充分, 得到的

表1 叶黄素提取皂化正交试验结果分析

Table 1 Analyzing tabulation of lutein extracting and saponifying through the orthogonal test

试验号	反应时	溶剂倍量/	碱浓度/	试验结果	
	间/h	(mL g ⁻¹)	(g mL ⁻¹)	检测量 /	提取
	A	B	C	($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	率/ %
1	1(6)	1(30)	1(0.10)	55.21	71.93
2	1(6)	2(40)	2(0.15)	68.85	89.70
3	1(6)	3(50)	3(0.20)	68.22	88.87
4	2(8)	1(30)	3(0.20)	56.19	73.20
5	2(8)	2(40)	1(0.10)	55.01	71.66
6	2(8)	3(50)	2(0.15)	65.94	85.90
7	3(10)	1(30)	2(0.15)	53.13	69.21
8	3(10)	2(40)	3(0.20)	55.88	72.80
9	3(10)	3(50)	1(0.10)	69.00	89.88
K_1	192.28	164.53	175.96		
K_2	173.88	176.48	187.92		
K_3	178.00	203.15	180.29		
k_1	64.09	54.84	58.65		
k_2	57.96	58.83	62.64		
k_3	59.33	67.72	60.10		
R_j	6.13	12.88	3.99	$j=1,2,3$	
较优水平	A ₁	B ₃	C ₂		
因素主次	B	A	C		

注: 1 g 万寿菊提取皂化后的产物按体积比 1:250 稀释, HPLC 检测。

游离叶黄素量就越多。

反应时间的影响次之。万寿菊中叶黄素的提取率不随反应时间的延长而增高,这是因为随着反应时间的延长,一些叶黄素转化成为玉米黄质,有一部分叶黄素在空气中被氧化,反应时间越长,叶黄素转化的量和被氧化的量就越多。

KOH 乙醇溶液浓度的影响最小。KOH 的量不能太大,否则在后面中和操作步骤中会消耗大量乙酸,而且需要大量的水洗去生成的盐,造成叶黄素的损失。本研究没有选择氢氧化钠和其他碱皂化是因为 KOH 较易溶于乙醇且生成没有毒性的钾盐。

以提取率为考查指标,万寿菊中叶黄素同时提取皂化最佳工艺为 A₁B₃C₂,即溶剂倍量为 50 mL/g,反应时间 6 h, KOH 乙醇溶液质量浓度为 0.15 g/mL。由于此最佳工艺参数在设计的试验中没有出现,为验证该结果的准确性,对上述优化工艺进行试验操作,得到叶黄素的提取率在 90% 以上,可见此优化工艺是可靠的。

3 结论

1) 单因素试验结果表明,叶黄素得率随 THF 溶剂倍量的增大而增加,溶剂倍量为 40 mL/g 时得率最高;反应时间增加,叶黄素得率也随着增加,8 h 达到最大值;KOH 乙醇溶液的质量浓度对叶黄素得率影响较小,随着浓度的增加,得率增加较慢。

2) 正交试验得到最佳工艺条件为: THF 溶剂倍量为 50 mL/g,反应时间 6 h, KOH 乙醇溶液质量浓度为 0.15 g/mL 时提取率最高,达 90% 以上。

采用上述优化的同时提取皂化工艺,其步骤较常规工艺简化,得到的叶黄素中有机溶剂残留较少。

参 考 文 献

- [1] Ausich R L, Sanders D J. Process for the formation, isolation and purification of comestible xanthophylls crystals from plants:US,5648564[P]. 1997-07-15
- [2] Alves-Rodrigues A. The science behind lutein [J]. Toxicology Letters,2004,150:57-83
- [3] 宋昊,何泽超.万寿菊花中叶黄素的提取[J].化工设计,2003,13(4):10-12
- [4] Levi L W. Trans-xanthophyll ester concentrates of enhanced purity and methods of making same:US,6191293 [P]. 2001-02-20
- [5] Kreienbuhl P, Rudolph W. Method of making carotenoids:US,6150561[P]. 2000-11-21
- [6] Hirschberg J, Harker M. Carotenoid-producing bacterial species and process for production of carotenoids using same:US,5935808[P]. 1999-08-10
- [7] Khachik. Process for isolation, purification, and recrystallization of lutein from saponified marigold oleoresin and uses thereof:US,5382714[P]. 1995-01-17
- [8] Madhavi D L, Kagan D I. Process for the isolation of mixed carotenoids from plants:US,6380442[P]. 2002-04-30
- [9] Sowbhagya H B, Sampathu S R, Krishnamurthy N. Natural colorant from marigold-chemistry and technology [J]. Food and Reviews International, 2004, 20(1):33-50
- [10] Philip, Thomas. Purification of lutein-fatty acid esters from plant materials: US, 4048203[P]. 1977-09-13
- [11] Khachik. Process for extraction and purification of lutein zeaxanthin and rare carotenoids from marigold flowers and plants:US,6262284[P]. 2001-07-17
- [12] AOAC. Official methods of the association of official analytical chemists, 13th ed.. AOAC: Washington, DC, 1992