

超声波法提取荸荠块茎果肉植物甾醇的工艺研究

刘倩, 杨志刚*, 罗兵, 孙海燕 (常熟理工学院生物工程系, 江苏常熟 215500)

摘要 [目的] 优化超声波法提取荸荠块茎果肉中的植物甾醇的最佳工艺参数。[方法] 采用超声波法提取荸荠块茎果肉中的植物甾醇, 对提取溶剂的种类、溶剂体积分数(V/V)、料液比、提取时间、超声功率分别进行单因素试验, 并在此基础上利用 Box-Behnken 中心组合试验和响应面分析法确定了植物甾醇提取的最佳工艺。[结果] 试验表明, 荸荠块茎果肉植物甾醇的最佳提取工艺条件: 乙醇体积分数为 60%, 料液比为 1:20 g/ml, 提取时间为 9 min, 提取功率为 395 W, 在此条件下测得吸光值为 1.502。[结论] 研究可为荸荠的进一步开发利用提供参考依据。

关键词 荸荠; 植物甾醇; 响应面; 超声波

中图分类号 S645.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)32-11492-04

Study on Phytosterols Extraction from Chufa Tubers Pulp by Ultrasonic
LIU Qian, YANG Zhi-gang*, LUO Bing et al (Department of Bioengineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500)

Abstract [Objective] To optimize technical parameters for extracting phytosterols from chufa tubers pulp by ultrasonic method. [Method] The ultrasonic method was used to extract phytosterols from chufa tubers pulp. Single factor experiments were conducted on extraction solvent types, solvent volume fraction(V/V), solid-liquid ratio, extraction time, ultrasonic power, on the basis of this, Box-Behnken combination experiment and response surface analysis method were adopted to determine the optimal technique of phytosterols extraction. [Result] The results show that the best technological conditions of phytosterols extraction from chufa tubers pulp are: alcohol concentration 60%, the ratio of solid to liquid 1:20 g/ml, extraction time 9 min, ultrasonic power 395 W. Under the above condition, the ultraviolet spectrophotometer absorbance was 1.502. [Conclusion] The study can provide reference basis for further development and utilization of chufa.

Key words Chufa; Phytosterols; Response surface; Ultrasonic

荸荠属莎草科多年生水生草本植物, 喜生于池沼中或栽培在水田里, 具匍匐茎, 先端膨大为球茎, 是我国典型的传统中药, 具有药膳同源之功效, 不光其质脆味佳, 营养丰富, 而且能清心降火、补肺凉肝、消食化痰、破积滞、利脓血等。《中药大辞典》上记载, 荸荠中含有抑菌成分——马蹄英, 该物质对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及产气杆菌均有抑制作用^[1]。还有报道发现, 荸荠的各种制剂在动物体内均有抑制肿瘤细胞的作用^[2]。

植物甾醇是一类以环戊烷全氢菲为骨架的天然醇类化合物。天然植物甾醇种类繁多, 主要包括 β -谷甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇和菜油甾醇 4 种无甲基甾醇^[3]。植物甾醇主要存在于油脂中, 特别是精炼油后的脱臭馏出物中富含植物甾醇, 所以在大多数已报道的研究中, 一般都以脱臭馏出物作为提取原料, 用不同的方法加以提取^[4-8]。甾醇属天然物质, 本身无毒性, 且具有乳化性和稳定性等特点, 因此在医药、食品、化妆品、动物生长剂、植物生长激素及化工、纺织等领域都得到广泛应用^[9]。植物甾醇提取方法有多种, 常见的提取方法有溶剂结晶法、络合法、皂化法、蒸馏法(简单蒸馏法、分子蒸馏法)、吸附法(柱吸附法、高压流体吸附法)、超临界 CO_2 萃取法、酶法等^[10-11], 近年来也有使用超声法提取植物甾醇的研究报道^[12-13]。笔者采用超声波法提取荸荠块茎

果肉中的植物甾醇并确定最佳工艺参数。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要原料试剂。荸荠, 产地苏州, 购于农贸市场; 植物甾醇混合标准品, 上海奥宇生物科技有限公司; 无水乙醇、乙酸乙酯、正己烷、石油醚, 均为分析纯; 试验用水为蒸馏水。

1.1.2 仪器设备。电子天平(LP502B); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用器材有限公司; 高速中药粉碎机(DFT-200), 温岭市林大机械有限公司制造; 超声波细胞粉碎机(FQ-IID), 南京菲齐工贸有限公司; 烘箱(202-3), 上海实验仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理。将荸荠洗净、去皮、烘干、粉碎备用。

1.2.2 最大紫外吸收波长的测定。精确称取 20 mg 植物甾醇混合标准品, 用无水乙醇溶解定容至 25 ml 容量瓶, 以无水乙醇为空白对照, 检测植物甾醇混合标准品的最大紫外吸收波长。

1.2.3 荸荠块茎果肉植物甾醇提取与提取量测定。准确称取 2 g 荸荠块茎果肉粉末, 用一定浓度的提取溶剂以一定的料液比在一定的超声功率条件下提取一定时间, 过滤后, 在 50 ml 容量瓶内以相应浓度的提取溶剂将滤液定容至 50 ml, 于检测的最大紫外吸收波长处测定吸光值。结果以吸光值表示。

1.2.4 最佳提取溶剂的确定。在超声波提取条件下, 选取几种常用溶剂进行比较试验。固定条件: 提取时间 60 min, 料液比 1:20 g/ml, 超声功率 600 W。在超声波提取条件下, 选用无水乙醇、乙酸乙酯、正己烷、石油醚进行提取, 确定最佳提取溶剂。

基金项目 江苏农业科技支撑项目(BE2011445); 苏州市科技计划项目(SZS201102, SYN201110, SNG201323); 江苏省大学生实践创新训练计划项目(201310333032Y); 苏州市吴江区科技计划项目(WN201311, WN201317); 常熟市科技计划项目(CS201205)。

作者简介 刘倩(1992-), 女, 江苏南京人, 助理实验师, 从事生物engineering研究。* 通讯作者, 高级实验师, 从事天然产物研究与开发。

收稿日期 2014-10-08

1.2.5 单因素试验。精确称取荸荠块茎粉末 2 g,以“1.2.4”确定的最佳溶剂为提取溶剂,分别考察不同体积分数的提取溶剂(50%、60%、70%、80%、90%)、料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/ml)、提取时间(5、10、15、20、25 min)、超声功率(200、300、400、500、600 W)对植物甾醇提取率的影响。

1.2.6 响应面法试验。在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 设计,以紫外吸光值为响应值,选取对甾醇产量影响较大的单因素进行响应面试验,通过回归方程和方差分析确定最佳提取工艺条件,并对最佳条件进行验证试验。统计分析软件为 Design-Expert 7.0 专业版本。

2 结果与分析

2.1 提取荸荠块茎果肉中植物甾醇的单因素试验

2.1.1 最佳提取溶剂的选择。通过图 1 可以看出,以石油醚作为提取溶剂时,荸荠块茎果肉植物甾醇的提取量最高,吸光度达到 0.183,其次是无水乙醇,其吸光度为 0.155,两者相差不是很大,而以石油醚作为提取溶剂时,由于其易挥发,溶剂损耗大。所以综合考虑,将乙醇作为提取溶剂。

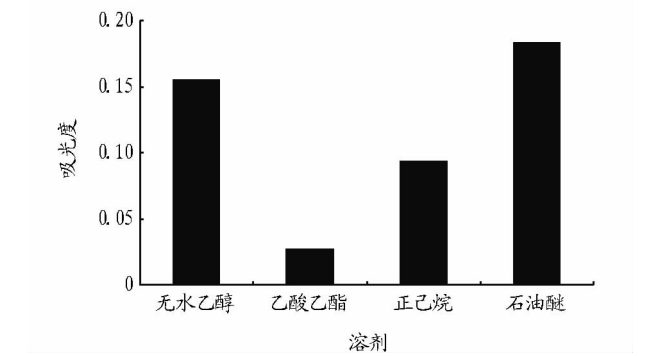


图 1 不同溶剂对荸荠块茎果肉植物甾醇提取量的影响

2.1.2 乙醇体积分数对荸荠块茎果肉植物甾醇提取量的影响。由图 2 可见,当乙醇体积分数介于 60%~70% 时,植物甾醇的提取量出现峰值。随着乙醇体积分数的增大,植物甾醇的提取量呈现先增大后减小的变化。这是由于不同体积分数的乙醇极性和挥发性不同,植物甾醇具有活性基团——羟基,能与乙醇和水形成氢键,而当乙醇体积分数太大时,乙醇挥发损耗大,提取量会降低。因乙醇体积分数 60% 和 70% 的植物甾醇提取量接近,是以乙醇体积分数取 60% 为宜。

2.1.3 料液比对荸荠块茎果肉植物甾醇提取量的影响。由图 3 可以看出,当料液比大于 1:20 g/ml 时,植物甾醇的提取量随着料液比中溶剂用量的增大而增大。这主要是由于随着料液比中溶剂用量的增大,荸荠块茎果肉粉末与提取液接触面的浓度差增大,植物甾醇就容易渗透出来;但是当料液比小于 1:20 g/ml 时,植物甾醇的提取量却随着料液比中溶剂用量的增大而减少。这主要是因为受试验条件所限,超声提取时烧杯口是敞开的,料液比中溶剂用量增大,溶剂损耗增大,所以提取量减少。因此,确定料液比为 1:20 g/ml 最佳。

2.1.4 超声提取时间对荸荠块茎果肉植物甾醇提取量的影

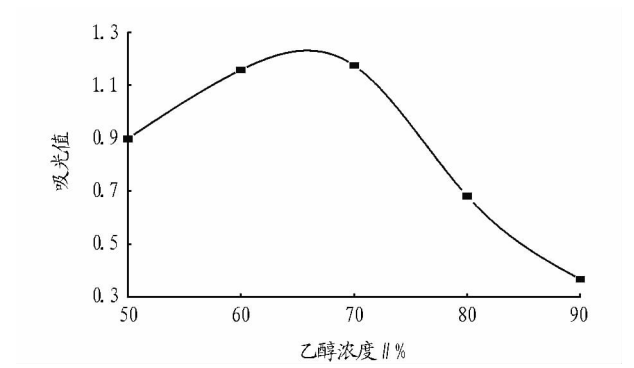


图 2 乙醇体积分数对荸荠块茎果肉植物甾醇提取量的影响

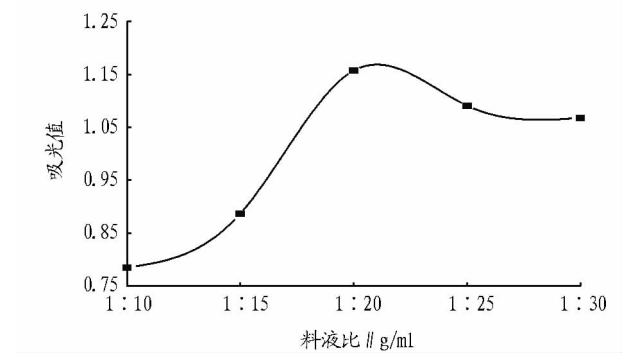


图 3 料液比对荸荠块茎果肉植物甾醇提取量的影响

响。由图 4 可以看出,当超声提取时间小于 10 min 时,超声提取时间越长,植物甾醇的提取量就越大,但当超声提取时间超过 10 min 后,随着超声提取时间的延长,植物甾醇的提取量反而下降。这是由于随着时间的延长,超声提取使得乙醇的损耗增加,另一方面也是由于乙醇的挥发导致的损耗。因此,超声提取时间选择在 10 min 左右达到较高的提取效果。

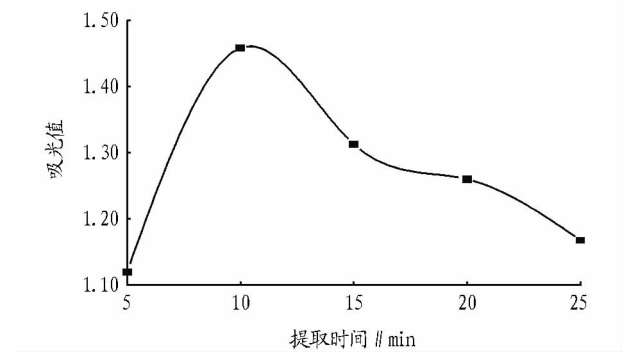


图 4 超声提取时间对荸荠块茎果肉植物甾醇提取量的影响

2.1.5 超声功率对荸荠块茎果肉植物甾醇提取量的影响。由图 5 可以看出,当超声功率小于 400 W 时,超声功率越大,植物甾醇的提取量就越大,这是因为超声功率越大,细胞分子运动加剧,加速了有效成分的溶解和释放,所以植物甾醇的提取量增大。但当超声功率大于 400 W 时,随着超声功率的增大,植物甾醇的提取量反而下降,这或许是因为超声功率增大溶解的杂质的含量也相应增加,从而导致有效成分的提取量下降。

2.2 提取荸荠块茎果肉中植物甾醇的响应面试验 单因素

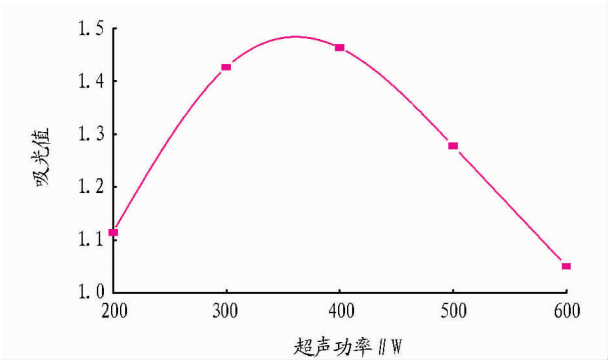


图5 超声功率对荸荠块茎果肉植物甾醇提取量的影响

试验结果表明,料液比、超声提取时间、超声功率对荸荠块茎果肉中植物甾醇的提取量有显著影响。因此,固定乙醇体积分数为60%,通过响应面分析对料液比、超声提取时间、超声功率3个因素进行更深入的研究。分析因素与水平设计见表1,响应面分析方案及试验结果见表2。

水平	因素		
	料液比(X_1)//g/ml	提取时间(X_2)//min	超声功率(X_3)//W
-1	1:15	5	300
0	1:20	10	400
1	1:25	15	500

通过试验软件 Design-Expert 7.0 将表2的结果进行拟合,得到了按实际值计的拟合方程: $Y = -5.964\ 00 + 0.367\ 18X_1 + 0.145\ 63X_2 + 0.014\ 927X_3 - 0.001\ 94X_1X_2 + 0.000\ 010\ 5X_1X_3 + 0.000\ 021X_2X_3 - 0.008\ 519X_1^2 - 0.005\ 869X_2^2 - 0.000\ 019\ 397\ 5X_3^2$ 。

试验的方差分析显示: $F_{模型} = 19.62, P_{模型} = 0.000\ 4; F_{X_1} = 8.42, P_{X_1} = 0.022\ 9; F_{X_2} = 0.31, P_{X_2} = 0.595\ 7; F_{X_3} = 0.78, P_{X_3} = 0.405\ 4; F_{X_1X_2} = 3.14, P_{X_1X_2} = 0.119\ 5; F_{X_1X_3} = 0.037, P_{X_1X_3} = 0.8533; F_{X_2X_3} = 0.15, P_{X_2X_3} = 0.7125; F_{X_1^2} = 63.80, P_{X_1^2} <$

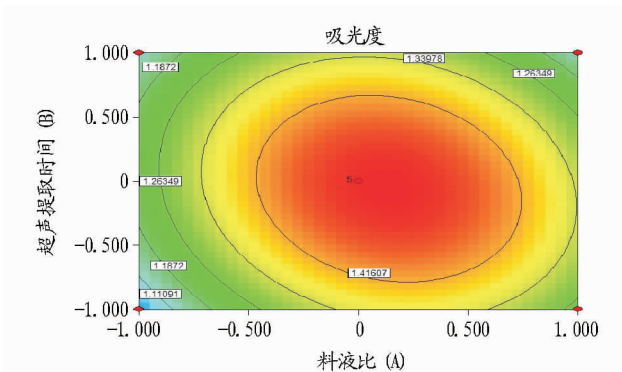


图6 料液比与超声提取时间对植物甾醇提取量的响应面分析

为检验RSA法的可靠性,采用上述最优提取条件进行植物甾醇的提取试验,考虑到实际操作的方便,将条件修正为料液比1:20 g/ml,超声提取时间9 min,超声功率395 W。实际测得提取的植物甾醇紫外吸光值为1.502,与理论预测

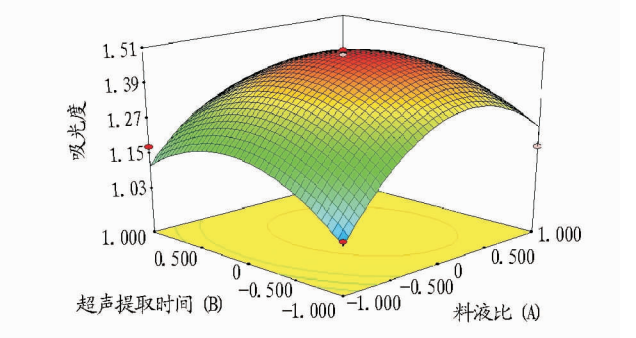
$0.000\ 1; F_{X_2^2} = 30.28, P_{X_2^2} = 0.000\ 9; F_{X_3^2} = 52.92, P_{X_3^2} = 0.000\ 2; F_{失拟} = 109.19, P_{失拟} = 0.000\ 3。$

试验号	因素			吸光值 A_{214}
	料液比 (X_1)//g/ml	超声提取时间 (X_2)//min	超声功率 (X_3)//W	
1	1:20	5	300	1.194
2	1:15	15	400	1.176
3	1:20	10	400	1.486
4	1:25	15	400	1.112
5	1:20	10	400	1.502
6	1:20	5	500	1.175
7	1:20	15	500	1.122
8	1:20	10	400	1.487
9	1:25	5	400	1.178
10	1:20	10	400	1.482
11	1:25	10	500	1.147
12	1:25	10	300	1.207
13	1:20	10	400	1.484
14	1:15	10	500	0.945
15	1:15	10	300	1.026
16	1:20	15	300	1.099
17	1:15	5	400	1.048

由此可知,方程的 F 值为19.62, $F > f_{0.01}(9,7) = 5.61$,说明因变量和全体自变量之间的线性关系显著;模型的 $R^2 = 0.961\ 9$,说明拟合程度较高,即试验方法是可靠的。

由RSA预测最高紫外吸光值为1.493,条件是 $X_1 = 1:20.69\text{ g/ml}, X_2 = 9.69\text{ min}, X_3 = 395.55\text{ W}$ 。因此,用超声波法提取荸荠块茎果肉植物甾醇的最佳工艺条件为:乙醇体积分数为60%,料液比1:20.69 g/ml,超声提取时间为9.69 min,超声功率为395.55 W。

响应曲面图及其等高线图见图6~8。由图6~8可看出,3个响应面均为开口向下的凸曲面, $X_1、X_2$ 和 X_3 3个因素与甾醇提取量呈抛物线关系,且在考察范围内存在响应值的极高点。



值相比,相对误差是0.6%。因此,采用RSA法优化得到的工艺条件参数准确可靠,具有使用价值。

3 结论

体积分数为60%的乙醇为超声提取荸荠块茎果肉中植

物甾醇的理想溶剂,响应面优化得到的最佳提取工艺条件为:料液比为 1:20 g/ml,超声提取时间为 9 min,超声功率为 395 W,2 g 荸荠块茎粉末提取的植物甾醇的紫外吸光值理论可达到 1.493,验证试验值为 1.502,与理论值相对误差为 0.6%。

荸荠块茎果肉植物甾醇提取的优化数学回归模型: $Y = -5.964\ 00 + 0.367\ 18X_1 + 0.145\ 63X_2 + 0.014\ 927X_3 - 0.001\ 94X_1X_2 + 0.000\ 010\ 5X_1X_3 + 0.000\ 021X_2X_3 - 0.008\ 519X_1^2 - 0.005\ 869X_2^2 - 0.000\ 019\ 397\ 5X_3^2$ 。

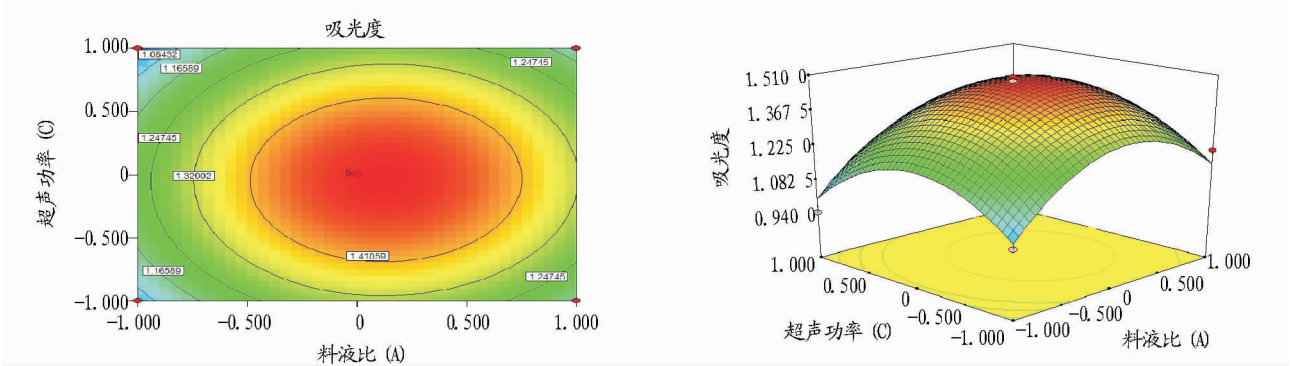


图 7 料液比与超声功率对植物甾醇提取量的响应面分析

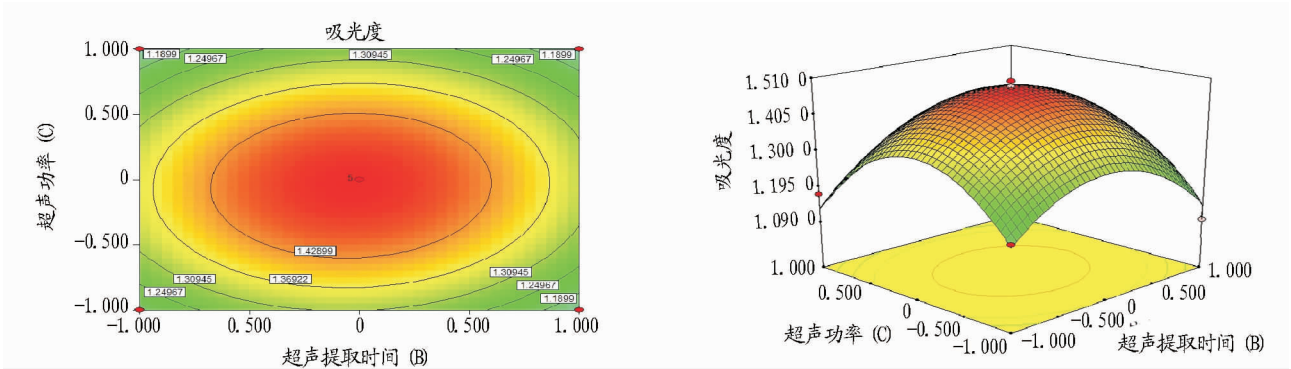


图 8 超声提取时间与超声功率对植物甾醇提取量的响应面分析

参考文献

[1] 刘欣,赵力超,周爱梅.荸荠产粉废浆中功能组分及其功能效果的初步研究[J].食品科学,2006,27(2):251-255.

[2] 盛继群.孝感荸荠种质资源及应用价值[J].氨基酸和生物资源,2002,24(3):11-13.

[3] 诸爱士,李卢川.响应面优化菜籽毛油甾醇提取[J].中国粮油学报,2011,26(7):63-67.

[4] 刘亮,杨根.皂化酸解法提取菜籽油脱臭馏出物中植物甾醇的工艺研究[J].浙江化工,2008,39(9):1-5.

[5] 姜洪峰,钱俊青.菜籽油脱臭馏出物中天然 V_E 和植物甾醇提取工艺研究[J].中国粮油学报,2007,22(3):115-121.

[6] 姜绍通,邵平,潘丽军.菜籽油脱臭馏出物中甾醇分离的甲酯化过程优化研究[J].农业工程学报,2006,22(2):164-167.

[7] 李脉,王舰平.脱臭馏出物酶法制备植物甾醇酯的研究[J].现代食品科技,2006,22(3):96-99.

[8] 高晶.脱臭馏出物中甾醇的提取与精制工艺研究[J].华南理工大学学报,2004,21(1):49-53.

[9] 周宝兰.植物甾醇的应用[J].中国油脂,1992,17(4):33-38.

[10] THOMAS S C, THOMAS H J, JOHNC G. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae mammosides* L.) seed oil; extraction and identification [J]. Food Chemistry, 2007, 101: 1633-1639.

[11] 庞利苹,徐雅琴.植物甾醇提纯及单体分离工艺的研究进展[J].中国粮油学报,2010,25(3):124-128.

[12] 张泽生,于卫涛.超声波法提取米糠中植物甾醇的工艺研究[J].食品研究与开发,2007,28(1):43-46.

[13] 陈红梅.超声波法提取红曲中麦角甾醇的条件优化研究[J].安徽农学通报,2007,13(7):84-85.

[14] L. peel [J]. Food Chem, 2010, 119: 851-858.

[15] 樊黎生,张声华,吴小刚.微波辅助提取黑木耳多糖的研究[J].食品与发酵工业,2005,31(10):142-144.

[16] 郭平,卢家炯,林海霞.黑木耳多糖功效与提取方法[J].中国林副特产,2006(6):72-74.

[17] 陈艳秋,周丽萍,尹英敏.黑木耳子实体水溶性多糖提取工艺的研究[J].吉林农业大学学报,2003,25(4):470-472.

[18] KHAN M K, VIAN M A, TIXIER A S F, et al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel [J]. Food Chem, 2010, 119: 851-858.

[19] 樊黎生,张声华,吴小刚.微波辅助提取黑木耳多糖的研究[J].食品与发酵工业,2005,31(10):142-144.

[20] 于庆宇.高电压脉冲电场浸提技术的研究[D].长春:吉林大学,2012.

[21] 赵鑫.黑木耳分级多糖抗氧化活性及其相关生理功能研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2011.

(上接第 11491 页)