

超声提取裙带菜中岩藻黄素的工艺研究

苌 钊^{1,2}, 徐小琴², 李 强², 范智超²

1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003

2. 西安皓天生物工程技术有限责任公司, 陕西 西安 710075

摘要: 目的 运用超声提取法对裙带菜 *Undaria pinnatifida* 中岩藻黄素的提取工艺进行研究。方法 以 HPLC 法检测岩藻黄素的量, 通过单因素实验考察了提取溶剂、乙醇体积分数、提取时间、提取液料比、提取温度对岩藻黄素提取率的影响; 并用正交试验得到超声波法提取岩藻黄素的最佳工艺。结果 超声提取的最佳工艺是: 乙醇体积分数为 90%, 超声时间为 30 min, 提取温度为 40 ℃, 液料比 10:1。此条件下测得岩藻黄素的提取量为 1.362 mg/g。结论 裙带菜中岩藻黄素的含量丰富, 超声法提取岩藻黄素操作简单、方便快捷。

关键词: 岩藻黄素; 裙带菜; 超声提取; 工艺优化

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)04-0285-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.04.012

Optimization of ultrasonic enhanced extraction of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*

CHANG Zhao^{1,2}, XU Xiao-qin², LI Qiang², FAN Zhi-chao²

1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

2. Xi'an Haotian Bioengineering Technology Co., Ltd, Xi'an 710075, China

Abstract: Objective To optimize the technology for the ultrasonic extraction of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*. **Methods** The concentration of fucoxanthin was analyzed by HPLC. Affecting factors for fucoxanthin extraction technique, such as solvent concentration, extraction temperature, extraction time, and ratio of sample weight to solvent volume were optimized by single factor and orthogonal test. **Results** The optimum extraction model is as follows: solvent concentration 90%, extraction temperature 40 ℃, extraction time 30 min, and the ratio of sample weight to solvent volume 10:1. The fucoxanthin extraction rate was 1.362 mg/g. **Conclusion** *U. pinnatifida* is rich in fucoxanthin. The enhanced method of ultrasonic enhanced extraction is simple and accurate.

Key words: fucoxanthin; *Undaria pinnatifida* (Harv.) Suringar; ultrasonic extraction; technology optimization

岩藻黄素(fucoxanthin)亦称岩藻黄质、褐藻素,是一种脂溶性天然类胡萝卜素,为褐藻、硅藻、金藻及黄绿藻所含的色素,在褐藻中的量很高,其结构见图 1^[1]。已经有的研究证明岩藻黄素具有一定的抗癌、抗氧化、抗肥胖作用^[2-7]。因此,以岩藻黄素作为药品和保健品的研发越来越受到人们重视,特别是近些年,美国一些公司已推出含有岩藻黄素复合配方的减肥胶囊。

裙带菜 *Undaria pinnatifida* (Harv.) Suringar 又名裙带、海芥菜,是我国褐藻中最主要的海藻,主要分布于东海沿岸和黄海西部沿岸^[8]。裙带菜含有大量的岩藻黄素,但是目前国内关于岩藻黄素的工业化生产的信息不是很多。因此,本研究以裙带菜

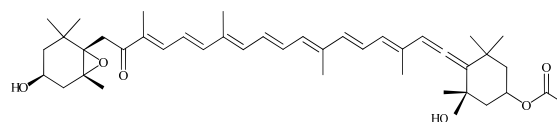


图 1 岩藻黄素的结构

Fig. 1 Structure of fucoxanthin

为原料,利用超声提取法对岩藻黄素的提取工艺进行优化,探讨裙带菜中岩藻黄素的提取率,为大力开发岩藻黄素资源提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验材料购于大连水产学院海珍苗种培育基地,经中国海洋大学海洋生命学院徐涤老师鉴定为

收稿日期: 2013-04-25

作者简介: 苌 钊 (1983—),男,硕士研究生,研究方向为天然产物化学。E-mail: clare@htinc.cn

裙带菜 *Undaria pinnatifida* (Harv.) Suringar。岩藻黄素对照品 (Sigma 公司, 质量分数 $\geq 99\%$, 批号 020M1541); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

KQ—250DB 型数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Agilent—1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent); 旋转蒸发器 RSE—52AA (上海亚荣生化仪器厂); FA1104N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 岩藻黄素的提取

将新鲜的裙带菜用清水冲洗藻体表面泥沙、盐粒, 然后用吸水纸吸掉表面的水分, 置于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内干燥至恒质量, 干燥后的裙带菜用多功能粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 制得裙带菜干粉^[9]。准确称取 5.00 g 裙带菜干粉, 分别加入不同的提取溶剂, 充分振荡, 超声提取, 抽滤, 滤液减压浓缩至干, 得岩藻黄素粗品。

2.2 岩藻黄素的 HPLC 检测

2.2.1 色谱条件^[10] Hypersil ODS C_{18} 分析色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 检测波长 450 nm, 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流动相为乙腈—甲醇—0.1%醋酸铵溶液 (75:15:10), 体积流量 1.0 mL/min。色谱图见图 2。

2.2.2 标准曲线的制作 准确称取 12.50 mg 岩藻黄素对照品, 用无水乙醇溶解, 定容到 50 mL, 分别精密吸取 0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 用无水乙醇定容, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 得岩藻黄素对照品溶液。进样 10 μL , 用岩藻黄素的浓度 (X) 与峰面积的积分值 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=186\ 445X+54\ 584$ ($R^2=0.999\ 6$)。岩藻黄素在 1~128 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈线性关系。

2.2.3 样品溶液的配制 取超声法提取裙带菜的抽滤液, 精密吸取 2 mL 上清液, 用无水乙醇定容到 25 mL 量瓶中, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 即得样品溶液。

2.2.4 HPLC 法测定岩藻黄素的量 取样品溶液 10 μL 进样, 在“2.2.1”项下色谱条件下进行 HPLC 分析, 记录峰面积。按照外标法计算岩藻黄素的质量, 按照公式计算裙带菜中岩藻黄素提取率。

岩藻黄素提取率=样品溶液中岩藻黄素的质量/裙带菜的质量

2.3 单因素实验

采用单因素实验, 分别考察了超声波提取法中提取溶剂、乙醇浓度、提取时间、液料比、提取温度对岩藻黄素提取量的影响。

2.3.1 提取溶剂对岩藻黄素提取率的影响 分别用正己烷、石油醚、醋酸乙酯、丙酮、90%乙醇、90%甲醇提取裙带菜干粉。岩藻黄素的提取率分别为 0.42、0.38、0.72、0.84、1.21、1.33 mg/g, 其中 90%甲醇的效果要优于其他有机溶剂, 其次是 90%乙醇, 石油醚的效果最差。与从海带中提取岩藻黄素溶剂顺序甲醇>乙醇>丙酮>石油醚一致^[11], 表明甲醇和乙醇为裙带菜岩藻黄素提取的良好溶剂。鉴于甲醇的毒性和终产品的溶剂残留, 确定乙醇为理想溶剂。

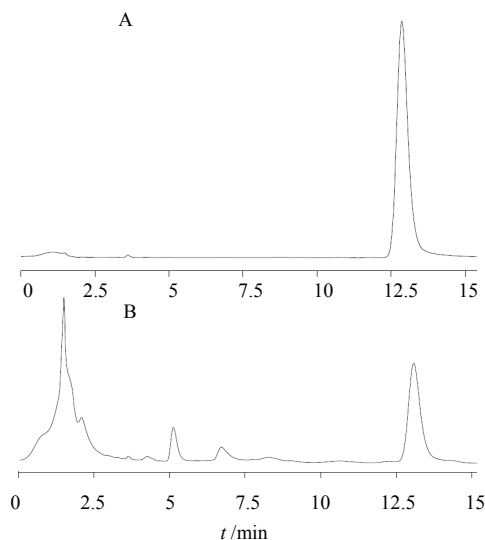


图 2 对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

2.3.2 乙醇体积分数对岩藻黄素提取率的影响 用体积分数 60%~100%乙醇超声提取裙带菜干粉。随着乙醇体积分数的增大, 岩藻黄素的提取率呈先增加后降低的趋势, 乙醇体积分数为 80%~90%时提取率增速最为明显, 但超过 90%时提取率略有下降 (图 3)。因此乙醇的最佳体积分数为 90%。

2.3.3 提取时间对岩藻黄素提取率的影响 分别用 90%乙醇超声提取裙带菜干粉 10、20、30、40、50 min, 随着时间的增长, 岩藻黄素的提取量呈先增加后降低的趋势, 在 30 min 达到最大 (图 4), 故提取时间定为 30 min。

2.3.4 液料比对岩藻黄素提取率的影响 用 6:1、8:1、10:1、12:1、14:1 的液料比超声提取裙

带菜干粉。随着液料比的增大,岩藻黄素的提取率逐渐升高,超过10:1后岩藻黄素的增率趋于平缓(图5)。从大生产考虑,应选择液料比为10:1,过大则造成浪费。

2.3.5 提取温度对岩藻黄素提取率的影响 提取温度分别为20、30、40、50、60℃,岩藻黄素的提取率在20~40℃增幅比较大,但随着温度的进一步升高,提取率呈下降趋势(图6),所以提取温度控制在不高于40℃。

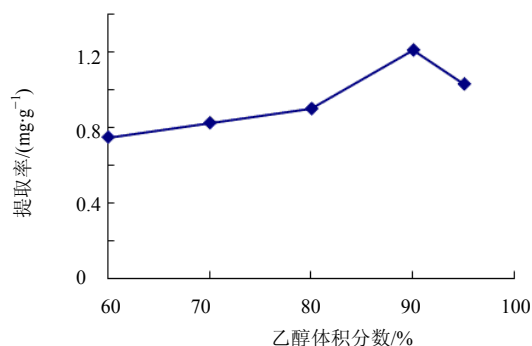


图3 乙醇体积分数对岩藻黄素提取率的影响

Fig. 3 Effect of ethanol concentration on extraction rate of fucoxanthin

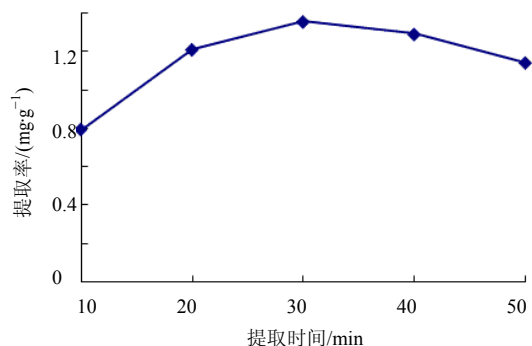


图4 提取时间对岩藻黄素提取率的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on extraction rate of fucoxanthin

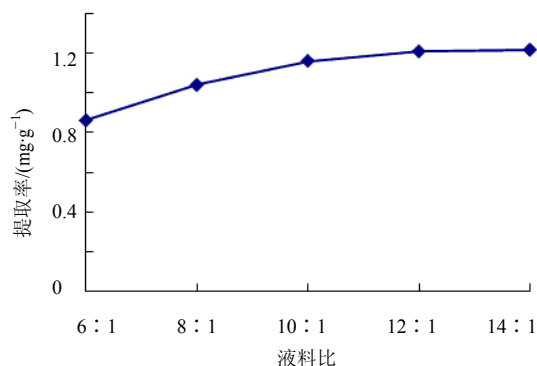


图5 液料比对岩藻黄素提取率的影响

Fig. 5 Effect of solvent to material ratio on extraction rate of fucoxanthin

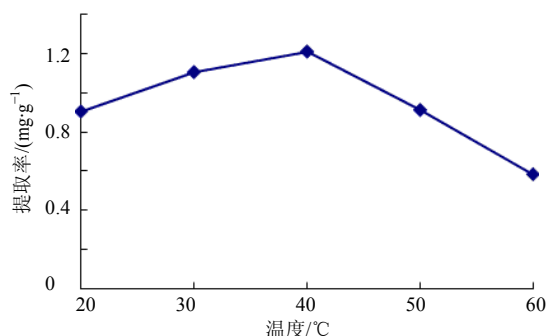


图6 提取温度对岩藻黄素提取率的影响

Fig. 6 Effect of extraction temperature on extraction rate of fucoxanthin

2.4 正交试验

在单因素实验的基础上,用正交试验进行条件优化。采用L₉(3⁴)正交表对裙带菜进行超声提取并测定岩藻黄素的量。因素-水平表设计见表1。正交实验结果见表2、表3。

表1 L₉(3⁴) 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of L₉(3⁴) orthogonal test

水平	因素			
	乙醇体积分数(A)	时间(B)	液料比(C)	温度(D)
1	70%	20 min	8:1	30℃
2	80%	30 min	10:1	40℃
3	90%	40 min	12:1	50℃

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

实验号	A	B	C	D	提取量/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	0.598
2	1	2	2	2	0.835
3	1	3	3	3	0.626
4	2	1	2	3	0.758
5	2	2	3	1	0.941
6	2	3	1	2	0.835
7	3	1	3	2	1.210
8	3	2	1	3	0.956
9	3	3	2	1	1.161
K ₁	0.686	0.855	0.796	0.900	
K ₂	0.845	0.911	0.918	0.960	
K ₃	1.109	0.874	0.925	0.780	
R	0.423	0.055	0.129	0.180	

表3 方差分析表
Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 比	$F_{0.05}$	显著性
A	0.274	2	54.800	19.000	$P < 0.05$
B	0.005	2	1.000	19.000	
C	0.032	2	6.400	19.000	
D	0.050	2	10.000	19.000	
误差	0.010	2			

结果表明,各因素对岩藻黄素提取率的影响程度从高到低依次为 $A > D > C > B$, 其中 A 因素对岩藻黄素提取具有显著性影响。超声提取岩藻黄素最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3D_2$, 即乙醇体积分数为 90%, 提取温度 40 °C, 超声时间 30 min, 液料比 12:1。在 C 因素中, 液料比 12:1 和 10:1 比较, 结果相差不多, 其他因素无显著性影响, 考虑到以后可能的大规模生产溶剂和能源消耗等因素, 确定优化工艺为 $A_3B_2C_2D$ 。

2.5 验证试验

称取裙带菜粉末 5.00 g, 按优选工艺进行 3 次平行提取实验, 分析岩藻黄素提取率。结果实验平均提取率为 1.362 mg/g, RSD 值为 0.64%, 表明优化工艺可行。

3 讨论

海藻中的色素大致可以分为类胡萝卜素、藻胆蛋白和叶绿素, 而类胡萝卜素则是海藻中分布最广泛、最重要的色素。岩藻黄素是褐藻门的主要色素, 并且在金藻门金藻纲、硅藻纲中也有分布。由于金藻纲和硅藻纲属海藻主要是单细胞型海藻, 体型较小, 尤其是硅藻纲属海藻通常只有用显微镜才可见, 可应用于岩藻黄素提取原料的为褐藻纲属海藻。而褐藻中产量比较大的海藻有海带、裙带菜、羊栖菜等, 有研究显示裙带菜中所含岩藻黄素较为丰富^[4], 因此裙带菜可作为岩藻黄素的优良来源。

岩藻黄素是脂溶性类胡萝卜素类化合物, 它易溶于大极性有机溶剂, 如丙酮、乙醇、甲醇等。本研究用 90%乙醇作为提取溶剂, 能基本将裙带菜藻体中的岩藻黄素萃取完全。李丹彤等^[12]使用丙酮-乙醇混合溶剂 (95:5) 从裙带菜中提取岩藻黄素效果最佳, 同时得出使用丙酮比乙醇提取得到的岩藻黄素要多, 这与本实验结果不一致。在大生产过程中, 单纯的使用乙醇比使用丙酮等混合溶剂更利于溶剂的回收和再利用, 而且乙醇作为一种绿色溶剂,

更能满足现在社会倡导的清洁生产等环保要求。因此, 乙醇比甲醇、丙酮更适合工业化大生产提取岩藻黄素。

目前, 岩藻黄素在国内还没有工业化生产。如果在本实验的基础上完善出一套岩藻黄素的纯化工艺, 并开发出一条工业化生产的工艺路线, 将会产生巨大的经济效益与社会效益。

参考文献

- [1] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. 中药原植物化学成分手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [2] Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, *et al.* Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR gamma ligand, troglitazone, on colon cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1675(1/3): 113-119.
- [3] Yan X J, Chuda Y, Suzuki M, *et al.* Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(3): 605-607.
- [4] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, *et al.* Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332(2): 392-397.
- [5] Miyashita K. Seaweed carotenoid, fucoxanthin, with highly bioactive and nutritional activities [J]. *J Mar Biosci Biotechnol*, 2006, 1(1): 48-58.
- [6] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, *et al.* Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(19): 7701-7706.
- [7] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, *et al.* Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18(1): 147-152.
- [8] 赵建成. 生物资源学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [9] 刘 梁, 苟明玥, 张春枝, 等. 海带岩藻黄素提取工艺的优化 [J]. 大连工业大学学报, 2010, 29(6): 406-408.
- [10] 尹尚君, 徐 涛, 刘丽萍, 等. 羊栖菜岩藻黄质的提取工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 272-275.
- [11] 赵 鹏. 海带中岩藻黄素的提取与纯化工艺研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2010.
- [12] 李丹彤, 陈国栋, 张玲丽, 等. 裙带菜岩藻黄素的提取分离及对人肝癌细胞 HepG2 的抑制作用研究 [J]. 辽宁师范大学学报: 自然科学版, 2012, 35(3): 383-389.