

# 快速溶剂萃取仪提取葡萄籽中多酚物质的工艺优化

刘叶,李华\*,郑亚蕾,杨世玲,李莹莹  
(西北农林科技大学葡萄酒学院,陕西咸阳 712100)

**摘要:**以新品种媚丽葡萄籽为研究对象,采用单因素实验研究了快速溶剂萃取仪提取多酚物质的工艺并进行了正交实验优化。结果表明:最佳提取条件为提取时间20 min、提取温度50 ℃、提取压强8.97 MPa、乙醇体积分数80%。在此条件下多酚提取量为28.89 mg/g。利用快速溶剂萃取仪提取葡萄籽多酚物质能极大地缩短提取时间。

**关键词:**葡萄籽,多酚,快速溶剂萃取

## Optimization of extraction technology for polyphenols from grape seeds by accelerated solvent extraction

LIU Ye, LI Hua\*, ZHENG Ya-lei, YANG Shi-ling, LI Ying-ying

(College of Enology, Northwest A&F University, Xianyang 712100, China)

**Abstract:** Accelerated solvent extraction (ASE) system was used to optimize polyphenol extraction from seeds of a new grape cultivar "Meili" through orthogonal test. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: extraction time 30 min, temperature 50 ℃, pressure 8.97 MPa and ethanol concentration 80%. The yield of extraction was 28.89 mg/g. The ASE method could effectively reduce the operation time.

**Key words:** grape seeds; polyphenol; ASE

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)18-0244-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.040

葡萄籽中含有大量的多酚物质<sup>[1]</sup>,而多酚物质因其较高的药用价值被广泛研究<sup>[2]</sup>。葡萄籽多酚可以清除自由基而达到抗氧化效果,除此还有降低血脂、抗癌等作用<sup>[3-7]</sup>。媚丽葡萄是以梅鹿特、玫瑰香、雷司令等品种进行多代轮回杂交出的新品种,综合性状优良,尤其是抗病性强,该品种适宜在我国华北、西北地区及南方栽培<sup>[8]</sup>。

快速溶剂萃取是在一定的温度(50~200 ℃)和压力(6.20~20.7 MPa)下用溶剂对固体或半固体样品进行萃取的方法。使用常规的溶剂、利用增加温度和高压提高萃取的效率,大大加快了萃取的速度并明显降低萃取溶剂的使用量<sup>[9-12]</sup>。与传统的溶剂提取、超声波提取等方法<sup>[13-14]</sup>相比,快速溶剂萃取仪可以有效提高萃取效率,缩短提取时间,减少溶剂用量,降低生产成本。本研究利用快速溶剂萃取仪提取葡萄籽中的多酚物质,优化提取条件,以期以后的研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

媚丽葡萄 2012年收于陕西杨凌曹辛庄葡萄园,经过挑选,选取颗粒饱满,无腐烂的葡萄进行实验;无水乙醇 广东光华科技股份有限公司;没食子酸标准品 天津博迪化工股份有限公司。

ASE2000快速溶剂萃取仪 美国戴安公司;UV-1700紫外分光光度计 日本岛津公司;FD-1-50真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;R214旋转蒸发仪 上海申生科技有限公司

### 1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 准确称取没食子酸0.50g,配制浓度分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/mL的标准溶液。

取上述系列标准溶液各0.1 mL,加入蒸馏水5 mL,福林-消卡试剂<sup>[15-17]</sup>0.5 mL,充分混匀,在30 s时加入1.5 mL 20%的碳酸钠溶液,混合后加入蒸馏水定容

收稿日期:2014-12-05

作者简介:刘叶(1990-),女,硕士研究生,研究方向:葡萄酒化学,E-mail:yezihappy1990@126.com。

\* 通讯作者:李华(1959-),男,博士,教授,研究方向:葡萄与葡萄酒学,E-mail:hualiwine@163.com。

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD31B07)。

至10 mL。将溶液在20 ℃下放置2 h后于765 nm波长处测定吸光度。以没食子酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程为: $y=0.1193x+0.007$  ( $y$ 为吸光值; $x$ 为浓度,mg/L; $R^2=0.9995$ )。

1.2.2 葡萄籽多酚提取工艺 葡萄籽→粉碎过20目筛→50 ℃真空干燥24 h→快速溶剂萃取仪提取→30 ℃下旋转蒸发去除溶剂→分析测定

1.2.3 葡萄籽多酚提取量测定 准确称取1 g葡萄籽粉,置于萃取池中,按照各因素考察条件进行提取,按照1.2.1测定吸光度,采用福林-消卡法<sup>[18]</sup>测定多酚含量,计算多酚提取量。

$$\text{多酚提取量 (mg/g)} = \frac{A-0.007}{0.1193} \times \frac{V}{1000 \times m} \times \text{稀释倍数}$$

式中:A—样品的吸光度;V—提取液的体积,mL;m—葡萄籽粉的质量,g。

1.2.4 葡萄籽中多酚物质提取实验

1.2.4.1 乙醇体积分数对多酚提取量的影响 取1 g葡萄籽粉末于萃取池中,分别在溶剂瓶中加入50%、60%、70%、80%、90%、100%的乙醇溶液200 mL,在6.90 MPa、温度50 ℃、提取时间10 min、循环提取两次,研究不同乙醇体积分数对多酚提取量的影响。

1.2.4.2 提取压强对多酚提取量的影响 取1 g葡萄籽粉末于萃取池中,在溶剂瓶中加入80%的乙醇溶液200 mL,温度为50 ℃,分别在6.21、6.90、7.59、8.28、8.96、9.66 MPa下提取10 min,循环两次,考察不同压强下多酚的提取量。

1.2.4.3 提取温度对多酚含量的影响 取1 g葡萄籽粉末于萃取池中,在溶剂瓶中加入80%的乙醇溶液200 mL,压强为8.28 MPa,分别在40、50、60、70、80 ℃条件下提取10 min,循环两次,研究不同温度对多酚提取量的影响。

1.2.4.4 提取时间对多酚提取量的影响 取1 g葡萄籽粉末于萃取池中,在溶剂瓶中加入80%的乙醇溶液200 mL,压强为8.28 MPa,温度50 ℃,时间分别设定为5、10、15、20、25 min,循环两次,研究提取时间对多酚提取量的影响。

1.2.4.5 正交实验设计 综合单因素实验的结果,选取对多酚提取量影响显著的4个因素,采用4因素3水平的 $L_9(3^4)$ 进行正交实验,优化葡萄籽中多酚物质的提取工艺。因素水平表如表1所示。

表1 快速溶剂萃取分析因素与水平

Table 1 Variables and their coded levels used in the orthogonal test

水平	因素			
	A 乙醇体积分数 (%)	B 提取压强 (MPa)	C 提取温度 (℃)	D 提取时间 (min)
1	70	7.59	40	15
2	80	8.28	50	20
3	90	8.97	60	25

### 1.3 数据处理

采用Excel 2010、SPSS等数据处理软件对数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

2.1.1 乙醇体积分数的影响 溶剂体积分数对提取量有很大的影响,与水相比,用乙醇提取效率高、时间短<sup>[9]</sup>,乙醇体积分数对多酚提取量的影响结果见图1。

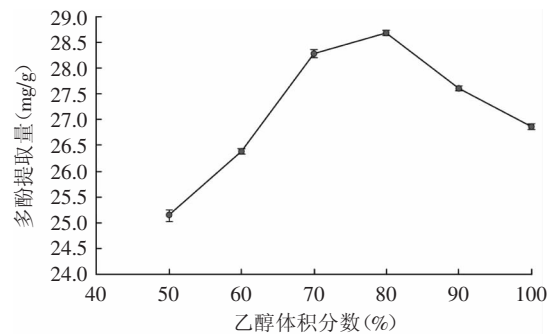


图1 乙醇体积分数对提取量的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on the yield of extraction

从图1中可以看出,乙醇体积分数在80%时,多酚提取量达到最大值,此后随着乙醇浓度的增加,多酚提取量呈下降趋势。多酚常与蛋白质多糖等大分子通过氢键、疏水键形成复合物,乙醇浓度过低时,水含量高,不能破坏氢键等,使得多酚物质不易溶出<sup>[14]</sup>。当乙醇体积分数增加时,溶液极性增大,多酚提取量增加;但乙醇的浓度继续增加,一些脂类、色素等杂质就会溶解<sup>[16]</sup>,这些成分会与多酚物质竞争,同乙醇水分子结合,从而导致多酚活性物质的溶解度下降<sup>[13]</sup>。对多酚提取量有一定的影响,因此确定乙醇体积分数为80%最佳。

2.1.2 提取压强的影响 压强是快速萃取仪提取多酚物质的主要因素之一,压强对多酚提取量的影响结果见图2。

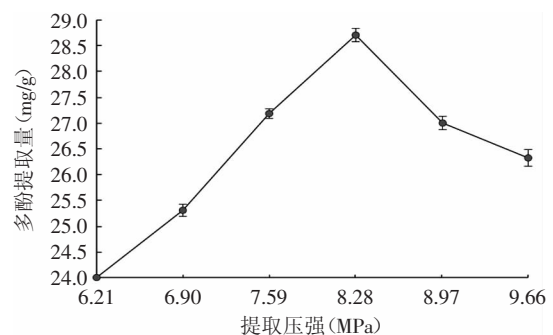


图2 提取压强对提取量的影响

Fig.2 Effect of pressure on the yield of extraction

从图2可以看出,在6.21~8.28 MPa压强范围内,多酚提取量随着压强增大而增加;在8.28 MPa压强时多酚提取量达到最大值;随着压强继续增加,多酚提取量明显下降,这是由于多酚物质不稳定性,压强过大会对其结构造成一定的破坏<sup>[16]</sup>。因此,根据实验结果选定最佳提取压强为8.28 MPa。

2.1.3 提取温度的影响 从图3中可以看出,随着温

度升高,多酚提取量逐渐增加,在50℃时达到最大值,此后随着温度升高葡萄籽多酚提取量呈下降趋势。这是因为温度的升高有利于多酚物质的溶出,但多酚物质容易氧化,过高的温度会引起多酚的变性<sup>[1]</sup>,不利于多酚化合物的稳定,进而影响多酚的提取量。综合考虑多酚热不稳定、易氧化的特性确定最佳提取温度为50℃。这与史红梅等的研究结果基本一致<sup>[13]</sup>。

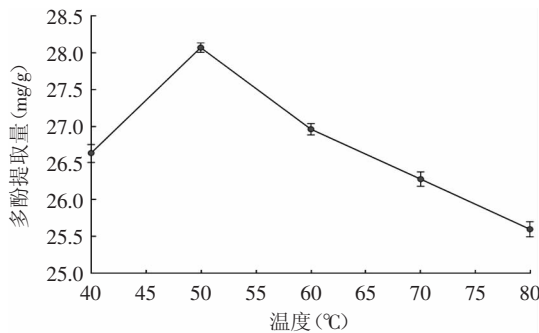


图3 提取温度对提取量的影响

Fig.3 Effect of temperature on the yield of extraction

2.1.4 提取时间的影响 从图4中可以看出,随着提取时间增加,多酚提取量也随之增加,在15 min时达到最大值;时间继续增加,提取量趋于稳定后有所下降。这说明在一定的提取时间内,时间越长越有利于多酚物质的溶出;但若超过这个时间,提取溶液达到饱和,提取量不再随着时间增加而增加。分析原因可能是长时间提取一些亲醇类的物质溶出<sup>[16]</sup>,会降低多酚的提取量。时间过长,浸出的多酚物质在溶液内被氧化,也会导致提取量降低<sup>[14]</sup>。因此确定最佳提取时间为15 min。这与袁琳等的研究结果基本一致<sup>[16]</sup>。

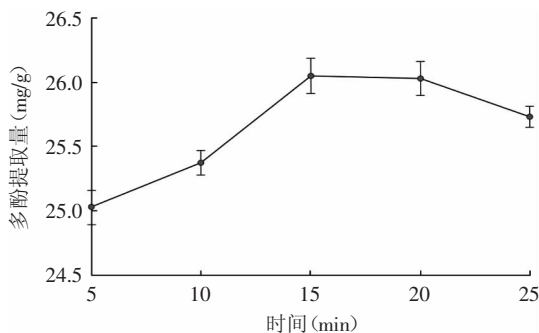


图4 提取时间对提取量的影响

Fig.4 Effect of extraction time on the yield of extraction

## 2.2 正交实验确定最佳提取工艺

通过单因素实验结果,设计了4因素3水平的正交实验,以多酚提取量为指标,确定最佳的提取条件,实验结果如表2所示。

从表2中多酚含量极差分析可以看出,D因素(提取时间)为主要的影响因素,C因素(提取温度)次之,B因素(提取压强)的影响效果最小,可见各因素影响因素的次序为D>C>A>B。多酚物质提取的最佳工艺条件是A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即乙醇体积分数为80%,提取压强为

表2 正交实验设计与结果分析

Table 2 Experiment design and results analysis for orthogonal test

实验号	A	B	C	D	多酚提取量(mg/g)
1	1	1	1	1	20.94
2	1	2	2	2	27.60
3	1	3	3	3	26.17
4	2	1	2	3	29.21
5	2	2	3	1	25.06
6	2	3	1	2	27.81
7	3	1	3	2	27.41
8	3	2	1	3	23.94
9	3	3	2	1	26.00
K <sub>1</sub>	74.70	77.55	72.69	72.00	
K <sub>2</sub>	82.08	76.59	82.80	82.83	
K <sub>3</sub>	77.34	79.98	78.63	79.32	
k <sub>1</sub>	24.90	25.85	24.23	24.00	
k <sub>2</sub>	27.36	25.53	27.60	27.61	
k <sub>3</sub>	25.78	26.66	26.21	26.44	
R	2.46	1.13	3.37	3.61	

表3 方差分析表

Table 3 Variance analysis of orthogonal test results

因素	偏差平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	9.295	2	4.648	4.597	
B	2.022	2	1.011	1.000	
C	17.245	2	8.623	8.529	
D	20.323	2	10.162	10.051	*
误差	2.02	2			

注:\*表示 $p<0.05$ 水平上显著。

8.97 MPa,温度为50℃,提取时间20 min。

对正交实验结果进行方差分析得表3,从表3可以看出,各因素的影响次序为D>C>A>B,与极差分析结果一致,其中以提取时间对多酚提取量的影响最大,达到显著水平( $p<0.05$ )。

## 2.3 验证实验

当提取条件为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>时,经过5次重复实验所得到的提取量为(28.89±0.35) mg/g,相对标准偏差为0.23%,结果表明在最佳工艺条件下,快速溶剂萃取仪提取葡萄籽多酚重复性好。从验证结果和正交实验的结果看,多酚含量较高,略低于正交设计中的A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(29.21 mg/g)。但综合考虑实验影响因素和成本,选取提取时间相对较短的工艺条件A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即乙醇体积分数为80%,提取压强为8.97 MPa,温度为50℃,提取时间20 min。

## 3 结论

在单因素实验的基础上,以乙醇浓度、提取时间、提取压强、提取温度为实验因素进行4因素3水平的正交实验,以多酚提取量为考察指标,对实验结果进行方差分析,最终得出提取媚丽葡萄籽多酚的最佳工艺为:乙醇体积分数80%,提取压强8.97 MPa,温度50℃,提取时间20 min。在此条件下多酚提取量为

28.89 mg/g。

史红梅等对葡萄藤茎中的多酚物质进行提取,在提取时间1 h、固液比1:15条件下,得到提取量仅为14.43 mg/g<sup>[13]</sup>。而王玮在提取时间30 min下,得到葡萄籽多酚提取量仅为10.02 mg/g<sup>[20]</sup>。因此相对于传统有机溶剂提取,用快速萃取仪来提取多酚物质,能缩短提取时间,提高提取产量。

### 参考文献

- [1] 丁燕,赵新节. 酚类物质的结构与性质及其与葡萄及葡萄酒的关系[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2003(1):13-16.
- [2] Gonzalez-Centeno M R, Jourdes M, Femenis A, et al. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012(48):11850-11858.
- [3] 李华,沈洁. 超声波法从葡萄籽中提取多酚的研究[J]. 酿酒科技,2005(5):89-91.
- [4] 唐传核,彭志英. 葡萄多酚类化合物以及生理功能[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2000(2):12-15.
- [5] 李双石,李晓燕,苑函,等. 葡萄酒渣提取多酚化合物研究进展[J]. 酿酒科技,2012(12):17-21.
- [6] 卢晓霞,王田田,王军. 响应面法优化葡萄籽多酚提取工艺[J]. 食品工业科技,2013(24):279-283.
- [7] 赵亮,景浩. 不同品种葡萄皮、籽提取物多酚含量及抗氧化能力的比较研究[J]. 食品工业科技,2009(10):154-157.
- [8] 张振文,王华,房玉林,等. 优质抗病酿酒葡萄新品种‘媚丽’[J]. 园艺学报,2013(40):1611-1612.
- [9] Cassazza A A, Aliakbarian B, Sannita E. High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins

[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012(47):399-405.

- [10] 刘静. ASE快速溶剂萃取:解决半固体样品前处理的新技术[J]. 现代科学仪器,2002(3):59-61.
- [11] Divan K, Darwish R. Accelerated Sample Extraction (ASE (R)) for the food industry—Khalil Divan and Rana Darwish describe a technique that gives faster extraction times, reduces solvent consumption and addresses the need for automation[J]. Food Science Technology—Information Quarterly of the Institute of Food Science and Techn, 2005(19):29-31.
- [12] Farid C, Ying L, Valérie T, et al. Optimization of procedures for in-line extraction of lipids and polyphenols from grape seeds[J]. Food Analytical Methods, 2014(7):459-464.
- [13] 史红梅,孙玉霞,蒋锡龙,等. 正交实验法优化葡萄藤茎中多酚活性物质提取工艺的研究[J]. 食品工业科技,2012(2):287-290.
- [14] 朱素英. 正交实验法优化芦笋嫩茎多酚的提取工艺[J]. 食品工业科技,2013(21):224-227.
- [15] 尹莲. 超生法提取茶多酚的实验研究[J]. 食品工艺,1999(3):10-11.
- [16] 袁琳,胡立志,杨晓雁,等. 快速溶剂萃取仪提取葡萄籽中原花色苷条件优化[J]. 2013(34):157-162.
- [17] 郭雄飞,倪慧,卿德刚,等. 葡萄籽中多酚类物质的提取和纯化工艺[J]. 西北农业学报,2009(4):41-44.
- [18] 王华. 葡萄酒分析检测[M]. 北京:中国农业出版社,2010:154.
- [19] 李华,王蔚新,袁春龙. 葡萄籽多酚提取物的提取工艺研究[J]. 食品研究与开发,2005(26):69-72.
- [20] 王玮. 葡萄籽多酚类物质的提取工艺优化[J]. 中国保健营养,2014(3):1166-1167.

(上接第237页)

the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L[J]. Biochemical Journal, 1987, 248:449-454.

- [23] An H, Peters M Y, Seymour T A, et al. Isolation and activation of cathepsin L-inhibitor complexes from Pacific whiting (*Merluccius productus*) [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1995, 43:327-330.
- [24] Whang I, Mahanama D Z, Chamilani N. Molecular characterization and expression analysis of Cathepsin B and L cysteine proteases from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30:763-772.
- [25] Benjakul S, Seymour T A, Morrissey M T, et al. Proteinase in Pacific whiting surimi wash water: Identification and characterization [J]. Journal of Food Science, 1996, 61(6):1165-1170.
- [26] Aranishi F, Ogata H, Hara K, et al. Purification and characterization of cathepsin L from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio* [J]. Comparative Biochemistry Physiology, 1997, 118B(5):531-537.
- [27] Liu H, Yin L J, Zhang N, et al. Purification and

Characterization of Cathepsin L from the Muscle of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(25):9584-9591.

- [28] 李树红,张楠,刘欢,等. 鲢鱼背肌肌原纤维蛋白自溶与内源组织蛋白酶B、L、H的关系[J]. 中国农业大学学报,2004,9(5):71-75.
- [29] 李海萍,陈海华. 漂洗工艺和热处理对鲤鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品与发酵工业,2009,35(3):109-113.
- [30] 何芸,姚开,贾冬英,等. 抗鱼肉蛋白冷冻变性机理的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2007,29(2):36-39.
- [31] Wakamatsu T, Saito Y. Further study on the effect of sucrose and sodium chloride on gelatin and unfreezable water of egg yolk during freezing [J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1980, 54:951-957.
- [32] Hu Y Q, Morioka K, Chen S G, et al. Effect of iced-storage on the activity of cathepsin L and trypsin-like protease in carp dorsal muscle [J]. LWT—Food Science and Technology, 2015, 60(2):1249-1253.
- [33] 侯鲁娜,陈学云,聂小华,等. 鲤鱼组织蛋白酶L活性的影响因素研究[J]. 食品工业科技,2010,31(11):75-77.