

文章编号:1001-6880(2016)12-1983-06

高压脉冲电场辅助溶剂提取鹿茸渣中卵磷脂

鲍妮娜*

宿州学院生物与食品工程学院,宿州 234000

摘要:为提高鹿茸渣中卵磷脂的提取率,本文利用高压脉冲电场辅助有机溶剂的方法进行提取,并采用响应面法对其提取进行优化设计。通过对电场强度、脉冲数和提取溶剂含水率进行单因素考察,建立一个3水平的优化设计。结果表明,响应面优化设计对鹿茸渣中卵磷脂的提取是实际可行的。根据响应面优化和二次回归方程分析得到鹿茸渣中卵磷脂提取的优化条件为:电场强度20 kV/cm,脉冲数为9,液料比为10.5。在此优化条件下,得到的卵磷脂的质量为1.592 mg/g 鹿茸渣,与预测值1.597 mg/g 鹿茸渣相符,说明所建立的模型是可靠的。同时,通过比较可以看出,高压脉冲电场比溶剂直接提取所得到的卵磷脂的量高,该研究可为PEF技术应用于鹿茸渣卵磷脂的提取提供参考。

关键词:高压脉冲电场;卵磷脂;响应面

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.023

Optimization of PEF-assisted Organic Solvent Extraction of Lecithin from Sika Deer Velvet Antler Slag

BAO Ni-na*

College of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China

Abstract: High-voltage pulsed electric field (PEF) is an emerging non-thermal processing technology that has recently generated much interest for improving the extraction rate of some bioactive substances and enhancing the quality of food products. To improve the extraction rate of phosphatidylcholine (PC) from sika deer velvet antler slag, PEF-assisted organic solvent was applied in this study. The quantitative effects of field strength, pulse numbers, moisture content of extraction solvent, and a three-level Box-Behnken design which was based on the results of a single-factor test was employed to optimize the parameters for extraction of PC. By solving the regression equation and also by analyzing the response surface contour plots, the optimal PC extraction conditions were determined: field strength 20 kV/cm, pulse numbers 9 and moisture content of extraction solvent 10.5, and the weight of PC extracted was 1.592 mg per 1g sika deer velvet antler slag.

Key words: high-voltage pulsed electric field; phosphatidylcholine; Box-Behnken

鹿茸为鹿科动物梅花鹿或马鹿的雄鹿密生茸毛的未骨化的幼角^[1],是一种传统的名贵中药。鹿茸中含有许多的功能性成分,分为水溶性和脂溶性两种。随着对鹿茸中有效成分的研究越来越多,趋向于鹿茸价值的最大化开发。一般是将鹿茸先经过超临界流体提取脂溶性成分后再经水溶,以此分别得到水溶性和脂溶性的有效成分,经此过程后剩余的便是鹿茸渣。

卵磷脂属于脂类物质,因此应该存在于鹿茸脂

溶性成分中,有报道称鹿茸中含有磷脂类物质^[2-7]。依此可以推论卵磷脂会进入到超临界流体提取得到的脂溶性成分中,但据王金宇^[8]的研究结果——超临界流体萃取时磷脂类物质不能被同时萃取出来,又因为卵磷脂是脂类成分很难溶于水中,因此可以推论卵磷脂存在于鹿茸渣中。因此,对鹿茸渣中的卵磷脂进行提取,将提高鹿茸的综合利用率,增加其产值。

本文利用高压脉冲电场(high-voltage pulsed electric field, PEF)辅助溶剂的方法提取鹿茸渣中的卵磷脂,考察PEF场强、脉冲数、提取溶剂含水率对PC提取率的影响,并优化出其最佳的提取工艺参数,为PEF技术应用于鹿茸渣中的卵磷脂的提取提

收稿日期:2016-05-04 接受日期:2016-07-04

基金项目:宿州学院教授(博士)科研启动基金(2015JB09);宿州学院药物生物技术研究所开放课题(2015YKF04)

*通讯作者 Tel:86-015805577728;E-mail:ninabao1984@163.com

供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鹿茸渣,吉云鹿业发展有限公司;无水乙醇、氯仿、甲醇、磷酸二氢钾,均为分析纯国药集团化学试剂有限公司。

高压脉冲电场提取装置^[9],实验室自制设备;101-1A型电热鼓风干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司;D-37520型高速冷冻离心机,Osterode Kendro Laboratory Products;TU-1810型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;90-4型恒温磁力搅拌器,上海沪西分析仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 溶剂法提取卵磷脂

采用溶剂氯仿和甲醇的混合液提取其中的磷脂,干燥后利用乙醇溶液提取其中的卵磷脂。

1.2.2 磷脂的测定

磷脂的测定根据文献^[7],见方程式(1)。

$$\text{总磷脂含量}(\%) = \frac{\text{总磷质量}(\mu\text{g}) \times 10^6}{\text{样品质量}(\text{g})} \times 25 / 25 \quad (1)$$

其中 25 为磷转换为磷脂的系数。

1.2.3 磷标准曲线

磷标准液:准确称取 105 ℃下干燥至恒重的磷酸二氢钾 0.43949 于 1000 mL 容量瓶中,加水稀释定容,溶液浓度为 100 μg/mL,4 ℃冰箱备用。磷使用液:准确吸取 1 mL 磷标准液,移入 100 mL 容量瓶中,定容,该溶液浓度为 1 μg/mL,现用现配。以磷量 0.005、0.01、0.02、0.03、0.04 mg 为横坐标,吸光

光度值为纵坐标,在波长为 650 nm 处测定其吸光光度值。

1.2.4 高压脉冲电场辅助溶剂提取卵磷脂

试验根据文献^[10]的方法,在室温条件下,鹿茸渣与提取溶剂(不同含水率的乙醇溶液)以 1:10 的料液比混匀,高压脉冲装置选用方形波,脉宽 2 μs,以 0.2 mL/s 的速度流经高压脉冲电场处理室。考察电场强度、脉冲数以及提取溶剂含水率 3 个因素对 PC 提取率的影响。

选择的试验参数为:(1)电场强度:电场强度分别设置为 10、15、20、25、30 kV/cm。(2)脉冲数:脉冲处理时间可以通过脉冲数反映,脉冲数越多处理的时间也就越长。脉冲数分别设置为 2、4、6、8、10。(3)含水率:含水率分别设置为 0、5%、10%、15%、20%。

1.2.5 响应面(Box-Behnken)试验设计

以电场强度、脉冲数、含水率作为影响卵磷脂提取率的主要因素。将这三个因素作为自变量 X₁、X₂、X₃,每个因素设置 3 个水平,以 -1、0、+1 进行水平编码。卵磷脂提取率的响应值如式(2)所示:

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

式中, Y_i 为卵磷脂提取率对应的峰面积; β₀、β_i、β_{ii} 及 β_{ij} 分别为方程的一次项,二次项及交互项系数; X_i、X_j 为因素自变量。

经过单因素试验选取自变量取值范围,因素水平编码如表 1 所示。据此进行中心组合试验设计,每组试验重复 3 次,其结果求平均值得出。并采用 Design-Expert 软件进行回归模型分析。

表 1 响应面分析因素水平编码表

Table 1 Independent variables and experimental levels for Box-Behnken design

因素 Factor	编码 Code	水平 Level		
		-1	0	1
电场强度 Field strength (kV/cm)	X ₁	18	20	22
脉冲数 Pulse numbers	X ₂	7	8	9
含水率 Moisture content of extraction solvent	X ₃	8	10	12

2 结果与讨论

2.1 溶剂法提取卵磷脂

采用氯仿/甲醇(2:1)溶剂体系对鹿茸渣中的磷脂进行提取,提取的液料比为 5。取鹿茸渣 10.0 g 向其中加入 50 mL 的氯仿/甲醇溶液,用恒温磁力

搅拌器在通风厨中搅拌 30 min 后,离心得到上清液,减压浓缩、干燥。干燥物加入 10 倍体积的 95% 乙醇溶液,35 ℃下萃取 1 h,浓缩、干燥。由磷标准曲线方程 $y = 12.417x - 0.0096 (R^2 = 0.9991)$ 得磷脂的含量为 2.801 mg/g,得到的卵磷脂的含量为磷脂含量的 46% 左右。所得到的磷脂含量和卵磷脂的

含量分别与张馨文和段传凤文章中描述的想接近,即鹿茸渣中的卵磷脂含量为 1.303 mg/g 鹿茸渣。

2.2 电场强度对卵磷脂提取的影响

由图1可以看出,电场强度对于卵磷脂的提取有很大影响,卵磷脂的量随着电场强度的增加先快速增加后又出现下降的趋势。当电场强度达到 20 kV/cm 时,卵磷脂的量达到最大值为 $1.54 \pm 0.014\text{ mg/g}$ 鹿茸渣。而当电场强度超过 20 kV/cm 时,卵磷脂的提取量逐渐下降,这极有可能是因为随着电场强度的增加,破坏了卵磷脂的结构,因此使其的提取量减少。由图得出的结论为,采用电场强度 20 kV/cm 作为提取卵磷脂的条件。

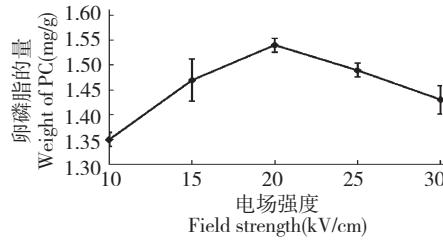


图1 电场强度对卵磷脂提取量的影响

Fig. 1 Effect of field strength on the extraction weight of PC

2.3 含水率对卵磷脂提取的影响

图2为提取溶剂含水率对卵磷脂提取的影响,由图可以看出,含水率对卵磷脂的提取也有很重要的影响。随着提取溶剂含水率的增加,提取所得到的卵磷脂先增加后又逐渐减少。当含水率达到 10% 时,卵磷脂的提取量达到最大值为 $1.47 \pm 0.014\text{ mg/g}$ 鹿茸渣。当含水率超过 10% 时,卵磷脂的提取量呈现下降的趋势,这主要是因为水的加入增加了溶剂本身的导电性,使其提高了卵磷脂的提取量,但随后出现下降的原因则有可能是因为含水率的增加导致了溶剂本身对卵磷脂的提取性能。综合所述,我们采用含水率为 10% 作为提取卵磷脂的条件。

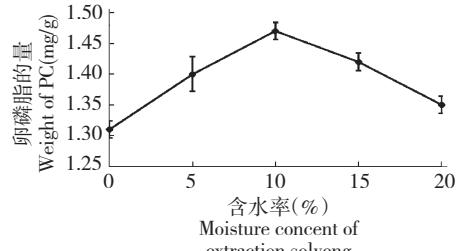


图2 含水率对卵磷脂的量的影响

Fig. 2 Effect of moisture content of extraction solvent on the weight of PC

2.4 脉冲数对卵磷脂提取的影响

图3为脉冲数对卵磷脂提取的影响,如图所示可以看出,脉冲数对卵磷脂的提取具有一定的影响作用。随着脉冲数的增加,提取所得到的卵磷脂的量呈现先迅速增加后出现趋于平缓的情况。当脉冲数为8时,卵磷脂的提取量基本上达到最大值为 $1.43 \pm 0.014\text{ mg/g}$ 鹿茸渣。当脉冲数大于8时,提取所得到的卵磷脂的量趋于平稳。脉冲数直接影响了高压脉冲电场对于物料的作用时间,结果显示,当作用时间在一定的范围内,有助于提高物质的提取。当作用时间在一定的增加范围之内,使其提取所得到物质的量保持在一定的水平。综合以上的情况,我们采用脉冲数为8作为提取卵磷脂的条件。

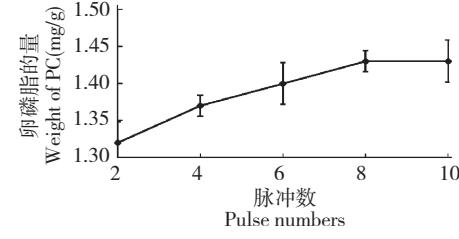


图3 脉冲数对卵磷脂的量的影响

Fig. 3 Effect of pulse numbers on the weight of PC

2.5 Box-Behnken 中心组合设计与结果

响应面优化比传统的优化有很多的优点,比如节省时间,空间和原材料等。本试验设计了17个试验点的响应面分析试验,其中12个析因点,包含5个零点试验以分析误差。试验方案与结果如表2所示。

2.6 二次回归模型建立与方差分析

通过对17组试验的结果进行分析,对试验数据进行多项式回归分析,建立二次响应回归模型,拟合得到二次回归方程,如式(3)所示,并对回归方程进行方差分析,如表3所示。

$$R_1 = +1.55 + 0.021 X_1 + 0.080 X_2 + 0.019 X_3 - 0.01 X_1 X_2 + 0.013 X_1 X_3 - 0.010 X_2 X_3 - 0.11 X_1^2 - 0.032 X_2^2 - 0.019 X_3^2 \quad (3)$$

上述二次回归模型方程的回归系数 $R_2 = 0.9964$,模型的F值为215.33,这可以说明此分析是显著的。从回归模型的方差分析结果可以看出(见表3),所建立的模型能很好地反映试验数据,回归方程的拟合度较好,试验误差小。基于回归方程的因素显著性分析,在显著水平为 $P < 0.01$ 条件下,模型中的一次项电场强度 X_1 ($P = 0.0001$)、脉

表 2 卵磷脂的量的中心组合试验设计及响应值
Table 2 Design and result of Box-Behnken analysis

序号 No.	X ₁	X ₂	X ₃	实验值 Actual yield (g)	预测值 Predicted yield (g)
1	0	1	-1	1.56	1.57
2	-1	1	0	1.47	1.47
3	1	0	1	1.46	1.47
4	0	0	0	1.55	1.55
5	-1	0	1	1.39	1.4
6	0	0	0	1.54	1.55
7	0	0	0	1.55	1.55
8	0	1	1	1.59	1.58
9	-1	0	-1	1.39	1.39
10	-1	-1	0	1.29	1.29
11	0	-1	1	1.45	1.44
12	1	-1	0	1.35	1.35
13	0	0	0	1.55	1.55
14	0	0	0	1.54	1.55
15	1	1	0	1.49	1.49
16	0	-1	-1	1.38	1.39
17	1	0	-1	1.41	1.4

冲数 X₂ ($P < 0.0001$)、含水率 X₃ ($P = 0.0003$)，二次项 X₁²、X₂² 和 X₃²，交互项 X₁X₂、X₁X₃、X₂X₃ 均表现显著。模型的失拟项 $P = 0.1234 > 0.05$ ，这表明失拟项不显著，即该模型是稳定的，能较好地预测在实

际不同因素组合处理后提取得到的卵磷脂质量的变化情况。因此，可以采用此模型对提取得到的卵磷脂质量进行分析和预测。

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the quadratic polynomial model

因素 Term	协同估计 Coefficient estimate	平方和 Sum of square	标准差 Standard error	F 值 F-value	P 值可能性 Probability > F
截距 Intercept	1.55		3.566×10^{-3}		
X ₁	0.021	3.612×10^{-3}	2.819×10^{-3}	56.83	0.0001
X ₂	0.080	0.051	2.819×10^{-3}	805.39	< 0.0001
X ₃	0.019	2.813×10^{-3}	2.819×10^{-3}	44.24	0.0003
X ₁ × X ₂	-0.01	4.000×10^{-4}	3.987×10^{-3}	6.29	0.0405
X ₁ × X ₃	0.013	6.250×10^{-4}	3.987×10^{-3}	9.83	0.0165
X ₂ × X ₃	-0.010	4.000×10^{-4}	3.987×10^{-3}	6.29	0.0405
X ₁ × X ₁	-0.11	0.055	3.886×10^{-3}	864.54	< 0.0001
X ₂ × X ₂	-0.032	4.244×10^{-3}	3.886×10^{-3}	66.77	< 0.0001
X ₃ × X ₃	-0.019	1.560×10^{-3}	3.886×10^{-3}	24.54	0.0016

2.7 响应面分析

利用 Design-Expert 7.0 软件设计响应面试验，研究参数及其交互作用对鹿茸渣中卵磷脂质量提取的影响。三维响应面和二维等高线图显示反应和每

个变量的实验水平之间的交互作用。如图 4(a)所示，当提取溶剂含水率保持在零水平时，电场强度和脉冲数对鹿茸渣中卵磷脂提取的交互作用。如图 4(b)所示，当电场强度保持在零水平，脉冲数和提取

溶剂含水率对鹿茸渣中卵磷脂提取的交互作用。图4(c)表明,当脉冲数保持在零水平时,电场强度和提取溶剂含水率对鹿茸渣中卵磷脂提取的交互作用。

由图4(a)可以看出,随着电场强度和脉冲数的增加,鹿茸渣中卵磷脂提取的质量快速增加,但在场强达到20 kV/cm以后,所提取的物质的量呈现快速下降的趋势,这极有可能是因为场强的增加影响了其中物质的结构,因此导致其提取率下降^[11,12]。此外,鹿茸渣中卵磷脂提取的质量随着脉冲数的增加也先出现了快速的上升,后又呈现下降的趋势,脉冲数的大小反映了高压脉冲电场的作用长短^[13,14],这可能是由于作用时间过长导致其中物质的变化,从而影响了鹿茸渣中卵磷脂的提取。由图4(b)可以看出,鹿茸渣中卵磷脂提取的质量随着脉冲数的

增加先增加后又减少,可以看出电场作用时间较长将影响卵磷脂的提取,此外同样的,鹿茸渣中卵磷脂提取的质量随着提取溶剂含水率的增加先增加后出现下降趋势,这说明提取溶剂含水率的增加,增加了电场的导电性,从而使其提取的卵磷脂物质的质量明显增加。由图4(c)可以看出,其二者之间的交互作用比较明显,卵磷脂提取的质量先随着强度的增加而增加,后又表现出减少的趋势。此外同样的,鹿茸渣中卵磷脂提取的质量先随着提取溶剂含水率的增加而先增加后出现下降趋势,这可以说明,随着提取溶剂含水率的增加使电场的导电性能增加,从而增加其对鹿茸渣的作用效果,以此增加了其中卵磷脂物质的提取。

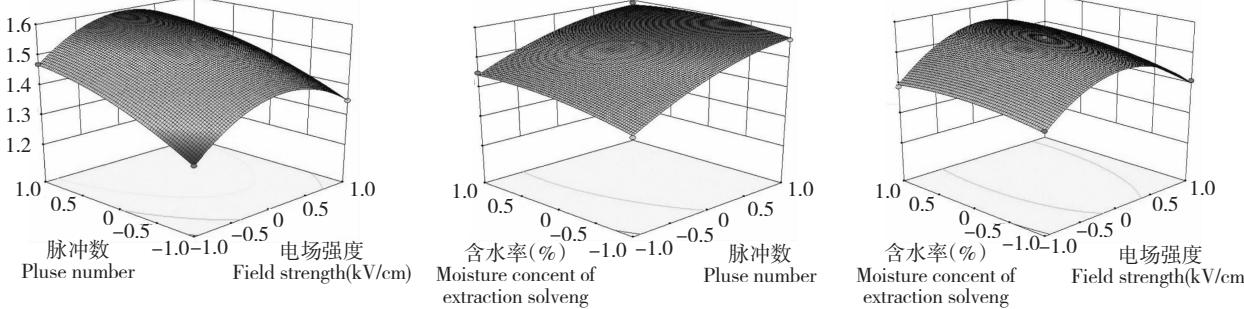


图4 电场强度和脉冲数(a)、脉冲数和含水率(b)及电场强度和含水率(c)的交互作用对卵磷脂提取的影响

Fig. 4 Response surface plot showing the interactive effects of field strength and pulse numbers (A), pulse numbers and moisture content of extraction solvent (B) and field strength and moisture content of extraction solvent (C) on the weight of PC

2.8 最优因素组合的确定与验证

依据响应面分析结果,通过对回归方程的分析,得出鹿茸渣中卵磷脂提取质量最大(1.597 mg/g 鹿茸渣)的条件为:电场强度为20 kV/cm,脉冲数为9,提取溶剂含水率为10.5。依照此优化条件进行验证试验,重复3次,平均值为1.592 mg/g 鹿茸渣。试验结果与模型优化模拟结果基本一致,说明模型

可靠性较高,能较好地预测实际情况。

2.9 卵磷脂提取方法比较

由表4可以看出,尽管高压脉冲电场辅助溶剂提取的时间只有6 μs,但提取得到的卵磷脂的量却比传统溶剂提取60 min得到的量多,高压脉冲电场辅助溶剂提取卵磷脂的方法在极大的缩短提取时间的同时获得了较高的提取量。

表4 高压脉冲电场辅助溶剂提取与传统溶剂法提取比较

Table 4 Comparison of PEF and conventional extraction methods

方法 Method	高压脉冲电场提取 PEF extraction	溶剂提取 Conventional extraction
时间 Time	6 μs	60 min
卵磷脂量 PC yield (mg/g 鹿茸渣)	1.592	1.303

3 结论

本文采用响应面的方法,对鹿茸渣中卵磷脂的

提取进行了优化。通过对电场强度、脉冲数和提取溶剂含水率进行了单因素考察,建立了一个3水平的优化设计。结果表明,响应面优化设计对鹿茸渣

中卵磷脂的提取是实际可行的。根据响应面优化和二次回归方程分析得到鹿茸渣中卵磷脂提取的优化条件为:电场强度 20 kV/cm, 脉冲数为 9, 液料比为 10.5。在此优化条件下, 得到的糖脂类物质的质量为 1.592 mg/g 鹿茸渣, 与预测值 1.597 mg/g 鹿茸渣相符。同时, 通过比较可以看出, 高压脉冲电场比溶剂直接提取所得到的卵磷脂的量要多, 溶剂直接提取所得到的物质的量为 1.303 mg/g 鹿茸渣, 而高压脉冲电场提取所得到为 1.592 mg/g 鹿茸渣, 表明高压脉冲电场辅助溶剂法提取卵磷脂的效果更佳, 它不仅能耗少且作用时间短。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of China (中国药典)*. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 264-265.
- 2 Fan YL (范玉林). Research progress of chemical composition on Velvet antler. *Chin Tradit Pat Med (中成药研究)*, 1980, 1:23-25.
- 3 Hattori M, Yang XW, Kaneko S, et al. Constituents of the pi-loose antler of *Cervus nippon* var. *mantchuicus*. *Shoyalaugaku Zasshi*, 1989, 43:173-176.
- 4 Sliaev AB, Razmakhnina VE. Amino acid and lipid composition of reindeer antlers. *Vestnick Moskovskogo Uneversiteta*, 1978, 16(3):68-71.
- 5 Ivankina NF, Isay SV, Busarova NG, et al. Prostaglandin-like activity, fatty acid and phospholipids composition of sika deer (*Cervus nippon*) antlers at different growth stages. *Biochem Molec Biol*, 1993, 106:159-162.
- 6 Kim Y, Lim D, Shin S, et al. Biochemical studies on antler (cervus Nippon taiouanus) (V) A study of glycopilids and phospholipids of antler velvet layer and pantocrin. *Korean Biochem*, 1977, 10:153-164.
- 7 Zhang XW (张馨文). The composition and anti-fatigue activity of the lipid-soluble fraction of velvet antler. Chong Qing: Southwest University (西南大学), MSc. 2010.
- 8 Wang JY (王金宇). Extraction of active components from antler velvet and preparation of a novel microcapsule. Tianjin: Tianjin University (天津大学), PhD. 2006.
- 9 Yin YG (殷涌光). A processing unit of high-voltage pulsed electric fields (一种高压脉冲电场处理装置). CN1615759, 2005-05-18.
- 10 Liu JB (刘静波), Zhou YQ (周玉权), Liu D (刘丹), et al. Extracting egg yolk lecithin using PEF-assisted organic solvent. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2013, 29:251-258.
- 11 Zhang Y, Liao XJ, Ni YY, et al. Kinetic analysis of the degradation and its color change of cyanidin-3-glucoside exposed to pulsed electric field. *Eur Food Res Technol*, 2007, 224:597-603.
- 12 Deak A, Chaudhuri B, Bhattacharjee S. A kinetic study of the oxidation of phenol, o-chlorophenol and catechol by hydrogen peroxide between 298 K and 333 K; the effect of pH, temperature and ratio of oxidant to substrate. *J Chem Technol Biotechnol*, 1999, 74:162-168.
- 13 Garde-Cerdan T, Arias-Gil M, Marelles-Fontanet AR, et al. Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free amino acids of grape juice. *Food Control*, 2007, 18:473-479.
- 14 Li YQ, Chen Q, Liu XH, et al. Inactivation of soybean lipoxygenase in soymilk by pulsed electric fields. *Food Chem*, 2008, 109:408-414.

(上接第 1923 页)

- 14 Sun HP (孙化鹏). Optimal select resources of *Diospyros kaki* in Hunan Province and separate and identify the flavonoids of *Diospyros kaki* Leaf. Hunan: Hunan Agricultural University (湖南农业大学), PhD. 2010.
- 15 Han HY (韩慧英). Studies on the bioactive constituents of Qian Lie Kang and *Brassica napus* L. Pollen. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学), PhD, 2004.
- 16 Li BC (李宝才), Wen KW (闻克威), Dong YL (董玉莲), et al. Separation and identification of Rutin in leaves of *Kandilia candel*. *J Trop Oceanograph (热带海洋学报)*, 2002, 21(3):90-94.
- 17 Zhao CY (赵春艳). Studies on separation, purification and structural characterizations of flavonoids from *Allium mongolicum* Regel and its effects on immunity and antioxidant function in mice. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University (内蒙古农业大学), PhD. 2008.
- 18 Wei ZW (魏志文), Wan XC (宛晓春), Li DX (李大祥), et al. Separation and preparation of Quercetin monomer in tea. *Food Ferment Ind (食品与发酵工业)*, 2009, 35:187-190.