

双水相萃取分离葡萄籽中原花青素

Separation of procyanidin from grape seed by aqueous two-phase system

张喜峰^{1,2} 程广¹ 何倩¹ 张芬琴¹ 罗光宏^{3,4}

ZHANG Xi-feng^{1,2} CHENG Guang¹ HE Qian¹ ZHANG Fen-qin¹ LUO Guang-hong^{3,4}

(1. 河西学院农业与生物技术学院, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃 张掖 734000;
3. 河西学院凯源生物技术开发中心, 甘肃 张掖 734000; 4. 甘肃省微藻工程技术研究中心, 甘肃 张掖 734000)

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China;

2. Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Zhangye, Gansu 734000, China;

3. Kaiyuan Bio-Tech Development Center, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China;

4. Kaiyuan Bio-Tech Development Center, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China)

摘要:采用双水相萃取葡萄籽中原花青素, 首先研究双水相萃取体系组成、辅助萃取方法、萃取策略对原花青素萃取效果的影响, 并采用正交试验对原花青素萃取条件进行优化。结果表明, 双水相萃取体系组成为无水乙醇/硫酸铵, 辅助萃取方法为微波辅助法, 萃取策略为乙醇+水+葡萄籽微波处理后加入硫酸铵, 条件为无水乙醇/硫酸铵萃取体系为质量分数 30% 无水乙醇/质量分数 20% 硫酸铵, 加入葡萄籽质量分数为 3%, pH 为 4.0, 微波功率 100 W, 微波时间 5 min, 在该条件下, 葡萄籽中原花青素的萃取率为 94.1%, 得率为 25.8 mg/g;

关键词:葡萄籽; 原花青素; 双水相萃取

Abstract: Procyanidin from grape seed were separated and purified by the aqueous phase two-extraction. Aqueous two-phase extraction systems, differently assisted extraction methods and the extraction strategies were firstly studied. The best extractions of procyanidin by aqueous two-phase system were investigated based on orthogonal experimental design. The results showed that, in the aqueous two-phase extraction system of ethanol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the extraction method was the microwave-assisted extraction, i.e., Ethanol, water, and compounded by microwave treatment, as well as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were added. It was found that the best extraction conditions were 30% (w/w) ethanol/20% (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3% (w/w) grape seed powders, pH=4.0, microwave power 100W, and microwave time 5 min. Under these best extraction conditions, the recovery rate

of procyanidin was 94.1%, and its yield was 25.8 mg/g.

Keywords: grape seed; procyanidin; aqueous two-phase extraction

在葡萄酒酿造过程中, 每年约产生 500~900 万 t 葡萄皮渣废弃物^[1], 近年来仅用于动物饲料和燃料, 附加值较低。因此, 寻找一种有效的葡萄皮渣处理方法迫在眉睫。

原花青素是葡萄籽多酚类化合物的重要组成部分之一, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗过敏、抗突变等活性^[2-4]。廖素凤等^[5]采用丙酮提取葡萄籽中原花青素, 因丙酮有一定毒性, 限制了其应用范围; Hernández-Jiménez A 等^[6]研究了乙醇浓度对葡萄籽原花青素提取效果的影响, 结果表明, 乙醇浓度对葡萄籽中原花青素提取影响较小。樊金玲等^[7]对提取后沙棘籽原花色素与葡萄籽原花青素抗氧化活性进行了比较研究, 发现沙棘籽原花青素相对葡萄籽原花青素抗氧化性较强。金华等^[8]采用超声辅助提取葡萄籽中原花青素, 获得原花青素提取率为 2.482%。Pérez C 等^[9]采用超临界 CO_2 萃取葡萄籽中原花青素, 并对其抗氧化性进行了分析研究。该法存在设备成本较高、能耗大等缺点。原花青素纯化方法主要有大孔树脂层析法, 该法存在溶剂用量大、生产周期长和操作繁琐等缺点。

有机溶剂/盐双水相萃取指将亲水性有机溶剂和盐混合后由于盐析作用可形成两相; 当葡萄籽粉末加入双水相体系后, 蛋白质、多糖、少量多酚类物质进入下相(富盐相), 大部分多酚类物质进入上相(有机溶剂相)。该技术具有操作简单、传质速度快、容易放大、收率高等优点^[10]。该技术在生物工程领域发展较快^[11]。笔者^[12]前期曾采用聚乙二醇(PEG)/硫酸铵双水相体系对葡萄籽粗提液中原花青素进行了研究, 原花青素被萃取到 PEG 相, 但原花青素中 PEG 的去除增加了后续工作的难度。

基金项目: 甘肃省中小企业创新基金项目(编号: 1047GCCG001); 国家级大学生创新创业训练计划项目(编号: 201510740005)

作者简介: 张喜峰, 男, 河西学院讲师, 硕士。

通信作者: 罗光宏(1965—), 男, 河西学院教授, 硕士。

E-mail: luoguanghong@163.com

收稿日期: 2016-12-11

本试验拟采用双水相萃取分离葡萄籽中原花青素,首先分析了双水相萃取体系组成、辅助萃取方法、萃取策略对原花青素萃取效果的影响,在此基础上对萃取过程影响因素进行系统考察,旨在为葡萄籽中原花青素萃取提供最佳方法,同时为其它活性成分萃取提供技术参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与amp;仪器

葡萄籽:品种为赤霞珠,取自甘肃顺意生物科技有限公司,经挑选、洗净晾干、粉碎至50~100目备用;

乙醇:分析纯,成都市科龙化工试剂厂;

香草醛:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

儿茶素标准品:纯度≥99.8%,上海源叶生物科技有限公司;

硫酸铵:分析纯,天津市致远化学试剂有限公司;

电子分析天平:JA2003型,梅特勒-托利多有限公司;

超声波微波组合反应系统:XO-SM50型,南京先欧仪器制造有限公司;

可见分光光度计:722S型,上海现科分光仪器有限公司。

1.2 双水相萃取

1.2.1 香草醛—盐酸法测定原花青素的含量 分别吸取不同浓度的儿茶素标准溶液0.5 mL,加4%香草醛甲醇溶液3 mL,再加入1.5 mL浓盐酸,避光反应15 min。以0.5 mL蒸馏水,4%香草醛甲醇溶液3 mL,1.5 mL浓盐酸为空白对照,在500 nm处测定吸光值^[13]。以反应体系所测吸光值 y 为纵坐标,儿茶素含量 x (mg)为横坐标,作标准曲线,求得回归方程为: $y=6.0104x+0.0124$, $R^2=0.9976$ 。

1.2.2 双水相萃取方法 将一定量的有机溶剂(无水乙醇或丙酮)、无机盐(磷酸氢二钾或硫酸铵)、葡萄籽粉末充分混匀,加蒸馏水使质量分数为100%,搅拌至无机盐溶解,按照一定萃取方法和策略进行,待静置至两相分离,读取上下相的体积,测定上下相的吸光度,并按式(1)~(4)计算相比、分配系数、萃取率及得率。

$$R = \frac{V_{\text{上}}}{V_{\text{下}}}, \quad (1)$$

$$K = \frac{C_{\text{上}}}{C_{\text{下}}}, \quad (2)$$

$$E = \frac{RK}{1+RK} \times 100\%, \quad (3)$$

$$Y = \frac{C_{\text{上}} V_{\text{上}}}{m}, \quad (4)$$

式中:

R ——相比;

$V_{\text{上}}$ ——上相体积,mL;

$V_{\text{下}}$ ——下相体积,mL;

K ——分配系数;

$C_{\text{上}}$ ——上相中原花青素的质量浓度,mg/mL;

$C_{\text{下}}$ ——下相中原花青素的质量浓度,mg/mL;

E ——萃取率,%;

Y ——得率,mg/g;

m ——葡萄籽粉末质量,g。

1.2.3 萃取体系组成的确定 分别按照体系中最终质量分数为28%无水乙醇/22%硫酸铵、28%无水乙醇/22%磷酸氢二钾、28%丙酮/22%磷酸氢二钾,加入质量分数2%葡萄籽粉末,补加蒸馏水使质量分数为100%,搅拌至充分溶解,静置至两相分离,读取上下相的体积,测定上下相的吸光度,并计算相比、分配系数、萃取率及得率,确定原花青素萃取的双水相体系组成。

1.2.4 辅助萃取方法的确定 在质量分数为28%无水乙醇和22%硫酸铵中,加入质量分数2%葡萄籽粉末,补加蒸馏水使质量分数为100%,搅拌至充分混匀。分别采用100 W超声处理5 min、室温浸提5 min、100 W微波处理5 min 3种辅助方法。静置至两相分离,读取上下相的体积,测定上下相的吸光度,并计算相比、分配系数、萃取率及得率,确定原花青素萃取的辅助方法。

1.2.5 萃取策略的确定 按照策略1:无水乙醇+硫酸铵+葡萄籽粉末+水,然后100 W微波处理5 min;策略2:硫酸铵+水+葡萄籽粉末混合后100 W微波处理5 min,加入无水乙醇,策略3:无水乙醇+水+葡萄籽粉末混合后100 W微波处理5 min,加入硫酸铵。3种萃取体系组成均为100%。静置至两相分离,读取上下相的体积,测定上下相的吸光度,并计算相比、分配系数、萃取率及得率,从而确定原花青素萃取的最佳策略。

1.2.6 影响微波辅助萃取葡萄籽原花青素的因素

(1) 无水乙醇/硫酸铵质量分数:按照无水乙醇+水+葡萄籽粉末加入顺序混合后100 W微波处理5 min,加入硫酸铵使体系中无水乙醇/硫酸铵的最终质量分数分别为34%/16%,32%/18%,30%/20%,28%/22%,26%/24%,24%/26%,22%/28%,研究无水乙醇/硫酸铵质量分数组成对原花青素萃取率和得率的影响。

(2) 葡萄籽粉末质量分数:以质量分数30%无水乙醇/20%硫酸铵为双水相萃取体系,加入葡萄籽粉末使其质量分数分别为1%,2%,3%,4%,5%,100 W微波处理5 min,研究葡萄籽粉末加入量对原花青素萃取率和得率的影响。

(3) 体系pH:以质量分数30%无水乙醇/20%硫酸铵为双水相萃取体系,加入葡萄籽粉末使其质量分数为3%,调节体系pH分别为3,4,5,6,7,8,在微波功率为100 W条件下,处理5 min,研究体系pH对原花青素萃取率和得率的影响。

(4) 微波功率:以质量分数30%无水乙醇/20%硫酸铵为双水相萃取体系,加入葡萄籽粉末使其质量分数为3%,调节体系pH为4,在微波功率分别为50,60,70,80,90,100 W条件下,处理5 min。研究微波功率对原花青素萃取率和得率的影响。

(5) 微波时间:以质量分数30%无水乙醇/20%硫酸铵为双水相萃取体系,加入葡萄籽粉末使其质量分数为3%,调节体系pH值为4,在微波功率为90 W条件下,分别处理1,3,5,7,9 min。分析微波时间对原花青素萃取率和得率的影响。

影响。

1.2.7 正交试验设计 在双水相体系组成基础上,对葡萄籽粉末质量分数、pH 值、微波功率、微波时间进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,以原花青素萃取率和得率为分析指标确定葡萄籽原花青素的最佳萃取条件。采用评分优选法^[14]即将各项指标除以该列最大值乘以 100 为该项得分。权衡原花青素萃取率和得率两项指标,确定二者的权重系数均为 0.5,对两项指标进行加权求和,即综合评分 $t = (\text{原花青素萃取率 } t_1 / 94.1\%) \times 100 \times 0.5 + (\text{得率 } t_2 / 27.4) \times 100 \times 0.5$ 。

1.3 双水相萃取后葡萄籽中原花青素薄层层析分析

将 1 mg/mL 原花青素标准品和儿茶素标准品及双水相萃取后上、下相溶液进行薄层层析检测,分别将上述标准品和样品溶液点样于薄层层析硅胶上,在层析缸中展开,扩展剂为 $V_{\text{正丁醇}} : V_{\text{冰乙酸}} : V_{\text{水}} : V_{\text{甲醇}} = 4 : 1 : 3 : 4$,显色剂为 20 mL/100 mL 硫酸甲醇溶液与 1% 香草醛甲醇溶液等量混合喷雾,干燥后显色,分析双水相体系对葡萄籽中原花青素萃取效果。

2 结果与分析

2.1 萃取体系组成对原花青素萃取率和得率的影响

由图 1 可知,对 28% 无水乙醇 22% 硫酸铵、24% 无水乙醇 26% 磷酸氢二钾、34% 丙酮 16% 磷酸氢二钾 3 个双水相萃取体系而言,无水乙醇—硫酸铵双水相萃取体系的原花青素的萃取率和得率最高。原因可能是原花青素在乙醇中的溶解度比在丙酮中的高,同时丙酮毒性较大,存在安全隐患,乙醇不会对人体造成伤害,满足绿色萃取的需求^[15]。磷酸氢二钾与硫酸铵相比,硫酸铵参与组成双水相体系有较高的电荷密度和水化能力^[16],更利于原花青素提取。因此,原花青素的双水相萃取体系组成以无水乙醇/硫酸铵为最佳。

2.2 辅助萃取方法对原花青素萃取率和得率的影响

由图 2 可知,原花青素的得率和萃取率从高到低依次是:微波辅助萃取法>超声辅助萃取法>室温萃取法。微波辅助萃取法与超声波辅助萃取法、室温辅助萃取法相比具有省时、高效和溶剂用量少的特点^[17]。其原因可能是微波有助于提高溶剂分子及原花青素分子的动能,促进了扩散传质运动,进而得到较高的得率和萃取率。故原花青素的萃取方法采用微波辅助萃取法。

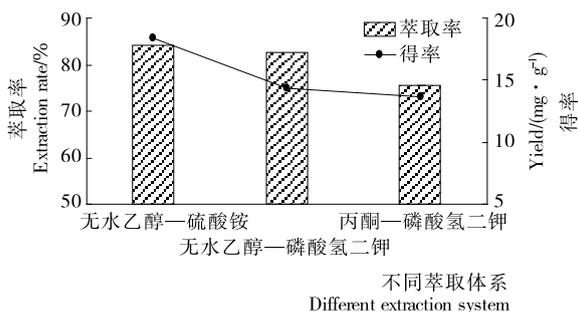


图 1 萃取体系组成对原花青素得率和萃取率的影响

Figure 1 Effect of different extraction system on yield and recovery of procyanidins

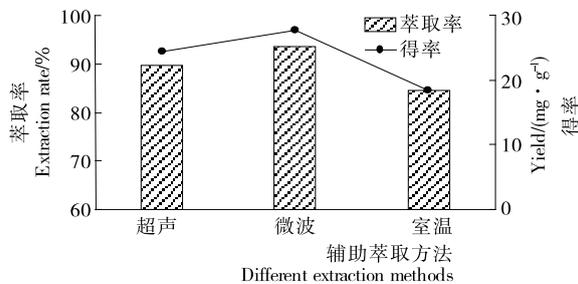


图 2 辅助萃取方法对原花青素得率和萃取率的影响

Figure 2 Effect of different extraction methods on yield and recovery of procyanidins

2.3 萃取策略对原花青素萃取率和得率的影响

由图 3 可知,3 种萃取策略中,策略 3 中原花青素的得率和萃取率较策略 1 和策略 2 高,即将无水乙醇和葡萄籽粉末、水混合,微波处理后加入硫酸铵比直接向双水相体系中加入葡萄籽粉末的萃取效果好,原因可能与无水乙醇和水的极性有关,另外经过乙醇提取的粗提液原花青素的浓度较大。故采用乙醇提取后再加入硫酸铵。

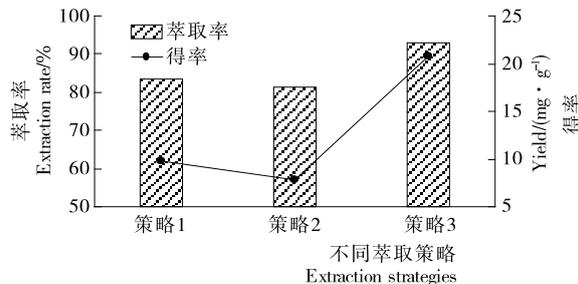


图 3 萃取策略对原花青素得率和萃取率的影响

Figure 3 Effect of different extraction strategy on yield and recovery of procyanidins

2.4 体系中无水乙醇/硫酸铵质量分数比值对原花青素萃取率和得率的影响

由表 1 可知,随着无水乙醇/硫酸铵质量分数比值减小,原花青素的得率和萃取率先呈逐渐升高趋势。在 30%/20% 时达到最大,随后原花青素的得率和萃取率呈下降趋势。其原因可能是当无水乙醇/硫酸铵质量分数比值较大时,在萃取原花青素同时,其它物质如单宁、白藜芦醇等也会被萃取,影响原花青素得率和萃取率;当无水乙醇/硫酸铵质量分数比值较小,萃取不充分,且硫酸铵质量分数过高,由于盐析作用的结果,影响原花青素萃取后两相转移,导致得率和萃取率降低^[16]。因此选择 30% 无水乙醇/20% 硫酸铵为双水相体系组成。

2.5 葡萄籽粉末质量分数对原花青素萃取率和得率的影响

由图 4 可知,在 30% 无水乙醇/20% 硫酸铵双水相萃取体系中,随着葡萄籽粉末质量分数逐渐增加,原花青素得率和萃取率先增加后减小。当葡萄籽粉末质量分数为 3% 时,原花青素得率和萃取率达到最大值。原因可能是粉末加入量较少时,在微波作用下,水分子有效吸收所需要的微波能,使水分子汽化,加强了萃取原花青素的驱动力,从而萃取效

表1 无水乙醇/硫酸铵质量分数比值对原花青素萃取率和得率的影响

Table 1 Effect of ethanol/(NH₄)₂SO₄ mass fraction on yield and recovery of procyanidins

无水乙醇/硫酸铵 质量分数比值	萃取率/%	得率/ (mg·g ⁻¹)
34%/16%	85.4	16.9
32%/18%	86.5	18.9
30%/20%	95.1	25.4
28%/22%	89.2	14.6
26%/24%	89.0	10.8
24%/26%	87.2	10.0
22%/28%	80.9	7.8

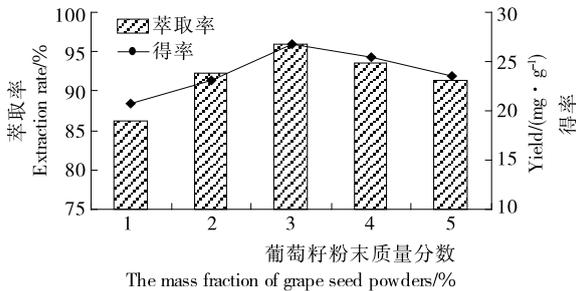


图4 葡萄籽粉末质量分数对原花青素得率和萃取率的影响
Figure 4 Effect of the mass fraction of grape seed powder on yield and recovery of procyanidins

果较好;当葡萄籽粉末加入量过大时,由于上相萃取原花青素的量达到饱和,导致萃取率和得率下降。因此,选择葡萄籽粉末质量分数为3%。

2.6 pH对原花青素萃取率和得率的影响

由图5可知,当萃取体系pH为4时,原花青素得率和萃取率达最大值,可能是在无水乙醇/硫酸铵双水相体系中,上、下相间存在电位差。当pH值较低时,影响原花青素的解离度,使其吸附H⁺而携带正电荷,原花青素主要富集在电位为负的下相,导致萃取率和得率较低;当萃取体系pH值为4时,酸性条件破坏原花青素与蛋白质、多糖等的结合,提高萃取效果;当pH值过大时,会破坏原花青素结构,导致原花青素的得率和萃取率降低。因此选择pH=4.0为最佳。

2.7 微波功率对原花青素萃取率和得率的影响

由图6可知,随微波功率的逐渐增加,原花青素得率在

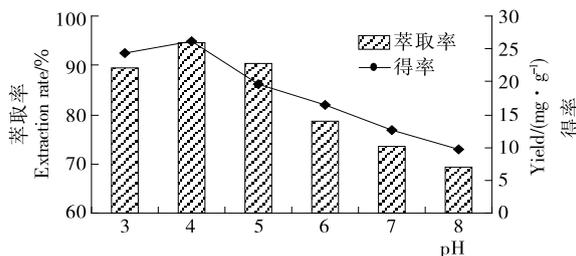


图5 pH对原花青素得率和萃取率的影响

Figure 5 Effect of different pH on yield and recovery of procyanidins

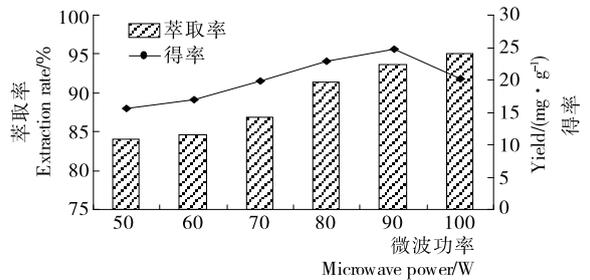


图6 微波功率对原花青素得率和萃取率的影响

Figure 6 Effect of different microwave power on yield and recovery of procyanidins

90 W时达到最大值,之后逐渐下降,而萃取率一直呈现增加趋势。原因可能是在微波功率较低条件下,体系温度较低,热效应缓慢,随着微波功率的增加,温度升高,扩散系数增加,固体表面的液膜层变薄,减少了扩散阻力^[18],促使原花青素得率和萃取率增加;当微波功率超过90 W时,可能其它物质浸出也较多,影响原花青素的得率。因此,最佳微波功率为90 W。

2.8 微波时间对原花青素萃取率和得率的影响

由图7可知,原花青素得率和萃取率随微波时间的延长逐渐增加,在5 min时达到最大值,之后趋于稳定并逐渐下降。原因可能是随着微波时间的延长,高频电磁波穿透并渗透到细胞内部极性分子上,使内部温度突然升高,压力增加,细胞壁破裂^[19],促使葡萄籽中原花青素释放;之后再继续延长微波时间,热量继续积累,原花青素易降解、氧化,使原花青素结构受到破坏^[20]。因此,最佳微波时间为5 min。

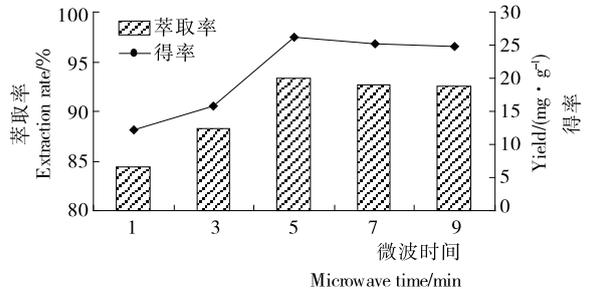


图7 微波时间对原花青素得率和萃取率的影响

Figure 7 Effect of different microwave time on yield and recovery of procyanidins

2.9 正交试验结果及分析

在确定双水相萃取体系为30%无水乙醇/20%硫酸铵基础上,通过改变葡萄籽粉末质量分数、pH、微波功率、微波时间4个因素,以原花青素萃取率和得率为分析指标进行L₉(3⁴)正交试验,因素水平见表2,试验及计算结果见表3。

由表3、4可知,葡萄籽粉末质量分数、微波功率对原花青素萃取率和得率影响显著,各因素对原花青素萃取率和得率影响大小为:葡萄籽粉末质量分数>微波功率>微波时间>pH;最佳工艺条件为A₂B₂C₃D₂,即葡萄籽粉末质量分数3%,pH 4,微波功率100 W,微波时间为5 min。

在30%无水乙醇/20%硫酸铵双水相体系中,按照葡萄

籽粉末质量分数为 3%, pH 4, 微波功率 100 W, 微波时间 5 min 重复 3 次验证实验, 原花青素平均萃取率和得率分别为 94.1% 和 25.8 mg/g, 综合评分为 97.08 分。

2.10 萃取后葡萄籽中原花青素薄层层析分析

由图 8 可知, 上相中原花青素进行薄层展开显现的斑点比下相明显; 上、下相样品展开后斑点的 Rf 值与原花青素和儿茶素标准品的 Rf 值基本保持一致, 说明双水相体系可有

表 2 正交试验因素水平

Table 2 The factors and levels of orthogonal experiments

水平	A 葡萄籽粉末质量分数/%	B pH	C 微波功率/W	D 微波时间/min
1	2	3	80	3
2	3	4	90	5
3	4	5	100	7

表 3 正交试验结果

Table 3 The results of orthogonal experiments

序号	A	B	C	D	原花青素萃取率/%	原花青素得率/(mg·g ⁻¹)	综合评分
1	1	1	1	1	91.5	23.35	91.23
2	1	2	2	2	94.1	25.40	96.35
3	1	3	3	3	89.6	26.11	95.25
4	2	1	2	3	91.9	23.64	91.97
5	2	2	3	1	89.7	27.40	97.66
6	2	3	1	2	94.1	24.90	95.43
7	3	1	3	2	92.1	24.90	95.73
8	3	2	1	3	91.1	20.20	85.26
9	3	3	2	1	87.1	20.90	84.41
k ₁	94.27	92.52	90.74	91.10			
k ₂	95.12	93.09	90.91	95.48			
k ₃	88.02	91.80	95.76	90.83			
R	7.10	1.29	5.02	4.65			

表 4 方差分析表[†]

Table 4 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	90.31	2	45.157 4	36.061 4	0.027 0
B*	2.50	2	1.252 2		
C	48.76	2	24.378 8	19.468 2	0.048 9
D	40.99	2	20.495 1	16.366 8	0.057 6
误差	2.50	2	1.252 2		
总和	182.57				

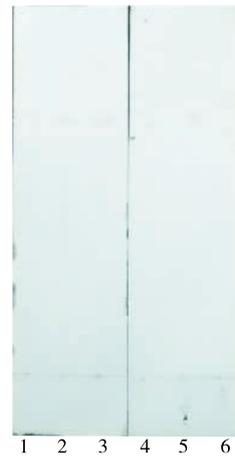
† * 表示误差列。

效萃取葡萄籽中原花青素。

3 结论

利用双水相体系对葡萄籽中的原花青素进行萃取, 主要研究了萃取体系组成、辅助萃取方式、萃取策略对原花青素得率和萃取率的影响, 在此基础上对萃取过程影响因素进行了系统考察, 获得了一种较好的双水相萃取方法。

葡萄籽中原花青素的最佳萃取体系组成为无水乙醇/硫酸铵, 最佳的辅助萃取方法为微波辅助萃取法, 并确定了无水乙醇/硫酸铵双水相萃取体系的质量分数为 30% 无水乙醇/20% 硫酸铵, 葡萄籽粉末质量分数为 3%, pH 为 4.0, 微波功率为 100 W, 微波时间为 5 min, 在该条件下原花青素平均萃取率和得率分别为 94.1% 和 25.8 mg/g。萃取后原花青



1~3. 萃取后上相 4. 萃取后下相 5. 原花青素标准品 6. 儿茶素标准品

图 8 双水相萃取后原花青素的薄层层析

Figure 8 Thin layer chromatograph of the procyanidin by aqueous two-phase system

素经薄层层析检测, 上相中原花青素显现斑点比下相明显, 说明双水相体系可有效萃取原花青素, 且该法可为双水相萃取其它天然产物活性成分提供技术参考。

本试验过程中仅通过萃取效果分析了辅助萃取方法的优劣, 若能将不同萃取方法获得的原花青素进行抗氧化性比较分析, 本研究内容将更加丰富; 萃取后原花青素对抑制晚

期糖基化末端产物如何,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 彭丽霞, 黄彦芳, 刘翠平, 等. 酿酒葡萄皮渣的综合利用[J]. 酿酒科技, 2010(10): 93-96.
- [2] TYAGI A, RAINA K, SHRESTHA S P, et al. Procyanidin B2 3, 3'(-)-di-O-gallate, a biologically active constituent of grape seed extract, induces apoptosis in human prostate cancer cells via targeting NF- κ B, Stat3, and AP1 transcription factors[J]. Nutrition and cancer, 2014, 66(4): 736-746.
- [3] AHMAD F, KHAN G M. Study of aging and hepatoprotective activity of *Vitis vinifera* L. seeds in albino rats[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(3): S1 770-S1 774.
- [4] GU Shao-bin, WU Ying, YANG Jian-bo. Screening of cytoprotectors against methotrexate-induced cytogenotoxicity from bioactive phytochemicals[J]. Peer J, 2016, 4: e1983.
- [5] 廖素凤, 陈剑雄, 黄志伟, 等. 响应曲面分析法优化葡萄籽原花青素提取工艺的研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(3): 554-559.
- [6] HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ A, KENNEDY J A, BAUTISTA-ORTÍN A B, et al. Effect of ethanol on grape seed proanthocyanidin extraction[J]. American journal of enology and viticulture, 2012, 63(1): 57-61.
- [7] 樊金玲, 罗磊, 武涛, 等. 沙棘籽原花色素与葡萄籽原花青素抗氧化活性的比较[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 26-30.
- [8] 金华, 刘志刚, 曾晓丹, 等. 超声提取葡萄籽原花青素工艺的优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2014, 39(4): 102-107.
- [9] PÉREZ C, DEL CASTILLO M L R, GIL C, et al. Supercritical fluid extraction of grape seeds: extract chemical composition, antioxidant activity and inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells[J]. Food & function, 2015, 6(8): 2 607-2 613.
- [10] GRILO A L, RAQUEL AIRES-BARROS M, AZEVEDO A M. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: fundamentals, applications and trends[J]. Separation & Purification Reviews, 2016, 45(1): 68-80.
- [11] TONGUL B, KAVAKCIOGLU B, TARHAN L. Partitioning and purification of menadione induced NAD (P) H oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in aqueous two-phase systems[J]. Separation and Purification Technology, 2016, 163: 275-281.
- [12] 张喜峰, 冯蕾蕾, 赵玉丽, 等. 响应面优化葡萄籽中原花青素的双水相萃取条件[J]. 食品工业科技, 2014, 35(7): 227-231.
- [13] 涂佳, 邓学良, 周文化, 等. 野生毛葡萄常规营养成分和原花青素含量分析[J]. 食品与机械, 2010, 28(2): 82-85.
- [14] 张丽芝, 冯娜. 酶协同微波辅助提取红枣多糖的工艺优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 145-147.
- [15] 吕丽爽, 潘道东. 微波对葡萄籽中低聚原花青素(OPC's)提取的影响[J]. 食品与机械, 2004, 20(6): 31-32.
- [16] IBARRA-HERRERA C C, AGUILAR O, RITO-PALOMARES M. Application of an aqueous two-phase systems strategy for the potential recovery of a recombinant protein from alfalfa (*Medicago sativa*)[J]. Separation and Purification Technology, 2011, 77(1): 94-98.
- [17] 刘叶青. 生物分离工程实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2014: 42.
- [18] CAI Yu, YU Ying-jia, DUAN Geng-li, et al. Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1 872-1 877.
- [19] KRISHNAN R Y, RAJAN K S. Microwave assisted extraction of flavonoids from *Terminalia bellerica*: Study of kinetics and thermodynamics[J]. Separation and Purification Technology, 2016, 157: 169-178.
- [20] ROSTAMI H, GHARIBZAHEDI S M T. Microwave-assisted extraction of jujube polysaccharide: Optimization, purification and functional characterization[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 143: 100-107.
- [12] 杨君, 张献忠, 高宏建, 等. 天然植物精油提取方法研究进展[J]. 中国食物与营养, 2012(9): 31-35.
- [13] 李双, 王成忠, 唐晓璇, 等. 不同提取方法对牡丹精油理化性质和成分的影响[J]. 食品工业, 2015(7): 170-174.
- [14] 杜丽君, 郑国华, 牛先前, 等. 溶剂萃取法提取胡椒木叶片精油影响因子的分析[J]. 福建热作科技, 2015(4): 42-44.
- [15] 戴琳, 单银花, 王志祥, 等. 超临界 CO₂ 萃取玫瑰精油的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2015(3): 266-269, 274.
- [16] PINO J A, MESA J, MUÑOZ Y, et al. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6): 2 213-2 223.
- [17] PINO J A, MESA J. Contribution of volatile compounds to mango (*Mangifera indica* L.) aroma[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2006, 21(2): 207-213.
- [18] 宋平, 宋元德. 不同方法提取沙田柚柚皮精油成分的研究[J]. 保鲜与加工, 2014(1): 41-46.
- [19] 何丽芝, 王婧, 赵振东, 等. 3-萜烯资源及其生物活性应用研究进展[J]. 林产化学与工业, 2011(3): 122-126.
- [20] 刘晓宇, 陈旭冰, 陈光勇. β -石竹烯及其衍生物的生物活性与合成研究进展[J]. 林产化学与工业, 2012(1): 104-110.
- [21] 黄巧娟, 孙志高, 龙勇, 等. D-柠檬烯抗癌机制的研究进展[J]. 食品科学, 2015(7): 240-244.
- [22] 钟佳, 徐小军, 陈尚研, 等. 柠檬醛衍生物的合成及其活性研究进展[J]. 广东化工, 2015, 42(9): 109-111.
- [23] 向俊, 樊蕊, 王磊, 等. 柠檬醛微胶囊化研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2014(9): 176-183.
- [24] 张春娥, 张惠, 刘楚怡, 等. 亚油酸的研究进展[J]. 粮油加工, 2010(5): 18-21.
- [25] 杨静, 常蕊. α -亚麻酸的研究进展[J]. 农业工程, 2011(1): 72-76.

(上接第 159 页)