

微波和超声波提取脐橙皮渣总黄酮工艺条件优化

尹波, 王科军, 钟金莲, 罗序中
(赣南师范学院化学与生命科学学院, 江西 赣州 341000)

摘要: 采用单因素试验及均匀设计法试验和 SPSS 13.0 统计软件回归分析, 进行微波辅助和超声波辅助提取赣南脐橙皮渣中总黄酮的工艺研究。结果表明: 微波辅助最佳提取条件为功率 390W、辐射时间 7min、乙醇体积分数 50%、料液比 1:45(g/mL), 总黄酮提取可达 19.3mg/g; 超声波最佳提取条件为温度 70℃、超声提取时间 60min、乙醇体积分数 50%、料液比 1:45(g/mL), 总黄酮提取可达 16.6mg/g。

关键词: 脐橙渣; 微波辅助; 超声波; 总黄酮

Process Optimization for Microwave-assisted and Ultrasonic-assisted Extraction of Total Flavonoids from Navel Orange Residue (Left over from Juicing)

YIN Bo, WANG Ke-jun, ZHONG Jin-lian, LUO Xu-zhong
(College of Chemistry and Life Science, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, China)

Abstract: Based on one-factor-at-a-time experiments, uniform experimental design followed by regression analysis using the software SPSS 13.0 was carried out to optimize the microwave-assisted and ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from navel orange residue (left over from juicing). The optimal microwave-assisted extraction conditions were microwave power 390 W, irradiation time 7 min, ethanol concentration 50%, and material/liquid ratio of 1:45 (g/mL) and the extraction rate of total flavonoids was 19.3 mg/g under these conditions. The optimal ultrasonic-assisted extraction conditions were temperature 70 °C, ultrasonic treatment time 60 min, ethanol concentration 50%, and material/liquid ratio of 1:45 (g/mL), and the resulting extraction rate of total flavonoids was 16.6 mg/g.

Key words: navel orange residues; microwave-assisted extraction; ultrasonic-assisted extraction; total flavonoids

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)06-0019-05

脐橙为芸香科柑橘属果实, 是江西赣南地区的特色经济作物, 年产量近 200 万吨, 产值超过 40 亿元。脐橙榨汁加工生产中产生大量的脐橙渣, 一般作为饲料、肥料或废弃物处理, 利用率及经济效益较低, 且易污染环境。因此, 研究这些脐橙皮渣中黄酮类化合物的生产具有重要的现实意义。

黄酮类化合物分布广泛, 种类繁多, 具有抗菌、消炎、抗突变、清热解毒、镇静、利尿、防止心血管疾病等作用, 是天然的抗氧化剂^[1-20]。柑橘、槐米、陈皮、黄芩、芫花、葛根、银杏叶中的含量尤为丰富^[6], 黄酮类化合物提取方法有超声波振荡法^[7-9,21-22]、微波萃取^[10-12,23]、双水相萃取法^[13]、酶法及半仿生法^[14-15]、超临界 CO₂ 萃取^[16]等。本实验利用微波萃取、超声波提取赣南脐橙渣中黄酮类化合物, 并应用均匀设计法试

验优化提取工艺, 旨在为赣南脐橙渣资源的研究开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

新鲜脐橙榨汁后剩余皮渣 江西省脐橙工程技术研究中心; 芦丁对照品(含量 ≥ 98%) 天津一方科技有限公司; 无水乙醇(分析纯) 天津市大茂化学试剂厂。

LWMC-201 型微波化学反应器(功率 650W) 南京旋光科技有限公司; SB-3200 型超声波清洗器(超声功率 180W) 宁波新芝生物科技有限公司; UV-2550 型紫外分光光度计 日本岛津公司; AE240 型双量程分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 料理机 九阳股份有限公司; DZF-6090 型真空干燥箱 上海三发科学仪器有限公司

收稿日期: 2011-02-23

基金项目: 江西省科技厅支撑计划项目(2010BNB1400); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ10587);

江西省教育厅青年科学基金项目(GJJ11214); 赣州市果业基金项目(GZGY2008-1)

作者简介: 尹波(1961—), 男, 实验师, 本科, 研究方向为食品加工技术。E-mail: yinbo20080808@126.com

限公司。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液制备

准确称取干燥质量恒定的芦丁对照品 30.30mg, 用 50% (体积分数, 下同) 乙醇溶液溶解并定容于 100mL 容量瓶中, 得 303 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液, 冷藏保存备用。

1.2.2 样品溶液制备

将新鲜的脐橙皮渣于 65℃ 干燥至质量恒定, 用料理机粉碎成粉末, 置干燥器备用。称取一定质量的脐橙皮渣粉末, 加入一定体积分数的乙醇溶液, 分别进行微波处理或超声波处理, 用相应体积分数的乙醇溶液为参比测定吸光度。

1.2.3 提取条件的选择试验设计

利用单因素试验和均匀设计法试验, 以脐橙皮渣为试样研究微波辅助和超声波辅助提取赣南脐橙皮渣中总黄酮的工艺。微波提取工艺选择提取微波功率、微波处理时间、提取乙醇体积分数、料液比为微波提取的因素; 超声波提取工艺选择提取温度、时间、乙醇体积分数、料液比为超声波(180W)提取的因素; 其均匀设计的因素水平见表 1、2。

表 1 微波提取工艺均匀设计法试验因素水平表

Table 1 Factors and their levels in the uniform design for optimizing microwave-assisted extraction

因素	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
辐射功率/W	65	130	195	260	325	390	455	520	585	650
辐射时间/min	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
乙醇体积分数/%	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
料液比(g/mL)	1:10	1:15	1:20	1:25	1:30	1:35	1:40	1:45	1:50	1:60

表 2 超声波提取工艺均匀设计法试验因素水平表

Table 2 Factors and their levels in the uniform design for optimizing ultrasonic-assisted extraction

因素	1	2	3	4	5
提取温度/℃	30	40	50	60	70
提取时间/min	15	30	45	60	75
乙醇体积分数/%	40	50	60	70	80
料液比(g/mL)	1:10	1:20	1:30	1:45	1:60

1.2.4 总黄酮含量测定和鉴定

总黄酮含量测定按文献[7,19]方法进行, 黄酮鉴定按文献[7]方法进行。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制及总黄酮提取率的计算

将不同浓度的对照品溶液在波长 273nm 处以 50% 乙醇溶液为参比测定吸光度 A 。以质量浓度 $C(\mu\text{g/mL})$ 为横

坐标、吸光度 A 为纵坐标, 得线性回归方程: $A = 0.02462C + 0.04613$ ($r = 0.9994$)。芦丁对照品质量浓度 C 在 6.0~58 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

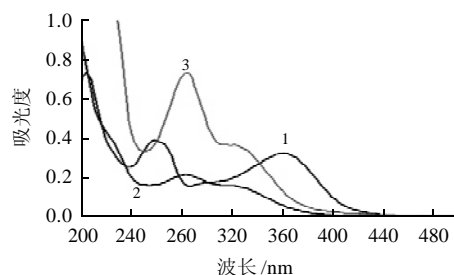
计算总黄酮提取率:

$$Y/(\text{mg/g}) = \frac{C \cdot V}{m} \cdot 10^{-3}$$

式中: C 为根据标准曲线计算所得的总黄酮质量浓度($\mu\text{g/mL}$); V 为提取液的换算总体积/mL; m 为样品质量/g; Y 为总黄酮提取率/(mg/g)。

2.2 测定波长的选择

类黄酮化合物在 200~400nm 区域内存有 2 个主吸收峰: 峰带 I 220~280nm 和峰带 II 300~400nm^[20]。将对照品和样品溶液分别进行紫外扫描得到图 1, 从图 1 可得, 对照品溶液在 258nm 和 362nm 附近有最大吸收, 样品溶液在 282nm 和 320nm 附近有特征峰。兼顾到提取溶液与对照品溶液的吸收光谱的差异, 选择 273nm 为测定波长。



1. 芦丁; 2. 超声波提取样品; 3. 微波提取样品。

图 1 对照品及样品的紫外吸收光谱

Fig.1 UV absorption spectra of rutin standard and total flavonoids extracted by microwave-assisted and ultrasonic-assisted extraction

2.3 单因素试验

2.3.1 微波辅助提取工艺

2.3.1.1 微波辐射功率对提取率的影响

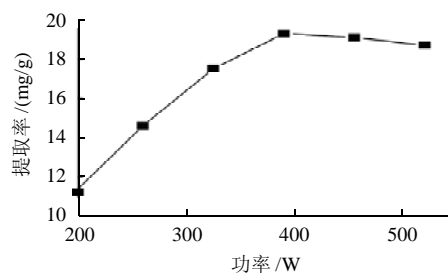


图 2 辐射功率对提取率的影响

Fig.2 Effect of microwave power on the extraction rate of total flavonoids

微波辐射时间 7min, 乙醇体积分数 50%, 液料比 1:45(g/mL), 只改变辐射功率, 结果见图 2。

由图 2 可得, 随着辐射功率的增大, 脐橙皮渣的总黄酮提取率迅速提高, 到 390W 达到最大, 但此后提取率反而有所降低。这是因为微波提供的能量是通过极性分子的偶极旋转和离子传导两种作用直接透过透明的溶剂, 传导到植物物料的细胞内部, 使细胞内瞬间升温, 随着微波能量的增大, 加剧其内部压力超过细胞壁膨胀的能力, 致细胞破裂, 使细胞内的物质自由流出传递至周围的溶剂中被溶解加速^[23]; 当微波方式功率超过 390W 后由于温度过高而使部分乙醇溶剂蒸发为气体减少了与脐橙皮渣接触的几率, 所以提取率会有所下降。故本试验的微波最近辐射功率为 390W。

2.3.1.2 微波辐射时间对提取率的影响

微波辐射功率 390W, 乙醇体积分数 50%, 料液比 1:45, 只改变辐射时间, 结果见图 3。

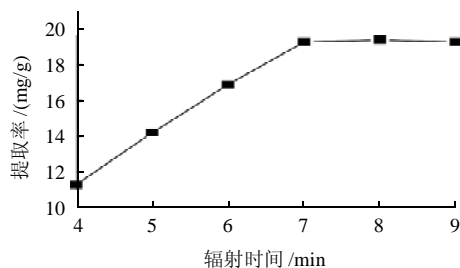


图 3 辐射时间对提取率的影响

Fig.3 Effect of microwave treatment time on the extraction rate of total flavonoids

由图 3 可知, 随着辐射时间的延长黄酮提取率随之迅速增大, 但超过 7min 后提取率基本不变, 这是因为辐射 7min 后脐橙皮渣中的总黄酮基本提取完毕。故本试验的辐射时间 7min 为宜。

2.3.1.3 乙醇体积分数对提取率的影响

微波辐射功率 390W, 辐射时间 7min, 料液比 1:45, 只改变乙醇体积分数, 结果见图 4。

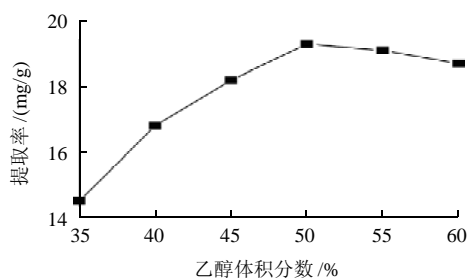


图 4 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig.4 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids

由图 4 可知, 随着乙醇体积分数的增大, 脐橙皮渣的黄酮提取率也增大, 但超过 50% 后会有所下降。本试验以乙醇体积分数 50% 最好。

2.3.1.4 液料比对提取率的影响

微波辐射功率 390W, 辐射时间 7min, 乙醇体积分数 50%, 只改变液料比, 结果见图 5。

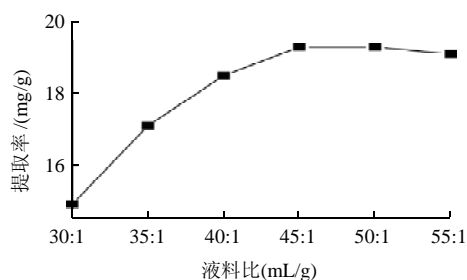


图 5 液料比对提取率的影响

Fig.5 Effect of material/liquid ratio on extraction rate of total flavonoids

由图 5 可知, 随着液料比的增大, 提取率迅速增大, 但液料比到 45:1 后, 脐橙皮渣的黄酮提取率变化不大。故本试验液料比选择 45:1。

2.3.2 超声波辅助提取工艺

2.3.2.1 超声波提取温度对提取率的影响

超声波提取时间 60min, 乙醇体积分数 50%, 料液比 1:45, 只改变提取温度对脐橙皮渣中黄酮提取率的影响, 结果见图 6。

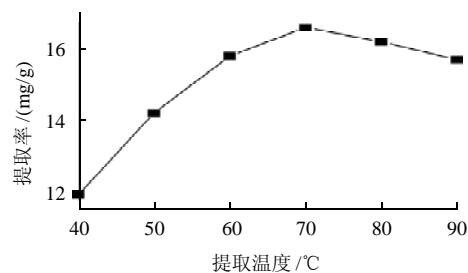


图 6 提取温度对提取率的影响

Fig.6 Effect of temperature on the extraction rate of total flavonoids

由图 6 可知, 随着提取温度的升高, 其提取率快速增大, 但到 70°C 后提取率反而有所下降。这是因为乙醇的沸点较低, 温度太高会使乙醇蒸发为蒸气, 溶剂与皮渣接触的几率减少, 所以提取率会下降。选择 70°C 为最佳。

2.3.2.2 提取时间对其提取率的影响

超声波提取温度 70°C, 乙醇体积分数 50%, 料液比 1:45, 只改变提取时间考察提取率, 结果见图 7。

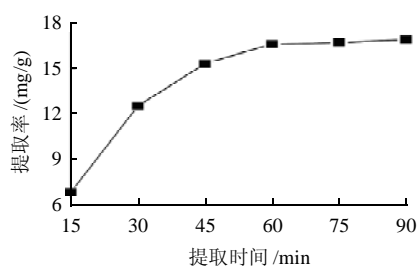


图7 提取时间对提取率的影响

Fig.7 Effect of ultrasonic treatment time on the extraction rate of total flavonoids

由图7可得,随着超声波提取时间的延长,其提取率随之提高,但超过60min后,提取率趋于平缓。选择提取时间60min为宜。

2.3.2.3 乙醇体积分数对提取率的影响

超声波提取温度70℃,提取时间60min,料液比1:45,只改变乙醇体积分数考察提取率的影响,结果见图8。由图8可知,以乙醇体积分数50%提取率最高。

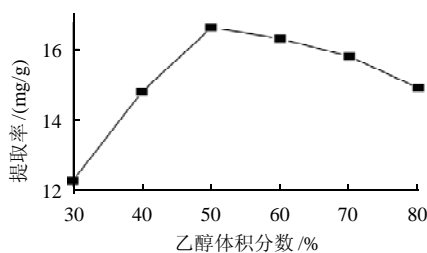


图8 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig.8 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids

2.3.2.4 液料比对提取率的影响

超声波提取温度70℃,提取时间60min,乙醇体积分数50%,考察液料比提取率的影响,结果见图9。由图9可知,液料比45:1(mL/g)为最佳。

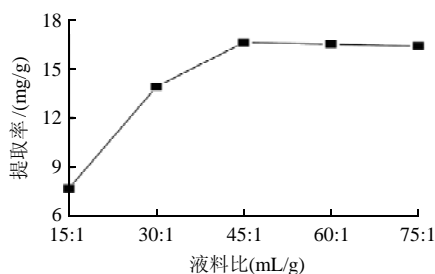


图9 液料比对提取率的影响

Fig.9 Effect of material/liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids

2.4 均匀设计试验条件的优选

微波提取工艺试验方案和结果见表3;超声波提取工艺试验方案和结果见表4。

表3 微波提取 $U_{10}(10^8)$ 均匀设计方案与结果

Table 3 Uniform design arrangement and results for optimizing microwave-assisted extraction

试验号	辐射功率/W	辐射时间/min	乙醇体积分数/%	料液比(g/mL)	黄酮提取率/(mg/g)
1	65(1)	3(3)	60(4)	1:30(5)	4.1
2	130(2)	6(6)	80(8)	1:60(10)	11.9
3	195(3)	9(9)	45(1)	1:25(4)	16.4
4	260(4)	1(1)	65(5)	1:50(9)	10.3
5	325(5)	4(4)	85(9)	1:20(3)	15.5
6	390(6)	7(7)	50(2)	1:45(8)	19.3
7	455(7)	10(10)	70(6)	1:15(2)	17.0
8	520(8)	2(2)	90(10)	1:40(7)	12.6
9	585(9)	5(5)	55(3)	1:10(1)	14.2
10	650(10)	8(8)	75(7)	1:35(6)	16.3

表4 超声波提取 $U_{10}(10^8)$ 水平均匀设计方案与结果

Table 4 Uniform design arrangement and results for optimizing ultrasonic-assisted extraction

试验号	温度/℃	时间/min	乙醇体积分数/%	料液比(g/mL)	黄酮提取率/(mg/g)
1	30(1)	30(2)	50(2)	1:30(3)	6.81
2	30(1)	45(3)	70(4)	1:60(5)	9.12
3	40(2)	75(5)	40(1)	1:20(2)	12.3
4	40(2)	15(1)	60(3)	1:60(5)	8.94
5	50(3)	30(2)	80(5)	1:20(2)	11.8
6	50(3)	60(4)	40(1)	1:10(1)	14.4
7	60(4)	75(5)	60(3)	1:45(4)	15.7
8	60(4)	15(1)	80(5)	1:10(1)	10.8
9	70(5)	60(4)	50(2)	1:45(4)	16.6
10	70(5)	45(3)	70(4)	1:30(3)	13.5

采用SPSS 13.0统计软件对上述均匀设计试验结果进行回归分析。在微波辅助提取黄酮工艺试验中,以 Y_1 对 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 进行逐步回归,得回归方程 $Y_1 = 8.527 + 0.952X_2$,其相关系数 $R^2 = 0.445$,调整决定系数 $R^2_{Adj} = 0.375$, $F = 6.409$, $P = 0.035 < 0.05$ 。表明该方程具有统计学意义。方程中只保留了 X_2 项,其系数为正值,说明辐射时间与黄酮类化合物提取率呈正相关,且影响显著。结合实际条件,选择微波提取的较优工艺条件为辐射功率390W、辐射时间7min、乙醇体积分数50%、料液比1:45(g/mL),在此条件下重复6次实验,总黄酮平均提取率达19.3mg/g;RSD < 0.60%。

在超声波辅助提取黄酮工艺试验中,以 Y_2 对A、B、C、D进行逐步回归,得回归方程 $Y_2 = 1.268 + 0.145A + 0.077B$,其相关系数 $R^2 = 0.922$,调整决定系数 $R^2_{Adj} = 0.900$, $F = 41.459$, $P = 0.000 < 0.01$ 。表明该方程具有统计学意义。方程中保留了A项和B项,其系数均为正值,说明在超声辐射提取黄酮类化合物的工艺中,提取温度和提取时间是影响黄酮类化合物得率的两个主要因素。结合实际条件,选择超声波提取的较佳工艺

条件为温度 70℃、超声提取时间 60min、乙醇体积分数 50%、料液比 1:45(g/mL), 在此条件下重复 6 次实验, 总黄酮平均提取率 16.7mg/g, RSD < 0.70%。

3 结 论

利用均匀设计法, 用 SPSS 13.0 统计软件对试验结果进行回归分析, 得到了微波辅助提取赣南脐橙皮渣中总黄酮的优化条件: 辐射功率 390W、辐射时间 7min、乙醇体积分数 50%、料液比 1:45(g/mL), 总黄酮提取率 19.3mg/g; 超声波提取的优化条件: 温度 70℃、超声提取时间 60min、乙醇体积分数 50%、料液比 1:45(g/mL), 总黄酮提取率 16.6mg/g。

参考文献:

- [1] 裴凌鹏, 惠伯棣, 金宗濂, 等. 黄酮类化合物的生理活性及其制备技术研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 203-207.
- [2] WILMSEN P K, SPADA D S, SALVADOR M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems[J]. Agric Food Chem, 2005, 53(12): 4757-4761.
- [3] TIAN Qingguo, MILLER E G, JAYAPRAKASHA G K, et al. An improved HPLC method for the analysis of citrus limonoids in culture media[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 846(1/2): 385-390.
- [4] KANAZE F I, GABRIELI C, KOKKALOU E, et al. Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 33(2): 243-249.
- [5] MAJO D D, GIAMMANCO M, GUARDIA M L, et al. Flavanones in citrus fruit: structure-antioxidant activity relationships[J]. Food Research International, 2005, 38(10): 1161-1166.
- [6] 张鞍灵, 高锦明, 王姝清. 黄酮类化合物的分布及开发利用[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(1): 69-74.
- [7] 黄运红, 高兴强, 黎伟伟, 等. 超声波提取脐橙皮黄酮类化合物的工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 102-105.
- [8] 杨佳, 张国文, 汪佳蓉, 等. 响应面分析法优化超声提取赣南脐橙皮中黄酮类化合物的工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 94-97.
- [9] 章英, 宋江峰, 李大婧, 等. 均匀设计优选超声波提取甘薯叶黄酮的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(6): 190-195.
- [10] 王刚, 郭延磊. 均匀设计优选微波辅助萃取照山白黄酮类成分[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(4): 434-436.
- [11] 李智利. 微波萃取法提取柑橘皮中的黄酮及含量分析[J]. 应用化工, 2007, 36(10): 998-999.
- [12] 张玉, 曾凡坤, 吴剑. 微波辅助提取柑桔皮渣中类黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(7): 210-212.
- [13] 张春秀, 胡小玲, 卢锦花, 等. 双水相萃取法富集分离银杏叶浸取液的探讨[J]. 化学研究与应用, 2001, 13(6): 686-688.
- [14] 陈晓娟, 周春山. 酶法及半仿生法提取杜仲叶中绿原酸和黄酮[J]. 精细化工, 2006, 23(3): 257-260.
- [15] 黄剑波, 孙哲浩, 董华强. 酶解辅助提取甜茶黄酮类化合物的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(2): 36-40.
- [16] 王正云. 超临界 CO₂ 萃取芦笋中总黄酮的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(10): 42-46.
- [17] 苏东林, 单杨, 李高阳, 等. 响应面法优化柑桔皮总黄酮提取工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 9(6): 70-77.
- [18] 徐春仲. 响应面法优化橘渣中类黄酮提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(12): 41-45.
- [19] 吕凇, 陶宁萍. 紫外分光光度法检测桔皮中总黄酮含量的方法研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(2): 217-220.
- [20] 姚新生. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [21] 周晶, 冯淑华. 中药提取分离新技术[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [22] 郭孝武, 冯岳松, 等. 超声提取分离[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [23] 金钦汉, 戴树珊. 微波化学[M]. 北京: 科学出版社, 1999.