

荔枝皮黄酮微波—双水相提取工艺优化及 DPPH·清除活性

Optimization of extraction technology of flavonoids in litchi peel by microwave-assisted aqueous two-phase method and its clearing activity to DPPH·

王维力¹ 明 李¹ 阮尚全^{1,2} 汪建红^{1,2}

WANG Wei-li¹ MING Li¹ RUAN Shang-quan^{1,2} WANG Jian-hong^{1,2}

(1. 内江师范学院化学化工学院, 四川 内江 641199; 2. 四川省高等学校果类废弃物资源化重点实验室, 四川 内江 641199)

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Neijiang Normal University, Neijiang, Sichuan 641119, China; 2. Key Laboratory of Fruit Waste Treatment and Resource Recycling of the Sichuan Provincial College, Neijiang, Sichuan 641199, China)

摘要:采用微波联合双水相技术考查了乙醇体积分数、料液比、硫酸铵用量、微波功率、微波辐射时间对提取荔枝皮黄酮得率的影响,以 Box-Behnken 试验设计建立了提取试验模型,在乙醇体积分数为 60%、料液比 1:40 (g/mL)、硫酸铵用量 10 g/100 mL、微波辐射时间 90 s、微波功率 270 W 时,黄酮得率为 20.74%,与模型计算值 20.94% 的相对误差为 0.97%,产物清除 DPPH· 具有良好的量效关系,浓度达到 1.5 μg/mL 时清除能力强于 V_C 和芦丁。

关键词:荔枝皮;微波辐射;双水相技术;黄酮;自由基

Abstract: The influence of ethanol concentration, solid-liquid ratio, amount of ammonium sulfate, microwave power and microwave radiation time, on the yield of flavonoids, was investigated by microwave-assisted aqueous two-phase method. The experimental model, in which flavonoids were extracted, was established by Box-Behnken experimental design. The results showed that when the ethanol volume fraction was 60%, the solid-liquid ratio was 1:40 (g/mL), the amount of the ammonium sulfate was 4 g, the microwave radiation time was 90 s, and the microwave power was 270 W, the yield of the flavonoid was 20.74%, which relative error was 0.97% for the model calculated value 20.94%. The product had good dose-effect relationship for DPPH·, and the scavenging ability was stronger than V_C and rutin in 1.5 μg/mL.

Keywords: litchi peel; microwave radiation; aqueous two-phase tech-

nique; flavonoid; free radical

中国荔枝种植主要分布在两广、福建、海南、四川、台湾等地区,在食用、尤其是生产加工中产生的果皮以丢弃为主,四川合江县栽植面积已超过 2.0×10⁴ hm²,年产量达 2.0×10⁷ kg,果皮按 16% 计算^[1],可达到 3.20×10⁶ kg,其深度利用意义重大。荔枝皮中黄酮含量高达 17.92%^[2],在医药、食品、化妆品等行业具有极大开发前景^[3-4]。目前荔枝皮黄酮提取方法有直接水浴加热法^[1]、超声波提取法^[5]、微波与超声波耦合^[6]、酶法与超声波耦合^[7]等,鲜见用双水相技术提取的研究报道。微波能显著缩短提取时间,提高产率,文献[8~9]用微波法和超声波法提取同一榴莲皮中的黄酮,微波法将提取时间由 50 min 缩短到 120 s,产率由 3.26% 提高到 4.84%。双水相体系因条件温和、溶剂易回收、易于连续化操作等优点,广泛应用于生物、食品、制药等领域,已有工业化应用报道^[10-13]。

本试验拟以四川合江县荔枝皮为材料,微波和双水相技术的优点相结合,用响应曲面优化建立提取其中黄酮的理论模型和试验方法,获得各因素与响应值之间的函数关系,得到因素的最佳组合,并对提取物清除 DPPH· 进行了试验,以期合江荔枝皮的深度利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

紫外可见分光光度计:T6-新世纪型,北京普析通用仪器有限公司;

离心机:TD-5 型,四川蜀科仪器有限公司;

微波紫外超声波三位一体合成萃取仪:UWave-1000 型,

基金项目:四川省教育厅自然科学基金重点项目(编码:15ZA0291);
内江师范学院大学生科研重点项目(编码:17NSD-51)

作者简介:王维力,女,内江师范学院在读本科生。

通信作者:阮尚全(1963—),男,内江师范学院高级实验师,本科。

E-mail: rsq2009nj@sina.com

收稿日期:2018-06-26

上海新仪微波化学科技有限公司;

中药粉碎机:DFT-10型,温岭市林大机械有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9140A型,上海精宏实验设备有限公司;

电子分析天平:AE240型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

芦丁、抗坏血酸、二苯代苦味酰基苯肼(DPPH·)、亚硝酸钠、硝酸铝、无水乙醇、氢氧化钠、硫酸铵、磷酸氢二钾等:分析纯,成都金山化学试剂厂;

试验用水为蒸馏水;

荔枝皮:采自于四川合江县荔枝生产基地,果皮低温烘干至恒重,粉碎备用。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制 准确称取芦丁标准品 0.020 0 g,以 60%乙醇溶解,定容于 50 mL 容量瓶中,移取 0.00,1.00,2.00,3.00,4.00,5.00,6.00 mL 于 25 mL 比色管中,根据文献[7]方法测定,以吸光度为纵坐标,芦丁浓度为横坐标,用最小二乘法作线性回归曲线。

1.2.2 黄酮的测定 参照文献[7],按式(1)计算黄酮得率。

$$R_1 = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R_1 ——黄酮得率,%;

m_1 ——黄酮质量,g;

m_2 ——荔枝皮质量,g。

1.2.3 筛选分相盐 根据文献[14]修改如下:在乙醇体积分数为 65%、微波时间为 90 s、料液比为 1:40 (g/mL)、微波功率为 250 W 条件下,比较硫酸铵和磷酸氢二钾 2 种分相盐对荔枝皮中黄酮提取效果的影响。

1.2.4 单因素试验

(1) 乙醇体积分数:固定料液比 1:40 (g/mL),微波功率 250 W,提取时间 90 s,考查乙醇体积分数(55%,60%,65%,70%,75%)对黄酮得率的影响。

(2) 料液比:固定乙醇体积分数 65%,微波功率 250 W,提取时间 90 s,考查料液比[1:20,1:25,1:30,1:40,1:50 (g/mL)]对黄酮得率的影响。

(3) 硫酸铵用量:固定乙醇体积分数 65%,料液比 1:40 (g/mL),微波功率 250 W,提取时间为 90s,考查硫酸铵(7.5,10.0,12.5,15.0,17.5 g/100 mL)对黄酮得率的影响。

(4) 微波辐射时间:固定乙醇体积分数 65%,料液比 1:40 (g/mL),硫酸铵 10 g/100 mL,微波功率 250 W,考查提取时间(30,60,90,120,150 s)对黄酮得率的影响。

(5) 微波功率:固定乙醇体积分数 65%,料液比 1:40 (g/mL),硫酸铵 10 g/100 mL,提取时间 90 s,考查微波功率(200,250,300,350,400 W)对黄酮得率的影响。

1.2.5 Box-Behnken 试验设计 以硫酸铵用量、微波功率、微波辐射时间为试验因子,黄酮得率为响应值,用 Design Expert 8.0 软件中 Box-Behnken 设计进行试验优化。

1.2.6 清除 DPPH· 试验 根据文献[15]修改为:DPPH·

浓度为 0.000 2 mol/L,取提取液(黄酮浓度为 0.015 g/L) 0.10,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00,1.20 mL 于 25 mL 的比色管中,加入 DPPH· 溶液 2 mL,用 95%乙醇准确补充至 6 mL,摇匀,室温下避光放置 30 min,以 60%乙醇作参比,在 517 nm 波长下测定吸光值 A_i ,用同法测定吸光值 A_c 和 A_j ,考查提取液清除自由基的性质,并与等浓度的 V_c 和芦丁进行比对试验。清除率计算公式:

$$K = \frac{A_c - (A_i - A_j)}{A_c} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

K ——DPPH· 清除率,%;

A_i ——加入 DPPH· 的待测液吸光值;

A_j ——待测液吸光值;

A_c ——DPPH· 吸光值。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线试验

如图 1 所示,芦丁标准曲线方程为 $A = 0.011 1c - 0.039 6$,相关系数 $R^2 = 0.999 4$ 。

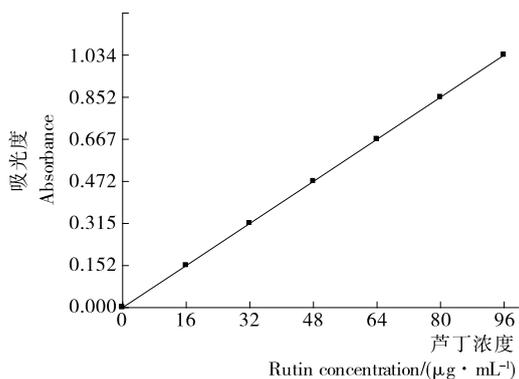


图 1 芦丁标准曲线

Figure 1 The standard curve of rutin

2.2 分相盐试验

在有效分相条件下,硫酸铵和磷酸氢二钾对照试验结果:黄酮得率分别为 14.65% 和 11.29%,可知硫酸铵对本材料更有效,同时硫酸铵作为一种酸性盐,具有溶解度大、易操作特点,适合提取黄酮类物质,故本试验确定硫酸铵为分相盐。

2.3 单因素试验

2.3.1 乙醇体积分数对黄酮得率的影响 如图 2 所示,在乙醇体积分数为 55%~60%时,黄酮得率随乙醇体积分数增加有显著增长,65%时得率达到最高,60%~65%时得率增加不显著;当乙醇浓度继续增大时,黄酮得率有下降趋势,可能是杂质成分溶出竞争力增强和对微波的作用产生了影响,导致黄酮得率降低。因此确定最佳乙醇体积分数为 60%。

2.3.2 料液比对黄酮得率的影响 如图 3 所示,料液比在 1:25~1:50 (g/mL)时,黄酮得率随着溶剂量的增加而增加。料液比在 1:30~1:40 (g/mL)时增加显著,在 1:40~1:50 (g/mL)时增加较小,考虑到提取剂用量较大时,不仅增加了乙醇用量,增大了后续工序难度,还会导致生产

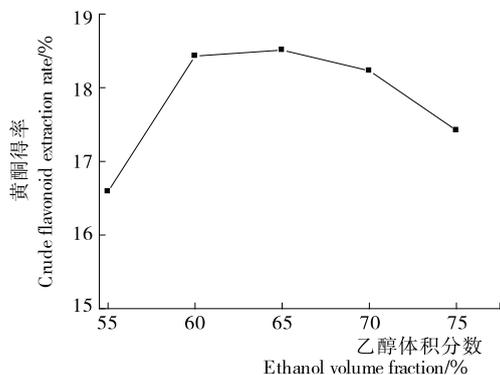


图 2 乙醇体积分数对黄酮得率的影响

Figure 2 Effects of ethanol volume fraction on yield of flavonoids

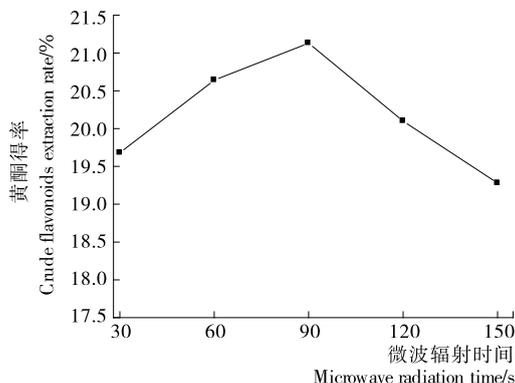


图 5 微波辐射时间对黄酮得率的影响

Figure 5 Effects of microwave radiation time on yield of flavonoids

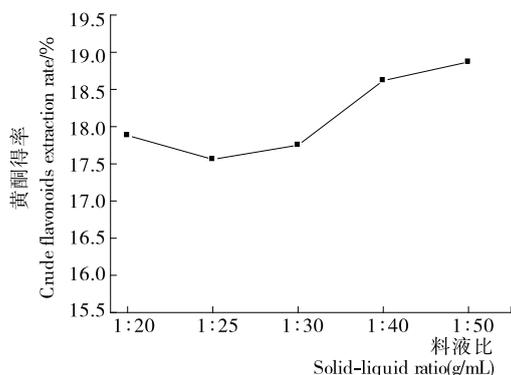


图 3 料液比对黄酮得率的影响

Figure 3 Effects of solid-liquid ratio on yield of flavonoids

成本增加,综合考虑选定 1:40 (g/mL)为最佳料液比。

2.3.3 硫酸铵用量对黄酮得率的影响 如图 4 所示,黄酮得率随硫酸铵用量的增加先增加后减少,在硫酸铵用量为 10 g/100 mL 时有最大值,但随着硫酸铵用量增加黄酮量减少,且 10 g/100 mL 时已出现少许的盐剩余,分相明显,综合考虑,选取硫酸铵用量为 10 g/100 mL 时最佳条件。

2.3.4 提取时间对黄酮得率的影响 如图 5 所示,随着提取时间延长,黄酮得率先增加后减少,在 90 s 时有最佳值,之后有减少。可能是最初微波提取时,黄酮溶出起主导作用,但

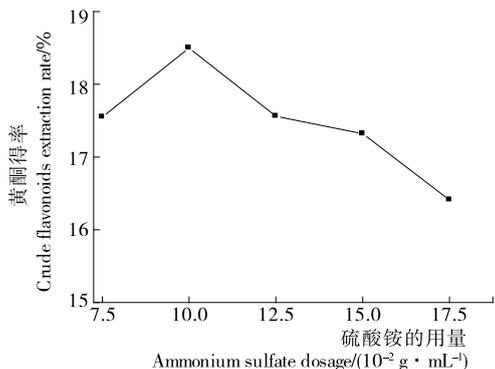


图 4 硫酸铵用量对黄酮得率的影响

Figure 4 Effects of ammonium sulfate dosage on yield of flavonoids

加热时间过长,微波对黄酮类物质中有效成分结构破坏及降解逐渐凸显,从而导致得率降低。因此确定最佳提取时间为 90 s。

2.3.5 微波功率对黄酮得率的影响 如图 6 所示,最初黄酮得率随着微波功率的增加而增加,在 250 W 时有最佳值。因为微波功率越大,分子运动越剧烈,提取效率相对会越高,当微波功率过大时,活性分子运动过于剧烈,也加剧了活性物质间发生副作用,导致黄酮得率下降。另一方面也会加剧黄酮有效成分结构被破坏及其他杂质增加而不利于提取。故将 250 W 作为最佳功率。

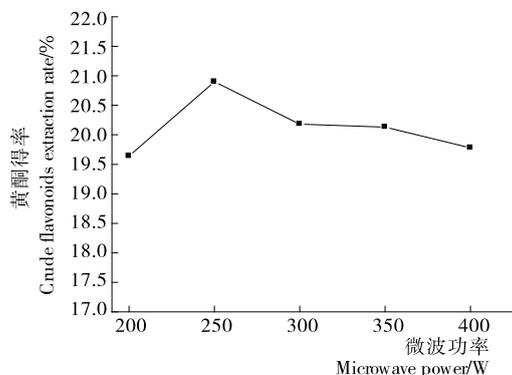


图 6 微波功率对黄酮得率的影响

Figure 6 Effects of microwave power on yield of flavonoids

2.4 响应曲面试验结果

2.4.1 因素水平及编码 见表 1。

2.4.2 响应曲面试验结果及方差分析 固定乙醇体积分数为 60%,料液比为 1:40 (g/mL),以硫酸铵用量、微波功率、微波时间为变量因子,黄酮得率为响应值,设计三因素三水平 Box-Behnken 试验,试验结果见表 2,方差分析见表 3。

通过 Design Expert 8.0 软件对 17 组数据进行回归分析及拟合,得回归方程为:

$$R_1 = -12.842 + 3.514 5A + 0.150 8B + 0.145 3C - 0.000 4AB + 0.011 667AC - 0.000 25BC - 0.569A^2 - 0.000 235 6B^2 - 0.000 676 667C^2. \quad (3)$$

表1 Box-Behnken 中心组合因素水平编码表

Table 1 Factor levels Coding table of Box-Behnken central combination

水平	A 硫酸铵用量/ ($10^{-2} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	B 微波功率/ W	C 微波时间/ s
-1	7.5	250	60
0	10.0	300	90
1	12.5	350	120

表2 Box-Behnken 设计方案及试验结果

Table 2 Design scheme and experimental result of Box-Behnken central combination

试验号	A	B	C	黄酮得率 $R_1/\%$
1	1	1	0	19.92
2	0	-1	-1	18.65
3	-1	0	1	19.61
4	1	0	1	20.33
5	1	-1	0	19.11
6	0	0	0	20.54
7	1	0	-1	19.05
8	0	0	0	21.04
9	0	0	0	20.69
10	0	0	0	20.72
11	0	1	1	19.92
12	-1	1	0	20.33
13	0	1	-1	20.33
14	-1	-1	0	19.44
15	0	0	0	21.30
16	-1	0	-1	19.73
17	0	-1	1	19.74

表3 回归模型方差分析结果[†]

Table 3 Variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	8.02	9	0.89	12.87	0.001 4	**
A	0.061	1	0.061	0.88	0.378 4	
B	1.58	1	1.58	22.87	0.002 0	**
C	0.42	1	0.42	6.11	0.042 7	*
AB	0.001 6	1	0.001 6	0.023	0.883 5	
AC	0.49	1	0.49	7.07	0.032 5	*
BC	0.56	1	0.56	8.12	0.024 7	*
A ²	1.36	1	1.36	19.68	0.003 0	**
B ²	1.46	1	1.46	21.09	0.002 5	**
C ²	1.56	1	1.56	22.54	0.002 1	**
残差	0.48	7	0.069			
失拟项	0.11	3	0.036	0.38	0.772 2	
净误差	0.38	4	0.094			
总差异	8.51	16				

[†] $R^2=0.943 0; R_{adj}^2=0.869 7; CV\%=1.31; *$ 表示差异显著 ($P<0.05$); ** 表示差异极显著 ($P<0.01$).

由表3可知,影响荔枝皮黄酮得率的主次顺序为 $B>C>A$,且微波功率在设计水平内影响具有极显著性,微波辐射时间具有显著性,硫酸铵用量影响不显著。模型P值为0.001 4,说明该模型有效可靠、有意义 ($P<0.01$),失拟项P值为0.772 2不显著 ($P>0.05$),对模型有利。 $R^2=0.943 0$,说明该模型能解释94.30%响应值的变化, $R_{adj}^2=0.869 7$,说明可信度较好,因此可以运用该拟合模型对荔枝皮中黄酮得率进行分析预测。

2.4.3 黄酮得率的响应面分析 试验因子A、B、C所构成的响应曲面图如图7~9所示。

从响应曲面图可形象地看出图形均为山丘形曲面,有极大值,结合方差分析,可以得出微波功率在交互作用中对黄酮得率的影响最显著,微波时间的影响次之,硫酸铵用量的影响作用不够显著。利用RMS预测,通过对各个响应面最高点的极值分析及对最高点取值,并对多元二次回归方程进行求解,得出各个因子的解,最优工艺条件为:硫酸铵用量9.85 g/100 mL,微波时间91.79 s,微波功率268.03 W,在此条件下荔枝皮中黄酮得率的理论值可达20.947 8%。

2.4.4 验证实验 考虑到可操作性,以硫酸铵用量为10 g/100 mL、微波时间为90 s、微波功率为270 W验证Box-Behnken设计试验所得结果的可靠性,5次平行实验所得黄酮得率的统计均值为20.74%,与此条件下理论预测值

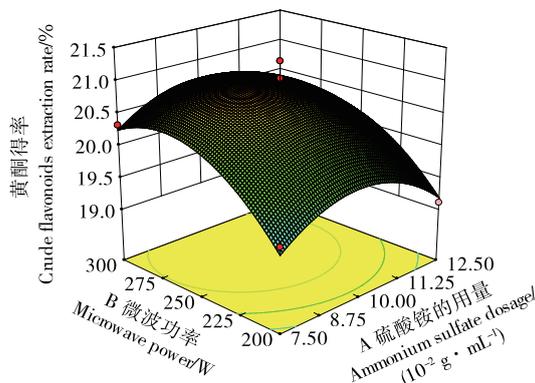


图7 因素A和因素B对黄酮得率影响的响应面
Figure 7 Response surface plot about effects of factor A and factor B on yield of flavonoids

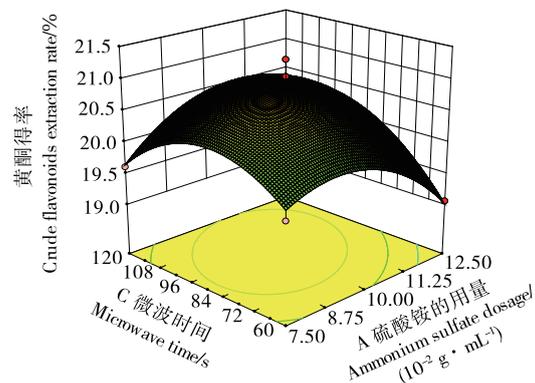


图8 因素A和因素C对黄酮得率影响的响应面
Figure 8 Response surface plot about effects of factor A and factor C on yield of flavonoids

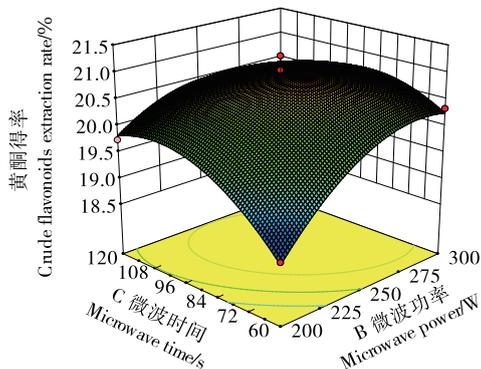


图 9 因素 B 和因素 C 对黄酮得率影响的响应面

Figure 9 Response surface plot about effects of factor B and factor C on yield of flavonoids

20.94% 的相对误差为 0.97%, 表明该优化参数可靠, 试验模型有指导意义。

2.5 对 DPPH· 的清除效果

如图 10 所示, 荔枝皮黄酮对 DPPH· 有一定的消除能力, 且随样品浓度的增大而增强, 在 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内呈现较好的量效关系, 浓度达到 0.25~1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 荔枝皮黄酮对 DPPH· 的清除作用好于 V_c 、芦丁。

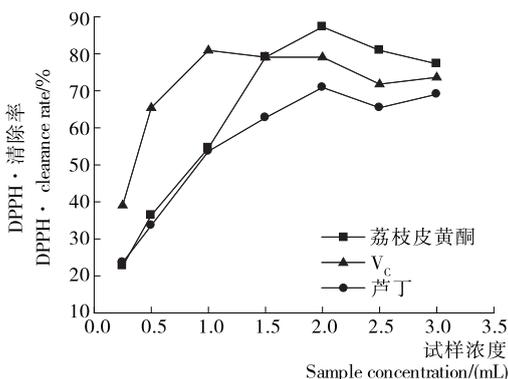


图 10 不同清除剂的 DPPH· 清除率

Figure 10 Scavenging rates of different scavenger for DPPH·

3 结论

本研究充分利用了微波和双水相技术的优点, 缩短了提取时间, 溶剂易于回收。以 Box-Behnken 方法进行响应曲面设计, 建立了微波联用双水相提取荔枝皮中黄酮的试验理论模型, 得到的工艺参数为硫酸铵用量 10 g/100 mL, 微波时间 90 s, 微波功率 270 W, 黄酮得率为 20.74%; 提取物有较好的清除 DPPH· 的能力, 存在较好的量效关系。后续将对黄酮的分离纯化及应用作进一步的研究。

参考文献

[1] 杨宝. 荔枝壳功能性成分制备与生理活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2006.

[2] 杨宝, 赵谋明, 李宝珍, 等. 荔枝壳黄酮类物质的醇提工艺[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(4): 144-146.

[3] 张扬武, 罗伟生. 荔枝核总黄酮治疗肝脏疾病实验研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(10): 220-222.

[4] 孟庆华, 于晓霞, 张海凤, 等. 天然黄酮类化合物清除自由基机理及其应用进展[J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2012, 21(2): 79-83.

[5] 涂华, 陈碧琼, 张燕军. 超声波提取荔枝壳总黄酮的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(14): 8 350-8 352.

[6] 涂华, 陈碧琼, 周锡兰. 超声波微波双辅助提取荔枝壳总黄酮工艺优化[J]. 湖北农业科学, 2013, 54(52): 2 880-2 882.

[7] 阮尚全, 宋秋菊, 何慧蓉, 等. 超声波协同酶法提取荔枝壳中总黄酮及抗氧化性[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2014, 37(4): 574-578.

[8] 阮尚全, 黄艺, 刘艳玲, 等. 微波协同双水相提取榴莲皮中总黄酮的工艺[J]. 食品科技, 2013, 38(10): 228-231.

[9] 阮尚全, 王志鹏, 黄雀宏, 等. 双水相-超声波提取榴莲果皮总黄酮的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1 722-1 725.

[10] 陈亚妮, 张军民. 微波萃取技术研究进展[J]. 应用化工, 2010, 39(2): 270-273.

[11] 邹艳敏. 回流法与微波法提取白首乌地上部分总黄酮的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(35): 15 535-15 536.

[12] 陈丛瑾, 屈丽娟, 陈东. 双水相萃取法分离纯化黄酮类化合物的研究进展[J]. 应用化工, 2010, 39(10): 1 587-1 589, 1 596.

[13] 吴丁丁, 穆小静, 易小琦. 双水相萃取技术的新发展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 395-398.

[14] 李梦青, 耿艳辉, 刘桂敏, 等. 双水相萃取技术在白藜芦醇提纯工艺中的应用[J]. 天然产物研究与开发, 2006(18): 647-649.

[15] 海平, 苏雅乐其其格. 蒙药小白蒿中总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 59-63.

● 欢迎订阅 发布广告

- 中文核心期刊
- 俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI) 收录期刊
- 中国科技核心期刊
- 美国《化学文摘》(CA) 收录期刊
- RCCSE 中国核心学术期刊
- 波兰《哥白尼索引》(IC) 收录期刊
- 国内外公开发行人刊
- 英国《食品科技文摘》(FSTA) 收录期刊
- 入选《中国知识资源总库·科技精品期刊》
- 英国《全球健康》(Global Health) 收录期刊
- 《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊
- 英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI) 收录期刊
- 《中国期刊网》全文数据库收录期刊
- 万方数据—数字化期刊群全文数据库收录期刊
- 美国《乌利希期刊指南》(UPD) 收录期刊

《中国调味品》 CHINA CONDIMENT

《中国调味品》杂志是中文核心期刊。于1976年创刊, 是调味品行业国内外公开发行的专业技术刊物。三十多年来我刊本着为行业服务, 推动行业技术进步的宗旨, 以先进性、实用性、信息量大的特点办刊, 受到业内人士欢迎。

《中国调味品》主要刊载食品添加剂、酱油、食醋、盐、酱腌菜、豆腐乳、方便面、香辛料、鲜味剂、甜味剂、核苷酸、复合调味料及有关调味技术等领域的新技术、新工艺、新设备等内容。设有“基础研究”、“技术研发”、“分析检测”、“食品添加剂”、“专论综述”等专栏。

有人用调味品家 烹了入品食

刊号: ISSN 1000-9973 邮发代号: 14-13 月刊 大16开 正文200页 15.00元/期 180.00元/年
CN 23-1299/TS

投稿网站: www.zgtwp.cn 邮箱: zgtwp1976@vip.163.com

地址: 哈尔滨市南岗区西大直街331号方舟大厦C座17楼

联系电话: 0451-53627188 0451-53627988

《中国调味品》杂志社 全国调味品科技情报中心站