

双水相-超声波提取榴莲果皮总黄酮的工艺研究

阮尚全^{1,2}, 王志鹏¹, 黄雀宏¹, 卓莉^{1,2}

(1. 内江师范学院化学化工学院, 四川内江 641112)

(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 641112)

摘要: 在乙醇-硫酸铵双水相中, 采用超声波法提取了榴莲皮中的总黄酮。考查了乙醇浓度、硫酸铵用量、料液比、超声功率、超声时间、提取温度对总黄酮提取率的影响。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 确立了榴莲果皮中总黄酮提取最佳工艺条件为: 60%乙醇浓度, 料液比为 1:25, 超声波功率 280W, 超声时间 50 min, 提取温度 70℃。按照最优条件提取, 总黄酮得率达 3.26%。

关键词: 双水相; 超声波; 榴莲果皮; 黄酮

文章编号: 1673-9078(2012)12-1722-1725

Study on Extraction Technology of the Flavonoids Ultrasonic by Wave and Aqueous Two-phase System in the Durio Zibethinus Peel

RUAN Shang-quan^{1,2}, WANG Zhi-peng¹, HUANG Que-hong¹, ZHUO Li^{1,2}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Neijiang Normal University, Neijiang 641112, China) (2. Key Laboratory of Fruit Waste Treatment and Resource Recycling of the Sichuan Provincial College, Neijiang 641112, China)

Abstract: The flavonoids were extracted in the ethanol-(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system by ultrasonic cooperation. The ethanol concentration, the amount of the (NH₄)₂SO₄, the solid-liquid ratio, the ultrasonic power, the ultrasonic time and the extraction temperature were discussed by the single factor experiment. The optimum extraction conditions were optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test. The optimum extraction conditions of the flavonoids were as follows: the ethanol concentration 60%, the solid-liquid ratio 1:25, the ultrasonic power 280 W, the ultrasonic time 50, and the extraction temperature 70 °C. The yield of the flavonoid was reached 3.26% at the optimum conditions.

Key words: aqueous two-phase system; ultrasonic wave; durio zibethinus peel; flavonoid

榴莲 (*Durio zibethinus*) 是木棉科 (*Bombaceae*) 榴莲属 (*Durio*) 植物, 原产于马来西亚, 是热带著名水果之一, 在东南亚等热带国家被誉为“果中之王”^[1]。其香气成分中含有多种酯类、酮类、烃类和含硫化合物^[2]。果肉除可鲜食外, 还可煮食和加工成各种美食, 还具有良好的药用价值^[3-5]。黄酮类化合物(flavonoids)属于多酚类物质, 广泛作为抗氧化剂、抗菌剂、感光器、外观引诱剂等, 具有降压、降血脂、增加冠脉流量、抗血栓等功能, 是预防和治疗高血压的有效成分, 广泛用于医药、食品等行业, 具有极广的开发应用前景^[6,7]。榴莲皮占单果重的 50%以上, 是重要的生物活性物质的资源, 目前果皮主要是废弃物方式处理, 既污染环境, 又造成极大的资源浪费。提取榴莲废弃物中黄酮类化合物, 即可减轻环境压力, 又可实现重大的经济价值, 符合绿色环保理念。超声波在介质中传播时产生的空化作用、机械效应、热效应、化学效应,

收稿日期: 2012-08-06

作者简介: 阮尚全 (1963-), 男, 高级实验师, 主要从事光谱分析及生物质提取

可提高目标物从固相转移到液相的传质速率, 提高提取产率, 而双水相提取技术环境温和, 避免了有毒试剂的使用, 能够提供温和的水环境, 具有活性损失小, 避免了被提取成分的脱水变性, 因此广泛用于提取和分离植物中的生物活性物质^[8-13]。乙醇-硫酸铵体系-超声波提取榴莲皮中黄酮未见报道。文章以榴莲皮为研究对象, 探索了双水相体系-超声波提取榴莲皮中总黄酮的工艺, 对榴莲果皮中黄酮的提取提供了一定的方法依据, 有良好的提取效果, 具有一定的参考意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

KQ-400KDB 超声波清洗器(江苏昆山); T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析); TD-5 台式低速离心机(四川蜀科); DFT-100 型中药粉碎机(温岭); AE240 电子分析天平(梅特勒-托利多)。芦丁(BR), 亚硝酸钠(AR), 硝酸铝(AR), 无水乙醇(AR), 氢氧化钠(AR)。

1.2 试验方法

实验材料榴莲购于内江某超市,取皮洗净、烘干、粉碎,准确称取烘干样品 2.000 g 于 250 mL 碘量瓶中,加入乙醇溶液浸泡 30 min,再加入硫酸铵形成双水相,于一定的超声波功率和温度下提取,离心分离,取上层清液用 30% 乙醇定容制成 100 mL 母液。取 5.0 mL 于 25 mL 比色管中,加 30% 乙醇至 10 mL,加入 5% 的 NaNO_2 溶液 1.0 mL, 6 min 后加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠溶液 10.0 mL, 用蒸馏水定容摇匀放置 15 min, 于波长 511 nm 处测定吸光度, 计算黄酮得率。

1.3 提取工艺流程

榴莲→取皮清洗→烘干→粉碎→称量→溶剂浸泡→超声提取→分离→定容→移取显色定容→测定

1.4 标准曲线的绘制

准确称取芦丁标准样品 0.0200 g, 用 60% 乙醇溶解并定容于 100 mL 容量瓶中。分别精密吸取上述芦丁溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL 于 25 mL 比色管中, 按“1.2”操作配制成标准系列, 于波长 511 nm 处测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标, 芦丁标准溶液的浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 用最小二乘法作线性回归曲线。

2 结果与分析

2.1 标准曲线回归方程与相关系数

实验测得标准曲线回归方程为: $A=0.01229C-0.00974$, 相关系数 $R^2=0.9992$, 在 8.0~56.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 见图 1。

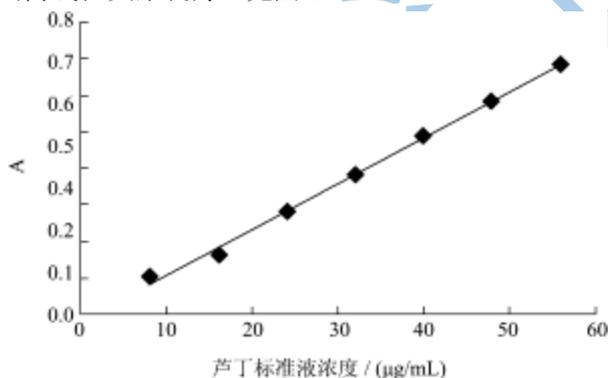


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 The standard curve of rutin

2.2 单因素实验

2.2.1 乙醇浓度对黄酮提取率的影响

准确称取 2.0 g 样品 7 份于 250 mL 碘量瓶中, 加 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液 40 mL (料液比 1:20), 浸泡 30 min 进行超声提取。实验表明: 总黄酮提取率随着乙醇浓度的升高而增加, 在乙醇浓度 60% 处达到最高, 结果见图 2。

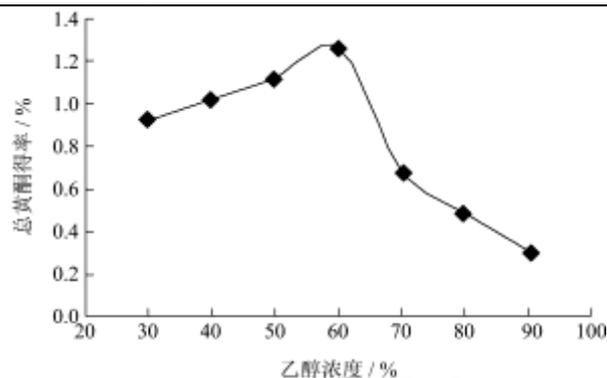


图2 乙醇浓度对总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of the concentration of ethanol on extraction yield

2.2.2 硫酸铵用量对黄酮提取率的影响

在乙醇-硫酸铵双水相体系中提取黄酮与在不含硫酸铵体系中提取率相比有提高, 但硫酸铵用量饱和与否对提取率影响不大^[8]。本实验准确称取 2.0 g 样品 7 份于 250 mL 碘量瓶中, 加 60% 的乙醇溶液 40 mL (料液比 1:20) 浸泡 30 min, 加入硫酸铵 1 g、2 g、3 g、4 g、5 g、6 g、7 g 进行超声提取, 总黄酮提取率随着硫酸铵用量增加而升高, 然后降低, 但影响不显著。重复实验表明在硫酸铵用量为 2 g 时达到最大, 因此确定硫酸铵的用量为 2 g, 结果见图 3。

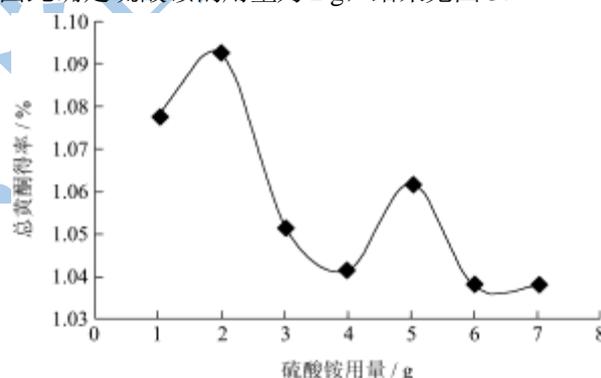


图3 硫酸铵用量对总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of the dosage of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on extraction yield

2.2.3 料液比对黄酮提取率的影响

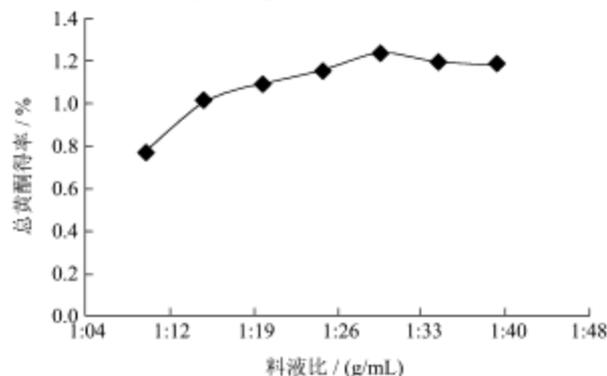


图4 料液比对总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of ratio of solid solution on extraction yield

称取 2.0 g 样品 7 份于 250 mL 碘量瓶中, 加 60%

的乙醇溶液 20 mL、30 mL、40 mL、50 mL、60 mL、70 mL、80 mL，浸泡 30 min 进行超声提取。实验表明，总黄酮提取率随着料液比的增大而增加，在加入 60 mL 乙醇溶液时（料液比 1:30）达到最高。

2.2.4 超声功率对黄酮提取率的影响

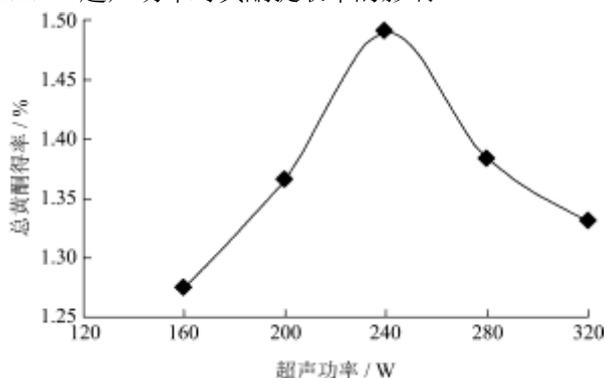


图5 超声波功率对黄酮得率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic power on extraction yield

准确称取 2.0 g 样品 5 份于 250 mL 碘量瓶中，各加 60% 的乙醇溶液 60 mL，浸泡 30 min，各加入硫酸铵 2 g，在超声波功率分别为 160 W、200 W、240 W、280 W、320 W 下超声波提取。由实验结果可以得出，总黄酮提取率随着超声功率的增加而增大，在功率为 240 W 时达到最高，然后降低。

2.2.5 提取时间对黄酮提取率的影响

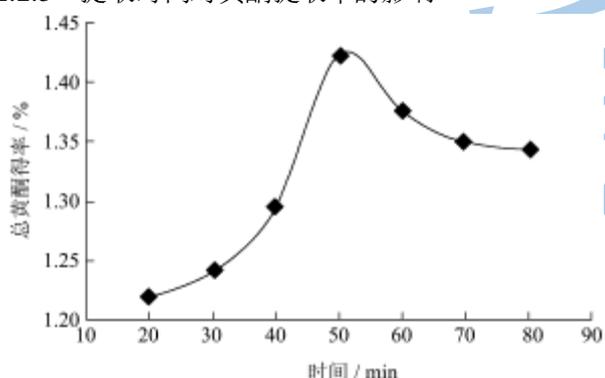


图6 超声时间对总黄酮得率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic time on extraction yield

准确称取 2.0 g 样品 7 份于 250 mL 碘量瓶中，各加 60% 的乙醇溶液 60 mL，浸泡 30 min，加入硫酸铵 2 g，在超声功率 280 W、温度 50 °C 下分别超声 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、70 min、80 min。图 6 结果表明，总黄酮提取率随着超声时间的增加而增大，在超声 50 min 时达到最高，之后逐渐降低。延长提取时间可使目标产物提取更彻底，但随着加热时间延长，可能使黄酮发生分解或氧化，因此确定提取时间为 50 min。

2.2.6 温度对黄酮提取率的影响

准确称取 2.0 g 榴莲果皮样品 6 份于 250 mL 碘量

瓶中，各加 60% 的乙醇溶液 60 mL，浸泡 30 min，加入硫酸铵 2 g，在超声功率 240 W，温度分别为 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 超声 50 min。图 7 结果表明，总黄酮提取率随着超声温度的增加有明显增加趋势，在 80 °C 时继续上升，考虑到乙醇沸点为 78 °C，随加热时间的延长会导致乙醇挥发，故确定 70 °C 作为最佳条件探究榴莲果皮中黄酮提取较优工艺条件。

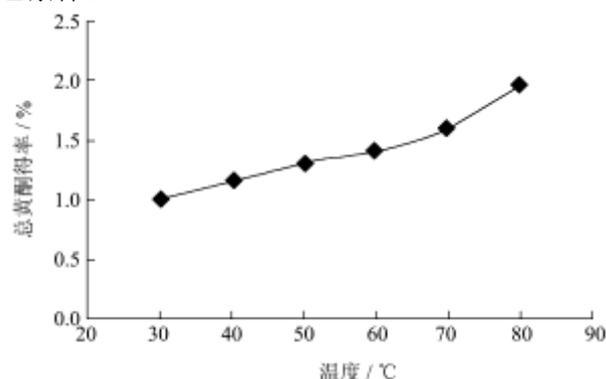


图7 提取温度对总黄酮得率的影响

Fig.7 Effect of the extraction temperature on extraction yield

2.3 提取产物的定性鉴定

取提取液约 1 mL 于试管中，参照文献^[4,15]对提取物作黄酮类化合物鉴定。实验结果为：加入 FeCl₃ 溶液时试样溶液显墨绿色，加入 Na₂CO₃ 溶液时试样溶液呈现黄色，加入浓硫酸时试样溶液呈橙红色，由此说明有黄酮类化合物存在。

2.4 正交实验

单因素实验结果表明，硫酸铵用量对总黄酮提取率影响相对较小，乙醇浓度、料液比、超声波功率、提取时间、提取温度对提取率均有较大影响，故选取以下因素进行正交试验设计，取 70 °C 为最佳提取温度，进一步优化从榴莲果皮中提取黄酮的工艺参数。取三个水平按 L₉(3⁴) 设计成正交实验，根据每次所得结果评判最佳提取条件。实验结果见表 1。

乙醇浓度、料液比、超声功率、提取温度、提取时间、硫酸铵用量等因素均对榴莲皮中总黄酮的提取有影响。由极差分析可知，各因素对果胶提取率的影响主次顺序为：A>C>D>B，即乙醇浓度对总黄酮的提取率影响最大，其次为超声波功率和提取时间，料液比对提取率影响最小。最优条件的确定：由表 2 可知，从榴莲果皮中提取黄酮的工艺条件最优组合为 A₂B₁C₃D₂，即在硫酸铵用量为 2 g，超声提取温度为 70 °C 的条件下：乙醇浓度 60%，料液比 1:25，超声波功率 280 W，超声提取 50 min 为最佳提取条件。验证试验：为进一步验证正交试验的结果及重现性，在最优条件下进行 5 次平行实验，榴莲皮的黄酮提取率分

别为: 3.26%, 3.29%, 3.22%, 3.29%, 3.25%, 平均提取率为 3.26%。可见实验设计合理可行。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验设计及结果

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal experimental design and results

序号	因素				总黄酮 得率/%
	A(乙醇 浓度/%)	B[料液比 /(g/mL)]	C(超声波 功率/W)	D(提取 时间/min)	
1	1(50)	1(1:25)	1(200)	1(40)	2.86
2	1	2(1:30)	2(240)	2(50)	2.90
3	1	3(1:35)	3(280)	3(60)	3.09
4	2(60)	1	2	3	2.97
5	2	2	3	1	3.20
6	2	3	1	2	3.19
7	3(70)	1	3	2	2.54
8	3	2	1	3	2.11
9	3	3	2	1	2.09
K_1	2.950	2.790	2.720	2.717	
K_2	3.120	2.737	2.653	2.877	
K_3	2.247	2.790	2.943	2.723	
R	0.873	0.053	0.290	0.160	

注: K_1 、 K_2 、 K_3 为各因素水平黄酮提取率平均值, R 为极差。

4 结论

文章采用单因素联合正交试验设计对榴莲果皮中黄酮类物质的超声提取工艺条件进行了研究, 本方法提取榴莲果皮中黄酮的最佳工艺条件为: 硫酸铵用量 2 g, 乙醇浓度 60%, 料液比 1:25, 超声波功率 280 W, 超声提取时间 50 min, 超声提取温度 70 °C。超声波提取法作为一种天然产物活性成分分离提取的新技术, 具有条件温和, 快速的特点。此法提取榴莲果皮中黄酮类物质提取率为 3.26%, 具有一定的适用价值, 对于芒果皮中黄酮物质的分离纯化等问题有待进一步

进行探究。

参考文献

- [1] 李移, 李尚德, 莫丽儿, 等. 榴莲果中微量元素的分析[J]. 广东微量元素, 2001, 12: 60-61
- [2] 杨敬勇, 孟鸿菊. 榴莲与人体健康研究进展[J]. 中国果业信息, 2007, 1: 29-30
- [3] 青莲. 榴莲品种介绍[J]. 世界热带农业信息, 2005, 10: 24-27
- [4] 孙俊秀. 水果中的臭豆腐-榴莲[J]. 四川烹饪高等专科学校学报, 2004, 4: 18
- [5] 杨玉峰, 王丽珣, 刘若纓, 等. 榴莲皮外洗治疗老年性瘙痒症 85 例[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 6: 521-522
- [6] 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, 16: 102-105
- [7] 黄河胜, 马传庚. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 589-592
- [8] 王顺民, 季长路, 任晶晶. 超声波协同双水相体系提取茛菪总黄酮的研究[J]. 安徽工程科技学院学报, 2009, 24(3): 28-30, 48
- [9] 周燕芳. 超声波协同提取杨桃叶中黄酮的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 160-162
- [10] 龚珍林, 闻克玉, 贾玉红. 正交试验法优选艾叶总黄酮提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(9): 62-64, 70
- [11] 齐丽霞, 郑彦峰, 谈锋. 银杏叶总黄酮提取方法的比较研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(1): 80-83
- [12] 魏燕华, 成差群, 谭秀芬. 超声波提取法与索氏提取法提取化橘红中柚皮苷的比较[J]. 中国药业, 2009(18): 47-48
- [13] 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): 1587-1589-1596
- [14] 李琪, 廖颖, 张宏等. 枇杷花中黄酮的分离鉴别研究[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(1): 86-88
- [15] 李敏, 吴茜, 张景林, 等. 桑叶黄酮提取分离方法研究[J]. 应用化工, 2010, 39(6): 790-795