

利用表面活性剂超声波辅助提取 胡柚皮黄酮的研究

刘钊,严子军,许逸琼

(肇庆学院 食品与制药工程学院,广东 肇庆 526061)

摘要:胡柚营养价值丰富,果肉已经得到开发利用,其果皮也富含营养素,可以进一步开发利用以提高胡柚的利用价值。以胡柚皮为原料,通过在超声波辅助提取的环境下,添加表面活性剂辅助提取,测定所得总黄酮的提取率。在单因素试验的基础上,采用四因素三水平的响应面试验设计优化提取条件,结果表明:在提取温度为 40 ℃,十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)质量分数为 2.0 %,超声时间为 22 min,乙醇浓度为 77 %,料液比为 1:40(g/mL)时,总黄酮最高提取率可达到 1.97 %。

关键词:胡柚皮;超声波;表面活性剂;黄酮;响应面

Study on Extraction of Flavonoids from Huyou Peel with Ultrasonic Assist of Surfactant

LIU Zhao, YAN Zi-jun, XU Yi-qiong

(School of Food and Pharmaceutical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, Guangdong, China)

Abstract: Huyou is rich in nutrient value, and the flesh has been developed and utilized. Its peel is also rich in nutrients and can be further developed and utilized to improve the utilization value of Huyou. The extracting rate of the obtained total flavonoids was determined by using the Huyou peels as a raw material by adding a surfactant to assist extraction in an ultrasonic extraction environment. On the basis of single factor experiment, the four-factor and three-level response surface test design was used to optimize the extraction conditions. The results showed that the sodium dodecyl sulfate (SDS) mass fraction was 2.0 % and the ultrasonic time was 22 min at the extraction temperature of 40 ℃. Ethanol concentration was 77 %, the ratio of material to liquid was 1:40 (g/mL), the highest extraction rate of total flavonoids could reach 1.97 %.

Key words: Huyou peels; ultrasonic; surfactant; flavonoid; response surface

引文格式:

刘钊,严子军,许逸琼. 利用表面活性剂超声波辅助提取胡柚皮黄酮的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(18): 125-130

LIU Zhao, YAN Zijun, XU Yiqiong. Study on Extraction of Flavonoids from Huyou Peel with Ultrasonic Assist of Surfactant[J].

Food Research and Development, 2020, 41(18): 125-130

常山胡柚是常山特有的一种柑桔地方品种,是自然界中的芸香科植物柚与甜橙的天然杂交品种,具有独特的风味^[1]。目前,胡柚在加工产业中主要是将果肉制成果汁型饮料以及果脯,废弃大量的果皮果渣,而胡柚皮中含有丰富的果胶、多酚类化合物包括黄酮类物质以及挥发性精油等,适合将其进行开发利用,提高

胡柚的整体价值^[2-3]。由于合成抗氧化剂对人体存在着一定的潜在风险,故人们对黄酮等天然抗氧化剂越来越重视,需求量也逐年增大^[4]。传统上,用水蒸气蒸馏法、索式提取法、回流提取法等方法提取时工序繁杂,耗时长,成分复杂并且损失大^[5]。对胡柚皮用超声辅助提取或者表面活性剂协同微波辅助提取的研究报道较常见^[6-9],而将超声和表面活性剂结合起来提取胡柚皮黄酮的研究还鲜见报道。本试验采用表面活性剂与超声波协同辅助提取胡柚皮中的黄酮类物质,能够更

作者简介:刘钊(1984—),男(汉),实验师,硕士,研究方向:食品工程。

大程度上使原料中的提取物溶解在溶液中,能有效地提高提取效率^[10-13]。利用 Design-Expert.V8.0.6 软件中的 Box-Behnken 中心组合设计进行响应面优化试验^[14-16],并在优化试验的结果上进行验证得出最佳提取条件,本试验研究旨在为胡柚皮的进一步综合利用提供参考。

1 材料与仪器

胡柚:浙江省衢州市常山县;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS):分析纯,山东西亚化学股份有限公司;十二烷基苯磺酸钠(sodium dodecyl benzene sulfonate, LAS)、吐温 20 (Tween-20)、聚乙二醇 400 (polyethylene glycol, PEG400):分析纯,国药集团化学试剂有限公司;95 %乙醇、无水乙醇:分析纯,广州化学试剂厂;芦丁:98 %,成都曼思特生物科技有限公司。

SK8200H 超声波清洗器:上海科导超声仪器有限公司;UV-1100 型紫外可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司;AUY120 电子分析天平:日本岛津公司;DHG-9070B 数显电热恒温干燥箱:上海浦东荣丰科学仪器有限公司;TD3-800B 台式低速离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

2 试验方法

2.1 胡柚皮中总黄酮的提取工艺流程

胡柚→清洗→剥皮切块→烘箱干燥(60℃)→粉碎→过筛→称量→表面活性剂+乙醇溶液浸提→超声辅助提取→离心→抽滤→显色定容→吸光度测定→总黄酮提取率计算

2.2 操作要点

将胡柚皮切成小块,放进烘箱中设置 60℃烘干至恒重,然后用粉碎机将其打成粉末状后过 60 目筛。参考文献[17-20]配制芦丁标准液、5 %亚硝酸钠溶液、10 %硝酸铝溶液、1 mol/L 氢氧化钠溶液、60 %乙醇溶液等溶液,并绘制芦丁标准曲线。

在 100 mL 的碘量瓶中放入称好的 1 g 胡柚皮粉,按照设定的料液比加入一半体积的表面活性剂溶液和乙醇溶液,放置在已提前 40℃恒温的超声器中,超声一定时间后取出,用半微量抽滤装置进行抽滤。将滤渣和另外一半体积的表面活性剂溶液和乙醇溶液摇匀,继续超声相同时间,再抽滤,合并两次抽滤液,摇匀。将混合均匀的滤液倒入 10 mL 的离心管中,设置离心机以 4 000 r/min 离心 15 min 后,用吸量管准确移取上层离心液 0.5 mL 于 25 mL 比色管中,进行显色处理。以样品提取液空白进行调零,在最大吸收波长

510 nm 处依次测定吸光度,将吸光度代入标准曲线回归方程得出提取出来后总黄酮的质量浓度 c (mg/mL),从而计算出总黄酮提取率。平行 3 次重复试验,取其均值。提取率计算公式:

$$\text{总黄酮提取率}/\% = \frac{c \times V \times n}{m \times 1\,000}$$

式中: c 为样品系列浓度梯度显色液中所含总黄酮的质量浓度,mg/mL; V 为提取液体积,mL; n 为溶液稀释倍数; m 为称取的胡柚皮粉末质量,g;1 000 为单位换算系数。

2.3 单因素试验

单因素研究时,设计表面活性剂质量分数为 1 %,超声时间为 5 min,功率为 500 W,乙醇体积分数为 60 %,料液比为 1:20(g/mL),在提取温度为 40℃下进行辅助提取。当研究到相应因素时,改变其因素值进行研究,其他因素条件保持不变。在探究每一个单因素后,将其较佳的条件替换后再进行下一个因素探究。

2.3.1 表面活性剂类型的影响

准确称取 1 g 的胡柚皮粉 4 份,按照 2.2 试验方法,计算出总黄酮提取率。探究不同种类表面活性剂:吐温 20(Tween-20)、十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基苯磺酸钠(LAS)、聚乙二醇 400(PEG400)对提取率的影响。

2.3.2 SDS 质量分数对提取率的影响

准确称取 1 g 的胡柚皮粉 6 份,参照 2.2 的试验方法,计算出总黄酮提取率。探究加入质量分数为 0.5 %、1.0 %、1.5 %、2.0 %、2.5 %、3.0 % 的 SDS 对提取率的影响。

2.3.3 超声时间对提取率的影响

准确称取 1 g 的胡柚皮粉 6 份,在 SDS 质量分数为 2.5 %的条件下,参照 2.2 中的试验方法,计算出总黄酮提取率。探究超声时间为 5、10、15、20、25、30 min 对提取率的影响。

2.3.4 乙醇浓度对提取率的影响

准确称取 1 g 的胡柚皮粉 5 份,在 SDS 质量分数为 2.5 %,超声时间为 25 min 条件下,参照 2.2 中的试验方法,计算出总黄酮提取率。探究 50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 的乙醇溶液对提取率的影响。

2.3.5 料液比对提取率的影响

准确称取 1 g 的胡柚皮粉 5 份,在 SDS 质量分数为 2.5 %,超声时间为 25 min,70 %乙醇溶液条件下,参照 2.2 中的试验方法,计算出总黄酮提取率。探究料液比为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60(g/mL)时对提取率的影响。

2.4 响应面优化

综合单因素试验操作与结果,选取 SDS 质量分数、超声时间、乙醇浓度、料液比等 4 个因素进行 Box-Behnken 响应面优化试验设计,利用 Design-Expert V8.0.6 软件进行数据拟合得出优化工艺条件,设计如表 1 所示。

表 1 因素水平设计表
Table 1 Factor level design

水平	因素			
	A SDS 质量分数/%	B 超声时间/min	C 乙醇浓度/%	D 料液比/(g/mL)
-1	2.0	20	60	1:20
0	2.5	25	70	1:30
1	3.0	30	80	1:40

3 结果与分析

3.1 芦丁标准曲线的绘制

芦丁标准曲线见图 1。

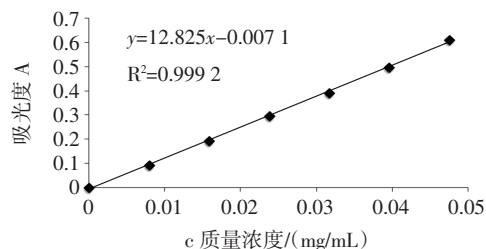


图 1 芦丁标准曲线

Fig.1 Rutin standard curve

由图 1 可见,在 0~0.05 mg/mL 范围内,标准曲线方程式为 $y = 12.825x - 0.0071$,即 $A = 12.825c - 0.0071$,决定系数 R^2 为 0.9992,表明芦丁溶液与吸光度在选取的试验范围内具有良好的线性关系。

3.2 单因素试验对提取率的影响

3.2.1 表面活性剂类型对提取率的影响

不同种类表面活性剂对总黄酮提取率的影响见图 2。

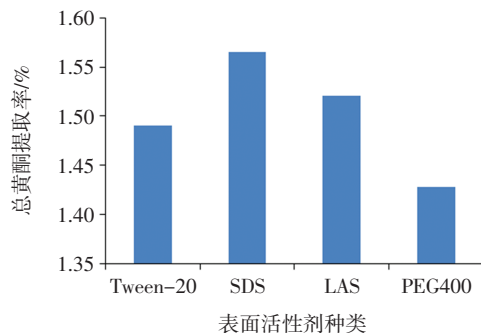


图 2 不同种类表面活性剂对提取率的影响

Fig.2 Effect of different kinds of surfactants on extraction rate

由图 2 可知,加入不同类型表面活性剂由于破坏细胞膜能力不一样使之浸出物也存在差异性,故在超声辅助提取中提取率也存在差异,PEG400 的提取率最低,SDS 的提取率最高,LAS 次之,因此试验选择 SDS 作为提取胡柚皮总黄酮的表面活性剂。

3.2.2 SDS 质量分数对提取率的影响

SDS 质量分数对提取率的影响见图 3。

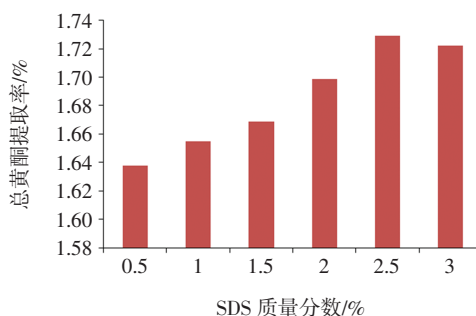


图 3 SDS 质量分数对提取率的影响

Fig.3 Effect of SDS quality score on extraction rate

由图 3 可知,在 0.5%~3.0% 范围内随着 SDS 质量分数的增加总黄酮提取率逐渐增加,当 SDS 用量达到 2.5% 时,提取率最大,大于 2.5% 时提取率降低。由于表面活性剂到达一定浓度程度后,对总黄酮的增溶作用不再增强,溶液中形成的胶束数量呈现饱和状态,因此试验选择 SDS 最佳用量为 2.5%。

3.2.3 超声时间对提取率的影响

超声时间对提取率的影响见图 4。

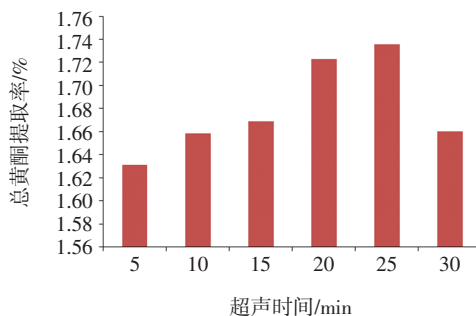


图 4 超声时间对提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic time on extraction rate

由图 4 可知,胡柚皮中总黄酮提取率随超声时间而逐渐增加,当达到 25 min 时达到最大值,超过 25 min 后,提取率呈现下降趋势。超声波辅助提取会产生的空化效应使得原料中更多黄酮溶解到乙醇溶液中,但超声时间过长,部分黄酮结构会被破坏,同时有其他杂质溶出,使得黄酮提取率降低。因此试验选择超声辅助提取最佳时间为 25 min。

3.2.4 乙醇浓度对提取率的影响

乙醇浓度对提取率的影响见图 5。

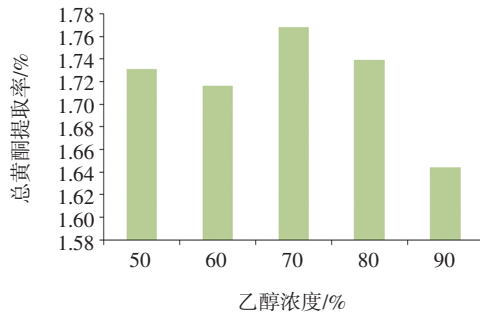


图5 乙醇浓度对提取率的影响

Fig.5 Effect of ethanol concentration on extraction rate

由图5可知,在乙醇体积分数为70%时提取率达到最大值,超过此浓度后,提取率呈现下降趋势。随着乙醇浓度的增加,植物细胞的通透性提高,有更多的黄酮溶于乙醇溶液中,但超过一定限度后,高浓度的乙醇对其他物质影响更大,从而溶解出更多的醇溶亲脂性杂质,影响总黄酮提取率。因此试验选择最佳乙醇体积分数为70%。

3.2.5 料液比对提取率的影响

料液比对提取率的影响见图6。

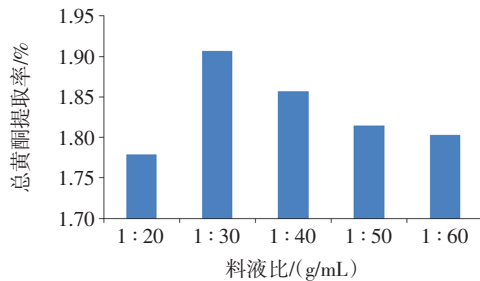


图6 料液比对提取率的影响

Fig.6 Effect of raw material and solution ratio on extraction rate

由图6可知,随着提取溶液量的增加,总黄酮提取率先增加,当料液比为1:30(g/mL)时提取率最大,随后,提取率逐渐减少。当溶液量增大时,样品粉末与溶剂的接触面浓度差变大,导致传质速率增加,黄酮类化合物更容易溶出;但浓度差到达一定程度后,其他非黄酮类化合物也会相继溶出,杂质增多,溶液黏度发生改变,影响了黄酮的溶出,从而提取率降低。因此试验选择最佳料液比为1:30(g/mL)。

3.3 响应面方案设计及结果分析

响应面试验设计及结果见表2。

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results

试验号	A SDS 质量分数	B 超声时间	C 乙醇浓度	D 料液比	总黄酮提取率/%
1	-1	0	0	1	1.965 9
2	0	-1	-1	0	1.767 1
3	0	1	1	0	1.858 9
4	0	1	0	-1	1.849 8
5	0	0	1	-1	1.753 5
6	1	-1	0	0	1.807 7
7	0	0	-1	1	1.786 3
8	0	0	0	0	1.906 3
9	1	1	0	0	1.894 2
10	0	0	0	0	1.916 6
11	1	0	0	-1	1.787 6
12	0	0	0	0	1.914 2
13	1	0	0	1	1.895 7
14	0	0	0	0	1.890 8
15	-1	0	0	-1	1.765 8
16	0	-1	0	1	1.957 4
17	0	0	0	0	1.923 1
18	-1	0	-1	0	1.812 6
19	1	0	-1	0	1.817 9
20	1	0	1	0	1.812 8
21	0	1	0	1	1.817 5
22	-1	1	0	0	1.956 2
23	-1	-1	0	0	1.830 5
24	0	1	-1	0	1.818 4
25	0	-1	1	0	1.806 0
26	0	-1	0	-1	1.640 8
27	-1	0	1	0	1.951 5
28	0	0	1	1	1.872 3
29	0	0	-1	-1	1.746 0

使用 Design-Expert.V8.0.6 软件对表2中响应面试验数据进行回归拟合,得到胡柚皮中总黄酮提取率(Y),SDS 质量浓度(A),超声时间(B),乙醇浓度(C),料液比(D)的二次回归方程为: $Y(\%)=1.91-0.022A+0.032B+0.026C+0.063D-0.098AB-0.036AC-0.023AD+0.0004BC-0.087BD+0.020CD+0.00001667A^2-0.037B^2-0.062C^2-0.057D^2$ 。回归模型的方差分析如表3所示。

从表3可知其自变量 $A, B, C, D, AC, BD, B^2, C^2, D^2$

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.16	14	0.011	19.81	< 0.000 1	极其显著
A-SDS 质量浓度	0.005 923	1	0.005 923	10.45	0.006	**
B-超声时间	0.012	1	0.012	21.85	0.000 4	**
C-乙醇浓度	0.007 839	1	0.007 839	13.83	0.002 3	**
D-料液比	0.047	1	0.047	83.07	< 0.000 1	**

续表 3 方差分析
Continue table 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
AB	0.000 384 2	1	0.000 384 2	0.68	0.424 1	
AC	0.005 184	1	0.005 184	9.15	0.009 1	**
AD	0.002 116	1	0.002 116	3.73	0.073 8	
BC	0.000 000 64	1	0.000 000 64	0.001 13	0.973 7	
BD	0.03	1	0.03	53.7	< 0.000 1	**
CD	0.001 541	1	0.001 541	2.72	0.121 4	
A ²	0.000 000 001 8	1	0.000 000 001 8	0.000 003 18	0.998 6	
B ²	0.008 747	1	0.008 747	15.43	0.001 5	**
C ²	0.025	1	0.025	43.82	< 0.000 1	**
D ²	0.021	1	0.021	37.79	< 0.000 1	**
残差	0.007 934	14	0.000 566 7			
失拟项	0.007 319	10	0.000 731 9	4.76	0.073	
误差项	0.000 614 9	4	0.000 153 7			
总和	0.17	28				

注:** 表示为极显著($P\leq 0.01$),无标记表示为不显著($P>0.05$)。

的 P 值均小于 0.01, 表明单因素 A 、 B 、 C 、 D 交互项 AC 、 BD 与二次项 B^2 、 C^2 、 D^2 都对试验具有极显著影响, 而其他项 AB 、 AD 、 BC 、 CD 、 A^2 则影响不显著。因此, 二次多项回归方程可修正为: $Y(\%) = 1.91 - 0.022A + 0.032B + 0.026C + 0.063D - 0.036A^2 - 0.087BD - 0.037B^2 - 0.062C^2 - 0.057D^2$, 对胡柚皮中总黄酮提取率的大小影响顺序为: 料液比(D)>超声时间(B)>乙醇浓度(C)>

SDS 质量浓度(A)。模型的 $R^2=0.952\ 0$, 校正决定系数 $R^2(\text{adj})=0.903\ 9>0.80$ 试验误差较小, 表明模型拟合度较好, 试验可操作。

3.4 各因素交互作用分析

经过分析各因素间的交互作用, 剔除不显著项, 显著项如图 7 所示。

乙醇浓度的曲线比 SDS 质量浓度的曲线走势更

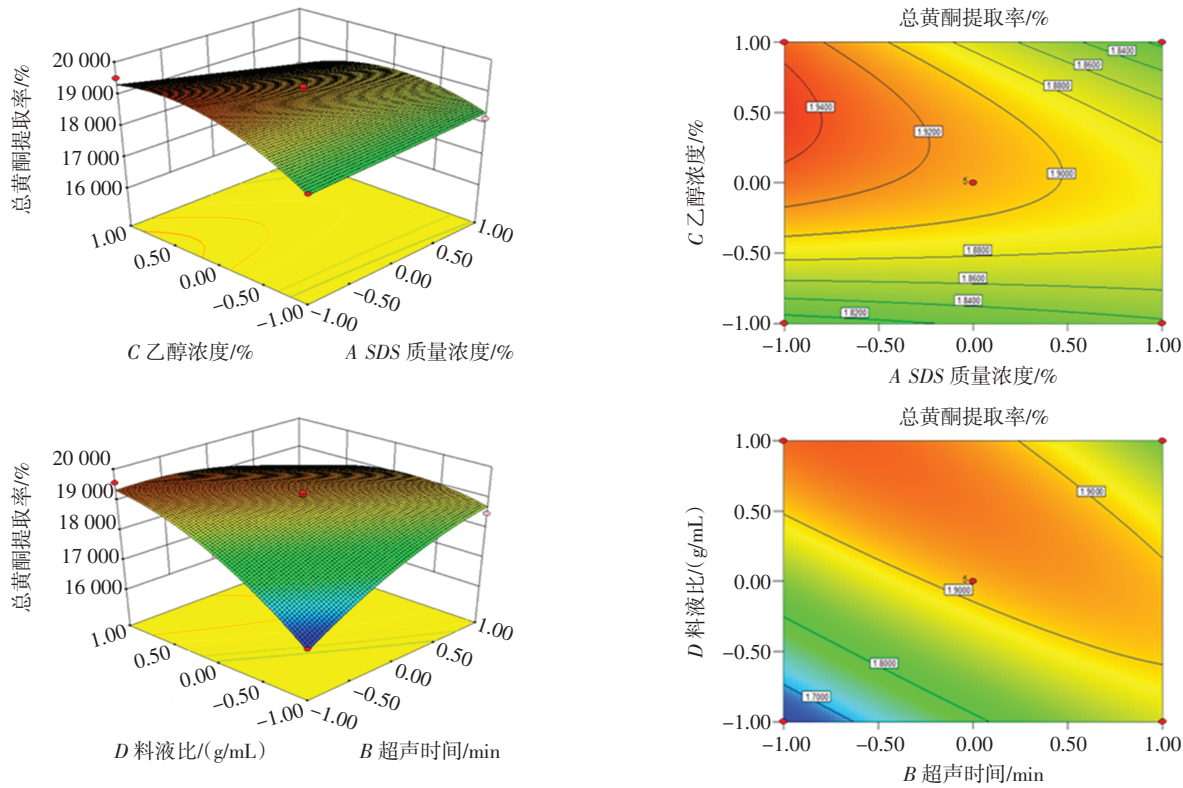


图 7 两因素交互作用的响应面和等高线图

Fig.7 Response surface and contour map of two-factor interaction

为陡峭,SDS 质量浓度的曲线走势平缓。乙醇浓度对提取率的影响比 SDS 质量浓度更为显著。二者等高线图形状呈现椭圆形,表明二者具有显著的交互作用,且在 SDS 浓度为 2.0 %~2.25 %,乙醇浓度为 75 %~80 % 的区域内提取率取得最大值。料液比的曲线比超声时间走势更为陡峭。料液比对提取率的影响比提取时间更为显著。二者等高线图形状呈现椭圆形,表明二者具有显著的交互作用,且在超声时间为 20 min~25 min,料液比为 1:35(g/mL)~1:40(g/mL)的区域内提取率取得最大值。此结果分析与方差分析结果相一致。

3.5 验证优化条件

根据模型拟合得到胡柚皮中总黄酮的最佳提取工艺条件在 SDS 质量浓度为 2.0 %,超声时间为 21.9 min,乙醇浓度为 76.54 %,料液比为 1:40(g/mL)时,总黄酮提取率可达到 2.001 %。从实际可操作角度考虑,将最佳提取工艺条件修正为 SDS 质量浓度为 2.0 %,超声时间为 22 min,乙醇浓度为 77 %,料液比为 1:40(g/mL),在此条件下进行试验,最后得到胡柚皮中总黄酮提取率为 1.973 1 %。与模型拟合得到的预测值相对误差为 1.4 %,从而证明该响应面优化模型所得的数据准确,工艺条件可行性较高,具有实际生产应用价值。

4 结论

胡柚皮一直作为垃圾被废弃,其皮中的营养成分丰富,经加工利用可以大大提高胡柚皮的应用价值。本试验通过在乙醇溶液提取胡柚皮总黄酮的基础上,采用表面活性剂超声波辅助提取,在单因素试验的基础上进行响应面优化试验,结果表明此法提取能有效地提高胡柚皮总黄酮的提取率。经过优化验证,最佳提取工艺条件为:SDS 质量分数为 2.0 %,超声时间为 22 min,乙醇浓度为 77 %,料液比为 1:40(g/mL),提取温度为 40 ℃。在此条件下,胡柚皮中总黄酮提取率可达 1.973 1 %。试验期望能为进一步研究胡柚皮黄酮的提取提供一定的理论基础,将胡柚皮变废为宝,提高胡柚的整体价值。

参考文献:

[1] 姜红宇,刘郁峰,盘雪,等. 响应面法优化胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的提取工艺[J]. 中国现代应用药学,2017,34(11): 1546-1550

[2] 施灵荣,赵四清,方修贵. 常山胡柚产业现状及开发前景[J]. 浙江

柑橘,2017,34(3): 2-5

[3] 孙长颢,凌文华,黄国伟,等. 营养与食品卫生学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社,2017: 120-121

[4] Joaquín Gómez-Estaca, Carol López-de-Dicastillo, Pilar Hernández-Muñoz, et al. Advances in antioxidant active food packaging[J]. Trends in Food Science & Technology, 2014, 35: 42

[5] Xingbin Ma, Hongling Lin, Yahui He, et al. Magnetic molecularly imprinted polymers doped with graphene oxide for the selective recognition and extraction of four flavonoids from *Rhododendron* species[J]. Journal of Chromatography A, 2019, 1598: 39-48

[6] 韩伟,杨天骄,王昊,等. 表面活性剂在提取黄酮类化合物中的应用和进展[J]. 中国制药装备: 工艺与装备, 2014, 9(29): 44

[7] 王占一,王京龙,王玉海,等. 石榴鞣质黄酮表面活性剂-超声波协同提取工艺优化及其动力学、热力学行为[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1728

[8] 苏学军,郑琳,钱明月. 表面活性剂协同超声提取陈皮中总黄酮的工艺研究[J]. 中国调味品, 2015, 40(5): 20-21

[9] 焦辉彬,刘梦蝶,郭赵瑞,等. 表面活性剂辅助提取马水桔皮渣中黄酮的工艺研究[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(5): 4-7

[10] 王崑仑,李家磊,谢学军,等. 纤维素酶辅助超声法提取葛根多糖及 DPPH 抗氧化能力研究[J]. 食品工业科技, 2019-06-14. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20190611.1104.004.html>

[11] Y S Hamed, M Abdin, H M S Akhtar, et al. Extraction, purification by macrospores resin and *in vitro* antioxidant activity of flavonoids from *Moringa oliefera* leaves[J]. South African Journal of Botany, 2019, 124: 270-279

[12] Mansur Ahmad Rois, Song Nho-Eul, Jang Hae Won, et al. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts[J]. Food chemistry, 2019, 293: 438-445

[13] 项飞. 胡柚皮膳食黄酮的提取[D]. 武昌: 武汉工程大学, 2016

[14] 李云雁, 胡传荣. 试验设计与数据处理[M]. 二版. 北京: 化学工业出版社, 2016: 199-200

[15] 童心, 王勇, 高锐, 等. 正交实验联用响应面法优化脱皮马勃总生物碱提取的研究[J]. 药物生物技术, 2013, 20(3): 248

[16] 张崑, 王卫, 张佳敏, 等. 响应面法和正交试验对骨素酶解工艺优化的比较[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(7): 53-56

[17] Liu Zaizhi, Kong Lingtao, Lu Shunbao, et al. Application of a Combined Homogenate and Ultrasonic Cavitation System for the Efficient Extraction of Flavonoids from *Cinnamomum camphora* Leaves and Evaluation of Their Antioxidant Activity *In Vitro*[J]. Journal of analytical methods in chemistry, 2019, 2019: 12

[18] Mohammad Chand Ali, Jia Chen, Haijuan Zhang, et al. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction[J]. Talanta, 2019, 203: 16-22

[19] 谢勇武, 谭属琼, 张鹭文. 酶法辅助优化平和蜜柚皮总黄酮的提取工艺研究[J]. 福建轻纺, 2018, 2(11): 39

[20] 王晓林, 金龙哲, 钟方丽, 等. 麻椒总黄酮提取方法的比较及其抗氧化性[J]. 中国食品添加剂, 2017 (7): 164