

余先纯,王向军. 柚皮黄酮的提取工艺及红外光谱分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):137-139.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.043

柚皮黄酮的提取工艺及红外光谱分析

余先纯¹, 王向军²

(1. 中南林业科技大学材料科学与工程学院, 湖南长沙 410004; 2. 江门市蓬江区文森装饰材料有限公司, 广东江门 529000)

摘要:采用微波联合酶法提取柚皮黄酮,探讨了微波功率、微波处理时间、酶解温度、酶液用量、酶解时间和缓冲液 pH 值对黄酮提取率的影响,并通过正交试验对提取工艺进行优化。红外光谱分析显示,提取物为典型的黄酮类化合物。正交试验结果表明,在微波功率 350 W、微波处理时间 10 min、酶解时间 90 min、酶液用量 0.9% (m/m)、酶提取温度 55 ℃ 和缓冲液 pH 值 4.5 的条件下,黄酮的提取率可达到 5.93%。

关键词:柚皮黄酮;微波处理;酶法;红外光谱

中图分类号: TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0137-03

柚皮是丰富廉价的果实废弃物,其中除了含有丰富的芳香油、果胶、色素外,还有经济价值很高的橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷等生物类黄酮物质^[1],柚皮中的黄酮具有抗氧化、抗菌、抗突变、抗肿瘤等多种作用,广泛用于医药、食品及美容等行业^[2]。传统的提取方法多为溶剂提取法,但提取时间长、产品活性及纯度低。而酶法提取技术与微波联合提取法在许多方面发挥着独特的优势。其中酶法提取条件温和、能耗低、无污染^[3],但提取速度慢。微波辅助提取是利用微波场的特性和优点来强化天然产物有效物质浸出的提取方法。它具有提取效率高、消耗溶剂少、提取时间短等优点^[4]。因此,采用微波联合酶法提取技术,可以在低温环境下加速胞内物质溶出,节省提取时间、加快反应速率和提高产率。

目前,关于利用微波联合酶法提取柚皮黄酮的研究报道

还不多见。本研究以柚皮为原料,采用微波联合酶法联用技术提取柚皮黄酮,并利用正交试验对提取工艺进行优化,以获取最佳的提取工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

柚皮从水果市场购得;纤维素酶,诺维信(中国)生物技术有限公司;芸香苷标准样品(美国 Sigma 公司);无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯。

FH102 微型植物试样粉碎机(湖北省黄骅市齐家务科学仪器厂);SHZ-82 数显水浴恒温振荡器(江苏科兴电器有限公司);MAS-II 型常压微波合成/萃取反应工作站(上海新仪微波化学科技有限公司);傅立叶变换红外光谱仪(Varian 2000,中国)。

1.2 方法

1.2.1 柚皮预处理 用蒸馏水将柚皮洗净后放入鼓风干燥箱,在 80 ℃ 恒温干燥 3 h,再用微型植物试样粉碎机破碎至 60 目。取柚皮粉末 3.0 g,按 1:18 的料液比后置于常压微波合成/萃取反应工作站,在设定的功率下处理一段时间后冷却至 40 ℃,得到预处理液。

收稿日期:2015-12-15

基金项目:湖南省科技计划(编号:2013GK3184)。

作者简介:余先纯(1969—),女,湖南岳阳人,硕士,教授,研究方向为生物质材料综合利用。E-mail:sdlyxc@163.com。

通信作者:王向军,工程师,研究方向为化学工程。E-mail:jmwjxj@163.com。

业,2012,8(12):81-83.

[2] 石敏,周元福,李树林,等. 紫云英不同播种量对鲜草产量的影响[J]. 耕作与栽培,2012(4):34.

[3] 胡开辉,罗庆国,汪世华,等. 化感水稻根际微生物类群及酶活性变化[J]. 应用生态学报,2006,17(6):1060-1064.

[4] 宋亮,潘开文,王进闯,等. 酚酸类物质对苜蓿种子萌发及抗氧化酶活性的影响[J]. 生态学报,2006,26(10):3393-3403.

[5] 韩春梅,李春龙,叶少平,等. 生姜水浸液对生姜幼苗根际土壤酶活性、生物群落结构及土壤养分的影响[J]. 生态学报,2012,32(2):489-498.

[6] 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1983.

[7] Visser S, Parkinson D. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms[J]. American Journal of Alternative Agriculture,1992,7(1):33-37.

[8] 劳家桢. 土壤农化分析手册[M]. 北京:农业出版社,1988.

[9] 叶文斌,樊亮,负汉伯. 阿魏酸对道地中药材纹党的化感作用研究[J]. 中国农学通报,2012,28(31):231-236.

[10] 黄益宗,冯宗炜,张福珠. 化感物质对土壤硝化反应影响的研究[J]. 土壤与环境,1999,8(3):203-207.

[11] 李春龙. 外源化感物质香草酸对辣椒幼苗土壤酶活性及土壤养分含量的影响[J]. 中国蔬菜,2009(20):46-49.

[12] 周宝利,韩琳,尹玉玲,等. 化感物质棕榈酸对茄子根际土壤微生物组成及微生物量的影响[J]. 沈阳农业大学学报,2010,41(3):275-278.

[13] 刘秀芬. 化感物质对土壤硝化作用的影响[J]. 中国生态农业学报,2002,10(2):60-62.

[14] Aon M A, Colaneri A C. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil[J]. Applied Soil Ecology,2001,18(3):255-270.

1.2.2 柚皮黄酮的提取 在预处理液中加入一定质量分数的纤维素酶,加入 200 mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液^[5],调节 pH 值后置于集热式恒温加热磁力搅拌器中,在一定的温度下提取一定时间,再冰浴冷却至常温,然后减压、抽滤,得到柚皮黄酮提取液。同时,采取在无微波辅助条件下进行的对比试验。

1.2.3 柚皮黄酮的分析 样品总黄酮含量的测定参照参考文献[6]方法进行。

黄酮提取率按照(1)式计算:

$$\text{黄酮提取率} = \frac{\text{总黄酮质量}}{\text{桔皮粉质量}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 单因素试验

在探索性试验的基础上,以柚皮黄酮的提取率为指标,采用单因素试验,考察微波处理时间、微波功率、酶解温度、酶液用量、酶解时间和缓冲液 pH 值对黄酮提取率的影响,以确定提取黄酮的最佳条件。

2.1.1 微波处理时间和功率的影响 在酶解温度 55 ℃、酶液用量 0.8%、酶解时间 90 min 和缓冲液 pH 值为 4.5 条件下,设置微波功率分别为 200、250、300、350 W。由图 1 可知,微波功率对黄酮提取率的影响很大,功率低时,黄酮提取率较低;随着功率的升高,黄酮提取率不断升高,但 10 min 后,功率为 300 W 的提取率与 350 W 的相接近,考虑到生产成本,将功率确定为 300 W。同时,当功率为 300 W 时,10 min 后,黄酮提取率增幅趋缓,随着时间的延长,提取率曲线几乎接近水平,这是因为微波加热能使有液泡类的细胞瞬间膨胀破碎,使胞内物质释放出来,在提取初期,时间越长,胞内物质释放物越多^[7],黄酮的提取率也就越高,随着时间的延长,胞内释放物的含量逐步减少,黄酮提取率增加不明显。故将微波处理时间确定为 10 min。

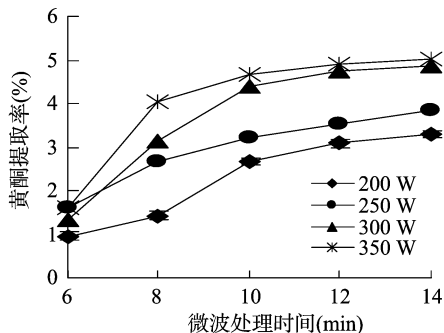


图1 微波处理时间和功率对黄酮提取率的影响

2.1.2 酶解温度和酶液用量对提取率的影响 在微波功率 300 W、微波处理时间 10 min、酶解时间 90 min 和缓冲液 pH 值为 4.5 的条件下进行试验,设置酶解温度 45、50、55、60 ℃。由图 2 可知,相同条件下,酶解温度为 55 ℃时提取率最高,因此在本试验中选取 55 ℃为酶法提取温度。在 55 ℃时,酶液用量低于 0.8% 时,随着酶液用量的增加,柚皮黄酮提取率明显增加,当酶液用量超过此值时,黄酮提取率增加缓慢。

2.1.3 缓冲液 pH 值和酶解时间对提取率的影响 选取微波功率 300 W、微波处理时间 10 min、酶解温度 55 ℃及酶液

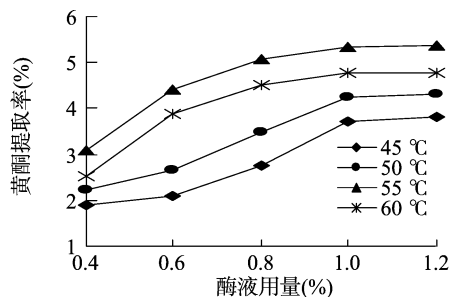


图2 酶解温度和酶液用量对提取率的影响

用量 0.8%,考察不同酶解时间和缓冲液不同 pH 值对黄酮提取率的影响,由图 3 可知,在酶解时间为 90 min、缓冲液 pH 值约为 4.5 时,柚皮黄酮提取率较高,而 pH 值低于或超过 4.5 后提取率均较小。这可能是由于 pH 值约为 4.5 时酶的活性较好的缘故,因此确定 pH 值为 4.5。随着提取时间的延长,黄酮提取率逐渐增加,当酶解时间超过 90 min 后再延长提取时间,黄酮提取率降低,故选择 90 min 作为酶解时间。

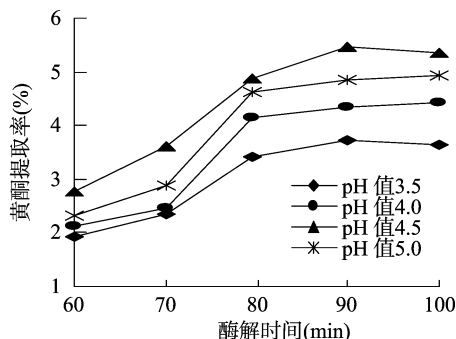


图3 缓冲液 pH 值和酶解时间对提取率的影响

2.2 正交试验分析

为了使提取黄酮提取工艺更加科学和合理,在进行单因素试验的基础上,取提取液 pH 值为 4.5,采用 $L_{16}(4^5)$ 多因素正交试验对提取黄酮的微波功率、微波处理时间、酶解时间、酶液用量和酶提取温度 5 个有重要影响的因素进行设计,见表 1。

根据正交试验结果显示:影响黄酮提取率的因素顺序为 $B > A > D > C > E$,工艺的最佳组合为 $B_2A_4D_2C_2E_2$,即微波功率 350 W、微波处理时间 10 min、酶解时间 90 min、酶液用量 0.9% 和酶提取温度 55 ℃。按上述最优条件追加 3 次试验,提取柚皮黄酮的平均提取率为 5.93%。而在其他工艺条件相同,但无微波的条件下,采用酶法提取法,黄酮的提取率仅为 4.24%,酶解时间 240 min。因此,可见微波有利于提高黄酮的提取率及加快提取速度。

2.3 红外光谱分析

由于天然黄酮类化合物母核上常含有羟基、甲氧基、异戊烯氧基和羟基等基团,其红外光谱在 $3\ 100 \sim 3\ 460\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 600 \sim 1\ 640\ \text{cm}^{-1}$,以及 $1\ 372$ 、 $1\ 242$ 、 $1\ 058\ \text{cm}^{-1}$ 的振动峰可代表黄酮类化合物的特征峰。

由图 4 可知,柚皮黄酮红外谱在 $3\ 390\ \text{cm}^{-1}$ 附近有羟基缔合形成宽而强的吸收峰,说明有大量的酚羟基或糖上的羟基存在;同时,在 $2\ 932$ 、 $2\ 862$ 、 $1\ 370\ \text{cm}^{-1}$ 附近有较强的表征 CH_2^- 和 CH_3^- 的吸收峰出现,证明饱和碳上的氢较多;而在

表 1 提取黄酮的正交试验结果

序号	A:微波功率 (W)	B:微波处理时间 (min)	C:酶解时间 (min)	D:酶液用量 (%)	E:酶提取温度 (℃)	黄酮提取率 (%)
1	1(200)	1(9)	1(85)	1(1.0)	1(60)	4.66
2	1	2(10)	2(90)	2(0.9)	2(55)	5.86
3	1	3(11)	3(95)	3(0.8)	3(50)	4.97
4	1	4(12)	4(100)	4(0.7)	4(45)	4.85
5	2(250)	1	2	3	4	5.08
6	2	2	1	4	3	5.17
7	2	3	4	1	2	5.34
8	2	4	3	2	1	5.45
9	3(300)	1	3	4	2	4.87
10	3	2	4	3	1	5.14
11	3	3	1	2	4	5.23
12	3	4	2	1	3	5.11
13	4(350)	1	4	2	3	5.43
14	4	2	3	1	4	5.47
15	4	3	2	4	1	5.57
16	4	4	1	3	2	5.45
k_1	5.08	5.01	5.13	5.14	5.21	
k_2	5.26	5.41	5.41	5.49	5.38	
k_3	5.09	5.28	5.19	5.16	5.17	
k_4	5.47	5.22	5.19	5.12	5.16	
R_j	0.39	0.40	0.28	0.37	0.22	

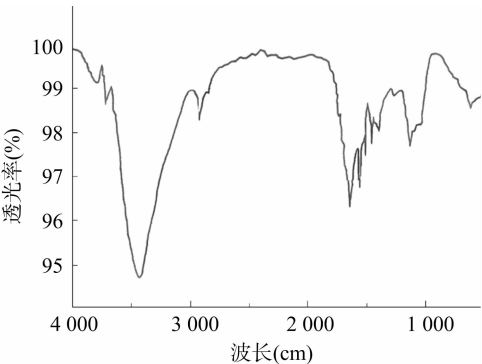


图4 产物的红外光谱图

1 740 cm^{-1} 附近由酯羰基(C—O)引起的伸缩振动峰虽然较弱,但在 1 646 cm^{-1} 附近仍然有羰基的伸缩振动峰出现;此外,在 1 646、1 518 ~ 1 322 cm^{-1} 范围内有若干表征苯环的吸收峰存在;且在 1 320 ~ 1 158 cm^{-1} 有由羟基的弯曲振动引起的吸收峰出现;而在 1 246 和 1 060 cm^{-1} 附近也出现了 C—O—C 的反对称和对称伸缩振动峰;最后,在 890 ~ 700 cm^{-1} 附近还出现了苯环上取代基位置引起的吸收峰。以上特征峰的出现,均说明提取物为典型的黄酮类化合物。

3 结论与讨论

采用微波辅助酶法提取柚皮黄酮,微波的使用有利于提高黄酮的提取量和加快提取速度,而酶法的使用可以降低较高温度对黄酮生物活性的影响。微波的功率、微波处理时间、缓冲液的 pH 值以及提取温度、时间和酶液用量等因素均对

黄酮的提取量有较大影响。
在缓冲液 pH 值为 4.5 的情况下,经过正交试验优化后的提取工艺条件为:微波功率 350 W、微波处理时间 10 min、酶解时间 90 min、酶液用量 0.9% 和酶提取温度 55 $^{\circ}\text{C}$,柚皮黄酮的提取率可达 5.93%。
红外光谱分析显示,采用本方法所得到的提取物为典型的黄酮类化合物。

参考文献:

[1] Katsube T, Tabata H, Ohta Y, et al. Screening for antioxidant activity in edible plant products; comparison of low - density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin - Ciocalteu assay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(8): 2391 - 2396.
[2] 孙彩云, 柳鑫华, 王庆辉, 等. 半仿生提取柿叶黄酮及其抗氧化和抗菌作用[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(10): 115 - 118.
[3] Yu X C, Sun D L. Microwave and enzymatic extraction of orange peel pectin[J]. Asian Journal of Chemistry, 2013, 25(10): 5333 - 5336.
[4] 席彩彩, 张文芳, 侯明月, 等. 微波提取技术在中药有效成分提取中的应用[J]. 中国药物, 2014, 23(3): 94 - 96.
[5] 陈 健, 欧阳玥, 闫 静. 磷酸盐缓冲溶液对邻二氮菲 - Fe^{2+} 氧化法测定羟基自由基的影响[J]. 分子科学学报, 2012, 28(4): 350 - 352.
[6] 徐春明, 王英英, 李 婷, 等. 银杏叶总黄酮的微波提取及生物利用度研究[J]. 林产化学与工业, 2014, 34(4): 134 - 136.
[7] 陈美红. 柿单宁抗氧化活性及水解工艺研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.