

柚皮中黄酮类化合物提取工艺研究

李 歌¹, 王珊珊^{1*}, 丁文珺¹, 牛 佳¹, 姚倩祺²

1.沈阳工学院生命工程学院, 辽宁 抚顺 113122;

2.辽宁省抚顺市兽药饲料监察所, 辽宁 抚顺 113122

摘 要:柚子的果皮中含有果胶、膳食纤维、香精油、多糖、黄酮类化合物等多种活性成分,具有很高的药用和食用价值。通过对柚子皮资源进行合理的开发利用和深加工,不仅能够减少环境污染,还能创造较好的经济效益和社会效益。采用超声波法对柚皮中黄酮类物质进行提取,研究了柚皮中黄酮提取过程中的影响因素,并通过单因素试验和正交试验法以及验证试验对提取过程中的工艺参数进行探究,最终确定最佳提取工艺为:乙醇体积分数为 80%,超声时间 30 min,浸泡温度 60℃,料液比 1:25,在此条件下,柚皮中黄酮得率为 4.63%。

关键词:柚子皮;黄酮类化合物;超声波法

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2016.02.08

Research on Extraction Process of Flavonoids From Pomelo Peel

LI Ge¹, WANG Shan-shan^{1*}, DING Wen-jun¹, NIU Jia¹, YAO Qian-qi²

1.Life Engineering College of Shenyang Institute of Technology, Liaoning Fushun 113122, China;

2.Fushun Institute of Veterinary Drug Control of Liaoning Province, Liaoning Fushun 113122, China

Abstract: Pomelo peel contains many kinds of active ingredients, such as pectin, dietary fiber, essential oil, polysaccharide and flavonoids, which has high medicinal and edible value. Reasonable development, utilization and deep processing using pomelo peel as material, could not only reduce the environment pollution, but also create good economic and social benefits. This experiment extracted flavonoids from the pomelo peel using the ultrasonic method, and studied the influence factors in the process of pomelo peel flavonoids extraction. Through the single factor and orthogonal experiment method to study the optimal extraction technological parameter, results showed that the optimal parameters were as follows: ethanol concentration was 80%, ultrasonic treatment time was 30 min, soaking temperature was 60℃, solid to liquid ratio was 1:25, and the yield of flavonoid was 4.63%.

Key words: pomelo peel; flavonoid; ultrasonic-assisted

柚子为芸香科(Rutaceae)柑橘亚科柑橘属(Citrus)植物。它的果实硕大,果皮比较光滑,一般呈绿色或淡黄色。研究发现,柚子的外皮(最外层黄色的厚皮)和内皮(直接与果肉接触的薄层)中含有多种活性成分,如膳食纤维、果胶、香精油、色素和黄酮类化合物等,它们具有较高的药用以及保健价值,同时还具有防治和杀灭害虫等作用^[1]。此外,中医还认为,柚皮还具有止咳、理气、抗炎、化痰和止痒等功效。现代医学研究表明,柚皮提取物具有抗氧化、抗微生物、降血糖、降

血压、抗癌、抑酶、抗衰老和预防动脉粥样硬化等作用^[2]。目前的食品加工业中,柚子皮多被作为废弃物丢弃,不仅造成了资源浪费,还对生态环境造成了污染。对柚子皮进行深加工处理,既能减少环境污染,又有极高的经济价值和社会价值。

黄酮类化合物常见的提取方法有热水提取法、有机溶剂提取法、微波提取法和超声提取法。黄酮易溶于水,利用这一特性可采用热水浸提法来提取,热水提取法的优点是所需设备少、所需其他试剂少、节约实验成本。但是由于水的极性比

收稿日期:2015-09-08; 接受日期:2015-09-21

基金项目:辽宁省教育规划课题(JG14DB310)资助。

作者简介:李 歌,本科生,研究方向为天然活性成分的提取及应用。E-mail:1324265495@qq.com。* 通信作者:王珊珊,讲师,研究方向为生化与微生物发酵。E-mail:shuihugai@163.com

较大,提取同时容易把易溶于水的其他成分提取出来,如:糖类、蛋白质等,此外,热水提取法时间较长。实验室经常采用的方法是有机溶剂提取法,常用的有机溶剂有乙醇、丙酮等。其中乙醇提取是最主要的提取方法。它的优点是黄酮的含量和提取率均较高,与热水提取法相比所需时间短,且后续操作较简单,如过滤、回收溶剂等。但乙醇提取所需试剂用量较大、成本较高、操作相对复杂。微波法是指在微波反应器中用合适的试剂从植物、动物及矿物质等组织中提取各种成分的技术。微波法的优点是:所需时间短、溶剂用量较少、黄酮提取率高,是一种真正的短时高效的方法。但目前仍处于试验阶段,是一种新兴的技术手段,具有良好的发展前景和巨大的应用潜力。

超声波法提取黄酮类化合物,是目前比较新的方法在玉米、银杏叶、紫苏等植物中都有应用^[3~5]。超声波是一种弹性机械振动波,超声提取法是利用超声波的空化作用、机械效应和热效应等加速胞内有效物质的释放、扩散和溶解,从而显著提高提取效率的提取方法。超声波提取法的优势明显,主要体现在黄酮得率高、所需时间短、节约成本和环境污染小等方面^[6]。因此超声波法在黄酮类化合物提取中,是一种快速、高效、节能的新型提取工艺。综合以上工艺,本研究采用超声波法研究了在柚子皮中提取黄酮类物质的最佳工艺条件,以期为柚皮的加工利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蜜柚(文旦柚)为市售。芦丁标准品、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等购自中国药品生物制品检验所。

1.2 实验方法

1.2.1 柚子皮中黄酮的提取 将柚子皮的黄色果皮与白色果皮分开,留下黄色果皮,然后在65℃条件下烘干5 h,烘干后用粉碎机磨成粉末状,过筛,把柚子皮粉末放入干燥箱中备用。用柚子皮粉末提取黄酮的工艺流程为:乙醇浸泡→超声波处理→抽滤→定容→取样测吸光值→计算提取率^[7]。

1.2.2 芦丁标准曲线的制作 准确称取芦丁标准品20 mg,加入甲醇进行溶解,定容至100 mL,充分溶解,制成0.2 mg/mL的芦丁标准溶液待用。

取7支干净的试管,进行编号,准确吸取芦丁标准溶液0、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL、6.0 mL,然后分别加入5%亚硝酸钠溶液1 mL,摇晃使其充分混匀,静置6 min后再分别加入10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀,静置6 min^[2],最后分别加入10% NaOH溶液10 mL,并用蒸馏水定容至25 mL,定容后再静置15 min,在510 nm波长下,以空白为对照,测定吸光值。以芦丁标准液为横坐标,相应的吸光值为纵坐标来绘制芦丁标准曲线^[6]。

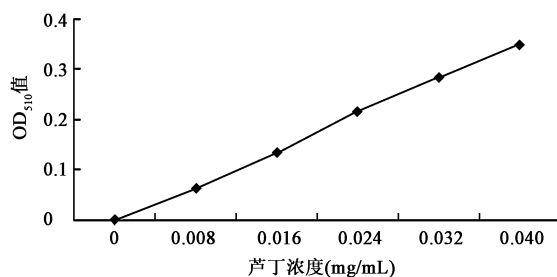


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin.

由图1得 $y = 8.8643x - 0.003$ ($R^2 = 0.991$),测定黄酮提取液的吸光值后,根据标准曲线所得公式计算出黄酮提取液的浓度。然后计算黄酮得率:

黄酮得率(%) = 提取液浓度(mg/mL) × 稀释倍数 × 体积(mL) / 样品干重 × 1 000

1.2.3 单因素实验 选取乙醇体积分数、浸泡温度、料液比和超声时间^[8,9]为参数,每个参数设5个水平(表1),采用单因素正交试验^[10,11]在各组合条件下分别测定黄酮的得率以确定最佳工艺条件。

2 结果与分析

2.1 乙醇最佳体积分数的确定

从图2可以看出,其他条件不变的情况下,在不同的乙醇体积分数下,柚皮中黄酮类化合物的吸光值在50%~70%的范围内逐渐增大,这可能是由于乙醇体积分数的增加减少了柚子皮与溶剂间黄酮类化合物的浓度差,从而减少了柚子皮中黄酮类化合物的残留量,所以吸光值和黄酮得率在不断增大。然而,乙醇体积分数在70%~90%的范围内,柚皮中黄酮类化合物的吸光值随

表 1 柚子皮中黄酮类化合物因素水平
Table 1 Factor levels of pomelo peel flavonoids.

水平	因素			
	A:乙醇体积分数(%)	B:浸泡温度(℃)	C:料液比(g/mL)	D:超声时间(min)
1	50	40	1:10	10
2	60	50	1:15	20
3	70	60	1:20	30
4	80	70	1:25	40
5	90	80	1:30	50

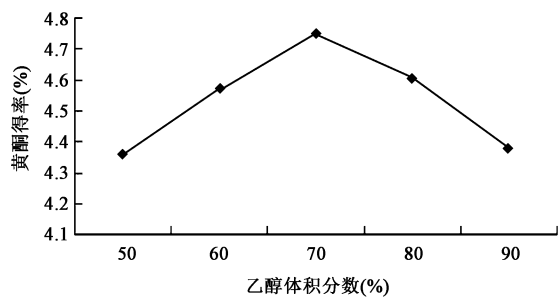


图 2 黄酮得率与乙醇体积分数的关系曲线
Fig.2 Relation curve between flavonoids extraction ratio and ethanol volume fraction.

乙醇体积分数增大而逐渐减小,这可能是由于在乙醇体积分数达到 70%后,在一定的提取条件下,柚子皮中的黄酮类化合物析出基本已达到平衡,即使继续增大乙醇的体积分数,也没有增大吸光值和黄酮得率。所以,可以初步确定超声波提取的最佳乙醇体积分数为 70%。

2.2 最佳浸泡温度的确定

由图 3 可以看出,随着温度的升高,黄酮得率从 40℃到 60℃范围内逐渐增大,溶剂分子运动加快,所以吸光值和黄酮得率在不断增大,而在

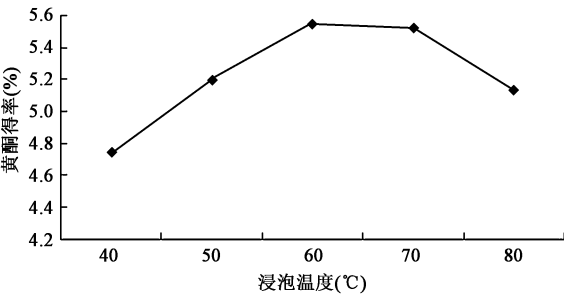


图 3 黄酮得率与浸泡温度的关系曲线
Fig.3 Relation curve between flavonoids extraction ratio and soaking temperature.

60℃到 80℃范围内,随着温度的升高,溶剂挥发的速度也在不断加快,从而导致柚皮中黄酮类化合物的吸光值和黄酮得率随温度升高而逐渐减小。所以,可以初步确定超声波提取的最佳浸泡温度为 60℃。

2.3 最佳料液比的确定

从图 4 可以看出,在一定的条件下,随着料液比的增加,吸光值和黄酮的得率都在增大,当料液比为 1:25 时,吸光值和黄酮的得率都为最大,然而,当料液比继续增大至 1:30,吸光值和黄酮的得率反而减小。所以,可以初步确定超声波提取的最佳料液比为 1:25。

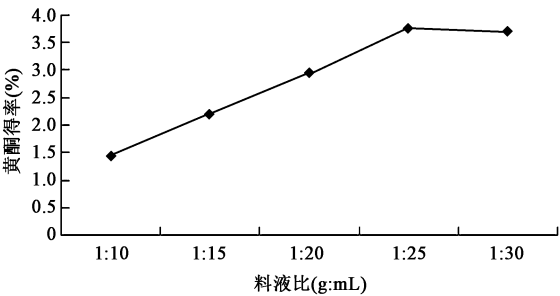


图 4 黄酮得率与料液比的关系曲线
Fig.4 Relation curve between flavonoids extraction ratio and material liquid ratio.

2.4 最佳超声时间的确定

从图 5 可以看出,在一定条件下,20~40 min 内,随着超声时间的延长,吸光值也在逐渐增大,这是由于黄酮类化合物的析出是一个溶剂破坏细胞壁析出最后达到平衡的过程。所以,提取黄酮类化合物需要一定的时间,然而,当超声时间继续延长时,吸光值和黄酮得率不再增加反而有减小的趋势,这有可能是因为超声时间太长,会有一小部分的乙醇挥发,从而使沸点增大,进一步的破坏

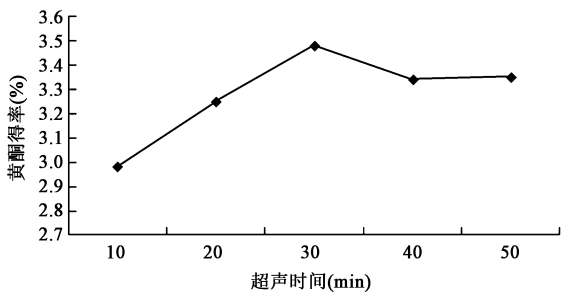


图 5 黄酮得率与超声时间的关系曲线
Fig.5 Relation curve between flavonoids extraction ratio and ultrasonic time.

了某些黄酮类化合物。所以,可以初步确定超声波提取的最佳超声时间为 30 min。

2.5 正交实验

在柚子皮中提取黄酮类化合物的过程中,各个影响因素会相互产生交叉影响,所以,综合考虑超声波提取法的影响因素,再依照单因素的试验结果,确定以乙醇的体积分数、浸泡温度、料液比和超声时间 4 个参数进行 4 因素 5 水平的正交试验设计,并以吸光值及黄酮类化合物的得率作为判断标准,从而确定最佳的工艺条件。

表 2 正交实验结果
Table 2 Orthogonal experiment results.

试验号	A:乙醇体积分数	B:浸泡温度(℃)	C:料液比(g/mL)	D:超声时间(min)	黄酮得率
1	50%	40	1:10	10	3.69%
2	50%	50	1:15	20	3.97%
3	50%	60	1:20	30	4.27%
4	50%	70	1:25	40	4.56%
5	50%	80	1:30	50	3.94%
6	60%	40	1:15	30	4.12%
7	60%	50	1:20	40	4.28%
8	60%	60	1:25	50	4.58%
9	60%	70	1:30	10	4.53%
10	60%	80	1:10	20	4.07%
11	70%	40	1:20	50	3.96%
12	70%	50	1:25	10	4.13%
13	70%	60	1:30	20	4.57%
14	70%	70	1:10	30	4.25%
15	70%	80	1:15	40	3.86%
16	80%	40	1:25	20	4.64%
17	80%	50	1:30	30	4.55%
18	80%	60	1:10	40	4.62%
19	80%	70	1:15	50	4.37%
20	80%	80	1:20	10	4.19%
21	90%	40	1:30	40	3.95%
22	90%	50	1:10	50	3.86%
23	90%	60	1:15	10	4.02%
24	90%	70	1:20	20	4.56%
25	90%	80	1:25	30	4.42%
K1	4.08%	4.12%	4.17%	4.15%	
K2	4.44%	4.24%	4.16%	4.42%	
K3	4.17%	4.60%	4.29%	4.48%	
K4	4.63%	4.53%	4.63%	4.33%	
K5	4.28%	4.17%	4.45%	4.23%	
R ²	0.55	0.48	0.57	0.33	

从极差分析可知:影响因子按从大到小顺序为: $C>A>B>D$,即料液比对黄酮得率影响最大,其次是乙醇体积分数、浸泡温度,影响最小的是超声时间。通过正交实验的结果可以看出,超声波法提取柚子皮中黄酮类化合物的最佳工艺条件为: $A_4B_3C_4D_3$,即以体积分数为 80% 的乙醇作为溶剂,温度为 60°C ,料液比为 1:25,超声时间为 30 min。

2.6 验证实验

通过上述的正交实验,初步确定了超声波法提取柚子皮中黄酮类化合物的最佳工艺条件,在 2.5 得出的最佳工艺条件下进行 3 次验证实验,以确保实验的准确性。称取 3 份柚皮粉,每份 3 g,按照单因素的试验方法进行测定吸光值,结果得出在最佳条件下,黄酮的得率为 4.63%。

3 讨论

国内外学者对柚皮总黄酮的提取也有一定的研究。戴玉绵等^[12]应用微波法从柚皮中提取黄酮类化合物的最佳工艺条件是浸提时间 5 min,乙醇浓度 80%,料液比 1:25,在此工艺条件下,黄酮得率为 0.884 mg/g。此外,于桂香等^[13]应用超声波法从柚皮中提取黄酮类化合物的最佳工艺条件是乙醇浓度 81%,提取温度 61.5°C ,超声时间 45 min。在此工艺条件下,黄酮得率为 6.667 mg/g。本文工艺与有关文献报导的方法相比较^[12,13],黄酮类化合物得率高、成本低、时间短、操作简单、易回收处理,是一种高效、快速、环保的新型工艺。

采用超声波法提取柚皮黄酮,影响其得率的各个影响因素会相互产生交叉影响,关键因素为料液比,料液比过小,提取不完全,料液比过高,不

增加得率反而增加乙醇用量,提高成本,也会造成回收困难。其次是乙醇体积分数,然后是提取温度和超声时间,温度过低和超声时间过短,都会使提取不彻底,造成资源浪费,而柚皮总黄酮中柚皮苷为酚羟基化合物,温度过高,时间过长时会使柚皮苷氧化,造成得率下降。讨论最佳条件下的得率与正交条件下的最高得率无差异。

参 考 文 献

- [1] 马先红,隋新,刘洋.柚皮活性成分提取工艺的研究进展[J].吉林化工学院学报,2014,11:38-41.
- [2] 贾冬英,姚开,谭敏,等.柚皮中生理活性成分的研究进展[J].食品与发酵工业,2001,27:77-78.
- [3] 刘晓飞,刘宁,张娜,等.超声波辅助酶法提取甜玉米穗轴黄酮及抑菌性研究[J].食品科学,2014,21:12-14.
- [4] 于文萃.超声波法提取银杏叶中黄酮类化合物的研究[J].吉林化工学院学报,2015,1:5-8.
- [5] 田海娟,王磊,张静,等.超声波法提取紫苏油粕黄酮的工艺研究[J].中国调味品,2013,12:1-4,8.
- [6] 吕萍.超声波法提取柚皮中黄酮的最佳工艺研究[J].吉林农业科技学院学报,2012,2:14-16.
- [7] Curtis G, Andrew O W, Anthony U O.Determination of polymethoxylated flavones in peels of selected Jamaican and Mexican citrus (*Citrus* spp.) cultivars by high-performance liquid chromatography[J].Biomed. Chromatogram., 2007, 21: 48-54.
- [8] 郭莉,阚建全,孙志高,等.柚子活性成分的提取及其功能研究进展[J].食品研究与开发,2007,8:167-171.
- [9] 廖春燕,朱海东.超声波法提取橘皮中黄酮物质的研究[J].四川食品与发酵,2007,3:31-34.
- [10] 张怡,曾绍校,郑宝东.柚子皮总黄酮提取工艺的研究[J].中国农学通报,2011,14:100-103.
- [11] 杨金兰,阎杰.超声波辅助提取竹叶黄酮的研究[J].广东农业科学,2012,11:113-115,127.
- [12] 戴玉锦,卢明,冯玲.微波法从柚皮中提取黄酮类化合物的工艺研究[J].苏州科技学院生物系,2006,3:34-38.
- [13] 于桂香,于咏梅,等.响应面法优化超声提取柚皮黄酮总工艺的研究[J].北方园艺,2011,8:23-26.