金柚皮总黄酮的微波辅助提取工艺研究

朱远平
(嘉应学院生物系，广东 梅州 514015)

摘 要：采用微波辐射预处理金柚皮，以乙醇作提取剂从金柚皮中提取黄酮类物质，探讨了影响金柚皮总黄酮提取的微波辐射预处理条件(辐射功率和辐射时间)、乙醇浓度、浸提时间、浸提温度、料液比因素。通过正交试验确定了最佳工艺条件。结果表明，在微波辐射功率495W、辐射时间3min预处理金柚皮后，用80%乙醇作为浸提剂，按料液比1:8，在温度70℃下浸提40min可取得最佳提取效果。此条件下总黄酮提取率达0.99%。
关键词：金柚皮；总黄酮；微波辅助提取

Microwave-assisted Extraction of Total Flavonoids from Fruit Peels of Shatian Pomelo (*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort)

ZHU Yuan-ping
(Department of Biology, Jiaying University, Meizhou 514015, China)

Abstract: This study aimed to optimize extraction technology of total flavonoids from microwave-pretreated fruit peel slices of Shatian pomelo with ethanol. Two parameters of microwave pretreatment, including radiation power and duration, were optimized by single factor test, and then four parameters of extraction, including ethanol concentration, extraction temperature and duration, and solid/liquid ratio, were optimized by orthogonal test design based on single factor test. Results showed that under optimized conditions [with microwave-pretreated fruit peel slices of Shatian pomelo for 3 min at 495 W as the material and 80% ethanol as the extraction solvent, as well as the ratio between them of 1:8 (g/ml), extraction for 40 min at 70 ℃], the best extraction efficiency of total flavonoids was achieved. Triple validation experiment on the optimal extraction technology obtained showed that average extraction yield of total flavonoids was 0.99%.
Key words: Shatian pomelo peel; total flavonoids; microwave-assisted extraction
中图分类号：RS284.2 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2009)12-0073-05

金柚，又名沙田柚，为芸香科柑桔属植物柚的成熟果实，盛产于广东梅州，因果形大、色泽金黄、营养丰富故而得名。金柚皮是金柚的果皮，占整个柚果质量的40%。金柚皮可药用，《四川中药志》记载它有“化痰、消食、下气、利隔”的功用，能“治气郁胸闷、脘腹冷痛、食滞、咳喘、疝气”。现代研究表明，金柚皮中除含有丰富的挥发油、果胶、色素外，还含有经济价值高的黄酮类化合物等生物活性成分[1]，是具有较高保健、药用功效的植物果实资源，有很大的开发价值。黄酮类化合物是指以黄酮为母核而衍生的一系列以$C_6-C_3-C_6$为基本碳架的化合物，广泛存在于花草、水果、蔬菜等绿色天然植物中。它具有多种生物活性和药理作用[2]，在医药工业方面，它可作抗炎、抗菌、抗病毒和健胃消食类药物的主要成分。黄酮类化合物具有抗氧化、抗衰老等功能，又由于它来自天然植物，毒性低，相对安全，在食品加工中广泛用作食品的添加剂，如食品抗氧保鲜剂、天然色素、天然甜味剂等[3]。目前，绝大多数金柚皮以废物的形式丢弃，既浪费资源，又污染环境。从废弃的金柚皮中提取黄酮类物质，对更有效地开发利用金柚资源，提高金柚的附加值，变废为宝，减少污染都具有重要的现实意义。

传统的黄酮提取方法有浸提法、索氏法和回流法等[4]。微波提取技术是近年来发展的一门新技术，它具有选择性强、能强化浸提过程、加热快且均匀、节能、产率高等优点，该技术既降低了操作费用，又合乎环境保护的要求，是一种有良好发展前景的新工艺，已被广泛应用于植物有效活性成分提取[5-9]。本研究以广东梅

收稿日期：2008-10-23
基金项目：梅州市科学技术局、嘉应学院联合自然科学研究项目(07KJ22)
作者简介：朱远平(1965-)，男，高级工程师，硕士，主要从事分析化学研究。E-mail：zhuyp@jyu.edu.cn

州富产的金柚柚皮为原料，应用微波预处理金柚皮，以乙醇为提取剂进行浸提，以提取其中的具有抗氧化作用的天然成分——黄酮类物质，考察影响提取的主要因素，寻求最佳的提取工艺条件，探索一种快速简便、节能、效率高的金柚皮总黄酮提取方法，为开发利用金柚皮这一资源提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金柚，产地梅州，剥下柚皮洗净，切成5mm×2mm×2mm均匀薄片，自然晾干后，在60℃烘箱干燥后冷却备用。

芦丁(生化试剂) 上海试剂二厂；无水乙醇；5% $NaNO_2$溶液；10% $Al(NO_3)_3$溶液。

1.2 仪器与设备

U-2800紫外分光光度计 日本HITACHI公司；KJ23B-C微波炉(微波工作频率2450MHz，辐射功率五档可调：128、300、495、638、750W) 顺德美的微波炉制造公司；RE200A旋转蒸发器 日本YAMATO公司；HHS型电热型恒温水浴锅 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 提取工艺流程

金柚皮→去表面青皮→切片→干燥→称重→微波辐射处理→乙醇浸提→过滤→浓缩→除脂→过滤浓缩→冷冻干燥→粗黄酮制品

1.3.2 微波辅助法提取金柚皮中的总黄酮

准确称取5.0g金柚皮均匀薄片，用少量的水喷雾润湿，在玻璃托盘上均匀铺开，放入微波炉中，在微波功率495W下，辐射处理一定时间。然后将金柚皮切片转移至锥形瓶中，加入乙醇提取剂恒温浸提，过滤，残渣在同条件下再浸提一次，过滤，合并两次滤液得到提取液。将提取液在旋转蒸发器进行蒸发浓缩得浓缩物，用石油醚洗涤浓缩物，去除掉脂溶性杂质，离心分离去掉石油醚。最后，将浓缩物冷冻干燥得到总黄酮制品。

1.3.3 微波辐射辅助提取单因素及正交试验设计

根据微波技术和溶剂提取法的基本理论，选择乙醇为提取剂，影响因素微波辐射功率微波辐射时间、乙醇浓度、浸提温度、浸提时间、料液比等进行单因素试验，从而了解各因素对提取效果的影响。在单因素试验的基础上，初步确定提取条件，再用正交试验法优化得到最佳提取工艺条件。

1.3.4 总黄酮含量的测定

参照文献[10]～[11]，以芦丁做标准，采用$NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$-NaOH显色体系，分光光度法测定总黄酮含量。

1.3.4.1 芦丁标准溶液的配制和标准曲线的绘制

准确称取20mg芦丁标准品，用60%乙醇溶解并定容至100ml容量瓶中，摇匀，得浓度为200μg/ml的芦丁标准溶液。精密吸取芦丁标准溶液0.00、1.00、3.00、4.00、5.00ml，分别置于25ml容量瓶中，用60%的乙醇稀释至12.5ml；加0.7ml 5%的$NaNO_2$溶液摇匀，放置5min；加入0.7ml 10% $Al(NO_3)_3$溶液摇匀。放6min后，再加5ml 1mol/L的NaOH溶液混匀，用60%乙醇溶液定容。放置10min后，以试剂空白为参比溶液，在510nm下测定吸光度。以吸光度对浓度进行回归，求得本实验的标准曲线回归方程为：A=0.035C+0.025，R=0.9986(C为黄酮浓度μg/ml，A为吸光度)。

1.3.4.2 金柚皮总黄酮含量的测定

将各试验所得粗黄酮制品分别用60%乙醇溶解并定容至200ml作为实验溶液。精确移取一定体积的实验溶液，按1.3.4.1节方法显色和测吸光度。从回归方程计算出黄酮浓度，然后再计算出金柚皮总黄酮提取率。

$$提取率(\%)=\frac{C\times 25\times V_1}{m\times V_2\times 1000}\times 100$$

式中：C为黄酮浓度(μg/ml)；V_1为实验溶液的体积(ml)；V_2为显色所移取的实验溶液体积(ml)；m为金柚皮质量。

2 结果与分析

2.1 微波辐射预处理条件的确定

2.1.1 微波辐射功率的选择

将金柚皮切片，分别在微波辐射功率为128、300、495、638、750W下辐射3min后，在乙醇浓度80%、浸提时间40min、料液比1:8、浸提温度70℃条件下，按1.3.2节方法进行浸提。结果如图1所示。

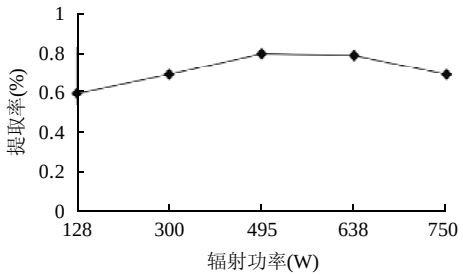

图1 辐射功率对提取金柚皮总黄酮的影响

Fig.1 Effects of microwave radiation power on yield of total flavonoids

从图1可以看出，当微波功率小于495W时，提取率随功率的增大而增大。这是因为微波可直接作用于分子，当功率增大时，使分子的热运动加剧，而引起温度升高，可以快速破坏细胞壁，使黄酮类物质更快地分离提取出来。但超过638W后，提取率略为下降，在实验中发现，当功率为750W时，金柚皮发黄变硬甚至变黑。分析其原因，可能是功率较大时，温度高而使金柚皮碳化变质，成分被破坏。因此，为使金柚皮中的总黄酮浸提完全 ，同时又避免成分结构被破坏，本实验选用微波辐射功率495W。

2.1.2 微波辐射时间的选择

用微波炉功率495W分别对金柚皮切片样品照射1、2、3、4、5、6min，其他条件同2.1.1，按1.3.2节方法进行提取，结果如图2所示。

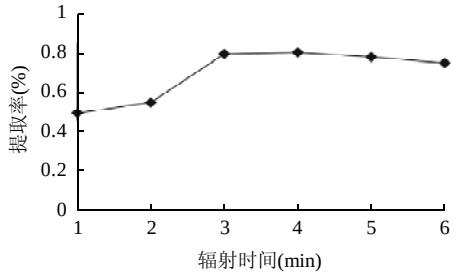

图2 微波辐射时间对金柚皮总黄酮提取率的影响

Fig.2 Effects of microwave radiation duration on yield of total flavonoids

由图2可知，在辐射时间1～2min之内，总黄酮浸提率变化微小，但当辐射时间超过2min后，浸提率变化较大。这是因为微波的作用机制是微波直接作用于分子，使分子的热运动加剧，从而引起温度升高，可以快速破坏细胞壁，使细胞内的有效成分更快的分离浸提出来。当辐射时间为2min或以下时，因时间短，微波的作用机制未完全发挥出来，细胞破裂不完全，有效成分溶出慢；当辐射时间到达3min时，物系吸收微波能多，热能高，对金柚皮细胞的破坏大，细胞内的有效成分大部分可浸提出。但是，实验发现，当辐射时间超过4min时，金柚皮很容易被烤焦，黄酮得率反而降低，这可能是长时间辐射后金柚皮中的有效成分结构被破坏的结果。因此， 从实验的稳定性和可靠性考虑，选择3min为最佳的辐射时间。

综合分析微波功率和辐射时间对浸提效果的影响，结合实验条件，本实验确定微波功率495W、辐射时间3min作为金柚皮预处理条件。

2.2 金柚皮中提取总黄酮的单因素试验

2.2.1 乙醇浓度对提取效果的影响

将金柚皮薄片，用微波炉功率495W照射3min后，分别用浓度为50%、60%、70%、80%、90%、100%的乙醇溶液作提取剂，其他浸提条件同2.1.1，按1.3.2节方法进行提取，结果如图3所示。

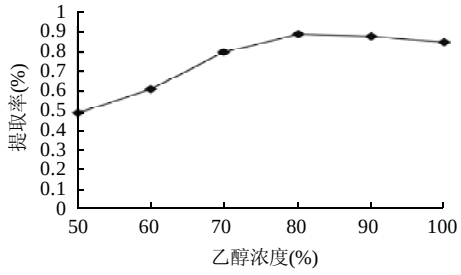

图3 乙醇浓度对金柚皮总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effects of ethanol concentration on yield of total flavonoids

由图3可见，随乙醇浓度增大，总黄酮提取率也增大。当乙醇浓度达80%时，提取率最高，而后稍下降。因为植物果实中的黄酮类物质大部分是与糖结合成苷类以糖配基的形式存在，少部分以难溶于水或不溶于水的游离黄酮存在，所以随乙醇浓度增大部分酯溶性黄酮一并提取，但当乙醇浓度较大时，水溶性黄酮的溶解度降低，不利于提取，黄酮提取率下降。因此，初步确定浓度为80%乙醇为最佳浸提剂。

2.2.2 浸提温度对提取效果的影响

将金柚皮薄片微波炉功率495W辐射处理3min后，分别在温度30、50、70、90℃，其他条件同2.1.1，按1.3.2节方法进行提取，结果如图4所示。

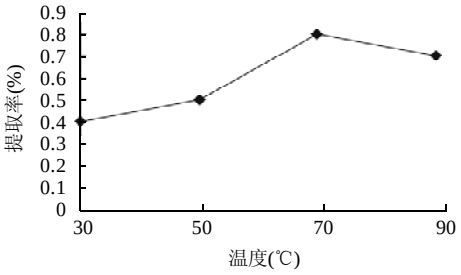

图4 浸提温度对金柚皮总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effects of extraction temperature on yield of total flavonoids

由图4可见，金柚皮总黄酮提取率随浸提温度的升高而增加。当浸提温度在50℃以下时，总黄酮浸出率的增长比较缓慢，但当浸提温度达到50℃以上时，总黄酮浸出率的增长比较迅速。但当温度大于70℃时，总黄酮浸出率反而稍有降低。这是因为温度增加可增大可溶性成分的溶解度、扩散系数，有利于浸提；但温度过高，会破坏不耐热的成分，导致浸提液劣变或杂质增加。因此，初步确定70℃为最佳的浸提温度。

2.2.3 浸提时间对提取效果的影响

将经微波预处理后的金柚皮薄片，加入提取剂，分别在浸提时间20、30、40、50、60min，其他条件

同2.1.1节，按1.3.2节方法进行提取，结果如图5所示。

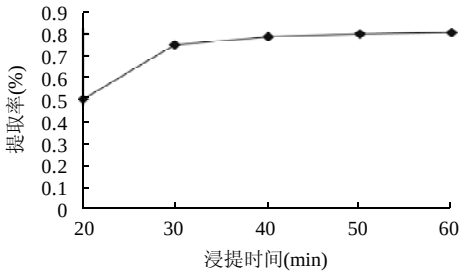

图5 浸提时间对金柚皮总黄酮提取率的影响

Fig.5 Effects of extraction duration on yield of total flavonoids

由图5可以看出，浸提时间在小于30min时，总黄酮得率随浸提时间的增大而增大；当浸提时间达30min时，黄酮得率最大；再延长时间，总黄酮得率基本不变，可以认为浸提完全，已基本达到了终点。因此，为使浸提充分又节约时间，初步确定浸提时间30min为最佳浸提时间。

2.2.4 料液比对提取效果的影响

分别按1:6、1:8、1:10、1:12(g/ml)的料液比加入提取剂，其他条件同2.1.1节，按1.3.2节方法进行提取，结果如图6所示。

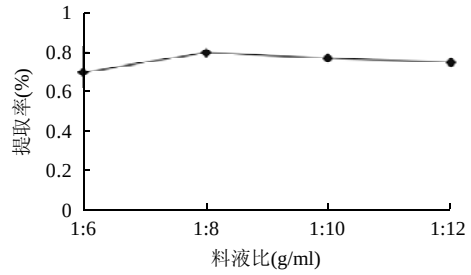

图6 料液比对金柚皮总黄酮提取率的影响

Fig.6 Effects of solid/liquid ratio on yield of total flavonoids

由图6可知，随提取剂用量增加，提取率逐步提高。在料液比1:6～1:8范围内，随着提取剂用量的增加，总黄酮浸出率也增加。但当料液比超过1:8时，总黄酮浸出率呈下降趋势，这可能是因为，料液浸提法是一种传质的扩散过程，当溶剂用量较大时，提取时间要相应增加，在限定时间内提取率稍有下降。因此，初步确定1:8为最佳料液比。

2.3 微波辐射辅助浸提正交试验

由单因素试验可知，金柚皮经微波辐射预处理后进行浸提，不同的乙醇浓度、浸提温度、浸提时间和料液比对金柚皮总黄酮的提取均有不同程度的影响。综合分析上述各因素，以乙醇浓度、浸提温度、浸提时间和料液比做四因素三水平的正交试验，以期进一步得出浸提的最佳工艺条件。水平因素表见表1，正交试验数据用正交设计专业软件处理，结果如表2、3所示。

表1 $L_9(3^4)$正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	因素			
	A乙醇浓度(%)	B浸提时间(min)	C料液比(g/ml)	D浸提温度(℃)
1	70	20	1:6	60
2	80	30	1:8	70
3	90	40	1:10	80

表2 $L_9(3^4)$正交试验数据分析结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test and range analysis

试验号	A	B	C	D	总黄酮提取率(%)
1	1	1	1	1	0.53
2	1	2	2	2	0.60
3	1	3	3	3	0.86
4	2	1	2	3	0.96
5	2	2	3	1	0.75
6	2	3	1	2	1.10
7	3	1	3	2	0.52
8	3	2	1	3	0.40
9	3	3	2	1	0.60
k_1	0.663	0.670	0.677	0.627	
k_2	0.937	0.583	0.720	0.740	
k_3	0.507	0.853	0.710	0.740	
R	0.430	0.270	0.043	0.113	

表3 方差分析

Table 3 Variance analysis for results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F	显著性
A	0.284	2	94.667	*
B	0.114	2	38.000	*
C	0.003	2	1.00	
D	0.026	2	8.667	

注：$F_{0.05(2,2)}=19.0$。

由表2中的平均值k和极差R分析表明：各浸提因素对总黄酮的提取效果都有一定的影响，影响大小顺序为A>B>D>C，即乙醇浓度>浸提时间>浸提温度>料液比。得出的最佳提取工艺组合是$A_2B_3D_2C_2$，即乙醇浓度80%、浸提时间40min、浸提温度70℃、料液比1:8。

由表3方差分析可知，乙醇浓度为主要因素，其次是浸提时间，以上二因素差异有显著性。

2.4 微波辅助法浸提最佳条件验证性实验

表4 最佳工艺的验证实验结果

Table 4 Yields of total flavonoids under optimum extraction conditions

实验号	总黄酮提取率(%)	平均值(%)	R
1	0.98		
2	1.02	0.99	0.05
3	0.97		

为考察上述最佳工艺条件的稳定性，以正交试验结

果最佳条件做3次重复实验，实验结果列于表4。由表4可知，最佳浸提条件重复性好，在此条件下，总黄酮提取率为0.99%。说明正交试验设计合理有效。

3 结论与讨论

微波是一种电磁波，它具有波动性、高频性、热特性和耐热特性四大基本特性。本研究用微波对金柚皮辐射预处理，经水润湿后的金柚皮中含有极性水分子，它能快速的吸收微波能而均匀地加热金柚皮及水分子的剧烈运动使金柚皮细胞内部结构破坏变薄、开孔甚至破裂，减少了扩散过程的阻力，有利于柚皮总黄酮分子从细胞里扩散到细胞外。本实验从金柚皮预处理条件(微波功率和辐射时间)、浸提浓度、浸提时间、浸提温度和料液比等方面对提取金柚皮总黄酮的影响因素进行了研究，经过方差分析及各因素对结果影响的分析，得出最佳条件为：微波功率495W、辐射时间3min、乙醇浓度80%、浸提时间40min、浸提温度70℃、料液比1:8。验证结果表明，金柚皮经微波辐射预处理后，再用乙醇浸提，浸提效果好，纯度高和节省时间。在最佳条件下提取金柚皮总黄酮，总黄酮得率为0.99%。

参考文献：

[1] 贾冬英, 姚开, 谭敏, 等. 柚皮中生理活性成分研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(11): 74-78.

[2] 刘成海, 游海. 天然产物有效成分的分离与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 181-190.

[3] 李楠, 刘元, 侯滨滨. 黄酮类化合物的功能特性[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(6): 139-141.

[4] 陈业高. 植物化学成分[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 232.

[5] 李巧玲, 陈学武, 李琳. 微波条件下提取天然色素的研究[J]. 食品科技, 2002, 23(6): 28-30.

[6] 李嵘, 金美芳. 微波法提取银杏黄酮甙的新工艺[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 39-41.

[7] 杜志坚, 刘志勇, 王莉, 等. 微波辅助提取荆芥中总黄酮及含量测定[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(2): 99-100.

[8] 余红英, 孙远明, 罗宗铭, 等. 千层塔黄酮类物质的微波提取工艺[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 132-134.

[9] 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]. 江苏农业科学, 2006(1): 121-123.

[10] 许琦. 芹菜总黄酮的提取及含量测定[J]. 食品科技, 2006(7): 241-243.

[11] 郭亚健. 关于$NaNO_3$-$Al(NO_3)_3$-NaOH比色测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 97-99.