

## 微波辅助法提取潮州柑橘皮中总黄酮的工艺研究

刘志聪, 郑丹萍 (韩山师范学院生命科学与食品工程学院, 广东潮州 521000)

**摘要** [目的]优化微波辅助提取潮州柑橘皮中总黄酮的工艺。[方法]采取微波辅助提取法,以乙醇浓度、料液比、微波功率和微波时间为因素,利用4因素3个水平正交试验,以总黄酮提取率作为评价指标,筛选最佳提取工艺。[结果]影响潮州柑橘皮中黄酮提取率的因素依次为微波功率、微波时间、料液比和乙醇浓度,最佳提取工艺条件为45%乙醇浓度,料液比1:30(g:mL),微波时间60 s,微波功率640 W,在该工艺条件下柑橘皮中总黄酮提取率可达1.173%。[结论]该研究可为潮州柑橘皮黄酮类化合物的开发利用提供科学依据。

**关键词** 潮州柑橘皮;微波辅助提取;总黄酮;正交试验

中图分类号 TS209 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)23-0188-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.23.053



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Study on Microwave-assisted Extraction of Total Flavonoids from Chaozhou Citrus Peel

LIU Zhi-cong, ZHENG Dan-ping (School of Life Sciences and Food Engineering, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521000)

**Abstract** [Objective] To optimize the microwave-assisted extraction of flavonoids from Chaozhou citrus peel. [Method] Microwave assisted extraction was used to screen the best extraction process by taking ethanol concentration, solid-liquid ratio, microwave power and microwave time as factors, using 4 factors and 3 levels orthogonal test, and taking the extraction rate of total flavonoids as the evaluation index. [Result] The main factors affecting the extraction rate of flavonoids from Chaozhou citrus peel were microwave power, microwave time, solid-liquid ratio and ethanol concentration. The optimum extraction conditions were 45% ethanol concentration, solid-liquid ratio 1:30 (g:mL), microwave time 60 s and microwave 640 W. Under these conditions, the extraction rate of flavonoids from citrus peel could reach 1.173%. [Conclusion] This study can provide a scientific basis for the development and utilization of flavonoids in Chaozhou citrus peel.

**Key words** Chaozhou citrus peel; Microwave-assisted extraction; Total flavonoids; Orthogonal test

柑橘皮医学上称为陈皮,为芸香科植物柑橘成熟果实的果皮,在我国有悠久的药用历史。我国古代医学认为,柑橘皮性味辛、微温、无毒、入脾、肺经,有理气调中、燥湿消痰、行气导滞的功效,具有消炎、抗溃疡、抑菌及利胆等作用<sup>[1]</sup>。柑橘皮所含营养成分除氨基酸外,其余成分含量均高于果肉,特别是果皮中富含橙皮苷、新橙皮苷、橘皮素、川陈皮素、二氢川陈皮素等黄酮类化合物<sup>[2]</sup>。黄酮类化合物(Flavonoids)在植物中广泛存在,是植物经光合作用产生的一大类次生代谢产物,作为一种功能成分,具有抗肿瘤、延缓衰老、增强心血管功能、增强免疫力、调解内分泌系统、护肝、抗炎、抗过敏、抑菌、抗病毒等功效<sup>[3]</sup>。近年来,国内外对黄酮类化合物的提取工艺优化及功能活性分析进行了大量研究<sup>[4-14]</sup>。柑橘皮中同样含有多种黄酮类化合物,对柑橘皮药理作用的广泛深入研究和临床试验<sup>[2,15-16]</sup>证实,黄酮类化合物起着非常重要的作用。

潮州柑在潮汕地区栽培历史悠久,至今已有1300余年的历史,是潮汕地区著名水果品种之一,也是潮汕地区老百姓比较喜爱的水果之一,每年会产生大量的果皮资源待利用。近年来,从柑橘皮中提取香精油、果胶和类胡萝卜素等,已取得一定的研究成果,但尚未形成规模化生产。目前,柑橘皮除少量用于中药和食品加工外,大部分柑橘皮被作为垃圾丢弃<sup>[15]</sup>。微波辅助提取技术具有耗能低、效率高、不破坏有效成分等优点。该研究通过优化微波辅助提取潮州柑橘

皮中黄酮的工艺,为潮州柑橘皮中黄酮类化合物的开发利用提供理论参考。

#### 1 材料与方法

**1.1 供试材料** 市售新鲜的潮州柑橘洗净取皮,在烘箱中(50℃)鼓风干燥,将干燥后的柑橘皮经粉碎机粉碎,过60目,备用。

**1.2 主要试剂** 芦丁标准品(中国生物制品检定所),95%乙醇、水、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝,均为国产分析纯。

**1.3 主要仪器** 电热鼓风干燥箱(上海市实验仪器总厂),手提式粉碎机,JA3003N电子天平(上海精密科学仪器有限公司),WD800G型微波炉(格兰仕微波炉电器有限公司),800型离心机(上海手术器械厂),WFJ7200型可见分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司)。

#### 1.4 试验方法

**1.4.1 微波辅助提取柑橘皮总黄酮工艺流程(图1)。**

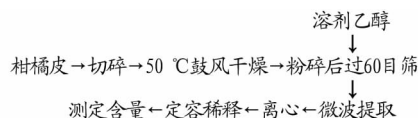


图1 工艺流程

Fig.1 Process flow

**1.4.2 芦丁标准曲线的绘制**<sup>[16]</sup>。精密称取经105℃干燥至恒重的芦丁标准试剂0.011 g,用60%(V/V)乙醇溶解,并定量转入100 mL容量瓶,用60%乙醇定容,摇匀配置成浓度为0.11 mg/mL标准母液。准确吸取0.11 mg/mL芦丁标准母液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL于5只25 mL容量瓶中,加入15 mL 60%乙醇。然后加入0.3 mL 5% NaNO<sub>2</sub>,摇匀静置6 min,再加入0.3 mL 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>,摇匀静置6 min后加入

**基金项目** 广东省粤东药食资源功能物质与治未病研究重点实验室(2021B1212040015)。

**作者简介** 刘志聪(1983—),男,广东兴宁人,实验师,硕士,从事天然活性产物研究。

**收稿日期** 2021-03-17;修回日期 2021-04-27

2.0 mL 1 mol/L NaOH,用 60%乙醇定容至刻度线,摇匀静置 12 min。以 60%乙醇作为空白对照,在 500 nm 处测定其吸光度 3 次,取平均值。以芦丁浓度( $C$ )为横坐标,吸光度( $A$ )为纵坐标,绘制芦丁标准曲线(图 2),建立回归方程: $y = 11.071 0x + 0.000 7$ ,相关系数  $R^2 = 0.999 7$ ,具有较好的线性。

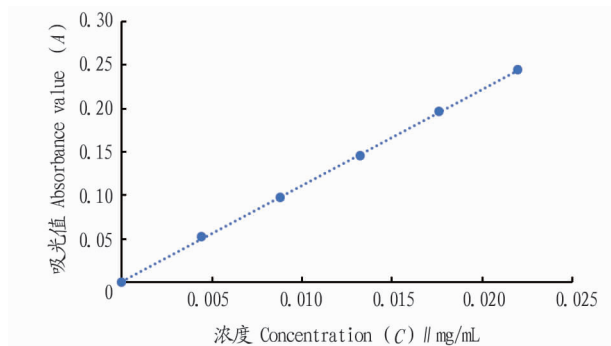


图 2 芦丁标准曲线

Fig. 2 Rutin standard curve

**1.4.3 样品中黄酮含量的测定。**取样品溶液 1.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 15 mL 60%乙醇,分别加入 0.3 mL 5%  $\text{NaNO}_2$ ,摇匀静置 6 min,加入 0.3 mL 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ,摇匀静置 6 min 后加入 2.0 mL 1 mol/L NaOH,最后用 60%乙醇定容至刻度,摇匀静置 12 min。以 60%乙醇作为空白对照,在 500 nm 处测定吸光度,平行试验 3 次,吸光度取平均值,根据回归方程计算样品溶液的浓度及总黄酮含量。

$$\text{总黄酮含量} = C \times F \times V / m \times 100\%$$

式中, $C$  为样品中黄酮浓度,mg/mL; $F$  为溶液稀释倍数; $V$  为溶液体积,mL; $m$  为样品质量,mg。

**1.4.4 微波提取工艺优化。**

**1.4.4.1 单因素试验。**根据预试验可知,影响柑橘皮总黄酮含量提取的因素为乙醇浓度、料液比、微波功率及微波时间,为获得最高的提取率,进行以下单因素试验:

(1) 乙醇浓度:准确称取 1 g 柑橘皮粉末,在料液比 1:10,微波功率 320 W,微波时间 40 s 的条件下,分别设置体积分数为 35%、45%、55%、65%、75%的乙醇进行试验。

(2) 料液比:准确称取 1 g 柑橘皮粉末,在体积分数为 55%乙醇,微波功率 320 W,微波时间 40 s 的条件下,分别选择料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 进行试验。

(3) 微波功率:准确称取 1 g 柑橘皮粉末,在体积分数为 55%乙醇,料液比 1:20,微波时间 40 s 的条件下,分别设定微波功率为 0、160、320、480、640 W 进行试验。

(4) 微波时间:准确称取 1 g 柑橘皮粉末,在体积分数为 55%乙醇,料液比 1:20,微波功率 480 W 的条件下,分别设定微波时间为 20、30、40、50、60 s 进行试验。

**1.4.4.2 正交试验。**根据单因素试验结果,以乙醇浓度、料液比、微波时间、微波功率设计 4 因素 3 水平( $L_9(3^4)$ )正交试验(表 1)。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

**2.1.1 乙醇浓度对柑橘皮中总黄酮提取率的影响。**由图 3

可知,随着乙醇浓度的升高,柑橘皮总黄酮的提取率也随之增大,在乙醇浓度在 55%时可达到最大值,继续升高乙醇浓度,柑橘皮总黄酮提取率反而下降。这可能与微波加热的机理有关,因为提高乙醇浓度可以增大提取剂对样品的渗透性,也可提高黄酮类化合物的溶解度,从而提高柑橘皮总黄酮的提取率,而在使用微波加热时,样品中的极性分子尤其是水分子吸收微波能会产生大量热量使样品升温,乙醇浓度增大的同时就减小了料液中水的比例,使样品升温减慢从而影响柑橘皮黄酮的提取率。此外,柑橘皮中的黄酮类化合物含有易溶于水的黄酮苷和易溶于有机溶剂的黄酮苷元,且黄酮苷的含量高于黄酮苷元。当乙醇浓度低时,随着乙醇浓度的升高,黄酮苷元溶解增加,黄酮的提取率逐步增大,但当乙醇浓度超过 55%,随着乙醇浓度升高,易溶于水的黄酮苷溶解减少,导致总黄酮的提取率下降。因此,乙醇的最佳浓度初步定为 55%。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factor and level of orthogonal test

| 水平 Level | 因素 Factors                         |                                    |                              |                             |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
|          | 乙醇浓度 Ethanol concentration(A) // % | 料液比 Solid-liquid ratio (B) // g/mL | 微波功率 Microwave power(C) // W | 微波时间 Microwave time(D) // s |
| 1        | 45                                 | 1:10                               | 320                          | 40                          |
| 2        | 55                                 | 1:20                               | 480                          | 50                          |
| 3        | 65                                 | 1:30                               | 640                          | 60                          |

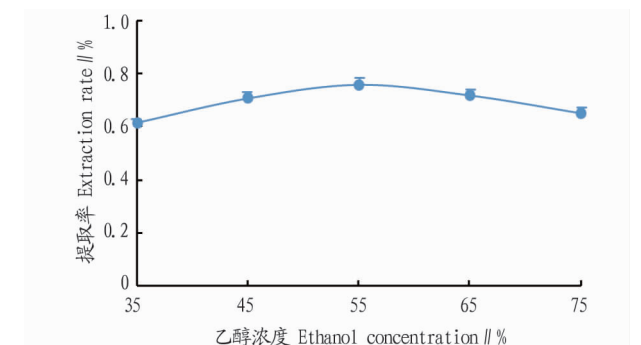


图 3 乙醇浓度对柑橘皮中总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of ethanol concentration on extraction rate of total flavonoids from citrus peel

**2.1.2 料液比对柑橘皮中总黄酮提取率的影响。**由图 4 可知,随着料液比的增大,柑橘皮总黄酮的提取率逐步提高,当料液比达到 1:20 时,总黄酮的提取率最大,继续增加溶剂量,提取率反而下降。究其原因可能是在料液比小于 1:20 时,溶剂量过少导致柑橘皮中黄酮类化合物不能完全被提取;但料液比达到 1:20 时,柑橘皮中黄酮类化合物被完全提取,因此黄酮提取率此时为最高;继续增大料液比,由于溶剂量过多而使黄酮类化合物提取率下降。这可能由于当料液比大于 1:20 时,提取剂对微波能的吸收增加,温度升高减慢,导致细胞液对微波能吸收减少,细胞破裂不完全,柑橘皮中黄酮类化合物难以充分溶出。因此,提取的最佳料液比初步定为 1:20。

**2.1.3 微波功率对柑橘皮中总黄酮提取率的影响。**由图 5

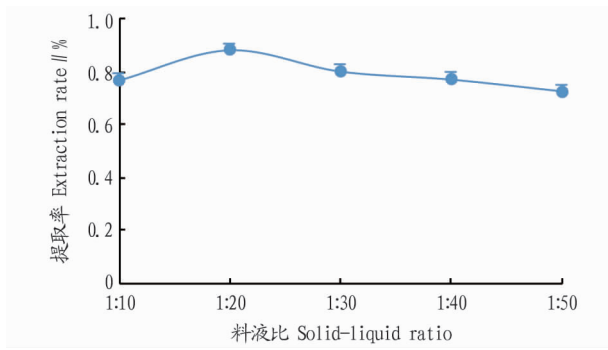


图4 料液比对柑橘皮中总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids from citrus peel

可知,柑橘皮总黄酮的提取率随微波功率的增大而提高,在320~480 W时提高尤为明显;当微波功率大于480 W时,柑橘皮总黄酮提取率反而下降。这可能是由于微波辐射使细胞内部温度升高,压力增大,细胞壁破裂,化合物从细胞中释放出来。一定时间范围内,辐射功率越高细胞破碎越完全,柑橘皮中总黄酮的提取率越高;但微波功率过高,会导致黄酮类化合物的活性成分被破坏,发生变性或者降解,从而导致柑橘皮中总黄酮的提取率降低。因此,提取的最佳微波功率初步定为480 W。

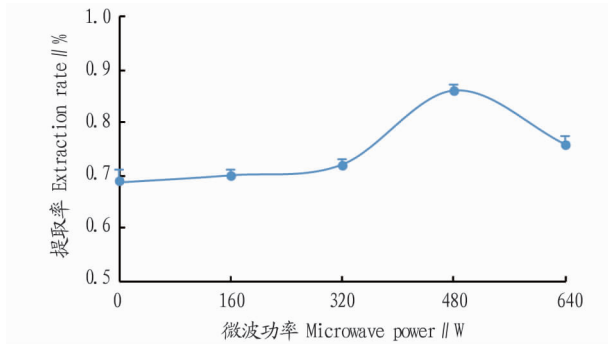


图5 微波功率对柑橘皮中总黄酮提取率的影响

Fig. 5 Effect of microwave power on extraction rate of total flavonoids from citrus peel

**2.1.4 微波时间对柑橘皮中总黄酮提取率的影响。**由图6可知,当微波提取时间为20~50 s,柑橘皮总黄酮的提取率随着微波时间的延长而迅速提高,但持续延长微波提取时间,总黄酮提取率反而下降。这很大程度上是由于柑橘皮中黄酮类物质的溶出需要一定时间,当时间小于50 s时,由于时间短,细胞壁尚未完全破裂,总黄酮的提取率随时间的增加而提高,而当时间大于50 s,总黄酮部分被分解或变性,有效成分减少,同时长时间的微波会导致乙醇挥发速度加快,从而使总黄酮的提取率降低。因此,提取的最佳微波时间初步确定为50 s。

**2.2 正交试验结果** 根据上述单因素试验结果,选择乙醇浓度(45%、55%、65%)、料液比(1:10、1:20、1:30)、微波功率(320、480、640 W)、微波时间(40、50、60 s)4个因素作为变量进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表1)。以柑橘皮中总黄酮的提取率为考察指标,进一步优化柑橘皮中黄酮类化合物的提取条

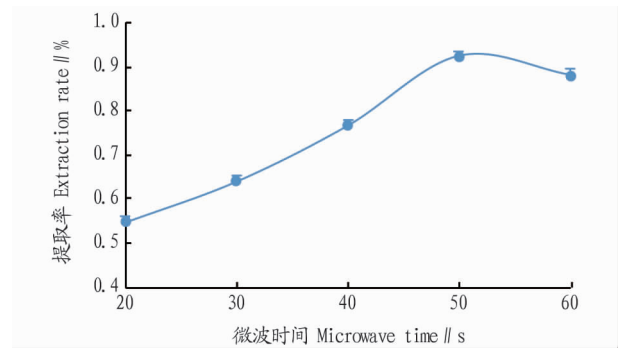


图6 微波时间对柑橘皮中总黄酮提取率的影响

Fig. 6 Effect of microwave time on extraction rate of total flavonoids from citrus peel

件。用SPSS 11.5软件进行正交试验数据分析,结果见表2。由表2可知,在4个影响因素中,对柑橘皮中黄酮类化合物提取率的影响从大到小依次为微波功率、微波时间、料液比、乙醇浓度。

表2 柑橘皮总黄酮提取率正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results on extraction rate of total flavonoids from citrus peel

| 试验号<br>Test<br>No. | A     | B     | C     | D     | 提取率<br>Extraction<br>rate / % |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|
| 1                  | 1     | 1     | 1     | 1     | 0.498                         |
| 2                  | 1     | 2     | 2     | 2     | 0.697                         |
| 3                  | 1     | 3     | 3     | 3     | 1.167                         |
| 4                  | 2     | 1     | 2     | 3     | 0.613                         |
| 5                  | 2     | 2     | 3     | 1     | 0.905                         |
| 6                  | 2     | 3     | 1     | 2     | 0.571                         |
| 7                  | 3     | 1     | 3     | 2     | 0.868                         |
| 8                  | 3     | 2     | 1     | 3     | 0.756                         |
| 9                  | 3     | 3     | 2     | 1     | 0.625                         |
| $k_1$              | 0.787 | 0.660 | 0.608 | 0.676 |                               |
| $k_2$              | 0.696 | 0.786 | 0.645 | 0.712 |                               |
| $k_3$              | 0.750 | 0.788 | 0.980 | 0.845 |                               |
| R                  | 0.091 | 0.128 | 0.372 | 0.169 |                               |

采用正交助手软件对正交试验结果进行方差分析,并对影响因素绘制了效应曲线,结果见表3、图7。由表3的方差分析结果表明,微波功率对柑橘皮总黄酮提取的影响达到显著水平,而乙醇浓度、料液比、微波时间均对柑橘皮总黄酮提取无显著影响。

表3 柑橘皮总黄酮提取率正交试验方差结果分析

Table 3 Variance results analysis of orthogonal test on extraction rate of total flavonoids from citrus peel

| 变异来源<br>Source of<br>variation | 偏差平方和<br>Sum of<br>squares of<br>deviations | 自由度<br>Freedom | F比<br>F ratio | F临界值<br>F critical<br>value | 显著性<br>Signi-<br>ficance |
|--------------------------------|---|----------------|---------------|-----------------------------|--------------------------|
| A                              | 0.013                                       | 2              | 0.151         | 0.460                       | —                        |
| B                              | 0.032                                       | 2              | 0.371         | 0.460                       | —                        |
| C                              | 0.252                                       | 2              | 2.922         | 0.460                       | *                        |
| D                              | 0.048                                       | 2              | 0.557         | 0.460                       | —                        |
| 误差 Error                       | 0.340                                       | 8              | —             | —                           | —                        |

注: $F_{0.05}(2,2)=19.0$ ; \*表示差异显著

Note:  $F_{0.05}(2,2)=19.0$ ; \* indicates the difference is significant

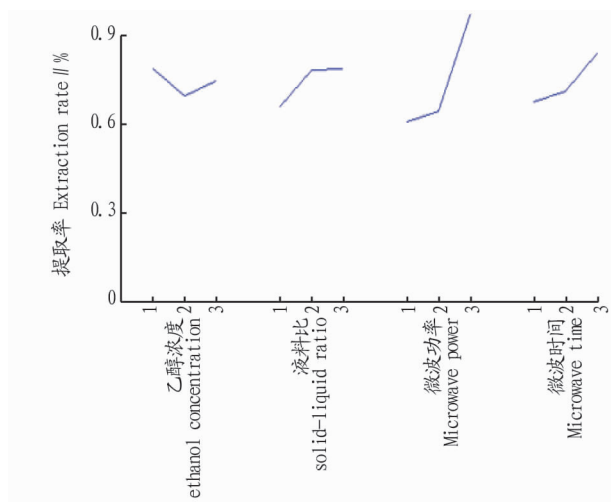


图7 柑橘皮总黄酮提取率正交试验效应曲线

Fig. 7 Effect curve of orthogonal test on extraction rate of total flavonoids from citrus peel

由图7的效应曲线可以看出,乙醇浓度、料液比、微波功率、微波时间4个因素对柑橘皮总黄酮提取率的影响效果变化趋势不同,但都出现明显的拐点。

综上所述,由表2可知,以总黄酮提取率为指标,正交试验的最佳组合为 $A_1B_3C_3D_3$ ,即乙醇浓度为45%,料液比为1:30,微波功率为640 W,微波时间为60 s。

**2.3 验证试验** 在正交试验最佳组合提取工艺条件下进行5次平行验证试验,准确称取1 g柑橘皮粉末,以45%乙醇,料液比1:30,微波功率640 W,微波时间60 s进行微波提取,测定结果见表4。由表4可知,在最佳组合工艺提取条件下,5次验证试验结果接近,潮州柑橘皮总黄酮的平均提取率为1.173%,相对平均偏差为0.382%,说明微波辅助法提取潮州柑橘皮中黄酮的优化工艺稳定可靠。

### 3 结论

本研究通过单因素试验分别考察了乙醇浓度、料液比、微波功率和微波时间对潮州柑橘皮中总黄酮提取效果的影响,并通过正交试验( $L_9(3^4)$ ),以总黄酮提取率为考察指标,优化潮州柑橘皮中总黄酮的最佳提取工艺条件,即乙醇浓度为45%,料液比为1:30,微波功率为640 W,微波时间为60 s,在该工艺条件下潮州柑橘皮中黄酮平均提取率为1.173%。通过数据软件分得出考4种因素的影响从大到小为微波功

表4 验证试验结果

Table 4 Validation test results

| 序号<br>No. | 吸光度<br>Absorbance | 提取率<br>Extraction rate//% | 平均值<br>Average value//% | 相对平均偏差<br>Relative mean deviation//% |
|-----------|-------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| 1         | 0.173             | 1.167                     | 1.173                   | 0.382                                |
| 2         | 0.174             | 1.174                     |                         |                                      |
| 3         | 0.175             | 1.181                     |                         |                                      |
| 4         | 0.174             | 1.174                     |                         |                                      |
| 5         | 0.173             | 1.167                     |                         |                                      |

率、微波时间、料液比、乙醇浓度,即最重要的影响因素为微波功率,其次为微波时间,说明微波对潮州柑橘皮中黄酮类化合物的提取有较为明显的促进作用。通过试验表明,潮州柑橘皮中含有丰富的黄酮类化合物,能为今后潮州柑橘皮中黄酮的开发利用提供一定的理论依据。

### 参考文献

- [1] 黄锁义,罗燕,张婧萱,等. 柑桔皮总黄酮的提取及鉴别[J]. 时珍国医国药,2006,17(8):1495-1496.
- [2] 彭丽莎,方俊,孟德连,等. 柑桔皮中功能成分研究进展[J]. 现代农业科技,2006(10):18-19.
- [3] 谢志刚,刘成伦. 柑桔皮的综合利用新进展[J]. 食品与机械,2005,21(5):77-80.
- [4] 张福平,连少虹,陈蔚辉. 佛手柑黄酮类化合物提取工艺研究[J]. 食品研究与开发,2005,26(6):99-101.
- [5] 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.
- [6] 张福平,马瑞君,王季梅,等. 莲雾叶黄酮类化合物微波提取工艺及其抗氧化性研究[J]. 广东农业科学,2011,38(22):91-94.
- [7] 韩秋菊,马宏飞,李薇. 微波法提取黑木耳黄酮类化合物的研究[J]. 化学与生物工程,2011,28(11):54-56.
- [8] 滕海鹏,仲山民,吴峰华,等. 菊米黄酮的微波提取工艺研究[J]. 食品工业,2011,32(2):34-36.
- [9] 苏东林,单杨,李高阳,等. 柑桔皮总黄酮提取工艺优化及其数学模型研究[J]. 食品科学,2008,29(5):167-172.
- [10] 张彦丽,茹鲜古丽·哈斯木,丁海燕,等. 超声-微波协同萃取法提取昆仑雪菊中总黄酮的研究[J]. 广州化工,2011,39(21):57-59.
- [11] 周宇. 微波辅助萃取艾叶总黄酮的工艺条件研究[J]. 化工时刊,2011,25(8):8-10.
- [12] 马雄,乔良博,林华卫,等. 微波辅助提取花生壳总黄酮工艺研究[J]. 粮食与油脂,2011,24(10):32-36.
- [13] 谢婷,李智利,贺琼. 苦丁茶中黄酮的提取及含量测定[J]. 食品研究与开发,2011,32(9):66-69.
- [14] 王晓林,钟方丽,郭海燕. 微波法提取东北铁线莲总黄酮工艺研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(4):355-357.
- [15] 范正国,章湘云. 柑橘果皮综合利用的研究[J]. 湖南化工,2000,30(4):36-37.
- [16] 雷昌贵,孟宇竹,蔡利. 柑橘皮中黄酮提取工艺研究[J]. 中国食品添加剂,2008(2):135-138.

(上接第187页)

- [10] WU R A, DING Q Z, LU H J, et al. Caspase 3-mediated cytotoxicity of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) oil extract against human hepatocellular carcinoma and colorectal adenocarcinoma[J/OL]. Journal of ethnopharmacology, 2020, 250[2020-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112438>.
- [11] SHARMA R, SHARMA P C, RANA J C, et al. Improving the olive oil yield and quality through enzyme-assisted mechanical extraction, antioxidants and packaging[J]. Journal of food processing and preservation, 2015, 39(2):157-166.
- [12] 高小明,叶红玲,赵玉琪,等. 不同抗氧化剂对红松籽油的氧化抑制作

- 用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1):38-42.
- [13] 刘兆洁,李晓飞,李小康,等. 不同贮藏条件对核桃油氧化稳定性的影响[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(9):140-142.
- [14] JENSEN P N, WÅRENSEN G, ENGELSEN S B, et al. Evaluation of quality changes in walnut kernels (*Juglans regia* L.) by Vis/NIR spectroscopy[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, 49(12):5790-5796.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中酸价的测定:GB 5009.229—2016[S]. 北京:中国质检出版社, 2017.
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中过氧化值的测定:GB 5009.227—2016[S]. 北京:中国标准出版社, 2017.
- [17] 贺娜,陈海云,宁德鲁,等. 3种抗氧化剂对核桃油稳定性的影响[J]. 西部林业科学, 2019, 48(2):59-63.