

$L_9(3^4)$ 正交试验优化柑橘中橙皮苷的提取工艺

杜欢欢¹, 张涵¹, 景娟¹, 孟怡璠¹, 江海^{1,2,3*}, 徐皓^{1,2,3} (1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723000; 3. 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心, 陕西汉中 723000)

摘要 [目的] 开展柑橘皮中橙皮苷提取纯化工艺研究, 充分利用汉中丰富的柑橘资源, 提高其经济附加值。[方法] 以汉中柑橘皮为研究材料, 采用碱浸酸析法提取橙皮苷, 以碱的种类、碱添加量、提取温度、提取时间、料液比进行单因素试验, 以碱添加量、提取温度、提取时间、料液比进行 $L_9(3^4)$ 正交试验优化橙皮苷的提取工艺, 以超高效液相色谱检测验证优化结果。[结果] 影响柑橘皮中橙皮苷提取纯化工艺因素大小依次为提取时间、碱添加量、提取温度、料液比; 1 g 柑橘皮添加 0.08 g 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 提取时间 0.5 h, 温度 30 °C, 料液比 1:30 g/mL 的工艺条件下能得到最佳提取效果, 粗产品收率为 4.5%。[结论] 试验所得优化参数和提取工艺稳定, 选用的设备操作简便、快速, 具有良好的应用前景。

关键词 橙皮苷; 碱浸酸析; 提取; 工艺; 纯化

中图分类号 S609; S666 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)26-0041-04

Extraction Process of Hesperidin in Citrus Optimized by $L_9(3^4)$ Orthogonal Test

DU Huan-huan¹, ZHANG Han¹, JING Xian¹, JIANG Hai^{1,2,3*} et al (1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi Sci-Tech University, Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong, Shaanxi 723000; 3. Collaborative Innovation Center for Comprehensive Development of Bio-resources in Qinba Mountainous Area of Southern Shaanxi, Hanzhong, Shaanxi 723000)

Abstract [Objective] In order to carry out the research on extraction and purification process of hesperidin in citrus peel, make full use of abundant citrus resources in Hanzhong and increase the added economical value. [Method] Taking the Hanzhong citrus peel as research material, hesperidin was extracted by alkali extraction and acid precipitation method. The single factor experiment was carried out with the kinds of alkali, alkali content, extraction temperature, extraction time and the ratio of material to liquid. Alkali dosage, extraction temperature, extraction time and solid-liquid ratio were studied by $L_9(3^4)$ orthogonal test to optimize the extraction technology of hesperidin. The ultra performance liquid chromatography was used to test the optimization results. [Result] The sequence for the factors affecting extraction and purification process of hesperidin in citrus peel was extraction time, alkali weight, extraction temperature and the ratio of material to liquid. When the process conditions were 0.08 g of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ per gram citrus peel, extraction time 0.5 h, temperature 30 °C, and the material and liquid ratio 1:30 g/mL, the best extraction effect could be obtained. The yield rate of crude product was 4.5%. [Conclusion] The optimization parameters and extraction process obtained in the test were stable, and the operation of selected equipment was simple and rapid, which had good application prospects.

Key words Hesperidin; Alkali extraction-acid precipitation; Extraction; Process; Purification

橙皮苷属于黄酮类化合物, 其纯品为白色针状晶体, 熔点为 258~262 °C (250 °C 开始软化), 分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$, 相对分子量为 610.57, 能溶于稀碱和吡啶溶液, 常温下难溶于水, 微溶于甲醇、乙醇、冰醋酸, 无臭、无味^[1-3]。橙皮苷具有降低毛细管的脆性, 保护毛细血管, 防止微血管破裂出血的功能, 具有较好的抗氧化、降低血糖、抗炎镇痛、抗肿瘤、抗病毒作用, 是医药工业中重要的原料^[4], 也是化妆品和食品添加剂的重要原料^[5-7]。橙皮苷是柑橘皮中的主要成分, 我国柑橘资源丰富, 柑橘产量占世界第 2 位, 橙皮苷提取原料来源充足, 成本低廉。据调查, 橙皮苷市场需求广, 产品价格高。因此, 从柑橘果皮中提取橙皮苷, 原料来源广, 有很好的市场开发前景, 具有潜在的应用价值^[8]。

陕西汉中是我国传统柑橘的产区, 属我国长江中上游柑橘优势栽培区域的北缘, 年产柑橘超过 40 万 t, 占全国产量的 2%。汉中柑橘以鲜食为主, 深加工率低。从 2013 年起, 汉中陆续投产柑橘果酒生产线、柑橘罐头生产线、柑橘鲜榨果汁生产线, 提高了柑橘的深加工率及产品附加值, 但柑橘皮多作为柑橘生产加工的废料丢弃, 造成了严重的资源浪

费。鉴于此, 开展柑橘皮综合利用研究, 合理处理柑橘加工的下脚料, 对提高汉中柑橘的综合利用率很有必要^[9-10]。

现有报道中, 橙皮苷提取方法主要有热水提取、醇溶剂提取、双水相提取、超声波提取、微波提取、碱浸酸析等方法。热水提取和醇溶剂提取工艺简单但收率较低; 超声波提取、微波提取等虽然提取率高、提取时间短, 但设备成本高, 工艺要求较高。双水相萃取操作简单、高效、收率高, 但该方法要求精度较高, 放大用于规模化生产还有不少技术问题。碱浸酸析法工艺成熟, 只消耗价格低廉的无机酸及碱, 成本低且能得到较高收率^[11-14], 是现在常用的一种方法, 但关键的参数还需进一步优化。

笔者采用碱浸酸析法对橙皮苷进行提取, 研究了各种工艺参数对提取率的影响, 采用超高效液相色谱法对结果进行验证, 确定了橙皮苷提取最优工艺参数, 以期对汉中柑橘综合开发利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料。2014 年采摘于陕西汉中的柑橘, 剥皮, 柑橘皮经烘箱 45 °C 烘干、粉碎, 备用。

1.1.2 主要仪器。超高效液相色谱仪 (UPLC), 美国 waters

创立药材器械厂;101-OES 型电热鼓风干燥箱,北京市永光明医疗仪器;pHS-3C 型酸度计,上海雷磁;DK-98-11 型电热恒温水浴锅,北京科伟仪器有限公司;BJBLAA-1000 型玻璃砂蕊过滤器,北京华运安特科技有限责任公司。

1.1.3 主要试剂。Na₂CO₃(分析纯)、KOH(分析纯),西安化学试剂厂;NaOH(分析纯)、盐酸(分析纯),天津恒兴化学试剂制造有限公司;Ca(OH)₂(分析纯),天津大茂化学试剂厂;甲醇(分析纯)、乙醇(分析纯),天津百世化工有限公司。

1.2 试验原理 橙皮苷在碱液条件下首先开环生成易溶于水的橙皮苷查尔酮,通过过滤,去除不溶于水的杂质。滤液中的橙皮苷查尔酮在酸性条件下,关环生成水溶性较差的橙皮苷,过滤得到目标产物。

提取工艺流程为:首先将一定量的柑橘皮烘干研碎加入到蒸馏水中,加入一定量的碱调节 pH 至碱性,静置,过滤,滤液加入酸,调节 pH 至酸性,静置,待结晶后经过滤、干燥,得到橙皮苷粗品。然后将橙皮苷粗产品加入到有机溶剂中,加入碱调节 pH 至碱性,静置、过滤,滤液加入酸,调节 pH 至酸性,静置待结晶,过滤,干燥后得到纯化的橙皮苷目标产物。最后利用超高效液相色谱进行分析测定^[15]。

1.3 方法

1.3.1 样品干燥。将柑橘皮洗净后放在室温通风处进行干燥至恒重,然后用高速万能粉碎机进行粉碎至 60 目,装入保鲜袋中进行避光密封保存。

1.3.2 橙皮苷提取。将 1 g 橘皮粉加入到定量配置的碱液中,调节 pH 至碱性,反应至一定时间后,减压过滤,滤液加入 0.1 mol/L 盐酸,调节体系至酸性后,静置 12 h 后,得到少量淡黄色固体,常压过滤,再加入甲醇溶解后,用超高效液相色谱仪进行检测。

1.3.3 液相色谱仪分析检测。按“1.3.2”方法得到的提取液在液相色谱条件下进行分析,比较溶液中橙皮苷的含量,确定最优提取方法。色谱条件:Waters ACQUITY UPLC&BEH C₁₈ 色谱柱(50.0 mm×2.5 mm,1.7 μm);流动相 A 为乙腈,B 为纯水;采用梯度洗脱,A 梯度为 10%(0 min)–10%(1 min)–40%(5 min)–10%(6 min);检测波长 288 nm;流速为 0.3 mL/min;进样量 5 μL;PDA 检测器;柱温 30 ℃^[16]。

1.3.4 单因素试验。采用碱浸酸析法提取柑橘皮中的橙皮苷。分别就碱的种类[Na₂CO₃、K₂CO₃、NaOH、KOH、Ca(OH)₂];碱的用量(0.04、0.06、0.08、0.10 g);提取时间(0.5、1.0、2.0、4.0 h);液料比(1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL);提取温度(25、30、40、50、60 ℃)进行单因素试验。

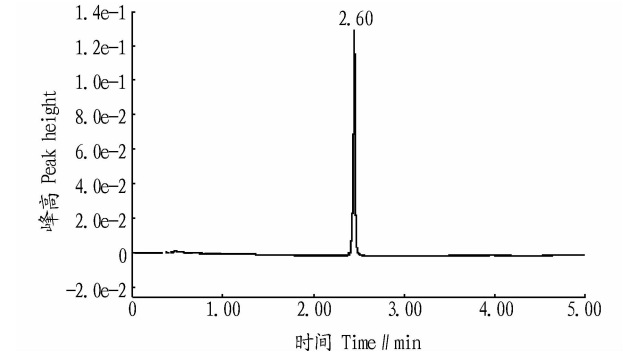
1.3.5 正交试验。在单因素试验的基础上,设计了 4 因素 3 水平正交试验,重点研究碱的用量、提取温度、提取时间、料液比 4 个因素对橙皮苷提取率的影响,确定橙皮苷提取的最佳工艺参数。正交试验因素水平设计见表 1。

1.3.6 验证试验。称取适量的柑橘皮,根据正交试验所得的最佳工艺条件,进行 3 组平行试验提取橙皮苷,验证方法准确性。

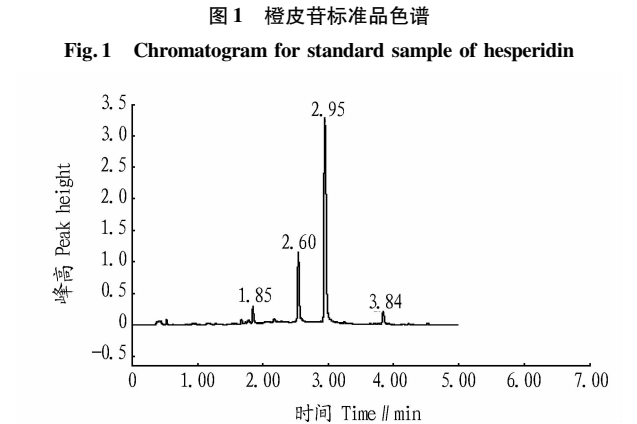
表 1 正交试验因素水平设计				
Table 1 Factor level design of orthogonal test				
水平 Level	因素 Factor			
	浸提时间(A) Extraction time//h	碱用量(B) Alkali weight//g	料液比(C) Solid-liquid ratio//g/mL	提取温度(D) Extraction temperature//℃
1	0.5	0.04	1:20	25
2	1.0	0.06	1:30	30
3	2.0	0.08	1:40	40

2 结果与分析

2.1 超高效液相色谱分析结果 按“1.3.3”的液相色谱方法,分别测定橙皮苷标准品和柑橘皮提取液,标准品色谱图见图 1,样品色谱图见图 2。色谱分析方法经稳定性试验、重复性试验、精密度试验、回收率试验验证,满足分析检测要求。



注:出峰时间为 2.60 min 的为橙皮苷。
Note:Peak appearance time of hesperidin was at 2.60 min.



注:出峰时间为 2.60 min 的为橙皮苷。
Note:Peak appearance time of hesperidin was at 2.60 min.

2.2 单因素试验结果

2.2.1 橙皮苷提取工艺中碱的筛选。在提取温度 30 ℃,浸提时间 0.5 h,碱用量 0.06 g,料液比 1:30 g/mL 的条件下,考察不同碱种类对橙皮苷色谱峰面积的影响。

试验表明(图 3),在加入碱量均为 0.06 g 的试验条件下,选择强碱的色谱峰峰面积最大,选择弱碱峰面积小。这可能因为是弱碱的碱性太弱,无法使橘皮中的橙皮苷开环形成橙皮苷查尔酮有关。试验结果同时显示,强碱 Ca(OH)₂

的处理效果最好,这与王灵果的试验中用 KOH 和 NaOH 提取橙皮苷的产率高有差异^[14]。

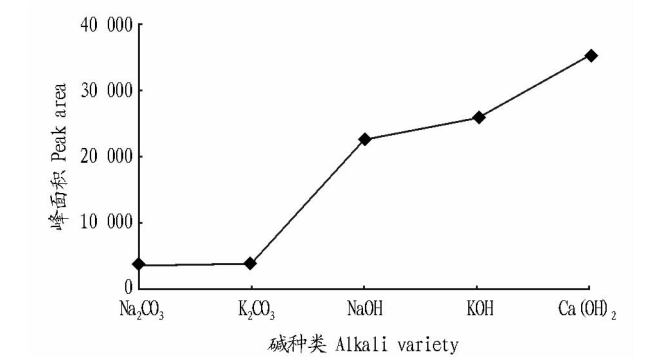


图3 不同碱作用下橙皮苷色谱峰面积趋势

Fig. 3 Chromatographic peak area of hesperidin under the effect of different alkalis

2.2.2 橙皮苷提取工艺中碱用量的筛选。在提取温度 30℃,浸提时间 0.5 h,碱为 $\text{Ca}(\text{OH})_2$,料液比 1:30 g/mL 的条件下,考察体系中不同碱用量对橙皮苷色谱峰面积的影响。

试验发现(图 4),体系中 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 添加量大小对于橙皮苷的提取率有一定的影响。随着体系中 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 添加量的增加,橙皮苷的提取率先增加后减小。这是因为随着体系中 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 添加量的增加,使橘皮中更多的橙皮苷开环溶解在水相中,当达到一定的平衡后,随着 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 添加量增加,粗产品的收率反而略有下降。最终选择在体系添加 0.08 g 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 。

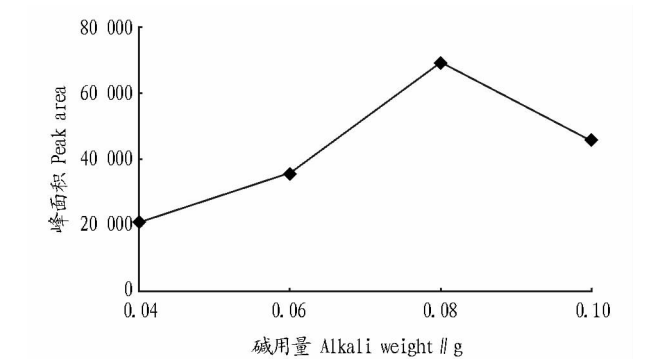


图4 不同碱用量条件下橙皮苷峰面积变化趋势

Fig. 4 Peak area of hesperidin under the different alkali weights

2.2.3 橙皮苷提取工艺中提取时间的筛选。在提取温度 30℃,碱为 $\text{Ca}(\text{OH})_2$,碱用量 0.06 g,料液比 1:30 g/mL 的条件下,考察不同浸提时间对橙皮苷色谱峰面积的影响。

试验发现(图 5),室温下提取时间 1 h,峰面积最高,为 39 760,而提取时间的延长并不能明显增加收率,反而明显下降。这是因为碱液中的橙皮苷查尔酮对氧气比较敏感,提取时间过长会导致橙皮苷查尔酮被氧化,因而降低橙皮苷提取率。

2.2.4 橙皮苷提取工艺中料液比的筛选。在提取温度 30℃,浸提时间 0.5 h,碱为 $\text{Ca}(\text{OH})_2$,碱用量 0.06 g 的条件下,考察不同料液比对橙皮苷色谱峰面积的影响。

试验发现(图 6),料液比 1:30 g/mL 时橙皮苷的收率较

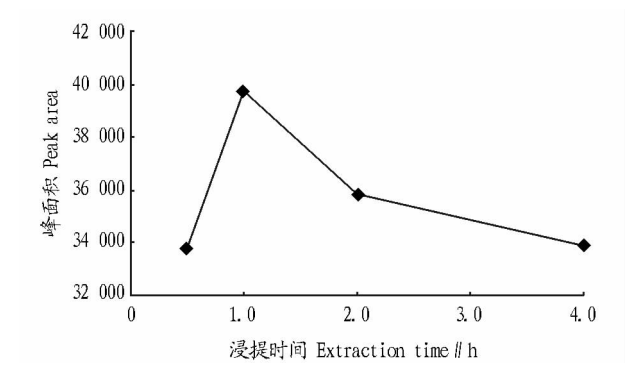


图5 不同提取时间条件下橙皮苷峰面积趋势

Fig. 5 Peak area of hesperidin under the different extraction times

高,峰面积可以达到 42 672。而料液比中溶剂用量继续增加,反而降低橙皮苷的提取率。当料液比为 1:50 g/mL 时,峰面积只有 27 836。这是因为料液比中溶剂用量的增加在一定程度上降低了碱的浓度,因此试验选择料液比为 1:30 g/mL。

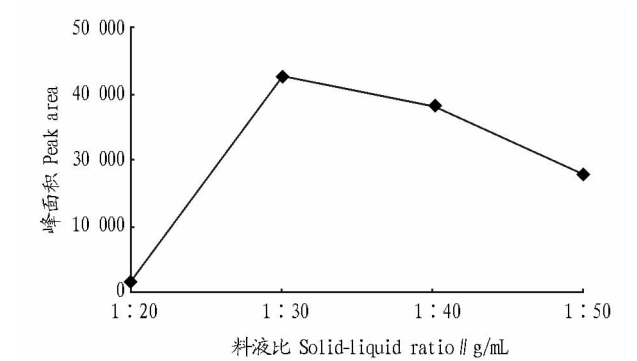


图6 不同料液比条件下橙皮苷峰面积趋势

Fig. 6 Peak area of hesperidin under the different solid-liquid ratios

2.2.5 橙皮苷提取工艺中提取温度的筛选。在浸提时间 0.5 h,碱为 $\text{Ca}(\text{OH})_2$,碱用量 0.06 g,料液比 1:30 g/mL 的条件下,考察不同提取温度对橙皮苷色谱峰面积的影响。

试验发现(图 7),在 30℃ 条件下,橙皮苷的提取率较高,峰面积可以达到 43 066。而随着提取温度的升高,橙皮苷的提取率反而降低。当提取温度 60℃ 时,峰面积只有 16 296。这是因为碱液中的橙皮苷查尔酮对于温度比较敏

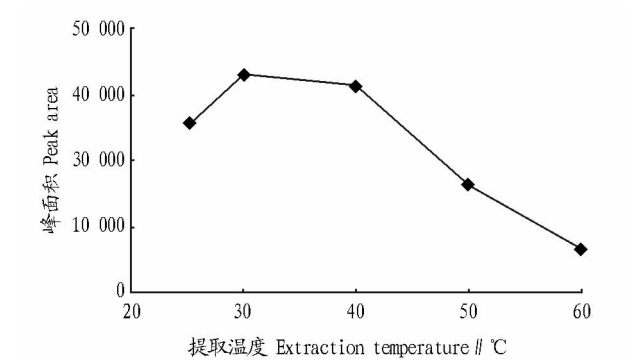


图7 不同温度条件下橙皮苷峰面积趋势

Fig. 7 Peak area of hesperidin under the different temperatures

感,提取温度的升高,加速橙皮若查尔酮的氧化,会降低粗产品的收率,因此提取温度确定为 30 ℃。

2.3 正交试验 正交试验及极差分析结果如表 2 所示,可知 4 个因素对橙皮苷提取得率的影响大小依次为 A、B、D、C,即提取时间、碱用量、提取温度、料液比,其中 A、B 为主要影响因素,可以选出最佳水平为 A₁B₃C₂D₂,即提取时间 0.5 h,碱用量 0.08 g,料液比为 1:30 g/mL,提取温度 30 ℃。

表 2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal experiment results

试验号 No.	因素 Factor				峰面积 Peak area
	A//h	B//g	C//g/mL	D//℃	
1	0.5	0.04	1:20	25	31 890
2	0.5	0.06	1:30	30	29 923
3	0.5	0.08	1:40	40	38 869
4	1.0	0.04	1:30	40	23 964
5	1.0	0.06	1:40	25	24 798
6	1.0	0.08	1:20	30	22 781
7	2.0	0.04	1:40	30	23 186
8	2.0	0.06	1:20	40	31 054
9	2.0	0.08	1:30	25	37 886
K ₁	100 682	79 040	85 725	94 574	
K ₂	71 543	85 775	91 773	95 890	
K ₃	92 126	99 536	86 853	86 853	
R	29 139	20 496	6 048	9 037	

2.4 验证试验 在正交试验得出的优化工艺条件下进行了 3 次重复试验验证,最佳提取条件下橙皮苷的峰面积为 38 996,RSD 值为 2.3%。因此可得,优选的条件稳定可行,重复性好,该最佳工艺条件合理。经过计算得出,粗产品的收率为 4.5%。

3 结论与讨论

该试验通过对碱的种类、碱的添加量、料液比、提取时间

(上接第 20 页)

2.3 生理生化实验结果 分离得到的内生假单胞菌,其糖发酵、V.P、柠檬酸和油脂分解实验结果为阳性,淀粉水解、H₂S 产生、吡嗪实验结果为阴性。

2.4 菌落生长温度范围 菌体在温度 20~43 ℃ 生长情况良好。

3 结论与讨论

该研究分离得到 1 株菜豆花的内生假单胞杆菌,该菌可以在菜豆花中定殖,在各期花中属于优势菌株,但在菜豆其他部位未分离到。该内生菌的生长温度为 20~43 ℃,与菜豆开花结荚的温度吻合。16S rDNA 序列显示,该内生菌为假单胞菌目,变形杆菌纲,不动杆菌属。该菌生理生化特征符合假单胞杆菌的特性。研究报道,假单胞菌可以通过产生抗生物物质使植物抵御病害,并且其次级代谢产物可促进植物吸收和生长^[8];同时假单胞菌具有帮助植物抗磷、耐镉等对抗重金属的特性^[9],是植物益生菌及抗虫害菌的理想菌株。因此,通过基因工程的方法转入杀虫的基因,并利用该菌可

及提取温度等因素的研究,确定了影响柑橘皮中橙皮苷提取的因素。研究确定了柑橘皮中橙皮苷提取的最佳工艺条件为:30 ℃下,1 g 的橙皮粉中加入 30 mL 蒸馏水,0.08 g Ca(OH)₂,搅拌浸提 0.5 h。与热水提取法、醇溶剂提取法、双水相提取法等方法相比,碱浸酸析法具有试剂简单、提取率高、成本低等优点,可作为工业化生产提取柑橘皮中橙皮苷的首选工艺。

参考文献

[1] 刘明,常庆,杨鹏,等. 橙皮苷提取工艺的研究进展[J]. 杭州化工,2011(4):11-13.
[2] MARDER M, VIOLA H, WASOWSKI C, et al. 6-Methylapigenin and hesperidin: New valeriana flavonoids with activity on the CNS[J]. Pharmacology, biochemistry and behavior, 2003, 75: 537-545.
[3] GROLMANN K, MANTHEY J A, CAMERON R. Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures[J]. Carbohydrate research, 2000, 328: 141-146.
[4] 刘学仁,张莹,林志群. 橙皮苷和橙皮素生物活性的研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(11):329-333.
[5] 李玉山. 橙皮苷研究新进展[J]. 科技导报,2009,27(22):108-120.
[6] 史德芳,高虹,程薇,等. 橙皮苷生理活性功能及其提取工艺研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(10):3936-3938.
[7] 朱思明,于淑娟,杨连生. 功能性橙皮苷的提取与化学改性研究进展[J]. 中国食品添加剂,2005(4):1-4.
[8] 贾亚伟,丁玉,朱红菊. 橙皮苷提取工艺研究进展[J]. 中国科技论文在线,2011,6(3):211-214.
[9] 曲学燕,杜欢欢,蒋景龙,等. 汉中