

椴柑皮中糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的同步提取与纯化

郑美瑜¹, 高浦¹, 陆胜民¹, 曹雪丹², 徐小忠³

¹浙江省农业科学院食品科学研究所 杭州 310021

²浙江柑橘研究所 浙江台州 318026

³浙江金明生物科技有限公司 浙江衢州 324014)

摘要 椴柑皮中富含糖苷黄酮和多甲氧基黄酮,为了充分利用这两类黄酮资源,本文对椴柑皮中的两类黄酮进行同步提取。以椴柑皮中主要黄酮单体的提取率为指标,通过单因素和正交试验,对同步提取工艺进行优化。对提取的粗提物用大孔树脂柱层析进行纯化。结果表明,最佳的提取条件为乙醇体积分数 60%,料液比(g/mL)1:40,提取时间 110 min,提取温度 75℃,此时各黄酮单体总提取率为(72.63±1.53)mg/g。采用 D101 树脂柱层析纯化,较佳的纯化工艺为上样量 170 mL,上样质量浓度为 2.5 g/L 的 30%乙醇溶液,上样流速 1 mL/min,洗脱液为 80%乙醇,纯化后提取物中 3 种黄酮橙皮苷、川陈皮素和桔皮素的含量分别是粗提物的 4.6,2.3,1.45 倍。结论:椴柑皮中糖苷黄酮和多甲氧基黄酮以较高的提取率被同步提取出来,经大孔树脂柱层析纯化,两类黄酮的含量都有所提高。研究结果为椴柑皮中多种黄酮提取工艺优化及提高椴柑皮的综合利用率提供了技术参考。

关键词 椴柑皮;糖苷黄酮;多甲氧基黄酮;提取;纯化

文章编号 1009-7848(2025)01-0219-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.021

椴柑(*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan)是芸香科、柑橘属小乔木,原产于中国。我国椴柑面积和产量均占世界椴柑面积和产量的 95%以上,全国生产椴柑的县有近 300 个^[1],椴柑资源非常丰富。椴柑果实营养丰富,除鲜食外,其果实被加工成果汁、饮料、果酒等,而加工后会产生大量的果皮副产物。该副产物中含有丰富的功能性成分,如黄酮、果胶、类胡萝卜素、精油、膳食纤维等。已有大量的国内外文献对柑橘果皮中的功能性成分进行研究^[2-4]。柑橘果皮中黄酮类成分种类丰富,据报道达 60 多种^[5]。黄酮中有些母核上未连糖基,称为苷元;有些在母核上连接有糖基,主要是二糖,称为糖苷,在植物中大多以糖苷形式存在^[6]。另外,有一类柑橘黄酮,其母核上的羟基大部分或全部被甲氧基所取代,是柑橘中所特有的一类黄酮,称为多甲氧基黄酮,具有平面结构,极性较低,容易通过细胞膜,其活性比其它黄酮强,尤其在抗癌活性方面^[7-9]。椴柑皮中糖苷黄酮代表性成分有芸香柚皮苷、橙皮苷等^[10],多甲氧基黄酮代表性成分有川

陈皮素、桔皮素、甜橙黄酮等^[11],后者主要存在于柑橘果皮的油胞层,含量比较低,市场售价高,目前高纯度的川陈皮素每公斤售价在 6 万元以上。柑橘黄酮类成分具有显著的功能活性,如抗氧化、抗炎、抗癌、抗心血管疾病等,因此其一直是国内外学者研究的热点。

柑橘皮中的黄酮类成分具有多种功能活性,且含量丰富,是提取黄酮的良好原料。糖苷黄酮传统的提取方法为碱溶酸沉法^[12-13],还有近年发展起来的超(亚)临界流体萃取法^[14-15]、离子液体法^[16]、低共熔剂法^[17]等。多甲氧基黄酮的提取方法主要是有机溶剂法^[18],以及超临界流体萃取法^[19-20]等。在以往的研究中,提取出以糖苷黄酮为主要成分,采用分光光度法测定其总黄酮含量,这种定量方法不能反映柑橘中多种黄酮单体的精确含量。大部分柑橘果皮中所含黄酮主要为糖苷黄酮,而多甲氧基黄酮含量较低。许引等^[21]检测了 14 种柑橘皮中的多甲氧基黄酮含量,其含量最高为 10.4 mg/g,而部分品种的多甲氧基黄酮含量低于 1 mg/g,甚至未检出。据文献报道,椴柑果皮中多甲氧基黄酮的含量较高,如 7 月和 8 月采摘的果皮中,其含量甚至超过橙皮苷的含量^[11]。多甲基黄酮是一类活性更高的黄酮,其抗氧化和抗癌功能显著,目前

收稿日期:2024-01-28

基金项目:浙江省重点研发计划项目(2022C02078)

第一作者:郑美瑜,女,硕士,副研究员

E-mail: zhenmey@sina.com

市场价值远远超过糖苷黄酮,而椪柑皮是多甲基黄酮的主要来源。椪柑皮中主要的糖苷黄酮含量也不低于其它柑橘品种,以往的研究以提取总黄酮或糖苷黄酮为主,而同步提取和纯化糖苷黄酮、多甲基黄酮的报道很少^[22]。本文以椪柑皮为原料,研究各提取因素对糖苷黄酮单体和多甲氧基黄酮单体同步提取的影响,优化提取工艺,并通过大孔树脂层析柱纯化粗提物,提高这两类黄酮的纯度。以期提高椪柑的附加值,拓展其黄酮在功能食品、药品和化妆品等行业中的应用,为椪柑果皮的综合利用提供依据和借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

椪柑于2022年12月采自浙江衢州,采摘后立即运回实验室,手工剥皮、冷冻干燥后,粉碎,过60目筛,备用。

1.2 主要试剂

芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、去甲基川陈皮素标准品,上海源叶生物科技有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯级,西格玛奥德里齐(上海)贸易有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、盐酸均为分析纯级,上海阿拉丁科技股份有限公司。

1.3 仪器与设备

LC-2030C 高效液相色谱仪,日本岛津公司;恒温加热磁力搅拌器,郑州市亚荣仪器有限公司;冷冻干燥机,广州飞迪生物科技有限公司;离心机,宁波市群安实验仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 糖苷类黄酮和多甲氧基黄酮含量的测定方法 采用高效液相法测定,色谱条件:参考郑美瑜等^[10]的方法。色谱柱为 ODS C18 柱(SunFire 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm),流速 1.0 mL/min;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL ,检测波长 280 nm。

1.4.2 标准曲线的制备 精密称取 7 种黄酮标准品 10 mg 置于 10 mL 的容量瓶中,加入甲醇溶解,配制成 1 mg/mL 的标准品溶液。精密量取各标准品溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 mL, 分别置于 10 mL 的容量瓶中,各加入甲醇补足 10 mL, 分别得到 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.15, 0.20

mg/mL 的标准品混合液。配制好的不同质量浓度的混标溶液进行高效液相分析。以标准品含量为横坐标,峰面积为纵坐标得到 7 种黄酮的标准曲线。

1.4.3 椪柑皮中糖苷类黄酮和多甲氧基黄酮的提取及其单因素实验 称取椪柑皮粉 1 g,加入乙醇溶液,加热磁力搅拌后,提取液进行抽滤,量取滤液体积,并取 2 mL 过微孔滤膜(0.45 μm),使用高效液相色谱仪分析提取液中黄酮各单体的含量。分别考察乙醇浓度(45%, 55%, 65%, 75%, 85%)、提取温度(40, 50, 60, 70, 80 $^{\circ}\text{C}$)、料液比(1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50)和提取时间(30, 60, 90, 120, 150 min)对各黄酮单体和总提取率的影响。其粗提物的 HPLC 色谱图如图 1 所示。

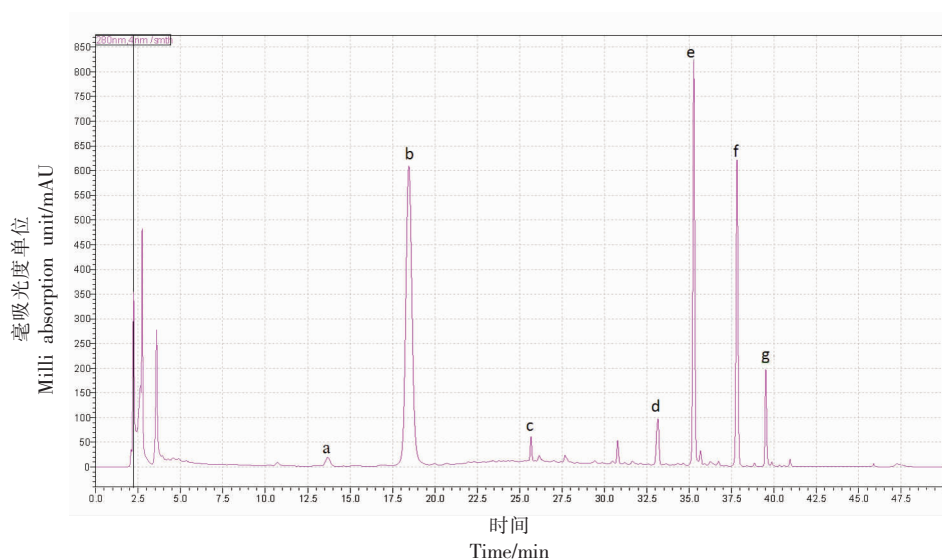
1.4.4 提取优化试验 由单因素的结果,得到各因素较佳的范围,以乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)和提取温度(D)4 个因素进行 4 因素 3 水平的正交试验,以 7 种黄酮的总提取率为考察指标,对提取工艺进行正交试验优化,正交试验设计表如表 1 所示。

1.4.5 黄酮提取率的计算 取 2 mL 黄酮提取液过微孔滤膜(0.45 μm),按照 1.4.1 节中的色谱条件进行分析,得到各个黄酮浓度,按公式(1)计算黄酮提取率。

$$Y = \frac{C \times V}{m} \quad (1)$$

式中:Y 为黄酮提取率,mg/g;C 为样品溶液中各黄酮的质量浓度,mg/mL;V 为提取液体积,mL;m 为椪柑皮粉末质量,g。

1.4.6 黄酮粗提物纯化试验 对糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的粗提物进行纯化,根据笔者先前关于多甲氧基黄酮纯化的专利^[23]以及文献报道^[24-25],选取 D101 树脂进行柱层析纯化,层析柱内径 26 cm,柱长 40 cm,装柱高度 30 cm。对影响纯化的上样质量浓度(2.5, 5.0, 7.5 g/L)、上样流速(0.5, 1.0, 1.5 mL/min)、上样液乙醇浓度(30%, 40%, 50%)、上样量(0~240 mL)、洗脱液乙醇浓度(60%, 80%, 100%)5 个因素进行单因素实验,确定较佳的纯化工艺。以吸附流出液中黄酮流出量和洗脱液中黄酮浓度为考察指标。黄酮流出量(mg)的计算公式为:



注: a. 芸香柚皮苷, b. 橙皮苷, c. 香蜂草苷, d. 甜橙黄酮, e. 川陈皮素, f. 桔皮素, g. 去甲基川陈皮素。

图 1 椴柑皮黄酮粗提物的 HPLC 图谱

Fig.1 The HPLC profiles of flavone extract of ponkan peel

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

序号	乙醇浓度 (A)/%	料液比(B)/ (g/mL)	提取时间 (C)/min	提取温度 (D)/°C
1	60	1:35	70	65
2	65	1:40	90	70
3	70	1:45	110	75

$$\text{黄酮流出量}(\text{mg}) = \text{流出液质量浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{流出液体积}(\text{mL}) \quad (2)$$

1.4.7 糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的快速测定方法

在粗提物的纯化中,为了快速监测流出液和洗脱液中黄酮浓度,通过分光光度法分别在波长 280 nm 和 330 nm 处监测溶液中糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的浓度,并通过与 HPLC 测定结果验证,分光光度法在 2 个波长下的测定值与 HPLC 测定值有较好的相关性。糖苷黄酮以橙皮苷为标准品,配制质量浓度为 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/L 的标准品溶液,在波长 280 nm 处测定其吸光度,绘制标准曲线方程为 $Y = 0.0518X + 0.0315, R^2 = 0.991$ 。多甲氧基黄酮以川陈皮素为标准品,配制质量浓度为 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/L 的标准品溶液,在波长 330 nm 处测定其吸光度,绘制标准曲线方程为 $Y = 0.118X + 0.0171, R^2 = 0.9973$ 。

2 结果与分析

2.1 椴柑皮中糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的提取单因素实验

2.1.1 乙醇浓度对椴柑皮中糖苷类黄酮和多甲氧基黄酮提取率的影响 在料液比 (g/mL) 1:40, 提取温度 70 °C, 提取时间 90 min 条件下, 设定乙醇浓度为 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 考察乙醇浓度对椴柑皮中几种主要的糖苷黄酮和多甲氧基黄酮提取率的影响, 其结果如表 2 所示。随着乙醇浓度的升高, 橙皮苷含量先升高后降低, 这是因为糖苷黄酮连接了糖基, 使其极性增强, 因此乙醇浓度过高时提取率较低。乙醇浓度对川陈皮素等多甲氧基黄酮含量的影响不大, 可能是相对于橙皮苷, 多甲氧基黄酮的含量较低, 而提取所用的料液比较高, 在乙醇浓度较低时就基本能提取出来, 因此乙醇浓度对其影响较小。黄酮的总提取率在乙醇浓度为 65% 时最高。从各黄酮单体含量来看, 椴柑皮中主要的糖苷类黄酮是橙皮苷, 多甲氧基黄酮主要是川陈皮素和桔皮素, 后者的含量高于大部分的柑橘果皮, 如胡柚皮在川陈皮素和桔皮素含量最高的 5 月份, 两者含量分别为 1.06 mg/g 和 0.64 mg/g; 甜橙皮在川陈皮素和桔皮素含量最高的 7 月份, 两者含量分别为 2.67 mg/g 和 0.31 mg/g; 晚熟温州蜜柑皮中的川陈皮素和桔皮素含量最高

时,分别为 1.0 mg/g 和 0.41 mg/g^[26],因此椴柑皮是多甲氧基黄酮的优质来源。

2.1.2 料液比对椴柑皮中糖苷类黄酮和多甲氧基黄酮提取率的影响 在提取温度 60 ℃,提取时间 90 min,乙醇浓度 65%条件下,设定料液比(g/mL)为 1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,考察料液比对椴柑皮目标黄酮提取率的影响,结果如表 3 所示。随

着料液比的增加,橙皮苷提取率升高,在料液比(g/mL)为 1:40 后增加缓慢。川陈皮素在料液比(g/mL)为 1:20 时最高,之后逐渐下降。而其余 4 种多甲氧基黄酮随着料液比的增加略有下降,可能是多甲氧基黄酮含量低于糖苷类黄酮含量,在料液比较高时就被提取出来了。各黄酮的总提取率在料液比(g/mL)为 1:40 时最高。

表 2 乙醇浓度对各黄酮单体提取率(mg/g)的影响

Table 2 The effect of ethanol concentration on extraction ratio (mg/g) of flavone monomer

乙醇浓度/%	芸香柚皮苷	橙皮苷	香蜂草苷	甜橙黄酮	川陈皮素	桔皮素	去甲基川陈皮素	总和
45	1.03 ± 0.05	38.59 ± 1.72	1.13 ± 0.06	1.54 ± 0.05	11.32 ± 0.77	6.62 ± 0.31	1.82 ± 0.06	62.05
55	0.89 ± 0.05	39.64 ± 3.42	1.14 ± 0.06	1.41 ± 0.06	10.11 ± 0.95	6.07 ± 0.45	1.72 ± 0.08	60.98
65	0.90 ± 0.04	41.68 ± 4.35	1.32 ± 0.07	1.44 ± 0.04	10.23 ± 1.05	6.17 ± 0.58	1.76 ± 0.06	63.50
75	0.8 ± 0.030	37.13 ± 4.32	1.19 ± 0.04	1.42 ± 0.03	10.10 ± 1.57	6.08 ± 0.75	1.74 ± 0.05	58.46
85	0.75 ± 0.05	34.21 ± 4.86	1.00 ± 0.05	1.46 ± 0.05	10.38 ± 1.15	6.27 ± 0.62	1.79 ± 0.07	55.86

表 3 料液比对各黄酮单体提取率(mg/g)的影响

Table 3 The effect of solid-liquid ratio on extraction ratio (mg/g) of flavone monomer

料液比/(g/mL)	芸香柚皮苷	橙皮苷	香蜂草苷	甜橙黄酮	川陈皮素	桔皮素	去甲基川陈皮素	总和
1:10	0.74 ± 0.07	14.89 ± 1.12	0.80 ± 0.05	1.69 ± 0.02	10.52 ± 0.12	8.44 ± 0.06	2.03 ± 0.02	39.11
1:20	0.76 ± 0.06	29.51 ± 1.16	1.04 ± 0.06	1.68 ± 0.09	14.12 ± 0.60	6.79 ± 0.29	1.94 ± 0.10	55.84
1:30	0.76 ± 0.02	27.51 ± 2.52	1.06 ± 0.05	1.66 ± 0.20	10.82 ± 1.02	6.30 ± 0.50	1.83 ± 0.25	49.94
1:40	0.83 ± 0.02	40.58 ± 0.09	1.07 ± 0.07	1.71 ± 0.05	10.73 ± 0.90	6.37 ± 0.46	1.86 ± 0.06	63.15
1:50	0.82 ± 0.03	40.81 ± 0.09	0.18 ± 0.02	1.49 ± 0.05	10.45 ± 0.18	6.33 ± 0.08	1.85 ± 0.08	61.93

2.1.3 提取温度对椴柑皮中糖苷类黄酮和多甲氧基黄酮提取率的影响 在料液比(g/mL)1:40,提取时间 90 min,乙醇浓度 65%条件下,设定提取温度为 40,50,60,70,80 ℃,考察提取温度对椴柑皮黄酮提取率的影响,结果如表 4 所示。随着温度的升高,橙皮苷提取率先升高后降低,在 70 ℃时最高,这是由于温度升高促进了黄酮的溶出,而温度

过高可能会对黄酮结构造成破坏,因而温度过高时反而降低。川陈皮素等多甲氧基黄酮提取率随着温度的升高也呈先升高后降低的趋势,在温度 60 ℃时最高,之后有所降低并趋于稳定,其原因与橙皮苷相似,主要是温度对黄酮提取率的双重作用。各黄酮的总提取率在 60 ℃时最高。

表 4 提取温度对各黄酮单体提取率(mg/g)的影响

Table 4 The effect of ethanol extracting temperature on extraction ratio (mg/g) of flavone monomer

温度/℃	芸香柚皮苷	橙皮苷	香蜂草苷	甜橙黄酮	川陈皮素	桔皮素	去甲基川陈皮素	总和
40	0.75 ± 0.03	33.96 ± 0.62	1.01 ± 0.04	1.50 ± 0.03	10.05 ± 0.18	6.04 ± 0.10	1.75 ± 0.04	55.06
50	0.71 ± 0.05	35.54 ± 3.72	0.93 ± 0.05	1.35 ± 0.10	9.25 ± 1.07	5.56 ± 0.55	1.61 ± 0.14	54.95
60	0.93 ± 0.03	45.78 ± 0.21	1.22 ± 0.02	1.84 ± 0.02	12.15 ± 0.20	7.22 ± 0.10	2.08 ± 0.03	71.22
70	1.01 ± 0.02	49.15 ± 5.76	1.32 ± 0.04	1.47 ± 0.15	10.28 ± 1.86	6.14 ± 0.95	1.78 ± 0.16	71.15
80	0.85 ± 0.03	41.59 ± 2.68	1.06 ± 0.03	1.48 ± 0.08	10.32 ± 1.10	6.20 ± 0.55	1.80 ± 0.10	63.30

2.1.4 提取时间对椴柑皮中糖苷类黄酮和多甲氧基黄酮提取率的影响 在料液比 (g/mL)1:40, 提取温度 70 ℃, 乙醇浓度 65% 条件下, 设定提取时间为 30, 60, 90, 120, 150 min, 考察提取时间对椴柑皮黄酮提取率的影响, 结果如表 5 所示。随着提取时间的延长, 橙皮苷提取率先增加后降低并趋于稳定, 这是由于随着提取时间的延长, 黄酮逐渐

溶解到提取液中, 当提取时间较长时, 黄酮已大部分溶出, 因而随着提取时间的变化较小, 且提取时间延长会增加对黄酮的破坏, 使其提取率下降。川陈皮素、桔皮素等多甲氧基黄酮提取率与橙皮苷的变化趋势相同, 各黄酮的总提取率在提取 90 min 时最高。

表 5 提取时间对各黄酮单体提取率 (mg/g) 影响

Table 5 The effect of extracting time on extraction ratio (mg/g) of flavone monomer

提取时间/min	芸香柚皮苷	橙皮苷	香蜂草苷	甜橙黄酮	川陈皮素	桔皮素	去甲基川陈皮素	总和
30	0.88 ± 0.05	41.11 ± 2.13	1.09 ± 0.04	1.36 ± 0.05	9.71 ± 1.04	5.85 ± 0.51	1.73 ± 0.06	61.73
60	0.89 ± 0.07	44.21 ± 4.84	1.15 ± 0.08	1.40 ± 0.10	9.97 ± 1.28	6.03 ± 0.58	1.78 ± 0.12	65.43
90	1.44 ± 0.06	45.13 ± 3.61	1.32 ± 0.07	1.51 ± 0.08	10.85 ± 1.05	6.51 ± 0.50	1.83 ± 0.07	68.59
120	0.90 ± 0.06	38.21 ± 3.87	1.20 ± 0.06	1.43 ± 0.08	10.16 ± 1.07	6.14 ± 0.51	1.72 ± 0.08	59.76
150	0.84 ± 0.08	38.19 ± 1.09	1.06 ± 0.04	1.43 ± 0.03	10.19 ± 0.40	6.15 ± 0.32	1.73 ± 0.02	59.59

2.2 椴柑皮中糖苷类黄酮和多甲氧基黄酮的提取正交试验

根据单因素实验结果, 选择乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)和提取温度(D)4 个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以黄酮总提取率为考察指标, 结果如表 6 所示。由 R 值可得, 4 个因素对黄酮提取率影响的程度由大到小依次为: 乙醇浓度 > 提取

温度 > 料液比 > 提取时间, 其中最佳提取工艺条件是: $A_1B_2C_3D_3$, 即: 乙醇浓度 60%, 料液比 (g/mL)1:40, 提取时间 110 min, 提取温度 75 ℃。对最佳提取条件进行 3 次验证, 得到黄酮单体的总提取率为 (72.63 ± 1.53) mg/g, 其提取率高于大部分文献中报道的总黄酮的提取率^[27-28]。

表 6 正交试验结果

Table 6 Results of orthogonal experiment

试验号	因素				黄酮总提取率/(mg/g)
	A/%	B/(g/mL)	C/min	D/℃	
1	1(60)	1(1:35)	1(70)	1(65)	62.31 ± 1.14
2	1	2(1:40)	2(90)	2(70)	62.69 ± 4.12
3	1	3(1:45)	3(110)	3(75)	70.02 ± 3.24
4	2(65)	1	2	3	60.67 ± 2.18
5	2	2	3	1	61.01 ± 3.34
6	2	3	1	2	59.49 ± 5.67
7	3(70)	1	3	2	55.94 ± 1.46
8	3	2	1	3	60.43 ± 3.26
9	3	3	2	1	53.04 ± 1.13
k_1	65.01	59.64	60.74	58.78	
k_2	60.39	61.38	58.8	59.37	
k_3	56.47	60.85	62.32	63.71	
R	7.84	1.04	0.88	4.22	

2.3 糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的柱层析纯化

2.3.1 上样因素对大孔树脂层析柱吸附流出液的

影响 粗提得到的椴柑皮提取物, 其黄酮含量需要进一步纯化。通过 D101 大孔树脂柱层析纯化,

用分光光度法对流出液进行吸光度监测,上样质量浓度、上样流速、样液乙醇浓度和上样量对糖苷黄酮和多甲氧基黄酮流出量(或质量浓度)的影响如图2所示。

2.3.1.1 上样质量浓度的影响 在样液乙醇浓度为50%,上样流速为1 mL/min,上样质量浓度分别为2.5,5.0,7.5 g/L时,上样1个柱床体积(BV),测定糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的流出量。当上样质量浓度为2.5 g/L时,糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的流出量均最低,上样质量浓度为5.0 g/L时,有缓慢增加,而上样质量浓度为7.5 g/L时,流出量迅速增加,表明上样质量浓度较高时,大孔树脂不能完全吸附,致使黄酮大量流出。因此,上样浓度以2.5~5.0 g/L为宜。

2.3.1.2 上样流速的影响 在上样质量浓度为2.5 g/L,样液乙醇浓度为50%,上样流速分别为0.5,1.0,1.5 mL/min时,上样1个BV,测定糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的流出量。当流速为0.5 mL/min时,黄酮流出量最低,流速为1.0 mL/min和1.5 mL/min时,流出量有所增加,而增加不明显。这是因为流速增加,流过大孔树脂柱的时间过短,致使大量的黄酮未被吸附而流出。虽然流速较低时黄酮流出量低,但是流速低会影响层析柱纯化

效率,因此选择流速1 mL/min较为合适。

2.3.1.3 上样乙醇浓度的影响 在上样质量浓度为2.5 g/L,上样流速为1 mL/min,样液乙醇浓度为30%,40%,50%时,上样1个BV,测定糖苷黄酮和多甲氧基黄酮的流出量。随着上样液乙醇浓度的增加,黄酮流出量增加明显,这是因为大孔树脂和乙醇之间存在竞争性。当样液中乙醇浓度较高时,黄酮在乙醇溶液中的溶解度大,黄酮更容易溶解在乙醇溶液中而随样液流出,因而不能被大孔树脂吸附;而乙醇浓度浓度较低时,黄酮在乙醇中的溶解度低,更易被大孔树脂吸附而被截留。然而乙醇浓度太低,黄酮的溶解度低,使黄酮分散性差,形成较大的颗粒,也不易被大孔树脂吸附。因此,样液乙醇浓度以30%为宜。

2.3.1.4 上样量的影响 在上样质量浓度为2.5 g/L,上样流速为1 mL/min,样液乙醇浓度为30%时,对流出液进行分布收集,每管10 mL,监测流出液在2个波长下的吸光度和黄酮质量浓度。从图2d可以看出,流出液收集至第18管(上样量为180 mL)时,流出液黄酮质量浓度快速增加,确定该上样点为上样的泄漏点,因此,较佳的上样量为170 mL。

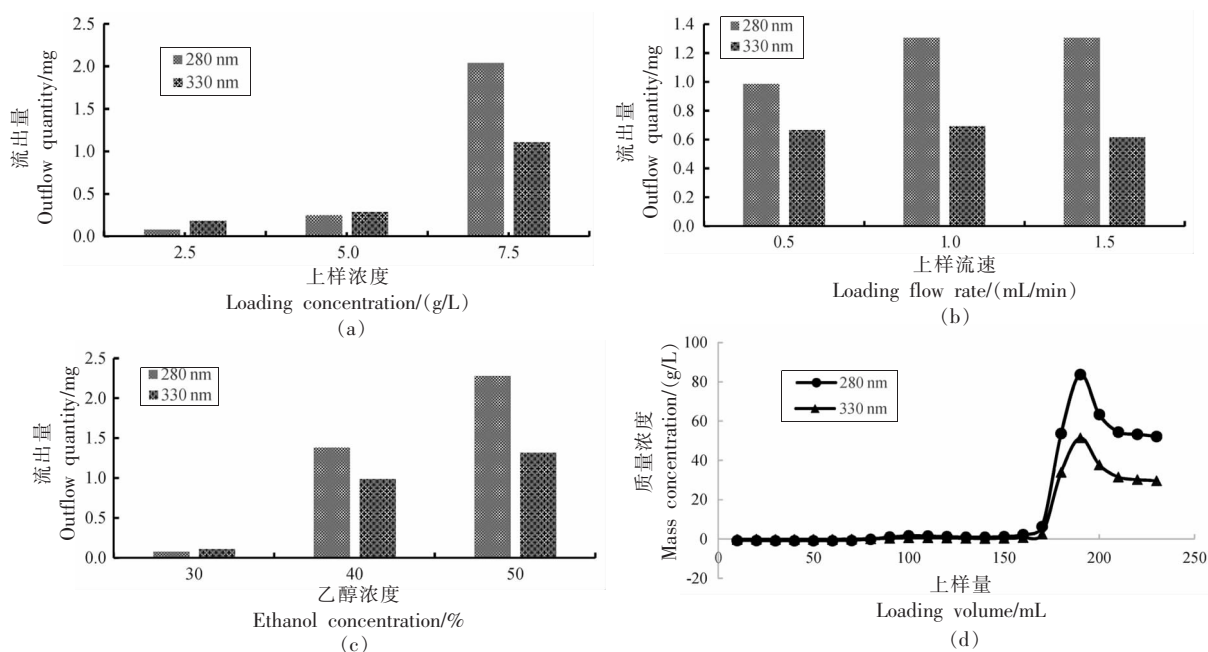


图2 各因素对大孔树脂层析柱黄酮流出量(或质量浓度)的影响

Fig.2 Effects of different factors on the outflow quantity (or mass concentration) of flavones of macroporous resin chromatography column

2.3.2 乙醇洗脱浓度对洗脱液中黄酮浓度的影响

在上样质量浓度 2.5 g/L, 上样乙醇浓度 30%, 上样流速 1 mL/min 条件下, 上样 1 个 BV, 并用 60%, 80%, 100% 的乙醇溶液对层析柱进行洗脱, 用分步收集器收集洗脱液, 监测每管洗脱液在 2 个波长下的吸光度和黄酮浓度, 绘制洗脱曲线, 如图 3a~3c 所示。从洗脱曲线可看出, 60% 乙醇的洗脱液的峰质量浓度远低于其它 2 个洗脱质量浓度, 而 80% 乙醇洗脱中的峰质量浓度要略高于 100% 洗脱液。把 3 个乙醇浓度洗脱的质量浓度较高的洗脱液合并, 并通过 HPLC 分析混合液中的黄酮单体浓度, 如表 7 所示。80% 洗脱混合液中的黄酮质量浓度高于 100% 洗脱混合液, 因此, 选择洗脱乙醇浓度为 80%。

在以上各因素研究的基础上, 在较佳条件下对大孔树脂层析柱进行上样和洗脱, 洗脱曲线如图 3d 所示。洗脱液中黄酮的峰质量浓度高于上样为 1 个 BV 时的峰质量浓度, 其中在波长 280 nm 处的峰质量浓度是初始上样液 (227.5 mg/L) 中的 2.9 倍, 在波长 330 nm 处的峰质量浓度是初始上样液 (101.4 mg/L) 中的 2.1 倍。把浓度较高部分的洗脱液 (13~23 管) 混合并冻干, 得到黄酮纯化物。将纯化物配成 10 mL 的甲醇溶液, 通过 HPLC 分析其中各黄酮单体的浓度和纯度, 结果见表 7。纯化物中橙皮苷、川陈皮素、桔皮素以及黄酮单体的总含量分别是粗提物中的 4.6, 2.3, 1.45, 3.96 倍, 表明经过纯化后, 各黄酮单体的含量有较大的提高。

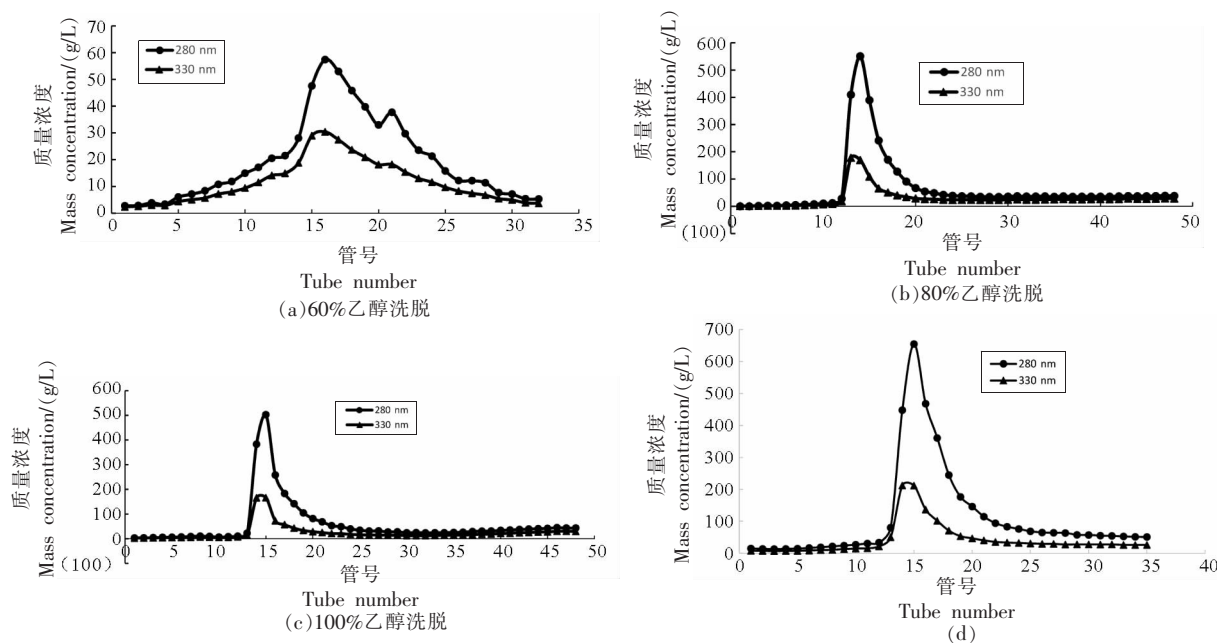


图 3 不同浓度乙醇对洗脱液中黄酮质量浓度的影响

Fig.3 Effects of different mass concentration ethanol on mass concentration of flavones in their eluent

表 7 洗脱混合液和纯化物中各黄酮单体 HPLC 分析结果

Table 7 The HPLC analysis of flavone monomer in elution mixture and purified flavones

	芸香柚皮苷	橙皮苷	香蜂草苷	甜橙黄酮	川陈皮素	桔皮素	去甲基 川陈皮素	总和
60%洗脱混合液/(mg/L)	0.00	0.24	0.00	0.01	0.00	0.08	0.02	0.35
80%洗脱混合液/(mg/L)	9.16	210.73	4.59	2.14	14.66	7.05	2.13	250.46
100%洗脱混合液/(mg/L)	5.59	112.75	2.94	0.35	5.24	13.61	4.34	144.82
黄酮纯化物溶液/(mg/L)	36.00	879.09	33.97	13.18	92.73	35.16	5.29	1 095.42
纯化物黄酮含量/%	0.95	23.19	0.90	0.35	2.45	0.93	0.14	28.91
粗提物黄酮含量/%	0.10	5.03	0.13	0.15	1.06	0.64	0.19	7.26

3 结论

为充分利用椴柑皮中含量较高的两类黄酮,研究了糖苷黄酮单体和多甲氧基黄酮单体的同步提取,探讨了各因素对各黄酮单体提取率的影响,经优化,最佳的提取工艺为乙醇浓度 60%,料液比(g/mL)1:40,提取时间 110 min,提取温度 75 ℃,在此工艺条件下,各黄酮单体的总提取率为(72.63±1.53)mg/g,比大部分文献中报道的总黄酮提取率高。粗提物通过 D101 大孔树脂柱层析进行纯化,最后得到较优的纯化工艺为上样量 170 mL,上样质量浓度为 2.5 g/L 的 30%乙醇溶液,上样流速 1 mL/min,洗脱液浓度为 80%乙醇,纯化物中各黄酮单体的总纯度为粗提物的 4 倍左右。本研究实现了对椴柑皮中的两种黄酮的同步提取,对其中的黄酮单体进行了精确定量,为椴柑果皮中黄酮提取方法的优化,提供了新思路。后续可通过此纯化工艺对纯化物进行多次纯化,以进一步提高黄酮纯度。

参 考 文 献

- [1] 沈兆敏. 我国椴柑现状及发展对策[J]. 果农之友, 2006(7): 8-9.
SHENG Z M. Current situation and developing countermeasures of Chinese ponkan [J]. Friends of Fruit Growers, 2006(7): 8-9.
- [2] AHMED O M, ABOUZID S F, AHMED N A, et al. An up-to-date review on citrus flavonoids: Chemistry and benefits in health and diseases [J]. Current Pharmaceutical Design, 2021, 27(4): 513-530.
- [3] DENG Y D, TU Y L, LAO S H, et al. The role and mechanism of citrus flavonoids in cardiovascular diseases prevention and treatment [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 62(27): 1-24.
- [4] ALAM F, MOHAMMADIN K, SHAFIQUE Z, et al. Citrus flavonoids as potential therapeutic agents: A review [J]. Phytotherapy Research, 2022, 36(4): 1415-1836.
- [5] TRIPOLI E, GUARDIA M, GIAMMANCO S, et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review [J]. Food Chemistry, 2007, 104(2): 466-479.
- [6] 叶兴乾, 徐贵华, 方忠祥, 等. 柑橘属类黄酮及其生理活性[J]. 中国食品学报, 2008, 8(5): 1-7.
YE X Q, XU G H, FANG Z X, et al. Citrus flavonoids and their physiological activity [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(5): 1-7.
- [7] ARAFA E A, SHURRAB N T, BUABEID M A. Therapeutic implications of a polymethoxylated flavone, tangeretin, in the management of cancer via modulation of different molecular pathways [J]. Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences, 2021, 2021: 4709818.
- [8] RAZA W, LUQMAN S, MEENA A. Prospects of tangeretin as a modulator of cancer targets/pathways [J]. Pharmacological Research, 2020, 161: 105202.
- [9] 王磊, 苏学素, 付陈梅, 等. 柑橘中多甲氧基黄酮生物活性及应用研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 285-290.
WANG L, SU X S, FU C M, et al. Research progress on biological activities and applications of polymethoxy flavonoids from Citrus [J]. Food Science, 2009, 30(7): 285-290.
- [10] 郑美瑜, 邢建荣, 夏其乐, 等. 常山胡柚与葡萄柚果实营养成分和功能成分对比研究[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(1): 150-156.
ZHENG M Y, XING J R, XIA Q L, et al. Comparison of fruit nutritional qualities and functional compounds of Changshan-huyou and grapefruit [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2016, 28(1): 150-156.
- [11] 吴群, 孙建城, 张姬雯, 等. 衢州主要柑桔青果皮 6 种黄酮类化合物含量变化和差异研究[J]. 中国南方果树, 2022, 51(6): 43-46.
WU Q, SUN J C, ZHANG J W, et al. Study on the contents and differences of 6 flavonoids in free peel of main citrus Varieties in Quzhou [J]. South China Fruits, 2022, 51(6): 43-46.
- [12] 李继伟, 任璇, 李媛, 等. SDS-微波协同碱法提取柑橘果皮渣黄酮的研究[J]. 应用化工, 2017, 46(9): 1709-1712.
LI J W, REN X, LI Y, et al. Study on flavonoids extraction from citrus peels by alkaline method assisted by SDS and microwave treatment [J]. Applied Chemical Industry, 2017, 46(9): 1709-1712.

- [13] ZHOU P, ZHENG M, LI X Z, et al. A consecutive extraction of pectin and hesperidin from *Citrus aurantium* L.: Process optimization, extract mechanism, characterization and bioactivity analysis[J]. Ind Crops Prod, 2022, 182: 114849.
- [14] JOKIĆ S, MOLNAR M, CIKOŠ A M, et al. Separation of selected bioactive compounds from orange peel using the sequence of supercritical CO₂ extraction and ultrasound solvent extraction: Optimization of limonene and hesperidin content[J]. Separation Science and Technology, 2019, 55: 1–13.
- [15] HWANG H K H, KO M, CHUNG M. Recovery of hesperidin and narirutin from waste *Citrus unshiu* peel using subcritical water extraction aided by pulsed electric field treatment[J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30: 217–226.
- [16] GU H Y, CHEN F L, ZHANG Q, et al. Application of ionic liquids in vacuum microwave-assisted extraction followed by macroporous resin isolation of three flavonoids rutin, hyperoside and hesperidin from *Sorbus tianschanica* leaves[J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1014: 45–55.
- [17] XU M L, RA L, CHEN N, et al. Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent[J]. Food Chemistry, 2019, 297: 124970.
- [18] 韩丹丹, 毕金峰, 谢宏, 等. 清见蜜柑果皮中多甲氧基黄酮的提取分离[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 191–199.
- HAN D D, BI J F, XIE H, et al. Extraction and separation of polymethoxyflavones in Kiyomi Tango peels[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(6): 191–199.
- [19] MITANI R, TASHIRO H, ARITA E, et al. Extraction of nobiletin and tangeretin with antioxidant activity from peels of *Citrus poonensis* using liquid carbon dioxide and ethanol entrainer[J]. Separation Science and Technology, 2021, 56(2): 1–11.
- [20] 吕小健, 许引, 董攀飞, 等. 响应面优化超临界 CO₂ 萃取陈皮多甲氧基黄酮研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(11): 16–20.
- LÜ X J, XU Y, DONG P F, et al. Optimization of supercritical CO₂ extraction of polymethoxyflavones from citri reticulate pericarpium by response surface methodology [J]. Food Research and Development, 2019, 40(11): 16–20.
- [21] 许引, 吕小健, 李明, 等. 14 种柑橘皮中多甲氧基黄酮成分分析[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 136–140.
- XU Y, LÜ X J, LI M, et al. Analysis of polymethoxyflavones in citrus peels of different varieties [J]. Food Science, 2019, 40(8): 136–140.
- [22] 聂超, 赵梓燕, 刘珞忆, 等. 浸提对甜橙果皮中黄酮和多甲氧基黄酮的影响及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1): 158–165.
- NIE C, ZHAO Z Y, LIU L Y, et al. Effect of extraction parameters on the yield of flavanones and polymethoxy flavones from citrus orange peel and antioxidant activity of the extract[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(1): 158–165.
- [23] 郑美瑜, 陆胜民, 夏其乐, 等. 柑桔多甲氧基黄酮的提取及纯化方法: 201110207429.4[P]. 2013–11–20.
- ZHENG M Y, LU S M, XIA Q L, et al. The method of extraction and purification of citrus polymethoxy flavone: 201110207429.4[P]. 2013–11–20.
- [24] 刘韶, 阳秀娟. 大孔树脂分离纯化陈皮中多甲氧基黄酮类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(10): 1562–1567.
- LIU S, YANG X J. Separation and purification of polymethoxylated flavones from orange peel using macroporous resin[J]. Nat Prod Res Dev, 2014, 26(10): 1562–1567.
- [25] 胡志军, 郝利君, 王南溪, 等. D-101 大孔吸附树脂分离纯化橘皮中的黄酮类物质[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 65–69.
- HU Z J, HAO L L, WANG N X, et al. Purification of crude total flavonoids extracted from citrus peel using D-101 macroporous adsorption resin[J]. Food Science, 2010, 31(8): 65–69.
- [26] 张文娟. 柑橘幼果功能成分提取分析及抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- ZHANG W J. Extraction and analysis on the functional components and antioxidant activity in young fruits citrus[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [27] 刘均玉. 橘皮的化学成分与黄酮类化合物的提取、纯化研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2011.
- LIU J Y. Study on chemicals of citrus peels and extraction and purification of flavonoids from them as well[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2011.
- [28] 陈源. 金柑等柑橘类果实黄酮类化合物提取、纯化及分离鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.

CHEN Y. Studies on extraction, purification, isolation and identification of flavonoids from citrus cul-

tivars fruit including *Fortunella crassifolia* swing[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2012.

The Synchronized Extraction and Purification of Glycoside Flavones and Polymethoxylated Flavones in Ponkan Peel

ZHENG Meiyu¹, GAO Pu¹, LU Shengmin¹, CAO Xuedan², XU Xiaozhong³

¹*Institute of Food Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021*

²*Zhejiang Citrus Research Institute, Taizhou 318026, Zhejiang*

³*Zhejiang Jinming Biotechnology Co., LTD, Quzhou 324014, Zhejiang*

Abstract Ponkan peel is rich in glycoside flavones and polymethoxylated flavones. To utilize adequately the two flavone, the synchronized extraction from ponkan peel was carried out, whose technology was optimized by single factor and orthogonal test, based on the the extraction rate of main flavonoid monomer of ponkan peel. The obtained crude extract was purified by the macroporous resin column chromatography. The results showed that the optimized extracting technology was a concentration of 60% ethanol, solid-liquid ratio (g/mL) of 1:40, extracting temperature of 75 °C and extracting time of 110 min, by which the total extracting ratio of seven flavones was (72.63±1.53) mg/g. Through the single factor experiment, the better purified conditions by the macroporous resin column chromatography were a loading sample volumn of 170 mL, loading sample mass concentration of 2.5 g/L in 30% ethanol solution, flow rate of 1 mL/min and elution concentration of 80% ethanol, under which the contents of hesperiding, nobiletin and tangeretin in purified extract were 4.6, 2.3, 1.45 folds of those of crude extract. Conclusion: The glycoside flavones and polymethoxylated flavones in ponkan peel were extracted synchronously at a higher extracting ratio, whose contents were enhanced further by the following purification by the macroporous resin column chromatography. The research results can provide the evidence and reference for the extraction of multiple flavones and comprehensive utilization of ponkan peel.

Keywords ponkan peel; glycoside flavones; polymethoxylated flavones; extraction; purification