

柚皮苷的溶剂热法提取及其抗氧化性、稳定性测定

唐 琴¹, 陈先勇¹, 宋 航²

(1.湖北民族学院化学与环境工程学院, 湖北 恩施 445000; 2.四川大学化工学院, 四川 成都 610065)

摘 要: 对柚皮中柚皮苷进行提取, 并测定其抗氧化和稳定性。以乙醇-水混合体系为溶剂, 对恩施特产贡水白柚皮中柚皮苷进行溶剂热法提取, 提取的柚皮苷用紫外吸收光谱定量测定。考察乙醇体积分数、柚皮粉粒度、填充度、提取温度及提取时间对柚皮苷提取率的影响。方法的回收率为96.51%~101.9%, 相对标准偏差小于0.16%。同时, 采用流动注射化学发光分析测定了柚皮苷的抗氧化性能, 并通过测定不同放置时间条件下样品溶液的紫外吸收光谱强度对柚皮苷的稳定性进行测定。结果表明, 该溶剂热法提取柚皮苷效率较高, 提取最佳工艺条件为乙醇体积分数70%、柚皮粉粒度120目、填充度80%、提取温度60℃和提取时间3h。提取出的柚皮苷具有较强的抗氧化性能和一定的稳定性。

关键词: 柚皮; 柚皮苷; 溶剂热法; 流动注射化学发光分析; 抗氧化性; 稳定性

Hot Solvent Extraction and Antioxidant Properties and Stability of Naringin from White Pomelo Peel

TANG Qin¹, CHEN Xian-yong¹, SONG Hang²

(1. College of Chemical and Environmental Engineering, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China;

2. College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Solvent-thermal method was applied for extracting naringin from shaddock peel of Enshi Gongshui (*Citrus grandis* Osbeck) using ethanol-water mixture as extraction solvent, and the naringin was determined by ultraviolet spectrophotometry. The recovery rate of naringin was from 96.51% to 101.9% with the relative standard deviation of less than 0.16%. The effects of extraction temperature, extraction time, ethanol concentration, shaddock peel powder size and filling factor on extraction rate of naringin were explored. The antioxidant activity and stability of naringin were investigated by flow-injection chemiluminescence and spectrophotometry. The results showed that the optimal process conditions were ethanol concentration of 70%, shaddock peel powder size of 120 mesh, filling factor of 80%, extraction temperature of 60 °C and extraction time of 3 h. The strong antioxidant activity and stability of naringin were simultaneously observed.

Key words: shaddock peel; naringin; solvent-thermal method; flow-injection chemiluminescence; antioxidant effect
中图分类号: O623.54 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)12-0287-05

柚皮苷是一种二氢黄酮类化合物, 主要存在于柑橘属植物的果皮和果实中, 而中果皮柚皮苷含量最高。研究表明, 柚皮苷不仅对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等有较高的抑菌活性, 而且是强效广谱的抗真菌药物^[1-2]。同时, 柚皮苷化合物具有抗氧化、抗癌、预防动脉粥样硬化以及增加其他药物利用度等重要生物活性^[3-6]。但由于柚皮苷等黄酮类化合物在人体内不能合成, 因此天然柚皮苷的研究与开发受到研究者们的高度关注, 其在药

物原料、保健食品以及生态学等领域的应用开发展现出广阔的发展前景^[7-9]。

溶剂热法是将物质与溶剂置于特制的密闭反应釜中, 使反应在相对较低的温度下进行的一种新型合成反应技术。由于体系中溶剂处于临界或超临界状态, 故反应活性高^[10-11]。目前溶剂热法广泛应用于材料制备领域, 但用该法提取柚皮中柚皮苷的研究还未见相关报道^[12-13]。恩施贡水白柚属恩施名优特产, 是优质耐贮柚

收稿日期: 2010-09-25

基金项目: 湖北省教育厅基金项目(B20082903); 四川省应用基础研究基金项目(04GY029-083-3)

作者简介: 唐琴(1977—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事天然产物及手性药物的开发应用研究。E-mail: tang_qiner@163.com

类新品种, 果皮中厚。但多以鲜食为主, 深加工程度低下, 占柚果总质量比重较大的中果皮未得到有效利用, 因此对白柚果皮中主要活性成分柚皮苷进行提取研究具有很高的经济利用价值^[14]。本实验以乙醇-水混合体系为溶剂, 对恩施特产白柚中层柚皮中柚皮苷的溶剂热法提取进行研究, 同时对相应柚皮苷的抗氧化性和稳定性进行测定, 旨在为柚皮苷的提取及应用提供一定的参考依据。

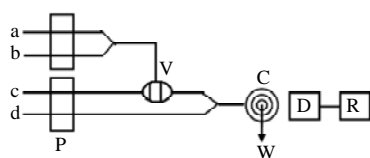
1 材料与试剂

1.1 材料与试剂

新鲜恩施贡水白柚中柚皮(白色海绵层), 50℃烘干至质量恒定后粉碎, 经 60、80、100、120、150 目筛网过筛后备用。柚皮苷标准品 中国药品生物制品检定所, 氢氧化钠、一缩二乙二醇、无水乙醇等试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

JJ-1 型精密增力电动搅拌机 常州澳华仪器有限公司; HHS-2S 型电热恒温水浴锅 上海跃华医疗器械厂; 101-1S 型数显式恒温干燥箱 上海跃进医疗器械厂; BS110S 型电子天平 上海天平仪器厂; UV-2550 型紫外分光光度计 日本岛津公司; 50mL 聚四氟乙烯内胆高压反应釜 江苏滨江正红塑料厂; IFFM-D 型流动注射化学发光仪(图 1) 西安瑞迈电子科技有限公司; RE52CS 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。



P. 蠕动泵; V. 进样阀; C. 流通池; W. 废液; D. 检测器; R. 记录仪。
a. 柚皮苷样品; b. 邻菲罗啉+Cu²⁺(碳酸盐缓冲液); c. H₂O; d. H₂O₂。

图 1 流动注射化学发光分析流程图

Fig.1 Schematic diagram of flow-injection chemiluminescence system

1.3 方法

1.3.1 紫外吸收曲线和标准曲线的绘制

用电子天平精确称取柚皮苷标准品 4.5mg 置 10mL 容量瓶中, 加二次蒸馏水定容后作为标准品贮备溶液。准确吸取柚皮苷标准品贮备液 1.0mL 置于 10mL 容量瓶中, 加二次蒸馏水定容作为柚皮苷标准品溶液备用。准确吸取该溶液 2.0mL 于 10mL 容量瓶中, 加入 90% 一缩二乙二醇 5mL 和 4mol/L 氢氧化钠溶液 0.1mL 后定容, 40℃ 恒温水浴放置 10min, 在 200~800nm 范围内扫描, 得到其最大吸收波长为 436nm^[15]。

准确吸取柚皮苷标准品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mL 于 10mL 容量瓶中, 分别加入 90% 一缩二乙二醇 5mL 和 4mol/L 氢氧化钠溶液 0.1mL 后定容, 在 40℃ 恒温水浴放置 10min, 在 436nm 处分别测定吸光度, 以质量浓度(ρ)与吸光度(A)绘制标准曲线。回归方程为: $Y=27.03X+0.0771$, $R=0.9981$, 线性范围为 0~0.0562mg/mL。

1.3.2 柚皮苷提取率的测定

分别精确称取备用中柚皮干粉 2g, 置于 50mL 不锈钢高压反应釜(聚四氟乙烯内胆)中, 在不同条件下用乙醇-水体系溶剂热法进行提取, 滤液旋转蒸发浓缩后(45℃)以去离子水定容至 250mL。取滤液 2mL, 依次加入 90% 一缩二乙二醇 5mL 和 4mol/L NaOH 溶液 0.1mL 后定容至 50mL, 测定样品溶液的紫外吸收光谱, 根据测得的试样吸光度(A)和标准曲线方程得试样质量浓度(ρ)/(mg/mL), 并计算提取率。同时, 通过测定不同放置时间条件下样品溶液的紫外吸收强度对柚皮苷稳定性进行测试研究。

$$\text{提取率}/\%=(\rho \times 3.125) \times 100$$

1.3.3 柚皮苷的抗氧化性能测定^[16]

采用流动注射化学发光分析测定柚皮苷的抗氧化性能: 取 50μL 4.0 × 10⁻⁴mol/L 邻菲罗啉、50μL 1.0 × 10⁻⁴mol/L Cu²⁺、0.80mL Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲溶液(pH10.57)和 50μL H₂O 的混合液置于干净小烧杯中, 并将烧杯放置于光电倍增管前, 由静态注射接口注入 50μL 0.27mol/L H₂O₂ 溶液, 测定化学发光信号(I_0), 另取 50μL 0.27mol/L H₂O₂ 溶液和 10mg/mL 柚皮苷样品混合溶液, 测定化学发光信号(I)。所有管路清洗干净后插入相应溶液中, 并控制流速均为 2.5mL/min。

$$\text{抑制率}/\%=(I_0 - I)/I_0 \times 100$$

2 结果与分析

2.1 各因素对柚皮苷提取率的影响

2.1.1 乙醇体积分数的影响

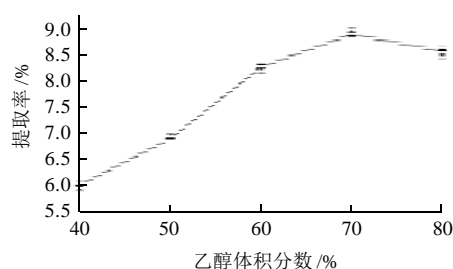


图 2 柚皮苷提取率与乙醇体积分数关系曲线

Fig.2 Relationship between extraction rate of naringin and ethanol concentration

以120目柚皮粉为原料,取填充度为80%,于60℃分别在不同乙醇体积分数条件下提取白柚中皮中柚皮苷3h,按照与标准品相同的方法显色后测定紫外吸收强度,根据标准曲线得到柚皮苷质量浓度。按照1.3.2节方法处理实验数据得乙醇体积分数与柚皮苷提取率的关系曲线,结果见图2。

由图2可知,当乙醇的体积分数太小时,原料溶解不完全,不能将所有的柚皮苷转移到浸提液中;而乙醇的体积分数太大时,则产生很大的渗透压,不利于柚皮苷的提取。因此,当乙醇体积分数小于70%时,柚皮苷提取率随着乙醇含量的升高而升高,乙醇体积分数达70%时提取率达到最大值,此时进一步提高乙醇含量提取率反而下降。实验中乙醇体积分数取70%较为适宜。

2.1.2 柚皮粉粒度的影响

取填充度为80%,在60℃条件下用70%乙醇分别提取不同粒度白柚中皮中柚皮苷3h,按照与标准品相同的方法显色后测定紫外吸收强度,根据标准曲线得到柚皮苷质量浓度。按照1.3.2节方法处理实验数据得柚皮粉粒度与柚皮苷提取率的关系曲线,结果如图3所示。

图3表明,当柚皮粉粒度在60~150目时,由于柚皮粉颗粒越小,比表面积越大,在溶剂中溶解能力越强,柚皮苷提取液浓度随着其粒度的增大而增加,提取率增大,当柚皮粉粒度增至120目以上时,柚皮苷溶解程度随粒度变化已不明显。从经济角度考虑,实验中选取柚皮粉粒度为120目。

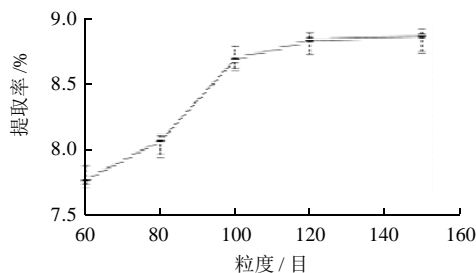


图3 柚皮苷提取率与粒度关系曲线

Fig.3 Relationship between extraction rate of naringin and shaddock peel powder size

2.1.3 填充度的影响

以120目柚皮粉为原料,取提取温度为60℃,分别在不同填充度条件下用70%乙醇提取白柚皮中柚皮苷3h,按照与标准品相同的方法显色后测定紫外吸收强度,根据标准曲线得到柚皮苷质量浓度。按照1.3.2节方法处理实验数据得填充度与柚皮苷提取率的关系曲线,结果如图4所示。

从图4可知,当填充度在50%~80%时,柚皮苷提取率随着填充度的增大而增大;当填充度在80%~

90%时,提取率随着填充度的增大而减小。实验选取填充度为80%较为适宜。

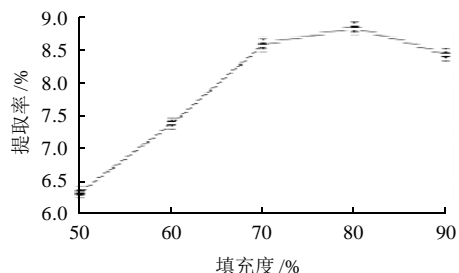


图4 柚皮苷提取率与填充度关系曲线

Fig.4 Relationship between extraction rate of naringin and filling factor

2.1.4 提取温度的影响

以120目柚皮粉为原料,取填充度为80%,用70%乙醇在不同提取温度条件下分别提取白柚中皮中柚皮苷3h,按照与标准品相同的方法显色后测定紫外吸收强度,根据标准曲线得到柚皮苷质量浓度。按照1.3.2节方法处理实验数据得提取温度与柚皮苷提取率的关系曲线,结果如图5所示。

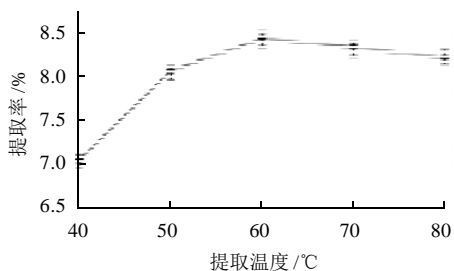


图5 柚皮苷提取率与提取温度关系曲线

Fig.5 Relationship between extraction rate of naringin and extraction temperature

从图5可知,提取温度对柚皮苷的提取效率有显著影响。随着温度的升高,柚皮苷在乙醇-水溶剂中的溶解度逐渐增加,提取液中柚皮苷浓度逐渐增大,提取率增加。当温度升至60℃时,提取液中柚皮苷含量达到极大值,继续升高温度,柚皮苷提取率略有下降,这可能是源于高温下柚皮苷出现一定程度的分解损失所致。实验取60℃为最佳提取温度。

2.1.5 提取时间的影响

以120目柚皮粉为原料,取填充度为80%,用70%乙醇于60℃在不同提取时间条件下分别提取白柚皮中柚皮苷,按照与标准品相同的方法显色后测定紫外吸收强度,根据标准曲线得到柚皮苷质量浓度。按照1.3.2中方法处理实验数据得提取时间与柚皮苷提取率的关系曲线,结果见图6。

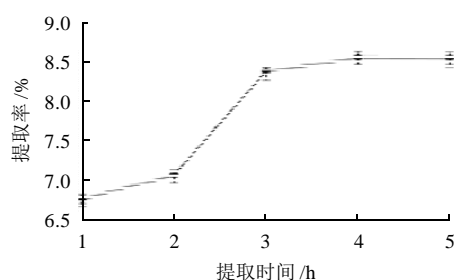


图6 柚皮苷提取率与提取时间关系曲线

Fig.6 Relationship between extraction rate of naringin and extraction time

从图6可以看出,当提取时间小于3h时,随着时间的延长,柚皮苷在该乙醇-水混合溶剂体系中溶解程度逐渐增大,提取液中柚皮苷质量浓度不断增加,提取率增大;当时间大于3h时,由于柚皮苷在该溶剂体系中溶解已达饱和,柚皮苷提取液质量浓度上升趋于平缓,提取率无明显改变。实验中提取时间控制在3h较为适宜。

研究表明:以120目柚皮粉为原料,于填充度80%条件下,用70%乙醇在60℃提取3h所得柚皮苷含量最大,提取率最高。在此最优工艺条件下进行柚皮苷的提取实验,提取率达8.829%。

2.2 柚皮苷的抗氧化性能测试

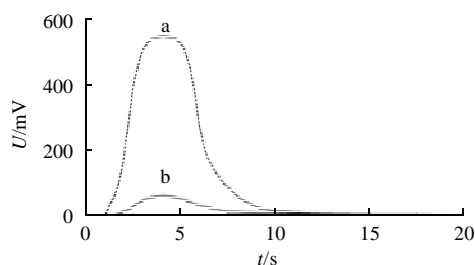
a.邻菲罗啉+Cu²⁺+H₂O₂; b.柚皮苷+邻菲罗啉+Cu²⁺+H₂O₂。

图7 化学发光动力学曲线

Fig.7 Kinetic curve of chemiluminescence reaction

取2.1节所得最佳工艺条件下提取的柚皮苷,配制样品质量浓度为10.00mg/mL,在缓冲溶液pH10.57、H₂O₂ 0.27mol/L、Cu²⁺ 1.0 × 10⁻⁴mol/L以及邻菲罗啉浓度4.0 × 10⁻⁴mol/L条件下^[16],进行流动注射化学发光分析实验,抑制率达95.6%,说明该柚皮苷具有较强的抗氧化能力。柚皮苷样品的化学发光分析动力学曲线如图7所示。

2.3 柚皮苷稳定性能的测定

取2.1节所得最佳工艺条件下提取的柚皮苷,按照绘制吸收曲线时配制相同的方法配制柚皮苷样品溶液进行稳定性实验。每组平行测定3次,结果取其平均值,实验结果见表1。

表1 柚皮苷的稳定性

Table 1 Stability of naringin

放置时间/h	1	2	3	4	5
吸光度	0.8828	0.8831	0.8824	0.7912	0.6896

表1表明:样品放置3h后测得其吸光度不变。这说明该柚皮苷样品具有较强的稳定性。

2.4 回收率及方法精密度测定

按最佳提取条件制备5个不同质量浓度的样品,按标准加入标准品柚皮苷,按照与标准品相同的方法显色后测定吸光度,求得回收率、标准偏差及相对标准偏差,结果见表2、3。

表2 方法精密度

Table 2 Precision of the analytical method

序号	质量浓度/(μg/mL)				变异系数/%
	取样	测量值(n=9)	平均值	标准偏差	
1	6.000	5.924~5.947	5.939	0.009203	0.1550
2	9.600	9.674~9.697	9.687	0.008843	0.09130
3	13.20	13.11~13.15	13.13	0.01673	0.1274
4	16.80	16.80~16.85	16.82	0.01924	0.1143
5	20.40	20.37~20.42	20.40	0.02073	0.1017

表3 方法回收率

Table 3 Recovery rate of the analytical method

序号	质量浓度/(μg/mL)				回收率/%
	样品量	加标量	理论值	实测值	
1	5.306	5.000	10.306	9.946	96.51
2	10.612	5.000	15.612	15.434	98.86
3	15.918	5.000	20.918	21.315	101.9

由表2、3可以看出本方法回收率为96.51%~101.9%,变异系数小于0.16%,方法的准确度与精密度均较高。

3 结论

以乙醇-水混合溶剂体系溶剂热法提取恩施贡水白柚中柚皮中柚皮苷,用紫外吸收光谱法测定所提取柚皮苷质量浓度。实验确定该溶剂热法提取柚皮苷的最佳工艺条件为:乙醇体积分数70%、柚皮粉粒度120目、填充度80%、提取温度60℃、提取时间3h。在最优工艺条件下柚皮苷的提取率为8.829%。这说明该溶剂热法提取柚皮苷效率较高,又由于该方法操作简单、快速、安全、经济、环保,且方法的准确度与精密度均可满足实际工作的需求,可用于其他同类柚皮产品中柚皮苷的提取。同时,流动注射化学发光分析和稳定性研究结果表明,提取出的柚皮苷具有较强的抗氧化性能和一定的稳定性。

参考文献:

- [1] NEGI P S, JAYAPRAKASHA G K. Antibacterial activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extract[J]. Eur Food Res Technol, 2001, 213(6): 484-487.
- [2] 李春美, 杜靖, 谢笔钧. 柚皮提取物的抑菌作用[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(1): 38-41.
- [3] 裴凌鹏, 惠伯棣, 金宗濂, 等. 黄酮类化合物的生理活性及其制备技术研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 203-207.
- [4] 杨宏亮, 田珩, 李沛波, 等. 柚皮苷及柚皮素的生物活性研究[J]. 中药材, 2007, 30(6): 752-754.
- [5] YEUM C H, CHOI J S. Effect of naringin pretreatment on bioavailability of verapamil in rabbits[J]. Archives of Pharmacol Research, 2006, 29(1): 102-107.
- [6] 杨冉, 屈凌波, 陈晓岚, 等. 柚皮素、柚皮苷与溶菌酶相互作用的荧光光谱法研究[J]. 化学学报, 2006, 64(13): 1349-1354.
- [7] YU Jun, DANDEKAR D V, TOLEDO R T, et al. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds[J]. Food Chemistry, 2007, 105(3): 1026-1031.
- [8] WONG R W K, RABIE A B M. Effect of naringin collagen graft on bone formation[J]. Biomaterials, 2006, 27(18): 1824-1831.
- [9] 吴琼英, 贾俊强. 柚皮黄酮的超声辅助提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 29-33.
- [10] 徐如人, 庞文琴. 无机合成与制备化学[M]. 北京: 高教出版社, 2001: 129.
- [11] MONTES-HERNANDEZ G, FERNANDEZ-MARTINEZ A, CHARLET L, et al. Textural properties of synthetic nano-calcite produced by hydrothermal carbonation of calcium hydroxide[J]. Journal of Crystal Growth, 2008, 310(29): 2946-2953.
- [12] 田振芬, 宋天佑, 范勇, 等. 一维链状硫酸钡的溶剂热合成与表征[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(3): 446-449.
- [13] 陈先勇, 唐琴, 胡卫兵. 以废弃磷石膏为原料水热合成碳酸钙晶须的研究[J]. 环境工程学报, 2008, 12(2): 1677-1680.
- [14] 郑小江, 吕宗浩, 李求文. 优质耐贮柚类新品种贡水白柚[J]. 园艺学报, 2002, 29(4): 396.
- [15] 贾冬英, 姚开, 谭敏, 等. 柚皮中柚皮苷的乙醇提取工艺研究[J]. 中草药, 2002, 33(9): 801-802.
- [16] 唐蕊. 流动注射化学发光分析法测定天然产物中黄酮类化合物的抗氧化性[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2006.