

Optimization of the Extraction Process for Naringin from Dried Citrus Reticulata

Junsong Yang Feng Li Yingying Zhong*

Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong, 526061, China

Abstract

Naringin is an important natural flavonoid compound with significant applications in various fields. This study aims to explore the optimal extraction process for naringin. Using dried Citrus grandis (pomelo) as the sample, the research investigated the extraction of naringin from citrus fruit peels via ultrasound-assisted ethanol extraction. Single-factor experiments were conducted to examine the effects of ethanol concentration, liquid-to-solid ratio, and ultrasonic time on the extraction yield of naringin. The results showed that the highest extraction rate was achieved under the following conditions: ethanol concentration of 50%, liquid-to-solid ratio of 25:1, and ultrasonic time of 30 min. Subsequently, response surface methodology (RSM) was employed to further optimize the extraction process based on the single-factor experiments. The theoretically optimal extraction parameters were determined as follows: ethanol concentration of 51.87%, liquid-to-solid ratio of 26.62:1, and ultrasonic time of 30.66 min, yielding an extraction rate of 7.61%. To validate these results, verification experiments were performed under adjusted conditions ethanol concentration of 52%, liquid-to-solid ratio of 27:1, and ultrasonic time of 31 min, achieving an extraction rate of 7.46%, which closely matched the predicted value. This indicates a high degree of fit between the model and the actual data. The proposed extraction method is simple and practical, providing a valuable reference for the further development and utilization of citrus peels.

Keywords

Naringin; Dried Citrus grandis(pomelo); Extraction Process; Single-factor experiments; Response surface

橘红干果中柚皮苷的提取工艺研究

杨俊松 李峰 钟颖颖*

肇庆学院, 中国 · 广东 肇庆 526061

摘 要

柚皮苷是一类重要的天然黄酮化合物, 在多个领域有着重要作用, 本研究旨在探究柚皮苷的最佳提取工艺。本研究以橘红干果为样品研究柑橘类果实外皮的柚皮苷提取工艺, 采用超声辅助乙醇提取法, 通过单因素实验研究了乙醇浓度、液料比、超声时间对柚皮苷得率的影响, 结果表明乙醇浓度为50%、液料比为25:1、超声时间为30min时柚皮苷得率最高。随后, 在单因素试验基础上结合响应面法进一步优化提取工艺, 得最佳理论提取参数为: 乙醇浓度51.87%、液料比26.62:1、超声时间30.66min, 得率为7.61%。在该理论最佳提取参数下, 我们选择乙醇浓度52%、液料比27:1、超声时间31min条件做了验证实验, 在此条件下得到得率为7.46%与预测值7.61%接近, 该结果表明模型与实际数据拟合程度高。总之, 该工艺的操作简单, 可为柑橘类果皮进一步开发利用提供一定的借鉴。

关键词

柚皮苷; 橘红干果; 提取工艺; 单因素; 响应面法

【基金项目】广东省区域联合基金—青年基金项目(项目编号: 2023A1515110754); 2024 肇庆学院高层次项目(项目编号: 504/2024012220); 广东省教育厅科研项目(项目编号: 2020ZDZX2045); 肇庆学院博士启动基金项目(项目编号: 611/230054)。

【作者简介】杨俊松(1996-), 男, 中国广东潮州人, 硕士, 助理实验师, 从事食品中功能性成分的提取及活性研究。

【通讯作者】钟颖颖(1995-), 女, 中国广东梅州人, 博士, 讲师, 从事食品质量与安全检测研究。

1 引言

柚皮苷是一种存在于芸香科植物柚果实、葡萄柚、橘、橙的果皮和果肉中的双氢黄酮类化合物。已有研究证明它具有抗氧化、保护心血管、抗炎和抗肿瘤等多种生物学功效。化橘红是一种橘类水果, 产自中国南方, 尤其在广东和福建等地。李时珍在《本草纲目》中记载:“橘红佳品, 其瓤内有红白之分, 利气、化痰、止咳功倍于它药, 其功愈陈愈良”。化橘红中含有多糖、黄酮、香豆素和挥发油等活性物质, 其中, 柚皮苷是其指标性成分。因此, 优化化橘红中柚皮苷的提取工艺可提高其得率和纯度, 可为开发新型药物或功能性食品提供原料基础。

目前,柚皮苷的提取方法主要包括溶剂提取法、酸碱水解法、微波提取法、超声波辅助提取法及酶解法等。其中,溶剂提取法传统且常用,但提取效率低,耗时长,且需要大量溶剂。酸碱水解法可以通过调节 pH 值促进柚皮苷释放,但需严格控制条件,避免副产物生成。酶解法温和且选择性强,但成本相对较高,工艺复杂。微波提取法耗时短、溶剂用量较少,黄酮得率高,但也存在溶剂选择受限,设备成本高等缺点。超声波辅助提取法能有效提高提取效率,缩短提取时间,减少溶剂用量。

综上所述,本研究拟采用超声波辅助乙醇提取法对橘红干果中的柚皮苷进行提取,并采用单因素结合响应面法优化柚皮苷提取条件,以提高橘红干果中柚皮苷的提取效率和纯度。该研究具有一定的药用开发价值,可为开发新型药物或功能性食品提供原料基础。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

CR-060S 型超声波清洗机,深圳市春霖清洗设备有限公司产品;HBS-ScanY 型全波长酶标分析仪,南京德铁生物科技有限公司产品;ATY124 型电子天平,日本岛津(Shimadzu)公司产品;DF-101S 型集热式磁力搅拌器,上海力辰邦西仪器科技有限公司产品;1000 C 型多功能粉碎机,东莞市房太电器有限公司产品;SFG-02B.400 型电热恒温鼓风干燥箱,湖北恒丰医疗制药设备有限公司产品^[1]。

2.2 材料与试剂

96 孔板购自上海晶安生物科技有限公司;蒸馏水购自肇庆鼎湖飘雪山泉水公司;化橘红购自安徽省同新堂健康产业有限公司;氢氧化钠购自上海阿拉丁试剂公司;柚皮苷、二乙二醇购自上海麦克林生化科技股份有限公司;无水乙醇购自天津市百世化工有限公司。

2.3 实验方法

2.3.1 原料预处理

将橘红样品放在恒温鼓风干燥箱中,在 50 ℃条件下干燥至质量不再减少,干燥后的橘红样品放入多功能粉碎机中打成粉末,过筛得到橘红粗粉,干燥保存备用。

2.3.2 溶液的制备

4 mol/L NaOH 水溶液:称取 32.0 g NaOH 固体,加适量蒸馏水将其溶解,待恢复室温后,转移至 200 mL 容量瓶用蒸馏水定容至 200 mL。

柚皮苷标准溶液:取 16 mg 柚皮苷标准品用无水乙醇定容至 100 mL 得到 16 mg/mL 的柚皮苷标准溶液。

2.3.3 柚皮苷标准曲线的绘制

分别取 0、20、40、60、80、100、120 μL 的柚皮苷标准溶液,分别加入 500 μL 90% 的二甘醇和 10 μL 4mol/L 的氢氧化钠溶液,用蒸馏水定容至 1 mL,得到浓度为 3.2、6.4、9.6、12.8、16、19.2 μg/mL 的柚皮苷溶液。随后在 40 ℃中水浴保温 10 min。冷却后往 96 孔板中加入 300 μL 上

述不同浓度柚皮苷溶液,并用酶标仪在 420 nm 处测定不同浓度的柚皮苷溶液的吸光度。以柚皮苷的浓度作横坐标、对应的吸光度作纵坐标,用 origin 拟合得到柚皮苷标准曲线。

2.3.4 单因素优化

通过查阅和分析总结文献我们发现乙醇浓度、液料比、超声时间这三个因素对柚皮苷得率的影响比较显著^[4-7],因此选择乙醇浓度、液料比、超声时间这三个因素来探究。具体操作如下:称取 0.1 g 橘红粉末,以不同浓度(40%、50%、60%、70%、80%)的乙醇溶液作为提取液,液料比为 15:1、20:1、25:1、30:1、35:1 (mL/g),在 40 ℃下超声提取不同时间(10、20、30、40、50 min)。然后进行抽滤,去滤渣,滤液用对应浓度的乙醇定容到 5 mL。接着取 10 μL 提取液,分别加入 500 μL 90% 的二乙二醇和 10 μL 4 mol/L 的氢氧化钠溶液,用蒸馏水定容至 1 mL。然后将上述溶液在 40 ℃中水浴保温 10 min。最后,取 300 μL 显色后的提取液加入 96 孔板中并用多功能酶标仪在 420 nm 处测定其吸光度,并计算其得率。

2.3.5 响应面实验

考虑到各个因素之间的交互作用,为避免局部最优条件,得出更系统合理的最优方案,因此我们进行了中心复合设计,以单因素试验中柚皮苷得率最高值对应的变量值作为中心值,以中心值临近两端的变量作为最高值和最低值来设计表 1。

表 1 响应面的因素水平设计

因素	水平		
	-1	0	1
乙醇浓度/% A	40	50	60
液料比/(mL/g) B	20:1	25:1	30:1
超声时间/min C	20	30	40

响应面法优化具体步骤:通过软件 Design-Expert 13 按表 3 设计响应面实验,通过响应面结果分析得出乙醇浓度、液料比、提取时间三者对柚皮苷得率的影响程度。此外,通过响应曲面分析三个因素之间两两交互作用,从而进一步分析结果得出最终的理论最佳方案。

2.3.6 最佳方案的可行性验证

在上述最佳理论方案的条件下,设置三组平行实验。通过比较最佳方案和各组实验柚皮苷得率的大小以及最佳方案的残差来判断最佳方案是否可行^[2]。

3 结果与讨论

3.1 柚皮苷标准曲线

为了后续试验可以得到准确的数据,我们制作了柚皮苷的标准曲线。将柚皮苷的浓度作为横坐标,吸光度作为纵坐标,绘制了如图 1 所示标准曲线,该标准曲线的回归方程为 $y = -0.01124 + 0.02286 x$,线性相关系数 $R^2 = 0.9989$,其线性范围为 0~19.2 μg/mL。

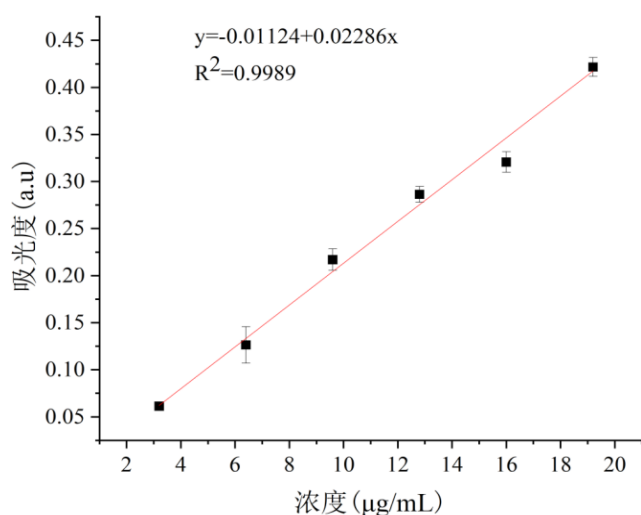


图1 柚皮苷标准曲线

3.2 单因素优化结果

由图2a可知,在乙醇浓度小于50%时,柚皮苷得率随

乙醇浓度的增加而提高,当乙醇浓度大于50%时,柚皮苷得率随着乙醇浓度的增加而降低。造成这种现象的原因可能是因为随着乙醇浓度的增加,蛋白质等大分子会在乙醇溶液中发生聚集,使柚皮苷扩散的阻力增加,从而导致柚皮苷的得率降低。因此,乙醇浓度为50%时提取效果最佳。由图2b可知,当液料比小于25:1时,柚皮苷得率较低,这可能由于柚皮苷溶解不充分导致柚皮苷含量较低的缘故。液料比在25:1时,柚皮苷得率最大,为6.87%。而当液料比大于25:1时,随着液料比的逐渐增大,提取液中柚皮苷的含量下降,这可能是因为溶剂量的增加会使其他物质溶出加剧,从而抑制柚皮苷的提取。因此,液料比为25:1提取效果最佳。由图2c可知,当超声时间在10~30 min时,柚皮苷的得率随着超声时间的增加而增加;而当超声时间继续延长时,柚皮苷的得率随着时间的增加而降低,这可能是由于超声时间过长,导致提取出来的柚皮苷遭到破坏所导致的。因此,超声时间为30 min提取效果最佳。

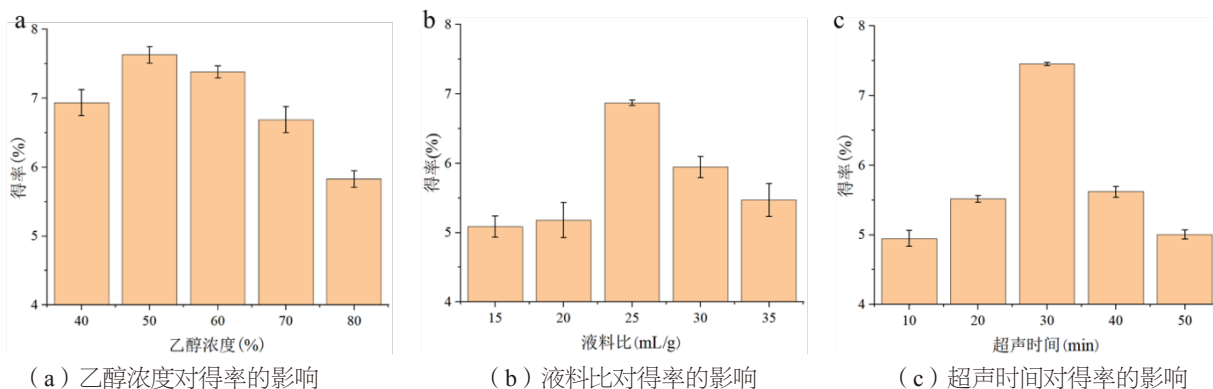


图2 不同溶液浓度对得率的影响

3.3 响应曲面分析

考虑到各个因素之间的交互作用,为避免局部条件最优,所以使用响应面法对工艺进行进一步优化。

3.3.1 响应面试验方案及二次方程模型的确立

通过中心复合设计对上述三个因素进行系统的优化,选取单因素实验中最高得率对应变量值作为中心点,以中心点邻近两端的变量值作为高低值,得如表2的试验方案^[3]。

使用 Design-Expert 13 软件对表2分析可得如下二次回归方程: $Y = 7.50 + 0.3053A + 0.5003B + 0.0182C - 0.2479AB + 0.1039AC + 0.2716BC - 0.6204A^2 - 0.7298B^2 - 0.9431C^2$ 。

通过比较上述二次回归方程中因素A、B和C的一次项系数的绝对值大小 ($0.5003 > 0.3053 > 0.0182$), 可得在试验范围内各因素对柚皮苷得率的影响程度为 $B > A > C$, 即液料比 > 乙醇浓度 > 超声时间。

3.3.2 方差分析及结果

对表2数据进行方差分析得表3。根据表3数据可知,整体模型的 $P < 0.001$, 表明该模型达到极显著水平; 失拟项的 $P = 0.3915$, 远大于0.05, 表明该模型的误差小, 可靠性高; $R^2 = 0.9779$, $R^2_{adj} = 0.9496$, 证明该模型与实验适配性强, 可用于对柚皮苷提取条件的优化分析预测。

此外, 根据表3还可以发现, 乙醇浓度(A)、液料比(B)的一阶项及其二阶项 A^2 、 B^2 、 C^2 均显示出极高的显著性 ($P < 0.01$)。这表明, 乙醇浓度、液料比以及它们各自的交互作用, 连同超声时间的自交互效应, 对柚皮苷提取效率具有决定性影响。乙醇浓度与液料比的交互效应(AB)以及液料比与超声时间的交互效应(BC)均通过显著性检验, 其P值均低于0.05, 说明这两个交互因素对柚皮苷提取效率具有重要影响。相比之下, 超声时间(C)及其与乙醇浓度的交互作用(AC)未达到显著水平, 其P值均超过0.05, 表明这两个因素对柚皮苷得率的影响较小。

表2 响应面实验方案

实验号	因素			柚皮苷得率/%
	A	B	C	
1	-1	0	-1	5.79
2	0	-1	1	5.01
3	0	-1	-1	5.62
4	0	0	0	7.30
5	0	1	-1	6.10
6	0	0	0	7.32
7	0	0	0	7.70
8	0	0	0	7.57
9	1	-1	0	6.33
10	1	0	-1	5.95
11	0	0	0	7.63
12	-1	-1	0	4.99
13	1	0	1	6.30
14	0	1	1	6.58
15	-1	1	0	6.46
16	1	1	0	6.81
17	-1	0	1	5.71

表3 方差结果分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.0247	9	0.0027	34.47	<0.0001	**
A	0.0016	1	0.0016	19.61	0.0031	**
B	0.0042	1	0.0042	52.66	0.0002	**
C	5.556E-06	1	5.556E-06	0.0699	0.7991	
AB	0.0005	1	0.0005	6.46	0.0385	*
AC	0.0001	1	0.0001	1.14	0.3220	
BC	0.0006	1	0.0006	7.76	0.0271	*
A ²	0.0034	1	0.0034	42.62	0.0003	**
B ²	0.0047	1	0.0047	58.96	0.0001	**
C ²	0.0078	1	0.0078	98.46	<0.0001	**
残差	0.0006	7	0.0001			
失拟项	0.0003	3	0.0001	1.29	0.3915	
纯误差	0.0003	4	0.0001			
总变异	0.0252	16				
R ²	0.9779					
R ² _{adj}	0.9496					

注：P>0.05 为不显著；P<0.05 为显著；P<0.01 为极显著

3.3.3 最佳工艺验证

为了验证模型预测的得率是否符合实际，因此对软件预测的条件进行验证。Design-Expert 13 软件预测的柚皮苷最佳提取工艺条件为：乙醇浓度 51.87%，液料比 26.62 : 1 (mL/g)，超声时间 30.66 min，柚皮苷得率为 7.61%。为了实验操作的简洁性和可行性，确定提取条件为乙醇浓度 52%，液料比 27:1 (mL/g)，超声时间 31 min，重复三次实验，得到的平均得率为 7.46%，与预测值接近，RSD 值为 0.76%，数据满足评价指标要求^[4]。

表4 验证试验

试验号	1	2	3	平均值
得率/%	7.49	7.49	7.39	7.46

4 结论

本研究通过超声辅助乙醇提取技术，探究了乙醇浓度、液料比及超声时间对柚皮苷得率的影响。单因素试验表明，乙醇浓度为 50%、液料比为 25 : 1，超声时间为 30min，柚皮苷的得率最高。在此基础上，采用 Design-Expert 13 软件优化提取工艺，得出最佳参数：乙醇浓度 52%，液料比 27 : 1 (mL/g)，超声时间 31min。为验证理论最优条件的实际效果，本研究对橘红干果进行了提取实验。实验数据表明，柚皮苷的提取效率达到 7.46%，与预测值 7.61% 高度吻合，充分证实了模型的有效性。该研究结果表明这个方法可为将来进一步开发利用柑橘果皮提供借鉴。

参考文献

- [1] 胡宇, 马洁, 金星鹏, 等. 葡萄柚柚皮苷提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 广州化工, 2024, 52(03): 76-80.
- [2] 王丽, 李洁凡, 韩学定. 化橘红: 化痰止咳[J]. 药物与人, 2024, (10): 59-61.
- [3] 李锦坤, 金刚亮, 王艳慧, 等. 化橘红提取物的制备工艺优化及其降脂作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 250-258.
- [4] 胡辰, 廖禹东. 超声辅助下江枳壳柚皮苷提取工艺的优化[J]. 食品安全导刊, 2024, (28): 110-113.