

乙醇/磷酸氢二钾双水相同步萃取脐橙果皮中黄酮和果胶

胡金梅¹, 许斯琪¹, 黄茜², 周林^{2*}

(1. 广东环境保护工程职业学院, 佛山 528216; 2. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广州 510006)

摘要: **目的** 采用乙醇/磷酸氢二钾双水相体系同步分离脐橙皮中的黄酮和果胶。**方法** 以脐橙果皮为原料, 通过单因素实验和响应面实验对双水相萃取条件进行优化, 分析了双水相体系乙醇体积分数、磷酸氢二钾质量浓度、萃取温度对黄酮和果胶提取率的影响。**结果** 乙醇/磷酸氢二钾双水相体系能同时分离脐橙果皮中的黄酮和果胶, 其中上相为黄酮类化合物, 下相经脱盐、热水浸提和乙醇沉淀后获得果胶。最佳提取条件为: 乙醇体积分数 35%, 磷酸氢二钾质量分数为 18%, 萃取温度为 78 °C, 此条件下的果胶得率为(8.35±0.09)%, 黄酮得率为(3.32±0.08)%。**结论** 本研究建立了乙醇/磷酸氢二钾双水相体系同步分离脐橙果皮中黄酮和果胶的方法, 具有工艺简单、提取率高的优点, 为脐橙果皮的综合利用和开发提供了可供参考的思路和技术手段。

关键词: 双水相萃取; 响应面分析; 黄酮类化合物; 果胶

Simultaneous extraction of flavonoids and pectin from navel orange peel by ethanol/dipotassium hydrogen phosphate aqueous two-phase system

HU Jin-Mei¹, XU Si-Qi¹, HUANG Qian², ZHOU Lin^{2*}

(1. College of Guangdong Polytechnic of Environmental Protection Engineering, Foshan 528216, China;
2. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: Objective To separate the flavonoids and pectin of navel orange peel by ethanol/dipotassium hydrogen phosphate aqueous two-phase system synchronously. **Methods** The aqueous two-phase system conditions were optimized by single-factor experiment and response surface experiment, and the effects of ethanol volume fraction, dipotassium hydrogen phosphate mass fraction and extraction temperature on the extraction rate of flavonoids and pectin were studied. **Results** The flavonoids and the pectin could be separated by the ethanol/dipotassium hydrogen phosphate aqueous two-phase system, the upper phase was flavonoids, while the lower phase was pectin after desalting, hot water extraction and ethanol precipitation. The optimal extraction conditions were as follows: Ethanol volume fraction of 35%, dipotassium hydrogen phosphate mass fraction of 18%, and the extraction temperature of 78 °C, under these conditions, the extraction yield of the pectin and the flavonoids were (8.35±0.09)% and (3.32±0.08)%, respectively. **Conclusion** The ethanol/dipotassium hydrogen phosphate aqueous two-phase system can simultaneously separate flavonoids and pectin from navel orange peel, which is characterized with the advantages of simple separation process and high yield, which provides reference ideas and technical means

基金项目: 广东环境保护工程职业学院院长基金项目(K650418122012)

Fund: Supported by the College of Guangdong Polytechnic of Environmental Protection Engineering (K650418122012)

*通信作者: 周林, 博士, 副教授, 主要研究方向为生物活性物质制备及其功能。E-mail: zhoulin@gdpu.edu.cn

*Corresponding author: ZHOU Lin, Ph.D, Associate Professor, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China. E-mail: zhoulin@gdpu.edu.cn

for the comprehensive utilization and development of navel orange peel.

KEY WORDS: aqueous two-phase system; response surface experiments; flavonoids; pectin

0 引言

我国是全球第一大水果生产国,人均占有量和消费量也位居世界前列,据国家统计局数据,2020 年我国水果产量为 28692.4 万 t,水果需求量达到 28956 万 t^[1]。但是我国水果深加工的发展相对滞后,90%以鲜销为主,果皮大部分被废弃。柑橘是我国种植面积最大、产量最多的水果。数据显示,2018 年我国柑橘总产量达到 4138.14 万 t,首次成为我国第一水果作物;2019 年我国柑橘种植面积和总产量分别达到 3925.95 万亩和 4584.54 万 t,均居世界第 1 位;2020 年由于疫情以及北半球干旱天气的影响,我国柑橘总体种植面积和产量都有所下降,分别为 3800 万亩及 3560 万 t,但仍位居世界第一^[2]。现代科学研究表明,柑橘果皮所含有的营养成分除氨基酸外均高于其果肉中的含量,如黄酮化合物、果胶、天然色素、柠檬烯等物质^[3-5]。其中,黄酮类物质具有抗氧化、抗衰老等多种生物活性和很高的药用价值^[6-7];果胶具有良好的乳化、胶凝、抗癌、抗腹泻等作用^[8-9]。因此,利用我国丰富的柑橘资源,提取果皮中的黄酮类活性物质和果胶,具有良好的经济和社会价值。

目前黄酮类化合物提取的方法主要有水提法、有机溶剂回流提取法、碱提酸析法等^[10-11];果胶提取的方法主要有酸提法、碱提法、酶法、微生物法、超声波辅助提取法等^[12-13]。传统提取方法工艺简单、成本低,但存在着明显的缺陷,如提取率低、周期长、溶剂消耗大、纯度低等问题。双水相萃取技术是通过溶质在互不相溶的两个水相中的分配系数差异进行分离的技术。双水相萃取技术具有生物相容性好、目标产物活性损失少、操作条件温和、设备简单等特点,已广泛应用于黄酮、色素、多糖等活性物质的提取^[14-16]。

为了最大化利用柑橘果皮中的活性物质,本研究采用双水相萃取技术同步提取果皮中的黄酮类化合物和果胶。由于黄酮类化合物溶于乙醇,且大多具有酚羟基,可以用碱性水或碱性稀醇浸出^[17],果胶也可以用碱性水提取,因此采用乙醇和溶于醇的弱碱性盐作为双水相体系。由于磷酸氢二钾的水溶性呈微碱性、且微溶于醇,能够稳定分相,故选用磷酸氢二钾作为盐相。本研究以脐橙为原料,通过单因素实验和响应面实验对双水相萃取条件进行优化,考察乙醇体积分数、磷酸氢二钾质量分数、萃取温度对黄酮化合物和果胶提取率的影响,以期为脐橙果皮资源的高值化利用提供可供借鉴的技术方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脐橙:赣南脐橙,中果:横径(6.0±0.50) cm,佛山南海农贸市场采购。

磷酸氢二钾、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、95%乙醇(分析纯,广州化学试剂有限公司);芦丁对照品(含量≥98%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

Bruker Tensor II 傅里叶红外光谱(德国布鲁克仪器有限公司);UV-1800 分光光度计(日本岛津仪器有限公司);KQ-300V 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司);GZX.9140MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);FSJ-A03D1 型粉碎机(广东佛山小熊电器股份有限公司);雷磁 PHS-3C 酸度计(上海精密科学仪器厂);AnkiTDL 离心机(上海安亭科学仪器);HH-1 恒温水浴锅(深圳三方圆生物科技股份有限公司);JB-12 雷磁磁力搅拌(上海精密科学仪器厂);FA2004B 分析天平(上海佑科仪器仪表有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 原材料的处理

选用新鲜的脐橙,清水洗涤干净,用刀将底部切开小口,剥皮,将果皮切成小块后用搅拌机打碎成细碎渣,备用。

1.3.2 乙醇/盐双水相体系建立

在双水相提取过程中,要避免在强碱下加热时破坏黄酮类化合物^[17]和果胶的水解,而碱性过低则提取不完全。由于磷酸氢二钾的水溶性呈微碱性、且微溶于乙醇,因此选用了乙醇/磷酸氢二钾作为双水相体系。通过预实验发现,乙醇和磷酸氢二钾的浓度在一定范围内才能形成稳定的分相体系,乙醇浓度过高,盐不易溶解;乙醇和盐的浓度过低,不能形成分相体系。因此,本实验采用单因素法分别考察在形成稳定分相体系下,乙醇、磷酸氢二钾的浓度、萃取温度等因素对柑橘果皮中总黄酮和果胶萃取得率的影响,确定最佳双水相萃取条件。

称取适量磷酸氢二钾,加 50 mL 水搅拌溶解,加入一定体积的 95%乙醇,再加水至 100 mL,混匀。加入 5 g 橙皮渣,磁力搅拌 30 min,倒入分液漏斗,静置待两相分层,分别收集上相、下相溶液,记录相应体积 $V_{上}$ 和 $V_{下}$,按照公式(1)计算相比 R 。

$$R = \frac{V_{\text{上}}}{V_{\text{下}}} \quad (1)$$

式中, $V_{\text{上}}$ 为上相提取液体积, mL; $V_{\text{下}}$ 为下相提取液体积, mL。

1.3.3 双水相分离条件

(1) 单因素实验

考察乙醇体积分数分别为 25%、30%、35%、40%、45%, 磷酸氢二钾质量分数分别为 10%、14%、18%、22%、25%, 萃取温度分别为 50、60、70、80、90 °C 时, 双水相分离条件对柑橘中黄酮类化合物和果胶提取效果的影响, 以总黄酮和果胶的得率为指标。

(2) 响应面优化设计

在单因素试验基础上, 选择乙醇体积分数(A)、磷酸氢二钾质量分数(B)和萃取温度(C) 3 个因素所确定的水平范围, 按照 Box-Behnken 试验设计, 筛选出双水相提取柑橘中总黄酮和果胶的最佳工艺参数。各因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平
Table 1 Response surface analysis factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数/%	30	35	40
B 磷酸氢二钾质量分数/%	14	18	22
C 萃取温度/°C	60	70	80

1.3.4 上相提取液中总黄酮的测定

(1) 可见分光光谱扫描测试

用乙醇/磷酸氢二钾双水相溶液萃取经破碎的柑橘果皮, 上、下相分离后, 取适量上相黄色提取液, 用去离子水稀释后, 在 200~500 nm 范围内进行光谱扫描。

(2) 总黄酮含量和得率的测定

总黄酮含量的测定有多种方法, 本研究采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法^[18]。以芦丁作为对照品, 测定波长 510 nm。以芦丁标准品溶液测得吸光度平均值为横坐标(X), 以其浓度为纵坐标(Y), 得到芦丁标准品回归方程: $Y=0.4995X-0.0097$ ($r^2=0.9993$)。取上相黄色提取液 1 mL, 照绘制标准曲线的方法测量其在 510 nm 处吸光度, 通过标准曲线方程求出总黄酮浓度, 按照公式(2)计算脐橙皮渣中总黄酮的得率。

$$\text{总黄酮得率}(\%) = \frac{C \times V \times N}{M \times 1000} \times 100\% \quad (2)$$

式中, C 为上相提取液中总黄酮含量, mg/mL; V 为上相提取液体积, mL; N 为稀释倍数; M 为脐橙皮渣重量, g。

1.3.5 果胶的测定

(1) 果胶的纯化

将乙醇/磷酸氢二钾双水相溶液萃取的下相提取物过滤, 得到滤渣。参考文献方法^[19], 用 20 mL 室温纯水清洗 3 次去盐, 再用 20 mL 80 °C 热水浸提 30 min, 趁热过滤。滤

液加入 1.5 倍体积的 95%乙醇沉淀, 过滤得到的凝胶状液体即果胶物质, 于 55 °C 干燥至恒重, 称量, 并采用红外光谱进行表征分析。

(2) 红外光谱定性分析

采用红外光谱仪, KBr 压片法^[20]测定。将干燥的果胶样品与 KBr 压制成片, 在 4000~400 cm^{-1} 波数范围扫描测定光谱吸收值。

(3) 果胶得率计算公式

干燥至恒重的果胶, 按照公式(3)计算脐橙皮渣中果胶的得率。

$$\text{果胶得率}(\%) = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (3)$$

式中, m 为下相果胶重量, g; M 为脐橙皮渣重量, g。

1.4 数据处理

采用 Origin 8 进行绘图, SPSS 21.0 对实验数据进行分析, Design-Expert 7.0 中的 Box-Behnken 试验设计方法进行响应面分析。每组实验重复 3 次, 实验结果以均数±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 单因素实验对黄酮和果胶得率的影响

2.1.1 双水相乙醇体积分数对萃取的影响

乙醇和磷酸氢二钾在一定浓度范围内才能形成稳定的分相体系, 当乙醇体积分数低于 25% 时, 不能形成双水相体系, 当乙醇体积分数高于 45% 以上时, 磷酸氢二钾不易溶解完全, 故考察乙醇体积分数分别为 25%、30%、35%、40%、45% 与质量分数为 18% 的磷酸氢二钾形成的双水相体系下, 提取橙皮中总黄酮与果胶的得率。

由图 1 可知, 乙醇体积分数为 25%~35% 时, 随着乙醇浓度的增加, 乙醇和水的上相体积逐渐增大, 相比呈现增加趋势。总黄酮随着乙醇浓度的增加而增加, 当乙醇体积分数为 35% 时, 总黄酮得率达到(2.60±0.05)%, 之后变化不大; 果胶得率呈现先增后减的趋势, 当乙醇体积分数为 35% 时, 果胶得率达到最大值(6.02±0.06)%, 此时相比为 1.50。但随着乙醇体积分数继续增大至 45% 时, 果胶的得率减少至(3.60±0.04)%。这可能是因为随着乙醇体积分数增加, 相比增大, 下相体积减少, 导致磷酸氢二钾的溶解性降低, 不利于果胶的萃取。因此, 选取乙醇体积分数为 30%、35%、40% 进行响应面实验。

2.1.2 双水相磷酸氢二钾质量分数对萃取的影响

由于黄酮类化合物大多具有酚羟基, 可以用碱水或碱性稀醇浸出。实验中发现磷酸氢二钾质量分数过低时与乙醇不能形成分相, 质量分数过高则易析出结晶。因此, 考察磷酸氢二钾的质量分数分别为 10%、14%、18%、22%、25% 与体积分数为 35% 的乙醇形成的双水相体系下, 提取脐橙皮中总黄酮与果胶的得率。

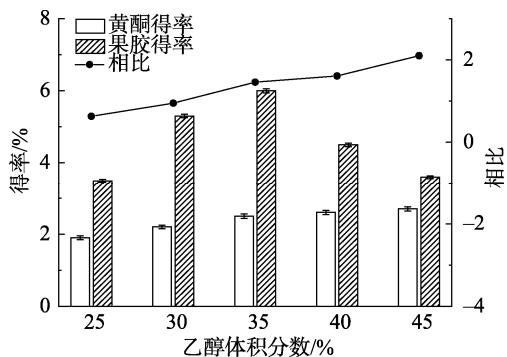


图1 乙醇体积分数对乙醇/盐双水相系统的相比、黄酮和果胶得率的影响($n=3$)

Fig.1 Effects of ethanol concentration on the phase volume ratios of ethanol/salt aqueous two-phase system and yields of flavonoids and pectin ($n=3$)

由图2可知,随着磷酸氢二钾质量分数的增加,双水相的相比由 7.00 ± 0.20 急剧减少至 1.50 ± 0.06 ,即上相体积减少,下相体积增加;当磷酸氢二钾质量分数为18%时,相比减少到 1.80 ± 0.06 ,之后降低趋势逐渐减缓。随着磷酸氢二钾质量分数的增加,总黄酮得率先上升后趋于平稳,当磷酸氢二钾质量分数为18%时,黄酮得率达到最大值(2.60 ± 0.05)%,之后不再增加。果胶得率随着磷酸氢二钾质量浓度的增加先增后减,当磷酸氢二钾质量分数为18%时,果胶得率达到最大值(6.20 ± 0.06)%,随后缓慢降低。因此,选取磷酸氢二钾质量分数为14%、18%、22%进行响应面实验。

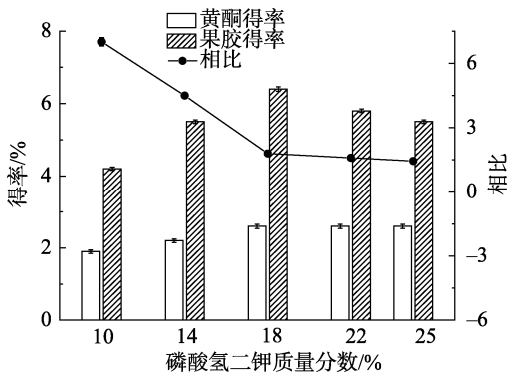


图2 磷酸氢二钾质量分数对乙醇/盐双水相系统的相比、黄酮和果胶得率的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of dipotassium hydrogen phosphate mass fraction on the phase volume ratios of ethanol/salt aqueous two-phase system and yields of flavonoids and pectin ($n=3$)

2.1.3 双水相萃取温度对萃取的影响

由图3可知,随着萃取温度由 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增加 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$,相比由 1.70 ± 0.05 减少至 1.50 ± 0.05 ,下降趋势较小;即上相体积略有减少,下相体积略有增加。原因可能是温度升高会使少量乙醇挥发,导致下相体积增大。萃取温度由 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增加至 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,果胶得率由(6.40 ± 0.06)%显著增加至

(8.00 ± 0.08)% ($P<0.05$),说明 $50\sim 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增加萃取温度对果胶得率有促进作用,但温度增加到 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,果胶得率降低至(7.0 ± 0.06)%;黄酮得率随着温度升高略有增加,由 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时的(2.60 ± 0.05)%增加至 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时(3.10 ± 0.06)% ($P>0.05$),但当温度升高到 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,黄酮得率减小到(2.70 ± 0.05)%。

由实验结果可以看出,在 $50\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内,增加萃取温度有利于黄酮和果胶的溶出和扩散,黄酮和果胶得率都会所有增加。但是,当温度持续升高时,导致乙醇的挥发,会影响黄酮化合物的提取效率,另外,果胶在高温碱性条件下容易降解^[21],故双水相萃取的温度不宜过高,选择萃取温度为 60 、 70 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行响应面实验。

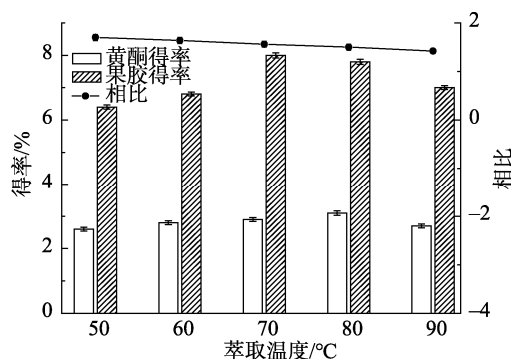


图3 萃取温度对乙醇/盐双水相系统的相比、黄酮和果胶得率的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of the extraction temperature on the phase volume ratios of ethanol/walt aqueous two-phase system and yields of flavonoids and pectin ($n=3$)

2.2 响应面优化双水相提取黄酮和果胶的试验结果

2.2.1 Box-Behnken 试验结果

在单因素试验所确定的乙醇体积分数(A)、磷酸氢二钾质量分数(B)和萃取温度(C)3个因素的水平范围,按照Box-Behnken试验设计,以果胶得率(R_1)和黄酮得率(R_2)为响应值进行三因素三水平共17个实验点的响应面分析实验,实验以随机次序进行,实验结果见表2。

2.2.2 回归模型分析

利用Design-Eepert软件对试验数据进行二次多项式逐步回归拟合,建立二次多元回归方程,对该方程的回归分析与方差分析结果见表3和表4,各因素经多元回归拟合,得到果胶(R_1)回归方程:

$$R_1=8.35+0.088A-0.1B-0.12C-0.12AB-0.075AC-0.072BC-0.97A^2-0.53B^2-0.053C^2$$

得到黄酮(R_2)回归方程:

$$R_2=3.35+0.12A-0.01B+0.066C-0.17AB-0.13AC+0.17BC-0.54A^2-0.65B^2-0.063C^2$$

由表3和表4的响应面方差分析可知,模型 P 值均小于0.01,表明模型方程极显著。模型相关系数 R^2 均大于95%,方程失拟项 P 值均大于0.05,不显著,表明模型拟合

程度良好, 试验误差小, 该模型是合适的, 可用于双水相萃取果皮中果胶和黄酮得率的预测及分析。

表 2 响应面试验结果
Table 2 Response surface test results

实验号	A 乙醇体积 分数/%	B 磷酸氢二钾 质量分数/%	C 萃取 温度/°C	R_1 果胶 得率/%	R_2 黄酮 得率/%
1	35	14	60	7.68	2.79
2	40	22	70	6.96	2.09
3	35	18	70	8.35	3.35
4	40	14	70	6.83	2.32
5	40	18	60	7.31	3.04
6	30	22	70	7.13	2.34
7	35	18	70	8.26	3.28
8	35	22	60	7.58	2.29
9	35	22	80	8.01	2.84
10	35	18	70	8.44	3.34
11	35	18	70	8.32	3.48
12	30	18	80	7.21	2.72
13	40	18	80	7.64	2.84
14	30	18	60	7.18	2.39
15	35	18	70	8.40	3.32
16	30	14	70	6.52	1.89
17	35	14	80	7.82	2.64

由表 3 可知, 模型中二次项 A^2 、 B^2 对果胶得率的影响极显著, 一次项 B 、 C 对果胶得率影响显著, 交互项 AB 、 AC 、 BC 的作用不显著。由表 4 可知, 模型中二次项 A^2 、 B^2 对黄酮得率影响极显著, 一次项 A 和交互项 AB 、 BC 对黄酮得率影响显著。由 F 值可知, 二次项 A^2 、 B^2 对果胶和黄酮的得率影响极显著($P<0.01$), 一次项对果胶得率都有影响, 影响大小次序为: $C>B>A$, 对黄酮得率影响次序为: $A>C>B$, 其中萃取温度对于果胶得率影响显著($P<0.05$), 乙醇体积分数对于黄酮得率影响显著($P<0.05$), 同时双水相体系乙醇和磷酸氢二钾的交互作用对于果胶和黄酮得率影响显著($P<0.05$)。

2.2.3 各因素交互作用响应面分析

响应面曲面图的弧度和等高线图的形状可反映出各因素的影响和相互作用。图 4 反映了乙醇体积分数(A)、磷酸氢二钾质量分数(B)和萃取温度(C)与果胶得率(R_1)响应值的关系, 由图 4 可以看出, 两变量交互因素 AB 的曲面较陡峭, 等高线图呈椭圆形, 表明 A 、 B 两因素的交互作用对果胶得率有相当程度的影响, 但尚不显著($P>0.05$), 这与表 3 中的方差分析结果相一致; 由表 4 可知, 两变量交互因素 AB 和 BC 对黄酮得率(R_2)影响显著($P<0.05$), AC 的交互作用不显著($P>0.05$), 这与图 5 中相应的响应面曲面图较平缓, 且等高线并没有呈现椭圆形的结果相符。

2.2.4 响应面优化工艺验证结果

通过 Design-Expert 7.0 软件预测最佳的提取工艺条件

为: 乙醇体积分数为 35.17%, 磷酸氢二钾质量分数为 18.50%, 萃取温度为 78.75 °C, 在此条件下, 果胶得率为 8.43%, 黄酮得率为 3.37%。为便于实验操作和过程控制, 将优化条件修正为乙醇体积分数 35%, 磷酸氢二钾质量分数为 18%, 萃取温度为 78 °C, 在此条件下进行 3 次平行试验, 结果测得果胶得率为 (8.35±0.09)%, 黄酮得率为 (3.32±0.08)%, 与模型预测的理论值的相对偏差分别为 0.95% 和 1.49%, 表明该模型具有良好的可行性。

表 3 果胶得率响应面回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance of quadratic response surface regression model of R_1 pectin

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5.780	9	0.640	44.99	< 0.0001	**
A	0.061	1	0.061	4.29	0.0770	
B	0.086	1	0.086	6.03	0.0437	*
C	0.110	1	0.110	7.58	0.0284	*
AB	0.058	1	0.058	4.04	0.0845	
AC	0.022	1	0.022	1.58	0.2495	
BC	0.021	1	0.021	1.47	0.2642	
A^2	3.930	1	3.930	275.18	< 0.0001	**
B^2	1.170	1	1.170	82.33	< 0.0001	**
C^2	0.012	1	0.012	0.84	0.3908	
残差	0.100	7	0.014			
失拟项	0.080	3	0.027	5.49	0.0667	不显著
纯误差	0.020	4	0.005			
总和	5.88	16				
R^2	0.983	R_{Adj}^2	0.9612			

注: ** $P<0.01$ 为差异性极显著, * $P<0.05$ 为差异性显著, 下同。

表 4 黄酮得率响应面回归模型方差分析
Table 4 Analysis of variance of quadratic response surface regression model of R_2 flavonoids

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	3.720	9	0.410	26.50	0.0001	**
A	0.110	1	0.110	7.24	0.0311	*
B	0.001	1	0.001	0.05	0.8273	
C	0.035	1	0.035	2.25	0.1771	
AB	0.120	1	0.120	7.41	0.0296	*
AC	0.070	1	0.070	4.50	0.0715	
BC	0.120	1	0.120	7.86	0.0264	*
A^2	1.240	1	1.240	79.69	< 0.0001	**
B^2	1.780	1	1.780	114.36	< 0.0001	**
C^2	0.017	1	0.017	1.08	0.3332	
残差	0.110	7	0.016			
失拟项	0.086	3	0.029	5.07	0.0754	不显著
纯误差	0.023	4	0.006			
总和	3.83	16				
R^2	0.9715	R_{Adj}^2	0.9348			

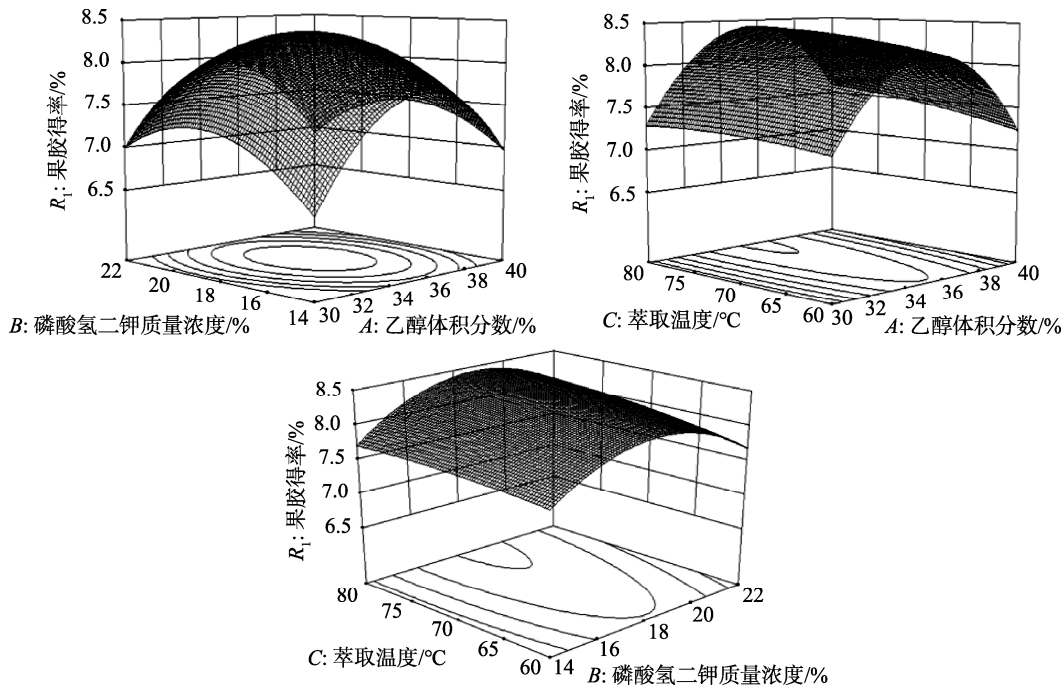


图4 各因素交互作用对果胶得率影响的响应面图

Fig.4 Response surface plot of the effect of process parameters on the extraction efficiency of pectin

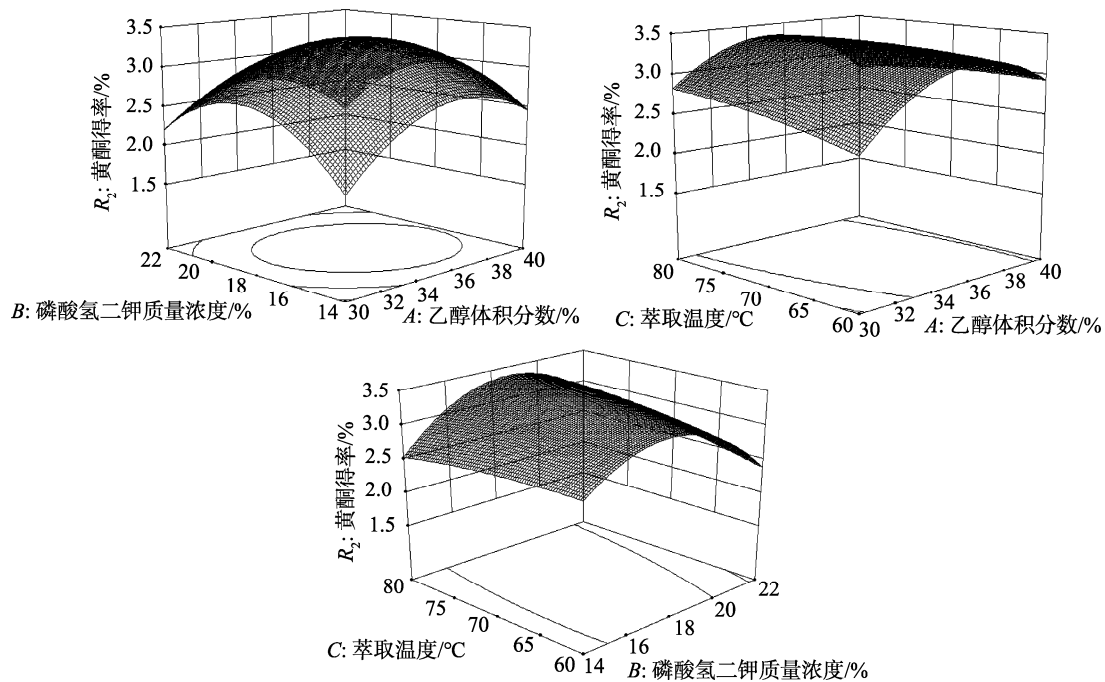


图5 各因素交互作用对黄酮得率影响的响应面图

Fig.5 Response surface plot of the effect of process parameters on the extraction efficiency of flavonoids

2.3 黄酮和果胶提取物的定性分析结果

2.3.1 上相黄酮类化合物的定性分析结果

在乙醇/磷酸氢二钾双水相体系中,上相由乙醇和水组成,黄酮类化合物溶于乙醇,故在上相,果胶在水和盐组成

的下相中。将上相黄色提取液适当稀释后,将芦丁对照品和样品溶液分别于紫外-可见分光光度计 200~500 nm 进行扫描,得到吸收光谱曲线。由图 6 可见,芦丁对照品溶液在 260 和 360 nm 附近有最大吸收,样品溶液在 280 nm 和 320 nm 附近有特征峰,与苏东林等^[22]和徐旭耀等^[23]采用微波和超声波辅

助乙醇提取柑橘中总黄酮的紫外分光光谱分析结果一致。

大多数黄酮类化合物在 200~400 nm 内存在 2 个主要吸收区域。出现在 300~400 nm 吸收带称为带 I, 出现在 240~280 nm 吸收带称为带 II^[18]。不同类型的黄酮化合物, 其带 I 或带 II 的峰位、峰形和吸收强度不同。因此, 根据上述黄色提取液呈现的特定的黄酮紫外吸收峰, 推断其为黄酮类化合物。

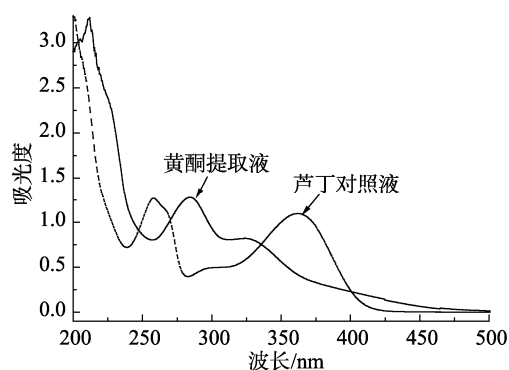


图 6 黄酮提取液和芦丁对照品的紫外-可见吸收光谱
Fig.6 Ultra-violet absorption spectra of flavonoid extract and Rutin standard

2.3.2 果胶提取物的红外光谱扫描图谱

采用乙醇/磷酸氢二钾双水相体系分离脐橙果皮得到的下相提取物, 经乙醇沉淀后的干燥物采用红外光谱仪扫描, 红外光谱图如图 7 所示。

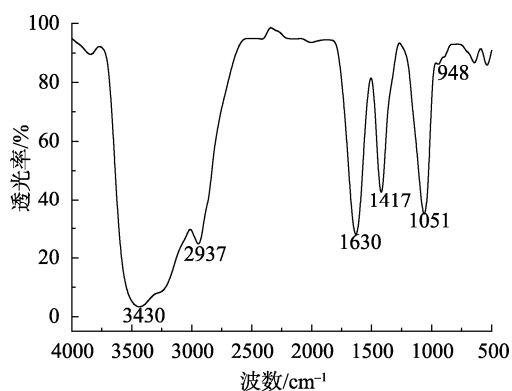


图 7 果胶提取物的红外光谱图
Fig.7 Infrared spectrum of pectin extraction from the lower phase

所得到的提取物在 3430 cm^{-1} 处和 2937 cm^{-1} 处有吸收, 在 1630 cm^{-1} 处的吸收很强, 但在 1750 cm^{-1} 没有吸收峰。在 3430 cm^{-1} 处的吸收主要是由于 OH 的伸缩引起的, 3100~2800 cm^{-1} 间的吸收峰是由 C-H 吸收引起的, 主要包括 -CH、-CH₂ 和 -CH₃ 的伸缩振动; 1760~1730 cm^{-1} 和 1630~1600 cm^{-1} 间的吸收峰, 分别是酯化的羰基和未酯化的羰基红外吸收引起; 在 1000~2000 cm^{-1} 之间的吸收峰是鉴定果胶主要化学官能团及提供用于比较不同类型果胶结构信息的

特征峰^[12,24]。其中, 1750 cm^{-1} 处的特征峰可用来区分果胶为高酯果胶或低酯果胶, 说明本方法提取到的果胶为高酯化果胶, 这与陈健乐等^[25]采用低温碱提柑橘果胶的红外光谱一致。此外, 1417 cm^{-1} 附近还有一个较强的羧基(-COOH)对称吸收峰; 在 1051 cm^{-1} 的特征峰是对应糖苷键 C-O-C 的伸缩振动峰, 表明有甲氧基存在。因此, 乙醇/磷酸氢二钾双水相体系分离得到的下相提取物具有脐橙果胶的特征结构。

3 结论与讨论

本研究建立了乙醇/磷酸氢二钾双水相体系同步分离脐橙果皮中的黄酮(上相)和果胶(下相)的方法, 并通过单因素实验和响应面设计对双水相萃取黄酮和果胶的条件进行了优化。

本研究建立的乙醇/磷酸氢二钾双水相同步萃取分离脐橙果皮中的总黄酮和果胶的方法, 较提取黄酮或果胶单一组分的工艺具有果皮资源利用较完全的优势。同时, 本方法所提取的总黄酮得率与常用的碱法或乙醇提取法相当^[26]; 与文献中报道的大孔树脂^[27]和酶法^[28]提取果胶相比, 采用乙醇/磷酸氢二钾双水相体系, 总黄酮能富集到上相, 还能同步提取分离下相的果胶, 因而具有提取工艺简单、能同步提取(效率较高)等优势, 为脐橙果皮的综合利用提供了新的思路和技术手段。基于本研究数据, 对该双水相体系进行工艺放大等研究将是进一步工作的重点。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家统计局. 中国统计年鉴 2020[M]. 北京: 中国统计出版社, 2020.
National Bureau of statistics of the people's Republic of China. China Statistical Yearbook 2020 [M]. Beijing: China Statistics Press, 2020.
- [2] 温哈秋子, 郑永强, 刘杨. 柑橘大数据研究与应用[J]. 农业大数据学报, 2021, 3(1): 33-44.
WEN HQZ, ZHENG YQ, LIU Y. Research and application of citrus big data [J]. J Agric Big Data, 2021, 3(1): 33-44.
- [3] 沈兆敏. 我国柑橘生产现状及未来前景展望[J]. 科学种养, 2019, (9): 5-10.
SHEN ZM. Current status and future prospects of citrus production in my country [J]. Sci Cultivation, 2019, (9): 5-10.
- [4] CHEN XM, TAIT AR, KITTS DD. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. Food Chem, 2017, 218: 15-21.
- [5] YI LZ, MA SS, REN DB. Phytochemistry and bioactivity of citrus flavonoids: A focus on antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and cardiovascular protection activities [J]. Phytochem Rev, 2017, 16(3): 479-511.
- [6] 吴梅青, 李俊雅, 陈丹. 柑橘皮中总黄酮提取工艺及降血糖活性的试验研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(5): 56-59.
WU MQ, LI JY, CHEN D. Study on extraction technology and hypoglycemic effect of total flavonoids from citrus peels [J]. Food Res Dev, 2018, 39(5): 56-59.
- [7] CHEN QY, WANG D, TAN C, *et al.* Profiling of flavonoid and antioxidant activity of fruit tissues from 27 chinese local citrus cultivars

- [J]. *Plants*, 2020, 9(2): 196–205.
- [8] 杨金妹, 木泰华, 马梦梅. 果胶结构、提取方法及乳化特性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(14): 315–322.
YANG JS, MU TH, MA MM. Research progress in structure, extraction methods and emulsifying properties of pectin [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(14): 315–322.
- [9] WANG C, QIU WY, CHEN TT, *et al.* Effects of structural and conformational characteristics of citrus pectin on its functional properties [J]. *Food Chem*, 2020, 339: 128064–128064.
- [10] 唐琴, 陈先勇, 宋航. 柚皮苷的溶剂热法提取及其抗氧化性、稳定性测定[J]. *食品科学*, 2011, 32(12): 187–189.
TANG Q, CHEN XY, SONG H. Hot solvent extraction and antioxidant properties and stability of naringin from white pomelo peel [J]. *Food Sci*, 2011, 32(12): 187–189.
- [11] 勾中智, 徐维盛, 刘静, 等. 柑橘类水果类黄酮化合物的提取及分析方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(5): 1556–1562.
GOU ZZ, XU WS, LIU J, *et al.* Progress of citrus flavonoids extraction and analysis method [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(5): 1556–1562.
- [12] 夏天添, 梁瑞红, 刘成梅, 等. 橙皮果胶的提取及性质研究[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(11): 234–236, 240.
XIA TT, LIANG RH, LIU CM, *et al.* Study on extraction and properties of pectin from the peel of orange [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2011, 32(11): 234–236, 240.
- [13] 周宏, 李昶, 翁慧. 橙子皮中果胶提取及含量测定[J]. *化工管理*, 2018, (30): 211–212.
ZHOU H, LI C, WENG H. Extraction and content determination of pectin in orange peel [J]. *Chem Enterprise Manage*, 2018, (30): 211–212.
- [14] 韩秋菊, 王晨, 李薇, 等. 乙醇-硫酸铵双水相萃取柚子皮中黄酮类化合物的研究[J]. *应用化工*, 2020, 49(9): 2275–2278.
HAN QJ, WANG C, LI W, *et al.* Study on the extraction of flavonoids from pomelo peel by ethanol and ammonium sulfate aqueous two-phase system [J]. *Appl Chem Ind*, 2020, 49(9): 2275–2278.
- [15] 胡金梅, 吴巧婷, 谢晶晶, 等. 双水相分离火龙果皮中色素和果胶[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(2): 37–41.
HU JM, WU QT, XIE JJ, *et al.* Separation of pigment and pectin from pitaya peel by aqueous two-phase system [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(2): 37–41.
- [16] 吴继宏, 余菁菁, 周林, 等. 双水相体系萃取分离发酵液中的裂褶菌多糖[J]. *食品科技*, 2019, 44(3): 188–193.
WU JH, YU JJ, ZHOU L, *et al.* Extraction and separation of *Schizophyllum* polysaccharide in fermentation broth by double aqueous phase system [J]. *Food Sci Technol*, 2019, 44(3): 188–193.
- [17] 单飞狮, 张东钊, 杨敏, 等. 乙醇-碱液回流法提取红橘果皮中橙皮苷工艺研究[J]. *绵阳师范学院学报*, 2018, 37(2): 66–71.
SHAN FS, ZHANG DF, YANG M, *et al.* Process research on extracting hesperidins of *Citrus reticulata* by ethanol-alkali reflux [J]. *J Mianyang Teach Coll*, 2018, 37(2): 66–71.
- [18] 刘嘉丽, 刘德明, 王丹, 等. 湖南柑橘果皮总黄酮及橙皮苷含量分析[J]. *湖南农业科学*, 2020, (11): 58–62.
LIU JL, LIU DM, WANG D, *et al.* Analyses of the contents of total flavonoids and hesperidin in citrus peel [J]. *Hunan Agric Sci*, 2020, (11): 58–62.
- [19] 沈锐, 谢青松, 赵壮志, 等. 响应面优化脐橙皮中果胶的提取工艺及理化性质分析[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(4): 77–83.
SHEN R, XIE QS, ZHAO ZZ, *et al.* Optimization of extraction technology and physicochemical properties of pectin from navel orange by response surface [J]. *Food Res Dev*, 2018, 39(4): 77–83.
- [20] PARK JK, KHAN T, JUNG JY. Structural studies of the glucuronic acid oligomers produced by *Gluconacetobacter hansenii* strain [J]. *Carbohydr Polym*, 2006, 63(4): 482–486.
- [21] DIAZ JV, ANTHON GE, BARRETT DM. Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(13): 5131–5136.
- [22] 苏东林, 单杨, 李高阳. 比色法测定柑桔皮中总黄酮含量的研究[J]. *中国酿造*, 2008, (2): 69–74.
SU DL, SHAN Y, LI GY. Study on quantitative determination of total flavonoids in citrus peel by colorimetry [J]. *China Brew*, 2008, (2): 69–74.
- [23] 徐旭耀, 萧许凤, 梅丹丹, 等. 紫外分光光度法测定柑橘皮中的总黄酮[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(7): 35–38.
XU XY, XIAO XF, MEI DD, *et al.* UV spectrophotometric measurement of total flavonoids in citrus peels [J]. *Food Res Dev*, 2012, 33(7): 35–38.
- [24] 牟方婷, 袁美, 石黎琳, 等. 超声和微波辅助果胶酶处理对果胶结构的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(4): 215–221, 236.
MU FT, YUAN M, SHI LL, *et al.* Effect of ultrasonic and microwave assisted pectinase treatment on pectin structure [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(4): 215–221, 236.
- [25] 陈健乐, 程焕, 陈士国, 等. 提取工艺与果胶对柑橘果胶多糖性质的影响[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(4): 1–9.
CHEN JL, CHENG H, CHEN SG, *et al.* The effect of extraction process and fruit size on the characteristic of mandarin pectin [J]. *J Chin Ins Food Sci Technol*, 2020, 20(4): 1–9.
- [26] 李继伟, 任璇, 周绍庆, 等. 柑橘皮黄酮石灰水提取工艺及果胶去除效果的研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(10): 101–104.
LI JW, REN X, ZHOU SQ, *et al.* Study on flavonoids extraction process from citrus peels by lime water method and the efficiency of pectin removing in the process [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(10): 101–104.
- [27] 封红梅, 曲敏, 刘伟, 等. 柑橘皮渣中高酯果胶的提取与纯化[J]. *食品与机械*, 2011, 27(3): 59–62.
FENG HM, QU M, LIU W, *et al.* Extraction and purification of high-ester pectin from tangerine peel waste [J]. *Food Mach*, 2011, 27(3): 59–62.
- [28] 苏东林, 李高阳, 刘伟, 等. 柑橘果胶液的脱色与浓缩纯化工艺优化研究[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(4): 108–114.
SU DL, LI GY, LIU W, *et al.* Optimum technology for decolorizing, concentrating and purifying pectic solution extracted from citrus peel [J]. *Chin Ins Food Sci Technol*, 2011, 11(4): 108–114.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



胡金梅, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品营养与检测。
E-mail: 172323992@qq.com



周林, 博士, 副教授, 主要研究方向为生物活性物质制备及其功能。
E-mail: zhoulin@gdpu.edu.cn