

柑橘皮中黄酮的提取方法研究

客慧明 王小逸 刘雷

(北京工业大学环境与能源工程学院 北京 100022)

摘 要 建立了一套用超临界 CO_2 萃取法提取柑橘皮中具有抗癌生物活性的黄酮、用硅胶柱作为预处理柱、以二氯甲烷作为洗脱剂、并用高效液相色谱法测定柑橘皮中黄酮的含量的方法。色谱条件为 C_{18} 柱, 紫外检测器, 检测波长为 270nm, 流动相为甲醇的水溶液($V(\text{甲醇})/V(\text{水})=65/35$), 温度 30 。超临界 CO_2 萃取的最佳条件为: 温度为 60 , 压强为 35MPa, 改善剂乙醇 150mL, 萃取时间为 3h。该法提取柑橘皮中的黄酮的萃取率和选择性都好于有机溶剂萃取法, 黄酮的萃取率是有机溶剂萃取法的 2 倍。与传统的有机溶剂萃取法相比超临界 CO_2 萃取法具有省时、萃取效率高且无有毒废弃物等优点。

关键词 超临界 CO_2 萃取法 黄酮 溶剂萃取 高效液相色谱 柑橘皮

Study of the Method to Extract the Flavonoids in Orange Peel

Ke Huiming, Wang Xiaoyi, Liu Lei

(College of Environment and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022)

Abstract The supercritical CO_2 modified with ethanol was used to extract biologically anticancer active flavonoids in orange peel. Silica gel column with dichloromethane as the eluting solvent was used to remove the impurities. Analysis of the flavones was carried out by means of reversed-phase high performance liquid chromatography on a C_{18} column with UV detector at the wavelength of 270nm. A mixture of water and methanol ($V(\text{MeOH})/V(\text{H}_2\text{O})=65/35$) was used as the mobile phase at 30 . The optimum condition for supercritical CO_2 extraction was found to be: 150mL ethanol at a pressure of 35MPa, and 60 for 3h. The determined results showed that the recovery and the selectivity of the supercritical CO_2 extraction were better than that of traditional extraction. The extraction rate of biologically anticancer active flavonoids by supercritical CO_2 fluid extraction was about 2 times as that of traditional solvent extraction. Compared with traditional solvent extraction, the method of supercritical CO_2 extraction has the advantages of short extraction time, high extraction efficiency and no poisonous waste etc.

Key words Supercritical CO_2 extraction, Flavonoids, Solvent extraction, High performance liquid chromatography, Orange peel

黄酮类化合物具有抗氧化作用, 它能清除自由基^[1], 淬灭单线态氧, 清除超氧化物和羟基自由基^[2,3], 抑制脂质过氧化以及抗癌作用^[4,5], 黄酮类化合物还具有抗菌和抗病毒作用。柑橘皮中的六甲氧基黄酮具有抑制血小板凝集、抗血栓形成的作用, 七甲氧基黄酮对胃癌细胞和白血

客慧明 男, 33 岁, 硕士, 从事环境科学领域研究。

2003-10-17 收稿, 2004-04-09 接受

病细胞均有较强的抑癌活性^[6]。目前,随着人类生活水平的提高,科研工作者已经越来越重视从植物中提取分离和测定黄酮的研究工作。应用较广泛的传统提取方法有水煮法和有机溶剂萃取法。也有一些学者探索过用酸碱沉淀法、铅盐沉淀法和超声提取法提取黄酮的工艺^[7],但上述方法都存在着后处理过程复杂、对环境污染较大等缺点。超临界流体萃取技术是一种崭新的绿色技术,它能耗低、污染小和不易破坏物质的生理活性等特点,因此受到国内外学者的广泛关注。

1 实验部分

1.1 仪器与药品

柑橘皮,产自湖南省,经挑选干燥后粉碎,均匀分成 9 份每份 500g。红惠制药公司 CL-5JI 型超临界流体萃取机,日本岛津公司 LC-6A 高效液相色谱仪,索氏提取器。甲醇、二氯甲烷、乙醚(都是分析纯),硅胶 200 目。

1.2 有机溶剂萃取

把处理好的柑橘皮 500g 装入索氏提取器中,用 1500mL 乙醚回流 15h,蒸馏除去乙醚并用乙醇溶解定容至 50mL 容量瓶,样品编号为 S₉。

1.3 超临界 CO₂ 萃取

把处理好的柑橘皮 500g 装入萃取釜中,从钢瓶出来的 CO₂ 经过滤器过滤后由压缩机压入萃取釜。当萃取釜达到所需压力、温度后,开始静态萃取 1h,随后进行 2h 的动态萃取。萃取完毕后关闭加压泵,接收萃取出的物质,用甲醇洗涤分离釜数次并接收洗出液。超临界萃取实验条件如表 1 所示, S₁ ~ S₈ 是由超临界萃取后分别用乙醇溶解定容于 50mL 容量瓶中而得到的样品。

表 1 超临界 CO₂ 萃取柑橘皮中黄酮的条件
Tab.1 Condition of supercritical CO₂ extraction of flavonoids in orange peel

样品	萃取温度/	压强/MPa	改善剂体积/mL	静态萃取时间/h	动态萃取时间/h	分离釜温度/
S ₁	40	35	0	1	2	35
S ₂	40	35	乙醇 50	1	2	35
S ₃	40	35	乙醇 150	1	2	35
S ₄	40	35	甲醇 50	1	2	35
S ₅	40	35	甲醇 150	1	2	35
S ₆	40	21	0	1	2	35
S ₇	40	12	0	1	2	35
S ₈	60	35	乙醇 150	1	2	35

表 2 样品提取结果
Tab.2 Sample extraction results

样品	M ₅ /mg	M ₆ /mg	M ₇ /mg	总质量/mg	提取率/%		
					五甲氧黄酮	六甲氧黄酮	七甲氧黄酮
S ₁	52.33	59.30	87.70	199.33	0.10	0.12	0.18
S ₂	32.30	50.78	45.50	128.58	0.06	0.10	0.09
S ₃	52.63	72.58	78.95	204.16	0.11	0.15	0.16
S ₄	36.49	45.73	44.67	126.89	0.07	0.09	0.09
S ₅	54.95	78.87	126.84	260.66	0.11	0.16	0.25
S ₆	33.98	38.89	50.94	123.81	0.07	0.08	0.10
S ₇	20.71	19.23	46.19	86.13	0.04	0.04	0.09
S ₈	58.25	84.06	164.24	306.55	0.12	0.17	0.33
S ₉	47.99	58.51	68.17	174.67	0.10	0.12	0.14

注: M₅、M₆、M₇ 分别代表五甲氧基黄酮、六甲氧基黄酮、七甲氧基黄酮的质量

1.4 高效液相色谱分析

精确称取五甲氧基黄酮 5.0mg、六甲氧基黄酮 4.0mg、七甲氧基黄酮 10.1mg 用甲醇定容于 100mL 容量瓶中,然后将此溶液稀释配制成系列标准溶液。在如下色谱条件下进行实验。色谱柱:Hyper ODS2 C₁₈(250mm×4.6mm);流量:1.0mL/min;流动相:V(MeOH)/V(H₂O)=65/35;检测器:紫外检测器,检测波长 270nm;进样量 8μL。得到三种物质的标准曲线。分别取 50 μL 样品溶液通过 200 目的固相萃取硅胶柱,以二氯甲烷作为洗脱剂,接流出液 5mL,在上述色谱条件下做 HPLC 测得各样品中五甲氧基黄酮、六甲氧基黄酮、七甲氧基黄酮的含量,见表 2。

2 结果与讨论

2.1 超临界 CO₂ 萃取的实验结果

柑橘皮中含有多种复杂的成分,用超临界 CO₂ 萃取常常不能很好地把极性较大的物质萃取出来,因此需要选择合适的改善剂。结合表 1 和表 2,从 S₂、S₄ 的比较中可以看出甲醇作为改善剂的效果与乙醇相当;从 S₆ 与 S₇ 的比较中可看出随着压强的升高黄酮产量呈现明显的递增趋势;从 S₃ 与 S₈ 的比较则得出温度的升高对黄酮的萃取有利的结论。从实验结果分析可知超临界萃取在温度为 40℃,压强为 35MPa,改善剂甲醇 50mL 时对五甲氧基黄酮和六甲氧基黄酮的选择性最好;而温度为 60℃,压强为 35MPa,改善剂乙醇 150mL 时对七甲氧基黄酮选择性最好。由于六甲氧基黄酮和七甲氧基黄酮具有抗癌活性,所以条件 8 是超临界 CO₂ 萃取这两种物质的最佳条件。

2.2 超临界萃取与传统方法的比较

用传统方法每 500g 柑橘皮中可提取出黄酮总质量为 174.67mg,而超临界萃取不加任何改善剂的情况下也可提出 199.33mg,所以,超临界 CO₂ 萃取柑橘皮中的黄酮类化合物比有机溶剂萃取法产量高。传统的有机溶剂萃取法提取后要经过大量的后处理步骤,如有机溶剂的回收,提取物的浓缩。而超临界萃取却不需要如此繁杂的步骤,且对黄酮类化合物的选择性也比有机溶剂萃取法好,可通过温度、压力、改善剂做出最佳选择。传统的有机溶剂萃取法中,每 500g 柑橘皮需要乙醚 1500mL,且需索氏提取 15h,这给工业化生产带来了巨大的困难。而应用超临界 CO₂ 萃取只需 3h 和 150mL 乙醇作为改善剂。因此超临界流体萃取法提取柑橘皮中的黄酮在工业生产中具有更大的开发和应用前景。

参考文献

- [1] S M Kuo, P S Leuvitt. Biol. Trace Elem. Res., 1998, 62(3): 135.
- [2] N Darmon, V Ferrandiz, M T Cannal et al. Liaison-Grupe Polyphenols Bull., 1990, 15: 158~162.
- [3] L Farkas, M Gabor. Flavonoids and Bioflavonoids. New York: CRC Press, 1986, 423~436.
- [4] N P Das, T A Pereria. J. Oil Chem. Soc., 1990, 4: 255~258.
- [5] E L D Silva, T Tsushida, J Terao. Arch. Biochem. Biophys., 1998, 349(2): 313~320.
- [6] M Noroozi, W J Angerson, M E Lean. Am. J. Clin. Nutr., 1998, 67(6): 1210~1215.
- [7] 翟福东, 张淑芬, 王小逸 等. 北京工业大学学报, 1997, 23(1):39~43.
- [8] 马慧萍, 贾正平, 谢景文 等. 华西药理学杂志, 2002, 17(1): 1~3.