

# Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction Process of Total Flavonoids from Pomegranate Peel

Zhen Liang\*, Baojuan Tu, Benrong Mu, Yu Fan#, Rong Yu#

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan  
Email: 1048161766@qq.com, #fanyu@cdutcm.edu.cn, #941675207@qq.com

Received: Apr. 8<sup>th</sup>, 2020; accepted: Apr. 29<sup>th</sup>, 2020; published: May 6<sup>th</sup>, 2020

## Abstract

**Objective:** The condition of ultrasonic assisted extraction process of total flavonoids from pomegranate peel was optimized. **Methods:** Considering the extraction rate of total flavonoids for the evaluation index, the size of particle screen, extraction solvent, extraction solvent percentage, solid-liquid ratio and extraction time were selected as the influencing factors based on the single factor experiment. **Results:** The optimal conditions are as follows: 100 mesh particle size, 60% ethanol as extraction solvent, 1:60 ratio of material to liquid, 60 minutes of extraction, and 30 minutes of ultrasonic extraction. Under this optimal extraction condition, the extraction rate of total flavonoids from pomegranate peel was 119.5 mg/g, and the degree of its main influencing factors was solid-liquid ratio > extracting time > ethanol concentration > mesh. **Conclusions:** The simple, reliable, and stable method would provide an experimental basis for the development and utilization of total flavonoids in pomegranate peel.

## Keywords

Pomegranate Peel, Total Flavonoid Content, Extracting Technology, Orthogonal Design

# 常温浸提超声辅助石榴皮总黄酮的工艺优化

梁 珍\*, 涂宝娟, 木本荣, 范 雨#, 余 蓉#

成都中医药大学, 四川 成都  
Email: 1048161766@qq.com, #fanyu@cdutcm.edu.cn, #941675207@qq.com

收稿日期: 2020年4月8日; 录用日期: 2020年4月29日; 发布日期: 2020年5月6日

\*第一作者。

#通讯作者。

## 摘要

目的：优化石榴皮总黄酮提取的超声辅助浸提工艺。方法：以总黄酮提取率为评价指标，在单因素试验的基础上，以颗粒筛目大小、提取溶剂百分数、料液比、浸提时间为影响因素考察对象，通过正交实验设计对石榴皮总黄酮提取的影响因素进行优化。结果：石榴皮总黄酮超声辅助浸提最佳工艺为颗粒大小100目、60%乙醇为提取溶剂、料液比为1:60、浸提60分钟。在此提取条件下，石榴皮总黄酮提取率为119.5 mg/g，其主要影响因素程度为料液比>浸提时间>乙醇浓度>筛目。结论：该方法简单、可靠，稳定性强，为石榴皮总黄酮的开发利用提供了实验依据。

## 关键词

石榴皮，总黄酮，提取工艺，正交设计

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

石榴，石榴科植物，又名安石榴。石榴皮是石榴的干燥果皮，我国云南、新疆、四川会理等地富产高品质石榴，而人们食用石榴后，通常把石榴皮作为废弃物扔弃，其实石榴皮是属于中药材中的一种，其性温、味苦涩，具有止血、杀虫、解毒的功效[1]。石榴皮中含有多种有效成分，主要有鞣质、多酚类、黄酮类、色素、有机酸、生物碱、蛋白质、糖类化合物等[2]，其中黄酮类化合物在石榴皮中广泛分布[3]。根据现代药理学研究表明，它可以起到抗肿瘤、抗诱变、降血压、调节免疫系统、改善心血管系统等作用[4] [5] [6]，并具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗衰老、清除自由基的活性[7] [8] [9]。研究表明，天然黄酮类化合物是一类来源广泛、获取成本低廉、提取方法简单可靠且具有强抗氧化性的抗氧化剂，黄酮类化合物既有药用价值，又有保健功能[10]，同时还具有食用价值[11]。目前，黄酮类化合物已被广泛应用于化妆品[12]、药品[4] [5] [6]、食品[11]等行业中，天然且廉价的黄酮类化合物的开发和利用价值不容小觑，为合理利用石榴皮这一废弃资源，更好地开发石榴皮黄酮类化合物，响应可持续发展战略的号召，推广中药材的使用，本文将研究从四川会理石榴皮中提取黄酮类化合物的提取工艺优化。

根据研究表明[13]，石榴各部位提取物中总黄酮含量依次为：石榴皮>石榴花>石榴籽；清除自由基的能力强弱依次为：石榴皮>石榴花>维生素C。目前已有的黄酮类化合物的提取方法有超声辅助提取法、水浸提法、微波辅助浸提法、有机溶剂浸提法、酶辅助浸提法、超临界流体提取法等[14] [15] [16] [17]，考虑到低成本、低能耗、操作简单、绿色环保、纯度高、提取率高等因素，本实验将采用超声辅助浸提法提取黄酮类化合物[18]。紫外可见分光光度法由于其仪器设备简单、操作方便、测定快速、灵敏度高等优点[19]，选择作为本实验总黄酮含量的测定方法。本实验将以总黄酮提取率为考察指标，采用超声辅助浸提法提取黄酮类化合物，结合紫外可见分光光度法测定提取物中总黄酮含量，对石榴皮中的黄酮类化合物的提取工艺进行优化，选择最佳颗粒大小、提取浓度、料液比、浸提时间等，提高总黄酮的提取率，同时为提取石榴皮中黄酮类化合物提供理论参考，为石榴皮的开发利用提供实验依据，提高石榴皮资源的利用价值。

## 2. 材料、试剂与仪器

### 2.1. 材料

石榴皮取自新鲜石榴皮(四川会理), 去除隔瓢后切成小片置于烘箱干燥至近恒重, 粉碎后过筛目, 储存于棕色广口瓶中, 常温避光保存备用。

### 2.2. 试剂

芦丁标准品(四川维克奇生物公司); 亚硝酸钠(重庆茂业化学试剂有限公司, AR)、氢氧化钠(成都临江化工厂, AR)、硝酸铝(成都市科龙化工试剂厂, AR)、无水乙醇(成都市科龙化工试剂厂, AR)、石油醚(罗恩试剂, AR, 沸程 60°C~90°C); 超纯水。

### 2.3. 仪器

紫外可见分光光度计(UV-6300PC 型, 上海美谱达仪器有限公司); 超声波清洗仪(KQ3200E, 昆山市超声仪器有限公司); 台式高速离心机(TG16-WS, 长沙高新技术产业开发区湘仪离心机有限公司); 电子天平(FA2004C, 上海越平科学仪器制造有限公司); 旋转蒸发器(YRE2000B, 巩义市予华仪器有限责任公司); 电热鼓风干燥箱(DHG-9145A, 上海一恒科技有限公司); 隔膜真空泵(GM-0.33A, 郑州长城科工贸有限公司)。

## 3. 试验方法

### 3.1. 标准溶液的配制

精密称取干燥的芦丁标准品(作为黄酮对照品) 5.0 mg, 加入 60%乙醇溶液溶解, 定容至 50 mL 容量瓶中, 配制成 0.10 mg/mL 的对照品溶液。

### 3.2. 供试品溶液的制备

将干燥的石榴皮粉末, 过筛目, 精密称取 100 目石榴皮粉末 1.0 g, 以 1:60 料液比加入 60%乙醇 60 mL, 常温下浸提 30 min, 辅助超声 30 min, 取 40 mL 提取液以 3000 r/min 的转速条件下离心 10 min, 取上清液用超纯水定容至 50 mL 容量瓶, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 经旋转蒸发浓缩除去有机溶剂, 超纯水定容浓缩液至 50 mL 容量瓶, 石油醚与提取液 1:1 比例分液萃取, 再次定容萃取液至 50 mL, 取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 超纯水定容, 摇匀。

### 3.3. 标准曲线的制备

分别精密量取标准品芦丁溶液 0.0、0.2、0.5、1.0、2.0、2.5、4.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 5%亚硝酸钠 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min; 10%硝酸铝 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min; 4%氢氧化钠 3 mL, 摇匀, 用 60%乙醇定容, 摇匀, 放置 15 min 待其显色。取样品液在紫外可见分光光度计进行吸收光谱扫描(扫描波长范围为 200~800 nm), 测出芦丁的最大吸收波长为 520 nm, 因此本实验在 520 nm 下直接测定吸光值, 芦丁标准品溶液浓度(mg/mL)为纵坐标绘制出标准曲线, 进行线性回归分析得出回归方程:  $A = 7.5865C - 0.0014$ , 其中 A—吸光度值, C—芦丁标准品浓度, 线性相关系数:  $R = 0.9997$ , 数据记录见图 1。

### 3.4. 石榴皮中黄酮类化合物提取的单因素试验

精密称取石榴皮黄酮粉末 1.0 g, 考察在不同颗粒大小(20 目、40 目、60 目、80 目、100 目)、不同乙醇浓度(0%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 100%)、不同料液比(1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80)、不同浸提时间(0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min)条件下, 超声辅助 30 min, 取提取液以 3000 r/min 的转速条

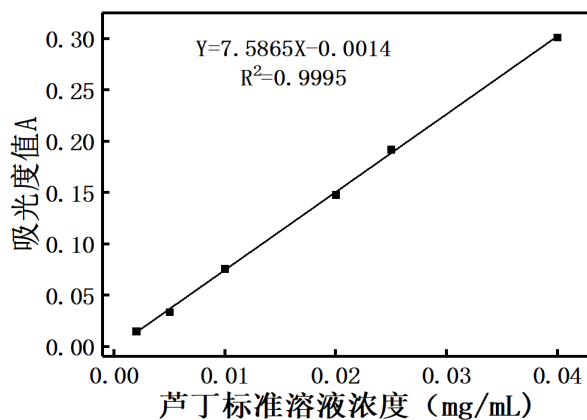


Figure 1. Rutin standard curve

图 1. 芦丁标准曲线

件下离心 10 min, 取上清液用超纯水定容至 50 mL, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 经旋转蒸发浓缩除去有机溶剂, 超纯水定容浓缩液至 50 mL, 石油醚与提取液 1:1 比例分液萃取, 再次定容萃取液至 50 mL, 取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 超纯水定容, 摇匀。分别量取上述各容量瓶中溶液 2 mL 于 10 mL 容量瓶中, 按照 3.3 方法显色, 分别在 520 nm 下测定吸光度值, 根据标准曲线计算总黄酮提取得率。

### 3.5. 石榴皮中黄酮类化合物提取的正交设计试验

根据 3.4 中单因素试验的结果, 选择合适的石榴皮粉末颗粒大小、乙醇浓度、料液比、浸提时间, 设计 4 因素 3 水平, 按照  $L_9(3^4)$  进行正交设计; 选取最优方案进行验证试验, 通过计算得出石榴皮黄酮在最佳条件下的提取得率。

## 4. 结果与分析

### 4.1. 单因素试验结果

#### 4.1.1. 颗粒大小的选择

不同颗粒大小对黄酮类化合物提取率的影响数据记录见图 2。

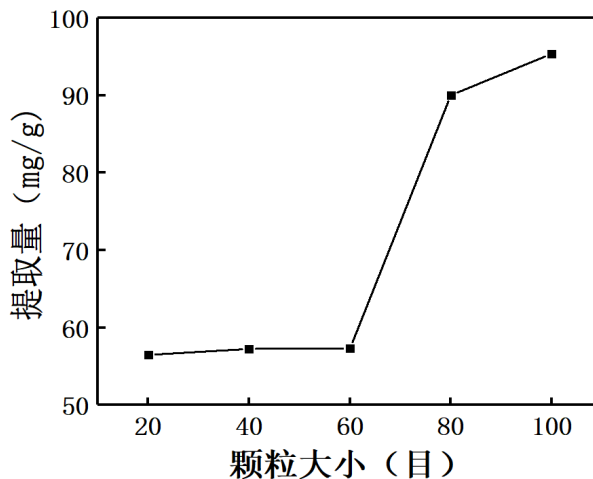


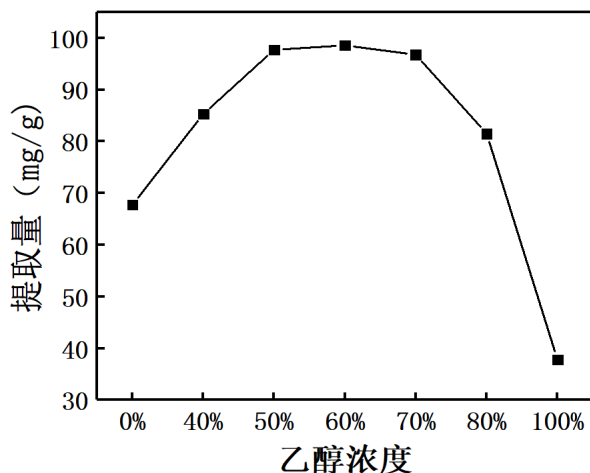
Figure 2. Effects of different particle size on extraction rate of flavonoids

图 2. 不同颗粒大小对黄酮类化合物提取率的影响

随着石榴皮样品颗粒越小, 原料的表面积越大, 促进总黄酮溶解于提取溶剂, 加速黄酮类化合物的浸出; 当原料粒径过小, 原料的表面积过大, 吸附作用过强, 影响物质的扩散作用, 反而降低了黄酮类化合物的析出, 并且不易滤过[20]。综上, 我们选择 100 目作为最佳提取颗粒大小。

#### 4.1.2. 提取溶剂浓度的选择

不同乙醇浓度对黄酮类化合物提取率的影响数据记录见图 3。



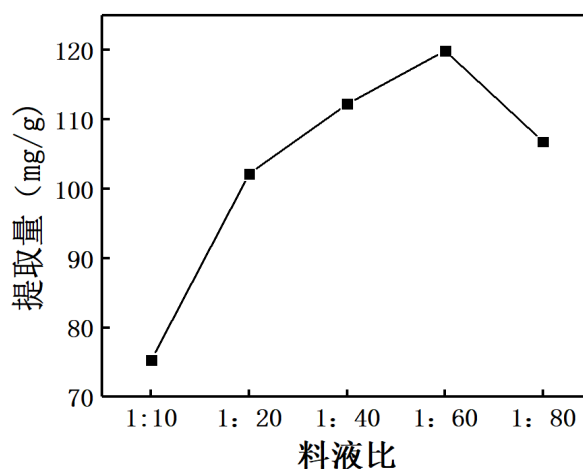
**Figure 3.** Effects of different ethanol concentrations on the extraction rate of flavonoids

**图 3.** 不同乙醇浓度对黄酮类化合物提取率的影响

随着乙醇浓度增加, 总黄酮提取率增高, 当乙醇浓度继续增高时, 黄酮提取率变化不大甚至降低, 其主要原因可能是: 当乙醇浓度较低时, 石榴皮中黄酮类化合物的溶解性差, 分离难, 所需的物质析出较少; 当乙醇体积分数继续增大大于 70% 时, 提取物中黄酮类化合物基本达到平衡, 而石榴皮中多糖、多酚类等其他物质含量增加, 影响黄酮类物质的提取率测定[21]。因此, 选择 60% 乙醇作为最佳乙醇浓度。

#### 4.1.3. 料液比的选择

不同液料比对黄酮类化合物提取率的影响数据记录见图 4。



**Figure 4.** Effects of different liquid-solid ratio on extraction rate of flavonoids

**图 4.** 不同液料比对黄酮类化合物提取率的影响

料液比为 1:60 时浸提效果最好, 当液料比过大时, 提取溶剂量过大, 溶剂负荷增加, 而总黄酮物质含量已达平衡, 使得黄酮类物质的提取率反而降低; 当料液比过小时, 不易充分溶解和分离石榴皮粉末中的黄酮类物质, 使得析出量少, 而且提取上清液时不易操作[22]。

#### 4.1.4. 浸提时间的选择

不同浸提时间对黄酮类化合物提取率的影响数据记录见图 5。

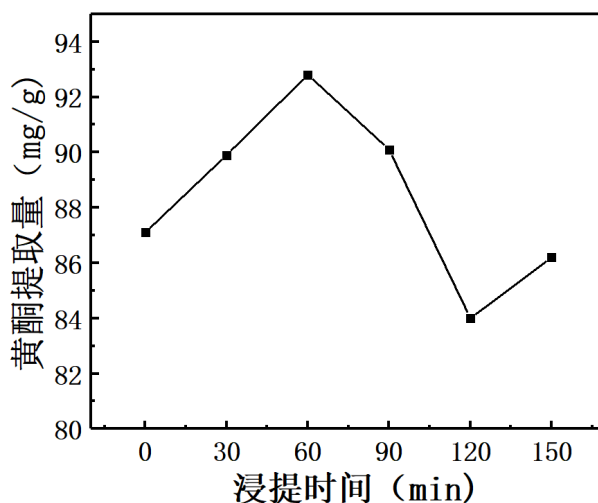


Figure 5. Effects of different extraction time on extraction rate of flavonoids

图 5. 不同浸提时间对黄酮类化合物提取率的影响

在 60 min 时提取率达到最佳, 当时间继续延长, 浸泡时间对黄酮提取率影响不大, 黄酮类物质已大量析出, 继续浸提反而会增加其他杂质的溶出率, 从而影响目的物质黄酮的纯度[23], 考虑目的物质的纯度及时间效率, 我们选择 60 min 作为最佳浸提时间。

## 4.2. 正交试验

正交试验结果如表 1 所示, 四个因素对石榴皮总黄酮提取率影响程度为料液比>浸提时间>乙醇浓度>筛目。

Table 1. Orthogonal experiment design and results

表 1. 正交试验设计及结果

实验号	因素				黄酮含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
	A	B	C	D	
	颗粒/目	乙醇浓度/%	料液比	浸提时间/min	
1	60	60	1:20	0	54.99
2	60	70	1:40	30	91.24
3	60	80	1:60	60	99.52
4	80	60	1:40	60	84.36
5	80	70	1:60	0	86.33
6	80	80	1:20	30	74.67

## Continued

7	100	60	1:60	30	89.85
8	100	70	1:20	60	90.17
9	100	80	1:40	0	98.36
K <sub>1</sub>	81.92	76.40	73.28	73.23	
K <sub>2</sub>	81.79	89.25	84.65	85.25	
K <sub>3</sub>	86.13	84.18	91.90	91.35	
K <sub>1</sub> '	27.31	25.47	24.43	24.41	
K <sub>2</sub> '	27.26	29.75	28.22	28.42	
K <sub>3</sub> '	28.71	28.06	30.63	30.45	
R	1.45	4.28	6.20	6.04	
优水平	A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>3</sub>	
最优组合	C <sub>3</sub> D <sub>3</sub> B <sub>2</sub> A <sub>3</sub>				

### 4.3. 最佳工艺验证结果

为验证正交设计试验中优化条件 C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>B<sub>2</sub>A<sub>3</sub> 的可靠性, 我们以 100 目石榴皮粉末, 60% 乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:60, 浸提 60 分钟, 超声 30 分钟, 3000 r/min 的转速条件下离心 10 min 为提取条件进行石榴皮总黄酮提取。将提取液的上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 经旋转蒸发浓缩除去有机溶剂, 超纯水定容浓缩液至 50 mL, 石油醚与提取液 1:1 比例分液萃取, 再次定容萃取液至 50 mL, 取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 超纯水定容, 摇匀。精密量取上述各量瓶中溶液 2 mL 于 10 mL 量瓶中, 按照 3.3 方法显色, 在 520 nm 下测定吸光度值, 根据标准曲线回归方程分析得出总黄酮提取率为 119.5 mg/g。

## 5. 讨论

石榴皮的品种、产地、实验室仪器设备、试验条件、操作人员等不同因素的影响, 可能导致同类试验结果存在差异。牛俊乐等采用了超声波乙醇浸提法获得普通胭脂红石榴的石榴皮中的总黄酮含量 148.09 mg/g [24], 但其超声时间较长, 不利于实际操作与仪器维护; 阮尚全等采用纤维素酶联合超声波协同提取攀枝花石榴皮总黄酮, 得到总黄酮提取率为 88.05 mg/g [26]; 唐丽丽等采用乙醇回流法提取石榴皮总黄酮, 提取率为 102.80 mg/g [26]。与阮尚全、唐丽丽等的研究结果综合比较, 本试验石榴皮中总黄酮提取技术操作简单, 可有效缩短提取时间, 提高生产效率。

## 6. 结论

本研究通过单因素试验和正交设计试验结果表明, 颗粒大小、提取溶剂百分数、料液比、浸提时间 4 个因素对石榴皮总黄酮提取率的影响为料液比>浸提时间>乙醇浓度>筛目; 确定了石榴皮总黄酮最佳提取工艺条件为: 颗粒大小为 100 筛目, 60% 乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:60, 浸提 60 分钟, 超声 30 分钟, 该条件下石榴皮总黄酮的提取率为 119.5 mg/g。

## 致 谢

感谢成都中医药大学 2018~2019 年大学生科研实践创新重点课题 ky-2019023 的支持; 感谢成都中医药大学校级教学改革建设项目 JGYB201972、JGYB201975 的支持; 感谢成都中医药大学校级核心课程《物理思维与科研素养》建设基金的支持。



## 参考文献

- [1] 柏杜文. 石榴皮的药用[J]. 农村新技术, 2019(4): 64.
- [2] 陈建雯, 杨剑兵, 吴双凤, 郭亚东. 石榴皮中化学成分及其生物活性研究进展[J]. 化学设计通讯, 2019(7): 144-145.
- [3] 买合木提·买买提, 热比耶姆·毛拉托, 合提吐逊古丽·撒塔尔, 艾克白尔·买买提. 传统维药石榴皮的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2017, 23(1): 54-57.
- [4] 刘素果, 任琪, 温媛媛, 等. 石榴果皮总黄酮的提取工艺[J]. 经济林研究, 2010, 28(3): 62-68.
- [5] 尤翠兰, 苏佩清. 黄酮类化合物降血压及其作用机制研究现状[J]. 河北中医药学报, 2007, 22(1): 41-43.
- [6] 闫恒, 张辉. 石榴化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国处方药, 2016, 14(2): 18.
- [7] 羊波, 应茵, 陈苓丽, 李承乐. 黄酮类化合物抗炎作用机制研究进展[J]. 中国药师, 2016, 19(7): 369-373.
- [8] 杨林. 石榴皮中黄酮抗自由基活性探究[J]. 南方农业, 2019, 13(5): 141.
- [9] 王晓娜, 刘少英, 王晓梅, 孟祥瑞, 杨素珍. 荷叶黄酮美白功效研究[J]. 日用化学品科学, 2019(5): 21-24.
- [10] 毕晓菲, 李勇. 石榴化学成分及其保健功能的研究进展[J]. 现代农业科技, 2010(22): 356-360.
- [11] 邵剑钢, 段奇, 李晓莉. 大豆异黄酮在军用功能食品中的应用[J]. 食品研究与开发, 2015(1): 145-147.
- [12] 占晨, 周琪, 刘光斌, 马雪, 喻健, 余云辉, 邹文莉, 毛宇, 黄长干. 天然野生植物葛根黄酮的提取及其在化妆品中的应用[J]. 应用化工, 2019(6): 1351-1353.
- [13] 杨肖, 陶威熔, 孙秀超, 古汉克孜·买买提, 肖平稳, 哈尼克孜·买买提依明. 石榴皮、籽、花中总黄酮的含量比较及体外抗氧化能力研究[N]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(11): 1455-1457.
- [14] 刘梦星, 刘祺凤, 田璐阳, 郝云辉, 马晶军. 石榴皮中总黄酮超声辅助提取及抗氧化性分析[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(4): 894-896.
- [15] 黄菊, 何伟平, 董黎明, 王晓辉. 微波辅助提取石榴皮黄酮及抗氧化活性研究[J]. 保鲜与加工, 2016(6): 92-97.
- [16] 何扩, 李玉锋, 张秀媛, 赵瑾. 超临界流体萃取银杏叶黄酮类物质的研究[J]. 山西食品工业, 2005(4): 2-5.
- [17] 万新焕, 陈新梅, 马山, 王继锋, 高雅, 周长征, 王立柱. 黄酮类化合物提取新方法的应用[J]. 中草药, 2019, 50(15): 3691-3699.
- [18] 张卫红, 吴晓霞, 马空军. 超声波技术强化提取天然产物的研究进展[J]. 现代化, 2013, 33(7): 26-29.
- [19] 杨林, 周本宏. 紫外可见分光光度法测定石榴皮中总黄酮含量[J]. 卫生职业教育, 2007(8): 144-145.
- [20] 吴进. 石榴皮粉理化性状研究及其提取物对红枣乳酸菌饮料品质影响[D]: [硕士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018: 1-57.
- [21] 吴苏喜, 吴美芳, 谢妍祥, 周青青, 谭传波, 张谦益. 油茶蒲不同溶剂粗提液的总黄酮提取率与抗氧化活性比较[J]. 中国油脂, 2019, 44(6): 116-123.
- [22] 库尔班江·巴拉提, 阿依努尔. 石榴皮总黄酮的提取及其体外抗氧化活性测定[J]. 伊犁师范学院学报(自然科学版), 2015, 9(3): 53-59.
- [23] 罗群, 李洁, 黄春萍. 石榴皮总黄酮超声波提取工艺的优化[J]. 南方农学报, 2013, 44(9): 1529-1533.
- [24] 牛俊乐, 黄斌, 黄秋月. 石榴皮中黄酮类化合物提取工艺优化及含量测定[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(4): 74-75.
- [25] 阮尚全, 陈蓉, 倪萍, 汪建红. 纤维素酶联合超声波协同提取攀枝花石榴皮总黄酮[J]. 内江师范学院学报, 2018, 33(10): 65-69.
- [26] 唐丽丽, 刘涓涓, 龙明华. 正交试验法优化石榴皮总黄酮的提取工艺[J]. 陕西农业科学, 2015, 61(9): 29-33.