

- [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 146-149.
- [9] 王永香, 米慧娟, 张传力, 等. Box-Behnken 响应面法优化热毒宁注射液金银花和青蒿(金青)的醇沉工艺研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 671-678.
- [10] 李喜香, 刘效栓, 刘维忠, 等. 姜石肠炎康颗粒醇沉工艺的星点设计-效应面法优化[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1887-1891.
- [11] 张南生, 孙卫军, 郭虹, 等. Box-Behnken Design 效应面法在制剂处方优化中的应用[J]. 中国医药导报, 2015, 12(23): 34-37.
- [12] Hao J F, Fang X S, Zhou Y F, et al. Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 683-692.
- [13] 李颖, 曾茂贵, 郑笈, 等. 星点设计-效应面法优化鱼腥草挥发油- β -环糊精包合物的制备工艺[J]. 中草药, 2014, 45(13): 1855-1862.

高橙皮中柠檬苦素超声提取工艺的优化

尤文挺¹, 江天¹, 王洒¹, 何龙¹, 杨诗奕², 李云岳³

(1. 温州医科大学附属温岭医院, 浙江温岭 317500; 2. 台州市肿瘤医院, 浙江温岭 317500; 3. 温岭市茗果高橙专业合作社, 浙江温岭 317500)

摘要: 目的 优化高橙皮中柠檬苦素的超声提取工艺。方法 在单因素试验的基础上, 以声强、乙醇体积分数、液料比、提取时间为影响因素, 柠檬苦素提取率为评价指标, 正交试验优化提取工艺。结果 最佳条件为声强 0.255 6 W/cm², 乙醇体积分数 70%, 料液比 30:1, 提取时间 30 min, 柠檬苦素提取率为 60.90 mg/100 g。结论 该方法合理可行, 可用于超声提取高橙皮中柠檬苦素。

关键词: 高橙皮; 柠檬苦素; 超声提取; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2020)05-1301-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.05.036

温岭高橙是浙江省温岭市传统的柑橘类品种, 早在明代嘉靖《太平县志》中就有其种植的记载, 其栽培历史至少有 470 年以上, 我国著名园艺学家吴耕民教授曾专门考证并推定它为葡萄柚原生种^[1]。温岭高橙果实风味独特、酸甜适中、略带苦味, 当地人认为它具有清热降火、醒酒护肝等功效, 深受该市及周边地区消费者的喜爱^[2], 但在日常食用过程中其果皮和种子往往被丢弃, 不仅易造成生态环境污染, 更让柠檬苦素这种具有潜在药用价值的生物活性物质白白浪费, 造成极大的损失。

柠檬苦素是存在于芸香科、楝科植物中的一类三萜类化合物^[3-4], 在柑橘中含有量最高, 具有抗癌、抗氧化、抗炎、抗疟疾、抗病毒、抗菌、神经保护、改善骨质量等生物活性^[5-6], 随着相关研究的深入, 如何从植物中提取该成分也越来越受研究者的关注。超声提取作为一种新技术, 它与传统溶剂提取相比可利用超声波产生的搅拌、强烈振动、高加速度、热效应、空化效应等作用来有效破坏植物细胞壁, 加速细胞内活性成分进入提取溶剂, 从而提高提取效率, 缩短提取时间, 节约溶剂, 并且避免高温对提取

成分的破坏^[7]。因此, 本实验超声提取高橙皮中柠檬苦素, 并在单因素试验基础上, 采用正交试验对其工艺进行优化, 以期筛选出一种高效经济的提取方法, 为今后相关工业化应用提供一定的参考。

1 材料

1.1 仪器 DHG-9 423 A 鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); FW-135 植物粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); SK2510HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); E-UEC-200I 超声波声强测量仪(杭州成功超声电源技术有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器、SHZ-III 真空泵(上海亚荣生化仪器厂); Waters 2695 HPLC 色谱仪、Waters 2487 紫外检测器(美国 Waters 公司); DU800 紫外/可见光分光光度计(美国 Beckman 公司); BS110S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司); PHS-3C 型精密 PH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.2 试剂与药物 新鲜高橙于 2015 年 12 月由温岭国庆塘高橙场、温岭坞根茗果高橙专业合作社提供, 丢弃过度成熟和有损坏者, 符合要求者通过手工剥皮并切碎, 将皮置

收稿日期: 2019-08-10

基金项目: 温岭市科技计划项目(2015C213025)

作者简介: 尤文挺(1986—), 男, 硕士生, 主管药师, 从事中药药理学、神经药理学研究。Tel: (0576) 89668008, E-mail: youwenting2012@126.com

于 45 °C 干燥箱中干燥至恒定质量，植物粉碎机粉碎，筛选出 40~100 目粒度放入密封样品袋中，置于干燥器内保存备用。柠檬苦素对照品（美国 Sigma-Aldrich 公司）。乙腈为色谱纯（德国 Merck 公司）；乙醇、二氯甲烷为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 超声提取在超声波清洗器中进行，最大输入功率为 250 W，工作频率为 53 kHz。取高橙皮 5.0 g，置于 250 mL 锥形瓶中，加入适当体积不同体积分数的乙醇，悬空置于离底面 3 cm 高度的位置，在 53 kHz 频率、不同参数下提取。同时，锥形瓶在超声波清洗器自带的温度控制系统中保持对应的恒温，提取后抽滤，滤液在旋转蒸发至无醇味，100 mL 二氯甲烷分 3 次萃取，保留并合并二氯甲烷相，45 °C 下旋转蒸发至干，瓶壁残渣用乙腈定容至 10 mL，过 0.45 μm 疏水膜，即得。

2.2 对照品溶液制备 精密称取柠檬苦素对照品 10.0 mg，乙腈定容，制成 1.0 mg/mL 贮备液，取适量依次稀释成 0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/mL，即得。

2.3 柠檬苦素含量测定

2.3.1 色谱条件 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 保护柱（4.6 mm×12.5 mm）；流动相乙腈-水，等度洗脱（45：55）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 °C；检测波长 210 nm；进样量 10 μL。色谱图见图 1。

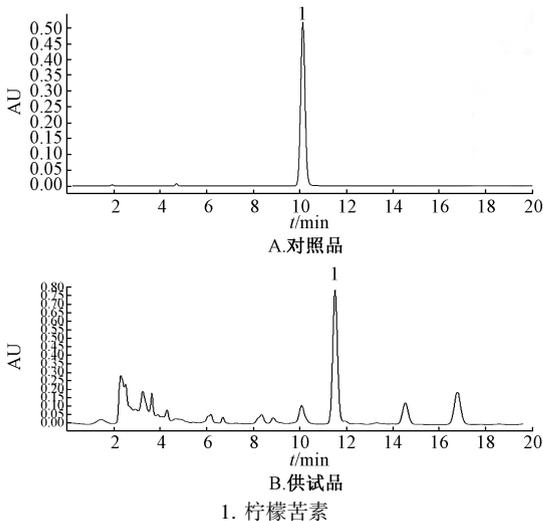


图 1 柠檬苦素 HPLC 色谱图

2.3.2 线性关系考察 将“2.2”项下对照品溶液在“2.3.1”项色谱条件下平行进样测定 5 次，以溶液质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得方程为 $Y = 7\,017\,548.627X - 7\,854.429$ ($R^2 = 0.999\,992$)，在 0.025~1.0 mg/mL 范围内线性关系良好。另外，该方程检测限为 1.793 μg/mL，定量限为 5.435 μg/mL。

2.3.3 精密度试验 取“2.2”项下同一对照品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下平行进样测定 6 次，每次 10 μL，测得柠檬苦素峰面积 RSD 为 0.61%，表明仪器精密度

良好。

2.3.4 稳定性试验 取“2.2”项下一对照品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下每隔 4 h 连续进样测定 6 次，每次 10 μL，测得柠檬苦素峰面积 RSD 为 1.7%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批供试品溶液 6 份，在“2.2.1”项下色谱条件进样测定，每次 10 μL，测得柠檬苦素峰面积 RSD 为 2.3%，表明该方法重复性良好。

2.3.6 柠檬苦素提取率测定 精密吸取“2.1”项下供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，计算提取率，公式为提取率 (mg/100 g) = $C \times V / M \times 100$ ，其中 C 为柠檬苦素含量 (mg/mL)，V 为定容体积 (mL)，M 为干燥高橙皮质量 (g)，平行 3 份，取平均值。

2.4 单因素试验 固定乙醇体积分数 70%、液料比 20：1、提取时间 60 min，考察不同功率（150、175、200、225、250 W）下不同声强（0.049 5、0.098 6、0.159 5、0.255 6、0.384 0 W/cm²）对柠檬苦素提取率的影响；固定声强 0.159 5 W/cm²、液料比 20：1、提取时间 60 min，考察不同乙醇体积分数（50%、60%、70%、80%、90%）对该成分提取率的影响；固定声强 0.159 5 W/cm²、乙醇体积分数 70%、提取时间 60 min，考察不同液料比（10：1、15：1、20：1、25：1、30：1）对该成分提取率的影响；固定声强 0.159 5 W/cm²、乙醇体积分数 70%、液料比 20：1，考察不同提取时间（30、45、60、75、90 min）对该成分提取率的影响。

2.5 正交试验 在单因素试验基础上，选择声强（A）、乙醇体积分数（B）、液料比（C）、提取时间（D）作为影响因素，柠檬苦素提取率作为评价指标，采用 L₉(3⁴) 正交试验优化提取工艺。因素水平见表 1，结果见表 2，方差分析见表 3。

表 1 因素水平

水平	A 声强/(W·cm ⁻²)	B 乙醇/%	C 液料比	D 提取时间/min
1	0.159 5	50	10：1	30
2	0.255 6	70	20：1	60
3	0.384 0	90	30：1	90

表 2 试验设计与结果 (n=3)

水平	A	B	C	D	柠檬苦素提取率/(mg·100 g ⁻¹)
1	1	1	1	1	40.48
2	1	2	2	2	50.78
3	1	3	3	3	39.91
4	2	1	2	3	54.49
5	2	2	3	1	57.17
6	2	3	1	2	34.95
7	3	1	3	2	49.43
8	3	2	1	3	43.35
9	3	3	2	1	37.80
均值 1	43.723	48.133	39.593	45.150	—
均值 2	48.870	50.433	47.690	45.053	—
均值 3	43.527	37.553	48.837	45.917	—
极差	5.343	12.880	9.244	0.864	—

表3 方差分析

因素	离均差平方和	自由度	F比	F临界值	P值
A	55.078	2	41.042	19.000	<0.05
B	283.121	2	210.969	19.000	<0.05
C	152.310	2	113.495	19.000	<0.05
D	1.342	2	1.000	19.000	>0.05
E(误差)	1.34	2	—	—	—

由表2可知,各因素影响程度依次为 $B>C>A>D$,即乙醇体积分数>液料比>声强>提取时间;由表3可知,因素A、B、C有显著影响($P<0.05$),最优工艺为 $A_2B_2C_3D_3$,但由于D无显著影响($P>0.05$),并考虑到时间和成本,故将其修正为 $A_2B_2C_3D_1$,即声强0.2556 W/cm²,乙醇体积分数70%,液料比30:1,提取时间30 min。

2.6 验证试验 按“2.5”项下优化工艺进行3批平行验证试验,测得柠檬苦素提取率分别为61.87、59.82、61.01 mg/100 g,平均60.90 mg/100 g,表明工艺合理可行,可大大节约提取时间。

3 讨论

本实验发现,50%乙醇超声提取后高橙干燥皮中微粒会吸附大量提取液而出现膨胀,导致难以过滤,之后旋转蒸发至无醇味的提取液在萃取时出现了乳化现象,使得提取液损耗严重,从而降低了柠檬苦的提取率。相关研究表明^[8],造成上述现象的原因是由于在水比例相对较高的提取液中和超声、加热环境下,果皮组织样品吸水膨胀加剧,果胶提取率显著增加,而提取液中果胶具有良好的乳化能力;在醇比例较高的提取液中(90%),由于果胶溶于水而难溶于乙醇,高体积分数乙醇给提取体系带来的溶解效益越来越小,果胶开始从溶液主体中沉淀下来^[9],附着在高橙皮微粒的表面,阻碍柠檬苦素扩散,导致其提取率急剧下降。因此,合适的乙醇体积分数对于提取率的提高优化至关重要。

液料比对天然药物提取过程具有重要影响,由Fick扩散第二定律推导出的动力学模型分析可得,液料比较低时,有效成分溶解不充分,溶液过早进入饱和;液料比较高时,有效成分快速溶解,可提高扩散速度^[10-11]。在工艺优化过程中发现,相对较小的液料比(10:1)会导致柠檬苦素在提取液中的含有量相对较高,而与高橙皮细胞液之间的浓度差较小,不利于物质扩散,进而降低提取效率;当液料比增加,浓度差扩大时,可加速柠檬苦素扩散,从而提取率得到改善。

本实验发现,不同功率下声强变化对超声提取高橙皮中柠檬苦素的影响并不占主导地位。一般情况下,超声波

清洗器在功率范围内的声强条件下通常可产生稳态空化作用,加上超声的搅拌和传质能力^[12],能有效击破高橙植物细胞壁,加速细胞内容物的释放和提取^[13],从而增加柠檬苦素提取率。然而,研究中超声清洗器功率有限,无法观察到更大声强对提取的影响,可能制约了声强因素对提取的影响程度。

综上所述,本实验优化的高橙皮中超声提取柠檬苦素工艺经济高效,以期为今后相关工业化应用提供一定的参考。

参考文献:

- [1] 吴耕民. 葡萄柚原生地的探讨[J]. 浙江柑桔, 1987(3): 1-2; 5.
- [2] 陈正连, 王涛. 温岭高橙标准化生产技术[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2014: 1-4.
- [3] 孙崇德, 陈昆松, 陈青俊, 等. 柑桔果实中天然柠檬苦素和诺米林的提取、鉴别与检测[J]. 中国食品学报, 2004, 4(1): 6-11.
- [4] 廖明华. 泰国红树植物 *Xylocarpus granatum* 的柠檬苦素研究[D]. 广州: 暨南大学, 2016.
- [5] Tundis R, Loizzo M R, Menichini F. An overview on chemical aspects and potential health benefits of limonoids and their derivatives[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54(2): 225-250.
- [6] 尤文挺, 王洒, 何龙, 等. 柠檬苦素单体的药理活性研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(1): 242-246.
- [7] Chemat F, Zill-e-Huma, Khan M K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction[J]. *Ultrason Sonochem*, 2011, 18(4): 813-835.
- [8] Xu Y T, Zhang L F, Bailina Y, et al. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel[J]. *J Food Eng*, 2014, 126: 72-81.
- [9] 储君, 王海鸥. 乙醇沉淀法提取柚皮果胶的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18): 7526-7528.
- [10] 苏辉. 天然药物有效成分提取过程的动力学模型[D]. 重庆: 重庆大学, 2012.
- [11] 曹雁平, 矫庆泽. 粒度、液料比和乙醇体积分数对姜黄素超声间歇浸取的影响[J]. 北京理工大学学报, 2010, 30(8): 1000-1004.
- [12] 栾振威. 超声空化与固体颗粒交互作用机理[D]. 天津: 天津大学, 2015.
- [13] Xu Y, Pan S Y. Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.) [J]. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20(4): 1026-1032.