

响应面法优化橘核中3种柠檬苦素类成分的超声辅助提取工艺

郁林娜¹, 程盛勇¹, 付洋¹, 鲁文琴², 刘兴赋¹, 罗喜荣^{1,*}, 杨军³

(1. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵州 贵阳 550004;
3. 中国科学院 地球化学研究所, 贵州 贵阳 550081)

摘要: 研究橘核中3种柠檬苦素类成分的超声提取辅助工艺。根据单因素试验结果, 采用响应面法对提取工艺进行优化。结果显示优化提取工艺为甲醇作提取溶剂、提取时间40 min、提取温度33℃、液料比13:1 (mL/g), 在此条件下柠檬苦素类成分总得率为11.804 5 mg/g, 与模型预测值11.756 9 mg/g基本一致, 该方法可用于提取橘核中的柠檬苦素、诺米林和黄柏酮。

关键词: 橘核; 柠檬苦素; 诺米林; 黄柏酮; 响应面法

Optimization of the Ultrasonic-assisted Extraction Process of Three Limonoids Constituents in Citrus Seed by Response Surface Methodology

YU Lin-na¹, CHENG Sheng-yong¹, FU Yang¹, LU Wen-qin², LIU Xing-fu¹, LUO Xi-rong^{1,*}, YANG Jun³

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;
2. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081, Guizhou, China)

Abstract: The optimum ultrasonic-assisted extraction technology of three limonoids constituents from citrus seed was investigated. According to the results of single factor test, the response surface method was used to optimize the extraction process. The optimum test conditions were as follow: the best solvent system was methanol, extraction time 40 min, temperature 33℃, and liquid-solid ratio 13:1 (mL/g). In verification test, the extraction yield of three limonoids constituents in citrus seed was 11.804 5 mg/g, basically consistent with the total rate of predicted value was 11.756 9 mg/g. The response surface method was feasible to optimize the extraction technology of limonin, nomilin and obacunone in citrus seed.

Key words: citrus seed; limonin; nomilin; obacunone; response surface method

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2013]2037号); 贵州省社发攻关项目(黔科合SY字[2015]3032号); 贵州省联合基金项目(黔科合LH字[2014]7091号)

作者简介: 郁林娜(1994—), 女(满), 硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型新技术及药代动力学。

* 通信作者: 罗喜荣(1973—), 女(汉), 教授, 硕士生导师, 研究方向: 药物新剂型及天然药物化学。

[11] 章超桦, 薛长湖. 水产食品学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2010: 246

[12] TROUT G R. Water binding ability of meat products: effects of fat levels, effective salt concentration and cooking temperature[J]. Food

Sci, 1986, 51 (4): 1061-1062

[13] 张吴平, 杨坚. 食品试验设计与统计分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2017: 82

收稿日期: 2018-07-25

引文格式:

郁林娜,程盛勇,付洋,等. 响应面法优化橘核中3种柠檬苦素类成分的超声辅助提取工艺[J].食品研究与开发,2019,40(5):133-137

YU Linna, CHENG Shengyong, FU Yang, et al. Optimization of the Ultrasonic-assisted Extraction Process of Three Limonoids Constituents in Citrus Seed by Response Surface Methodology[J].Food Research and Development, 2019, 40(5): 133-137

柠檬苦素类化合物是存在于芸香科和楝科植物中的四环三萜类次生代谢产物,在柑橘类果实的核、内果皮和囊衣等部位均有分布,以果核中含量最高(1%左右),主要为柠檬苦素、诺米林和黄柏酮,是引起柑橘味苦的重要原因之一。柠檬苦素类化合物可增强体内谷胱甘肽S转移酶(glutathione S-transferase, GST)的活性,能抑制由化学物质引起的口腔癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌等肿瘤,具有镇痛消炎、抗疟、抗焦虑、抗高血压、抗菌、抗病毒、杀虫等作用,被认为是潜在的防癌剂,作为功能性食品配料和医药原料具有良好的开发应用前景^[1-7]。

目前国内外有关柠檬苦素的提取研究较多,鲜见诺米林的提取研究报道,尚未见柠檬苦素、诺米林和黄柏酮同时提取的文献报道^[8-10]。本文以柠檬苦素、诺米林和黄柏酮总得率为响应指标,采用Box-behnken响应面法优化超声辅助提取工艺,以期对柠檬苦素类化合物的开发利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

橘核:产自浙江衢州,粉碎并过60目筛,30倍量石油醚回流脱脂后干燥备用;柠檬苦素、诺米林标准品(纯度均>98%):贵州医科大学药学院天然产物实验室自制;黄柏酮标准品(批号116A022,纯度>98%):北京索莱宝科技有限公司;乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

Agilent 1290 DAD 超高效液相色谱仪:美国Agilent公司;UC-10H 加热超声波清洗器:上海泰坦科技股份有限公司;SHZ-C 水浴恒温振荡器:上海浦东物理光学仪器厂;TGL-16G 高速台式离心机:上海安亭科学仪器厂;BSA224S 电子天平:赛多利斯科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 柠檬苦素类成分的含量测定

1.2.1.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate AQ-C₁₈ (2.1 mm×100 mm);流动相:乙腈-水(45:55,体积比);柱温:30℃;流速:

0.21 mL/min;检测波长:210 nm;进样量:0.8 μL。

1.2.1.2 标准品溶液制备

取柠檬苦素、诺米林、黄柏酮标准品适量置10 mL量瓶,加甲醇溶解、定容,制得标准储备液,采用逐级稀释法配制系列标准工作溶液,按“1.2.1.1”项下条件检测。

1.2.1.3 供试品溶液制备

取橘核粉3.00 g置100 mL具塞锥形瓶,加入溶剂混匀、称重,于不同温度下超声辅助提取一定时间后冷却、称重并补足减失的重量、过滤。取供试品溶液按“1.2.1.1”项下条件检测,根据标准曲线测定柠檬苦素、诺米林、黄柏酮浓度,计算柠檬苦素类成分总得率 $Y=Y_1+Y_2+Y_3$ 。

1.2.2 单因素试验设计

以柠檬苦素类成分总得率为评价指标,固定其他条件不变,分别考察不同提取溶剂(石油醚、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、异丙醇、无水乙醇、95%乙醇、甲醇、乙腈、水)、提取时间(10 min~90 min)、提取温度(20℃~60℃)、液料比[5:1 (mL/g)~25:1 (mL/g)]对柠檬苦素类成分提取的影响,确定工艺优化取值范围。

1.2.3 响应面试验设计

根据单因素试验结果,选择提取时间、提取温度、液料比为考察因素,以柠檬苦素类成分总得率 $Y/(mg/g)$ 为响应指标,采用Box-behnken响应面法设计三因素三水平试验方案优化工艺条件,见表1。

表1 试验因素编码及水平

Table 1 Code and level of experimental factors

水平	A 提取时间/min	B 提取温度/℃	C 液料比/(mL/g)
-1	10	20	5:1
0	30	30	10:1
1	50	40	15:1

2 结果与分析

2.1 柠檬苦素类成分的含量测定

2.1.1 专属性

取标准品溶液和供试品溶液按“1.2.1.1”项下条件检测,结果见图1。

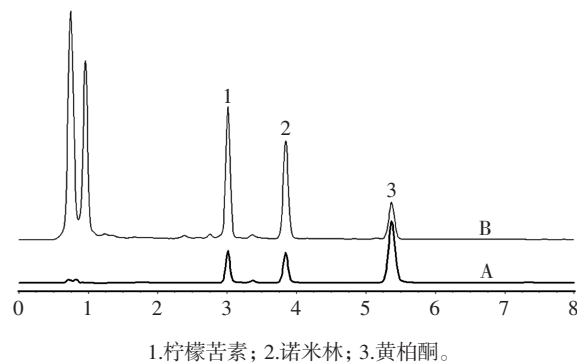


图1 标准品(A)和供试品(B)超高效液相色谱图
Fig.1 Ultra performance liquid chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

由图1可知柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的保留时间分别为3.07、3.95、5.54 min,各色谱峰完全分离且无杂质峰干扰,表明方法专属性良好。

2.1.2 标准曲线

以浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的回归方程分别为: $Y_1=1.965\,5X-13.268\,0$ ($3.71\,\mu\text{g/mL}\sim 1\,900\,\mu\text{g/mL}$, $R^2=0.999\,5$); $Y_2=1.786\,1X-9.153\,2$ ($2.93\,\mu\text{g/mL}\sim 1\,500\,\mu\text{g/mL}$, $R^2=0.999\,8$); $Y_3=4.588\,0X-40.065\,0$ ($3.71\,\mu\text{g/mL}\sim 950\,\mu\text{g/mL}$, $R^2=0.999\,4$)。

2.2 单因素试验

提取溶剂、提取时间、提取温度和液料比对柠檬苦素类成分总得率的影响见图2。

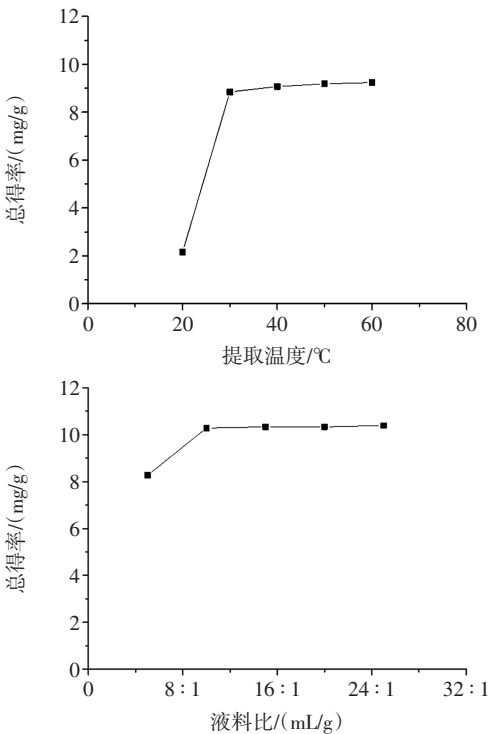
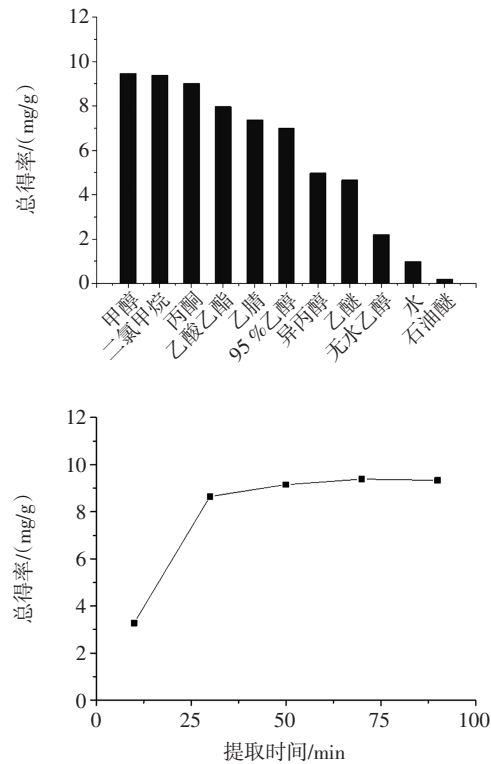


图2 各因素对柠檬苦素类成分总得率的影响
Fig.2 Effects of each factor on extraction yield of three limonoids constituents in citrus seed

由图2可知,以甲醇作提取溶剂时,柠檬苦素类成分总得率最高;随着提取时间延长、提取温度升高、液料比增加,柠檬苦素类成分总得率均先增幅明显,随之变缓并趋于平稳,说明目标物质的溶出基本完全,故确定提取时间、提取温度、液料比的最佳取值范围分别为10 min~50 min、20 °C~40 °C、5:1 (mL/g)~15:1 (mL/g)。

2.3 响应面试验

2.3.1 试验结果及回归模型分析

响应面试验结果见表2,回归模型的方差分析见表3。

表2 响应面试验设计及结果
Table 2 Experimental design and results of response surface

试验号	A/min	B/°C	C/(mL/g)	$Y_1/$ (mg/g)	$Y_2/$ (mg/g)	$Y_3/$ (mg/g)	$Y/$ (mg/g)
1	10	20	10	3.560 9	2.913 0	0.709 1	7.183 1
2	50	20	10	4.632 1	4.207 9	1.016 0	9.856 0
3	10	40	10	4.430 1	4.165 1	0.813 2	9.408 4
4	50	40	10	5.078 0	4.296 2	0.852 0	10.226 2
5	10	30	5	3.261 1	3.166 0	0.568 4	6.995 5
6	50	30	5	3.421 9	3.963 9	0.856 2	8.242 0
7	10	30	15	3.969 0	3.591 4	0.969 1	8.529 5
8	50	30	15	5.862 2	4.699 3	0.988 6	11.550 1
9	30	20	5	3.225 1	3.400 0	0.636 0	7.261 1
10	30	40	5	4.000 8	4.101 0	0.691 2	8.793 0

续表 2 响应面试验设计及结果

Continue table 2 Experimental design and results of response surface

试验号	A/min	B/°C	C/(mL/g)	Y ₁ /(mg/g)	Y ₂ /(mg/g)	Y ₃ /(mg/g)	Y/(mg/g)
11	30	20	15	4.285 0	3.987 1	0.892 1	9.164 2
12	30	40	15	5.160 1	4.577 8	0.925 1	10.662 9
13	30	30	10	5.450 2	4.550 6	0.840 6	10.841 4
14	30	30	10	5.659 0	4.810 3	0.920 0	11.389 2
15	30	30	10	5.700 9	4.663 0	0.876 0	11.240 0

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for fitted quadratic polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	33.91	9	3.77	46.83	0.000 3
A	7.52	1	7.52	93.50	0.000 2
B	3.96	1	3.96	49.18	0.000 9
C	9.28	1	9.28	115.31	0.000 1
AB	0.86	1	0.86	10.69	0.022 2
AC	0.79	1	0.79	9.78	0.026 0
BC	0.000 3	1	0.000 3	0.003 4	0.955 6
A ²	4.19	1	4.19	52.02	0.000 8
B ²	3.15	1	3.15	39.16	0.001 5
C ²	5.89	1	5.89	73.19	0.000 4
误差	0.40	5	0.080		
失拟	0.24	3	0.081	1.01	0.533 7
纯误差	0.16	2	0.080	R ² = 0.988 3	
合计	34.31	14		R ² _{Adj} = 0.967 2	

应用 Design Expert 10.0.7 软件对表 2 数据进行完全二次方程拟合,得柠檬苦素类成分总得率的回归方程: $Y = -11.127 7 + 0.233 4A + 0.695 8B + 1.097 6C - 0.002 3AB + 0.004 4AC - 0.000 3BC - 0.002 7A^2 - 0.009 2B^2 - 0.050 5C^2$ 。由表 3 可知模型 $P < 0.01$, 表明该模型极显著;失拟项 $P > 0.05$ 不显著,说明试验误差小; $R^2 = 0.988 3$, $R^2_{Adj} = 0.967 2$, 表明该模型拟合度良好;A、B、C 和 A^2 、 B^2 、 C^2 对柠檬苦素类成分提取影响极显著,AB、AC 对柠檬苦素类成分提取影响显著。

2.3.2 响应曲面分析与优化

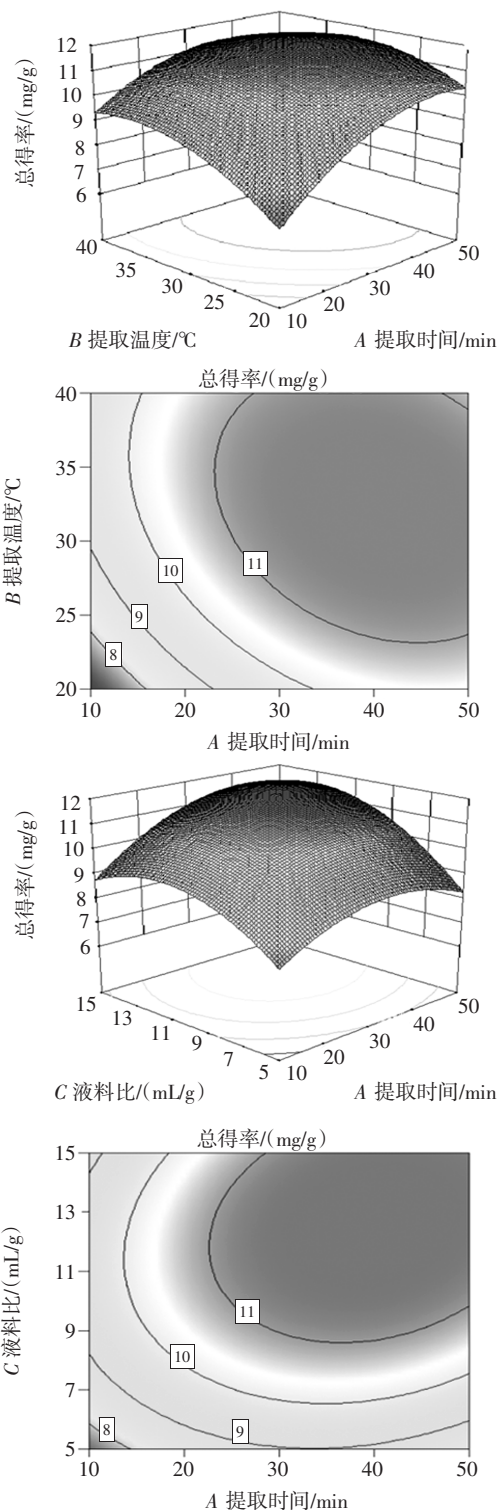
采用 Design Expert 10.0.7 软件绘制响应面图和等高线图,见图 3。

由图 3 响应面图可知液料比对柠檬苦素类成分提取影响最为显著,表现为曲面较陡,提取时间影响次之,提取温度相对影响最小;由图 3 等高线图可知,提取时间和提取温度交互作用对柠檬苦素类成分提取影响最大,表现为等高线呈较扁的椭圆形,提取时间和液料比交互作用影响次之,提取温度和液料比交互作用影响较小。通过 Design Expert 10.0.7 软件分析,

得到柠檬苦素类成分最佳提取工艺条件:提取时间 39.99 min、提取温度 32.56°C、液料比 12.54 : 1 (mL/g)。

2.3.3 验证试验

为方便实际操作将最佳提取工艺参数调整为提取时间 40 min、提取温度 33 °C、液料比 13 : 1 (mL/g), 经 3 次验证试验,柠檬苦素类成分平均总得率为 11.804 5 mg/g, 与模型预测值 11.756 9 mg/g 的偏差为



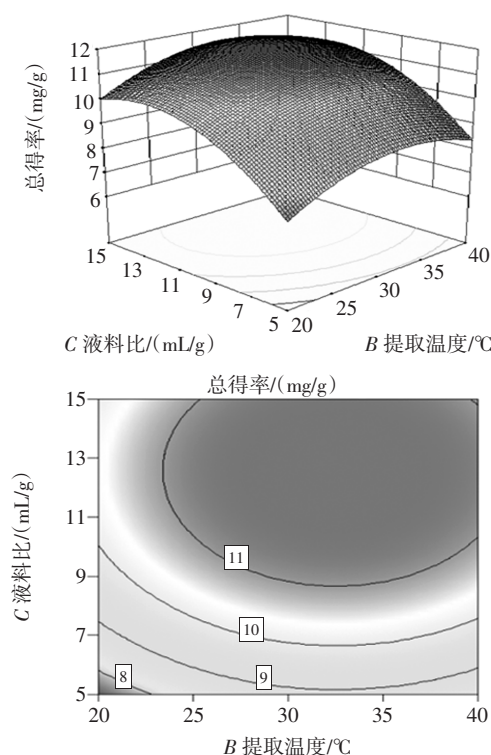


图3 各因素对柠檬苦素类成分总得率影响的响应面和等高线图

Fig.3 Responsive surface and contour of effects of each factor on extraction yield of three limonoids constituents in citrus seed

0.404 9%,表明该模型预测性良好,具有实用价值。取优化条件供试品溶液回收甲醇得干燥品,按“1.2.1”项下方法测得柠檬苦素类物质纯度 72.642 5%,其中柠檬苦素 36.599 4%、诺米林 29.662 8%、黄柏酮 6.380 3%,表明基于该工艺可有效获得高纯度柠檬苦素类化合物。

3 结论

我国柑橘资源丰富,其产量居世界首位,但柑橘加工业还十分落后,大量的副产物没有合理利用,特别是橘核由于味苦,通常被当作生活垃圾丢弃。若能高效合理地提取柠檬苦素类化合物,并将其投至食品医药行业发展,将会带来显著的经济和社会效益。

超声辅助提取是常用的中药提取方法,具有快速、高效、环保,且设备简单、操作方便等特点^[17]。本文应用响应面法首次建立了橘核中3种柠檬苦素类成分的超声辅助提取方法,得到优化提取工艺条件为甲醇作提取溶剂、提取时间 40 min、提取温度 33℃、液料比 13:1 (mL/g),此条件下柠檬苦素类成分总得率为 11.804 5 mg/g,产物中柠檬苦素类物质纯度高,有利于柠檬苦素、诺米林和黄柏酮的后续单体纯化,对其新型保健食品和新药研发有重要意义。本工艺具有经济、高效、合理、重复性好等特点,用于柑橘果

实中柠檬苦素类化合物的提取切实可行,为柠檬苦素类化合物的进一步开发利用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Yao J L, Liu J T, Zhao W S. By blocking hexokinase-2 phosphorylation, limonin suppresses tumor glycolysis and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2018, 11: 3793-3803
- [2] Hassan NA, Bassossy HME, Fahmy A, et al. Limonin alleviates macro- and micro-vascular complications of metabolic syndrome in rats: A comparative study with azelmidipine[J]. *Phytomedicine*, 2018, 43: 92-102
- [3] Wang S C, Yang Y, Liu J, et al. Discovery of novel limonin derivatives as potent anti-inflammatory and analgesic agents[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2018, 16(3): 231-240
- [4] Jin S W, Wang J Q, Chen S Y, et al. A novel limonin derivate modulates inflammatory response by suppressing the TLR4/NF- κ B signalling pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 100: 501-508
- [5] Kim J, Chakraborty S, Jayaprakasha GK, et al. Citrus nomilin down-regulates TNF- α -induced proliferation of aortic smooth muscle cells via apoptosis and inhibition of IkB[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 811: 93-100
- [6] Kimira Y, Taniuchi Y, Nakatani S, et al. Citrus limonoid nomilin inhibits osteoclastogenesis in vitro by suppression of NFATc1 and MAPK signaling pathways[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(12): 1120-1124
- [7] 石慧,王喜军.柠檬苦素类化合物的药理作用研究进展[J]. *中医药学报*, 2014, 42(4): 128-129
- [8] 杨军,余德顺,范菊娣,等.超临界二氧化碳萃取桔核中柠檬苦素的工艺研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(4): 934-935
- [9] 罗喜荣,范菊娣,莫彬彬,等.超临界二氧化碳萃取橘核中诺米林的工艺研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(8): 74-76
- [10] Liu Z Z, Zu Y G, Yang L. A process to preserve valuable compounds and acquire essential oils from pomelo flavedo using a microwave irradiation treatment[J]. *Food Chemistry*, 2017, 224: 172-180
- [11] Yang Y F, Zhang L Z, Du X P, et al. Recovery and purification of limonin from pummelo [Citrus grandis] peel using water extraction, ammonium sulfate precipitation and resin adsorption[J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1060: 150-157
- [12] 张声源,邹浩元,杨宇辉,等.响应面法优化金柚核中类柠檬苦素的提取工艺[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(9): 65-69
- [13] 张霞忠,王丹,董垠红,等.中心组合设计优化超声提取柠檬籽中的柠檬苦素[J]. *中成药*, 2016, 38(7): 1500-1504
- [14] 范杰平,戴娟娟,郑兵.从吴茱萸中提取和简易分离柠檬苦素[J]. *南昌大学学报(工科版)*, 2017, 39(3): 241-245
- [15] 张贝,白卫东,冯卫华,等.柠檬皮中柠檬苦素的提取及其抑菌稳定性研究[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(10): 150-152
- [16] 张小雯,彭颖,何婉莺,等.星点设计-效应面法优化枳椇内果皮柠檬苦素提取工艺[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(10): 169-173
- [17] 董翠英,陈娟.超声提取植物药有效成分的研究进展[J]. *中成药*, 2017, 39(7): 1473-1477

收稿日期:2018-08-15