

超临界二氧化碳萃取桔核中柠檬苦素的工艺研究

杨 军¹, 余德顺¹, 范菊娣², 罗喜荣^{2*}

(1. 中国科学院地球化学研究所, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 探讨超临界 CO₂ 萃取桔核中柠檬苦素的优化工艺条件。方法 采用响应曲面法考察萃取压力、萃取温度、夹带剂量对柠檬苦素萃取量的影响。结果 优化萃取条件为:萃取压力 30 MPa, 萃取温度 52℃, 夹带剂量 1.8 ml/g。结论 该方法简便准确, 预测性好。

关键词:桔核; 柠檬苦素; 超临界 CO₂ 萃取; 响应曲面法

中图分类号:R284.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1008-0805(2010)04-0934-02

柠檬苦素(limonin)及其类似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,尤其在柑桔属中含量较丰富,以种子中含量最高。柠檬苦素的生物活性与其高度氧化的三萜醇类诱导体结构相关,具有 C-14、C-15 位向的环氧化物特征,可抑制由化学物质引起的肝癌、结肠癌、乳腺癌、口腔癌和皮肤癌等多种肿瘤,具有镇痛、抗炎、抗焦虑、改善睡眠、解毒、驱虫等作用,所体现出的功能性在医药中具有很大的开发潜力^[1]。当前国内已有医药企业正在申报柠檬苦素 1 类中药新药。

有研究表明,加工处理过程会使柠檬苦素类似物的结构发生变化,甚至造成活性丧失。影响柠檬苦素活性和稳定性的因素主要有温度、pH 值及与光和空气接触的时间等。在 45~80℃ 柠檬苦素的降解速率依次升高,80℃ 时每天的降解速率是 45℃ 时的 1.4 倍^[2]。目前柠檬苦素的主要提取方法有热提取法和浸泡提取法,但存在工艺流程长、费时、耗费溶剂、重现性差、提取效率低等不足,且所用丙酮、二氯甲烷等溶剂有毒,易对环境 and 操作人员造成危害^[3]。超临界 CO₂ 萃取技术具有步骤简单、选择分离效果好、提取率高、产物无溶剂残留、有利于热敏性物质的萃取等优点,已广泛应用于香料及中草药成分的提取。本文采用 Box - Behnken 响应曲面法对超临界 CO₂ 萃取桔核中柠檬苦素工艺进行优化,寻找最佳工艺条件,为进一步规模化提取柠檬苦素奠定基础。

1 材料与仪器

桔核购于成都荷花池药材市场,破碎成 20 目颗粒备用;柠檬苦素标准品(美国 Sigma 公司);4L 超临界萃取装置(自行研制);HP1100 高效液相色谱仪(美国惠普公司);所用化学试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 柠檬苦素的提取 采用 Box - Behnken 响应曲面设计法,以萃取压力、萃取温度、夹带剂量[夹带剂体积(ml)/桔核原料重量(g)]为自变量,以柠檬苦素萃取量(mg/g)为响应指标设计 3 因素 3 水平实验方案,实验因素编码及水平设计见表 1。

取桔核粉 200 g 置于超临界萃取器,设定萃取时间为 1 h, CO₂ 流量为 20 L/h,解析压力为 5MPa,解析温度为 60℃。当达到预定温压条件,启动夹带剂泵,定量打入 95% 乙醇,萃取过程中从解析器收集萃取液,实验结束后滤去桔核油减压回收乙醇,真空干燥得黄绿色固体。

收稿日期:2009-05-01; 修订日期:2009-11-26

基金项目:贵州省科技基金项目(No. [2001]3002);

贵州省工业攻关项目(No. GY[2007]3059)

作者简介:杨 军(1972-),男(苗族),贵州松桃人,现任中国科学院地球化学研究所助理研究员,硕士学位,主要从事生物资源开发利用及超临界流体技术研究工作。

* **通讯作者简介:**罗喜荣(1973-),女(汉族),贵州松桃人,现任贵阳医学院副教授,硕士学位,主要从事天然药物的提取及其药理学研究工作。

表 1 实验因素编码及水平

| 因素 | 编码 | 水平 | | |
|-------------------------|----------------|----|-----|----|
| | | -1 | 0 | 1 |
| 萃取压力/MPa | X ₁ | 22 | 27 | 32 |
| 萃取温度/℃ | X ₂ | 40 | 50 | 60 |
| 夹带剂量/ml·g ⁻¹ | X ₃ | 1 | 1.5 | 2 |

2.2 柠檬苦素含量的测定^[4] 标准品的配制:准确称取柠檬苦素标准品 2.0 mg,用甲醇溶解定容至 10 ml 配制成 0.2 mg/ml 的标准溶液。

色谱条件:色谱柱为 C₁₈ 柱,流动相为乙腈: 甲醇: 磷酸缓冲液(0.03 mol/L) = 10: 40: 39(V/V),流速 1.0 ml/min,检测波长 210 nm,柱温为室温,进样量为 20 μl。

以标样的保留时间和峰面积进行定性、定量计算萃取物中柠檬苦素含量及萃取量(Y)。Y = 萃取物中柠檬苦素含量(mg)/桔核原料重量(g)

3 结果与讨论

3.1 实验结果及模型方程的建立 柠檬苦素的超临界 CO₂ 提取响应曲面实验设计方案与实验结果见表 2。

表 2 实验设计方案及结果

| 实验号 | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Y/mg·g ⁻¹ |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 8.77 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 11.56 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 8.13 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 12.33 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 8.38 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 10.92 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 9.65 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 12.59 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 10.44 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 11.26 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 11.18 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 11.15 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 11.81 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 11.67 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 12.16 |

利用 Minitab 15 软件对表 2 实验数据进行多元回归拟合,得响应曲面二次多元回归模型: $Y = -40.4404 + 2.3887X_1 + 0.4149X_2 + 6.0475X_3 - 0.0461X_1^2 - 0.0053X_2^2 - 1.37X_3^2 + 0.007X_1X_2 + 0.04X_1X_3 - 0.0425X_2X_3$

对该模型进行方差分析结果见表 3,回归模型系数显著性检验结果见表 4。由表 3 可知模型 $P = 0.005 < 0.01$ 表明该模型极显著,失拟项 $P = 0.164 > 0.05$ 不显著, $r^2 = 0.9606$ 说明该模型拟合程度良好,试验误差小,可以用此模型对柠檬苦素的超临界 CO₂ 提取进行分析和预测。由表 4 可知模型中一次项 X₁ 显著,二次项 X₁² 极显著,其他项不显著。

表 3 回归模型的方差分析

| 方差来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | F | P | r^2 |
|------|-----|----------|---------|-------|-------|---------|
| 模型 | 9 | 27.666 5 | 3.074 1 | 13.56 | 0.005 | 0.960 6 |
| 残差 | 5 | 1.133 9 | 0.226 8 | | | |
| 失拟 | 3 | 1.006 5 | 0.335 5 | 5.27 | 0.164 | |
| 误差 | 2 | 0.127 4 | 0.063 7 | | | |
| 总和 | 14 | 28.800 4 | | | | |

表 4 回归模型系数显著性检验

| 系数项 | 自由度 | 回归系数 | 标准差 | t | P |
|----------|-----|-----------|----------|--------|-------|
| 常量 | 1 | -40.440 4 | 13.158 1 | -3.073 | 0.028 |
| X_1 | 1 | 2.388 7 | 0.604 0 | 3.955 | 0.011 |
| X_2 | 1 | 0.414 9 | 0.288 7 | 1.437 | 0.210 |
| X_3 | 1 | 6.047 5 | 4.608 7 | 1.312 | 0.246 |
| X_1^2 | 1 | -0.046 1 | 0.009 9 | -4.650 | 0.006 |
| X_2^2 | 1 | -0.005 3 | 0.002 5 | -2.139 | 0.085 |
| X_3^2 | 1 | -1.370 0 | 0.991 3 | -1.382 | 0.226 |
| X_1X_2 | 1 | 0.007 0 | 0.004 8 | 1.480 | 0.199 |
| X_1X_3 | 1 | 0.040 0 | 0.095 2 | 0.420 | 0.692 |
| X_2X_3 | 1 | -0.042 5 | 0.047 6 | -0.892 | 0.413 |

3.2 响应曲面分析与优化 模型响应曲面图见图 1~3。由图 1 可知萃取压力恒定,随着萃取温度升高柠檬苦素萃取量逐步增加;保持萃取温度不变,随着萃取压力增加柠檬苦素萃取量快速增加,达到峰值后逐渐下降。由图 2 可知萃取压力恒定,随着夹带剂用量增加柠檬苦素萃取量逐步增加;夹带剂用量不变,随着萃取压力增加柠檬苦素萃取量快速增加,达到峰值后逐渐下降。由图 3 可知保持萃取温度不变,随着夹带剂用量增加柠檬苦素萃取量逐步增加,达到峰值后逐渐下降;夹带剂用量不变,随着萃取温度升高柠檬苦素萃取量逐渐增加,达到峰值后逐渐下降。

运用软件响应优化器望大寻优得到柠檬苦素最佳提取工艺条件为:萃取压力 30.69 MPa,萃取温度 52.12℃,夹带剂用量 1.85 ml/g。为检验响应曲面法所得结果的可靠性,采用上述优化提取条件进行柠檬苦素的超临界 CO₂ 提取,为方便实际操作将提取工艺参数修正为:萃取压力 30 MPa,萃取温度 52℃,夹带剂用量 1.8 ml/g,此条件下柠檬苦素理论萃取量为 12.52 mg/g。经验证实验柠檬苦素萃取量为 12.37 mg/g,与理论预测值非常接近,表明基于响应曲面法所得的优化提取工艺参数准确可靠,具有实用价值。

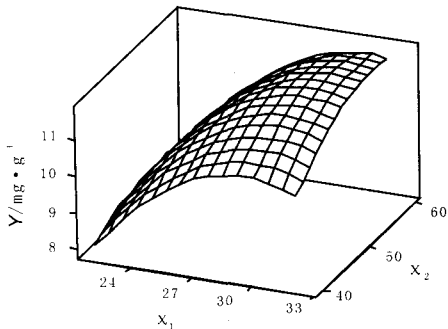


图 1 压力和温度对萃取量影响的响应曲面图

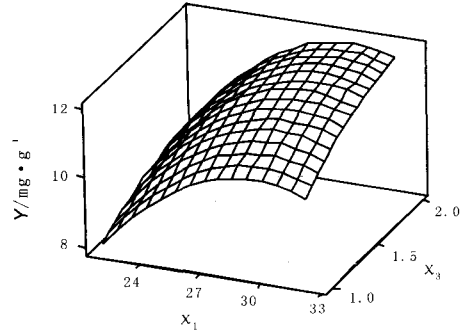


图 2 压力和夹带剂用量对萃取量影响的响应曲面图

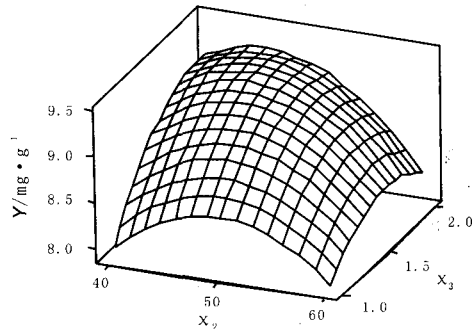


图 3 温度和夹带剂用量对萃取量影响的响应曲面图

4 结论

通过响应曲面法建立了柠檬苦素萃取量与萃取压力、萃取温度、夹带剂用量关系的回归模型,经检验证明该模型准确有效,超临界 CO₂ 萃取柠檬苦素优化工艺条件为:萃取压力 30 MPa,萃取温度 52℃,夹带剂用量 1.8 ml/g,柠檬苦素萃取量为 12.37 mg/g。

超临界 CO₂ 萃取技术能够比较好地保存中药有效成分不被破坏或发生次生化,可减少杂质使中药有效成分高度富集,萃取效率高。桔核超临界萃取物经简单精制即可获得 ≥90% 柠檬苦素,本工艺符合柠檬苦素医药原料生产要求,具有推广应用价值。

参考文献:

- [1] 高一勇,詹忠根,陆旋,等. 柑桔中柠檬苦素开发与产业化应用[J]. 现代商业,2009, 6:115.
- [2] 刘亮,戚向阳,董绪燕. 柑橘中柠檬苦素类似物的研究新进展[J]. 农产品加工(学刊),2007, 7: 37.
- [3] 张朝晖,朱中品,李辉. 柑橘中柠檬苦素超声提取工艺及含量分析[J]. 食品科学,2009,30(8): 56.
- [4] 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.