

张震,石凯欣,潘思轶. Plackett-Burman 联合效应面法优化超声辅助乙醇提取枳椇总酚工艺[J].华中农业大学学报,2021,40(4):182-190.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.04.022

Plackett-Burman 联合效应面法优化超声 辅助乙醇提取枳椇总酚工艺

张震,石凯欣,潘思轶

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070

摘要 为研究枳椇总酚的超声辅助乙醇提取工艺及组成成分,采用单因素试验和 Plackett-Burman 试验设计法,筛选出具有显著效应的3个因素为乙醇体积分数、液料比和超声温度,再使用星点设计-效应面法进一步优化,得出最佳条件为:浸泡时间 15 min,乙醇体积分数 44%,液料比 45.5 mL/g,超声时间 20 min,超声温度 34 °C,此时,枳椇冻干粉的总酚含量为 16.29±0.12 mg/g。此外,HPLC 结果显示,枳椇提取液中主要含有 18 种酚类物质,包括 4 种黄酮醇类物质、1 种黄烷醇类物质、6 种二氢黄酮类物质、4 种酚酸类物质和 3 种多甲氧基黄酮类物质,其中,柚皮苷含量占总酚含量的 91.36%。

关键词 枳椇;总酚含量;超声辅助提取;Plackett-Burman;星点设计-效应面法;组成成分;抗炎作用

中图分类号 TS 201.1;TS 201.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)04-0182-09

最新的大规模流行病学研究表明,药用植物因其副作用小、治疗靶点多,已成为治疗心血管疾病、功能性和慢性胃肠道疾病、癌症等复杂机制疾病的重要选择^[1]。枳椇(*Citrus wilsonii* Tanaka),又名香圆、宜昌柠檬等,属芸香科柑橘属,其果皮较厚,种子大而多,味极酸苦而具有香气^[2]。枳椇始载于《神农本草经》,具有理气宽中、行滞消胀的功效,为历版《中国药典》所收载,也是国家卫生健康委员会颁布的可用于保健食品的原料。众所周知,酚类物质是柑橘果实中最丰富的代谢产物,柑橘酚类物质在抗炎、抗氧化、降血脂、抗肿瘤、调节免疫功能、改善胃肠道功能等方面功效显著,且安全性高、无副作用^[3]。

超声辅助提取技术在溶剂消耗和能量输入方面是一种环境友好的非热技术,超声波用于活性物质的提取受到广泛关注^[4-5]。吴梅青等^[6]研究发现柑橘皮超声提取液中的多酚抗氧化能力显著高于微波提取法、回流提取法、水提法和碱溶酸沉法。同时,Khan 等^[7]报道了超声优化后的柑橘皮总酚含量为 275.8 mg/100 g,柚皮苷和橙皮苷的含量分别为

70.3和 205.2 mg/100 g,显著高于传统的提取方法。由此可见,超声波辅助提取生物活性成分具有节能、省时、高效的优势。

本研究采用 Plackett-Burman 联合星点设计-效应面法(central composite design response surface design,CCD-RSM)评估和优化了影响超声辅助乙醇提取枳椇总酚含量的工艺参数,旨在最大限度提高枳椇酚类物质的得率,并采用 HPLC 法对枳椇提取液的酚类物质进行定性定量分析,以期对枳椇活性物质的深加工及应用提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

新鲜枳椇(*Citrus wilsonii* Tanaka)果实,购自陕西省城固县果业局。将果实冷冻干燥至恒质量后过孔径 0.15 mm 的标准筛,将得到的枳椇冻干粉在-20 °C 避光保存,备用。18 种酚类物质的色谱级标准品(≥98%)购自上海源叶生物科技有限公司;色谱级甲醇和甲酸均购自美国 Fisher 公司;Folin & Ciocalteu 酚试剂购自美国 Sigma 公司;其

收稿日期:2021-01-29

基金项目:财政部和农业农村部,国家现代农业产业技术体系专项(CARS-26-07B);中央高校基本科研业务费专项(2662019PY016);湖北省技术创新专项重大项目(2018ABA072)

张震,E-mail: zhangzhen_lym@163.com

通信作者:潘思轶,E-mail: pansiyi@mail.hzau.edu.cn

他分析级的化学药品和试剂均购自上海国药控股化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

QE-100g 高速万能粉碎机,浙江屹立工贸有限公司;KQ-300DE 超声波清洗器,江苏昆山市超声仪器有限公司;Waters e2695 仪,美国 Waters 公司;UV-1800 紫外分光光度计,日本岛津科学仪器公司。

1.3 超声波辅助乙醇法提取枳椇酚类物质

精确称取 1 g 枳椇冻干粉置于锥形瓶中,用锡箔纸包裹避光并用橡胶塞密封,采用超声波辅助乙醇提取,将获得的混合物在 4 ℃ 以 8 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,并在 40 ℃ 浓缩以除去乙醇。最后,将枳椇提取物以 80% 甲醇和二甲亚砜(体积比 1:1)定容于 25 mL 棕色容量瓶中,待检测。

1.4 枳椇总酚含量的测定

根据 Cliffe 等^[8]的方法并适当修改测定枳椇提取物中的总酚含量。取 1 mL 稀释待测液和 5 mL 10% 的 Folin & Ciocalteu 酚试剂,混匀后避光静置 5 min,加入 4 mL 75 g/L Na_2CO_3 溶液,在 40 ℃ 的水浴中反应 10 min,最后在 760 nm 处进行吸光度的测定。以不同质量浓度梯度的没食子酸对照品溶液制备标准曲线,得到没食子酸标准曲线方程为 $y=9.9780x+0.0196$, $R^2=0.9993$ 。样品中的总酚含量以每克枳椇冻干粉样品中所含没食子酸当量表示,单位为 mg/g,计算公式如下:

$$\text{总酚含量} = CVn/m \quad (1)$$

式(1)中, C 为单位体积枳椇提取物的没食子酸质量,mg/mL; V 为所得枳椇提取物的总体积,mL; n 为紫外分光法测定时样品的稀释倍数; m 为枳椇冻干粉的总质量,g。

1.5 单因素试验设计

采用本文“1.3”的处理方法,分别考察浸泡时间、液料比、乙醇体积分数、超声时间、超声温度共 5 个因素对枳椇总酚含量的影响。固定液料比 40 mL/g、乙醇体积分数 80%、超声时间 20 min、超声温度 30 ℃ 的提取条件,考察浸泡时间为 0、5、10、15、20、25、30 min 对总酚含量的影响;固定浸泡时间 15 min、乙醇体积分数 80%、超声时间 20 min、超声温度 30 ℃ 的提取条件,考察液料比为 10、20、30、40、50、60 mL/g 对总酚含量的影响;固定浸泡时间 15 min、液料比 40 mL/g、超声时间 20 min、超声温

度 30 ℃ 的提取条件,考察乙醇体积分数 20%、40%、60%、80%、100% 对总酚含量的影响;固定浸泡时间 15 min、液料比 40 mL/g、乙醇体积分数 80%、超声温度 30 ℃ 的提取条件,考察超声时间为 5、10、15、20、25、30 min 对总酚含量的影响;固定浸泡时间 15 min、液料比 40 mL/g、乙醇体积分数 80%、超声时间 20 min 的提取条件,考察超声温度为 15、20、25、30、35、40 ℃ 对总酚含量的影响。根据单因素试验结果初步确定各因素的较优范围。

1.6 Plackett-Burman 试验设计

采用 Plackett-Burman 试验对 5 个自变量进行关键因素的筛选,每个变量都以高和低 2 个级别表示,以枳椇提取物总酚含量为指标,选择对枳椇总酚含量贡献最大的 3 个因素做进一步分析。

1.7 星点设计-效应面试验设计

根据 Plackett-Burman 试验设计的结果,选择乙醇体积分数、液料比、超声温度共 3 个因素,以枳椇提取物的总酚含量为响应值,使用包含 3 个因子和 5 个编码级的 CCD 来拟合二阶响应面,并设计 6 个重复的中心点用于估计纯误差。按照 Design-Expert 10.0.7 软件设计 CCD 矩阵影响因子相应的编码水平进行试验。

1.8 枳椇提取物各酚类物质单体成分与含量的检测

HPLC 法参考张元梅等^[9]的方法,并稍作修改。色谱分离在 ZOR-BAX Eclipse XDB-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)中进行,流动相由 0.1% 的甲酸水溶液(溶剂 A)和甲醇(溶剂 B)组成,梯度洗脱程序如下:0~20 min,37%~50% B;20~35 min,50%~80% B;35~40 min,80%~100% B。综合考虑可分 4 个波长进行检测,即芦丁的检测波长为 260 nm,儿茶素、圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、圣草酚、肉桂酸和柚皮素的检测波长为 283 nm,绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、甜橙黄酮、川陈皮素和桔皮素的检测波长为 330 nm,杨梅素、槲皮素、山奈酚的检测波长为 367 nm,紫外吸收光谱辅助定性。枳椇提取物和各标准溶液经 0.22 μm 的微孔有机滤膜过滤后进行 HPLC 检测分析。

1.9 数据处理

每组试验重复 3 次,结果以“平均值±标准偏差”表示。运用 SPSS Statistics 23 软件对数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 枳椇酚类物质提取工艺的单因素试验

从图1A可见,在0~30 min,枳椇多酚含量随着浸泡时间的延长,呈现先升高后降低的变化趋势。在浸泡15 min时进行超声提取所得的总酚含量最高,为 14.66 ± 0.15 mg/g。随着浸泡时间的延长,枳椇总酚含量迅速下降,浸泡25 min后的枳椇总酚含量仅为最高含量的70%左右。这可能是由于浸泡时间过短,枳椇冻干粉不能很好地分散,有些甚至聚集在溶剂中,因反应接触面积的减少而影响了其总酚得率。另一方面,浸泡时间过长会使枳椇组织中的糖类、蛋白质等扩散出来,甚至形成胶团依附于粉末表面,阻碍了枳椇多酚的溶出,导致其含量降低。综上,选取浸泡时间10~20 min用于筛选试验。

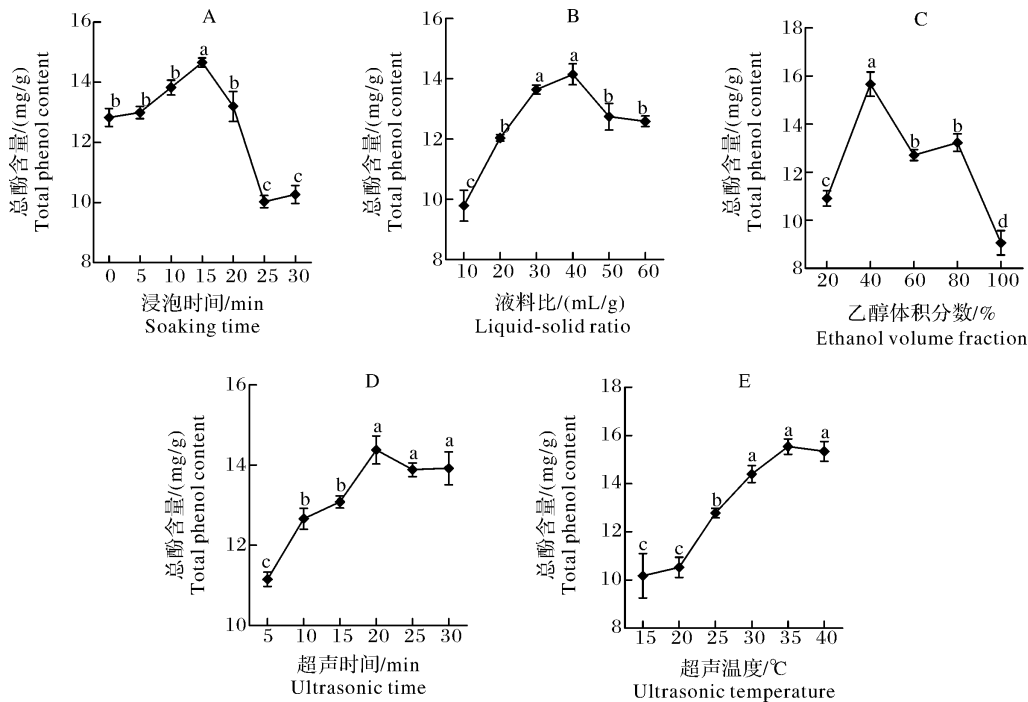
从图1B可见,随着液料比由10 mL/g增加到30 mL/g,总酚含量明显增加,在液料比40 mL/g时,总酚含量达到最大值 14.15 ± 0.35 mg/g,随着溶剂比例的增加,枳椇总酚含量开始减少并逐步稳定。溶剂量的增加使得细胞内外多酚浓度差变大,并且平衡会向胞外溶液倾斜而使得溶液浓度增大。基于

低成本和高效率的考虑,选取液料比30~50 mL/g进行筛选试验。

从图1C可见,随着乙醇体积分数的增加,枳椇总酚含量呈现先增加后减少的趋势。在乙醇体积分数为40%时,枳椇总酚含量达到最高,为 15.66 ± 0.51 mg/g。在100%乙醇提取时,枳椇总酚含量骤降至 9.06 ± 0.51 mg/g,显著低于其他组。过高的乙醇体积分数会使枳椇中的醇溶性和脂溶性杂质竞争性溶出,导致提取的枳椇酚类物质的总含量降低。综上,选择乙醇体积分数30%~50%进行筛选试验。

从图1D可见,枳椇总酚含量随着超声时间的延长呈现先增加后趋于稳定的变化趋势,在超声时间为20 min时获得最高含量为 14.38 ± 0.35 mg/g。从节约时间及能源的角度,选取超声时间15~25 min进行筛选试验。

在超声提取过程中,对温度的控制至关重要。从图1E可见,枳椇总酚含量随着超声温度的上升呈现逐渐增加的趋势,并在35℃达到最大值(15.54 ± 0.32 mg/g),比15℃时的总酚含量增加了52.80%。因此,选取超声温度30~40℃进行筛选试验。



同一组数据中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。Values followed by different letters in the same group showed statistically significant ($P < 0.05$).

图1 浸泡时间(A)、液料比(B)、乙醇体积分数(C)、超声时间(D)及超声温度(E)对枳椇总酚含量的影响

Fig.1 Effect of five extraction parameters on the content of total phenol in *Citrus wilsonii* Tanaka

2.2 Plackett-Burman 试验设计筛选影响枳椇总酚含量的主要因素

使用 Plackett-Burman 法进行初步的因素筛选试验。以枳椇总酚含量为响应值,通过软件 Design-Expert 10 设计了 12 次试验。结果发现,枳椇冻干粉和 30%乙醇按液料比 50 mL/g 浸泡 20 min 后,在 30 °C 超声处理 25 min 时,可观察到最低的枳椇总酚含量,为 11.42 ± 0.08 mg/g;枳椇冻干粉和 50%乙醇按液料比 30 mL/g 浸泡 10 min 后,以 40 °C 超声处理 25 min,此时,可获得最高的枳椇总酚含量,为 16.08 ± 0.44 mg/g。

贡献百分比可用于衡量各因素对响应值的影响程度的大小。由表 1 可知,5 个因素对枳椇总酚含量的影响程度由高到低为: $B > C > E > D > A$,乙醇体积分数(68.52%)>液料比(13.39%)>超声温度(8.59%)>超声时间(4.15%)>浸泡时间(0.95%),其中,浸泡时间和液料比对枳椇总酚得率的提高有显著的负效应,而乙醇体积分数、超声时间和超声温度具有显著的正效应。

表 2 Plackett-Burman 试验的方差分析

Table 2 Analysis of variance table for the Plackett-Burman design experiment

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	25.36	5	5.07	26.09	0.000 5	* * *
A	0.25	1	0.25	1.30	0.297 9	
B	18.18	1	18.18	93.48	0.000 1	* * *
C	3.55	1	3.55	18.27	0.005 2	* *
D	1.10	1	1.10	5.67	0.054 8	
E	2.28	1	2.28	11.72	0.014 1	*
残差 Residual	1.17	6	0.19			
R^2	0.956 0		R^2_{Pred}	0.919 4		
CV/%	3.27		R^2_{Adj}	0.824 1		

注:显著性水平: * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$ (Tukey 检验),下同。Level of significance; * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$ (Tukey's test). The same as below.

温度对响应值具有显著的影响($P < 0.05$)。相反,浸泡时间和超声时间的影响不显著($P > 0.05$)。

综上所述,固定最佳的浸泡时间为 15 min 和超声时间为 20 min(图 1),选择乙醇体积分数、液料比和超声温度进行进一步的考察,分析这 3 个因素及其相互作用对枳椇总酚含量的影响。

2.3 星点设计-效应面法确定枳椇酚类物质的最佳提取条件

根据 Plackett-Burman 试验中获得的结果,使用 CCD 法进一步优化了提取参数,发现枳椇总酚含量为 $11.89 \pm 0.36 \sim 16.35 \pm 0.26$ mg/g,波动范围较大。

如表 3 所示,通过方差分析对 CCD-RSM 模型

表 1 Plackett-Burman 设计中各种因素对总酚含量的影响
Table 1 Influence of various factors on total phenol content in Plackett-Burman design

因素 Factors	标准化效应 Standardized effect	平方和 Sum of squares	贡献百分比/% Percent contribution
A	-0.29	0.25	0.95
B	2.46	18.18	68.52
C	-1.09	3.55	13.39
D	0.61	1.10	4.15
E	0.87	2.28	8.59

由方差分析结果(表 2)可知,较低的变异系数($CV = 3.27\% < 10\%$)以及预测的 R^2 ($R^2_{Pred} = 0.919 4$)与调整后的 R^2 ($R^2_{Adj} = 0.824 1$)之间的差值小于 0.2,说明模型具有较强的优化信号和出色的模型适用性。模型 $P = 0.000 5 < 0.001$,表明该回归模型具有极其显著的统计学意义,模型拟合效果好。经方差分析得出的多元回归方程为: $Y = 13.4980 - 0.1451A + 1.2308B - 0.5441C + 0.3030D + 0.4359E$,其中, Y, A, B, C, D, E 分别表示枳椇总酚含量、浸泡时间、乙醇体积分数、液料比、超声时间、超声温度。其中,乙醇体积分数、液料比和超声

进行了评估。模型的 P 值小于 0.001 意味着不同处理间差异极显著,模型可信度高。同时,不显著的失拟项($P > 0.05$)和较低的纯误差(0.13)意味着该模型是精确且适用的。3 个一次项、3 个二次项及交互项 AC 对枳椇总酚含量的影响显著($P < 0.05$),根据 F 值大小得出各项对响应值的影响程度由强到弱依次为: $C^2 > A^2 > A > B^2 > B > AC > C > BC > AB$ 。由响应面分析得出的多元回归方程为: $Y = -20.3584 + 0.4802A + 0.5174B + 0.7403C + 0.0016AB + 0.0049AC - 0.0034BC - 0.0084A^2 - 0.0050B^2 - 0.0105C^2$,其中, Y, A, B, C 分别表示枳椇总酚含量、乙醇体积分数、液料比、超声温度。

表 3 CCD-RSM 模型的单因素方差分析表

Table 3 Analysis of variance for the central composite design response surface model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	41.00	9	4.56	23.14	<0.000 1	* * *
A	6.87	1	6.87	34.89	0.000 1	* * *
B	2.65	1	2.65	13.45	0.004 3	* *
C	1.74	1	1.74	8.84	0.014 0	*
AB	0.22	1	0.22	1.10	0.319 1	
AC	1.93	1	1.93	9.79	0.010 7	*
BC	0.92	1	0.92	4.68	0.055 7	
A ²	11.12	1	11.12	56.48	<0.000 1	* * *
B ²	4.01	1	4.01	20.38	0.001 1	* *
C ²	17.21	1	17.21	87.37	<0.000 1	* * *
残差 Residual	1.97	10	0.20			
失拟项 Lack of fit	1.34	5	0.27	2.11	0.215 4	
纯误差 Pure error	0.63	5	0.13			
R ²	0.954 2		R ² _{Adj}	0.912 9		
CV/%	3.11		R ² _{Pred}	0.739 6		

由图 2 的等高线图可知,乙醇体积分数和超声温度之间存在显著的交互作用,其等高线图呈现椭圆形或鞍形,该结果与方差分析结果(表 3)一致($P < 0.05$)。同时,乙醇体积分数和液料比之间的交互作用以及液料比和超声温度之间的交互作用并不显著($P > 0.05$),其等高线图形状接

近圆形。

由图 2 的三维响应曲面图可知,在选定的因素范围内,枳椇总酚含量随着单因素值的上升呈现先增加后减少趋势。其中,反映乙醇体积分数和超声温度的交互作用的响应曲面坡度最陡,表明其交互作用能够显著影响枳椇总酚的含量。

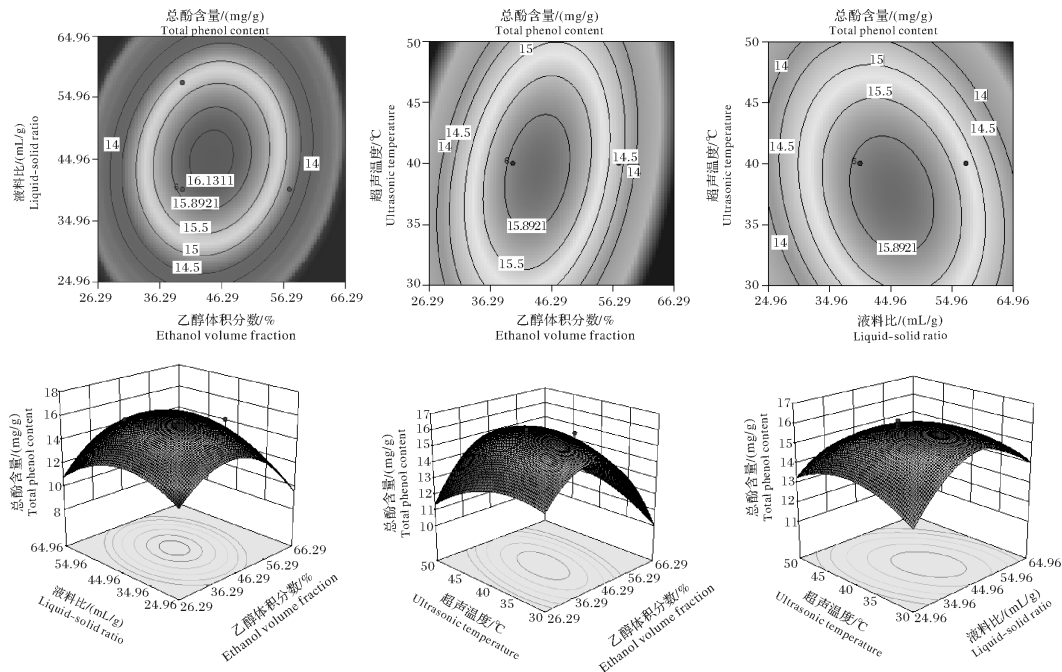


图 2 乙醇体积分数、液料比和超声温度的交互作用对枳椇总酚含量的影响

Fig.2 The effect of the interaction of ethanol volume fraction, liquid-solid ratio and ultrasonic temperature on the content of total phenol

通过 Plackett-Burman 联合 CCD 进行的优化试验获得的最佳条件是:浸泡时间 15 min、乙醇体积分数 44.254%、液料比 45.529 mL/g、超声温度 34.208 °C、超声时间 20 min,此时的枳椇总酚含量为 16.260 mg/g。根据实际情况,调整参数为:浸泡时间 15 min、乙醇体积分数 44%、液料比 45.5 mL/g、超声时间 20 min、超声温度 34 °C、共进行了 5 次验证试验。结果发现,该条件下枳椇总酚含量的实际值为 16.29 ± 0.12 mg/g,接近于预测值。因此,通过 Plackett-Burman 设计与星点设计响应面

方法相结合优化枳椇酚类物质的提取是可靠且实用的。

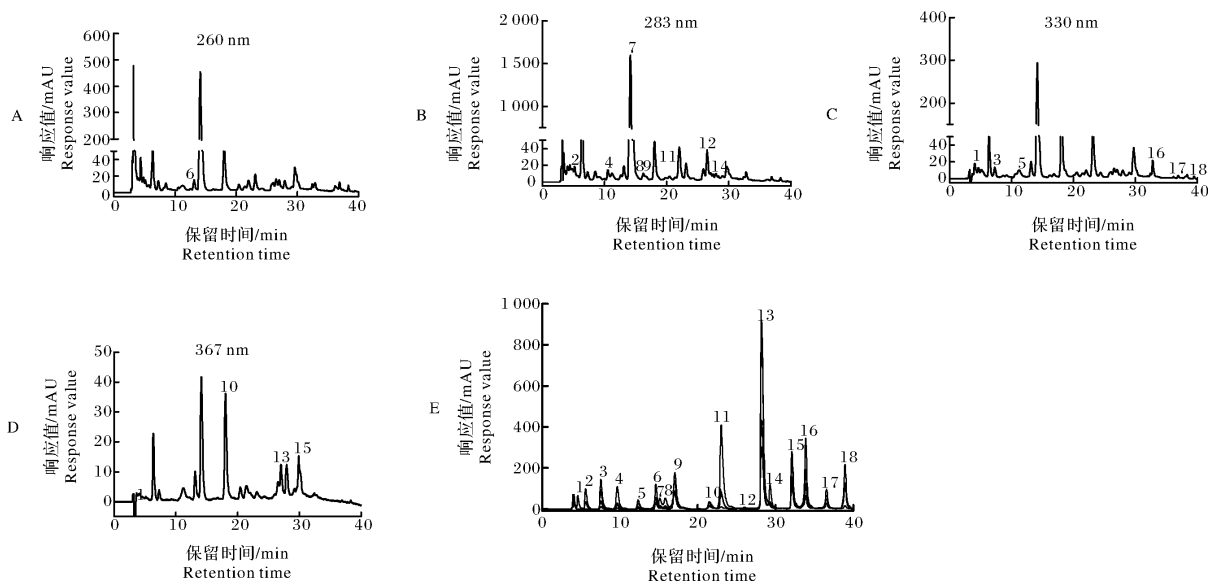
2.4 枳椇提取物酚类物质组成成分分析

由图 3 和表 4 可知,从枳椇提取物中同时分离出 18 种酚类化合物,其中,二氢黄酮类物质在枳椇提取物中含量最为丰富,约占总酚含量的 94.60%,主要包括圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、圣草酚和柚皮素 6 种。枳椇富含柚皮苷,含量约为 12.00 mg/g,约占总酚含量的 91.36%,是其苦味的主要来源之一,其次含量较多的是圣草酚

表 4 枳椇提取物中酚类化合物的含量

Table 4 The concentrations of phenolic compounds in *Citrus wilsonii* Tanaka extract

峰 Peak	保留时间/min Retention time	检测波长/nm Detection wavelength	化合物组成 Compounds	回归方程 Regression equations	相关系数 Correlation coefficient	线性范围/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Linear range	含量/($\mu\text{g}/\text{g}$) Concentration
1	4.930	330	绿原酸 Chlorogenic acid	$y = 30842.01x + 331642.04$	$R^2 = 0.999\ 1$	1.27~40.63	54.86 ± 1.95
2	4.990	283	儿茶素 Catechin	$y = 9899.51x + 314.36$	$R^2 = 0.999\ 1$	1.43~45.71	146.38 ± 3.66
3	7.330	330	咖啡酸 Caffeic acid	$y = 98542.71x - 64816.42$	$R^2 = 0.999\ 5$	2.22~71.11	33.20 ± 2.92
4	9.227	283	圣草次苷 Eriocitrin	$y = 21862.07x - 13065.80$	$R^2 = 1.000\ 0$	4.13~132.06	94.82 ± 0.89
5	11.380	330	阿魏酸 Ferulic acid	$y = 62040.21x - 15474.48$	$R^2 = 0.995\ 8$	1.59~50.79	44.46 ± 1.08
6	14.129	260	芦丁 Rutin	$y = 20216.34x + 33737.39$	$R^2 = 0.999\ 2$	4.13~132.06	113.48 ± 15.20
7	14.844	283	柚皮苷 Naringin	$y = 25415.13x - 28397.11$	$R^2 = 1.000\ 0$	2.86~1 462.86	$11\ 996.46 \pm 250.75$
8	15.146	283	橙皮苷 Hesperidin	$y = 17788.45x + 1130.51$	$R^2 = 0.996\ 7$	2.22~71.11	27.45 ± 2.48
9	15.959	283	新橙皮苷 Neohesperidin	$y = 36184.48x - 22198.32$	$R^2 = 0.999\ 0$	1.90~60.95	39.20 ± 0.17
10	17.257	367	杨梅素 Myricetin	$y = 10613.02x + 3418.13$	$R^2 = 0.999\ 3$	1.59~50.79	64.39 ± 2.81
11	21.362	283	圣草酚 Eriodictyol	$y = 52133.13x - 51958.62$	$R^2 = 0.999\ 0$	0.95~30.48	176.91 ± 2.41
12	26.300	283	肉桂酸 Cinnamic acid	$y = 101636.03x + 18985.60$	$R^2 = 1.000\ 0$	2.86~91.43	54.86 ± 3.68
13	27.209	367	槲皮素 Quercetin	$y = 43013.39x + 23737.18$	$R^2 = 0.997\ 8$	5.71~182.86	54.13 ± 2.39
14	27.393	283	柚皮素 Naringenin	$y = 29031.56x - 6851.28$	$R^2 = 0.999\ 9$	0.95~30.48	87.36 ± 12.05
15	31.483	367	山奈酚 Kaempferol	$y = 125911.81x + 416015.41$	$R^2 = 0.999\ 1$	2.54~81.27	80.13 ± 7.98
16	34.269	330	甜橙黄酮 Sinensetin	$y = 80500.18x + 5445.88$	$R^2 = 0.999\ 9$	0.79~25.40	30.46 ± 2.57
17	37.164	330	川陈皮素 Nobiletin	$y = 43383.05x - 33848.01$	$R^2 = 0.998\ 7$	2.38~76.19	21.74 ± 3.96
18	39.603	330	桔皮素 Tangeretin	$y = 42734.11x + 24180.04$	$R^2 = 0.999\ 1$	2.22~71.11	10.86 ± 2.00



数字代表的物质同表 4。The substances represented by the numbers are the same as those in Table 4.

图 3 检测波长分别为 260 nm (A)、283 nm (B)、330 nm (C) 和 367 nm (D) 下枳椇提取物中酚类物质和标准品 (E) 的 HPLC 谱图

Fig.3 HPLC of the phenolic compounds from *Citrus wilsonii* Tanaka extract at

260 nm (A), 283 nm (B), 330 nm (C) 和 367 nm (D) and 18 kinds of phenols mixed standard substance (E)

(176.91 $\mu\text{g/g}$)。此外,从枳椇提取物中检测到少量酚酸类物质,包括绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和肉桂酸。还检测出少量多甲氧基黄酮类物质,如:甜橙黄酮、川陈皮素和桔皮素,含量分别为 30.46、21.74 和 10.86 $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

3.1 枳椇多酚的超声提取工艺

据报道,超声可以通过影响溶剂的物理性质、酚类物质的溶解度及某些酶的活性来增加超声的处理效果^[10-11]。Ma 等^[11]发现超声辅助果胶酶提取柑橘渣水提物中的橙皮苷和酚酸时,底物结合和产物释放过程加速,且果胶酶与果胶底物之间的亲和力增强,这可能是由于在超声场下暴露了果胶酶结构中更多的活性位点所致,从而使提取率增加。Plackett-Burman 试验的结果表明乙醇体积分数是影响枳椇总酚提取率最主要的因素。柳萌等^[12]认为乙醇与水的混合液可以破坏酚类物质与蛋白质、多糖等物质的结合键,有利于酚酸的提取。由响应面图结果可知,溶剂极性和温度显著影响酚类物质的降解效果。多酚得率随着超声温度的上升而增加,可能得益于超声波在液体介质中的传播会产生强烈的混合效果,有助于提高质量传递,从而大大提高了溶

质的传递速率^[13]。然而,当温度过高时,一方面会导致溶剂的黏度和表面张力均降低,蒸气压升高,使得空化作用的气泡破裂程度降低,超声处理的效果减弱;另一方面,酚类物质属于易热降解的活性成分,高温会破坏多酚的结构,导致其产率降低^[14]。在本研究中,响应面图中多酚含量随温度的升高呈现先增加后降低的趋势,这与上述研究报道的结果相一致^[12-14]。

此外,在超声提取过程中,单个酚酸含量的下降程度与其芳香环取代基的类别和数目有关,羟基数目越多、甲氧基数目越少,酚酸越容易被降解,因此,枳椇多酚提取物中的多甲氧基黄酮被较好地保留^[15]。除此之外,糖基的存在可有效抑制酚类物质的降解。Biesaga 等^[16]发现经超声提取后,蜂蜜中的 9 种酚酸和 4 种黄酮糖苷都很稳定,而 7 种苷元的回收率仅 10%,黄酮醇苷元几乎完全降解。因此,实际生产中应根据目标产物的结构特性来选择适当的提取参数。

3.2 枳椇的组成成分分析

柑橘类水果中含有丰富的酚类物质,本研究通过 HPLC 对枳椇超声提取物进行分析,共检测出 18 种酚类物质,其中,柚皮苷的含量最高,其次是圣草酚。枳椇常作为枳壳、香橼等中药材的原料,用于破

气消积,化痰散痞,疏肝理气等。陕南枳壳提取物中含有大量的柚皮苷,但却仅含有微量的新橙皮苷,其质量不满足我国药典规定的香橼原材料的要求,但是满足作为枳壳原材料的规定,该结果与杨辉等^[17]的研究结果一致。因此,枳壳作为枳壳与香橼原料入药的安全性和药理作用等方面还有待进一步研究。

枳壳提取物中含有约 90% 以上的二氢黄酮类物质。二氢黄酮类化合物是药用植物中广泛存在的一类黄酮类化合物,具有抗癌、抗氧化、清除自由基、保护神经、治疗心血管疾病及调理肠胃功能、抗炎、抗菌等多种药理活性。因此,二氢黄酮类物质可能是枳壳在各类疾病治疗中发挥作用的关键活性物质。作为一种母本为柚类、父本为枳类的杂交柑橘品种,枳壳中检测出丰富的多甲氧基黄酮。研究发现,甜橙黄酮和川陈皮素等多甲氧基黄酮部分通过影响磷酸二酯酶的活性起到抑制 TNF- α 的作用,具有很好的抗炎作用^[3]。此外,任雪等^[18]提出广陈皮的多甲氧基黄酮提取物可通过减弱或消除氧自由基及炎症介质的过度释放,对小鼠肺组织起到保护作用。因此,我们推测枳壳具有潜在的抗炎活性,可用于慢性炎症疾病的治疗方案中。

目前,国内外对枳壳活性成分的提取分离以及体外活性研究较多,而枳壳调节胃肠道健康、治疗心血管疾病、调节免疫功能的机制并不明确,未来需要进一步探索枳壳对人体健康的干预机制,以期为临床应用提供理论依据。

参考文献 References

- [1] STEVENS Y, RYMENANT E V, GROOTAERT C, et al. The intestinal fate of *Citrus* flavanones and their effects on gastrointestinal health[J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1464 [2021-01-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31252646/>. doi: 10.3390/nu11071464.
- [2] 丁鼎, 敖义俊, 丁德宽, 等. 陕南药用柑橘资源枳壳的特性及栽培现状调查[J]. *浙江柑橘*, 2019, 36(2): 22-25. DING D, AO Y J, DING D K, et al. Investigation on the characteristics and cultivation status of *Citrus wilsonii* Tanaka in southern Shaanxi [J]. *Zhejiang Ganju*, 2019, 36(2): 22-25 (in Chinese).
- [3] SHIMIZU C, WAKITA Y, INOUE T, et al. Effects of lifelong intake of lemon polyphenols on aging and intestinal microbiome in the senescence-accelerated mouse prone 1 (SAMP1)[J/OL]. *Scientific reports*, 2019, 9: 3671 [2020-12-28]. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40253-x>.
- [4] WEN L, ZHANG Z H, SUN D W, et al. Combination of emer-

- ging technologies for the extraction of bioactive compounds[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2020, 60(11): 1826-1841.
- [5] GONZÁLEZ-CENTENO M R, COMAS-SERRA F, FEMENIA A, et al. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling [J]. *Ultrasonics sonochemistry*, 2015, 22: 506-514.
- [6] 吴梅青, 刘捷频, 陈丹. 柑橘黄酮抗氧化和抗肿瘤作用研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(1): 83-85. WU M Q, LIU J P, CHEN D. Research on antioxidant and anti-tumor activity of citrus flavonoids [J]. *Asia Pacific traditional medicine*, 2017, 13(1): 83-85 (in Chinese with English abstract).
- [7] KHAN M K, ABERT-VIAN M, FABIANO-TIXIER A S, et al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel [J]. *Food chemistry*, 2010, 119(2): 851-858.
- [8] CLIFFE S, FAWER M S, MAIER G, et al. Enzyme assays for the phenolic content of natural juices [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1994, 42(8): 1824-1828.
- [9] 张元梅, 周志钦, 孙玉敬, 等. 高效液相色谱法同时测定柑橘果实中 18 种黄酮的含量 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(17): 3558-3565. ZHANG Y M, ZHOU Z Q, SUN Y J, et al. Simultaneous determination of 18 flavonoids in *Citrus* fruits by high-performance liquid chromatography [J]. *Scientia agricultura sinica*, 2012, 45(17): 3558-3565 (in Chinese with English abstract).
- [10] PAPOUTSIS K, PRISTIJONO P, GOLDING J B, et al. Screening the effect of four ultrasound-assisted extraction parameters on hesperidin and phenolic acid content of aqueous *Citrus* pomace extracts [J]. *Food bioscience*, 2018, 21: 20-26.
- [11] MA X B, ZHANG L F, WANG W J, et al. Synergistic effect and mechanisms of combining ultrasound and pectinase on pectin hydrolysis [J]. *Food and bioprocess technology*, 2016, 9(7): 1249-1257.
- [12] 柳萌, 邵海燕, 房祥军, 等. 不同成熟度杨梅酚酸的超声-微波协同优化提取及其抗氧化性对比 [J]. *食品科学*, 2021, 42(3): 112-120. LIU M, GAO H Y, FANG X J, et al. Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction of phenolic acids from Chinese bayberries (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) of different maturities and a comparative study of their antioxidant activities [J]. *Food science*, 2021, 42(3): 112-120 (in Chinese with English abstract).
- [13] CHEMAT F, ROMBAUT N, SICAIRE A G, et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products, mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications: a review [J]. *Ultrasonics sonochemistry*, 2017, 34: 540-560.
- [14] MIESZCZAKOWSKA-FRAC M, DYKI B, KONOPACKA D. Effects of ultrasound on polyphenol retention in apples after the application of predrying treatments in liquid medium [J]. *Food and bioprocess technology*, 2016, 9(3): 543-552.

- [15] QIAO L P, YE X Q, SUN Y J, et al. Sonochemical effects on free phenolic acids under ultrasound treatment in a model system[J]. *Ultrasonics sonochemistry*, 2013, 20(4): 1017-1025.
- [16] BIESAGA M, PYRZYŃSKA K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods[J]. *Food chemistry*, 2013, 136(1): 46-54.
- [17] 杨辉, 杨培君, 李会宁. 中药材香圆挥发油成分 GC-MS 分析与比较[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(2): 219-229. YANG H, YANG P J, LI H N. Comparison of volatile oils from both fructus aurantii and fructus aurantii immaturus of *Citrus wilsonii* in Shaanxi by GC-MS[J]. *Journal of food science and biotechnology*, 2010, 29(2): 219-229 (in Chinese with English abstract).
- [18] 任雪, 石凯欣, 张震, 等. 广陈皮中多甲氧基黄酮提取物对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. *华中农业大学学报*, 2021, 40(3): 248-255. REN X, SHI K X, ZHANG Z, et al. Protective effect of polymethoxyflavones extract from *Citrus reticulata* 'Chachi' on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40(3): 248-255 (in Chinese with English abstract).

Optimization of ultrasound-assisted ethanol extraction of polyphenols from *Citrus wilsonii* Tanaka using Plackett-Burman coupled with response surface design

ZHANG Zhen, SHI Kaixin, PAN Siyi

*College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Environment Correlative Dietology of Ministry Education, Wuhan 430070, China*

Abstract *Citrus wilsonii* Tanaka is a kind of medicinal citrus local variety in southern Shaanxi Province. It can be made into Chinese herbal medicine or soaked in water to treat gastric acid, bloating and dyspepsia. In order to provide theoretical basis for the development and utilization of *Citrus wilsonii* Tanaka resources, the ultrasound-assisted ethanol extraction technology and components of total phenol from *Citrus wilsonii* Tanaka were studied. Firstly, the five extraction parameters were investigated by single factor test and Plackett-Burman design. Three factors with significant effect were selected as ethanol volume fraction, liquid-solid ratio and ultrasonic temperature. On this basis, the central composite design response surface method was used to further optimize. The optimal conditions were as follows: soaking time 15 min, ethanol volume fraction 44%, liquid-solid ratio 45.5 mL/g, ultrasonic time 20 min, ultrasonic temperature 34 °C. Under the condition, the total phenol content per gram of *Citrus wilsonii* Tanaka lyophilized powder was 16.29 ± 0.12 mg gallic acid equivalent. In addition, the results of HPLC showed that there were 18 kinds of phenols in the extract, including 4 kinds of flavonols, 1 kind of flavanols, 6 kinds of dihydroflavones, 4 kinds of phenolic acids and 3 kinds of polymethoxyflavones. Naringin accounted for 91.36% of the total phenol.

Keywords *Citrus wilsonii* Tanaka; total phenol content; ultrasonic-assisted extraction; Plackett-Burman; central composite design-response surface method; components; anti-inflammatory effect

(责任编辑:赵琳琳)