响应面法优化胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的提取工艺

姜红宇[a,b,c]，刘郁峰[a]，盘雪[a]，尹霞[a]，王宗成[a,b,c*]（湖南科技学院，a.化学与生物工程学院，b.湖南省银杏工程技术研究中心，c.湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室，湖南 永州 425199）

摘要：目的 优选胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的提取工艺。**方法** 在单因素试验的基础上，对乙醇浓度、料液比、提取时间3个因素进行响应面Box-Behnken中心组合设计优化，得到最佳提取工艺。**结果** 最佳提取工艺条件为乙醇浓度60%、料液比 1∶10、提取时间1.8 h、回流提取2次，在此条件下柚皮苷与新橙皮苷的总得率为23.44%。**结论** 本提取工艺方法简单、合理、稳定，为工业化生产提供了一定的依据。

关键词：响应面分析法；胡柚幼果；柚皮苷；新橙皮苷

中图分类号：R284.2 **文献标识码：**B **文章编号：**1007-7693(2017)11-1546-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.11.010

引用本文：姜红宇，刘郁峰，盘雪，等. 响应面法优化胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的提取工艺[J]. 中国现代应用药学，2017, 34(11): 1546-1551.

Response Surface Methodology for Optimization of Extraction Process of Naringin and Neohesperidin from Huyou Fruitlet

JIANG Hongyu[a,b,c], LIU Yufeng[a], PAN Xue[a], YIN Xia[a], WANG Zongcheng[a,b,c*] (*Hunan University of Science and Engineering, a.College of Chemical and Biological Engineering, b.Hunan Provincial Engineering Research Center for Ginkgo Biloba, c.Hunan Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources of Southern Hunan, Yongzhou 425199, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction process of naringin and neohesperidin from Huyou fruitlet. **METHODS** Based on the single factor experiment, Box-Benhnken three factors (ethanol concentration, solid-liquid ratio and extraction time) experiment by response surface design was carried out. **RESULTS** The optimum conditions was as follows: solid to liquid ratio 1∶10, 60% ethanol, extraction time 1.8 h and extraction two times. Under these conditions, the total yield of naringin and neohesperidin from huyou fruitlet was 23.44%. **CONCLUSION** The method is simple, reasonable, feasible and provide a experiment basis for its industrial production.

KEY WORDS: response surface methodology; Huyou fruitlet; naringin; neohesperidin

胡柚为芸香科植物柚(*Citrus. grandis* L. Osbeck)与甜橙(*Citrus. sinensis* L. Osbeck)的杂交品种[1]。胡柚幼果中含有丰富的黄酮类化合物，占20%以上，主要为新橙皮苷、柚皮苷，其中新橙皮苷含量较高[2]。新橙皮苷有治愈毛细血管脆性和血浆中蛋白质通透性过高的作用[3]；还可以显著抑制人胃癌细胞株的生长[4]；对于革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌及酿酒酵母菌均有一定的抑制作用[5]；对皮肤炎表现出较好的抑制作用[6]，在抗过敏方面也具有一定的开发价值[7]。此外，新橙皮苷经开环氢化处理后形成的新橙皮苷二氢查耳酮[8-9]，是一种无毒、低能量、高甜度的新一代甜味剂，口感清爽，余味持久，并具有极佳的屏蔽苦味的功效，已被列入“食品添加剂使用卫生标准”品种，可用于食品工业[10]。新橙皮苷在欧美一些国家已广泛应用于保健、医药行业，具有很大的市场前景。柚皮苷具有抗氧化、抗衰老、抗癌、抗微生物、抑酶、降血糖、降血压、预防动脉粥样硬化等药理作用[11-12]，已在医药和化妆品领域得到广泛应用，也可作为天然色素、风味改良剂和苦味剂，还可进一步合成转化为新橙皮苷[8-9]。课题组前期研究也证实了常山胡柚幼果中新橙皮苷含量非常高，柚皮苷含量次之，而橙皮苷含量较少，从胡柚幼果中分离纯化得到新橙皮苷成本较低，具有良好的应用前景，而柚皮苷也较高且能转化为新橙皮苷，但橙皮苷含量较少。本实验研

基金项目：湖南省高校科技创新团队支持计划资助(2012-318)；永州市科技计划资助项目(2016-8)

作者简介：姜红宇，男，博士，讲师 Tel: (0746)6381164 E-mail: jhy_lily@126.com ***通信作者：**王宗成，男，硕士，讲师 Tel: (0746)6381164 E-mail: wangzongche@163.com

究胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的较优提取工艺条件，以期为提取分离纯化得到廉价的新橙皮苷提供一定的实验依据。

1 试剂与仪器

1.1 原料与试剂

胡柚幼果采购于浙江衢州常山胡柚种植农户，为2016年5月胡柚早期落果干燥而成，幼果粒径<1.5 cm，并于60 ℃真空干燥箱中烘干粉碎后过60目筛；柚皮苷对照品(批号：B1511023，纯度>98.5%)和新橙皮苷对照品(批号：B1602134，纯度>98.5%)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；乙腈，色谱级；磷酸、95%乙醇为分析纯。

1.2 仪器设备

FW-200 高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)；SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵、集热式磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司)；RE-52B旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)；TE124S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)；LC-20AT高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 标准曲线的绘制

胡柚幼果提取液中柚皮苷与新橙皮苷的含量测定参照中国药典2015年版一部枳壳项下柚皮苷与新橙皮苷的含量测定方法用 HPLC 测定[13]，色谱柱为月旭 C_{18} 柱(4.6 mm×150 mm，5 μm)；以乙腈-水(20∶80)(用磷酸调节pH值至3)为流动相；检测波长为283 nm。取柚皮苷对照品9.43 mg、新橙皮苷对照品9.71 mg，用甲醇定容至10 mL，分别吸取0.6，0.8，1.0，1.2，1.6，2.0 mL的混标溶液于6个10 mL的量瓶，用甲醇定容即得对照品溶液，以峰面积为纵坐标，对照品溶液浓度为横坐标绘制标准曲线。

2.2 提取方法

取胡柚幼果粉末10 g，置圆底烧瓶中，加入乙醇溶液在70 ℃的水浴条件下回流提取，合并提取液略浓缩，加无水乙醇，定容至250 mL。从中取1 mL再稀释50倍，再取稀释液10 mL用微孔滤膜过滤，取续滤液作为样品溶液，参照对照品溶液的高效液相色谱测定条件，测定峰面积，以标准曲线计算浓度，然后计算得率。

2.3 单因素试验

分别考察乙醇浓度(40%，50%，60%，70%，80%)，料液比(1∶6，1∶8，1∶10，1∶12，1∶14)，提取时间(1.0，1.5，2.0，2.5，3.0 h)，提取次数(1，2，3次)对胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷得率的影响。

2.4 响应面设计

在单因素试验的基础上，固定提取次数2次，对乙醇浓度、料液比、提取时间3个因素进行响应面设计优化，根据响应面 Box-Behnken 中心组合试验设计原理设计试验方案[14]，并进行实验，利用 Design Expert 软件对试验数据进行回归分析，获得最佳提取工艺条件。

3 结果与讨论

3.1 色谱图与标准曲线

通过HPLC测定，确定该液相条件下柚皮苷、新橙皮苷的保留时间，柚皮苷的色谱图、柚皮苷与新橙皮苷的混合对照品溶液色谱图及样品溶液的色谱图见图1。柚皮苷的标准曲线方程为 A=1.515×10^7c+3.301×10^3(r=0.999 9)，线性范围为0.057~0.189 mg·mL^{-1}；新橙皮苷的标准曲线方程为 A=1.905×10^7c–2.411×10^4(r=0.999 8)，线性范围为0.058~0.194 mg·mL^{-1}。

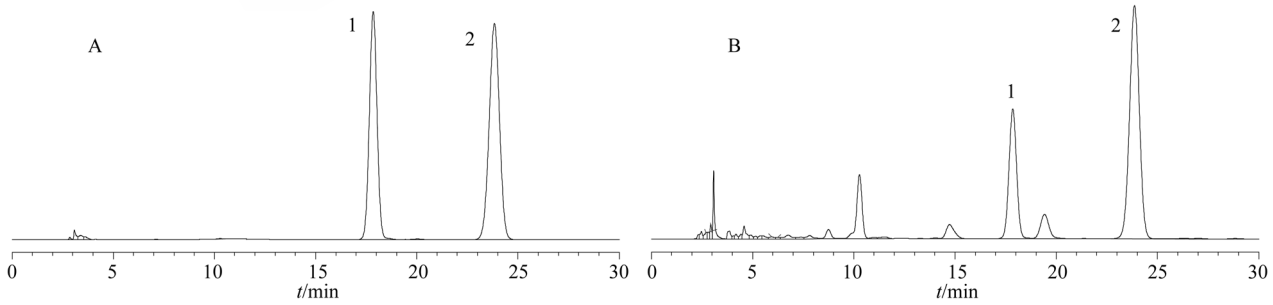

图1 样品的高效液相色谱图

A–对照品；B–样品；1–柚皮苷；2–新橙皮苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms of sample

A–control; B–sample; 1–naringin; 2–neohesperidin.

3.2 单因素试验

3.2.1 料液比对得率的影响 取 5 份胡柚幼果粉末各 10 g，置圆底烧瓶中，分别加入 6，8，10，12，14 倍量的 70%乙醇提取，回流 2 次，每次 1.5 h 的条件下提取胡柚幼果中柚皮苷和新橙皮苷，考察料液比对柚皮苷和新橙皮苷得率的影响。结果见图 2，随着溶媒量的增大，柚皮苷和新橙皮苷的得率呈增加趋势，但当料液比达到 1∶10 后，柚皮苷和新橙皮苷的得率随溶媒量的增加均不明显。因此宜选取料液比 1∶10。

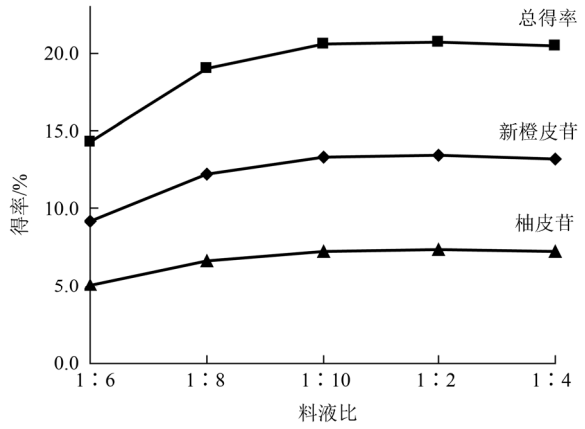

图 2 料液比对柚皮苷、新橙皮苷和总得率的影响

Fig. 2 Effect of solid-liquid ratio on the yield of naringin, neohesperidin and total

3.2.2 乙醇浓度对得率的影响 取 5 份胡柚幼果粉末各 10 g，置圆底烧瓶中，分别加入 10 倍量的 40%，50%，60%，70%，80%乙醇回流提取 2 次，每次 1.5 h 的条件下提取胡柚幼果中柚皮苷和新橙皮苷，考察乙醇浓度对柚皮苷和新橙皮苷得率的影响。结果见图 3，随着乙醇浓度递增，柚皮苷的得率变化不明显，而新橙皮苷的得率和总得率都呈先增后减的变化趋势，在乙醇浓度为 60%时，提取柚皮苷和新橙皮苷的效果更佳。

3.2.3 提取时间对得率的影响 取 5 份胡柚幼果粉末各 10 g，置圆底烧瓶中，加入 10 倍量的 70%乙醇回流提取 2 次，分别提取 1.0，1.5，2.0，2.5，3.0 h 的条件下提取胡柚幼果中柚皮苷和新橙皮苷，考察提取时间对柚皮苷和新橙皮苷得率的影响。结果见图 4，分析可知提取时间在 1.5~2.0 h 时，柚皮苷、新橙皮苷的得率及总得率较大，且 2.0 h 比 1.5 h 增加不明显，而>2.0 h 后反而减少，因此取提取时间 1.5 h 为宜。

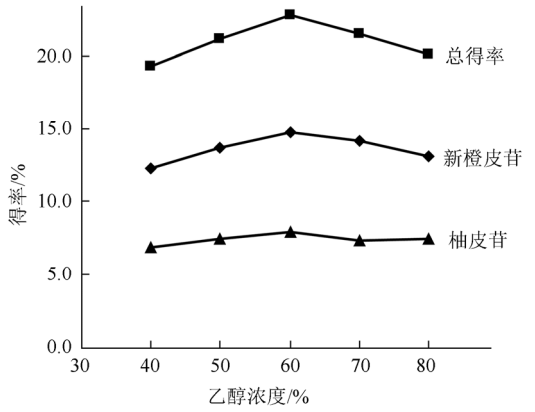

图 3 乙醇浓度对柚皮苷、新橙皮苷和总得率的影响

Fig. 3 Effect of ethanol concentration on the yield of naringin, neohesperidin and total

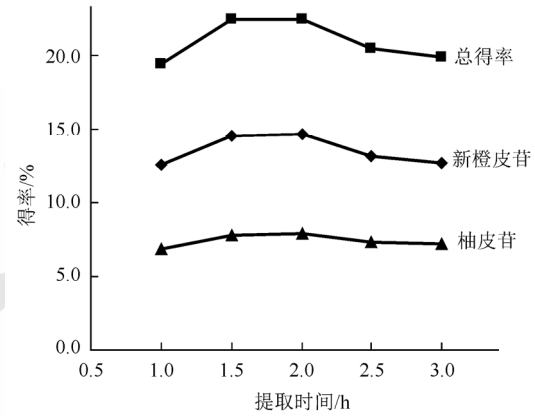

图 4 提取时间对柚皮苷、新橙皮苷和总得率的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on the yield of naringin, neohesperidin and total

3.2.4 提取次数对得率的影响 取 3 份胡柚幼果粉末各 10 g，置圆底烧瓶中，加入 10 倍量的 70%乙醇提取，分别回流提取 1，2，3 次，每次提取 1.5 h 的条件下提取胡柚幼果中柚皮苷和新橙皮苷，考察回流次数对柚皮苷和新橙皮苷得率的影响。结果见图 5，提取 2 次柚皮苷和新橙皮苷已基本提取完全，为了节省时间和节约溶剂，从工业成本和提取周期角度来看，宜选取提取 2 次。

3.3 响应面设计试验结果及分析

3.3.1 Box-Benhnken 设计方案及试验结果 在单因素试验的基础上，固定提取 2 次，对乙醇浓度、料液比、提取时间 3 个因素进行响应面设计优化，根据响应面 Box-Behnken 中心组合试验设计原理设计试验方案，并进行实验，试验因素水平情况见表 1，试验设计及结果见表 2。

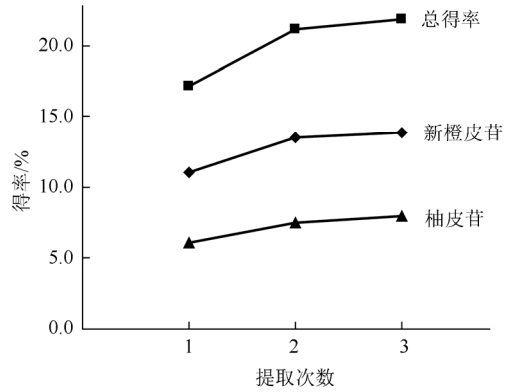

图 5 提取次数对柚皮苷、新橙皮苷和总得率的影响

Fig. 5 Effect of extraction times on the yield of naringin, neohesperidin and total

表 1 响应面的因素与水平

Tab. 1 Factors and levels in response surface design

因素	水平		
	−1	0	1
A 乙醇浓度%	50	60	70
B 料液比	1∶8	1∶10	1∶12
C 提取时间/h	1.0	1.5	2.0

采用 Design expert 8.0.6 软件对实验结果进行多项拟合回归，得到胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的总得率(Y)对乙醇浓度(A)，料液比(B)，提取时间(C)的二次多项回归方程为 Y=22.60−0.25A+0.57B+0.89C+0.060AB−0.023AC+0.52BC−2.86A^2−1.12B^2−0.71C^2。

表 2 响应面设计安排与试验结果

Tab. 2 Response surface design arrangement and experimental results

序号	*A*/%	*B*	*C*/h	柚皮苷/%	新橙皮苷/%	总得率/%
10	60	1∶12	1.0	7.02	13.11	20.13
15	60	1∶10	1.5	7.98	14.88	22.86
5	50	1∶10	1.0	6.38	11.89	18.27
9	60	1∶8	1.0	6.91	12.84	19.75
1	50	1∶8	1.5	6.43	12.10	18.53
3	50	1∶12	1.5	6.71	12.54	19.25
6	70	1∶10	1.0	6.25	11.62	17.87
7	50	1∶10	2.0	7.11	13.12	20.23
17	60	1∶10	1.5	7.95	14.69	22.64
16	60	1∶10	1.5	7.88	14.57	22.45
8	70	1∶10	2.0	6.95	12.79	19.74
11	60	1∶8	2.0	7.21	13.14	20.35
12	60	1∶12	2.0	8.04	14.78	22.82
13	60	1∶10	1.5	7.94	14.62	22.56
14	60	1∶10	1.5	7.91	14.57	22.48
4	70	1∶12	1.5	6.55	12.27	18.82
2	70	1∶8	1.5	6.25	11.61	17.86

3.3.2 回归模型的方差分析　为了检验回归方程的有效性，进一步确定各因素对总得率的影响程度，对回归模型进行了方差分析，结果见表 3。

表 3 响应面设计模型的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance of response surface quadratic model

来源	平方和	df	方差	*F* 值	*P* 值	显著性
模型	55.46	9	6.16	134.49	< 0.000 1	有显著性差异
A	0.50	1	0.50	10.80	0.013 4	有显著性差异
B	2.57	1	2.57	55.98	0.000 1	有显著性差异
C	6.34	1	6.34	138.29	<0.000 1	有显著性差异
AB	0.014	1	0.014	0.31	0.592 6	无显著性差异
AC	2.025×10^{-3}	1	2.025×10^{-3}	0.044	0.839 5	无显著性差异
BC	1.09	1	1.09	23.83	0.001 8	有显著性差异
A^2	34.42	1	34.42	751.09	<0.000 1	有显著性差异
B^2	5.32	1	5.32	116.09	<0.000 1	有显著性差异
C^2	2.13	1	2.13	46.52	0.000 2	有显著性差异
残差	0.32	7	0.046			
失拟项	0.21	3	0.071	2.64	0.185 9	无显著性差异
纯误差	0.11	4	0.027			
总误差	55.79	16				
R^2=0.994 3			Adj.R^2=0.986 9		CV%=1.05%	

http://www.chinjmap.com

从表 3 可以看出，模型的 F=134.49，P<0.000 1<0.05，说明本实验所采用的二次模型是很显著的。P_A，P_B，P_C，P_{BC}，P_A^2，P_B^2，P_C^2 均<0.05，说明乙醇浓度、料液比、提取时间、料液比和提取时间的交互项以及 3 个因素的二次项都具有显著影响；而其他交互项影响不显著，也说明乙醇浓度与料液比、乙醇浓度与提取时间的交互作用不大，因此，胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的总得率(Y)对乙醇浓度(A)，料液比(B)，提取时间(C)的二次多项回归方程修订为 Y=22.60–0.25A+0.57B+0.89C+0.52BC–2.86A^2–1.12B^2–0.71C^2。各因素的效应关系为：C(提取时间)>B(料液比)>A(乙醇浓度)。相关系数 R^2=0.994 3 表明模型拟合程度较好，回归方程能很好地描述各因素与响应值之间的关系，该实验方法可靠，变异系数(CV)为 1.05%说明模型的重现性很好[14-15]。

3.3.3 响应曲面分析与优化 根据回归模型作出响应曲面，见图 6~8，可以看出各试验因素的最佳参数及各试验因素之间的相互作用。由柚皮苷和新橙皮苷总得率(Y)对乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)各试验因素所构成的响应曲面图可以直观地看出的交互作用 BC 对柚皮苷和新橙皮苷总得率的影响比较显著。

3.3.4 提取条件的优化 用 Design-expert 8.0.6 软件对二次多项式回归方程进行计算，得到最佳提取工艺条件为乙醇浓度 58.83%，料液比 1∶10.49，提取时间 1.79 h，预测得率为 23.01%。但考虑到实际操作的便利性，将其参数修正如下：乙醇浓度为 60%，料液比为 1∶10，提取时间为 1.8 h，预测得率为 22.98%。

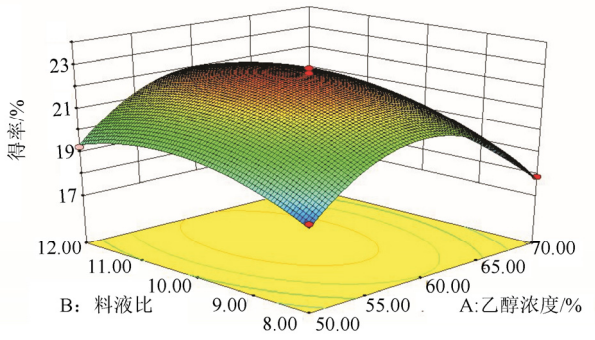

图 6 乙醇浓度与料液比的交互作用对总得率的影响

Fig. 6 The effect of interaction of ethanol concentration and solid-liquid ratio on the total yield

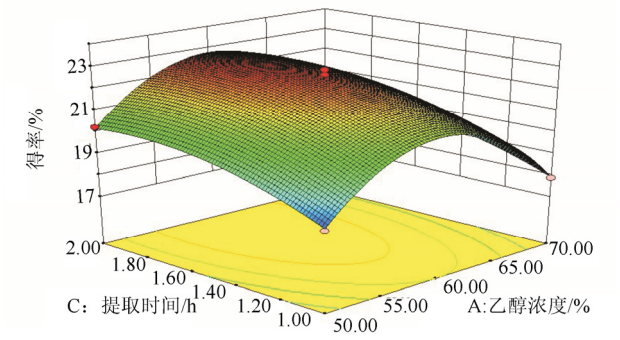

图 7 乙醇浓度与提取时间的交互作用对总得率的影响

Fig. 7 The effect of interaction of ethanol concentration and extraction time on the total yield

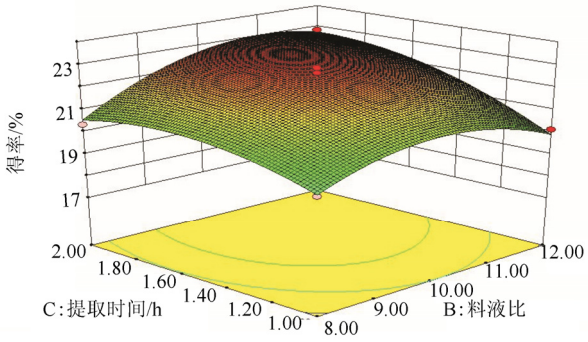

图 8 料液比与提取时间的交互作用对总得率的影响

Fig. 8 The effect of interaction of solid-liquid ratio and extraction time on the total yield

3.3.5 验证性试验 按照分析得到的最佳提取工艺条件：乙醇浓度 60%，料液比为 1∶10，提取时间 1.8 h，回流 2 次，重复 3 次实验，得到柚皮苷和新橙皮苷的实际总得率分别为：23.45%，23.56%，23.31%，平均得率为 23.44 mg·g^{-1}，与预测值相近，说明最佳工艺提取条件：乙醇浓度 60%，料液比为 1∶10，提取时间 1.8 h 稳定可靠。

4 结论

本实验通过响应面法设计优化乙醇回流提取胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的工艺，采用 Box-Behnken 设计方案建立的二次多项数学模型能较准确地预测胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的总得率。通过响应曲面综合分析得出了胡柚幼果中柚皮苷与新橙皮苷的提取工艺最优方案为：乙醇浓度为 60%，料液比 1∶10，提取时间 1.8 h，回流提取 2 次，在该条件下，柚皮苷与新橙皮苷的总得率为 23.44 mg·g^{-1}。本实验所得到的工艺条件，可行性强，重复性好，为其工业化扩大生产和胡柚幼果资源进一步开发利用提供了理论基础。

REFERENCES

[1] WU Q, PIAO X L, ZHANG J. Determination of three major flavonoids in *Citrus paradisi* cv. Changshan Huyou fruit [J]. Food Sci(食品科学), 2011, 32(18): 168-170.

[2] SONG J F, FENG J Q, HU J H, et al. Study on the dynamic changes of three contents in *Citrus Changshan* Huyou fruit in different growth periods [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(12): 1474-1478.

[3] HUANG A H, ZENG Y E, CHI Y G, et al. Optimization of extraction technology for neohesperidin in Fructus Aurantii Immaturus by orthogonal experiment [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2009, 20(6): 580-582.

[4] LEE J H, LEE S H, KIM Y S, et al. Protective effects of neohesperidin and poncirin isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata* on potential gastric disease [J]. Phytother Res, 2009, 23(12), 1748-1753.

[5] MANDALARI G, BENNETT R N, BISIGNANO G, et al. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry [J]. J Appl Microbiol, 2007, 103(6): 2056-2064.

[6] TRIPOLI E, LA G M, GIAMMANCO S, et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review [J]. Food Chem, 2007, 104(2): 466-479.

[7] FENG B M, JIANG G, JIA J M, et al. Study on the anti-allergic activities of narigin and neohesperidin [J]. J Dalian Univ(大连大学学报), 2005, 26(4): 63-64.

[8] FRYDMAN A, WEISSHAUS O, HUHMAN D V, et al. Metabolic engineering of plant cells for biotransformation of hesperedin into neohesperidin, a substrate for production of the low-calorie sweetener and flavor enhancer NHDC [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(25): 9708-9712.

[9] ROBERISON G H, CLARK J P, LUNDINN R, et al. Dihydrochalcone sweeteners: Preparation of neohesperidin dihydrochalcone [J]. Ind Eng Chem Prod Res Dev, 1974, 13(2): 125-129.

[10] WEN H L, OUYANG Z Y, HU X B, et al. Research progress of neosperidin dihydrochalcone [J]. China Condiment(中国调味品), 2008, 33(10): 70-73.

[11] GAO J, LIU F C. Optimization of the extraction technology of naringin from Aurantii Fructus immaturus by orthogonal test [J]. China Pharm(中国药房), 2014, 25(35): 3291-3293.

[12] 李积东, 黄起壬. 柚皮苷的分离提取及药理作用研究进展[J]. 北方药学, 2014, 11(7): 67-68.

[13] 中国药典. 二部[S]. 2015: 246.

[14] WANG Z C, JIANG Y R, LIU X W, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *Zingiber officinale* Roscoe stem and leaves using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity [J]. Res Dev Nat Prod(天然产物研究与开发), 2015, 27(9): 1582-1588.

[15] SHI Z, WANG J P, ZHANG J J, et al. Optimizing the extraction process of the total saponin of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma by response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(1): 68-71.

收稿日期：2017-04-22

(本文责编：曹粤锋)

http://www.chinjmap.com