

酶解辅助提取陈皮中橙皮苷的工艺优化

宁娜^{1,2}, 韩建军^{1,2}, 薛东芳³, 陈彪³, 胡宇莉⁴

(1. 铜仁职业技术学院药学院, 贵州 铜仁 554300; 2. 贵州省中兽药工程研究中心, 贵州 铜仁 554300;

3. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715; 4. 重庆市动物疾病预防控制中心, 重庆 401120)

[收稿日期] 2015-12-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 03-0024-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了优化纤维素酶辅助提取陈皮中橙皮苷的工艺, 在单因素试验基础上, 选取酶解温度、酶解 pH 值、酶用量、酶解时间作为自变量, 以橙皮苷收率为响应值, 利用 Box - Behnken 中心组合设计原理和响应面分析法, 研究各自变量及其相互作用对橙皮苷提取效果的影响, 并优化该酶解辅助提取条件。优选得到橙皮苷的最佳酶解辅助提取工艺为: 酶解温度 50 ℃、酶解 pH 值 5.0、酶用量 8.9 mg/g、酶解时间 47 min。在此最佳工艺条件下, 纤维酶辅助提取橙皮苷的收率为 5.24 mg/g, 与理论预测值(5.26 mg/g)的相对误差仅为 0.38%。优选的提取工艺简单、稳定, 为工业化生产提供参考依据。

[关键词] 陈皮; 橙皮苷; 纤维素酶; 乙醇回流法; 提取工艺

Optimization of Enzyme - assisted Extraction Process for Hesperidin from *Citrus reticulata*

NING Na^{1,2}, HAN Jian - jun^{1,2}, XUE Dong - fang³, CHEN Biao³, HU Yu - li⁴

(1. Department of Pharmacy, Tongren Vocational and Technical College, Tongren, Guizhou 554300, China;

2. Engineering Research Center of Veterinary Traditional Chinese Medicine in Guizhou, Tongren, Guizhou 554300, China;

3. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

4. Animal Disease Prevention and Control Center of Chongqing, Chongqing 401120, China)

Abstract: Hesperidin from *Citrus reticulata* was extracted by cellulase - assisted extraction process. On the basis of single factor experiments, enzymolysis temperature, pH value, cellulase dosage and enzymolysis time were chosen as independent variables and hesperidin yield as response value. Box - Behnken central composite design and response surface methodology were adopted to study the interaction of the receptive variables and their influence on the hesperidin yield, as well as the optimized extraction process. The optimum extraction condition were as follows: enzymolysis temperature 50 ℃, pH 5.0, cellulase dosage 8.9 mg/g, enzymolysis time 47 min. Under this condition, the hesperidin yield was up to 5.24 mg/g, the relative error was merely 0.38% compared to the predicted value (5.26 mg/g). The optimum extraction condition is simple and stable, and which serves as references for industrial large scale production.

基金项目: 贵州省农业类工程技术研究中心项目(黔科合农 G 字[2015]4001 号)

作者简介: 宁娜, 博士, 副教授。从事药用资源的开发利用工作。E - mail: ningnaok@163.com

Key words: *Citrus reticulata*; hesperidin; cellulase; ethanol refluxing method; extraction process

陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 其性温味苦、辛, 具有理气健脾、燥湿化痰之功效, 主治食欲减少、痰湿咳嗽等症^[1]。陈皮含有黄酮类、多糖类、挥发油等成分, 其中橙皮苷是陈皮的主要药效成分^[1-2]。研究表明橙皮苷可改善肉仔鸡小肠粘膜形态结构、促进肉仔鸡肠道对营养物质的吸收^[3]、提高肉仔鸡屠宰性能、促进肉仔鸡的免疫器官生长^[4]、提高断奶仔猪的免疫机能^[5]等作用。

陈皮的传统提取方法有煎煮法^[6]、渗漉法^[6]、回流法^[7]等。酶解辅助提取法是指在传统溶剂法的基础上, 利用生物酶降解细胞壁及间质中的成分, 破坏植物细胞壁结构, 通过降低细胞的渗透阻力促进有效成分的溶出, 具有催化效率高、专一性强、反应条件温和等特点^[8]。目前已有学者将酶解辅助提取法应用于钩藤中钩藤碱^[9]、花生壳中木犀草素^[10]、山药中多糖^[11]等成分的传统回流提取工艺中, 以达到缩短提取时间、提高有效成分收率、减少溶剂用量等目的。本文首次将酶解辅助提取法应用于陈皮中橙皮苷的提取研究, 并通过响应面分析法优化该提取工艺, 以期陈皮中橙皮苷的工业化生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; pH S-3C 精密 pH 计, 上海雷磁仪器厂; BP211D 电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; KQ-600TDB 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; RE-2000A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 药品与试剂 橙皮苷对照品, 中国食品药品检定研究院, 纯度为 95.3%; 陈皮药材, 成都荷花池中药材市场, 经本院梁玉勇教授鉴定; 纤维素酶, 宁夏和氏璧生物技术有限公司, 酶活力为 20000 U/g; 水为重蒸水; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 橙皮苷的 HPLC 测定

1.3.1.1 色谱条件 参考《中华人民共和国兽药典》^[1], 具体色谱条件为: Diomansil - C18 柱 (4.6 mm × 250.0 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 醋酸 - 水 (35:4:61); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 28 °C; 检测波长: 283 nm; 进样量: 20 μL。该色谱条件下理论塔板数以橙皮苷峰计算不低于 2000。

1.3.1.2 橙皮苷的提取 酶解辅助提取陈皮的工艺流程如下: 陈皮 → 干燥、粉碎成粗粉 (过 40 目筛) → 酶解 → 回流提取 → 合并提取液 → 减压浓缩至 50 mL → 测定橙皮苷含量。通过参考文献^[7]及结合预试验结果, 确定回流提取的工艺条件为: 加入 20 倍量 70% 乙醇, 在 75 °C 条件下回流提取 60 min。

1.3.1.3 橙皮苷收率的计算 精密吸取陈皮提取液 0.1 mL 至 25 mL 容量瓶中, 并用甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 计算橙皮苷收率。橙皮苷收率按如下公式进行计算: 橙皮苷收率 (mg/g) = 提取得到的橙皮苷质量 (mg) / 陈皮药材质量 (g)。

1.3.2 单因素试验

1.3.2.1 酶解温度 准确称取 10 g 陈皮粉末, 加入 100 mL 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲溶液, 在酶解 pH 值 5.0、酶用量 9 mg/g、酶解时间 50 min 的条件下, 考察不同酶解温度 (40、45、50、55、60 °C) 对橙皮苷收率的影响。

1.3.2.2 酶解 pH 值 准确称取 10 g 陈皮粉末, 加入 100 mL 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲溶液, 在酶解温度 50 °C、酶用量 9 mg/g、酶解时间 50 min 的条件下, 考察不同酶解 pH 值 (4.0、4.5、5.0、5.5、6.0) 对橙皮苷收率的影响。

1.3.2.3 酶用量 准确称取 10 g 陈皮粉末, 加入 100 mL 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲溶液, 在酶解温度 50 °C、酶解 pH 值 5.0、酶解时间 50 min 的条件下, 考察不同酶用量 (5、7、9、11、13 mg/g) 对橙皮苷收率的影响。

1.3.2.4 酶解时间 准确称取 10 g 陈皮粉末, 加

入 100 mL 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲溶液,在酶解温度 50 ℃、酶解 pH 值 5.0、酶用量 9 mg/g 的条件下,考察不同酶解时间(10、30、50、70、90 min)对橙皮苷收率的影响。

1.3.3 响应面法优化试验 在单因素试验基础上,根据 Box - Behnken 中心组合设计原理,以橙皮苷收率为考察指标,对酶解温度、酶解 pH 值、酶用量、酶解时间进行 4 因素 3 水平试验,具体试验因素水平安排见表 1。

表 1 Box - Behnken 设计因素及水平				
代码	因素	水平		
		-1	0	+1
X_1	酶解温度/℃	45	50	55
X_2	酶解 pH 值	4.5	5.0	5.5
X_3	酶用量/(mg · g ⁻¹)	7	9	11
X_4	酶解时间/min	30	50	70

1.3.4 不同提取方法对橙皮苷收率的影响 平行比较传统回流提取法和酶解辅助提取法对陈皮中橙皮苷提取的影响。其中传统回流提取法的具体提取操作为:准确称取 10 g 陈皮粉末,加入 100 mL 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲溶液,在提取 pH 值为 5.0、提取温度为 50 ℃ 的条件下提取 47 min 后收集滤液,向药材中加入 20 倍量 70% 乙醇,在 75 ℃ 条件下回流提取 60 min,合并滤液并减压浓缩至 50 mL,经过适当稀释后取续滤液按照 1.3.1 项下色谱条件进行 HPLC 测定,并计算橙皮苷收率。酶解辅助提取法的具体操作为:准确称取 10 g 陈皮粉末,加入 100 mL 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲溶液,在酶解温度 50 ℃、酶解 pH 值 5.0、酶用量 8.9 mg/g 的条件下酶解时间 47 min 收集滤液,向药材中加入 20 倍量 70% 乙醇,在 75 ℃ 条件下回流提取 60 min,合并滤液并减压浓缩至 50 mL,经过适当稀释后取续滤液按照 1.3.1 项下色谱条件进行 HPLC 测定,并计算橙皮苷收率。

2 结果与分析

2.1 橙皮苷的 HPLC 测定结果 在 1.3.1.1 项色谱条件下测定橙皮苷对照品及陈皮药材得到的结果见图 1。峰面积 Y 与小檗碱浓度 X (μg/mL) 的回归方程为: $Y=133592.06X-12001.40$ ($R^2=0.9999$),线性范围为:8.64 ~ 51.84 μg/mL。

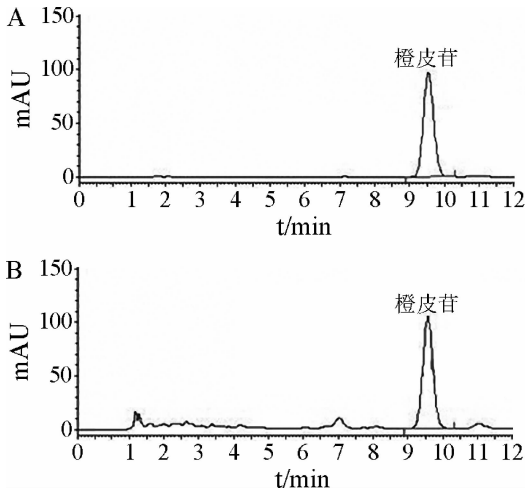


图 1 橙皮苷对照品(A)和陈皮药材(B)的 HPLC 图

2.2 单因素试验结果

2.2.1 酶解温度 酶解温度对橙皮苷收率的影响见图 2。由图 2 可知,橙皮苷收率随着酶解温度的升高先增大后减小。当酶解温度为 50 ℃ 时,橙皮苷收率最大。

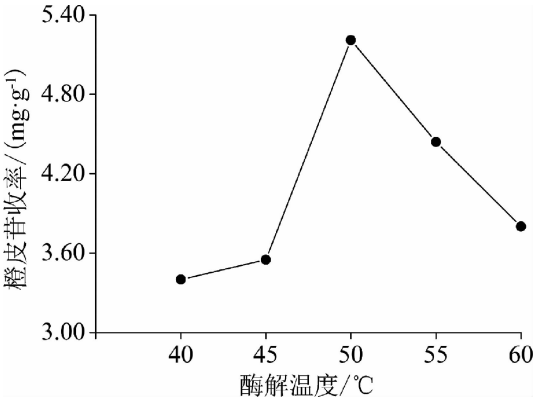


图 2 酶解温度对橙皮苷收率的影响

2.2.2 酶解 pH 值 不同酶解 pH 值对橙皮苷收率的影响见图 3。由图 3 可知,橙皮苷收率随着酶解 pH 值的增大先增大后减小。酶解 pH 值为 5.0 时,橙皮苷收率最大。

2.2.3 酶用量 不同酶用量对橙皮苷收率的影响见图 4。由图 4 可知,橙皮苷收率随着纤维素酶用量的增加先增大后减小。纤维素酶用量为 9 mg/g 时,橙皮苷收率最大。

2.2.4 酶解时间 不同酶解时间对橙皮苷收率的影响见图 5。由图 5 可知,橙皮苷收率随着酶解时间的延长而升高。当酶解时间超过 50 min 后,橙皮苷收率的增加趋于平缓。

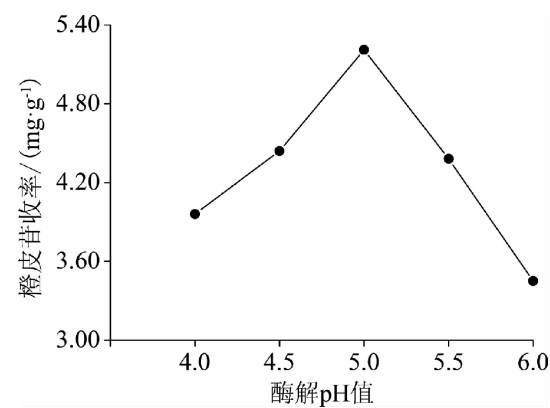


图3 酶解pH值对橙皮苷收率的影响

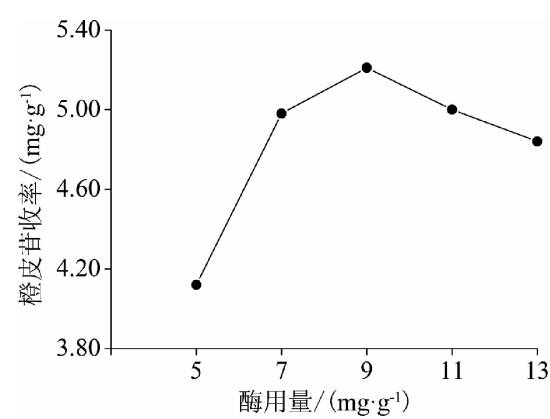


图4 酶用量对橙皮苷收率的影响

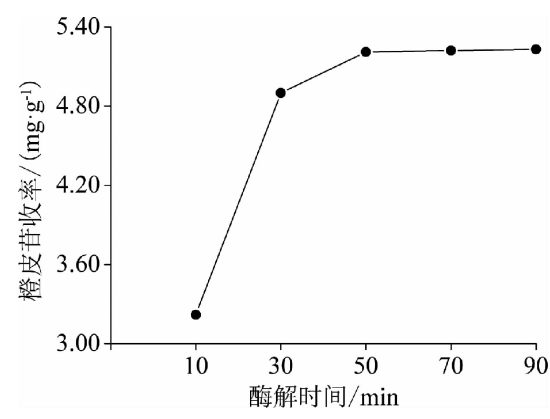


图5 酶解时间对橙皮苷收率的影响

2.3 响应面试验优选最佳工艺条件

2.3.1 响应面试验设计结果 响应面试验设计及结果见表2,通过 Design-Expert 8.0.6 软件拟合得到影响橙皮苷收率的回归方程: $Y = 5.260 + 0.078X_1 + 0.072X_2 - 0.052X_3 - 0.033X_4 - 0.040X_1X_2 + 0.120X_1X_3 + 0.180X_1X_4 - 0.055X_2X_3 + 0.010X_2X_4 - 0.045X_3X_4 - 0.610X_1^2 - 0.610X_2^2 - 0.560X_3^2 -$

表2 Box-Behnken 试验设计及结果					
试验号	因素				Y 橙皮苷收率/(mg·g ⁻¹)
	X ₁ 酶解温度/℃	X ₂ 酶解pH 值	X ₃ 酶用量/(mg·g ⁻¹)	X ₄ 酶解时间/min	
1	1	0	0	-1	4.46
2	-1	0	0	1	4.20
3	0	-1	-1	0	3.94
4	1	1	0	0	4.14
5	1	0	1	0	4.30
6	-1	0	-1	0	4.16
7	0	1	-1	0	4.21
8	0	-1	1	0	3.98
9	0	0	0	0	5.31
10	0	0	0	0	5.25
11	-1	-1	0	0	3.89
12	-1	0	1	0	3.88
13	0	-1	0	1	4.49
14	1	0	-1	0	4.10
15	0	0	-1	1	4.73
16	1	0	0	1	4.70
17	0	1	0	1	4.67
18	0	1	1	0	4.03
19	0	0	-1	-1	4.74
20	0	0	1	1	4.44
21	0	1	0	-1	4.64
22	1	-1	0	0	4.11
23	0	0	1	-1	4.63
24	0	0	0	0	5.21
25	0	-1	0	-1	4.50
26	-1	1	0	0	4.08
27	-1	0	0	-1	4.66

$0.091X_4^2$ 。橙皮苷收率的二次多项回归模型方差分析结果见表3。由表3 数据可知,模型极显著($P < 0.01$),失拟项不显著($P > 0.05$),回归模型的复相关系数 R^2 为 0.9866,校正后的复相关系数 R_{Adj}^2 为 0.9709,说明所选变量可解释响应值 97.09%的变化,利用此回归方程对试验结果进行分析是可靠的。模型变异系数 CV 值为 0.32% ($< 10\%$),说明本试验具有较高的可靠性与精密度,信噪比 S/N 值为 27.379 (> 4),说明回归方程具有较高的拟合度与可信度。由 F 值可知各因素

对橙皮苷收率的影响程度顺序为:酶解温度 > 酶解 pH 值 > 酶用量 > 酶解时间。由 P 值可知回归方程一次项中, X_3 对橙皮苷收率的影响显著 ($P < 0.05$), X_1 、 X_2 对橙皮苷收率的影响极显著 ($P < 0.01$);二次项中 X_4^2 对橙皮苷收率的影响显著 ($P < 0.05$), X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对橙皮苷收率的影响极显著 ($P < 0.01$);交互项中 X_1X_3 、 X_1X_4 对橙皮苷收率的影响极显著 ($P < 0.01$)。

表 3 回归方程的方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	4.27	14	0.30	62.99	<0.0001
X_1	7.40×10^{-2}	1	7.40×10^{-2}	15.23	0.0021
X_2	6.20×10^{-2}	1	6.20×10^{-2}	12.74	0.0039
X_3	3.20×10^{-2}	1	3.20×10^{-2}	6.62	0.0244
X_4	1.30×10^{-2}	1	1.30×10^{-2}	2.76	0.1227
X_1X_2	6.40×10^{-3}	1	6.40×10^{-3}	1.32	0.2724
X_1X_3	5.80×10^{-2}	1	5.80×10^{-2}	11.91	0.0048
X_1X_4	0.12	1	0.12	25.33	0.0003
X_2X_3	1.20×10^{-2}	1	1.20×10^{-2}	2.50	0.1397
X_2X_4	4.00×10^{-4}	1	4.00×10^{-4}	0.08	0.7786
X_3X_4	8.10×10^{-3}	1	8.10×10^{-3}	1.67	0.2200
X^2	2.01	1	2.01	414.85	<0.0001
X^2	2.01	1	2.01	414.85	<0.0001
X^2	1.65	1	1.65	340.72	<0.0001
X^2	4.40×10^{-2}	1	4.40×10^{-2}	9.10	0.0107
残差	5.80×10^{-2}	12	4.84×10^{-3}		
失拟项	5.30×10^{-2}	10	5.30×10^{-3}	2.09	0.3667
纯误差	5.07×10^{-3}	2	2.53×10^{-3}		
总误差	4.32	26			
决定系数 $R^2 = 0.9866$	校正决定系数 $R^{Adj} = 0.9709$	变异系数 CV	0.32%	信噪比 S/N	27.379

2.3.2 响应面分析 经 Design - Expert 8.0.6 软件对模型进行分析,得到各因素对橙皮苷收率影响的响应面图见图 6。响应曲图可直观反映各因素交互作用对橙皮苷收率的影响,曲面越陡峭则表示影响越显著。由图 6 可知,酶解温度与酶用量、酶解温度与酶解时间对橙皮苷收率的影响较显著,与上述方差分析结果一致。

2.3.3 最佳工艺条件的确定及验证试验 通过 Design - Expert 8.0.6 软件分析,得到最佳酶解辅助提取陈皮中橙皮苷的工艺条件为:酶解温度 50.20 ℃、酶解 pH 值 5.03、酶用量 8.92 mg/g、酶解时间 47.35 min,在此条件下,橙皮苷的理论收率为 5.26 mg/g。考虑到操作的可行性,将最佳酶解工艺条件修正为:酶解温度 50 ℃、酶解 pH 值 5.0、酶用量 8.9 mg/g、酶解时间 47 min。在该工艺条件下,对陈皮进行 3 次平行提取试验,结果表明橙皮苷的平均收率为 5.24 mg/g, RSD 为 0.67% ($n = 3$),试验结果与模型预测相对误差仅为 0.38%。另取同等质量陈皮 3 份,不加纤维素酶,其他操作均与酶

解法相同。结果表明,传统回流提取法中橙皮苷的平均收率仅为 2.76 mg/g, RSD 为 0.91% ($n = 3$)。

3 讨论与小结

陈皮主产于我国四川、广东、浙江、福建等地。陈皮的传统提取方法(如煎煮法^[6]、渗漉法^[6]、回流法^[7])存在提取效率低、溶剂用量大、耗时长等缺点。本研究首次将酶解辅助提取法应用于陈皮提取中,即在传统回流提取的基础上,加入酶解预处理步骤,以期陈皮中橙皮苷的工业化提取提供参考。

在单因素试验中,就酶解温度而言,橙皮苷收率随酶解温度的升高而增大,当酶解温度达到 50 ℃后,随着酶解温度的进一步升高而呈下降趋势,这是由于环境温度过低,不利于酶活性的发挥,环境温度过高则会引起酶变性、失活,从而影响橙皮苷收率;就酶解 pH 值而言,橙皮苷收率随着酶解 pH 值的增大而增大,当时酶解 pH 达到 5.0 后,随着酶解 pH 值的进一步升高而呈下降趋势,这是由于酶活力受环境 pH 值影响,过高或过低均不利于酶活性的发挥,从而影响橙皮苷收率;就酶用量而

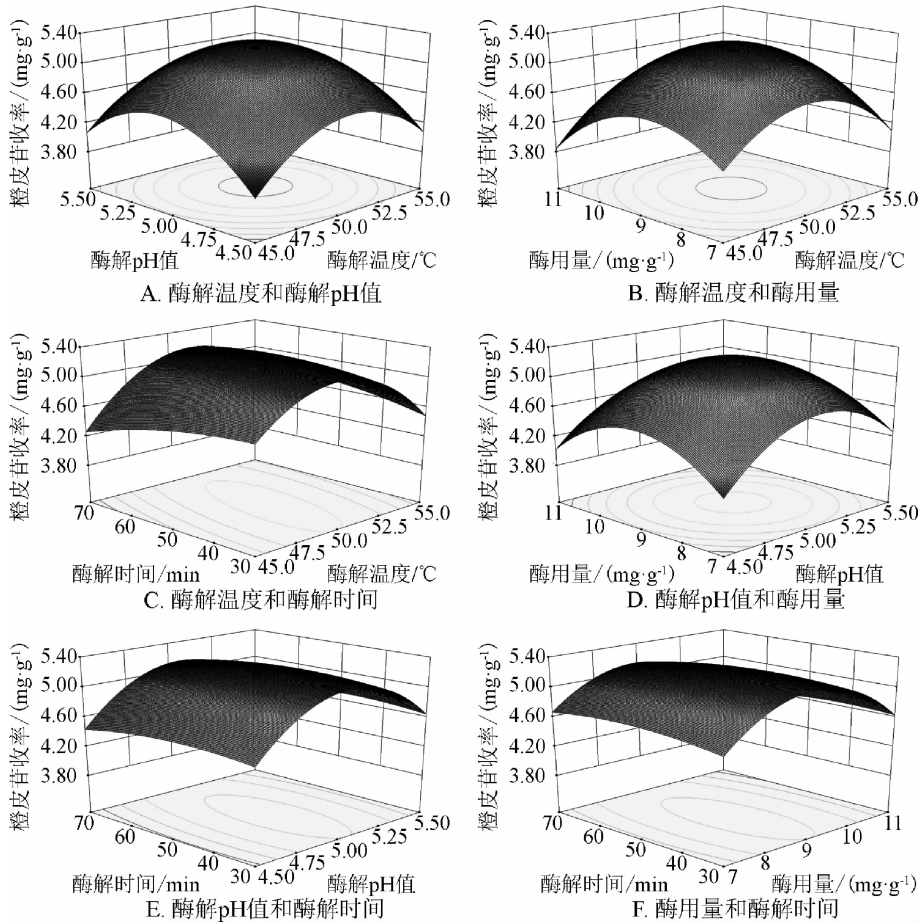


图6 各因素相互作用对橙皮苷收率影响的响应面图

言,橙皮苷收率随着酶用量的增加而增大,当酶用量为9 mg/g时,酶相对于底物已达到饱和,继续增加酶用量则相对过剩的酶会包裹住药材颗粒,从而阻碍有效成分的溶出;就酶解时间而言,橙皮苷收率随着酶解时间的延长而增大,当酶解时间超过50 min后,随着酶解时间的进一步延长而无明显变化。

通过响应面试验优选得到陈皮中橙皮苷的最佳酶解辅助提取工艺条件为:酶解温度 50 ℃、酶解 pH 值 5.0、酶用量 8.9 mg/g、酶解时间 47 min。该优选的工艺稳定可行,与传统方法相比,橙皮苷收率有较大提高。该提取工艺中的反应条件温和易控、溶剂消耗量少、耗时短,为陈皮中橙皮苷的工业化生产提供参考依据。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版二部[S].
[2] 赵秀玲. 陈皮生理活性成分研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 376-381.
[3] 曹贵彬, 易凤珍, 游金明, 等. 陈皮苷制剂对爱拔益加肉鸡

生长性能, 免疫器官指数及小肠黏膜形态结构的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(3): 710-717.
[4] 王海良, 崔虎, 吕慧源, 等. 橙皮苷对肉仔鸡生产性能、屠宰性能及免疫机能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(20): 57-60.
[5] 刘英, 王之盛, 周安国. 橙皮苷、绿原酸对断奶仔猪生长、抗氧化和免疫机能的影响[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(9): 1233-1236.
[6] 蔡庆顺, 钟小群, 余华. 陈皮不同提取工艺橙皮苷提取率分析[J]. 中成药, 2010, 32(6): 1067-1070.
[7] 韦正, 杨丽, 李旻, 等. Box-Behnken 效应面法优化陈皮中橙皮苷及川陈皮素提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 17-20.
[8] 王云洁, 闫治攀, 白福祖. 酶法在中药提取中的应用进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(9): 110-112.
[9] 吴卫, 唐振祥, 李素珍. 酶解法辅助提取钩藤中钩藤碱的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 23-25.
[10] 熊清平, 张强华, 石莹莹, 等. 酶法辅助提取花生壳中木犀草素的工艺研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(1): 46-49.
[11] 董义, 沈才洪, 曾里, 等. 酶解辅助提取山药多糖的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2015, 36(3): 56-60.