

橘皮中类柠檬苦素提取工艺及其驱蝇效应探讨

罗爱民, 金 晶, 潘雪雪, 杨 艳*, 吴海燕

湖北民族学院化学与环境工程学院, 恩施 445000

摘要: 采用高效液相色谱(HPLC)法检测了通过低温微波辐射辅助处理后橘皮中类柠檬苦素的含量, 并对提取分离后所得的类柠檬苦素以果蝇为实验对象进行了驱蝇效应探讨。提取实验应用正交试验设计法, 考察提取溶剂、溶液 pH 值、提取温度、提取时间、料液比五个因素对橘皮中类柠檬苦素提取率的影响, 采用正交实验设计表 $L_{16}(4^5)$ 对橘皮中类柠檬苦素的提取工艺进行了优化。结果表明, 最优提取工艺为: 无水乙醇作为提取剂、溶液 pH = 5、提取温度 50 °C、提取时间 120 min、料液比 1: 12。在最优工艺条件下, 橘皮中类柠檬苦素提取量为 0.876 mg/g。在驱蝇效应实验中, 通过不同浓度的类柠檬苦素对果蝇驱除效应的比较, 发现时间和浓度对果蝇均有影响, 但浓度效应大于时间效应, 喷洒 1.152 mg/mL 浓度的类柠檬苦素溶液可以在 12h 内将果蝇全部杀死。

关键词: 高效液相色谱; 橘皮; 类柠檬苦素; 提取工艺; 驱蝇

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.032

Extraction and Anthelmintic Effect of Limonoids from Orange Peel

LUO Ai-min, JIN Jing, PAN Xue-xue, YANG Yan*, WU Hai-yan

School of Chemistry and Environmental Engineering, Hubei University for Nationalities, Hubei Enshi 445000, China

Abstract: In this study, the limonoids was extracted from orange peel by low-temperature microwave radiation and solvent reflux extraction. The content of limonoids was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The orthogonal experiment design was used to optimize the extraction conditions. In addition, the anthelmintic effect of the extract was tested on drosophila. The results showed that the optimal extraction conditions were: using ethanol as extraction solvent, pH of 5, extraction temperature of 50 °C, extraction time of 120 min, material/solvent ratio of 1: 12. Under the optimal conditions, the extraction yield of limonoids was 0.876 mg/g. Different concentrations of limonoids extract all showed anthelmintic effects on drosophila in time and concentration dependent manner. The effect of sample concentration was higher than the effect of time. When the concentration of extract reached 1.152 mg/mL, drosophila was all killed in 12 hours.

Key words: high performance liquid chromatography; orange peel; limonoids; extraction process; anthelmintic effect

橘子营养价值很高, 蕴含丰富的蛋白质、维生素、矿物质元素等, 成为人们日常生活中受青睐的水果。橘皮主要由外果皮、中果皮和内果皮组成。外果皮富含精油和色素, 约占果重的 10%; 中果皮蕴藏柠檬苦素和纤维素约占果重的 10% ~ 30%; 内果皮主要由果胶、纤维素和木质素组成, 约占果重的 10%^[1]。目前, 除了 22% ~ 28% 的橘皮被利用外, 较大部分未充分利用, 通常丢弃处理, 既造成资源浪

费, 又污染环境。橘皮中的类柠檬苦素是一类高度氧化的四环三萜类次生代谢产物, 具有独特的生物活性, 其分子式 $C_{26}H_{30}O_8$, 分子量 470, 主要存在于芸香科和楝科植物组织中的^[2]。20 世纪 60 年代, Arigoni 和 Barton 等^[3]用化学和 X-ray 的方法对柠檬苦素的结构进行了研究, 1989 年, Shin Hasegawa 首次发现柠檬苦素类似物^[4]。1993 年 Mendel 等^[5]人对柠檬苦素类似物的结构研究分析时发现, 柠檬苦素结构中呋喃环和环氧结构是草地黏虫的幼虫拒食的主要原因。Klocke 等^[6]人研究发现类柠檬苦素具有使昆虫拒食和昆虫产卵抑制的特性。近几年随着对自然资源充分利用的逐渐重视和对橘皮柠檬苦素的深入研究, 发现柠檬苦素具有消炎镇痛、抗氧

收稿日期: 2013-07-12 接受日期: 2013-11-06

基金项目: 国家自然科学基金(31360408/C200210); 湖北省自然科学基金(2014CFC1126); 湖北民族学院应用化学产业人才计划(2013HBM); 湖北民族学院 2013 年大学生科研训练计划(2013Z105)

* 通讯作者 Tel: 86-013789908676; E-mail: yanyang8069@163.com

化性、抗癌抗肿瘤、抗焦虑^[7,8]等生物活性。橘皮中的类柠檬苦素绿色环保,不影响乙酰胆碱酯酶的活性,对人及其它高等动物没有毒害^[9],在环境中容易降解,不易让昆虫产生抗药性,可以作为新型驱蝇剂取代目前市场销售的对人体具有潜在危害的驱蝇剂来防治日常蚊虫。本文通过正交实验,对橘皮中类柠檬苦素的提取工艺进行优化,并对提取得到的类柠檬苦素对果蝇进行了驱蝇活性试验。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

橘子皮购于恩施农贸市场,粉碎、经石油醚脱脂后微波处理(功率300 W,辐射时间1 min)。柠檬苦素标准品(含量 $\geq 98\%$,上海金穗生物科技有限公司),水(超纯水),果蝇(委托湖北民族学院生命科学学院老师培养)。乙腈(色谱级)、无水乙醇、乙酸乙酯、丙酮、石油醚(60~90℃)、冰醋酸、98%硫酸均为AR,购于上海国药集团。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(HPLC)1260 Infinity Series (Agilent),配二极管阵列检测器(DAD);DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(上海美强仪器设备有限公司);KQ2200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FA1004B电子天平(上海佑科仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(上海英化设备有限公司);800型离心机(上海云楼医用仪器厂);RE-52A旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);家用微波炉。

表1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors				
	提取时间/t Extraction time (min)	提取温度 Extraction temperature (°C)	料液比 Liquid to solid ratio (g/mL)	溶剂 Solvent	pH
1	60	30	1:10	水	2.0
2	90	50	1:12	乙酸乙酯	5.0
3	120	70	1:15	丙酮	8.0
4	180	90	1:20	无水乙醇	10.0

1.3.4 标准曲线的绘制与线性回归方程

准确称量14.4 mg标准柠檬苦素(纯度 $\geq 98\%$)于小烧杯中,用流动相溶解,定容到25 mL的容量瓶中,配成质量浓度为0.576 mg/mL标准溶

1.3 实验方法

1.3.1 类柠檬苦素提取流程

将新鲜的橘皮用剪刀剪成大小基本一致的碎片(小于1 mm),放到50℃恒温烘箱中烘干至水分小于5%,在棕色瓶中倒入石油醚,料液比为1:5,浸泡烘干的橘皮8h,脱去橘皮中的油脂,过滤、自然风干后,用家用微波炉(功率300 W)辐射1 min进行辅助处理。具体提取流程如图1所示。

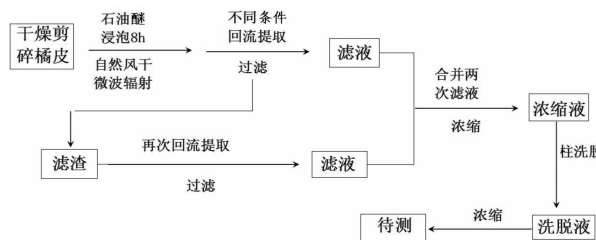


图1 橘皮中类柠檬苦素提取流程

Fig. 1 The extraction process of limonoids from orange peel

1.3.2 HPLC 检测条件

色谱柱:Edipse plus C₁₈(4.6 mm × 10 mm,3.5 μm);流动相:乙腈:水(45:55,V:V),流速:0.8 mL/min;检测器:二极管阵列检测器(DAD),检测波长:210 nm;柱温:室温;进样量为10 μL。检测之前通过DAD扫描190~400 nm的紫外吸收,确定最佳检测波长为210 nm。

1.3.3 正交实验设计优化提取工艺

通过L₁₆(4⁵)正交试验设计表,考察提取时间、提取温度、提取溶剂、液料比、溶液pH值对橘皮中类柠檬苦素提取率的影响,因素与水平见表1。

液。分别取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL柠檬苦素标准溶液于10 mL的容量瓶中,配成浓度为:11.52、23.04、34.56、46.08、57.60 mg/L的标准液。

根据HPLC对柠檬苦素标准品的检测结果,所

得结果采用线性回归方法以为质量浓度为横坐标(X)、吸光度为纵坐标(Y)绘制标准曲线。根据标准曲线,采用线性回归方法计算出标准曲线方程为: $Y = 10.9308016X - 2.901838$ ($R^2 = 0.99969$)。提取物中类柠檬苦素的检测基于以上方程,采用外标法进行含量计算。

样品中的类柠檬苦素的质量 $m = A_2/A_1 \times C \times V \times S$ (1)

类柠檬苦素含量(mg/g) = $m/M_{\#}$ (2)

式(1)中, A_1 为标准品 HPLC 吸收峰面积; A_2 为样品吸收峰面积; C 为标准样品质量浓度(mg/mL); V 为样品体积(mL); S 为样品稀释倍数。类柠檬苦素含量以 mg/g 计算。

1.3.5 驱蝇活性试验

将类柠檬苦素提取物用葡萄糖口服液配制成 0、0.058、0.230、0.461、0.691、0.922、1.152 mg/mL 6 个不同质量浓度梯度的溶液。将个体大小和饲养环境相同的果蝇分别放入 7 个 1000 mL 的大烧杯中,每个烧杯放入 80 只和适量的培养基和水,培养 48 h 后再用不同浓度的类柠檬苦素溶液向烧杯中的果蝇培养基喷洒(培养基表面有小液滴即可),60 min 后再喷洒一次,烧杯口用透气的纱布遮盖好,置于相同的环境下,观察果蝇状态,记录果蝇死亡数目,轻轻触动果蝇没有任何反应则视为死亡。按时间顺序分别计算果蝇死亡率及校正死亡率。计算公式为:

死亡率 = (死亡果蝇数 ÷ 烧杯内总的果蝇数) × 100% (3)

校正死亡率 = [(处理死亡率 - 对照死亡率) ÷ (1 - 对照死亡率)] × 100% (4)

2 结果与讨论

2.1 样品检测色谱图

将提取液按图 1 中提取流程中的处理方式进行处理,再进行 HPLC 检测,通过外标法,与对照品的 HPLC 进行对比,确定提取液中类柠檬苦素的含量。样品与标准品的 HPLC 检测分别如图 2 中(A)、(B)所示。

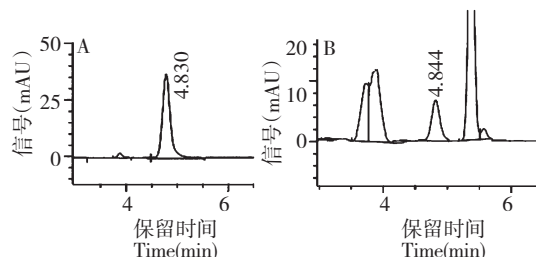


图 2 柠檬苦素标准品(A)及橘皮类柠檬苦素提取物(B)的 HPLC 检测图

Fig. 2 HPLC chromatograms of limonin standard (A) and limonoids extract of orange peel (B)

2.2 正交实验结果及数据分析

实验对比了回流和索氏提取及提取次数的影响。索氏提取率较回流法略高,但消耗溶剂量大,浪费原材料,但回流次数过长,易使类柠檬苦素分解转化,提取量下降,以回流两次为宜。故选用回流法进行提取。根据正交实验设计表,对橘皮提取的类柠檬苦素进行了正交设计实验。每组实验平行重复三次。准确称取 3.00 g 预处理后橘皮,根据实验设计(表 2),回流提取两次,合并两次提取液。取纯化处理后提取液 1 mL,用流动相稀释至 10 mL,超声,微孔滤膜过滤,待测。提取液经 HPLC 检测,并进行含量分析。正交试验结果如表 2 所示。

表 2 正交实验设计及结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiment

因素 Factors	时间 Time (min)	温度 Temperature (°C)	物料比 Liquid to solid ratio (g/mL)	溶剂 Solvent	pH	类柠檬苦素含量 Concentration of limonoids (mg/g)
1	1	1	1	1	1	0.205
2	1	2	2	2	2	0.579
3	1	3	3	3	3	0.548
4	1	4	4	4	4	0.624
5	2	1	2	3	4	0.463
6	2	2	1	4	3	0.706
7	2	3	4	1	2	0.499

8	2	4	3	2	1	0.440
9	3	1	3	4	2	0.801
10	3	2	4	3	1	0.774
11	3	3	1	2	4	0.453
12	3	4	2	1	3	0.501
13	4	1	4	2	3	0.386
14	4	2	3	1	4	0.490
15	4	3	2	4	1	0.761
16	4	4	1	3	2	0.593
K ₁	0.489	0.464	0.489	0.424	0.545	
K ₂	0.527	0.637	0.576	0.465	0.618	
K ₃	0.632	0.565	0.570	0.595	0.535	
K ₄	0.557	0.539	0.571	0.723	0.508	
R	0.143	0.173	0.087	0.299	0.110	

2.3 方差分析

通过正交试验设计,5种因素对类柠檬苦素提取量的影响方差分析如表3所示。从表3可以看出,5种因素中提取溶剂对类柠檬苦素提取影响最

为显著,其临界值最大。5种因素对提取量的影响程度为提取溶剂 > 提取温度 > 提取时间 > pH > 料液比。

表3 回归方程方差分析

Table 3 Variance analysis of regression equation

因素 Factors	偏差平方和 (SS)	均方差 (SS/3)	F*	SS*	PC%
时间 Time	0.044	0.0147	0.588	0.0293	7.9189
温度 Temperature	0.061	0.0203	0.816	0.0407	11.0000
料液比 Liquid to solid ratio	0.021	0.0070	0.281	0.0140	3.7838
溶剂 Solvent	0.222	0.0740	2.968*	0.1480	40.0000
pH	0.026	0.0087	0.348	0.0173	4.6756
误差 Error	0.370	-	-	-	-

* $P < 0.05$.

通过验证实验,在最佳提取工艺,即提取时间为120 min、提取温度为50℃、料液比为1:12、提取溶剂为无水乙醇溶液、pH值为5条件下,进行重复提取实验,平行提取三次,柠檬苦素类物质产率取三次平均值,此时柠檬苦素类物质的提取量为0.876 mg/g,说明该工艺条件是可靠的。

2.4 驱蝇试验结果

柠檬苦素能够抑制昆虫取食,最后可能导致昆虫拒食而饥饿死亡^[10]。利用不同浓度的柠檬苦素溶液分别对果蝇培养基喷洒,60 min后重复喷洒一次,静置5 h和12 h后果蝇均出现不同程度的死亡现象,其死亡率及校正死亡率结果如图3所示。

由图3可以得知,类柠檬苦素对果蝇有较好的

驱除效果,驱除效果随着类柠檬苦素质量浓度的增大而增强。喷洒1.152 mg/mL浓度的类柠檬苦素溶液静置5 h后,果蝇校正死亡率达到91.03%,静置12 h后果蝇全部死亡。较低浓度的0.058 mg/

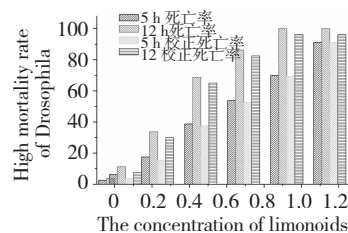


图3 橘皮柠檬苦素驱蝇活性

Fig. 3 The insecticidal activities of limonoids from orange peel on drosophila

mL 浓度的类柠檬苦素喷洒静置 12 h 后,果蝇校正死亡率为 7.50%,驱除果蝇效果较差。驱除效果也随着静置作用时间的延长而增大,但浓度效应大于时间效应。

3 结论

本实验对橘皮中柠檬苦素提取工艺进行了探讨,对反应时间、提取温度、料液比、溶剂、pH 值等因素的影响进行了正交实验,利用正交 $L_{16}(4^5)$ 设计对实验结果进行工艺优化,得出柠檬苦素最佳提取路线是 $A_3B_2C_2D_4E_2$,即回流法提取橘皮中柠檬苦素最佳工艺条件为:时间 120 min、温度 50 °C、料液比 1:12、提取溶剂无水乙醇溶液、pH 值为 5。并进一步在最优工艺条件下进行了验证,重复提取实验三次,验证实验的平均提取值为 0.876 mg/g,所得最佳提取工艺得到实际验证。

驱蝇试验结果表明类柠檬苦素浓度和作用时间对果蝇驱除效果均有很大影响,随着浓度的增加和作用时间的延长其驱除效果较为显著,但其浓度效应大于时间效应。1.152 mg/mL 浓度的类柠檬苦素溶液可以在 5 h 内将果蝇驱除效果达到 91.03%,喷洒 12 h 后果蝇全部死亡;较低浓度的 0.058 mg/mL 浓度的类柠檬苦素喷洒静置 12 h 后,果蝇驱除效果仅为 7.50%,驱除果蝇效果较差。

参考文献

1 Zhang M(张珉),Zhong XH(钟晓红). Advance in study of

functional components in Citrus. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报),2009,25:137-140.

2 Liu J(刘君). Study on the technology conditions of extraction and purification of limonoids in citrus seeds. Chongqing: Southwest University(西南大学),MSc,2008.

3 Arigoni D,Barton D,Corey EJ, *et al.* The constitution of limonoids. *Cell Mol Life*,1960,16(2):41-49.

4 Hasegawa S,Bennett RD. Limonoid glycosides in Citrus. *Phytochemistry*,1989,28:1717-1720.

5 Mendel MJ,Alford AR,Rajab MS. Relationship of citrus limonoid structure to feeding deterrence against fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Environ Entomol*,1993,22:167-173.

6 Klocke JA,Kubo I. Citrus limonoid by-products as insect control agents. *Entomol Exp ET App*,1982,32(3):299-301.

7 Poulouse SM,Harris ED. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *Nutrition*,2005,135:870-877.

8 Zou LS(邹连生). Study on extraction and purification and antitumorous *in vitro* of limonoids in Citrus. Chongqing: Southwest Agricultural University(西南农业大学),MSc,2001.

9 Schoonhoven LM. Stereo Selective Perception of an Tifeedants in Insects. In *Stereoselectivity of Pesticides. Biologicaland Chem Icalproblems*. Netherland: Elsevier Scipub,1988. 289-302.

10 Zhao BG(赵博光),Yang XY(杨雪云). Studies and potential application of the plant antifeedants. *J Nanjing Forest Univ*(南京林业大学学报),1999,23(5):1-6.

(上接第 495 页)

12 Yang MH(杨明惠),Liu MH(刘满红),He LX(何丽仙), *et al.* Determination of hydroxyl free radical in Fenton reaction by decolouring spectrophotometry and its analytical applications. *Chin J Analysis Laboratory*(分析实验室),2006,25:77-80.

13 Hu XL(胡喜兰),Han ZX(韩照祥),Tao Y(陶莹), *et al.*

Antioxidant activity detection of 17 plant samples by using DPPH · method. *Food Sci Tech*(食品科技),2006,10:264-268.

14 Pleiss J,Fischer M,Schmid R D. Anatomy of lipase binding sites;the scissile fatty acid binding site. *Chem Physics Lipids*,1998,93:67-80.