

超声辅助提取野西瓜藤中 葫芦素 B 工艺的优化

赵春燕¹, 刘钰莹^{1,2}, 马 越², 赵晓燕², 张 超^{2,*}

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866;

2. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 果蔬农产品保鲜与加工北京市重点实验室, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097)

摘 要:采用超声辅助法从野西瓜藤中提取葫芦素 B, 研究料液比、乙醇体积分数、超声时间和超声温度对野西瓜藤中葫芦素 B 得率的影响, 并以葫芦素 B 得率为响应值, 采用响应面分析方法优化葫芦素 B 提取工艺。结果显示: 超声处理温度对葫芦素 B 得率影响最大, 其次是乙醇体积分数和超声时间, 当超声温度 80 ℃、超声时间 30 min、乙醇体积分数 75% 时, 葫芦素 B 得率最高, 可以达到 84.7%, 提取量为 0.168 mg/g。

关键词:野西瓜, 藤, 超声辅助, 葫芦素 B, 响应面法

Optimization of ultrasonic-assisted extraction of cucurbitacin B from watermelon (*Citrullus colocynthis*) vine

ZHAO Chun-yan¹, LIU Yu-ying^{1,2}, MA Yue², ZHAO Xiao-yan², ZHANG Chao^{2,*}

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences; Beijing Key Laboratory of Fruits and Vegetable Storage and Processing; Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture, Beijing 100097, China)

Abstract: Cucurbitacin B was extracted from watermelon (*Citrullus colocynthis*) vines by the ultrasonic-assisted extraction. The ultrasonic-assisted extraction was optimized by the combination of the single-factor experiment and response surface methodology. The results showed that the ultrasonic temperature was the key factor affecting the cucurbitacin B extraction rate, while the ethanol concentration and ultrasonic time showed less influence on the extraction rate. The extraction rate of the cucurbitacin B reached to 84.7% when the ethanol concentration was 75% with the ultrasonic temperature of 80 ℃ for 30 min.

Key words: *Citrullus colocynthis*; vine; ultrasound-assisted extraction; cucurbitacin B; response surface methodology

中图分类号: TS217.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2016)19-0197-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.19.030

葫芦素 B 是四环三萜类化合物, 是葫芦素家族中含量最丰富的成员^[1-2], 具有保护肝、消炎、抗肿瘤、提高机体免疫力等功能^[3-5]。近年来, 从植物资源中提取葫芦素的方法有乙醇回流法、超临界 CO₂ 萃取法、超声辅助法等^[6-7], 其中超临界 CO₂ 萃取法从甜瓜蒂中提取葫芦素 B 的得率为 16.5 mg/g^[8]; 乙醇回流法从甜瓜蒂中提取葫芦素 B 的得率为 10.7 mg/g^[9]; 超声辅助法从甜葫芦中提取葫芦素 B 的得率为 7.98 mg/g^[10]。比较上述 3 种提取成本和产

品得率, 超声辅助提取法具有操作方便、省时、高效等特点, 在成本与效率之间基本上达到平衡点。

野西瓜 (*Citrullus colocynthis*) 是一种生活在沙漠地区的攀缘藤草本植物, 在我国新疆、内蒙古等地有少量分布, 是维吾尔族传统用药之一, 具有消炎、止痛、解毒等功能^[11-12]。本课题组首次检测发现野西瓜藤(包括蔓和叶)含有葫芦素 B, 含量达到 0.198 mg/g。野西瓜藤资源丰富, 生物产量大, 且易于获取, 但是目前是农业废弃物, 直接抛洒在田间^[13]。鉴于此, 研

收稿日期: 2016-03-21

作者简介: 赵春燕(1966-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品深加工, E-mail: zhaochunyan108@163.com。

* 通讯作者: 张超(1978-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 果蔬深加工, E-mail: zhangchao@nrcv.org。

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-26); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJ CX20140204); 果蔬农产品保鲜与加工北京市重点实验室专项(Z141105004414037)。

究考察超声辅助提取工艺对野西瓜藤中葫芦素 B 得率的影响,采用单因素实验结合响应面分析的方法优化超声辅助提取工艺参数,以期对野西瓜藤资源的充分利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

野西瓜藤 北京蔬菜研究中心农场采收;葫芦素 B 标准品 四川省维克奇生物科技有限公司;无水乙醇(色谱纯) 国药集团化学试剂有限公司。

高效液相色谱仪,Agilent 1260(配有四元泵及自动进样器、DAD 检测器) 美国安捷伦公司;高速万能粉碎机,FW100 天津市泰斯特仪器有限公司;数控超声波清洗器,KQ-500DE 昆山市超声仪器有限公司;电子天平,PL3002 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;布氏漏斗抽滤装置 成都蜀牛科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 葫芦素 B 标准曲线的绘制 称取葫芦素 B 标准品 0.2 mg,配制成质量浓度为 0.2 mg/mL 标准储备液。分别量取该标准储备液 5、10、25、50 和 75 μ L,配制成质量浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.15 mg/mL 的标准溶液,以葫芦素 B 的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:XBridge-C₁₈柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m);柱温 25 $^{\circ}$ C;流动相:A 相:纯水,B 相:乙腈;梯度洗脱:0~30 min,50% B;30~45 min,50%~100% B;45~60 min,100%~50% B;流速 1 mL/min;检测波长 228 nm^[14]。

1.2.3 样品中葫芦素 B 含量的测定 在野西瓜成熟后,将野西瓜藤在 60 $^{\circ}$ C 烘干至水分含量低于 10%,使用 FW100 高速万能粉碎机粉碎 30 s,收集通过 20 目筛网的粉末,精确称量干粉 5 g,放入 100 mL 烧杯中,加入一定体积比的乙醇水溶液,封口膜封住烧杯,按一定的超声条件(料液比、溶剂体积分数、超声时间、超声温度)提取葫芦素 B,布氏漏斗抽滤后过 0.45 μ m 滤膜,采用 HPLC 方法测定葫芦素 B 峰面积,根据标准曲线计算样品中葫芦素 B 的含量。葫芦素 B 得率计算公式为:

$$e(\%) = \frac{c \times v}{m} \times 100$$

式中: e :葫芦素 B 得率,%; c :样品溶液中葫芦素 B 质量浓度,mg/mL; v :加入的乙醇体积,mL; m :样品中总葫芦素 B 含量,mg。

1.2.4 单因素实验 在固定温度为 60 $^{\circ}$ C、乙醇体积分数为 70%、超声时间为 20 min 的条件下,考察不同料液比(1:8、1:10、1:12、1:14、1:16)对葫芦素 B 得率的影响;固定料液比为 1:14 时,乙醇体积分数为 70%、超声时间 20 min 条件下,考察不同超声温度(40、50、60、70、80 $^{\circ}$ C)对葫芦素 B 得率的影响;固定料液比为 1:14 时,超声温度为 80 $^{\circ}$ C、超声时间 20 min 条件下,考察不同乙醇体积分数(50%、60%、70%、80%、90%)对葫芦素 B 得率的影响;固定料液比为 1:14 时,超声温度为 80 $^{\circ}$ C、乙醇体积分数为

90% 条件下,考察不同超声时间(10、15、20、25、30 min)对葫芦素 B 得率的影响。

1.2.5 响应面实验设计 综合单因素实验结果,选取对葫芦素 B 提取有显著影响的乙醇体积分数、超声时间、超声温度为因素,运用 Design-Expert 软件设计实验^[15-16],分析并确定最佳提取工艺条件。

1.3 数据处理与统计

实验所有数据均有三次重复,计算平均值和标准偏差。使用统计分析软件 DPS v7.05 进行处理,Duncan's 新复极差法进行显著性分析($p \leq 0.05$)。采用 Design-Expert 软件对所得数据进行回归分析,图像绘制采用 Origin 8.0 软件(美国 Origin Lab Corporation 公司)。

2 结果与分析

2.1 葫芦素 B 标准曲线绘制

图 1 显示葫芦素 B 含量与峰面积呈线性关系。其回归方程为 $Y = 16347X - 21.77843$,相关性 $R^2 = 0.9997$,葫芦素含量在 0~0.20 mg/mL 范围内线性关系良好。

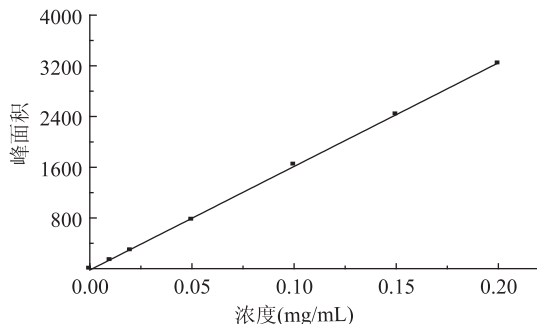


图 1 葫芦素 B 标准曲线

Fig.1 Standard curve of cucurbitacin B

2.2 超声波辅助提取对葫芦素 B 得率的影响

野西瓜藤中葫芦素 B 的含量为 0.198 mg/g,低于甜瓜蒂和天花粉中的葫芦素 B 含量,但是野西瓜藤的生物产量是果实的 20~300 倍,所以野西瓜藤是葫芦素 B 的良好来源。图 2 比较超声波辅助提取对葫芦素 B 得率的影响,处理的料液比为 1:10、温度为 60 $^{\circ}$ C 条件下,用 70% 乙醇提取 20 min,超声处理显著增加葫芦素 B 的得率,达到未超声处理的 5 倍。原因在于超声波的空化作用、热效应、机械作业加速细

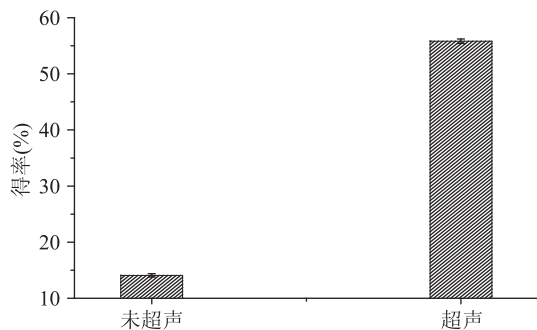


图 2 超声对得率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic extraction on the extraction rate of Cucurbitacin B

胞壁的破碎使胞外溶剂容易进入细胞内^[17],从而促进葫芦素 B 溶出,得率提高。

2.3 料液比对葫芦素 B 得率的影响

图 3 为料液比对葫芦素 B 得率的影响,葫芦素 B 得率随着料液比的增大而增加,得率从 48.9% 上升到 62.3%,这是由固、液相之间的浓度差而决定的。料液少,两相间的浓度差小,从而传质推力小,随着溶剂的增加,导致传质推力的提高,使得率上升,但从显著性分析来看,1:14 与 1:16 差异不显著($p > 0.05$),因此从生产成本考虑料液比 1:14 为宜。

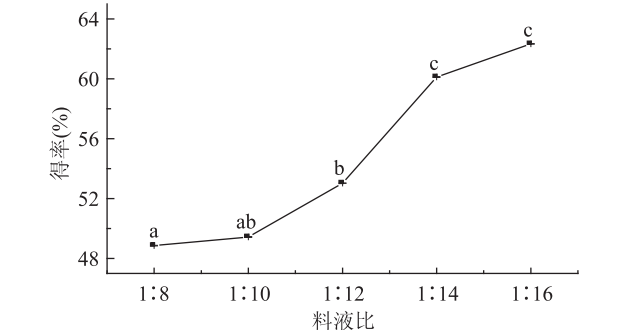


图 3 料液比对得率的影响
Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate of Cucurbitacin B

2.4 超声温度对葫芦素 B 得率的影响

图 4 为超声温度对葫芦素 B 得率的影响,结果显示野西瓜藤中葫芦素 B 的得率随着超声温度增大而增加,从 43.2% 上升至在 80 ℃ 时为 54.8% 达到最大值。这是由于温度升高,溶液内分子运动剧烈,反应速率增大,导致得率的增加,在 80 ℃ 时,得率最大,考虑到超声仪器的实际承受能力(最大为 90 ℃),选择 80 ℃ 为最佳提取温度。

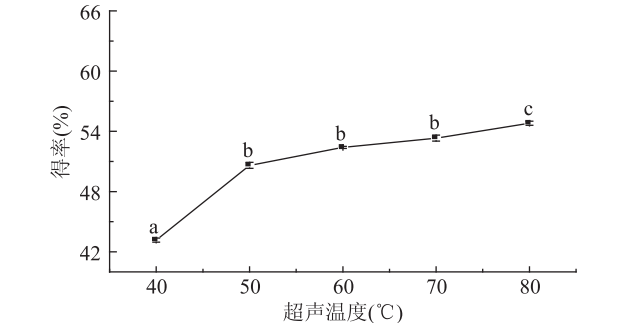


图 4 超声温度对得率的影响
Fig.4 Effect of temperature on the extraction rate of Cucurbitacin B

2.5 乙醇体积分数对葫芦素 B 得率的影响

如图 5,结果表明,在实验范围内,葫芦素 B 得率随着乙醇体积分数的增加而增大,得率从 40.6% 上升至 65.6%,且在乙醇体积分数为 90% 时,提取液中葫芦素 B 含量最高,提取效果最佳。

2.6 超声时间对葫芦素 B 得率的影响

图 6 可以看出,葫芦素 B 的得率随着超声时间的增加而逐渐增大,从 52.56% 上升至 63.42% 并在 30 min 时的得率为 63.42% 达到最大值,这可能是由

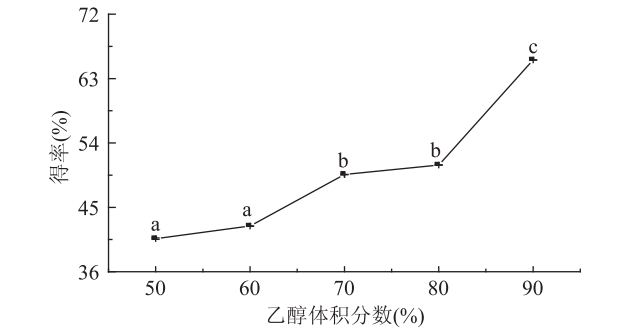


图 5 乙醇体积分数对得率的影响
Fig.5 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of Cucurbitacin B

于随着超声时间的延长,样品中大部分葫芦素 B 溶于乙醇中,从而使得得率逐渐增大。因此,选取 30 min 为葫芦素 B 的最佳提取时间。

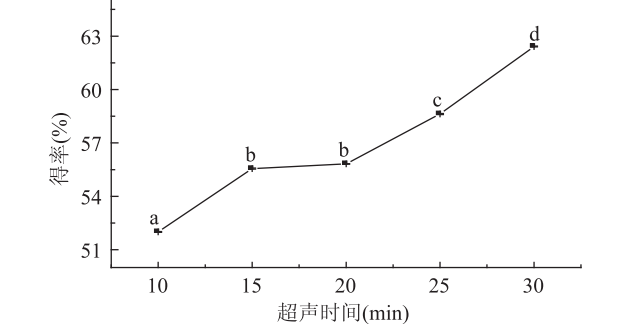


图 6 超声时间对得率的影响
Fig.6 Effect of ultrasonic time on the extraction rate of Cucurbitacin B

2.7 回归模型的建立及统计分析

响应面优化实验结果见表 1。采用软件 Design-Expert8.0 对所得数据进行回归分析,分析结果见表 2。

表 1 Design-Expert 实验设计结果 Table 1 Experiment result of Design-Expert				
实验号	A	B	C	葫芦素 B 得率(%)
1	0	0	0	40.63
2	0	0	0	53.06
3	0	0	0	50.61
4	0	1	-1	69.48
5	1	0	1	44.02
6	0	1	1	88.75
7	0	-1	1	50.14
8	-1	-1	0	54.60
9	1	0	-1	39.31
10	1	-1	0	45.44
11	0	0	0	55.82
12	0	-1	-1	56.43
13	-1	1	0	46.09
14	-1	0	-1	44.09
15	-1	0	1	47.63
16	1	1	0	65.81
17	0	0	0	51.07

表2 拟合二次多项式模型的方差分析

Table 2 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model

项目	平方和	df	均方	F 值	p 值
模型	2.1×10^{-1}	9	2.4×10^{-2}	11.30	0.0021 **
A	2.9×10^{-4}	1	2.9×10^{-4}	0.14	0.0710
B	5.6×10^{-2}	1	5.6×10^{-2}	26.62	0.0013 *
C	7.8×10^{-3}	1	7.8×10^{-3}	3.76	0.0930
AB	3.2×10^{-2}	1	3.2×10^{-2}	15.40	0.0057 *
AC	3.2×10^{-5}	1	3.2×10^{-5}	0.016	0.0090 **
BC	2.2×10^{-2}	1	2.2×10^{-2}	10.57	0.0140 *
A ²	5.8×10^{-2}	1	5.8×10^{-2}	27.86	0.0012 **
B ²	3.9×10^{-2}	1	3.9×10^{-2}	18.81	0.0034 **
C ²	1.9×10^{-3}	1	1.9×10^{-3}	0.96	0.3600
残差	1.5×10^{-2}	7	2.0×10^{-3}		
失拟项	1.3×10^{-2}	3	4.3×10^{-3}	12.25	0.1700
误差	1.4×10^{-3}	4	3.5×10^{-4}		
总离差	2.3×10^{-1}	16			

由方差分析表2可以看出模型的 $p = 0.0021 < 0.01$,说明该模型极显著,因此,这种实验方法是可靠的。方差的失拟项表现不显著 $p = 0.1700 > 0.05$,说明表面模型回归拟合较好各因素值与响应值之间的关系可以用此模型来函数化,决定系数 $R^2 = 0.9747$ 说明葫芦素B提取量的结果与模型回归值有较好的一致性^[18]。由表2中模型系数的显著性检验数据可知,超声温度的一次项对葫芦素B得率的影响达到显著水平($p < 0.05$),二次项的影响呈现极显著水平($p < 0.01$),乙醇体积分数的二次项均未达到显著水平,而乙醇体积分数的二次项则达极显著水平($p < 0.01$)。A与B交互作用显著,B与C交互作用显著,A和C交互关系极显著,表明各影响因素与响应值的关系中,二次项和交互项对响应值有影响。由F值可知,各因素对葫芦素B提取得影响排序为超声温度(B) > 超声时间(C) > 乙醇体积分数(A)。各因素对葫芦素B得率的影响不是简单的线性关系,利用软件对表1中实验数据进行多元回归分析,得到各因子对葫芦素B得率影响的二次回归模型:

$$Y = 50.22 + 0.27A + 7.96B + 2.63C - 7.22AB - 0.28AC + 0.64BC - 9.83A^2 - 1.25B^2 + 3.36C^2 \quad \text{式(1)}$$

由响应面模型绘制出响应面分析图,图7可以看出,当乙醇体积分数一定时,随着超声时间的增大葫芦素B的得率呈逐渐上升的趋势;当超声时间不变时,葫芦素B得率随着乙醇体积分数增加而增大。由Design-Expert软件对二次项回归方程进行求解,可得药西瓜蔓中葫芦素B得率的优化值为:超声温度为79.37℃、超声时间为29.51 min、乙醇体积分数74.54%,葫芦素B得率为81.4%。为方便实验操作将最优化条件取整数为:超声温度80℃、超声时间30 min、乙醇体积分数75%,在此条件下,葫芦素B的提取量为0.168 mg/g,得率为84.7%。

3 结论

研究以葫芦素B得率为响应值,通过单因素实验及响应面分析法探究野西瓜藤中葫芦素B的最佳

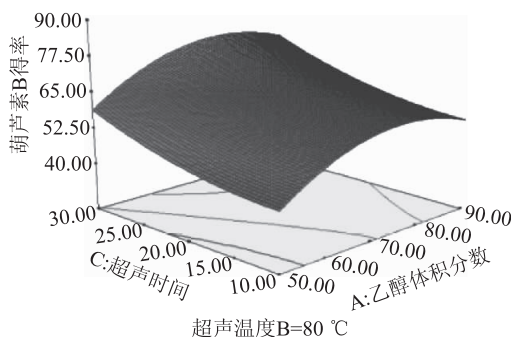


图7 乙醇体积分数与超声时间对响应值的影响

Fig.7 Effect of ultrasonic temperature and time on extraction rate of Cucurbitacin B

提取工艺,结果显示超声处理温度对葫芦素B得率影响最大,其次是乙醇体积分数和超声时间,当超声温度80℃、超声时间30 min、乙醇体积分数75%时,葫芦素B得率最高,可以达到84.7%。因此最佳提取条件为:超声温度80℃、超声时间30 min、乙醇体积分数75%,在此条件下,葫芦素B得率为84.7%,提取量为0.168 mg/g。

参考文献

- [1] 王莉梅,姚铭.葫芦素类化合物含量测定方法的研究进展[J].中国生化药物杂志,2015(1):185-188.
- [2] 么焕开,刘普,王菊.葫芦素的研究概况[J].齐鲁药事,2005,24(12):738.
- [3] Chen JC, Chiu MH, Nie RL, et al. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities [J]. Natural product reports,2005,22(3):386-399.
- [4] 杨凯,郑刚.葫芦素BE的药理作用研究进展[J].国际中医中药杂志,2006,28(1):27-29.
- [5] Alghasham A A. Cucurbitacins—a promising target for cancer therapy [J]. International journal of Health Sciences (Qassim), 2013,7(1):77-89.
- [6] 彭朝霞,曹敏,张运杰,等. HPLC测定天花粉中葫芦素B的含量[J].中国现代应用药学杂志,2009,26(11):946-948.
- [7] 姚三桃,王苔琴.天花粉商品的理化鉴别[J].中国中药杂志,1992,17(4):201-202.
- [8] 李悦,承伟,邹艾岑.瓜蒂中葫芦素B的不同提取工艺研究[J].中国药房,2012,23(19):1760-1761.
- [9] 范宏,邹德静,隋秀琴,等.超声波辅助提取甜葫芦中葫芦素B的工艺研究[J].农产品加工,2013,(12):29-31.
- [10] 单海峰,唐岚,李乐,等.甜瓜蒂中葫芦素B提取工艺研究[J].食品科技,2010,35(5):219-221.
- [11] 黄辉,张峻沛,张彦福.维吾尔药苦西瓜本草考证及生药鉴定[J].中国民族民间医药杂志,1997,(28):35-38.
- [12] 周秋鸿,李东,徐颖.药西瓜对小肠功能的影响[J].中医药信息杂志,2001,18(3):25-27.
- [13] 龚小妹,王硕,周小雷,等.西瓜藤的化学成分研究(II) [J].中药材,2013,36(10):1614-1616.
- [14] 吴军侠,赵红霞.高效液相色谱法测定甜瓜蒂中葫芦素B含量[J].化学与生物工程,2010,27(1):92-94.
- [15] 张君萍,侯喜林,董海艳,等.响应曲面法优化超声波提取沙葱籽多糖工艺[J].食品科学,2011,32(2):98-103.