

酸性水提取柑橘皮渣柠檬苦素工艺

吴剑, 曾凡坤*, 陈飞平

(西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

摘要: 以使用硫酸调节纯水得到的酸性水为溶剂, 采用高效液相色谱测定柠檬苦素含量, 浸提柑橘皮渣中柠檬苦素。在热浸提时间、温度及料液比单因素试验的基础上, 利用三元二次旋转组合试验设计优化提取条件, 建立三因素与柠檬苦素得率之间的数学模型。结果表明, 酸性水提取柑橘皮渣中柠檬苦素的最佳工艺条件为提取时间 2.6h、温度 61.2℃、料水比 1:19.2(g/mL)、酸性水提取液 pH4。在此工艺条件下, 柠檬苦素的得率为 0.117mg/g。
关键词: 柑橘皮渣; 柠檬苦素; 提取; 旋转正交; 高效液相色谱

Process Optimization for Acidic Water Extraction of Limonin from Citrus Peels by Response Surface Methodology

WU Jian, ZENG Fan-kun*, CHEN Fei-ping

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The pH of pure water was adjusted with sulfuric acid to provide a solvent for the extraction of limonin from citrus peels. Limonin quantification was performed by HPLC. Based on one-factor-at-a-time experiments, a three-variable quadratic rotary unitization design combined with response surface methodology was used to optimize three conditions for acidic water extraction of limonin from citrus peels, and a mathematical model describing limonin yield versus the three extraction conditions was built. The optimal extraction conditions of limonin from citrus peels were 2.6 h extraction at 61.2℃, pH 4 and a solid-to-liquid ratio 1:19.2 (g/mL). Under the optimized conditions, a limonin yield of 0.117 mg/g was achieved.

Key words: citrus peels; limonin; extraction; quadratic rotary unitization design; high performance liquid chromatography
中图分类号: TS209 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)14-0006-05

柠檬苦素类似物的主要来源是芸香科柑橘属植物^[1], 在幼果中多以苷元的形式存在。在果实的成长后期、成熟期柠檬苦素类似物苷元转化为配糖体, 这种配糖体只在果实及种子中进行^[2]。随着果实不断发育, 苷元逐步转化为配糖体^[3], 在种子中配糖体含量占干质量的 0.31%~0.87%^[4]。随着对柠檬苦素类似物生物活性的认识, 柠檬苦素类似物的应用研究已引起了医学界和食品界的广泛关注。柠檬苦素类似物在抗肿瘤、抗炎、镇痛、抗病毒、抗菌、利尿、抗焦虑, 并可以改善睡眠质量、降低胆固醇含量、防止动脉粥样硬化等方面都具有显著效果^[5-9]。

国内对柠檬苦素进行系统性研究的为数不多, 就已有的研究成果, 大部分是以柑橘种子作为提取材料、有机溶剂作为提取溶剂。在柑橘加工过程中, 皮渣(去汁后剩余物)是主要副产品, 占柑橘总量的 20%~40%^[10-11]。如要从皮渣中分离种子和其他部分, 进行大规模的生产

显然是不可行的。将鲜榨后的柑橘皮渣进行处理后, 可以直接提取柠檬苦素或其他生物活性物质, 这将极大提高工业化生产的可行性。在水提取基础上, 根据柠檬苦素在酸性环境中可以增大其溶出率的原理, 并且考虑提取溶剂的回收率与消耗成本, 在以工业化为目标的前提下, 本实验以新鲜柑橘皮渣作为提取材料、酸性水作为提取溶剂对其提取工艺进行研究并优化。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

新鲜柑橘(甜橙)榨汁后剩余皮渣, 取自中国农业科学院柑桔研究所, 粗碎备用。

1.2 试剂与仪器

柠檬苦素标准品(纯度 99.8%) 美国 Simga 公司; 乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯) 天津四友公司。

收稿日期: 2010-07-23

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2007BAD47B06-4)

作者简介: 吴剑 (1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品工程。E-mail: wj851031@yahoo.com.cn

* 通信作者: 曾凡坤(1963—), 男, 教授, 研究方向为果蔬加工。E-mail: zengfankun@swu.edu.cn

ultimate XB-C₁₈(4.6mm × 250mm, 5 μm) 美国 Welch 公司; LC-20A 型高效液相色谱仪、LC-20A 型紫外检测器、UV-2450 型双光束紫外分光光度计 日本岛津公司; AE200 型分析天平 瑞士梅特勒-托利多公司; PH-3S 型酸度计 成都方舟科技公司; JQS200DE 型超声波清洗仪 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 高效液相色谱条件^[12]

色谱柱: Welch ultimate (250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: 乙睛-超纯水(45:55, V/V); 流速 1.0mL/min; 柱温 25 ; 检测波长 200nm; 进样量 5 μL。

1.4 标准曲线的绘制与得率计算方法

称取柠檬苦素标准品 6.7mg, 用色谱纯乙睛溶解并定容于 25mL 容量瓶, 配制成质量浓度 0.0134mg/mL 的柠檬苦素标准溶液, 贮存于 4 备用。经双光束紫外分光光度计扫描后, 确定最大吸收波长为 200nm, 此后实验中检测波长定为 200nm。

精确量取 1、2、3、4、5mL 柠檬苦素标准母液置于 5 个 10mL 容量瓶, 分别向各容量瓶中加乙睛稀释并定容于 10mL, 制成一系列梯度浓度的标准溶液。经 0.45μm 有机滤膜后以进样量为 5μL 经液相色谱分析检测, 记录色谱图, 以峰面积为横坐标、标准溶液质量浓度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得曲线方程为 $Y=3 \times 10^{-7}X - 0.0005 (R^2=0.9996)$, 检出限为 0.001 ~ 0.05mg/mL。

$$\text{柠檬苦素得率} / (\text{mg/g}) = \frac{cv}{m}$$

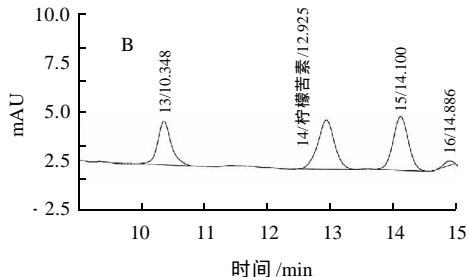
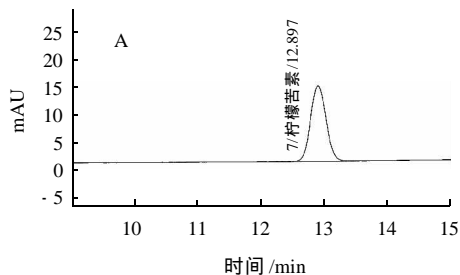
式中: c 为经过计算提取液中柠檬苦素的质量浓度 / (mg/mL); v 为提取液的总体积 / mL; m 为取样的质量 / g。

1.5 柠檬苦素提取工艺流程

柑橘皮渣粗碎 60~90 石油醚脱脂 称量 酸性水热提取 过滤 高效液相色谱检测

1.6 样品检测

称取脱脂皮渣 5.0g, 加入酸性提取液, 按提取工艺条件在热水浴提取, 过滤并收集滤液, 取各组处理提取液 2mL 经针式过滤头(有机系, 0.45μm)过滤后, 装入自动进样瓶。按色谱条件自动进样检测, 记录色谱图, 计算色谱峰面积, 根据标准曲线计算样品浓度。对柠檬苦素标准品与提取样品进行检测, 结果见图 1。可以看出样品中柠檬苦素保留时间与标准品色谱图中的保留时间一致, 可以判断为柠檬苦素。



A. 柠檬苦素标准品; B. 样品色谱图。
图 1 柠檬苦素标准品与样品色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of limonin standard and sample

1.7 酸性水提取柠檬苦素单因素试验设计

使用硫酸、盐酸、醋酸、柠檬酸调节纯水 pH 值, 以相同 pH 值的纯水作为提取溶剂, 确定最高得率的溶剂; 确定最佳提取溶剂后, 进行单因素试验, 试验水平为: pH 2.5、3、3.5、4、4.5、5、10; 提取时间 0.5、1、2、3、4h; 提取温度 20、40、50、60、70、80、90 ; 料液比 1:5、1:10、1:15、1:18、1:20 (g/mL), 确定提取时间、温度、料液比的最佳条件, 提取液中柠檬苦素得率按 1.2.5 节方法测定并计算得率。试验初始提取条件为温度 50 、料液比 1:10、提取时间 1.5h, 此后完成一个最佳因素替换一个以此类推。

1.8 优化试验设计

以柠檬苦素得率为响应值, 在单因素试验的基础上, 选取酸性水提取时间、料液比以及提取温度为影响因素, 采用三元二次旋转组合试验设计^[13]优化试验, 确定提取效率最佳的组合条件。在三元二次旋转组合试验设计中, 分别用 X_1 、 X_2 、 X_3 依次表示料液比、提取温度和提取时间, 以 -1、0、1 分别表示各因素的 5 个水平。根据 SAS 统计分析软件设计试验, 试验因素水平编码设计见表 1(以柠檬苦素得率为指标评价提取效果)。

表 1 三元二次旋转组合试验设计的因素水平编码表

Table 1 Factors and levels in the quadratic rotary unitization design

因素	代码	水平				
		-	-1	0	1	1
料液比(g/mL)	X_1	1:8	1:12.4	1:19	1:25.5	1:30
温度/h	X_2	40	46	50	64	70
时间/h	X_3	1	1.58	2.5	3.4	4

2 结果与分析

2.1 不同种类酸性水对提取柑橘皮渣中柠檬苦素得率的影响

由图 2 可知, 在本体系中无机酸浸提柠檬苦素能力

要强于有机酸。无机酸中硫酸提取率高于盐酸,推测在加热情况下促进了盐酸挥发速率,使得酸性水的酸性发生变化,而硫酸酸性水并不存在这个问题。并且硫酸使用广泛并易得,符合试验选择常见廉价提取液药品的原则,选择硫酸做调节纯水 pH 值的药品。

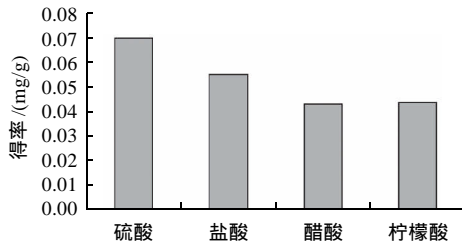


图2 不同酸性溶液对柠檬苦素提取率的影响
Fig.2 Effect of different acids on limonin yield

2.2 酸性水溶液 pH 值对提取柑橘皮渣中柠檬苦素得率的影响

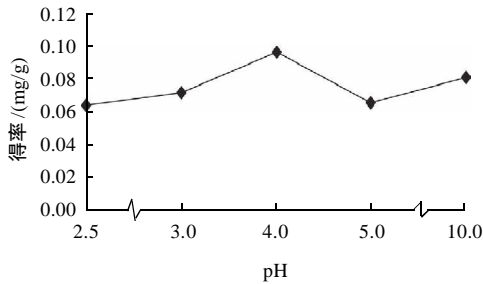


图3 不同 pH 值酸性水溶液对柠檬苦素提取率的影响
Fig.3 Effect of water pH on limonin yield

由图3可知,提取溶剂 pH2~4 时,提取率相应增加, pH4 时提取率最大,之后随着 pH 值增加,提取率下降,因此试验中选择 pH4 的酸性水溶液作为提取剂。

2.3 提取时间对提取柑橘皮渣中柠檬苦素得率的影响

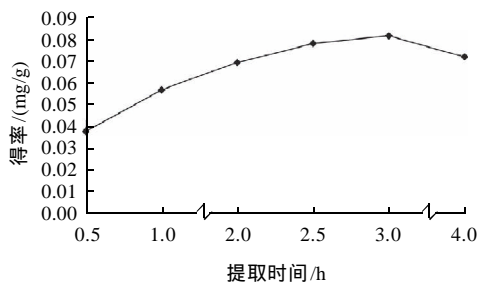


图4 提取时间对柠檬苦素得率的影响
Fig.4 Effect of extraction time on limonin yield

由图4可知,提取时间不超过3h时,随着时间的延长,柠檬苦素得率呈上升趋势,超过2h后,基本趋于平缓;当时间超过3h时,得率又下降,可能因热处

理时间过长,柠檬苦素被水中分子氧破坏所引起。综合考虑得率及提取效率,试验选取最佳提取时间为2.5h。

2.4 温度对提取柑橘柠檬苦素得率的影响

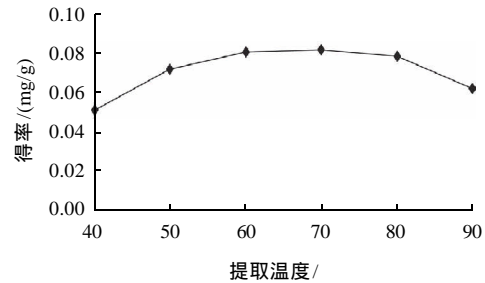


图5 温度对柠檬苦素得率的影响
Fig.5 Effect of extraction temperature on limonin yield

从图5可知,温度在40~70之间时,随着提取温度的增加,柠檬苦素得率逐渐升高,温度升高到60后,柠檬苦素的得率增长趋于平缓。柠檬苦素因其结构复杂,十分容易被氧化,在加热条件下与水中氧分子碰撞结合的概率也相应增加,温度的升高有利于提高提取效率,但也会增加柠檬苦素被氧化的概率。柠檬苦素具有生物活性,提取温度过高会破坏其化学结构,因此选取60为最佳的提取温度。

2.5 料液比对提取柑橘柠檬苦素得率的影响

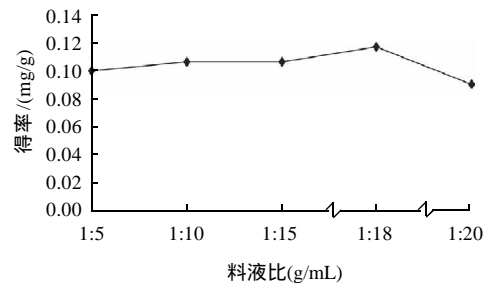


图6 料液比对柠檬苦素得率的影响
Fig.6 Effect of solid-to-liquid ratio on limonin yield

由图6可知,随着加水量的增加,柠檬苦素得率逐渐升高,当加水量大于取样量15倍之后,得率变化不大。再增加加水量,反而使得率降低,可能提取溶液量多并且提取液中柠檬苦素浓度较低,在此浓度液相色谱检测灵敏度下降,造成柠檬苦素得率下降的假象。因此综合考虑溶剂用量与提取后浓缩纯化工艺,选取1:18为最佳料液比。

2.6 优化试验结果分析

优化试验结果见表2,以柠檬苦素得率为响应值,采用SAS统计分析软件进行多元回归分析^[14],得到初步回归方程为: $Y=0.115164 + 0.003039X_1 + 0.012984X_2 + 0.005412X_3 - 0.019563X_1^2 - 0.002125X_1X_2 - 0.000375X_1X_3 -$

$$0.007896X_2^2 - 0.001125X_2X_3 - 0.017265X_3^2。$$

2.6.1 回归模型分析

经 SAS 进行多元回归分析后，对回归方程进行逐项显著性评价，结果表明除 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 项不显著之外，其余各项均显著，其中 X_2 、 X_1^2 、 X_3^2 项达到极显著。SAS 软件计算时，已将各项回归系数标准化，因此根据 3 个因素的绝对值大小判断影响因素的主次。在酸性水提取条件下，影响因素主次为温度 > 时间 > 料液比。

对不显著项利用 SAS 软件中 GLM Procedure 逐步回归，将不显著项并入误差项，得到优化后的回归方程： $Y=0.115164 + 0.003068X_1 + 0.012954X_2 + 0.005441X_3 - 0.019553X_1^2 - 0.007886X_2^2 - 0.017255X_3^2$ 。 R^2 值为 95.81%，修正决定系数为 92.91%，此二项表明试验方法可靠，可以良好的描述试验结果，可用于分析柑橘皮渣中柠檬苦素提取试验。

表 2 柠檬苦素提取旋转组合试验设计结构矩阵及结果
Table 2 Quadratic rotary unitization design and corresponding experimental results

试验号	X_1 料液比	X_2 温度	X_3 时间	柠檬苦素得率/(mg/g)
1	1	1	1	0.052
2	1	1	-1	0.063
3	1	-1	1	0.081
4	1	-1	-1	0.095
5	-1	1	1	0.059
6	-1	1	-1	0.076
7	-1	-1	1	0.087
8	-1	-1	-1	0.092
9	1.682	0	0	0.047
10	-1.682	0	0	0.058
11	0	1.682	0	0.064
12	0	-1.682	0	0.107
13	0	0	1.682	0.051
14	0	0	-1.682	0.067
15	0	0	0	0.117
16	0	0	0	0.118
17	0	0	0	0.119
18	0	0	0	0.111
19	0	0	0	0.117
20	0	0	0	0.116
21	0	0	0	0.114
22	0	0	0	0.112
23	0	0	0	0.115

2.6.2 方差分析

试验结果方差分析见表 3。结果表明 $P < 0.0001$ ，回归方程模型达到极显著水平，而误差项不显著。因此，该回归方程拟合性好。一次项与二次项对柠檬苦素提取得率有极显著影响，交互项对柠檬苦素得率影响不明显，有 95.81% 的响应值变化来源于所选变量。

表 3 方差分析结果表

Table 3 Primary variance analysis for the established regression model

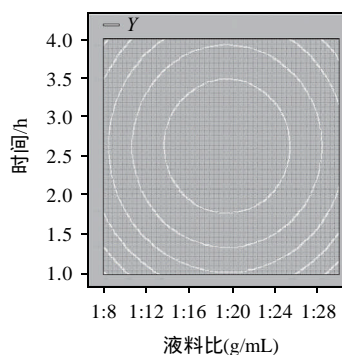
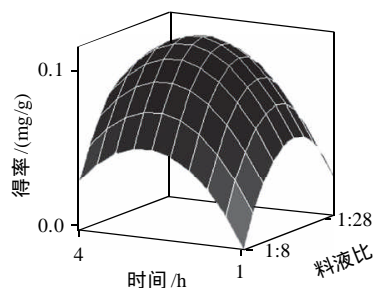
回归项	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
一次项	3	0.002825	0.000942	19.26178	< 0.0001
二次项	3	0.011658	0.003886	79.49273	< 0.0001
交互项	3	0.00005	0.000017	0.339141	0.797417
误差	13	0.000635	0.00004		
模型	9	0.014532	0.001615	33.03121	< 0.0001
总和	22	0.015168			

经过 GLM Procedure 逐步回归后的方差分析结果见表 4。结果显示经过合并不显著项后，回归模型为极显著。

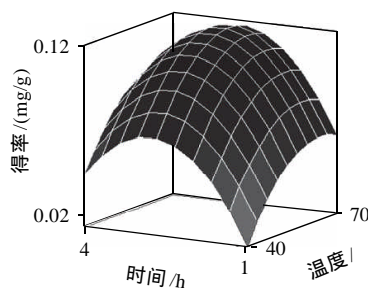
表 4 GLM 回归分析优化后模型的方差分析

Table 4 Variance analysis for the established regression model after GLM Procedure regression

来源	自由度	平方和	均方和	F 值	P 值
模型	6	0.014482	0.002414	56.361	< 0.0001
误差	16	0.000685	0.000043		
总和	22	0.015168			



固定水平：温度 = 55.0000135。
A. 时间和料液比



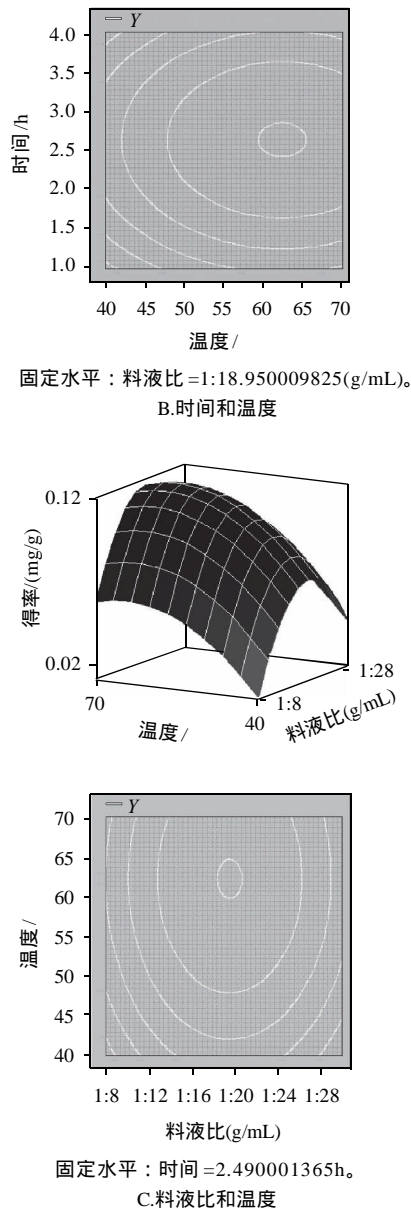


图7 各两因素交互作用对柠檬苦素得率影响的响应面和等高线图
Fig.7 Response surface and contour plots showing effects of pH, extraction time and temperature on limonin yield

从图7响应面图与等高线图所可看出,在其中一项固定为0水平时,另外二项的增加都会使得柠檬苦素得率先升后降,并达到最高值。当提取时间和料水比各自固定为0水平时,柠檬苦素得率随提取温度的变化幅度较大,并且得率达到极大值。而得率随着提取时间与料水比的变化时幅度不及温度,提取温度的改变对得率影响较大。利用SAS软件中RSREG程序处理后得到3个因素的最优值分别为提取时间2.6h、温度61.2、料液比1:19.2(g/mL)以及酸性水提取液pH4。在此条件下,预测柠檬苦素得率响应值为0.120mg/g。

2.6.3 验证实验

以最优条件作为一组处理进行验证实验,重复3次,得到的柠檬苦素平均得率为0.117mg/g,与理论预测值接近,重复性好。经过试验设计优化后得到的提取条件参数准确可靠,具有实际价值。

3 结论与讨论

本实验将酸性水提取法与响应面分析法结合,采用新鲜柑橘皮渣为原料,以硫酸溶液调节纯水pH值至4为提取溶剂,并优化了柑橘皮渣中柠檬苦素的提取工艺条件。经优化后的酸性水提取柑橘皮渣中柠檬苦素的最佳提取条件为提取时间2.6h、温度61.2、料水比1:19.2(g/mL)以及酸性水提取液pH4。在此条件下,柠檬苦素得率为0.117mg/g。与前人研究使用乙醇提取柑橘果皮和种子中含柠檬苦素64mg/kg和200~300mg/kg(本实验中皮渣中既有种子也有果皮)结果^[15]基本符合。因使用硫酸调节纯水pH值,与有机溶剂相比价格低廉,提取效果较好,提取液的酸较弱,除污简单,污染环境可能性小,对工业化大规模生产有指导意义。柑橘皮渣中水溶性物质较多,在提取液中杂质含量也较高,如何在提取后将杂质去除,是今后需重点关注与研究的方向。

参考文献:

- [1] 蔡护华, 桥永文男. 柑桔果实中柠檬苦素类化合物的研究现状与展望[J]. 植物学报, 1996, 38(4): 328-336.
- [2] HERMAN Z, FONG C H, HASEGAWA S. Biosynthesis of limonoid glucosides in navel orange[J]. Phytochemistry, phytochemistry, 1991, 30(5): 1487-1488.
- [3] 孙崇德, 陈昆松, 戚行江. 柑桔果实柠檬苦素类化合物的研究与应[J]. 浙江农业学报, 2002(5): 297-302.
- [4] JAYAPRAKASHA G, CHIDAMBARA MURTHY K, TICHY S, et al. Limonoid glucosides in citrus seed[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(1): 137-141.
- [5] 孙崇德, 陈昆松, 陈青俊, 等. 柑桔果实中天然柠檬苦素和诺米林的提取鉴别和检测[J]. 中国食品学报, 2004, 4(1): 9-11.
- [6] 陈静, 高彦祥, 吴伟莉, 等. 高效液相色谱法测定柑桔汁中的柠檬苦素和柚皮苷[J]. 色谱, 2005, 24(2): 159-160.
- [7] LAM L K T, LI Ying, HASEGAWA S. Effect of citrus limonoids on glutathione transferase activity in mice[J]. Agric Food Chem, 1989, 37(4): 878-880.
- [8] HASEGAWA S, LAM L, MILLER E G, et al. Citrus limonoids: biochemistry and possible importance to human nutrition[J]. Phytochemicals and Phytopharmacology, 1999(1): 79-94.
- [9] MILLER E G, RECORD M T, BINNIE W H, et al. Limonoid glucosides: effects on oral carcinogenesis[J]. Phytochemicals and Phytopharmacology, 1999(1): 95-105.
- [10] 邓烈, 吴厚玖, 周常勇, 等. 世界柑桔鲜果市场分析[J]. 柑桔与亚热带果树信息, 2005, 21(2): 1-4.
- [11] 刘晓军. 柑桔加工副产品加工利用[J]. 农产品加工: 学刊, 2007(11): 29-30.
- [12] 刘亮, 戚向阳, 董绪燕, 等. 高效液相色谱法测定柑橘中的柠檬苦素类似物[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 130-133.
- [13] 王钦德, 杨坚. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2004: 385-435.
- [14] 黄燕, 吴平. SAS统计分析及应用[M]. 北京: 机械出版社, 2006: 252-259.
- [15] 曾凡坤, 邹连生, 焦必林. 柑桔中类柠檬苦素含量及分布研究[J]. 中国食品学报, 2004, 3(4): 79-81.