

超临界二氧化碳萃取柠檬籽中柠檬苦素化合物的工艺研究

全晓艳, 刘新宇, 谢士娟, 汪静心, 李鹏飞, 李玉锋*

(西华大学生物工程学院, 四川成都 610039)

摘要 [目的] 优化从柠檬籽中提取柠檬苦素类化合物的生产工艺。[方法] 采用超临界二氧化碳流体萃取技术考察了萃取时间、夹带剂浓度、萃取压力和萃取温度等单因素对柠檬籽中柠檬苦素化合物提取率的影响, 并通过正交试验确定其最佳提取工艺。[结果] 超临界二氧化碳流体萃取技术萃取柠檬籽中柠檬苦素的最佳工艺条件为: 萃取时间 3.6 h、夹带剂乙醇浓度为 95%、萃取温度 55 ℃、萃取压力 31 MPa。[结论] 研究可为柠檬副产物的综合利用提供理论依据。

关键词 柠檬籽; 柠檬苦素化合物; 超临界二氧化碳萃取; 正交试验

中图分类号 S666.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)10-04623-03

Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Limonoids from Lemon Seeds

QUAN Xiao-yan et al (School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu, Sichuan 610039)

Abstract [Objective] To optimize the technique of extracting limonoids from lemon seeds. [Method] By using supercritical carbon dioxide extraction technology, effects of extracting time, entrainer concentration, extracting pressure and temperature on yield of limonoids were investigated, the orthogonal test was used to determine its optimum extraction technique. [Result] The optimum extracting techniques are: extracting time 3.6 h, entrainer concentration 95%, temperature 55 ℃, pressure 31 MPa. [Conclusion] The study could provide theoretical basis for comprehensive utilization of lemon by-product.

Key words Lemon seeds; Limonoids; Supercritical carbon dioxide; Orthogonal experiment

柠檬苦素是含呋喃环的高度氧化四环三萜类化合物, 主要存在于芸香科(Rutaceae)和楝科(Meliaceae)植物中, 是引起柑橘类果汁苦味的主要物质。迄今为止已有 50 多种柠檬苦素化合物是从柑橘属及相关属植物中分离出来^[1]。柠檬苦素类化合物可应用于抗癌^[2]、功能食品添加剂^[3]、无公害生物农药^[4]、抗氧化^[5-6]、抑菌^[7]等方面。我国具有丰富的柠檬资源, 其加工副产物柠檬籽的开发利用度低, 因此, 从柠檬籽中提取柠檬苦素化合物的工艺研究具有十分重要的意义。

目前柠檬苦素化合物的提取主要采用热提取(煎煮法、回流提取法)^[8-11]、浸泡提取(渗漉法、冷浸法)、超临界萃取^[12]及超声波提取^[13]等方法。传统的提取方法存在费时、耗费溶剂、重现性差、提取率低等不足等缺点^[14], 超临界二氧化碳萃取技术全过程很少使用有机溶剂, 对环境的污染小, 产物的提取率及纯度都较高^[3]。笔者采用超临界二氧化碳流体技术优化了从柠檬籽中提取柠檬苦素类化合物的生产工艺, 为柠檬副产物的综合利用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 柠檬籽, 新鲜四川安岳县柠檬手工取籽, 漂洗烘干后, 磨碎过 60 目筛, 密封保存于干燥器中备用。主要试剂: 柠檬苦素标准品, 成都曼思特生物科技有限公司, 色谱纯; 无水甲醇、石油醚、无水乙醇、二氯甲烷、异丙醇、对二甲氨基苯甲醛、三氯化铁、浓硫酸, 成都科龙化工试剂厂, 分析纯; 二氧化碳, 成都侨源实业有限公司, 分析纯。主要仪器设备: HA121-50-01 超临界萃取装置, 南通市华安超临界萃取有限公司; 旋干用 RE-52B 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; ZF-2 型三用紫外仪, 上海市安亭电子仪器厂; 电热恒温鼓

风干燥箱, 黄石市恒丰医疗器械有限公司; 玻璃仪器气流烘干箱, 郑州市长城科工贸有限公司; 冷藏冷冻箱, 合肥荣事达电冰箱有限公司; TDL-40B 低速离心机, 湖南星科科学仪器有限公司; SHZ-D(Ⅲ) 循环水式真空泵, 浙江黄岩求精真空泵厂; UV-2600A 紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; ZN-200A 高速中药粉碎机, 长沙市岳麓区中南制药机械厂。

1.2 方法

1.2.1 超临界流体萃取柠檬苦素化合物。将 50 g 粉碎干燥的柠檬籽粉填充于萃取釜中, 用二氧化碳气体反复冲洗, 排尽釜内空气, 然后加热到预定温度, 气瓶气体经冷箱冷凝成超临界状态, 经高压泵升至预定压力, 稳定所需的操作条件, 调节各阀门使二氧化碳流体全循环流动萃取, 到达预定萃取时间时萃取结束, 从分离釜底部取出柠檬苦素化合物粗品。

1.2.2 标准曲线绘制。将柠檬苦素标准品用无水甲醇配成 130 μg/ml 的标准工作溶液, 在 6 支试管中分别加入 0、0.5、0.8、1.2、1.5、2.0 ml 标准溶液, 分别加无水乙醇至 2.0 ml, 再分别加入显色剂 5.0 ml, 摇匀, 静置 30 min, 500 nm 波长下测定吸光值。以柠檬苦素空白液为参比溶液, 得出柠檬苦素标准曲线^[15]。

1.2.3 样品含量的测定。柠檬苦素类物质总量的测定: 精密吸取一定量样品制备液, 以无水乙醇稀释至 2.0 ml, 然后按照标准曲线的方法测定样品制备液的吸光度, 由吸光度从标准曲线上查出样品制备液的柠檬苦素物质浓度, 按下列公式计算出原料中柠檬苦素类似物的含量。

原料中柠檬苦素类似物含量 = $(10C/LM) \times 100\%$

式中, C 为检测值; L 为样品加入体积; 10 为样品制备定容体积; M 为样品质量。

1.2.4 单因素试验。影响柠檬苦素萃取率有萃取时间、萃取温度、萃取压力、夹带剂浓度等的主要影响因素, 试验分别考察了这 4 个因素对柠檬苦素化合物萃取率的影响。

基金项目 科技部星火计划项目(2010GA810002)。

作者简介 全晓艳(1986-), 女, 四川江油人, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 731374279@qq.com。* 通讯作者。

收稿日期 2013-03-09

1.2.5 正交试验。在单因素试验基础上,根据萃取时间、萃取温度、萃取压力、夹带剂浓度 4 个单因素试验所选出的最佳提取条件设计 3 水平 4 因素的正交试验,以确定柠檬籽中柠檬苦素化合物最佳萃取条件及这些因素对柠檬苦素萃取率影响的主次关系。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制 参照“1.2.1”的方法得到的试验结果见图 1,标准曲线的回归方程 $Y = 0.013\ 3X - 0.039$, $R = 0.998\ 2$,其中 Y 为吸光度值, X 为柠檬苦素质量浓度。

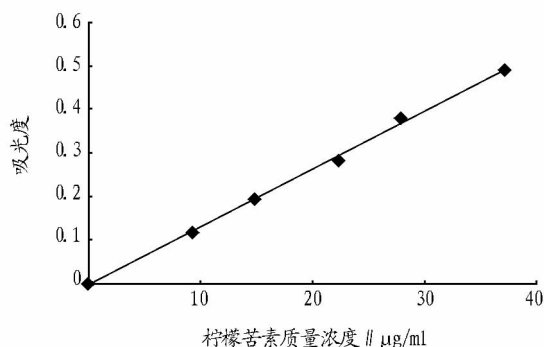


图1 柠檬苦素标准曲线

2.2 单因素试验

2.2.1 萃取时间对柠檬苦素提取的影响。分别设定提取时间为 1.0、2.0、2.5、3.5、4.5 h,在压力 25 MPa 下,添加夹带剂 95% 乙醇,固定萃取温度 35 ℃,按“1.2.1”方法处理萃取物。

从图 2 可以看出,虽然萃取 4.5 h 的效果优于 3.5 h,但 4.5 h 的萃取时间是用大量能耗和物流损失来换取微小萃取分离效果的提高,无论是实验室还是工业化生产都很不经济。因此,选取 3.5 h 作为最佳萃取时间。

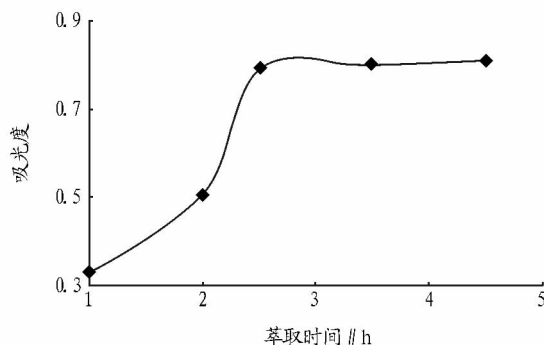


图2 柠檬苦素萃取液在不同萃取时间的吸光度

2.2.2 萃取温度对柠檬苦素提取的影响。分别设定提取温度为 20、30、40、50、60 ℃,在压力 25 MPa 下,添加夹带剂 95% 乙醇,萃取 2.5 h,按“1.2.1”方法处理萃取物。

从图 3 可以看出,随着萃取温度的升高,柠檬苦素萃取液的吸光度在逐渐增高。60 ℃ 的萃取效果要高于 50 ℃。但柠檬苦素是一种具有呋喃环的三萜类的化合物,具有呋喃环的三萜类的化合物在达到 60 ℃ 后容易氧化和转化,生物活性不容易得到保持,在达到或超过 60 ℃ 时进行超临界萃取间接影响提取率和纯度。提取温度为 50 ℃ 时,已经可以满足提取的要求,因此选用 50 ℃ 为最佳提取温度。

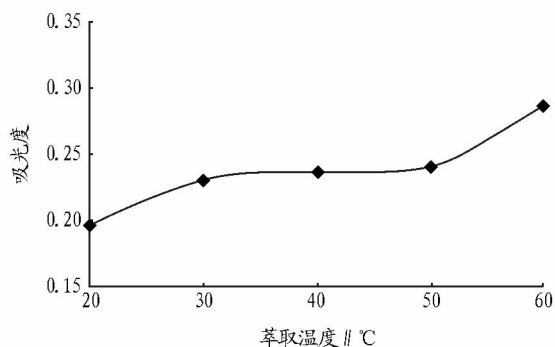


图3 柠檬苦素萃取液在不同萃取温度下的吸光度

2.2.3 萃取压力对柠檬苦素提取的影响。分别设定萃取压力为 15、20、25、30、35 MPa,在 35 ℃ 条件下,添加夹带剂 95% 乙醇,萃取 2.5 h,按“1.2.1”方法处理萃取物。

从图 4 可以看出,当萃取压力在 15 ~ 30 MPa 时,吸光度是随萃取压力的上升而提高;当萃取压力在 30 ~ 35 MPa 时,萃取率是随萃取压力的上升而降低。压力为 30 MPa 时的萃取效果最好,因此选取 30 MPa 为最佳萃取压力。

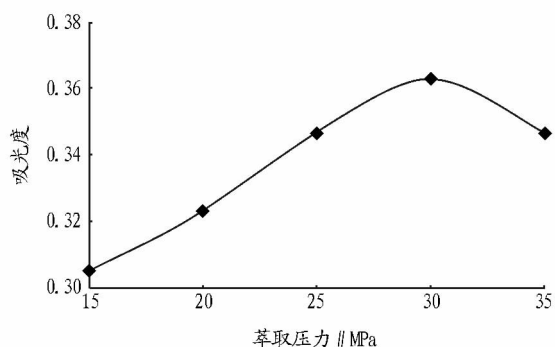


图4 柠檬苦素萃取液在不同萃取压力下的吸光度

2.2.4 夹带剂乙醇浓度对柠檬苦素提取的影响。分别采用夹带剂乙醇浓度为 85%、90%、95%、100%,在压力 25 MPa 和提取温度 35 ℃ 条件下,萃取 2.5 h,按“1.2.1”方法处理萃取物。

从图 5 可以看出,萃取率随着选取的无水乙醇夹带剂的浓度的增高而提高,乙醇作为夹带剂的浓度为 100% 时的萃取效果最好,为最佳夹带剂。

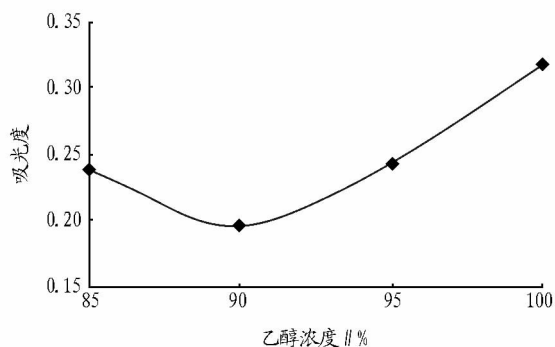


图5 柠檬苦素在不同浓度夹带剂提取下的吸光度

2.3 正交试验 在单因素试验的基础上,按“1.2.5”试验方法得出 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平设计见表 1,结果见表 2。

表 1 正交试验因素水平设计

水平	因素			
	时间 (A)//h	温度 (B)//℃	压力 (C)//MPa	乙醇浓度 (D)//%
1	3.5	55	29	95
2	3.6	58	30	98
3	3.7	60	31	100

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果

试验号	因素				吸光度	萃取率 %	产量 g/kg
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	0.323	2.9	1.461
2	1	2	2	2	0.204	1.9	0.952
3	1	3	3	3	0.264	2.4	1.208
4	2	1	2	3	0.335	3.0	1.512
5	2	2	3	1	0.373	3.4	1.674
6	2	3	1	2	0.307	2.8	1.392
7	3	1	3	2	0.285	2.6	1.298
8	3	2	1	3	0.241	2.2	1.110
9	3	3	2	1	0.319	2.9	1.143
K ₁	0.791	0.943	0.871	1.015			
K ₂	1.015	0.818	0.858	0.796			
K ₃	0.845	0.890	0.922	0.840			
R	0.074	0.041	0.021	0.073			

由表 2 可知,极差分析得出影响柠檬苦素化合物提取率的影响因素为:萃取时间(A)>夹带剂乙醇浓度(D)>萃取温度(B)>萃取压力(C)。最优条件为 A₂B₁C₃D₁,即萃取 3.6 h,萃取温度 55 ℃,萃取压力 31 MPa,夹带剂乙醇浓度为 95%。

为进一步确定各因素对柠檬苦素化合物提取率的影响程度,对表 2 中的柠檬苦素化合物萃取率进行方差分析和显著性检查,得出 $F_A = 10.43^{**} < F_{0.01} = 99.00$, $F_D = 10.00^{**} < F_{0.1} = 9.00$, $F_B = 2.43^{*} < F_{0.05} = 19.00$ 。因萃取压力对萃取率影响较小,作为误差项。由此可知,萃取时间(A)、夹带剂乙醇浓度(D)二因素对萃取率影响显著,萃取温度(B)因素对萃取率影响不显著。

2.4 验证试验 为了考察上述最佳萃取工艺条件稳定性,按正交试验确定的最佳萃取条件重复试验 3 次,3 次试验结果均优于正交试验表中任何一组,平均萃取率为 3.6%,RSD

=0.211% (n=3),说明该工艺稳定可行。

3 结论

通过单因素试验分别考察确定了超临界二氧化碳萃取柠檬苦素时最佳萃取时间为 3.5 h,最佳夹带剂浓度为 100%,最佳萃取温度为 50 ℃,最佳萃取压力为 30 MPa。

通过正交试验确定超临界二氧化碳萃取柠檬苦素的影响因素主次关系为:萃取时间>夹带剂乙醇浓度>萃取温度>萃取压力,其中萃取时间和夹带剂乙醇浓度对萃取率影响显著;最佳工艺条件为:超临界萃取时间为 3.6 h,夹带剂乙醇浓度为 95%,萃取温度为 55 ℃,萃取压力为 31 MPa。通过验证试验确定该工艺具有稳定可行性。应用超临界 CO₂ 流体萃取技术提取柠檬苦素,减少了有机溶剂的使用,提高了产品得率,降低了生产成本,具有较好的开发应用前景。

参考文献

[1] 孙常德,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、鉴别与检验[J].中国食品学报,2004(1):6-10.
[2] 张甘良,汪钊,朱国孟.柑桔生物类黄酮柚皮营生物活性的研究进展[J].天然产物研究与发展,2005(1):117-120.
[3] 张晨,刘志伟.超临界 CO₂ 萃取沙田柚皮精油的研究[J].农牧产品开发,2000(3):12-13.
[4] GEORGE A S,HAO C,STEVEN J S.Supercritical CO₂ extraction of β-carotene from sweet potatoes[J].Food Sci,1993,58(4):817-820.
[5] SUN C D,CHEN K S,CHEN Y,et al. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrusfruit of four cultivars during fruit growth and maturation[J]. Food Chemistry,2005,93(4):599-605.
[6] 刘英.四季柚果实主要功能成分分析及抗氧化作用的研究[D].杭州:浙江大学,2007.
[7] 罗水忠,潘利华,何建军,等.柑橘籽中柠檬苦素的提取与抑菌性研究[J].农产品加工·学刊,2006(10):105-107.
[8] 田庆国,戴军,丁霄霖,等.液相色谱/电喷雾质谱测定柑橘中的柠檬苦素类似物配糖体[J].色谱,2000,18(4):291-293.
[9] 邹连生.柑桔类柠檬苦素的提取、纯化和体外抗肿瘤的研究[D].重庆:西南农业大学,2001.
[10] 施英,徐玉娟,陈卫东,等.桔核中柠檬苦素类物质最佳提取条件的探讨及清除 DPPH 活性的研究[J].食品与机械,2006,22(6):74-76.
[11] 刘亮,戚向阳,董绪燕.枳实副产物中柠檬苦素最佳提取条件的研究[J].农业工程学报,2006,22(7):226-229.
[12] 刘亚娟,王志祥,林文,等.超临界 CO₂ 萃取烟草中烟碱[J].广东化工,2008,35(7):137-140.
[13] BOX G P,BEHNKEN D W. Some new three level designfor the study of quantitative variables[J].Technometrics,1960(2):456-475.
[14] 秦秀凤,蒲彪,王建鹏.超声波提取橘皮中柠檬苦素化合物的工艺研究[J].食品科技,2011(9):257-261.
[15] 王菁,蒲彪,伍红梅.柑橘果皮中主要功能性成分的含量测定[J].食品工业科技,2010(3):367-369.

(上接第 4591 页)

[10] 国家发展改革委、建设部.建设工程监理与相关服务收费管理规定(发改价格[2007]670号)[EB/OL].(2007-03-30) <http://wenku.baidu.com/view/53cd0e9e51e79b89680226c7.html>.
[11] 国家土地管理局、水利部.关于加强土地开发利用管理搞好水土保持的通知(1989)国土[规]字第 88 号)[EB/OL].(1989-07-28) <http://wenku.baidu.com/view/be63054169eac009581bec73.html>.
[12] LI Y H,GAO Z L,ZHOU M L. Current situation and prevention of soil erosion from construction of west-east natural gas transmission (Ningxia-Shaanxi Section) [J]. Agricultural Science & Technology,2012,13(6):1320-1327.
[13] 杨万盈.汉水流域安康段的水土流失及对环境影响分析[J].内蒙古农业科技,2010(3):22-23.