

## 中心组合设计优化超声提取柠檬籽中的柠檬苦素

张霞忠<sup>1,2</sup>, 王 丹<sup>1</sup>, 董垠红<sup>1</sup>, 周文俊<sup>1,2\*</sup>

(1. 内江师范学院化学化工学院, 四川 内江 641112; 2. 四川省高等学校果类废弃物资源化重点实验室, 四川 内江 641112)

**摘要:** 目的 采用中心组合设计优化超声提取柠檬 *Citrus limon* (L.) Burm. f. 籽中的柠檬苦素。方法 以乙醇为提取溶剂, 超声提取柠檬籽中的柠檬苦素。在单因素试验基础上, 中心组合设计对提取工艺进行优化。结果 最佳条件为液固比 17:1, 70% 乙醇, 提取时间 33 min, 提取温度 50 ℃, 平均提取率达 0.454 5 mg/g。结论 该方法重复性较好, 可为柠檬苦素的提取提供一种新方法。

**关键词:** 柠檬; 籽; 柠檬苦素; 超声提取; 中心组合设计

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)07-1500-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.013

## Optimization of the ultrasonic extraction of limonin from *Citrus limon* seeds by central composite design

ZHANG Xia-zhong<sup>1,2</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>, DONG Yin-hong<sup>1</sup>, ZHOU Wen-jun<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Neijiang Normal University, Neijiang 641112, China; 2. Key Laboratory of Sichuan Provincial Colleges for Fruit Waste Treatment and Resource Recycling, Neijiang 641112, China)

**KEY WORDS:** *Citrus limon* (L.) Burm. F.; seeds; limonin; ultrasonic extraction; central composite design

“中国柠檬之都”——四川省安岳县, 柠檬 *Citrus limon* (L.) Burm. f. 种植面积约为 23 万亩, 其总产值多达上亿元。柑橘类皮渣籽是柑橘类水果的废料, 一般处理方法是丢弃、加工成饲料或填埋, 会破坏自然和社会环境。因此, 加大对柑橘类水果废料的加工、再回收、再利用对保护环境具有重要的意义。

柠檬籽中含有柠檬苦素<sup>[1]</sup>、果胶<sup>[2]</sup>、黄酮<sup>[3]</sup>等活性物质, 故对其充分利用将带来较好的社会效益。柠檬苦素类化合物主要存在于芸香科植物果实中, 是具有呋喃环的三萜类化合物, 具有抑菌<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、抗癌<sup>[6]</sup>、除虫和杀虫<sup>[7]</sup>等多种生物活性。除药用外, 该成分还能在保健品和食品加工生产方面得到应用<sup>[4]</sup>, 以及作为动物的饲料添加剂在畜养行业得到应用<sup>[8]</sup>。

目前, 柠檬苦素主要采用离子交换法<sup>[9]</sup>、水抽提法<sup>[10]</sup>、超临界萃取<sup>[11]</sup>、有机溶剂提取法<sup>[12]</sup>

和超声波提取<sup>[13]</sup>等方法进行提取, 但传统方法产率低、重复性差、费时、耗费溶剂多, 而超临界萃取法设备费用贵, 操作难。因此, 寻找一种成本低、污染小、效率高的提取工艺十分有必要。超声波可以在样品和提取溶剂之间产生一种声波空化, 使固体样品逐渐分散, 溶于提取剂, 增大两者之间的距离, 这种空化作用提高了固相样品转移到液相中的传质速率, 而且一种快速、高效的新兴提取技术——超声波提取更适合低沸点、易挥发的成分<sup>[14]</sup>。本实验利用该技术优化安岳柠檬籽中的柠檬苦素提取工艺, 可为柑橘类水果皮渣籽中的苦素类物质的提取提供依据。

### 1 实验材料

1.1 仪器 KQ-500GVDV 型三频恒温数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); BT224S 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责

收稿日期: 2015-12-11

基金项目: 四川省教育厅项目 (12ZB074); 内江师范学院博士科研启动费项目 (2012B05); 内江师范学院校级项目 (12NJZ08)

作者简介: 张霞忠 (1984—), 女, 硕士, 从事杂环化合物合成研究。Tel: 15883289079, E-mail: zhangxiazhong@163.com

\* 通信作者: 周文俊 (1984—), 男, 博士, 从事果类废弃物资源化研究。Tel: 15884809433, E-mail: chemzhwj@126.com

任公司); RE-2000A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); TD-5 台式低速离心机 (四川蜀科仪器有限公司); SHZ-CA 型循环水式多用真空泵 (河南兰帆贸易有限公司); DF-101S 焦热式恒温加热磁力搅拌器 (郑州英峪予华仪器有限公司)。

1.2 试剂 柠檬苦素标准品 (含有量 >98%, 阿拉丁试剂上海有限公司)。石油醚、对二甲氨基苯甲醛、三氯化铁、无水乙醇及浓硫酸均为分析纯。

1.3 药材 所用柠檬籽源于四川省安岳县种植柠檬, 购自内江市桐梓坝农贸市场, 经内江师范学院专家鉴定为柠檬 *Citrus limon* (L.) Burm. F. 的籽, 品种为 Eureka (尤力克)。

## 2 实验方法

### 2.1 标准曲线的制备

2.1.1 显色剂的配制 精密称取对-二甲氨基苯甲醛 125 mg, 溶于 100 mL 浓硫酸和乙醇混合液中 (硫酸 65 mL, 无水乙醇 35 mL), 加入 0.05 mL 9% 三氯化铁水溶液, 现用现配<sup>[15]</sup>。

2.1.2 标准溶液的配制 精密称取柠檬苦素标准品 1.0 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加无水乙醇配制 0.020 mg/mL 标准溶液。

2.1.3 标准曲线的绘制 移取标准溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 置于 10 mL 比色管中, 无水乙醇定容, 配成 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μg/mL 溶液, 加入 2 mL 显色剂, 摇匀, 放置 30 min, 在 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标 ( $A$ ), 质量浓度为横坐标 ( $\mu\text{g/mL}$ ,  $C$ ) 进行回归, 得方程  $A = 0.03776C + 0.04183$  ( $r = 0.9997$ )。

2.2 柠檬苦素的提取 精密称取烘干粉碎后的柠檬籽粉末 2.000 g, 加入石油醚, 室温下搅拌 10 min, 离心 6 min, 除去上层清液, 加入乙醇, 50 °C 水定容至 25 mL。

移取提取液 2.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 2 mL 显色剂定容, 摇匀。放置 30 min, 紫外-可见分光光度计在 490 nm 波长处测定吸光度。

依据标准曲线回归方程, 可得到提取液质量浓度与柠檬苦素提取率的关系。计算公式如下。

$$Y = \frac{C \times V \times n}{m} \times 10^{-3}$$

其中,  $Y$  为柠檬苦素的提取率, 单位 mg/g;  $C$  为柠檬苦素的质量浓度, 单位  $\mu\text{g/mL}$ ;  $V$  为样品溶液体积, 单位 mL;  $n$  为稀释倍数;  $m$  为样品质量, 单位 g。

## 3 实验设计和数据分析

### 3.1 单因素试验

3.1.1 提取时间对提取率的影响 精密称取柠檬粉末 2.000 g, 置于烧杯中, 加入 20 mL 70% 乙醇, 在 50 °C 水浴、功率 240 W 下, 提取 10、20、30、40、50 min, 结果见图 1。由图可知, 当提取 30 min 时, 提取率最高, 为 0.351 2 mg/g, 其次是 20 min 和 40 min, 而在 10 min 和 50 min 最低。可能是刚开始柠檬苦素没有充分溶出, 时间延长后提取率提高, 但时间过长该成分将溶解。

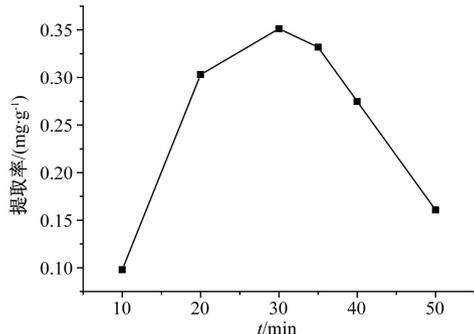


图 1 提取时间对提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on extraction rate

3.1.2 乙醇体积分数对提取率的影响 精密称取柠檬粉末 2.000 g, 置于烧杯中, 加入 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇 20 mL, 在 50 °C 水浴、功率 240 W 下提取 30 min, 结果见图 2。由图可知, 随着乙醇体积分数不断增大, 提取率也随之升高; 当其为 70% 时, 提取率最高; 当其大于 70% 时, 反而有所下降, 可能因为体积分数较高的乙醇具有一定脱水性, 会使柠檬苦素表面形成保护膜, 阻止其溶出; 当其小于 65% 时, 由于该成分溶解度过小, 提取液呈胶状, 故提取率较低。因此, 70% 乙醇提取率最高, 为 0.160 9 mg/g。

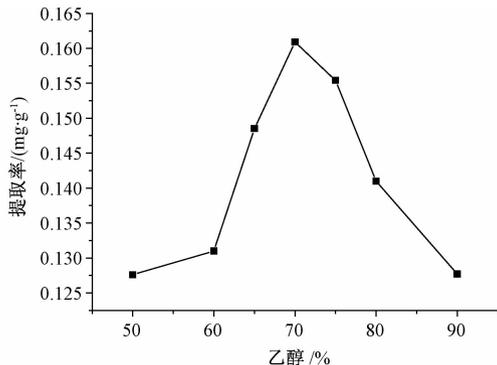


图 2 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on extraction rate

3.1.3 液固比对提取率的影响 精密称取柠檬粉末 2.000 g, 置于烧杯中, 加入 70% 乙醇 20、24、32、36、40 mL, 在 50 °C 水浴、功率 240 W 下提取 30 min, 结果见图 3。由图可知, 液固比在 10:1~18:1 时, 提取率逐渐增大, 可能是因为乙醇蒸发导致柠檬苦素溶出; 在 18:1 后, 可能是因为提取液过多, 导致提取率反而减小。因此, 最佳液固比选择 18:1, 提取率为 0.220 3 mg/g。

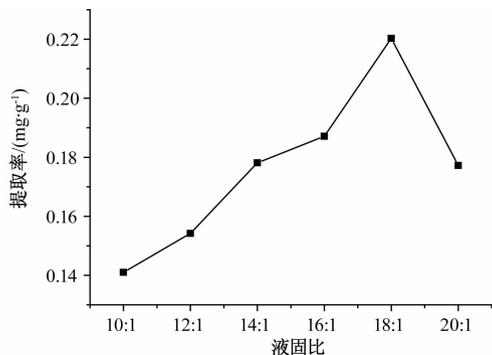


图3 液固比对提取率的影响

Fig. 3 Effect of liquid-solid ratio on extraction rate

3.1.4 提取温度对提取率的影响 精密称取柠檬粉末 2.000 g, 置于烧杯中, 加入 70% 乙醇溶液 36 mL, 在 30、40、50、60、70 °C 水浴、功率 240 W 下提取 30 min, 结果见图 4。由图可知, 提取温度为 30~50 °C 时, 提取率随温度升高而增加, 50 °C 时最高, 可能是溶质和溶剂分子运动加剧, 该成分逐渐溶出, 提取率提高; 当其大于 50 °C 时, 提取率反而降低, 可能是因为温度过高, 乙醇挥发, 超声波物理作用改变该成分的内部结构, 从而影响提取率。因此, 提取温度选择 50 °C 最佳, 提取率为 0.203 4 mg/g。

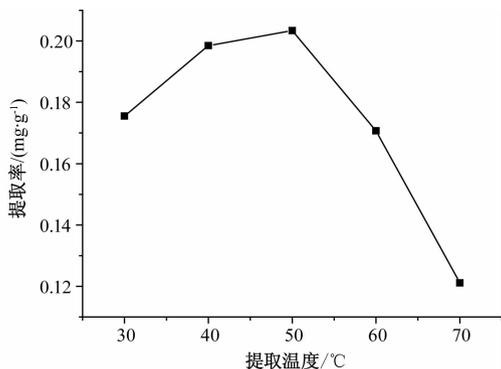


图4 提取温度对提取率的影响

Fig. 4 Effect of extraction temperature on extraction rate

3.1.5 超声功率对提取率的影响 精密称取柠檬粉末 2.000 g, 置于烧杯中, 加入 70% 乙醇 36 mL, 在 50 °C 水浴, 功率分别为 240、270、300、330、360、420 W 下提取 30 min, 结果见图 5。由图可知, 功率 240~300 W 时, 提取率随着其增大而升高, 可能是因为功率升高, 机械能增强, 提取物和提取溶剂之间的化学反应在一定程度上得到了促进; 当其大于 300 W 时, 提取率呈下降趋势, 可能是因为功率过高反而阻碍了两者之间的化学反应。因此, 在功率为 300 W 时, 柠檬苦素溶出最完全, 提取率为 0.370 2 mg/g。

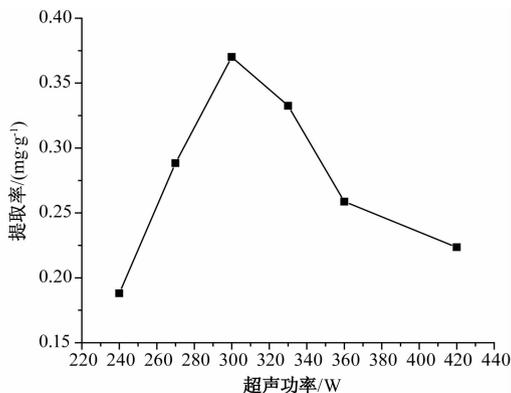


图5 超声功率对提取率的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic power on extraction rate

### 3.2 中心组合设计和响应面分析

3.2.1 响应面法 在单因素试验基础上, 应用 Design Expert 8.0.6 软件, 以提取时间 (A)、乙醇体积分数 (B) 和液固比 (C) 为自变量, 柠檬苦素提取率 (Y) 为考察值, 优化提取工艺, 共设立 17 个处理组 (共 3 组全“0”水平处理组), 再通过二次多项式方程逐步回归分析。因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 提取时间/min	B 乙醇/%	C 液固比
1	20	60	16
0	30	70	18
-1	40	80	20

3.2.2 结果与分析 在 300 W 功率和 50 °C 提取温度最佳条件下, 对提取时间、乙醇体积分数、液固比 3 个因素进行中心组合设计, 结果见表 2。

采用 Design Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行分析, 经多元回归拟合, 得回归方程为  $Y = 0.43 + 0.036A + 0.962 \times 10^{-3} B - 0.038C - 0.012AB +$

$0.012AC + 0.021BC - 0.048A^2 - 0.071B^2 - 0.031C^2$ 。方差分析见表3。

由表3可知,该实验模型非常显著 ( $P < 0.01$ ),而失拟性不显著 ( $P > 0.05$ ),即无失拟因素存在,表明拟合度良好,可对提取率进行分析。

表2 中心组合设计结果

Tab. 2 Results of central composite design

试验号	A	B	C	提取率/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	-1	1	-1	0.325 4
2	1	1	1	0.332 4
3	0	0	0	0.449 7
4	0	0	1	0.352 1
5	0	0	-1	0.403 5
6	0	-1	0	0.328 5
7	-1	-1	-1	0.281 4
8	1	-1	-1	0.395 8
9	-1	0	0	0.328 4
10	0	1	0	0.345 6
11	-1	-1	1	0.173 6
12	1	0	0	0.392 6
13	-1	1	1	0.217 8
14	0	0	0	0.469 7
15	0	0	0	0.459 3
16	1	-1	1	0.254 1
17	1	1	-1	0.308 4

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

变异来源	平方和	d <sub>f</sub>	均方	F 值	P 值
模型	0.098	9	0.011	7.83	0.006 4
残值	$9.769 \times 10^{-3}$	7	$1.396 \times 10^{-3}$	-	-
失拟项	$9.568 \times 10^{-3}$	5	$1.914 \times 10^{-3}$	19.13	0.050 4
纯误差	$2.001 \times 10^{-4}$	2	$1.001 \times 10^{-4}$	-	-
总和	0.11	16	-	-	-

回归模型系数显著性检验结果见表4。由表可知,A、C和B<sup>2</sup>的P值小于0.05,表明对提取率影响最显著,A<sup>2</sup>次之,而其他不显著。

表4 显著性检验结果

Tab. 4 Results of significance tests

因素	回归系数	d <sub>f</sub>	F 值	P 值
A	0.036	1	9.12	0.019 4
B	90.620	1	0.66	0.442 3
C	-0.038	1	10.59	0.014 0
AB	-0.012	1	0.85	0.387 7
AC	0.012	1	0.86	0.385 9
BC	0.021	1	2.47	0.160 4
A <sup>2</sup>	-0.048	1	4.39	0.074 3
B <sup>2</sup>	-0.071	1	9.76	0.016 8
C <sup>2</sup>	-0.031	1	1.79	0.222 7

3.2.3 响应面分析(图6~8) 由图6可知,当乙醇体积分数大于70%时,提取率先增加后下降;当其小于70%时,提取率一直增加。虽然提取时间和乙醇体积分数之间交互影响不明显,但提取率受两者的交互影响,故应综合考虑能耗要求和试剂成本,确定合适的提取时间和乙醇用量来提高提取率。

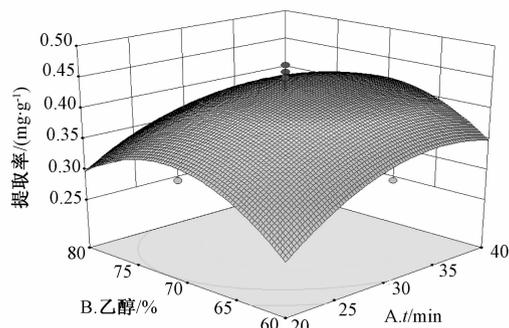


图6 乙醇体积分数和提取时间对提取率的影响  
Fig. 6 Effects of ethanol concentration and extraction time on extraction rate

由图7可知,当提取溶剂为70%时,液固比和提取时间对的交互作用不显著。当提取时间较长时,提取率较高,而且随液固比在一定范围内有所增加,但不明显,因此确定合适的提取时间和液固比分别为30℃和18:1。

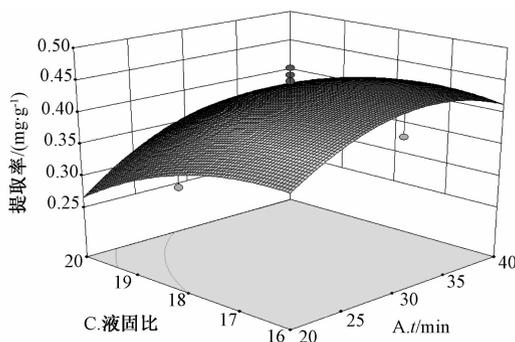


图7 液固比和提取时间对提取率的影响  
Fig. 7 Effects of liquid-solid ratio and extraction time on extraction rate

由图8可知,当提取温度为50℃时,较高乙醇体积分数和适宜液固比能略微提高提取率。

3.3 模型优化和验证 采用 Design Expert 8.0.6 软件,根据回归模型分析可知,最佳提取条件为提取时间 33.04 min,乙醇体积分数 69.57%,液固比 16.83:1,提取率预测值为 0.446 7 mg/g。为使实际操作更方便,最终确定柠檬苦素的优化提取工

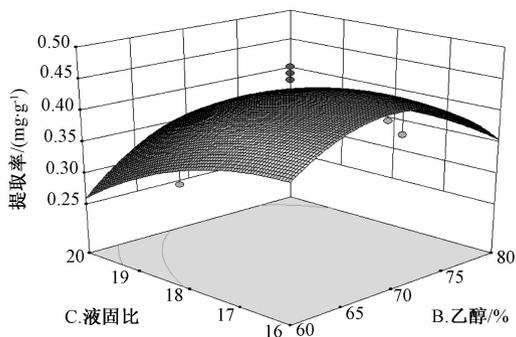


图8 液固比和乙醇体积分数对提取率的影响  
Fig. 8 Effects of liquid-solid ratio and ethanol concentration on extraction rate

艺为提取时间 33 min, 乙醇体积分数 70%, 液固比为 17 : 1, 重复 3 次实验, 提取率分别为 0.449 8、0.448 6、0.449 2 mg/g, 平均 0.449 2 mg/g, 而传统方法仅为 0.056 4 mg/g。在最佳条件下, 将该实验放大, 三组平行试验中投入柠檬籽 50 g, 提取率分别为 0.447 8、0.448 1、0.449 9 mg/g, 平均 0.448 6 mg/g; 投入 100 g, 提取率分别为 0.448 7、0.449 6、0.448 1 mg/g, 平均值为 0.448 8 mg/g。实际值和理论值接近, 说明拟合度较好, 可适用于超声提取柠檬苦素工艺的分析及其相关的参数优化。

#### 4 结论

本研究在单因素试验基础上, 采用中心组合设计优化超声提取柠檬籽中的柠檬苦素。结果表明, 该工艺具有一定的稳定性和可行性, 而且传统回流浸提法的提取率仅为 0.056 4 mg/g, 与实验结果 (0.4492 mg/g) 有较大差距。综上所述, 该方法能耗低、溶剂用量少、提取速度大大加快、提取时间明显缩短, 而且提取率也有一定提升, 杂质含量减少, 可为工业化提取柠檬苦素类化合物提供一定参考价值。

#### 参考文献:

- [1] 汪建红, 廖立敏, 王 碧, 等. 乙醇-硫酸铵双水相体系提取柠檬渣中柠檬苦素研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 230-232.
- [2] 李建凤, 任 磊, 王 真, 等. 响应曲面法用于超声波提取柠檬皮渣果胶研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(4): 267-269.
- [3] 廖立敏, 刘 月, 李建凤, 等. 响应曲面法用于微波提取柠檬皮渣总黄酮研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2012, 46(5): 569-572.
- [4] 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): 104-106.
- [5] 石 慧, 王喜军. 柠檬苦素类化合物的药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2014, 42(4): 128-129.
- [6] Poulouse S M, Harris E D, Patil B S. Antiproliferative effects of citrus limonoids against human neuroblastoma and colonic adenocarcinoma cells[J]. *Nutr Cancer*, 2006, 56(1): 103-112.
- [7] 孙崇德, 陈昆松, 戚行江, 等. 柑桔果实柠檬苦素类化合物的研究与应用[J]. 浙江农业学报, 2002, 14(5): 300-301.
- [8] 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.
- [9] Lee I S, Kim J P, Na M K, et al. Cytotoxicity of ergosterol derivatives from the fruiting bodies of *Hygrophorus russula* [J]. *Nat Prod Sci*, 2011, 17(5): 85-89.
- [10] Qin J C, Zhang Y M, Gao J M, et al. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(6): 1572-1574.
- [11] 罗喜荣, 范菊娣, 莫彬彬, 等. 超临界二氧化碳萃取橘核中诺米林的工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 74-76.
- [12] Kawagishi H, Katsumi R, Sazawa T, et al. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(9): 2777-2779.
- [13] 汤冬梅, 朱春风, 周明达. 柚核中柠檬苦素纯化工艺的研究[J]. 农产品加工·学刊, 2010(10): 48-50.
- [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, 36(9): 257-258.
- [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, 31(3): 367-369.