

文章编号:1001-6880(2015)6-1081-05

超声波辅助双水相提取柠檬皮中的柠檬苦素

汪建红^{1,2*},廖立敏^{1,2},王碧^{1,2},刘腾¹¹内江师范学院化学化工学院; 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:以低温烘干的柠檬皮为原料,利用超声波辅助乙醇-硫酸铵双水相体系提取柠檬皮中的柠檬苦素,通过单因素实验和正交实验考察了乙醇浓度、料液比、硫酸铵用量、超声波处理温度、处理时间、提取温度和提取时间对得率的影响。结果表明:当乙醇体积浓度为60%,料液比为1:20 g/mL,硫酸铵用量为12 g,超声波处理温度60 °C,处理时间30 min,提取温度为50 °C,提取时间为3 h时,得率最高。在此条件下作了3次平行实验,平均得率可达0.3222%,而且实验重现性好。

关键词:双水相;超声波;柠檬苦素;柠檬皮;正交实验

中图分类号:O629.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.06.026

Extraction of Limonin in Lemon Peel by Ultrasonic-assisted Aqueous Two-phase System

WANG Jian-hong^{1,2*}, LIAO Li-min^{1,2}, WANG Bi^{1,2}, LIU Teng¹¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Neijiang Normal University;²Key Laboratory of Fruit Waste Treatment and Resource Recycling, Sichuan Neijiang 641112, China

Abstract: In this study, limonin was extracted from dried lemon peel by ultrasonic-assisted aqueous two-phase system of ethanol-(NH₄)₂SO₄. The effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio, amount of ammonium sulfate, ultrasonic treatment temperature, ultrasonic treatment time, extraction temperature and extraction time, on the extraction yield, were studied by the single factor experiments and orthogonal tests. The results showed that when the volume concentration of alcohol was 60%, the solid-liquid ratio was 1:20 g/mL, the amount of ammonium sulfate was 12 g, the treatment temperature was 60 °C, the ultrasonic treatment time was 30 min, the extraction temperature was 50 °C and the extraction time was 3 h, the extraction yield of limonin reached the maximum. Under the optimal conditions, three parallel experiments were carried out and the average extraction yield reached 0.3222%. The reproducibility of the optimized method was good.

Key words: aqueous two-phase system; ultrasonic; limonin; lemon peel; orthogonal test

四川安岳是中国主要柠檬生产基地之一,被称为“中国柠檬之乡”,现有柠檬种植面积20万亩以上,年产鲜果25万吨以上,产量占全国柠檬总产量的70%^[1]。但由于缺乏相应的后处理手段,大量的柠檬皮等被作为垃圾直接丢弃,既造成了资源的浪费,又污染了环境。柠檬皮中含有大量的柠檬苦素等活性成分,柠檬苦素具有抗炎、杀虫、抗癌、抗HIV等作用^[2,3]。将柠檬苦素用于食品等领域,可充分发挥其经济价值,也可缓解对环境的压力,引起人们极大关注。

常用的柠檬苦素的提取方法有水提法^[4]、有机溶剂法^[5]、微波辅助法^[6]、超声波法^[7]、超临界流体萃取法^[8]、双水相萃取法^[9-11]等。水提法提取时间长,提取效率低;有机溶剂法操作过程中会用到部分的有毒有害的有机溶剂,污染提取物;微波辅助法用到的微波会对人体构成较大的危害;超临界流体萃取法,提取效率高,但设备较复杂,能耗大,成本高;超声波法提取时间短,提取效率高;双水相萃取法凭借双水相体系的分相特性,一方面可在较低有机溶剂浓度的条件下获得和较高相同有机溶剂浓度时一样的提取效果,一方面还可实现易溶于该有机溶剂的成分和易溶于水的成分的同时溶解,使提取体系固液易于分离,也便于下一步的水溶性和油溶性成分的分离,并且该方法操作简便,条件温和,几乎不

收稿日期:2014-10-29 接受日期:2015-04-02

基金项目:四川省教育厅青年基金资助项目(09ZB036);内江师范学院校级项目(14ZB01)

*通讯作者 E-mail:cunhua2@126.com

存在有机溶剂残留问题。

本文就结合了超声波和双水相萃取法两种方法的优点,利用超声波辅助双水相提取柠檬皮中的柠檬苦素,可同时实现低溶剂用量、较好的提取效果、容易分离固液两相及水溶性和油溶性成分的目的。传统的聚合物-聚合物、聚合物-无机盐等双水相体系粘度大、难处理,且需反萃取,而乙醇-硫酸铵双水相体系分相稳定,粘度小,操作简便,条件温和,选用试剂无毒,且处理简便^[12,13]。因此本实验选择此体系提取柠檬皮中的柠檬苦素,并通过单因素实验和正交实验考察了超声波处理温度、处理时间、乙醇浓度、料液比、硫酸铵用量、提取温度、提取时间对提取效果的影响,确定了超声波辅助双水相提取柠檬皮中柠檬苦素的最佳工艺条件,并与相同条件下不使用双水相体系和单纯只使用双水相体系时的提取情况进行了比较,为天然产物中有效成分提取探索了一条新的途径。

1 材料与设备

1.1 试剂与材料

柠檬苦素标准品,优级纯;硫酸铵、乙醇、对二甲氨基苯甲醛、硫酸、三氯化铁,均为分析纯;柠檬,购自四川安岳。

1.2 仪器与设备

KQ-400KDB型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BT-224S电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);SHB-B₉₅型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);TDL-5-A型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);T-6新世纪型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

2 实验方法

2.1 标准曲线的绘制

参照文献方法^[10],配制显色剂溶液及浓度为0.20 mg/mL的柠檬苦素标准溶液,并通过实验选择测定波长为500 nm。以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,并求出其线性回归方程为A=7.20C-0.0025, R²=0.9962。

2.2 柠檬苦素的提取与测定

柠檬苦素的提取:取低温烘干的柠檬皮粉末2.00 g于250 mL圆底烧瓶中,按照设定的料液比加入

一定浓度的乙醇溶液和一定量的硫酸铵;先在设定的温度下在确定的超声波功率下处理一定时间,然后移去超声波清洗器,在设定的提取温度下继续回流提取一定时间,抽滤,对滤液进行减压浓缩至干,用无水乙醇溶解并定容到25 mL容量瓶中。

柠檬苦素的测定:准确移取上述提取液2.00 mL于50 mL带刻度比色管中,用无水乙醇稀释至25.00 mL,加入5 mL显色剂混合溶液,显色30 min后,在500 nm波长处测定吸光度。根据标准曲线回归方程,得到提取液浓度。柠檬苦素得率按照下式计算:

$$Et (\%) = (C \times V \times n) / m \times 100 \%$$

式中,Et为得率(%);C为测得的提取液浓度(g/mL);V为提取液体积(mL);n为稀释倍数,m为原料的质量(g)。

2.3 乙醇浓度对提取效果的影响

由于所使用的超声波发生器的功率无法调节,所以功率是固定的400 W。在硫酸铵用量、乙醇用量、超声波处理温度、处理时间、提取温度、提取时间分别为8 g,30 mL,30 °C,40 min,40 °C,1 h的条件下,选择不同体积浓度(20%、30%、40%、50%、60%),重复上述操作。

2.4 超声波处理温度对提取效果的影响

在超声波功率400 W,超声波处理时间40 min,提取温度40 °C,硫酸铵用量8 g,乙醇用量30 mL,提取时间1 h及上一步确定的乙醇浓度的条件下,选择不同超声波处理温度(30、45、60、75 °C),重复上述操作。

2.5 超声波处理时间对提取效果的影响

在超声波功率400 W,恒定的乙醇浓度和超声波处理温度,提取温度40 °C,硫酸铵用量8 g,乙醇用量30 mL,提取时间1 h的条件下,选择不同超声波处理时间(20、30、40、50 min),重复上述操作。

2.6 正交实验

参考文献方法^[10],在确定的乙醇体积浓度、超声波处理温度、超声波处理时间的情况下,以硫酸铵用量、提取温度、料液比($m_{\text{柠檬皮}} : V_{\text{乙醇}}$)、提取时间为考察因素设计L₁₆(4⁴)正交表,并按照此正交表安排实验,每组实验条件下重复3次平行实验,重复上述操作。

3 结果与讨论

3.1 乙醇浓度、超声波处理温度和处理时间对提取效果的影响

乙醇浓度、超声波处理温度和时间对柠檬苦素的提取效果影响较大,如图1所示。

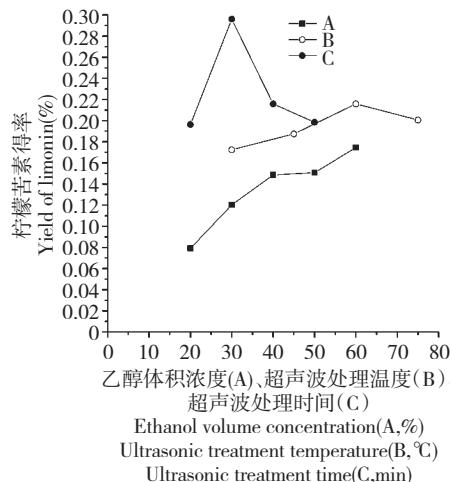


图1 乙醇体积浓度(A)、超声波处理温度(B)及超声波处理时间(C)对柠檬苦素提取的影响

Fig. 1 Effects of ethanol volume concentration (A), ultrasonic treatment temperature (B) and ultrasonic treatment time (C) on the extraction yield of limonin

从图1的折线(A)可知,柠檬苦素得率随着乙醇浓度的增加而逐渐增加,这是由于乙醇体积浓度增加,也增加了双水相体系上层的乙醇浓度,柠檬苦素在乙醇中的溶解度远大于在水中^[10]。当乙醇体

积浓度达到60%后,若继续增加乙醇浓度,则会有大量晶体从双水相体系析出,并且也难以形成稳定的双水相体系,影响柠檬苦素的提取。综合考虑这些因素,选择最佳乙醇体积浓度60%。

据图1的折线(B)可知,柠檬苦素得率随超声波处理温度的上升而上升,60℃时达到最大,此后继续提高处理温度,柠檬苦素得率出现了一定程度的下降。这是由于处理温度上升,使超声波破坏柠檬皮组织的破壁能力增强,柠檬苦素更易浸出;但在超声波的作用下,过高的处理温度会导致柠檬苦素因氧化或被超声波破坏等因素变质的量增加,也会增加乙醇挥发量。综合考虑节约能源和柠檬苦素得率这些因素,选择最佳超声波处理温度为60℃。

从图1的折线(C)可知,柠檬苦素得率随处理时间的延长而增大,30 min时达最大值,此后继续延长处理时间,柠檬苦素得率出现了下降的趋势。这是由于时间越长,超声波对柠檬皮细胞壁组织的破坏程度就越大,更有利干柠檬苦素的释放和进入溶液;过长的处理时间也会增加被超声波破坏和被氧化变质的柠檬苦素的量。综合考虑这些因素,选择最佳处理时间为30 min。

3.2 正交实验

在乙醇体积浓度为60%、超声波处理温度60℃,超声波处理时间30 min的条件下,设计L₁₆(4⁴)正交表,并按照此正交表安排实验,正交实验设计、实验结果及极差分析结果见表1,方差分析见表2。

表1 L₁₆(4⁴)正交实验设计和实验结果

Table 1 L₁₆(4⁴) orthogonal experimental design and results

实验号 No.	(A)硫酸铵的用量 Amount of ammonium sulfate (g)	(B)料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	(C)提取时间 Extraction time (h)	(D)提取温度 Extraction temperature (°C)	得率 Yield (%)
1	1(6)	1(1:10)	1(2)	1(40)	0.1835
2	1	2(1:15)	2(3)	2(50)	0.2247
3	1	3(1:20)	3(4)	3(60)	0.2420
4	1	4(1:25)	4(5)	4(70)	0.2247
5	2(8)	1	2	3	0.2116
6	2	2	1	4	0.1997
7	2	3	4	1	0.2451
8	2	4	3	2	0.2160
9	3(10)	1	3	4	0.2355
10	3	2	4	3	0.2225
11	3	3	1	2	0.2710
12	3	4	2	1	0.2559

13	4(12)	1	4	2	0.2658
14	4	2	3	1	0.2559
15	4	3	2	4	0.2811
16	4	4	1	3	0.2398
k_1	0.2187	0.2241	0.2235	0.2351	
k_2	0.2181	0.2257	0.2433	0.2444	
k_3	0.2462	0.2598	0.2374	0.2290	
k_4	0.2607	0.2341	0.2395	0.2353	
R	0.0426	0.0357	0.0198	0.0154	

表 2 正交实验结果方差分析

Table 2 Variance analysis of the orthogonal experiment results

因素 Factor	SS	df	F	$F_{0.05}(3,3)$	P
A	0.005	3	5.000	9.280	
B	0.003	3	3.000	9.280	
C	0.001	3	1.000	9.280	
D	0.000	3	0.000	9.280	
误差(e)	0.001	3			
总变异(T)	0.010	15			

注: $F_{0.05}(3,3) = 9.280$, $F_{0.01}(3,3) = 29.500$, * 代表 $P < 0.05$ 为影响显著。

Note: $F_{0.05}(3,3) = 9.280$, $F_{0.01}(3,3) = 29.500$, * $P < 0.05$, indicates significant difference.

从表 1 可看出, 柠檬皮中柠檬苦素的得率受到了温度、提取时间、料液比和硫酸铵用量这 4 个因素的交叉影响, 各因素影响的主次次序为硫酸铵用量 > 料液比 > 提取时间 > 提取温度。最佳水平组合为 $A_4B_3C_2D_2$, 即采用硫酸铵用量 12 g, 柠檬皮和乙醇的料液比 1:20 g/mL, 提取时间 3 h, 提取温度 50 ℃。

为了进一步确定实验因子的可信度, 对柠檬皮中柠檬苦素得率的正交实验结果方差分析见表 2。从表 2 可看到, 在柠檬皮所选择提取工艺正交实验所选取的因素和水平范围内, 因素 A、B、C、D 的影

响均未达到显著水平, 即硫酸铵用量、柠檬皮和乙醇的料液比、提取时间和提取温度对柠檬皮中柠檬苦素的提取影响不显著。而 F 值结果表明, 方差分析结果与直观的极差分析结果一致。

对正交实验结果进行 3 次平行实验证, 结果柠檬皮中柠檬苦素得率分别为 0.3092%、0.2941%、0.3634%, 平均值 0.3222%, 这与正交实验结果一致。

3.3 几种提取方法的比较

表 3 列举了不同提取方法提取柑橘类果皮渣苦素的情况。

表 3 几种提取方法下的柠檬苦素提取情况对比

Table 3 Comparison of extraction results of limonin using different methods

提取方法 Extraction method	非超声波非双水相类 ^[14] Non ultrasonic and non aqueous two-phase method	超声波辅助非双水相 ^[15] Ultrasonic-assisted and non aqueous two-phase method	单纯双水相非超声波 ^[10] Aqueous two-phase and non ultrasonic method	超声波辅助双水相(本文) Ultrasonic-assisted aqueous two phase method
提取体系固液分离易 Solid-liquid separation	难分离	难分离	易分离	易分离
苦素得率(%) Extraction yield of limonin	0.0856	0.3260	0.2230	0.3222

从表 3 可知, 使用双水相体系提取柠檬苦素时

提取体系固液分离容易, 不使用双水相体系时分离

较困难;使用超声波辅助提取时柠檬苦素得率较高;而超声波辅助双水相体系提取时,既具有提取体系固液分离容易的优点,柠檬苦素得率也较高,因此超声波辅助双水相提取柠檬苦素确实是一种很有发展前途的提取方法。

4 结论

本文通过设计单因素实验和正交实验,得出了超声波辅助乙醇-硫酸铵双水相体系的实验中,影响柠檬皮中柠檬苦素得率指标的因素大小顺序为:硫酸铵用量>料液比>提取时间>提取温度;提取的最佳工艺条件为:乙醇体积浓度60%,超声波处理温度60℃,超声波处理时间30 min,硫酸铵用量12 g,柠檬皮和乙醇的料液比1:20 g/mL,提取温度50℃,提取时间3 h。通过平行实验的验证可知,该方法不但得率较高,而且实验重现性好,也说明正交实验得出的结论是正确的。同其他方法相比,超声波辅助双水相提取法具有操作简便,得率高,分离容易等优点。该研究结果对于天然产物中有效成分的提取研究具有一定的参考价值。

参考文献

- Gong Q(龚琪),Zhu CH(朱春华),Duo JZ(多建祖),et al. Status quo and prospect of preserving techniques of lemon. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学),2012,40:10585-10587.
- Poulose SM,Harris ED. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *Nutri*,2005,135:870-877.
- Li B(李彪),Shi R(施蕊),Xiong Z(熊智),et al.'Extraction and insecticidal activities of limonin in peel of citrus maxima. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报),2012,28:284-288.
- Wei JL(卫静莉),Xue XL(薛笑莉),Chen YZ(陈玉章). Extraction of flavonoids from persimmon leaves process research. *Food Res Dev*(食品研究与开发),2013,34:29-32.
- Jiang HM(蒋红梅),Lu XY(卢向阳),Fang J(方俊),et al. Analysis on chemical compositions of *Mosla chinensis* maxim in Hunan and optimization of extraction technology of its volatile oil. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2007,19:869-873.
- Wang HC(王恒超),Yan J(严静),Chen JP(陈锦屏),et al. Study on micro-assisted extracting and antioxidant activity of flavonoids from the persimmon fruit. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2012,33:232-235.
- Jiao Y(焦岩),Chang Y(常影). Optimization of ultrasonic wave-assisted extraction process of flavonoids from apple peels. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2012,33:283-286.
- Tao Q(陶清),Lv JQ(吕鉴泉). Study on extraction of flavones from bamboo leaves by supercritical CO₂ fluid. *J Hubei Normal Univ,Nat Sci*(湖北师范学院学报,自科版),2010,30:96-99.
- Wang J H(汪建红),Liao L M(廖立敏),Wang B(王碧). Study on the extraction of the flavonoid in the lemon pulp by the aqueous two-phase system of the ethanol-(NH₄)₂SO₄. *J Huazhong Normal Univ,Nat Sci*(华中师范大学学报,自科版),2013,47:78-81.
- Wang JH(汪建红),Li LM(廖立敏),Wang B(王碧),et al. Study on extraction of limonin from lemon pulp by aqueous two-phase system of the ethanol-(NH₄)₂SO₄. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2014,35:230-232.
- Kulagin-Chicaroux A,Zeiner T. Novel aqueous two-phase system based on a hyperbranched polymer. *Fluid Phase Equilibria*,2014,362:1-10.
- Zheng SJ(郑尚季),Jia YR(贾玉荣),Qin Z(秦峰),et al. The extraction of total saponins from *Solanum lyratum* thunb using aqueous two-phase extraction. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科学大学报),2012,29:302-306.
- Xiang PZ,Gao YT. Extraction separation of gold in n-propyl alcohol-ammonium sulfate aqueous two-phase system. *Asian J Chem*,2013,25:1492-1496.
- Yang Y(杨艳),Pang XX(潘雪雪),Luo AM(罗爱民),et al. Synthesis and characterization of complexes of sulfosalicylic acid with rare earths. *Chem Bioeng*(化学与生物工程),2013,30:35-38.
- Li JL(黎继烈),Zhang H(张慧),Zeng CZ(曾超珍),et al. Study on ultrasonic extraction technology of limonin from the kumquat. *J Chin Inst Food Sci Technol*(中国食品学报),2009,9:96-102.