

柚子皮精油提取及其驱蚊效果研究

杨愈丰^{1,2,3}, 柳敦耀^{1,3}, 向红英^{1,3}, 吕延成¹, 王菊芳^{2*}

¹遵义医学院珠海校区生物化学与分子生物学教研室, 珠海 519041; ²华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640; ³珠海市中药基础与应用研究重点实验室, 珠海 519041

摘要: 本文通过响应面法研究了柚子皮精油的提取工艺, 并初步考察了所提取精油的驱蚊效果。柚子皮精油提取采用微波辅助蒸馏法, 在采用单因素实验考察蒸馏时间、料液比和 NaCl 质量分数对精油提取率的影响之后, 通过响应面法进行提取工艺优化, 以获得最佳提取方案; 然后采用趋避法验证柚子皮精油的驱蚊活性。结果表明, 最佳柚子皮精油提取方案如下: 蒸馏时间 100 min, 料液比 0.3:2 (g/mL), NaCl 的质量分数 1%, 采用该方案柚子皮精油提取率达 1.65%。通过初步驱蚊实验发现柚子皮精油具有较好的驱蚊活性, 和市售六神花露水效果相当, 驱蚊效应具有进一步深入研究的价值。

关键词: 柚子皮精油; 蒸馏法; 响应面法; 驱蚊活性

中图分类号: R184.31

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.026

Extraction and Mosquito Repellent Activity of Essential Oil from *Citrus maxima* (Burm.) Merr. cv. Shatian Yu peels

YANG Yu-feng^{1,2,3}, LIU Dun-yao^{1,3}, XIANG Hong-ying^{1,3}, LV Yan-cheng¹, WANG Ju-fang^{2*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China; ²School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; ³Zhuhai Key Laboratory of Fundamental and Applied Research in Traditional Chinese Medicine, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China

Abstract: The essential oil was extracted from *Citrus maxima* (Burm.) Merr. cv. Shatian Yu peels with distillation method. Response surface method was used to optimize the extraction process based on single factor experiments. Then the mosquito repellent activity of essential oil was tested by phobotaxis. The optimal extraction process were determined as follows: 30 g of pomelo peel was treated in 200 mL of buffer containing 1% of sodium chloride for 100 min, of which the extraction yield was up to 1.65%. The extracted essential oil has considerable mosquito repellent activity, which deserve to be researched further. The result of this study provided scientific basis for the application of *C. maxima* essential oil.

Key words: pomelo peels essential oil; distillation; response surface method; mosquito repellent activity

植物精油具有安全性高^[1]、稳定性好^[2]等优点, 常被作为添加剂应用于食品和药品等行业^[3,4]。研究表明: 柚皮精油具有止咳化痰、抗菌消炎及促进消化等价值^[5,6]。另外, 由于柚子皮精油具有独特的芳香气味, 常被用作食品添加剂, 同时在洗发露等日用品以及洗涤剂中也得到了广泛应用。

对于柚子皮精油的提取, 目前主要采用的方法有蒸馏法、压榨法、溶剂浸提法和超临界流体萃取法

等^[6-8]。水蒸气蒸馏法具有成本低、易操作的优点, 但存在容易蒸馏不充分造成精油提取率偏低等缺点。压榨法所提取的精油气味更加接近水果本身的香味, 但制得的精油纯度低, 出油率也偏低。浸提法的成本高, 容易形成难以分离的乳浊液, 同时存在溶剂残留等缺点, 若想获得香精油还需要再次蒸馏来除去残留的溶剂。超临界流体萃取法安全性高, 残留少; 但该法所需设备昂贵、操作技术较难。总的来说, 目前对柚子皮加工利用的研究尚不充分, 大部分的柚子皮还是被直接丢弃。因此, 开发有效的柚子皮精油提取工艺可以更有效的回收利用柚子皮, 创造良好的社会效益和经济效益。

收稿日期: 2016-07-01 接受日期: 2016-09-02

基金项目: 贵州省科技合作计划(黔科合 LH 字[2015]7547 号); 遵义医学院博士启动基金(F-712); 珠海市重点实验室开放基金(ZYKL-2016K2)

* 通信作者 E-mail: jufwang@scut.edu.cn

蒸馏法利用水分子的渗透作用将果皮细胞中的精油置换出来,然后与水蒸气一同从油水共沸物中被蒸馏出。柑橘类精油具有低沸点、密度小、稳定性好等特点,采用蒸馏法提取相当合适。NaCl 的盐析作用可使柚子皮精油在水中的溶解度下降,同时 NaCl 属于强电解质,可提高溶液的沸点^[6],这些因素都有助于精油的馏出。

蚊虫作为多种传染性疾病的载体,如登革热、疟疾等,严重威胁人类健康^[9]。随着化学驱避剂的大规模使用,耐药性蚊虫已经出现,这对蚊虫,乃至相关疾病的有效控制带来更大的挑战。多种天然的植物精油对蚊虫具有趋避效果,能够抑制其生长发育甚至起到杀死蚊虫、幼虫及其虫卵的作用^[2,10-12],同时具有性质温和、安全等优点,具有多种开发应用潜能^[13,14]。

本研究采用响应面法考察了蒸馏时间、料液比和 NaCl 质量分数对柚子皮精油提取效率的影响,得到了一个优化的提取方案;该工艺与已报道的方法比较,耗时少、所需 NaCl 量少、提取率高^[6];同时本研究初步考察了所提取精油的驱蚊效应,为拓宽柚子皮精油可能的应用范围提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与动物

柚子为广东梅县沙田柚,购买于珠海市金海岸市场。所用实验淡色库蚊(*Culex pipens pallens*)由珠海姗拉娜化妆品有限公司实验室提供。

1.2 仪器与设备

密封型摇摆粉碎机 CF-4A,浙江省温岭市创力药材器械厂;电子天平,福州华志科学仪器有限公司;蒸馏装置,珠海金承仪器有限公司;微波炉,广东美的微波炉制造有限公司;移液枪,美国 Sorenson BioScience。

1.3 实验方法

1.3.1 柚子皮处理

取新鲜沙田柚 6 个剥皮,用手术刀去掉白色絮

状皮层,只保留黄色表皮,厚度约 3 mm。放入密封型摇摆粉碎机,粉碎 90 s,用电子天平称取分装,每袋 30 g,置于-20 ℃条件下冻存备用。

1.3.2 精油提取方法

取 30 g 冷冻的柚子皮放入烧杯中,加入相应体积 NaCl 溶液,微波炉高火加热 60 s;用玻璃棒快速搅拌,倒入 500 mL 圆底烧瓶中,组装好蒸馏装置,接通电源,加热调至中火,开始计时。蒸馏结束后用移液枪将不溶于水的油状液体吸出,存放于 1.5 mL EP 管内,置于-20 ℃条件下冻存。等精油中残留的水结成冰去除,得到精油,称重记录,计算提取率。

1.3.3 精油得率计算

柚子皮精油得率的计算方法:

$$Y = \frac{M2}{M1} \times 100\%$$

式中 Y 为精油得率, M1 为柚子皮质量, M2 为精油质量。

1.3.4 精油提取单因素实验

单因素实验分为三组进行,分别考察蒸馏时间、料液比和 NaCl 质量分数对精油提取率的影响。首先固定料液比为 0.3:2 (g/mL), NaCl 质量分数为 0%,按上述蒸馏方法,蒸馏时间分别为 30、60、90、120、150 min 提取精油,以提取率为指标,筛选最佳蒸馏时间。然后固定蒸馏时间为前面得到的最佳值, NaCl 质量分数为 0%,分别以料液比为 0.3:0.5、0.3:1、0.3:2、0.3:3、0.3:4 (g/mL) 提取精油,筛选最佳料液比。最后固定蒸馏时间和料液比为前面得到的最佳值,分别以 NaCl 质量分数为 0、1%、2%、3%、4% 筛选最佳 NaCl 质量分数。

1.3.5 响应面实验

根据单因素实验的结果确定 NaCl 质量分数、料液比和蒸馏时间 3 个实验因素和 3 个水平,使用 Design Expert v8.0.6.1 进行实验设计,得到响应面的实验方案,对提取工艺进行响应面分析,实验因素与水平如表 1 所示。

表 1 响应面实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

水平 Levels	因素 Factors		
	X ₁ NaCl 质量分数 Concentration of NaCl (%)	X ₂ 料液比 Ratio of solid to liquid (g/mL)	X ₃ 蒸馏时间 Distillation time (min)
- 1	0	0.3:1	60
0	1	0.3:2	90
1	2	0.3:3	120

1.3.6 驱蚊实验

方法参考文献^[15],稍作修改:准备6个直径约21 cm长度约43 cm的透明圆筒串联,分别将2个圆筒间用纱布隔开且两边用纱布挡住,分别在左右两边的圆筒上标记一号筒和二号筒。组装成如图1所示装置;将一号圆筒用透气纱网封口,二号圆筒提前放入100只实验蚊虫,分别在二号圆筒放入含有200 μL 精油或六神花露水的棉花并密封,5 min后抽开2个圆筒间纱布,再过10 min后观察并记录两边圆筒的蚊虫数量,用等体积的蒸馏水代替精油做阴性对照,计算驱蚊率。驱蚊率计算公式如下:

$$\text{驱蚊率} = \frac{\text{一号筒中的蚊子数(样品 - 蒸馏水)}}{\text{总蚊子数}} \times 100\%$$

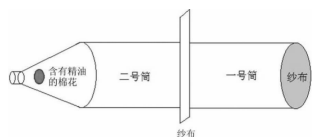


图1 驱蚊实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of equipment for mosquito repellent

1.3.7 数据处理

本文响应面优化部分数据采用软件 Design Expert v8.0.6.1 进行设计和数据分析,单因素实验和驱蚊率部分数据均采用三样取平均值法,使用 Excel 软件,采用 t 检验对数据进行方差分析, $P < 0.05$ 时

认为差异性显著, $P < 0.01$ 时认为差异性极显著。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

在精油提取过程中,蒸馏时间、料液比及 NaCl 质量分数对提取率的影响往往较大,实验首先对这几个单因素进行了考察。由图 2A 可知,精油提取率随蒸馏时间延长先增高后稍有降低,蒸馏 90 min 时精油提取率最高,达到 1.37%。前期随着蒸馏时间延长,精油提取越来越充分;但由于冷凝回流效率不可能达到 100%,因此蒸馏后期由于部分精油没有冷凝回流而导致提取率反而稍有下降。蒸馏时间可能跟原材料种类、颗粒大小有一定的关系,必须控制在合理的范围内。由图 2B 可知,当料液比为 0.3 : 2 时精油提取率最高,达到 1.43%。一方面当提取液量过少时,精油不能被充分交换到溶液中,故而提取率偏低;另一方面当提取液量过多时,精油在溶液中的残留量相应增加,这同样可能导致最终精油的得率不高。由图 2C 可知,NaCl 溶液的质量分数达到 1% 时精油提取率最好,达到 1.49%。NaCl 主要起盐析作用,同时可以提高溶液的沸点。随着 NaCl 质量分数的增加,盐析效果会下降,同时沸点也会升高,这可能是实验中在 NaCl 质量分数超过 1% 后,精油的提取率随着 NaCl 质量分数增加而降低的原因。

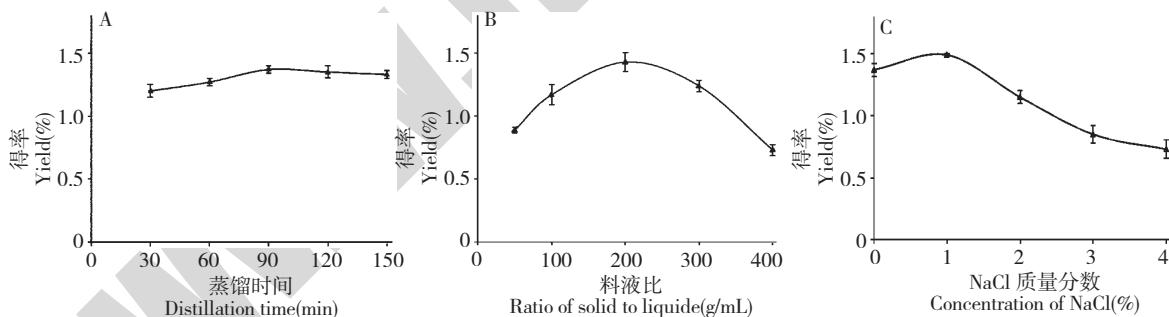


图2 蒸馏时间(A)、料液比(B)和 NaCl 质量分数(C)对精油提取率的影响

Fig. 2 Effects of distillation time(A), ratio of solid to liquid(B) and concentration of NaCl(C) on extraction yield of essential oil

2.2 响应面实验

以 NaCl 质量分数(X_1)、料液比(X_2)、蒸馏时间(X_3)为实验因素,应用 Design Expert v8.0.6.1 设计三因素三水平的 Box-Behnken 优化实验,以提取率为响应值,结果见表 2。

实验数据如表 2 所示,通过软件 Design Expert v8.0.6.1 进行回归分析,得到精油提取率 Y 与影响因素关系的二次多项回归方程为:

$$Y = 1.62 - 0.037X_1 - 0.0025X_2 + 0.098X_3 + 0.01X_1X_2 + 0.08X_1X_3 + 0.12X_2X_3 - 0.23X_1^2 - 0.072X_2^2 - 0.18X_3^2$$

如表 3 所示,失拟项 $P = 0.06$,说明模型相对于绝对误差并不显著,这表明通过实验得到的二次回归方程能很好地预测响应面值。同时模型的 F 值为 7.02, $P < 0.001$,说明回归方程模型对实验影响极显著。调整确定系数 $R_{Adj}^2 = 0.7721$,表明回归方

表 2 柚子皮精油提取响应面实验结果

Table 2 Response surface experimental results of pomelo peels essential oil extraction

编号 No.	(X ₁)NaCl 质量分数 Concentration of NaCl	(X ₂)料液比 Ratio of solid to liquid	(X ₃)蒸馏时间 Distillation time	提取率 Yield (%)
1	- 1	0	- 1	1.26
2	1	0	- 1	1.28
3	- 1	0	1	1.34
4	1	0	1	1.40
5	- 1	- 1	0	1.27
6	1	- 1	0	0.92
7	- 1	1	0	1.35
8	1	1	0	1.32
9	0	- 1	- 1	1.47
10	0	- 1	1	1.13
11	0	1	- 1	1.39
12	0	1	1	1.51
13	0	0	0	1.67
14	0	0	0	1.65
15	0	0	0	1.63
16	0	0	0	1.64
17	0	0	0	1.53

程与实验值具有较高的契合度,表明该模型能很好地反应响应值的变化。模型的回归系数 $R^2 = 0.9003$,表明自变量与响应值之间具有良好的线性关系,可将模型用于实验的理论预测。通过以上的

数据分析反应出该回归模型可用来对柚子皮精油的提取进行优化。通过 F 值的分析结果可得到对柚子皮精油提取率的影响因素大小为:蒸馏时间 > NaCl 质量分数 > 料液比。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for the regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	df	均方 Mean square	F value	P-value	显著性 Significance
模型 Model	0.58	9	0.065	7.02	0.0088	*
X ₁ NaCl 质量分数 Concentration of NaCl	0.011	1	0.011	1.22	0.3056	
X ₂ 料液比 Ratio of solid to liquid	0.000005	1	0.000005	0.005429	0.9433	
X ₃ 蒸馏时间 Distillation time	0.076	1	0.076	8.26	0.0239	*
X ₁ X ₂	0.0004	1	0.0004	0.043	0.8408	
X ₁ X ₃	0.026	1	0.026	2.78	0.1394	
X ₂ X ₃	0.053	1	0.053	5.74	0.0477	*
X ₁ ²	0.23	1	0.23	24.61	0.0016	**
X ₂ ²	0.022	1	0.022	2.37	0.1676	
X ₃ ²	0.13	1	0.13	14.32	0.0069	**
残差 Residual	0.064	7	0.00921			
失拟项 Lack of fit	0.053	3	0.018	5.88	0.0600	
纯误差 Pure error	0.012	4	0.00298			
总变异 Cor total	0.65	16				

$$R^2 = 0.9003 \quad R^2_{Adj} = 0.7721$$

注:差异极显著, ** $P < 0.01$; 差异显著, * $P < 0.05$ 。

Note: ** indicated extremely significant difference, $P < 0.01$; * indicated significant difference, $P < 0.05$.

由图4所示各因素交互影响的响应面三维图可看出 NaCl 质量分数与料液比的交互影响对柚子皮精油的提取率影响较大,而 NaCl 质量分数与料液比

的交互影响对柚子皮精油的提取率影响小。从侧面证明了 F 值的分析结果。

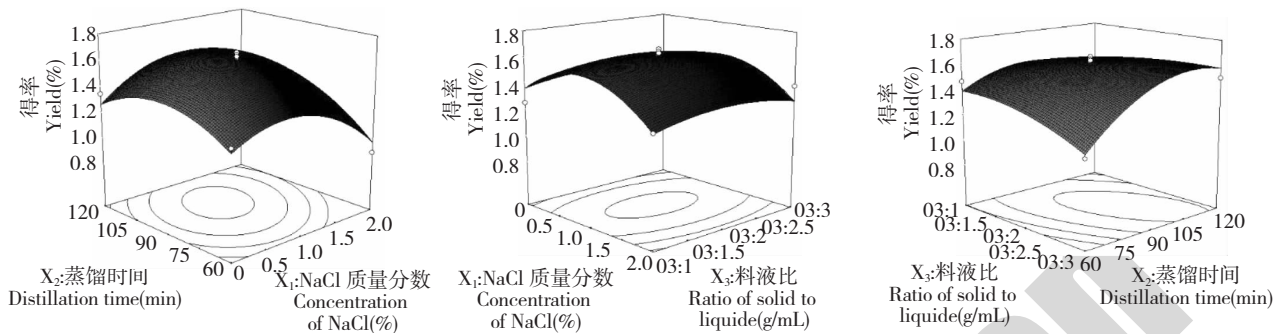


图4 3因素交互作用对精油提取率影响的响应面图(X_1 - X_3 、 X_1 - X_2 、 X_2 - X_3)

Fig. 4 Response surface plots showing the cross interaction among three factors on the extraction yield of essential oil (X_1 - X_3 , X_1 - X_2 , X_2 - X_3)

在响应面实验中影响精油提取率较大的因素为蒸馏时间以及 NaCl 的质量分数。综合所有因素考虑,在 NaCl 质量分数与溶液体积达到合适的范围时,蒸馏的温度也到达了合适的范围。而精油提取的关键在于提取过程中蒸馏是否充分,会不会还有精油残留在溶液中,这会直接影响到精油的提取率。而决定蒸馏是否充分的关键因素就是蒸馏时间。因此在响应面实验中,蒸馏时间的对精油提取率的影响最大。

软件测算得到的最佳提取方案为:蒸馏时间为 100.77 min,料液比为 0.3:2.27 (g/mL), NaCl 质量分数为 0.99%,理论提取率可达 1.64%。根据响应面实验数据和各个因素的对结果的影响程度大小,最终将柚子皮精油提取的最佳方案确定为:蒸馏时间 100 min、料液比 0.3:2 (g/mL)、NaCl 质量分数 1%。

为了验证最佳的提取方案,用得到的最佳方案进行了三次平行实验,提取率分别为 1.67%、1.63% 和 1.65%。三次平行实验结果平均值为 1.65% 与软件给出的提取率 1.64% 接近,因此采用响应面分析优化得到的柚子皮精油提取的方案参数可靠,可为柚子皮精油提取方法的优化作为理论依据。

该方法提取率比部分已报道的柚子皮精油提取率高,所需蒸馏时间较短,NaCl 质量分数较低^[6],可能的原因是我们对材料的处理更精细,处理后柚子皮的颗粒小,同时在蒸馏前做了短暂的超声波处理,这些都有利于柚子皮油胞的破裂,使精油释放更佳

充分,最终得到更高的提取率^[16]。当然颗粒大小和超声处理强度及时间对本研究提取率的具体影响程度有待进一步考察。

2.3 驱蚊实验

很多植物精油都具有驱蚊效果,甚至可以杀死成虫、幼虫或者虫卵^[2,10-12];又因其具有较好的安全性和芳香气味等特点,是目前蚊虫驱避剂或杀虫剂的优选成分。实验中对所提精油驱蚊效果进行了比较,由图5可知,精油达到驱蚊率达到 80%,比市售六神花露水效果稍差,但无统计学差异($P > 0.05$),具有作为驱避剂开发的价值。

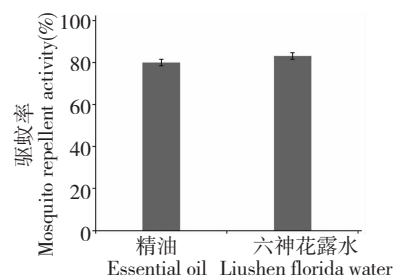


图5 两种样品的驱蚊效果比较

Fig. 5 Comparison of mosquito repellent activity of two samples

3 结论

实验用微波辅助蒸馏法建立了一个有效的精油提取方案,通过对蒸馏时间、料液比和 NaCl 质量分数初步研究,然后通过 Box-behnken 设计,采用响应面分析法对柚子皮精油提取工艺进行了优化,确定最佳提取条件为蒸馏时间 100 min、料液比 0.3:2

(g/mL)、NaCl 质量分数 1%, 提取率达到 1.65%。此外, 实验还验证了所提取精油的驱蚊效果, 结果表明: 柚子皮精油具有良好的驱蚊活性, 可作为驱蚊剂或其它食品、药品添加剂开发。当然, 柚子皮精油的驱蚊持久性如何, 能否真正用于驱避剂等方面的应用, 则需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Carvalho KD, SL ES, de Souza IA, *et al.* Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. *Parasitol Res*, 2016, 115:3441-3448.
- 2 Santos GK, Dutra KA, Lira CS, *et al.* Effects of *Croton rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2014, 19:16573-16587.
- 3 Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*, 2004, 94:223-253.
- 4 Zhang H(张辉), Jia JD(贾敬敦), Wang WY(王文月), *et al.* Current status and future trends of food additives research in China. *J Food Sci Biotech(食品与生物技术学报)*, 2016:225-233.
- 5 Li B(李斌), Yang LJ(杨丽君). Study on the extraction and antibacterial activity of essential oil from Shaddock Peel. *J Nanyang Inst Technol(南阳理工学院学报)*, 2012:89-92.
- 6 Zhang Y(张鹰), Wang MS(王满生), Zeng XA(曾新安), *et al.* Study on extractive condition optimization of essential oil in pomelo peel of Golden-pomelo and antibacterial activity. *Food Ind(食品工业)*, 2014:54-58.
- 7 Nejad-Sadeghi M, Taji S, Goodarzian I. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Draacocephalum kotschy* Boiss: An endangered medicinal plant in Iran. *J Chromatogr A*, 2015, 1422:73-81.
- 8 Fornari T, Vicente G, Vazquez E, *et al.* Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J Chromatogr A*, 2012, 1250:34-48.
- 9 Chattopadhyay P, Dhiman S, Borah S, Rabha B, *et al.* Essential oil based polymeric patch development and evaluating its repellent activity against mosquitoes. *Acta Trop*, 2015, 147:45-53.
- 10 da Silva MF, Bezerra-Silva PC, de Lira CS, *et al.* Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). *Exp Parasitol*, 2016, 165:64-70.
- 11 Bezerra-Silva PC, Dutra KA, Santos GK, *et al.* Evaluation of the activity of the essential oil from an ornamental flower against *Aedes aegypti*: electrophysiology, molecular dynamics and behavioral assays. *PLoS One*, 2016, 11:e0150008.
- 12 da Silva RC, Milet-Pinheiro P, Bezerra da Silva PC, *et al.* (E)-Caryophyllene and alpha-Humulene: *Aedes aegypti* oviposition deterrents elucidated by gas chromatography-electrophysiological assay of *Commiphora leptophloeos* leaf oil. *PLoS One*, 2015, 10:e0144586.
- 13 Soonwera M, Phasomkusolsil S. Efficacy of Thai herbal essential oils as green repellent against mosquito vectors. *Acta Trop*, 2015, 142:127-130.
- 14 Keziah EA, Nukenine EN, Danga SP, *et al.* Creams formulated with *Ocimum gratissimum* L. and *Lantana camara* L. crude extracts and fractions as mosquito repellents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *J Insect Sci*, 2015, 15:1-5.
- 15 Xu CH(许春晖), Ou XP(欧祥平), Su YS(苏毅生), *et al.* Repellent efficacy of plant essential oil mixture against mosquitoes. *Chin J Hyg Insect Equip Jun(中华卫生杀虫药械)*, 2014, 20:243-244.
- 16 Zhang J(张静), Yao F(姚芳), Ma WX(马维新), *et al.* Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of essential oil from pomelo peel. *China Food Add(中国食品添加剂)*, 2015, 7:58-64.

(上接第 830 页)

- 10 Shen WQ(沈王庆), Wang M(王淼), Yang T(杨婷). Study on kinetic of Hg^{2+} from wastewater adsorbed by lemon residues. *Spectrosc Spect Anal*, 2016, 36:788-794.
- 11 Marin-Rangel VM, Cortes-Martinez R, Villanueva RAC, *et al.* As(V) Biosorption in an aqueous solution using chemically treated lemon (*Citrus aurantifolia* Swingle) residues. *J Food Sci*, 2012, 71(1):10-14.
- 12 Shen WQ(沈王庆), Lei Y(雷阳). Study on adsorption properties of lemon residues modified by H_3PO_4 . *J S Agric Sci*, 2016, 44:376-380.
- 13 Shen WQ(沈王庆), Wei XJ(魏锡均), Tang X(唐雪), *et al.* Study on clarification of sugarcane juice with lemon slag. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 36:224-228.
- 14 Shen WQ(沈王庆), Li XX(李小雪), Huang J(黄佳). Structural characteristics and adsorption properties on Cu^{2+} of modified lemon residues. *Res Environ Sci*, 2016, 29:146-154.