

柑橘中柠檬苦素超声提取工艺及含量分析

张朝晖, 朱中品, 李 辉

(吉首大学化学化工学院, 湖南 吉首 416000)

摘 要:以乙醇为提取溶剂, 采用高效液相色谱进行分析, 结合单因素和正交试验对超声波提取柑橘皮中柠檬苦素的提取工艺进行优化。探讨不同粒径的柑橘皮与提取次数对提取率的影响, 结果表明, 最佳提取工艺条件为料液比 1:7(W/V)、提取温度 50℃、提取时间 30min、粒径 80 目, 反复提取四次即可达到提取完全。用优化后的提取条件对不同时期、不同品种的柑橘皮以及柑橘不同组织部位的柠檬苦素含量进行研究, 结果表明槿柑橘籽中柠檬苦素的含量比槿柑橘皮中含量高很多; 湘西槿柑橘籽中柠檬苦素的含量最高; 随着槿柑橘的成熟, 柠檬苦素的含量呈下降趋势。湘西槿柑橘籽中柠檬苦素含量最高, 可达 0.0169%。

关键词:柠檬苦素; 柑橘; 超声提取; 高效液相色谱(HPLC)

Study on Ultrasonic-assisted Extraction of Limonin from Xiangxi Ponkan Peel and Analysis of Limonin Content in Ponkan at Different Growth Periods and Peel and Seed of Different Citrus Varieties

ZHANG Zhao-hui, ZHU Zhong-pin, LI Hui

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: The ultrasonic-assisted ethanol extraction technology of limonin from Xiangxi ponkan peel was optimized through orthogonal test, and the effects of particle size of peel and extraction times on the extraction rate of limonin were also investigated. The results showed that the optimal extractant, ratio of material to extractant, extraction time, temperature, particle size and times are 80% ethanol, 1:7, 30 min, 50 °C, 80 mesh and 4 times, respectively. Moreover, the contents of limonin in Xiangxi ponkan fruit at different growth periods, and peel and seed of different citrus varieties were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the content of limonin in citrus seed is great higher than that in peel, especially which in Xiangxi pokan seed is the highest (0.0169%) among all tested samples. Following with the maturation of Xiangxi pokan, the content of limonin presents a downtrend.

Key words: limonin; citrus; ultrasonic extraction; high performance liquid chromatography (HPLC)

中图分类号: O657.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0056-04

最新研究表明柑橘中的三萜类物质在抗肿瘤方面有相当好的成效, 柠檬苦素(limonin)及其类似物就是其中一类重要组分^[2-3]。柠檬苦素及其类似物在抗肿瘤、镇痛、抗炎、改善睡眠、抗病毒、抗菌、利尿、抗焦虑^[3], 调节体内胆固醇含量、防止动脉粥样硬化和除虫等方面都具有显著效果^[4-5]。日本、美国已报道了柠檬苦素类物质制作功能性食品和饮料的专利^[2-6], 柠檬苦素的应用前景极为可观。目前, 柠檬苦素主要采用热提取(煎煮法、回流提取法)、浸泡提取(渗漉法、冷浸法)及超临界萃取等提取方法从天然植物中提取, 研究人员已经成功从芸香科和楝科的多种植物中提取出柠檬

苦素及其类似物^[7-9], 然而对于热提取法和浸泡提取法这两类常规方法而言, 存在着费时、浪费溶剂、效率低、重现性差、提取效率低等不足之处^[10], 而且所用溶剂通常有毒, 易对环境和操作人员造成危害^[3-9]; 而超临界萃取虽有节省试剂、无污染等优点, 但是回收率低, 同时为了获得超临界条件, 设备的一次性投资较大、运行成本高, 而且难于萃取强极性和大分子的物质。因此, 寻找一种效率高、成本低、污染小的柠檬苦素提取工艺非常必要。

超声波提取是一种新兴的提取技术, 优化超声提取条件, 可以获得快速、高效的提取效果, 尤其对于那

收稿日期: 2008-06-26

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(08JJ4004); 湖南省教育厅优秀青年基金项目(07B061)

作者简介: 张朝晖(1977-), 男, 副教授, 博士, 主要从事天然产物有效成分分离、纯化新工艺研究。

E-mail: zhaohuizhang77@hotmail.com

些易挥发、低沸点的有效成分的提取更为适合。本实验拟采用超声辅助提取技术,以高效液相色谱为检测手段,优化从柑橘皮中提取柠檬苦素的工艺,同时确定不同品种在不同时期的柠檬苦素含量。以促进柑橘皮和籽进一步综合开发,减少污染、提高柑橘的利用价值、促进柑橘产业经济的发展,同时也为医学界抗癌药物的制备提供更多的天然原料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柑橘皮、柑橘籽、桉柑橘皮、桉柑橘籽、柚子皮、柚子籽、冰糖橙产于湘西吉首;砂糖橘产于广东。

柠檬苦素标准品中国药品检测所;乙醇、异丙醇、二氯甲烷、60~90℃石油醚、甲醇、乙酸乙酯、丙酮均为分析纯;乙腈(色谱纯);水(三级蒸馏)。

1.2 仪器与设备

KQ-250E 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; LC-2010AHT 型高效液相色谱仪 日本岛津公司; RE-210B-II 型旋转蒸发器、RE-201 型恒温水浴锅 郑州长城科工贸有限公司; FA(N)/JA(N)型电子天平 南京大学仪器厂; FZ-102 型微型植物粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; GZX-9070MBE 型数显鼓风干燥箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 柑橘中柠檬苦素的提取工艺流程

干燥的柑橘粉 $\xrightarrow{60\sim 90^{\circ}\text{C}\text{石油醚超声脱脂}}$ 脱脂粉末
 $\xrightarrow{\text{乙醇提取}}$ 乙醇提取物 $\xrightarrow{\text{减压蒸馏}}$ 浸膏 $\xrightarrow{\text{石油醚洗涤,}}$
 $\xrightarrow{\text{二氯甲烷溶解,加2倍体积异丙醇,4}^{\circ}\text{C}\text{低温结晶}}$ 无色片状晶体

1.3.2 柠檬苦素标准溶液的配制

精确称取柠檬苦素标准品 5.0mg,用乙醇溶解,定容至 25ml 容量瓶中配成 0.2mg/ml 的标准溶液,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,备用。

1.3.3 色谱条件的选择

Shimadzu VP-ODS C_{18} 色谱柱(150mm $\times$ 4.6mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(45:55, V/V); 流速为 1.0ml/min; 检测波长为 215nm; 色谱柱温度为 25℃; 进样量 20 μl 。

1.3.4 标准曲线的绘制

取柠檬苦素标准溶液分别进样 5、10、15、20、25、30、35 μl 于液相色谱仪中,检测峰面积。以进样量(X)为横坐标,峰面积(A, $\times 10^5$)为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程如下:

$$A = 8.812 X + 2.372 \quad (R=0.996)$$

1.3.5 样品溶液的制备

称取不同时期,不同品种干燥的桉柑橘皮或桉柑橘籽脱脂粉末 2g 左右,置锥形瓶中加入乙醇,超声提取,过滤收集滤液,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,备用。

1.3.6 柠檬苦素的超声提取条件优化

结合单因素和正交试验对提取温度、料液比、提取时间、乙醇浓度等因素对超声波提取柠檬苦素的影响进行探讨。所得样品溶液采用高效液相色谱进行柠檬苦素的含量分析以确定最佳提取条件。

1.3.7 粒度及其相应提取次数优化

分别采用 12、80、120 目的桉柑橘粉末在优化后的条件下用乙醇溶液重复超声提取 5 次,分别过滤收集滤液,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,对所得样品溶液进行柠檬苦素含量分析以确定最佳提取粒度及次数。

1.3.8 柠檬苦素的含量测定

称取不同时期、不同品种的 80 目柑橘皮或柑橘籽脱脂粉末 2g 左右,分别加入 14ml 浓度为 80% 的乙醇,在 50℃ 水浴中超声提取 30min,收集滤液,滤渣再加 14ml 浓度为 80% 的乙醇,在 50℃ 水浴中超声提取 30min,重复 3 次,合并滤液,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,进样 20 μl 于液相色谱中检测,检测结果与标准曲线对照,计算含量。

$$\text{样品中柠檬苦素的质量}(M) = \frac{A_2}{A_1} \times C \times V \times S$$

$$\text{柠檬苦素的含量}(\%) = \frac{M}{M_{\#}} \times 100$$

式中: A_1 为标液中柠檬苦素的峰面积; A_2 为样品溶液中柠檬苦素峰面积; C 为标液中柠檬苦素的质量浓度(mg/ml); V 为样品溶液的体积(ml); S 为样品溶液稀释倍数; $M_{\#}$ 为样品质量。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择

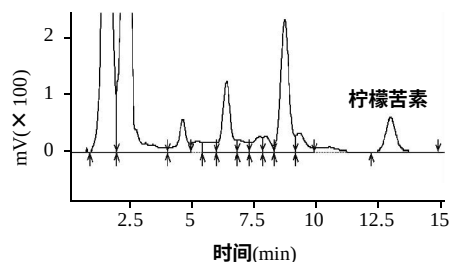


图1 液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of pokan peel

液相色谱分析中,流动相的选择很重要,正确选

择流动相才能更好地分离,检测出来的结果也更为准确。实验表明:当分别选用乙腈、水和磷酸缓冲液,乙腈、四氢呋喃和水混合液,乙腈、水和甲酸混合液,乙腈、甲醇和磷酸缓冲液为流动相时,色谱基线难以稳定;而选用乙腈和水为流动相时,通过调节改变乙腈和水的比例为45:55(V/V)时基线稳定,结果如图1所示,能有效分离槿柑橘皮的提取物。

2.2 超声提取的正交试验

采用超声波提取柑橘中的柠檬苦素时,影响提取效果的因素有很多,其中包括超声提取时间、超声频率、提取温度、料液比、提取粒度、提取溶剂等。乙醇和丙酮对柠檬苦素的提取效果较好,但由于丙酮挥发性和毒性较乙醇大,故选用乙醇作为提取溶剂^[9]。采用正交试验 $L_9(3^4)$ 优化提取温度、料液比、提取时间、乙醇浓度四个因素,确定最佳提取条件,正交试验设计如表1所示。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test on ultrasonic-assisted extraction conditions of limonin

水平	料液比(W/V)	时间(min)	乙醇浓度(%)	温度(°C)
1	1:5	20	70	40
2	1:6	30	80	50
3	1:7	40	90	60

注:其他固定提取条件为80目样品2g左右,提取1次。

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	料液比(W/V)	时间(min)	乙醇浓度(%)	温度(°C)	含量(%, $\times 10^{-2}$)
1	1:5	20	70	40	0.6151
2	1:6	30	80	40	0.6833
3	1:7	40	90	40	1.0386
4	1:5	40	80	50	0.9600
5	1:6	20	90	50	0.9765
6	1:7	30	70	50	1.4612
7	1:5	30	90	60	0.8171
8	1:6	40	70	60	0.8785
9	1:7	20	80	60	0.9053
K_1	2.3922	2.4969	2.5486	2.3370	
K_2	2.5383	2.9616	2.8322	3.3977	
K_3	3.4051	2.8771	2.9548	2.6009	
R	1.0129	0.4647	0.4062	1.0607	

由表2可知,提取温度对柠檬苦素的提取含量影响最大,在温度为50°C时柠檬苦素的提取含量最高。柠檬苦素的稳定性不高^[7],在合适的温度下,不仅能提高提取含量,又能保证柠檬苦素不被破坏,还能节省能源。料液比影响较大,在料液比为1:7的时候提取含量最高。提取时间对提取结果的影响比较小,在提取时间为30min时提取率达到最大,合适的时间不仅可以提高得率,还可以提高生产效率,带来经济效益。乙醇

浓度对柠檬苦素的提取得率影响最小,浓度越大提取得率越大,但80%和90%的提取得率相差不大,综合考虑生产成本用80%乙醇作为提取剂生产效益更好。因此超声提取柑橘中柠檬苦素的最佳工艺条件为:温度50°C、超声时间30min、提取溶剂为80%乙醇。

2.3 粒度及其相应提取次数比较

称取用过滤筛筛好的不同粒度槿柑皮脱脂粉末2g左右,加入14ml 80%乙醇作提取液,在50°C水浴中超声重复提取5次,提取时间分别为30min,分别收集滤液,用高效液相色谱进行检测并计算,结果如图3所示。

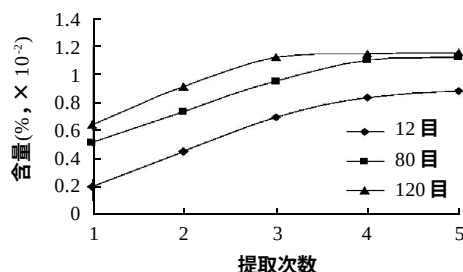


图3 不同粒度及提取次数对提取柠檬苦素的影响

Fig.3 Effects of different particle sizes and extraction times on extraction rate of limonin

由图3可知,随着柑橘皮粒度的减小,完全提取所需次数减少,提取含量增加。对于12目的样品,需要重复提取5次才差不多提取完全,80目的样品重复提取四次时基本提取完全,120目的样品仅需要提取三次就已经提取完全。在接下来的实验中选择80目的样品进行提取,这是因为容易加工,而且提取次数适中,省时省事,提取含量和120目相差不大。

2.4 不同时期槿柑橘中柠檬苦素含量分析

称取不同时期的相对提取柠檬苦素粒径为80目的粉末各2g左右,在最优提取条件下超声提取4次,最后合并所有提取溶液,用高效液相色谱进行检测并计算柠檬苦素的含量,结果如图4所示。

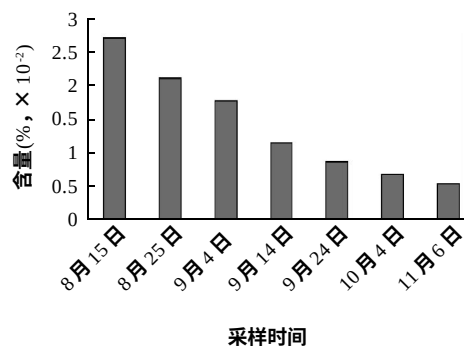


图4 不同时期柑橘中柠檬苦素含量比较

Fig.4 Comparison among limonin contents pokan fruit at different growth periods

由图4可知,随着柑橘的成熟,柑橘中柠檬苦素的含量越来越少,但降低的速度越来越慢,这是因为柠檬苦素随着柑橘的成熟逐渐转变成了柠檬苦素糖苷。柠檬苦素糖苷不但水溶性好而且没有苦味^[11],所以随着柑橘的成熟柠檬苦素的平均含量呈下降趋势,最后趋于稳定,柑橘成熟后就没那么苦。

2.5 不同品种的柑橘及柑橘不同组织部位中柠檬苦素含量分析

称取不同品种柑橘皮及柑橘不同组织部位粒径为80目粉末各2g左右,在最优提取条件下超声提取4次,合并所有滤液,用高效液相色谱进行柠檬苦素的检测并计算,结果如图5所示。

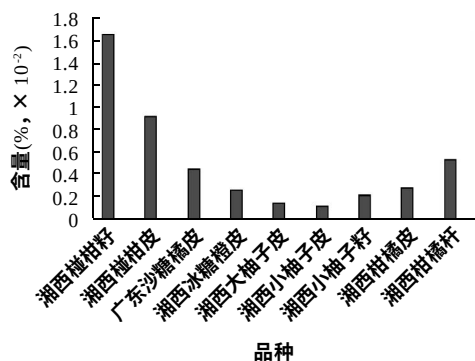


图5 不同品种柑橘及柑橘不同组织部位中柠檬苦素含量比较

Fig.5 Comparison among limonin contents in peel and seed of different citrus varieties

由图5可知,所测试的品种中,湘西椪柑籽中柠檬苦素的含量最高,为0.0169%,远高于皮中的含量,这就是平时人们在吃柑橘感觉籽特别苦的原因,而湘西小柚子皮中含量最低,仅为0.0009%。

3 结 论

本实验对超声提取柑橘中柠檬苦素的工艺条件及含量进行研究。对超声提取中的提取温度、提取时间、料液比、乙醇浓度等影响因素采用正交 $L_9(3^4)$ 设计结合单因素试验进行优化。以高效液相色谱为检测工具对其含量进行检测分析,确定最佳提取方案及分析各个柑橘品种中柠檬苦素的含量。结果表明超声提取柑橘中柠檬苦素的最佳条件为:料液比1:7,提取温度50℃,超声时间30min,提取溶剂为80%乙醇;选择80目的样品提取最合适;椪柑柑籽中柠檬苦素的含量比椪柑柑皮中含量高很多;不同柑橘品种中柠檬苦素的含量不同,湘西椪柑籽中的含量最高,为0.0169%随着椪柑的成熟,柠檬苦素的含量呈下降趋势。

参考文献:

- [1] 李永红,张毅,肖为民,等. 比色法测印楝种仁提取物中柠檬苦素类物质的含量[J]. 西南农业大学学报, 2003, 25(2): 150-152.
- [2] 方修贵,戚行江,胡安生. 柑桔果实中抗癌活性物质的研究现状和前景[J]. 综述与专题评论, 2003, 29(10): 79-82.
- [3] 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): 6-11.
- [4] 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): 157-160.
- [5] LAM L Y, HASEG K T, LAWA S. Effect of citrus limonoids on glutathione transferase activity in mice[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37: 878-880.
- [6] 田庆国,丁霄霖. 甜橙种子中柠檬苦素类化合物的提取[J]. 林产化学与工业, 1999, 19(3): 71-74.
- [7] 李福兴,王建江. 柠檬苦素类化合物的研究现状[J]. 国外医学: 中医中药分册, 2000, 22(3): 131-147.
- [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] 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): 74-88.
- [10] 盛占武,孙志高,黄学根,等. 超滤法提取橙皮苷工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 188-191.