

响应面分析法优化超临界二氧化碳萃取 橘皮中类柠檬苦素工艺

曾祥燕, 赵良忠*

(邵阳学院生物与化学工程系, 湖南 邵阳 422200)

摘要: 研究利用超临界二氧化碳萃取橘皮中类柠檬苦素工艺, 考察萃取时间、萃取温度、萃取压力和夹带剂用量对类柠檬苦素提取量的影响, 采用响应面设计, 以类柠檬苦素提取量为响应值进行考察。结果表明: 4个因素对类柠檬苦素提取量的影响大小次序为时间>萃取压力>萃取温度>夹带剂用量; 通过对模型进行分析, 得出提取类柠檬苦素的最佳工艺条件为萃取时间 2h、萃取温度 50℃、萃取压力 30MPa、夹带剂用量 1.51mL/g, 在此条件下, 类柠檬苦素的提取量为 54.26mg/kg, 而实际提取量为 53.87mg/kg, 回归方程的预测值和试验值无显著性差异。所得回归模型拟合情况良好, 能很好地反应实际情况。

关键词: 类柠檬苦素; 工艺; 优化; 响应面; 超临界二氧化碳

Application of Response Surface Methodology to Optimize Extraction Process for Nomilin from Orange Peel with Supercritical Carbon Dioxide

ZENG Xiang-yan, ZHAO Liang-zhong*

(Department of Biology and Chemical Engineering, Shaoyang University, Shaoyang 422000, China)

Abstract: In the extraction of nomilin from orange peel with supercritical CO₂, four operating parameters including time, temperature, pressure and entrainer (anhydrous ethanol) amount that affect extraction yield of nomilin were investigated using response surface methodology (RSM). A mathematical model describing the relationship between them was set up. The operating parameters could be ranked in decreasing order of influence as follows: time, pressure, temperature and entrainer amount. Response surface analysis of the developed model showed that the optimal extraction conditions were 2 h, 50 °C, 30 MPa and 1.51 mL/g entrainer amount. Under the conditions, the predicted and experimental extraction yields of nomilin were 54.26 mg/kg and 53.87 mg/kg, respectively, showing no significant difference. Moreover, the experimental data were well fitted with the developed model.

Key words: nomilin; process; optimization; response surface methodology; supercritical carbon dioxide

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0065-05

柑橘为芸香科柑橘属(*Citrus*)植物, 以柠檬柚、葡萄柚、甜橙、宽皮橘为主要栽培品种^[1], 柑橘皮中的主要功能性成分包括香精油、橘皮色素、果胶、膳食纤维、黄酮类化合物以及类柠檬苦素等六大种类。柠檬苦素类似物主要存在于芸香科和楝科植物中, 是一类三萜类的物质, 是植物次生代谢产物之一, 在柑橘属类中含量最为丰富^[2], 是引起柑橘汁苦味的重要原因之一, 从柑橘中分离出的含量较丰富的柠檬苦素类似物为

柠檬苦素、诺米林、奥巴叩酮、柠檬苦素糖苷和诺米林糖苷等。类柠檬苦素配糖体具有很大的开发利用价值, 可作功能性食品的基础原料用于加工多种功能性食品。有资料显示, 类柠檬苦素化合物还具有广泛的生物学活性, 如作为昆虫的杀虫剂、昆虫拒食剂、昆虫生长调节剂, 另外还具有抗癌、镇痛、抗炎、抑菌等其他药理活性^[3-4]。柠檬苦素类化合物在抗癌、镇痛、调节体内胆固醇水平、防止动脉粥样化和除虫等方面的

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: 湖南省教育厅一般研究项目(10C1190)

作者简介: 曾祥燕(1974—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zengxiangyan8@163.com

* 通信作者: 赵良忠(1963—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: sys169@163.com

作用,越来越受到人们的重视^[5-6]。加工处理过程会使柠檬苦素类化合物的结构发生变化,甚至造成活性丧失。影响柠檬苦素类物质活性和稳定性的主要因素有温度、pH值以及与光和空气接触的时间等^[7],在45~80℃范围内,柠檬苦素类物质的降解速率依次升高,80℃条件下每天的解速率是45℃条件下的1.4倍,当pH值大于7.5时,会出现C₁₇位打开,并结合阳离子,使原有的结构发生变化,因此在加工处理过程中要严格控制温度和pH值等因素,防止柠檬苦素类物质结构的变化^[8]。

目前提取分离类柠檬苦素的方法主要是有机溶剂提取法^[9-10]、水抽提法^[11]、离子交换法^[12]、超声提取法^[13-14]和超临界CO₂法^[15-16]等。本实验运用超临界CO₂法对柑橘皮中类柠檬苦素进行提取,因类柠檬苦素在高温和高pH值的条件下不稳定,并对其提取的工艺参数进行优化,得出类柠檬苦素的最适提取工艺,为柑橘皮类柠檬苦素的开发提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

柑橘果皮:取洁净的市售柑橘100kg,剥皮。

无水乙醇、浓硫酸、氯化铁、对二甲氨基苯甲醛(DMAB)均为分析纯;柠檬苦素标准样品 美国Sigma-Aldrich公司;显色液(Ehrlich试剂):A液:准确称取125mg对二甲氨基苯甲醛溶于100mL的浓硫酸和乙醇混合液(浓硫酸65mL、乙醇35mL,放冷使用)中;B液:准确称取氯化铁9.0g,用蒸馏水溶解并定容至100mL,使用时A液中加入0.5mL的B液,现用现配。

UV-2100分光光度计 北京莱伯泰科仪器有限公司;AUY 220电子分析天平 日本Shimadzu公司;FY-121-50-01超临界萃取装置 南通市飞宇科技开发有限公司;202-1A电热恒温鼓风干燥箱 上海东星建材试验设备有限公司;FSJ-114植物标本粉碎机 浙江省德清县雷甸通用机械设备厂。

1.2 方 法

1.2.1 样品处理

将柑橘果皮置于真空干燥箱中干燥,按照GB/T 5009.3—2003《食品中水分的测定》对材料水分进行测定,达到超临界萃取的物料要求即可。用粉碎机将干燥好的橘皮进行粉碎,取过60目筛的橘皮粉作为柑橘皮样品,每次萃取量为200g,其余保存于干燥器中备用。

1.2.2 操作过程

开冷循环和制冷机,对冷箱进行降温;在萃取罐中装入柑橘皮样品200g,关闭所有出口阀;通入CO₂,调节稳压阀,使温度和压力达到规定值;设定分离的温度和压力分离器温度50℃、压力5.0MPa;开动副泵,按照实验要求,加入相应量的夹带剂(无水乙醇)。

1.2.3 测定方法

1.2.3.1 柠檬苦素最大吸收波长的考察

准确称取柠檬苦素标准样品25.0mg,溶于无水乙醇转移至100mL容量瓶并定容至100mL,配制成250μg/mL的标准溶液。取1.00mL柠檬苦素标准溶液,加入无水乙醇1.0mL,再加入5mL显色液,摇匀,静置60min,在波长340~640nm范围内进行扫描,扫描结果如图1所示。从图1可以看出,在波长500nm处左右有最大吸收峰,所以选择500nm作为检测波长^[17]。

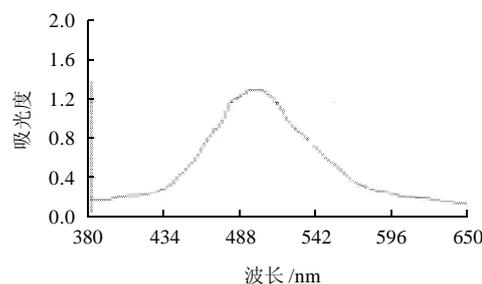


图1 柠檬苦素扫描光谱图

Fig.1 UV-visible scanning spectrum of nomilin standard

1.2.3.2 柠檬苦素标准曲线方程的得出

分别取0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0mL标准溶液于10mL试管中,并分别加入无水乙醇2.0、1.6、1.2、0.8、0.4、0.0mL,再分别加入5.0mL显色液,摇匀,静置60min后于检测波长处测其吸光度,以无水乙醇为空白溶液作参比。根据测得的结果采用直线回归方法得出标准曲线的回归方程,以加入标准样品的质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得到柠檬苦素在质量浓度为0~250μg/mL范围内的标准曲线方程为 $y = 0.0052x + 0.0066 (R^2 = 0.9976)$ 。

1.2.3.3 类柠檬苦素含量的测定

取真空干燥后的萃取物以无水乙醇溶解并定容至25mL。取萃取物溶液2mL,分别加入5mL显色剂显色60min,于最大吸收波长处测定吸光度。根据柠檬苦素的标准曲线,按式(1)计算萃取物中的类柠檬苦素含量。

$$m_1 = \frac{25 \times C}{1000} \quad (1)$$

式中: m_1 为萃取物中的类柠檬苦素含量/mg; C 为检测吸光度所对应的类柠檬苦素质量浓度/(μg/mL)。

1.2.4 萃取工艺中心旋转组合试验设计

根据预试验,选取时间、压力、温度和夹带剂用量为自变量,以柠檬苦素萃取量为响应值,进行试验设计^[18],共30个试验,因素水平编码见表1。

表1 萃取工艺中心旋转组合试验设计因素水平编码表

Table 1 Coded and corresponding actual values of the optimization parameters used in central composite rotary design (CCRD)

因素	代码		水平				
	未编码	已编码	-2	-1	0	1	2
时间/h	X ₁	x ₁	0.5	1	1.5	2	2.5
萃取温度/°C	X ₂	x ₂	35	40	45	50	55
萃取压力/MPa	X ₃	x ₃	15	20	25	30	35
夹带剂用量/(mL/g)	X ₄	x ₄	0.5	1	1.5	2	2.5

注: x₁=(X₁-1.5)÷0.5; x₂=(X₂-45)÷5; x₃=(X₃-25)÷5; x₄=(X₄-1.5)÷0.5。

1.2.5 模型的验证

通过响应面分析法优化超临界二氧化碳萃取橘皮中类柠檬苦素的萃取条件,在优化条件下萃取类柠檬苦素,通过比较预测值和实验值验证模型的有效性。

2 结果与分析

2.1 纤维提取回归模型的建立

表2 萃取工艺响应面试验设计和结果

Table 2 CCRD layout and experimental results

试验号	萃取时间/h	萃取温度/°C	萃取压力/MPa	夹带剂用量/(mL/g)	萃取量/(mg/kg)
1	0	0	-2	0	39.41
2	-1	1	-1	-1	41.15
3	1	-1	-1	0	46.13
4	0	0	0	0	50.12
5	-1	-1	-1	1	42.52
6	2	0	0	0	48.73
7	1	1	-1	1	49.72
8	-1	1	1	-1	45.89
9	-1	1	-1	1	45.05
10	0	0	0	0	47.11
11	0	0	0	0	46.20
12	-1	1	1	1	54.48
13	0	0	0	-2	38.41
14	1	1	1	-1	47.84
15	-2	0	0	0	43.93
16	1	1	-1	-1	44.26
17	1	-1	1	1	49.52
18	0	0	0	0	50.21
19	1	1	1	1	53.27
20	0	-2	0	0	42.40
21	1	-1	1	-1	44.20
22	0	0	0	2	50.23
23	0	0	0	0	50.29
24	-1	-1	1	1	48.23
25	0	0	0	0	50.08
26	-1	-1	1	-1	43.04
27	-1	-1	-1	-1	36.69
28	0	0	2	0	49.81
29	0	2	0	0	50.41
30	1	-1	-1	-1	42.25

本实验采用响应面法进行试验设计,在此基础上建立超临界二氧化碳萃取橘皮中类柠檬苦素的模型,试验设计和响应值见表2。

利用 Design Expert 软件,通过响应面试验进行向后回归分析,将差异不显著性的因素剔除,得出水溶性膳食纤维提取率的回归模型二次方程为:

$$Y = 49.00 + 2.80x_1 + 1.88x_2 + 2.48x_3 + 1.24x_4 - 0.86x_3x_4 - 1.09x_1^2 - 0.57x_2^2 - 1.02x_3^2 - 0.59x_4^2 \quad (2)$$

2.2 回归模型方差分析及各自变量对响应值的影响

表3 响应面试验结果方差分析表

Table 3 Analysis of variance for CCRD experimental results

方差来源	总和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	527.97290	9	58.66366	42.12493	< 0.0001	***
x ₁	188.38407	1	188.38407	135.27398	< 0.0001	***
x ₂	84.75042	1	84.75042	60.85720	< 0.0001	***
x ₃	147.51042	1	147.51042	105.92361	< 0.0001	***
x ₄	36.85282	1	36.85282	26.46310	< 0.0001	***
x ₃ x ₄	11.83360	1	11.83360	8.49742	0.0086	**
x ₁ ²	32.67514	1	32.67514	23.46322	< 0.0001	***
x ₂ ²	8.91806	1	8.91806	6.40384	0.0199	*
x ₃ ²	28.47843	1	28.47843	20.44966	0.0002	**
x ₄ ²	9.51420	1	9.51420	6.83191	0.0166	*
残差	27.85223	20	1.39261			
失拟项	10.89114	15	0.72608	0.21404	0.9910	
纯误差	16.96108	5	3.39222			
总和	555.82512	29				

注:***.差异极显著, P < 0.001; **.差异高度显著, P < 0.01; *.差异显著, P < 0.05。

由表3可知,本研究模型极显著(P < 0.0001),失拟性不显著,表明方程能有很好的拟合性。x₁、x₂、x₃、x₄和x₁²对类柠檬苦素的提取量有极显著影响,x₃x₄和x₃²对类柠檬苦素的提取量有高度显著影响,x₂²和x₄²对类柠檬苦素的提取量有显著影响。从F值的大小可以看出,各因素对类柠檬苦素的提取量影响的大小依次为x₁、x₃、x₂、x₄。为了形象地描述各因素对类柠檬苦素的提取量的影响,绘出各因素的响应面曲面图见图2。由图2a~2c可以看出,类柠檬苦素的提取量随着提取时间的延长而增加,但趋势变得越来越平缓,说明提取时间有个极限点,提取时间约达到2h后,类柠檬苦素的提取量没有明显增加,同时图2a~2c还表明时间比其他3个因素的影响都明显。

由图2a、2d和2e可以看出,类柠檬苦素的提取量随温度的升高而增加,温度对萃取物蒸汽压的影响,随着温度升高,萃取物蒸汽压增大,其扩散系数和传质系数都会增大,导致萃取得率增高,温度相对于提取压力而言,其对类柠檬苦素的提取量影响较小,曲

面较平缓;温度相对于夹带剂用量而言,其对类柠檬苦素的提取量影响较大,曲面较陡,萃取温度约达到 50°C ,类柠檬苦素的提取量没有明显增加,这主要是由于以下两方面的原因:一是随着温度升高, CO_2 流体的密度下降,导致其溶剂化的功能下降,使萃取物的溶解度下降,结果萃取得率降低;二是类柠檬苦素是热不稳定物质,在温度超过 50°C 是会发生分解。由图2b、2d和2f可以看出,类柠檬苦素的提取量随压力的增大而增加,在超临界萃取过程中,萃取压力是影响萃取得率的重要因素,它对超临界流体的密度、黏度和扩散系数的影响较大。萃取压力的增加导致超临界流体密度增大,从而使溶解力增强,提高萃取得率^[20],压力的影响比温度大、比夹带剂用量也大;萃取压力约达到 30MPa ,类柠檬苦素的提取量没有明显增加。由图2b、2d和2f可以看出,类柠檬苦素的提取量随夹带剂用量的增加而增加,夹带剂相对于其他几个因素,影响最小;当夹带剂用量约达到 1.5mL/g 时候,类柠檬苦素的提取量没有明显增加,其提取量的增加速度变慢,这主要由于一方面乙醇在超临界萃取三萜类化合物起到了提携作用,另一方面过多的乙醇会使超临界流体 CO_2 饱和,导致萃取效果不会随乙醇量的增加而明显改善甚至导致下降。

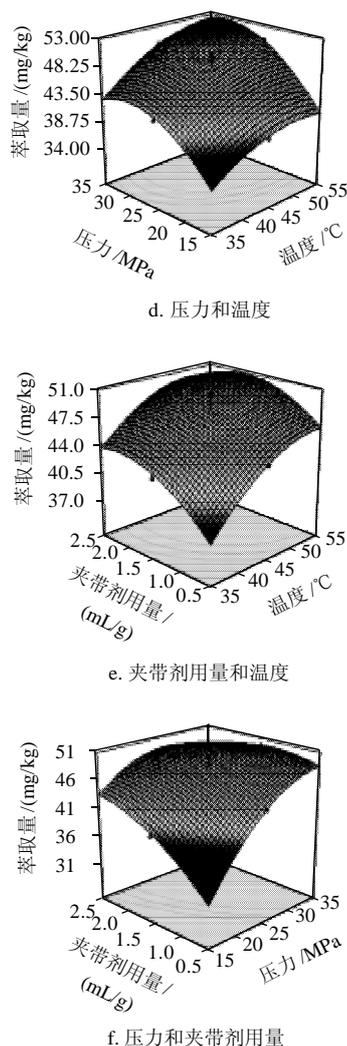
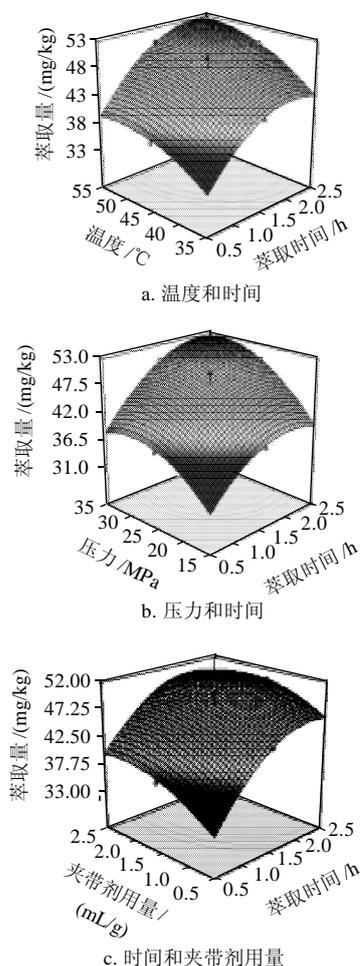


图2 各两因素交互作用对类柠檬苦素提取量影响的响应面图
Fig.2 Response surface plots showing the interactive effects of the studied variables on extraction yield of nomilin

2.3 预测值与实验值的拟合程度和回归模型的验证

模拟的拟合程度好坏由拟合系数决定,一个良好的拟合模型,拟合系数至少为 0.80 以上^[19]。有图3可得,本实验的模型的拟合系数为 0.9499 ,这表明 94.99% 的变量可以通过该模型来解释。

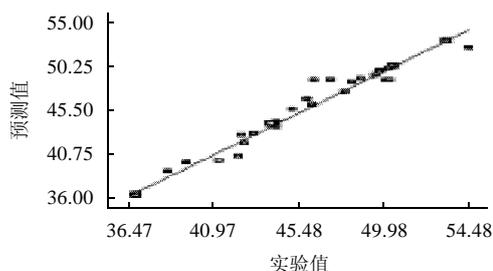


图3 预测值与实验值的对应关系
Fig.3 Good agreement between predicted and experimental extraction yields of nomilin under optimized process conditions

通过该回归模型,采用软件对各因素进行优化,得出化超临界二氧化碳萃取橘皮中类柠檬苦素的最佳工艺条件为萃取时间2h、萃取温度50℃、萃取压力30MPa、夹带剂用量1.51mL/g,在此条件下,类柠檬苦素的提取量为54.26mg/kg,而实际提取量为53.87mg/kg,理论值与实际值之间的相对误差为0.72%,差异不显著,符合实验要求。

3 结 论

3.1 超临界CO₂萃取技术提取橘皮中的柠檬苦素类似物,该法具有步骤简单、选择分离效果好,有利于类柠檬苦素等热敏性物质的萃取;考察萃取时间、萃取温度、萃取压力和夹带剂用量对类柠檬苦素提取量的影响,影响的大小次序为:时间>萃取压力>萃取温度>夹带剂用量。

3.2 采用响应面试验设计向后回归的方法,得出超临界二氧化碳萃取橘皮中类柠檬苦素的模型为 $Y = 49.00 + 2.80x_1 + 1.88x_2 + 2.48x_3 + 1.24x_4 - 0.86x_3x_4 - 1.09x_1^2 - 0.57x_2^2 - 1.02x_3^2 - 0.59x_4^2$,回归系数为0.9499,预测值与实际值有较好的拟合性。

3.3 利用回归模型,得出最佳工艺条件为萃取时间2h、萃取温度50℃、萃取压力30MPa、夹带剂用量1.51mL/g,在此条件下,类柠檬苦素的提取量为54.26mg/kg,而实际提取量为53.87mg/kg,理论值与实际值之间的相对误差为0.72%,差异不显著,符合实验要求。

参 考 文 献:

[1] 何天富. 柑橘学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
[2] 罗水忠, 潘利华. 柠檬苦素类似物的研究与应用进展[J]. 综述与述评, 2008, 11(1): 4-7.
[3] 赵雪梅, 费洪荣, 王桂玲. 柑桔属中柠檬苦素类化合物研究进展[J].

中国药房, 2007, 18(36): 2860-2862.
[4] SUN Chongde, CHEN Kunsong, CHEN Yang, et al. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilinin different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation[J]. Food Chemistry, 2005, 93(4): 599-605.
[5] LAM L Y, HASEG K T, LAWA S. Effect of citrus limonoids on glutathione S-transferase nativity in mice[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37(4): 878-880.
[6] 蔡护华, 桥永文男. 柑桔果实中柠檬苦素类化合物的研究现状与展望[J]. 植物学报, 1996, 38(4): 326-328.
[7] JITPUKDEEBODINTRA S, CHANTACHUM S, RATANAPHAN A. Stability of limonin from lime seeds[J]. Environ Agric Food Chem, 2005, 4(3): 30-38.
[8] 唐传核, 彭志英. 柑橘类的功能性成分研究概况[J]. 四川食品与发酵, 2004(4): 1-7.
[9] KHALILA A T, MAATOOQ G T, EL SAYED K A. Limonoids from *Citrus reticulata*[J]. Z Naturforsch, 2003, 58(3/4): 165-170.
[10] ISHII T, OHTA H, NOGATA Y. Limonoids in seeds of Iyo tangor[J]. Food Sci Technol Res, 2003, 9(2): 62-164.
[11] SAWABE A, MORITAB M, KISO T, et al. Isolation and characterization of new limonoid glycosides from *Citrus unshiu* peels[J]. Carbohydrate Research, 1999, 315(1): 142-147.
[12] 王辉, 徐环昕, 寇正福, 等. 吸附树脂分离纯化柚核中的柠檬苦素[J]. 离子交换与吸附, 2010, 26(3): 256-263.
[13] 孙崇德, 陈昆松, 陈青俊, 等. 柑橘果实中天然柠檬苦素和诺米林的提取、鉴别与检测[J]. 中国食品学报, 2004, 4(1): 6-10.
[14] 黎继烈, 张慧, 曾超珍, 等. 超声波辅助提取金橘柠檬苦素工艺研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 96-101.
[15] YU Jun, DANDEKAR D V. Supercritical fluid extraction of limonoid glucosides from gapefruit molasses[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(16): 6041-6045.
[16] 莫彬彬, 连宾, 万固存, 等. 超临界CO₂分步萃取花椒香气和麻味物质的初步研究[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 201-203.
[17] 田庆国, 丁霄霖. 测定橘核中柠檬苦素类似物的分光光度法[J]. 分析测试学报, 1999, 18(5): 45-47.
[18] 王钦德, 杨坚. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
[19] 甘露露, 邓泽元, 范亚苇, 等. 响应曲面法优化超临界二氧化碳萃取荷叶复方活性组分的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 208-214.