

常山胡柚果皮精油提取工艺模型筛选优化、 化学成分及抗氧化活性研究

江丽洁[†], 温乐乐[†], 石佳艺, 邓雅慧, 刘巨钊, 袁强*, 崔琦*

浙江中医药大学药学院, 杭州 311402

摘要: 研究常山胡柚果皮 (*Citrus × aurantium* Changshan-huyou pericarp, CP) 精油化学成分, 并对提取条件进行优化。采用水蒸气蒸馏法提取 CP 精油, 利用气相色谱-质谱法进行分析, 通过单因素试验考察不同提取条件对提取率的影响, 并利用响应面、人工神经网络进行工艺优化。结果表明, CP 精油中主要成分为 *D*-柠檬烯; 最佳工艺条件: 粒径 24 目、蒸馏水浸泡 1 h、液固比 34.86 mL/g、提取温度 300.00 °C、提取时间 166.21 min, 在此条件下, CP 精油提取率为 0.82%, 响应面与人工神经网络相结合, 可有效地利用已有数据对目标寻优。同时 CP 精油对 DPPH 自由基有明显的清除作用 (IC_{50} 值为 65.01 mg/mL), 表明 CP 精油具有一定的抗氧化活性。

关键词: 常山胡柚; 精油; 水蒸气蒸馏法; 响应面优化; 人工神经网络

中图分类号: TQ654.2; O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2024) 7-1101-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.7.001

Screening and optimization of essential oil extraction process model of *Citrus × aurantium* Changshan-huyou pericarp and its chemical constituents and antioxidant activity

JIANG Li-jie[†], WEN Le-le[†], SHI Jia-yi,
DENG Ya-hui, LIU Ju-zhao, YUAN Qiang*, CUI Qi*

School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

Abstract: This study aims to study the chemical constituent of essential oil from *Citrus × aurantium* Changshan-huyou pericarp (CP) and optimize the extraction conditions. The essential oil constituents in CP were extracted by steam distillation, and GC-MS was applied to qualitatively analyze the chemical constituents of essential oil in CP. The single-factor test was used to investigate the effect of different extraction conditions on the extraction yield of essential oil. Response surface methodology optimization and artificial neural network were used to screen the optimal extraction process of essential oil. The results showed that the main constituents in CP essential oil was *D*-limonene. The optimal technological parameters were as follows: particle size of 24 mesh, distilled water soaking for 1 h, liquid-solid ratio 34.86 mL/g, extraction temperature 300.00 °C, extraction time 166.21 min, under these conditions, the extraction yield of the essential oil was 0.82%. The combination of response surface methodology and artificial neural network can effectively optimize the target by using the existing data. Meanwhile, CP essential oil possessed significant scavenging ability on DPPH free radical (IC_{50} value = 65.01 mg/mL), indicating that CP essential oil had a certain degree of antioxidant activity.

Key words: *Citrus × aurantium* Changshan-huyou; essential oil; steam distillation; response surface methodology optimization; artificial neural network

收稿日期: 2024-04-19 接受日期: 2024-06-20

基金项目: 国家自然科学基金 (82204552); 浙江省自然科学基金 (LQ24H280009); 浙江中医药大学科研项目 (2022JK ZKTS10); 浙江省大学生新苗人才计划 (2023R410043)

[†] 共同第一作者

* 通信作者 E-mail: Yuanqiang0825@sina.com, zemucq@163.com

常山胡柚 (*Citrus aurantium* Changshan-huyou) 是芸香科柑橘属植物, 主产于浙江省常山县, 生于耐瘠、耐寒、低丘、缓坡的红壤地带, 其栽培选育历史至今已有百余年之久。作为药食同源植物, 常山胡柚的果皮、果实均可作为药用部位, 《本草纲目》记载:

“柚(气味)酸、寒,无毒,有消食、鲜酒毒、治饮酒口气,去肠胃恶气、疔妊不思食、口淡之功能”^[1]。浙江省常山县作为我国常山胡柚的主产区,所产的常山胡柚品质最佳、功效上好。而常山胡柚因其富含氨基酸、糖类、维生素等营养成分,除作为水果之外,在饮料、食品加工行业也深受欢迎^[2]。常山胡柚生产加工的主要副产品为常山胡柚果皮(*Citrus × aurantium* Changshan-huyou pericarp, CP),约占整个常山胡柚重量的50%,大部分作为废渣处理而未得到充分利用,且有研究证明常山胡柚的果皮中含有丰富的挥发油类成分,约占果皮鲜重的0.5%~2.0%^[3]。这些挥发性成分具有显著的抗炎、抗菌、抗氧化作用,可作为食品添加剂、香料香精和天然防腐剂等的来源^[4]。因此,对CP的深入研究与开发具有重要意义。

中药提取方法是驱动中药行业发展的源动力。而植物挥发油的传统提取方法包括水蒸气蒸馏法、微波提取法、有机溶剂萃取法、压榨法、超临界CO₂萃取法、亚临界流体萃取法、酶解法等。目前从CP中提取精油多采用水蒸气蒸馏法,该提取方法成本低、操作简单且无污染,是CP精油最常用的提取方法^[5]。根据现有研究结果,发现水蒸气蒸馏法提取CP精油的提取率大致在0.4%~1.28%,这与常山胡柚品种、产地和提取条件有关^[6]。水蒸气蒸馏法现已广泛用于植物精油提取,是药食同源植物挥发油提取的首选方法。此外有少部分研究采用压榨法、有机溶剂萃取法、超临界CO₂萃取法等提取CP精油,其中压榨法操作周期长、出油率低;有机溶剂萃取法虽然提取率较高,但有机溶剂与精油难分离,导致精油纯度不高,且有机溶剂普遍沸点较低,危险系数极高;超临界CO₂萃取法成本高^[7]。

本研究以CP为原料,采用水蒸气蒸馏法提取CP精油,通过单因素实验,应用响应面法(response surface methodology, RSM)和人工神经网络(artificial neural network, ANN)优化精油提取工艺,并采用气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)对其化学成分进行分析,以期对CP精油的提取应用提供理论基础,为CP精油的理化性质研究及综合开发资源化利用提供技术及理论依据。

1 材料与方

1.1 药材

常山胡柚采自浙江省衢州市常山县青石镇(地理坐标为118°41'51"~118°56'50"E, 28°49'47"~29°

11'49"N),并由浙江中医药大学秦路平教授鉴定为芸香科柑橘属常山胡柚 *Citrus aurantium* Changshan-huyou 的成熟果实。剥取果皮,阴干处理,用于后续实验。

1.2 仪器与试剂

WF-1000A 多功能粉碎机(常州市金坛友联仪器研究所);FA2204B 分析天平(上海佑科仪器仪表有限公司);10、24、50 目标准检验筛(绍兴市上虞华丰五金仪器有限公司);ZNHW-5 000 mL 恒温加热套(上海力辰邦西仪器科技有限公司);SHB-III A 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);GCMS-QP2010 Ultra 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司)。

乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);无水硫酸钠(分析纯,天津市永大化学试剂有限公司);氯化钠、氢氧化钠、盐酸(分析纯,华东医药股份有限公司器材试剂分公司);DPPH(纯度>99%,批号:BCBM125V,德国Sigma-Aldrich公司);维生素E(纯度≥99%,批号:T834623-100 mg,杭州豪达化工科技有限公司)。

1.3 精油提取及条件优化

根据《中华人民共和国药典》(2020版)规定的挥发油测定方法提取。准确称取100 g干燥CP粉末置于5 000 mL蒸馏烧瓶中,加入2 500 mL蒸馏水浸泡,采用水蒸气蒸馏法提取CP精油。将油水混合液收集到2 mL微管中,静置后分层,加入适量无水硫酸钠固体干燥,用移液枪将CP精油吸出。采用减重法称取3次重复实验收集的CP精油的质量,并按照公式(1)计算提取率(Y)。

$$Y = M_1 \div M_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中, M_1 为提取后精油的质量,g; M_2 为经过处理之后的粉末干重,g。

1.3.1 粒径筛选

采用筛分法检测粉末粒度分布:将阴干CP粉碎,分别过10、24、50目筛,得到对应三种不同粒径的CP粉末,密封保存。考察不同粒径CP粉末的精油提取率:称取不同粒径CP粉末各100 g,在温度为250℃,液固比25 mL/g,蒸馏水浸泡60 min的条件下提取120 min。

1.3.2 预处理筛选

称取24目CP粉末各100 g,控制温度不变,在液固比为25 mL/g条件下提取1 h,考察不同预处理条件对CP粉末精油提取率的影响。分别采用蒸馏水不浸泡或浸泡1 h、3%氯化钠溶液不浸泡或浸泡

1 h、以药材量 5% 的氢氧化钠溶液浸泡 1 h、以药材量 5% 的盐酸溶液浸泡 1 h、200 W 超声 30 min 或 10 min 处理等 8 种预处理方法,以考察不同预处理方式对 CP 精油提取率的影响。

1.3.3 单因素试验

对 CP 精油提取过程中的提取时间(30、60、90、120、150、180 min)、提取温度(150、200、250、300、350 ℃)、液固比(15、20、25、30、35 mL/g)三个条件进行单因素考察,计算不同提取条件下 CP 精油提取率,筛选出最佳的提取条件。

表 1 BBD 实验设计的因素水平

Table 1 Factor levels of BBD experimental design

水平 Level	因素 Factor		
	A:提取时间 Extraction time (min)	B:提取温度 Extraction temperature (°C)	C:液固比 Liquid-solid ratio (mL/g)
-1	120	250	25
0	150	300	30
1	180	350	35

1.3.5 人工神经网络

ANN 具有很强的机器学习和容错能力,能通过计算预测值与实测值之间的误差,逐层修改权值,多次重复训练,使误差达到最小。在本研究中,ANN 主要应用于 CP 精油提取过程中的实验优化部分。本实验将 BBD 实验得到的 17 组数据训练 ANN,以提取时间、提取温度、液固比 3 个节点作为 ANN 输入层的神经元,以 CP 精油提取率作为输出层,应用 Matlab 软件(R2016a 版)神经网络工具箱,设置 RSM 试验中 11 组数据作为训练样本,3 组数据作为验证样本,剩余 3 组数据作为测试样本。在本实验中,输入层和输出层的神经元数目由 BBD 数据所决定,所以隐藏层神经元的数目成为影响模型精确度的主要因素,因此需要对隐藏层的层数进行优化。其中设置 70% 实验数据为训练集(training set),15% 的数据为验证集(validation set),15% 的数据为测试集(test set)。隐藏层神经元数量可根据 Kolmogorov 定理确定,即 n_2 为隐藏层神经元数目, n_1 为输入层节点数目, m 为输出层节点数目, a 为 1~10 之间的常数。经测试发现隐藏层神经元数达到 8 时,网络训练精度满足要求,训练算法选择软件默认的 Levenberg-Marquardt。通过遗传算法对 ANN 模型进行寻优,设置最大迭代次数 200,种群规模 20,交叉概率 0.75。

1.3.4 响应面优化

根据单因素实验结果,采用 Box-Behnken Design (BBD) 试验设计与 RSM 相结合对水蒸气蒸馏法提取 CP 精油的相关参数进行系统优化。根据上述单因素实验结果选取对提取率影响较为显著的三个因素:提取时间(A)、提取温度(B)和液固比(C)进行了三因素三水平的 BBD 实验及响应面的分析,实验设计的因素水平见表 1。实验结果用统计软件 Design-Expert 8.0.6 进行数据分析处理,并制作三维响应面图。

1.4 GC-MS 分析

采用 GC-MS 对 CP 精油的化学成分进行分析。

GC 条件:色谱柱 HP-5MS(30 mm × 0.25 mm × 0.25 μm),柱初温 60 ℃,保留 2 min 后,以 10 ℃/min 速率升温至 100 ℃,保留 2 min,再以 50 ℃/min 速率升温至 150 ℃,保留 5 min,再以 20 ℃/min 升温至 200 ℃,最后以 40 ℃/min 升温至 260 ℃。进样口温度 230 ℃,载气 N₂,载气流量 1.0 mL/min,不分流,进样量 1 μL。

MS 条件:EI 离子源,电离能源 70 eV,扫描范围 m/z 50~500 amu,离子源温度 230 ℃,接口温度 280 ℃,溶剂延迟 3.5 min。

1.5 抗氧化活性测定

使用 DPPH 自由基还原法测定 CP 精油的抗氧化活性,并与维生素 E 的抗氧化活性进行比较^[8]。将 100 μL 不同浓度的 CP 精油乙醇溶液与 100 μL 0.004% 的 DPPH 乙醇溶液加入到 5 mL EP 管中混合。摇动混合物并在室温下在黑暗中反应 1.5 h,采用紫外分光光度计在 517 nm 处测量溶液的吸光度,然后按照公式(2)计算 DPPH 自由基清除率(S)。

$$S = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_0 为 100 μL 乙醇与 100 μL DPPH 乙醇溶液混合后的吸光度; A_1 为 100 μL CP 精油乙醇溶液

与 100 μL DPPH 乙醇溶液混合后的吸光度。

1.6 物理性质检测

为了研究 CP 精油部分物理性质,分别根据 GB/T 11540-2008、GB/T 5527-2010、GB/T 11538-2006 对提取精油的相对密度、折光系数、pH 进行测定^[7]。

1.7 统计分析

所有实验均重复 3 次,使用 MS Excel 进行数据处理与模型比较,使用 Design-Expert 8.0.6 软件绘制响应面图,使用 Origin Pro 2021 软件绘制其余图片,使用 IBM SPSS Statistics 27 对数据进行显著性分析,使用 MATLAB 完成人工神经网络代码编写及相关优化。

2 结果与分析

2.1 粒径粉碎与筛选结果

如图 1A 所示为 CP 粉末的平均粒径质量分布图。粉碎后得到的 24 目粉末最多,其质量百分数为 36.57%。如图 1B 所示,10、24 和 50 目 CP 粉末的精油提取率分别为 0.16%、0.22% 和 0.06%,可以发现当 CP 粉末粒径大小为 24 目时 CP 精油提取率最高。可能是由于在较细的颗粒内部,溶剂的浸提作用相对增强,提取率也相对提高,而粉末过小则导致颗粒表面积增大,表面吸附能力随之增强,从而不利于精油提取^[9]。因此后续研究中均采用 24 目 CP 粉末进行实验。

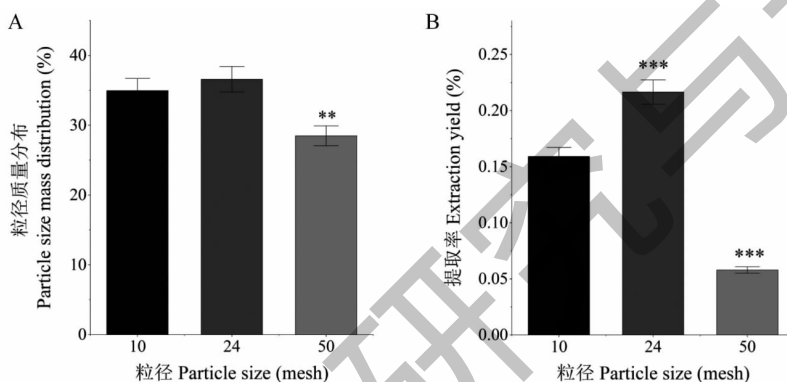


图 1 粉末的粒径质量分布 (A) 与不同粒径精油提取率 (B)

Fig. 1 The particle size mass distribution of powder (A) and the extraction yield of essential oil with different particle sizes (B)

注:与 10 目组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with the 10 mesh group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

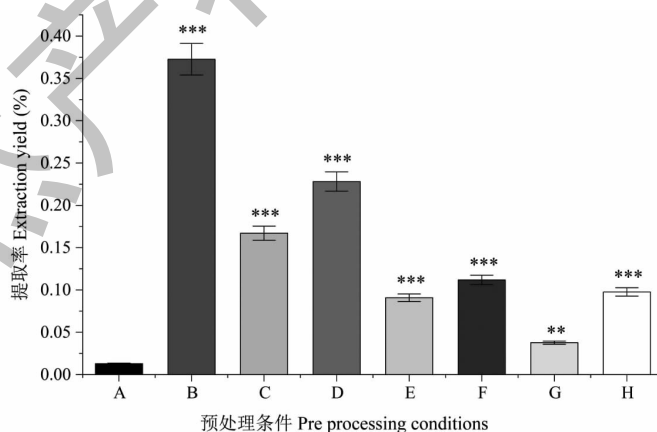


图 2 不同预处理条件下 CP 精油提取率

Fig. 2 Extraction yield of essential oil in CP under different pretreatment conditions

注:A:蒸馏水不浸泡;B:蒸馏水浸泡;C:3%氯化钠溶液不浸泡;D:3%氯化钠溶液浸泡;E:8%氢氧化钠溶液浸泡;F:8%盐酸溶液浸泡;G:超声 30 min;H:超声 10 min;与 A 相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note:A:Distilled water without immersion;B:Distilled water immersion;

C:3% NaCl solution without immersion;D:3% NaCl solution immersion;E:8% NaOH solution immersion;F:8% HCl solution immersion;

G:Ultrasound for 30 min;H:Ultrasound for 10 min. Compared with A, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.2 预处理条件筛选结果

如图2所示,在不同预处理条件下CP精油的提取率有较大差异。由图分析可得,采用蒸馏水浸泡1 h的预处理方式得到的精油提取率最高,为0.37%,浸泡处理后CP精油的提取率明显提高,是不浸泡组的28.60倍,可能是因为浸泡可使有效化学成分溶出;而经过盐溶液、碱溶液或酸溶液浸泡后的提取率较蒸馏水浸泡后的精油提取率小。实验过程中发现,使用盐溶液、碱溶液或酸溶液浸泡后提取CP精油,蒸馏烧瓶中更容易发生暴沸,可能是因为加入电解质后溶液的沸点变高;碱溶液浸泡时原料颜色由黄色转变为橙红色,且在提取过程中有乳化层的产生;酸溶液提取精油时CP中的糖苷发生酸水解产生糖类物质,导致提取过程中原料黏度增大,沸腾产生大量气泡;超声30 min较超声10 min提取的精油提取率低,可能是在超声的过程中精油挥发导致部分精油损失。综合考虑,本研究采用水蒸气蒸馏法浸泡1 h作为CP精油提取的最佳条件。

2.3 单因素实验结果

根据单因素实验结果可得,不同提取条件下CP精油的提取率有较大的差异。

如图3A所示,CP精油提取率随着提取时间的增加呈上升趋势,在150 min时提取率达到最高,在180 min时提取率开始降低。精油随提取时间的延长溶出量增加,当提取时间小于150 min时,由于精油溶出较少,提取不完全,提取率较低;当提取时间大于150 min时,精油的提取率呈现下降趋势,此时

挥发油已基本被蒸馏出来,而挥发油是容易挥发的物质,因此再延长时间,可能会导致其溶解、挥发损失,还会增加生产成本^[10]。因此,最佳提取时间为150 min。

如图3B所示,在不同提取温度的条件下CP精油的提取率呈先升高后下降的趋势,在温度为300℃时提取率最高。当提取温度低于300℃时,过低的温度达不到溶剂的沸点,不能使溶于其中的精油挥出,使提取率变低;当提取温度超过300℃时,溶液持续维持在沸腾状态,会使挥发油不断挥发,同样会影响挥发油提取率,且提取时间过长会产生暴沸,精油成分不稳定或挥发^[11]。因此,最佳提取温度为300℃。

如图3C所示,在液固比为30 mL/g时提取率达到最高,液固比太小或太大均对精油提取率产生较大的影响,可能的原因是CP粉末吸水性较强,液固比过少导致粉末浸泡不完全,挥发油成分不能充分和溶剂结合,进入溶媒中的含量降低,并容易导致糊化或植物基质中的可溶成分以高浓度溶解在溶剂中,不利于挥发性成分的传质,致使精油提取率小;随着料液比增加,物料与水充分融合,接触面积加大,扩散速度提高,提取率也相应提高,达到30 mL/g时,精油的提取率趋于最大;继续增加液固比,虽然挥发油充分释放,但总量不再增加,在水中溶解度也相应提高,于溶剂中损失的量增加,故最终精油提取率降低,也增加了水蒸气蒸馏过程的能耗和废水处理量,造成浪费。因此在接下来的实验中,选择30 mL/g作为液固比的最佳条件。

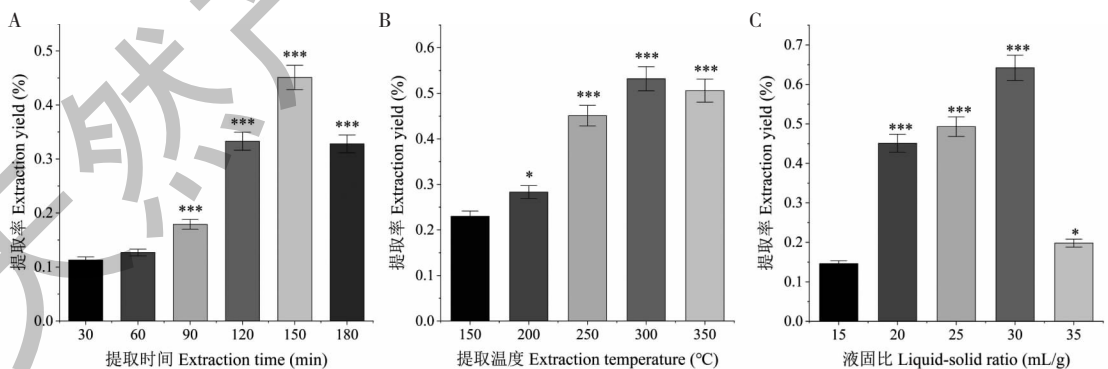


图3 单因素实验结果

Fig. 3 Single-factor test results

注:与30 min组、150℃组、15 mL/g组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。Note:Compared with the 30 min group,150℃ group,and 15 mL/g group,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。

2.4 响应面优化结果

本实验进行三因素三水平BBD实验,共17组

实验,结果见表2,对表2实验数据的方差分析见表3。

由表2中结果可知,本实验所建立的模型 $P < 0.05$, 差异显著;同时失拟项 $P = 0.2180 (> 0.05)$, 说明失拟项不显著,模型拟合成功,表明可用所得回归方程试验真实点对实验结果进行分析。同时可以看出,两种成分的实验模型相关性较好,模型的相关系数 (R^2) 为 0.915 2, 说明所建立的模型能

够准确描述出独立变量与响应值之间的关系。通过对表2的数据进行函数拟合,最终得到编码变量的二元回归方程: $Y = 0.64 - 0.010A + 0.17B + 0.15C + 0.003AB + 0.023AC + 0.067BC - 0.024A^2 + 0.10B^2 - 0.19C^2$ 。其中, Y 为 CP 精油的提取率 (%)。

表2 BBD 实验结果
Table 2 BBD experimental results

序号 No.	因素 Factor			Y: 提取率 Extraction yield (%)
	A	B	C	
1	-1	-1	0	0.590
2	1	-1	0	0.451
3	-1	1	0	0.971
4	1	1	0	0.844
5	-1	0	-1	0.278
6	1	0	-1	0.324
7	-1	0	1	0.474
8	1	0	1	0.613
9	0	-1	-1	0.301
10	0	1	-1	0.451
11	0	-1	1	0.509
12	0	1	1	0.925
13	0	0	0	0.648
14	0	0	0	0.605
15	0	0	0	0.717
16	0	0	0	0.682
17	0	0	0	0.532

表3 精油提取率的方差分析
Table 3 Analysis of variance of essential oil extraction yield

方差来源 Source	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	8.39	0.005 2	显著 Significant
A	0.10	0.758 8	-
B	27.92	0.001 1	-
C	21.17	0.002 5	-
AB	4.48×10^{-3}	0.948 5	-
AC	0.27	0.620 0	-
BC	2.20	0.181 6	-

续表 3 (Continued Tab. 3)

方差来源 Source	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
A^2	0.29	0.607 0	-
B^2	5.31	0.054 6	-
C^2	19.11	0.003 3	-
失拟项 Lack of fit	2.31	0.218 0	不显著 Not significant
R^2	0.915 2	-	-

图 4 为 BBD 实验中所采用的三个因素对 CP 精油提取率的响应面曲线图。响应面曲面斜率越大说明对应的因素对提取影响越显著。图 4A 为提取温度与提取时间之间的交互作用对精油成分的响应面曲线图。当提取时间为一定值时,提取率随着提取温度的升高而出现上升趋势。图 4B 为液固比与提取时间之间的交互作用对精油成分的响应面曲线图。当提取时间为一定值时,精油的提取率随着液固比的增加出现先上升后下降的趋势。然而在液固比超过 30 mL/g 时,提取率就会略有下降,这说明 30 mL/g 为最佳液固比。图 4C 为液固比与提取温度之间的交互作用对精油成分的响应面曲线图。随

着液固比与提取温度的增加,提取率呈现先上升后下降的趋势。综上所述,液固比对提取植物材料中的目标成分具有十分重要的影响。液固比小,提取溶剂用量就少,致使植物样品与提取溶剂的接触面积小、不充分,从而提取率就较低;但液固比过大,会耗费更多的资源与能源,从而不能达到高效低能的提取。

使用 Design-Expert 8.0.6 软件对 CP 精油提取响应面结果进行分析,得到最佳提取条件:液固比 32.82 mL/g,提取温度 350.00 °C,提取时间 153.75 min,精油的提取率的理论值为 0.96%,验证实验结果为 0.72%。

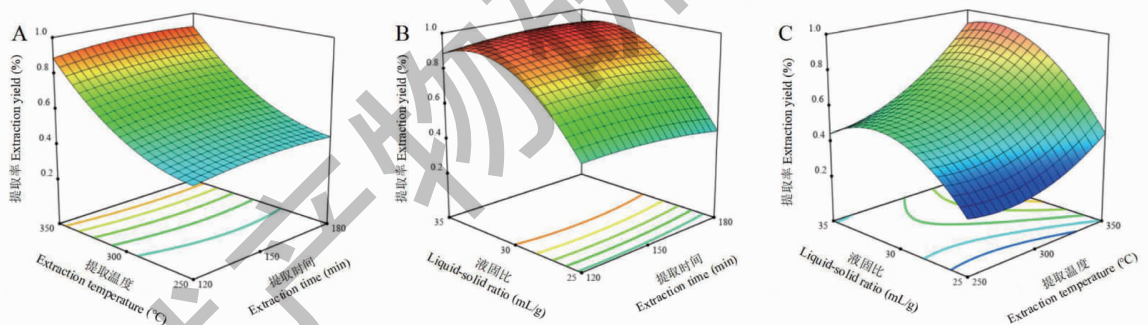


图 4 响应面曲线图

Fig. 4 Response surface curve

2.5 人工神经网络分析

图 5A 为 BP 神经网络训练结果,可以发现在模型训练最初阶段,训练集、矫正集、测试集的均方误差(mean-square error, MSE)不够接近,无法达到可接受的误差,因此无法完成训练过程。CP 精油提取率的最佳验证收敛数为 2,网络的 MSE 为 0.004 096 6,达到设定的训练最小目标值。训练 2 次后 MSE 先增大后减小至基本不变,过多训练会导致过度学习。因此,完成 BP 神经网络训练的标准是验证 MSE 接近于一个稳定的值。所以,在本研究中 2 次迭代后性能符合训练要求,表明该神经网络的收敛

性良好。

从单因素实验结果可以分析出,液固比、提取时间、提取温度这三个因素对 CP 精油的提取效果影响显著,故利用 ANN 对这三个因素进行优化分析。在 ANN 优化过程中,以上三个因素为输入层,精油提取率为输出层,构建了 ANN 模型。如图 5B 为实验数据与每一步计算的神经网络数据的散点比较图。其中设置 70% 的数据为训练集,15% 的数据为验证集,15% 的数据为测试集,通过对精油提取率的 ANN 预测分析发现,训练集、测试集、矫正集及整个模型的 R 值分别为 0.972 62、0.992 31、0.940 16 和

0.974 83, 显然非常接近 1。拟合程度愈高, 本模型中的训练、验证及总数据的拟合程度均达到较高水准, 说明实验值与 ANN 模型预测值具有良好的相关性, 利用该神经网络预测 CP 精油提取率的可行性强。

结合模型拟合并通过软件进行分析得出最佳提取条件: 液固比 34.86 mL/g, 提取温度 300.00 °C, 提取 166.21 min, 精油提取率的理论值为 0.82%, 验证的实验结果证明模型拟合合理可靠, 结果预测准确。

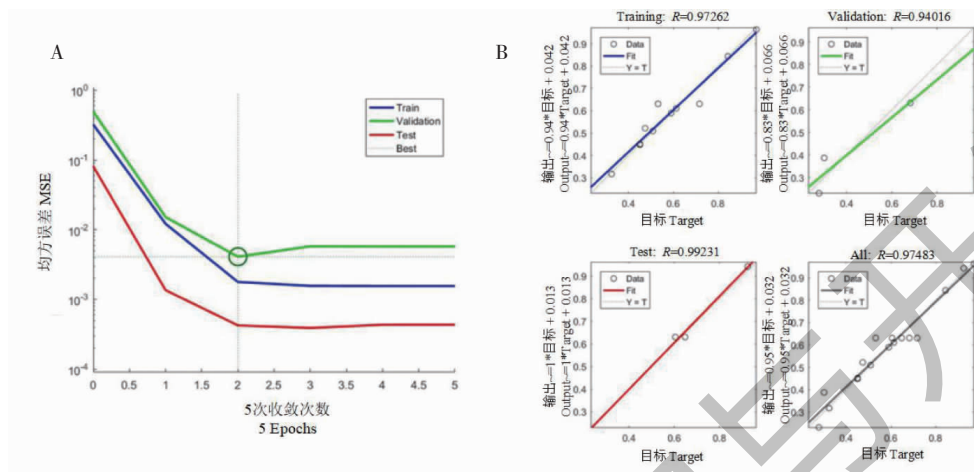


图5 人工神经网络分析结果

Fig. 5 Analysis results of artificial neural network

注: A 是 BP 神经网络训练结果图; B 是实验数据与每一步计算的神经网络数据的散点比较图。Note: A: The training result graph of the BP neural network; B: The scatter comparison graph between the experimental data and the neural network data calculated at each step.

2.6 响应面法与人工神经网络的比较

图 6 中比较了使用 RSM 与 ANN 模型对 CP 精油提取率的预测能力, 从图中可明显看出 ANN 的曲线与实验值的曲线重合度更高, ANN 的预测值与实验值的相差更小, 表明 ANN 模型比 RSM 模型的精

确度更高且预测能力更强, 证明建立的 ANN 模型具有极高的准确度和适应度。因此, 基于以上结果, 获得目标精油最大提取率的最佳条件由 ANN 模型优化得出。

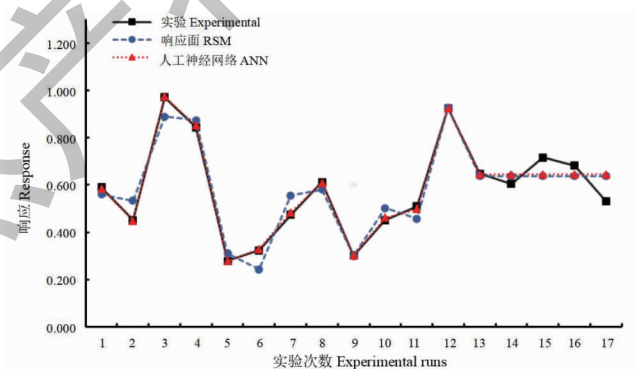


图6 RSM 模型与 ANN 模型的预测值与实验值的结果

Fig. 6 The result of the predicted and experimental values of the RSM model and the ANN model

2.7 CP 精油 GC-MS 分析

将提取到的 CP 精油经 GC-MS 分析, 得到的 CP 精油总离子流色谱图如图 7 所示。据图可知, CP 精油成分的峰形较好。GC-MS 定性分析从 CP 精油中共检测出 27 种化合物 (见表 4), 鉴定成分占总组分

的 99.64%, 以萜烯类为主, 其中含量最多的三种化合物依次是 *D*-柠檬烯、 β -古巴烯和 γ -松油烯, 相对含量分别达到 47.56%、14.85% 和 9.16%。Song 等^[12] 提取狮子柑果皮精油共鉴定出 53 种成分, 主要组成为 *D*-柠檬烯 (82.95%)、 γ -萜品烯 (5.58%)、

α -月桂烯(1.53%)。Saes 等^[13]用 Clevenger 型水蒸气蒸馏法检测三种柑橘的果皮,其中含量最多的为 *D*-柠檬烯、松烯和月桂烯,结果与其他研究检测到的 CP 精油的化学成分及含量有较大的相似程度。

D-柠檬烯及其衍生物具有潜在的化学预防和抗癌活性,能降低肿瘤周期蛋白 D1 的表达,抑制肿瘤增殖,且在人体中安全可耐受,此外高浓度的 *D*-柠檬烯还具有良好的抗炎、抗真菌、抗寄生虫和抗肥胖

活性以及预防糖尿病的作用; γ -松油烯具有分解脂肪的作用,能够降低胆固醇活性; β -古巴烯在制药、食品和化妆品领域具有广泛应用,在商业上可用作食品和香料的添加剂,也具有较好的抗真菌活性^[14,15]。 β -蒎烯在细胞遗传学、神经保护、抗焦虑、抗癌方面研究较多^[16],但该成分在 CP 精油中相对含量较少,目前 CP 不被认为是 β -蒎烯很好的来源植物,在此不做过多讨论。

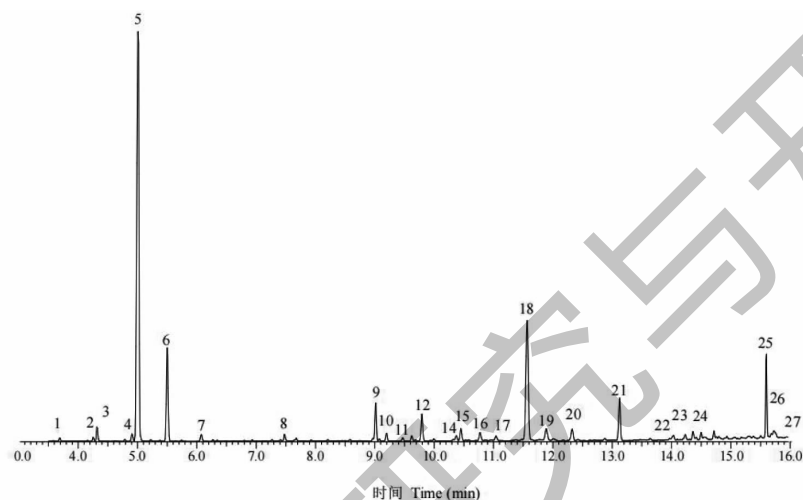


图 7 CP 精油 GC-MS 总离子流图

Fig. 7 GC-MS total ion chromatogram of CP essential oil

表 4 CP 精油的 GC-MS 分析结果

Table 4 GC-MS analysis results of CP essential oil

编号 No.	保留时间 Retention time(min)	相对含量 Relative content(%)	化合物 Compound	CAS 号 CAS number	分子式 Molecular formula
1	3.690	0.24	α -蒎烯 α -Pinene	80-56-8	C ₁₀ H ₁₆
2	4.254	0.29	β -蒎烯 β -Pinene	127-91-3	C ₁₀ H ₁₆
3	4.319	1.16	β -月桂烯 β -Myrcene	123-35-3	C ₁₀ H ₁₆
4	4.908	0.65	邻-异丙基苯 <i>o</i> -Cymene	527-84-4	C ₁₀ H ₁₄
5	5.011	47.56	<i>D</i> -柠檬烯 <i>D</i> -Limonene	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆
6	5.502	9.16	γ -松油烯 γ -Terpinene	99-85-4	C ₁₀ H ₁₆
7	6.075	0.61	萜品油烯 Terpinolene	586-62-9	C ₁₀ H ₁₆
8	7.478	0.51	癸醛 Decanal	112-31-2	C ₁₀ H ₂₀ O
9	9.013	3.02	δ -榄香烯 δ -Elemene	20307-84-0	C ₁₅ H ₂₄
10	9.198	0.63	乙酸橙花酯 Neryl Acetate	141-12-8	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
11	9.470	0.25	乙酸香叶酯 Geranyl acetate	16409-44-2	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
12	9.621	0.47	古巴烯 Copaene	3856-25-5	C ₁₅ H ₂₄
13	9.793	2.63	β -榄香烯 β -Elemene	515-13-9	C ₁₅ H ₂₄
14	10.372	0.38	β -石竹烯 β -Caryophyllene	87-44-5	C ₁₅ H ₂₄
15	10.451	1.16	萜澄茄油烯 Cubebene	13744-15-5	C ₁₅ H ₂₄
16	10.773	0.85	(<i>E</i>)- β 金合欢烯 (<i>E</i>)- β Famesene	18794-84-8	C ₁₅ H ₂₄

续表 4 (Continued Tab. 4)

编号 No.	保留时间 Retention time (min)	相对含量 Relative content (%)	化合物 Compound	CAS 号 CAS number	分子式 Molecular formula
17	11.042	0.45	石竹烯 α -Caryophyllene	6753-98-6	C ₁₅ H ₂₄
18	11.567	14.85	β -古巴烯 β -Copaene	317819-78-6	C ₁₅ H ₂₄
19	11.889	1.44	吉玛烯 Germacrene B	15423-57-1	C ₁₅ H ₂₄
20	12.325	1.24	Δ -杜松烯 (+)- Δ -Cadinene	483-76-1	C ₁₅ H ₂₄
21	13.123	3.87	Germacrene D	37839-63-7	C ₁₅ H ₂₄
22	14.030	0.37	桉油烯醇 Spathulenol	6750-60-3	C ₁₅ H ₂₄ O
23	14.230	0.36	2,6,9,11-Dodecetraenal, 2,6,10-trimethyl	4955-32-2	C ₁₅ H ₂₂ O
24	14.361	0.77	α -毕橙茄醇 α -Cadinol	481-34-5	C ₁₅ H ₂₆ O
25	15.597	5.60	圆柚酮 Nootkatone	4674-50-4	C ₁₅ H ₂₂ O
26	15.683	0.37	马兜铃酮 Aristolone	6831-17-0	C ₁₅ H ₂₂ O
27	15.725	0.75	正二十一烷 Heneicosane	629-94-7	C ₂₁ H ₄₄

2.8 CP 精油抗氧化活性分析

如图 8 所示, CP 精油对 DPPH 自由基有一定的清除作用, 并随 CP 精油浓度增大而增强。CP 和维生素 E 对 DPPH 清除的 IC₅₀ 值分别为 65.01 mg/mL 和 10.67 μ g/mL, 由此可看出 CP 精油对比维生素 E 的清除能力仍有差距。研究报道香橼精油的抗氧化能力与质量浓度呈正相关, 对 DPPH 自由基、羟基自由基和 H₂O₂ 均有一定的清除能力, 而 CP 精油与香橼精油相比对 DPPH 清除能力相似^[17]。CP 精油中的 *D*-柠檬烯相对含量高达 47.56%, 还含有 α -蒎烯、 γ -松油烯、 β -石竹烯等丰富的萜类成分, 以上成分已被证明是柑橘精油具有抗氧化能力的主要原因^[18]。本研究仅对 CP 精油的体外抗 DPPH 自由基清除活性进行研究, 而对其他自由基的清除效果及精油体内抗氧化活性有待进一步探究。

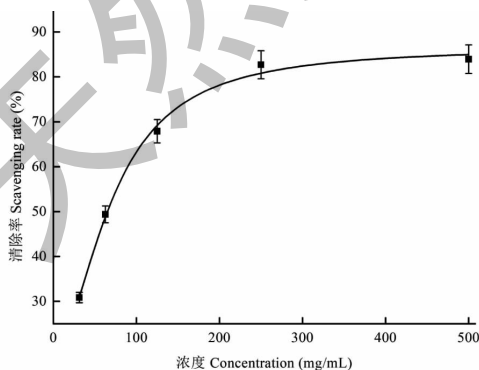


图 8 CP 精油对 DPPH 自由基清除作用

Fig. 8 Scavenging effect of CP essential oil on DPPH free radical

2.9 CP 精油物理性质研究

CP 精油在常温下为亮黄色半透明油状液体, 易

挥发, 在低温时易析出白色晶体, 并有独特的胡椒香味, 难溶于水, 易溶于有机溶剂如乙醚、石油醚等^[19]。本实验测得 CP 精油的相对密度为 0.89 g/mL, 折光系数为 1.46, pH 为 5.74。与采用有机溶剂萃取法提取的果皮精油的理化性质相比, 本实验测得的 CP 精油相对密度和折光系数更大, 理化性质更稳定^[20]。

对比不同提取方式所提取的 CP 精油和柑橘属其他种精油, CP 精油与其之间存在一定的差异, 但是 CP 精油与之相比颜色更纯, 密度更大, 还具有更好的稳定性。同时, CP 精油气味怡人, 颜色明亮, 理化性质稳定易于保存, 具有进一步开发的潜力。

3 结论

本文采用水蒸气蒸馏法系统性地对 CP 中的精油成分进行提取, 并对提取工艺进行优化。首先筛选精油提取的最佳粉末粒径和预处理条件, 并对提取时间、提取温度及液固比三个对 CP 精油提取率具有较大影响的因素进行单因素筛选实验。基于单因素筛选结果, 采用 RSM 与 ANN 这 2 种不同的方法对提取条件进一步优化。RSM 分析发现液固比对 CP 精油提取率具有较大影响, 液固比过小不利于物料与溶剂的充分接触, 导致提取率降低; 液固比过大, 容易产生资源浪费, 不能实现低能高效提取的目的, 且不适用于实际应用。ANN 模型的各项数据的拟合程度均达到较高水准, 实验值与模型预测值具有良好的相关性, 预测结果合理可靠。将 2 种方法的预测值与实验值进行对比, 发现 ANN 的预测值与实验值的相差更小, 更具优越性。基于此, 确定

ANN 模型优化条件为最佳提取条件:粒径 24 目、蒸馏水浸泡 1 h、液固比 34.86 mL/g、提取温度 300.00 °C、提取时间 166.21 min,CP 精油提取率为 0.82%。CP 精油的 GC-MS 分析结果显示,CP 精油中含有丰富的萜类化合物,主要成分为 *D*-柠檬烯,相对含量为 47.56%,其次为 β -古巴烯和 γ -松油烯。此外理化性质和抗氧化活性分析表明,水蒸气蒸馏法提取的 CP 精油具有良好的稳定性和抗氧化活性,可作为天然抗氧化剂和防腐剂来源。

在国家大力发展中医药的背景下,常山胡柚这一地方特有品种尚未得到充分的研究与开发。CP 作为常山胡柚加工生产所产生的主要副产物,其中含有丰富的精油成分,具有重要的开发利用价值。本研究对 CP 精油提取工艺的优化及其化学成分和理化性质方面开展研究,可为合理利用常山胡柚废弃资源提供新途径,对推动常山胡柚果皮中天然活性成分的深入开发具有重要意义。

参考文献

- Jiang LJ, Tian XL, Yuan Q, et al. Research progress on cultivation techniques of *Citrus × aurantium* 'Changshanhuyou' and chemical components and pharmacological action of *Qu Aurantii Fructus* [J]. *Zhejiang For Sci Technol* (浙江林业科技), 2022, 42: 129-136.
- Li YT, Wu ZF, Weng PF, et al. Stirring and pH control of fermentation for Huyou juice in 10 L fermenter by lactic acid bacteria [J]. *J Nucl Agric Sic* (核农学报), 2021, 35: 2369-2376.
- Tang QM, Wang LF. Functional components of citrus peel and its processing and application status [J]. *Food Mach* (食品与机械), 2022, 38: 180-185.
- Li LL, Zhang M, Chitrakar B, et al. Effect of combined drying method on phytochemical components, antioxidant capacity and hygroscopicity of Huyou (*Citrus changshanensis*) fruit [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 123: 109102.
- Su Y, Liu Y, Shen JF. Study on *in vitro* inhibitory effect of *Citrus aurantium* 'Changshanhuyou' peel essential oil on *Propionibacterium acnes* [J]. *Cereals Oils* (粮食与油脂), 2023, 36: 53-56.
- Zheng MY, Zhao SQ, Xing JR, et al. Comparison of fruit nutritional qualities and functional compounds of Changshanhuyou and grapefruit [J]. *Acta Agric Zhejiang* (浙江农业学报), 2016, 28: 150-156.
- Xiao XS, Song ZL, Xie YY, et al. Comparison of components, antioxidant and bacteriostatic ability of different varieties of pomelo peel essential oil [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2024, 36: 218-226.
- Xiao XS, Song ZL, Xie YY, et al. Comparison of components, antioxidant and bacteriostatic ability of different varieties of pomelo peel essential oil [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2024, 36: 218-226.
- Yuan WY, Zhang YB. Comparative study on extraction processes of essential oil in *Amomum tsaoko* [J/OL]. *Food Nutr China* (中国食物与营养): 1-9 [2024-04-16]. <https://doi.org/10.19870/j.cnki.11-3716/ts.20231101.002>.
- Wang J, Yuan SL, Wang D. Study on extraction of essential oil from nutmeg by ultrasonic-assisted steam distillation and its antioxidant activity [J]. *Cereals Oils* (粮食与油脂), 2022, 35: 81-85.
- Li XY, Wang Z, Zhao K, et al. Response surface methodology optimization of water vapor distillation for extracting volatile oil from peony root bark [J]. *Sci Technol Innov* (科技与创新), 2020, 4: 16-17.
- Song X, Wang ZB, Bao JW, et al. Optimization of extraction process and composition analysis of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan based on steam distillation [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2022, 43: 233-242.
- Saes A, Mei B, Er C, et al. Allelopathic potential of essential oils isolated from peels of three citrus species [J]. *Ann Agr Sci-Cairo*, 2019, 64: 89-94.
- Chebet JJ, et al. Effect of d-limonene and its derivatives on breast cancer in human trials; a scoping review and narrative synthesis [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21: 902.
- Masyita A, Sari RM, Astuti AD, et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives [J]. *Food Chem: X*, 2022, 13: 100217.
- Liu CJ, Niu LY, Yu M, et al. Study on antioxidant and antibacterial activities of essential oils from *Citrus medica* [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2016, 37: 132-137.
- Salehi B, Upadhyay S, Orhan IE, et al. Therapeutic potential of α - and β -pinene: a miracle gift of nature [J]. *Biomolecules*, 2019, 9: 738.
- Cao S. Study on chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of citrus essential oils [D]. Ganzhou: Ganzhou Normal University (赣南师范大学), 2022.
- Zhu KQ, Cai XY, Qiu YX. Optimization of the extracting process conditions of pomelo peel oil by subcritical fluid extraction [J]. *J Food Safety Qual* (食品安全质量检测学报), 2019, 10: 6656-6660.
- Li B, Yang LJ. Study on the extraction and antibacterial activity of essential oil from shaddock peel [J]. *J Nanyang Inst Technol* (南阳理工学院学报), 2012, 4: 89-92.