

皱皮木瓜中齐墩果酸的超临界 CO₂ 提取工艺优选

蒋顶云, 蒋长兴*, 熊清平, 时晓娟, 杜李扬, 徐文槽
(淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏 淮安 223003)

[摘要] 目的: 优选超临界 CO₂ 提取皱皮木瓜中齐墩果酸的工艺条件。方法: HPLC 测定齐墩果酸含量, 以齐墩果酸得率及含量的平均值为指标, 应用单因素和正交试验考察提取温度、提取压力、分离温度、分离压力及携带剂种类 5 个影响因素, 并将优选工艺与文献工艺进行对比分析。结果: 超临界 CO₂ 提取齐墩果酸的最佳工艺条件为提取温度 45 ℃, 提取压力 40 MPa, 分离温度 30 ℃, 分离压力 8 MPa, 携带剂 95% 乙醇; 超临界 CO₂ 提取优于其他方法。结论: 该优选工艺稳定可行, 可用于齐墩果酸的推广应用。

[关键词] 超临界 CO₂; 提取; 皱皮木瓜; 齐墩果酸

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0020-05

Optimization of Supercritical CO₂ Extraction Technology for Oleanolic acid from *Chaenomeles speciosa*

JIANG Ding-yun, JIANG Chang-xing*, XIONG Qing-ping, SHI Xiao-juan, DU Li-yan, XU Wen-cao
(Faculty of Life Sciences and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology conditions of oleanolic acid from *Chaenomeles speciosa* by supercritical CO₂. **Method:** HPLC was used to determine the content of oleanolic acid, with average between yield and content of oleanolic acid as index, single factor test and orthogonal test were used to investigate extraction temperature, extraction pressure, separation temperature, separation pressure and kind of carrying agent, and compared with optimized process and documentation process. **Result:** Optimum extraction technology conditions were: extraction temperature of 45 ℃, extraction pressure of 40 MPa, separation temperature of 30 ℃, separation pressure of 8 MPa and carrying agent of 95% ethanol; Supercritical CO₂ extraction was superior to other documentation methods. **Conclusion:** This optimized technology was feasible and stable, it could be used to promote application of oleanolic acid.

[Key words] supercritical CO₂; extraction; *Chaenomeles speciosa*; oleanolic acid

皱皮木瓜别名贴梗海棠、贴梗木瓜、铁脚海棠、铁脚梨等, 可药食两用^[1]。其性温, 味酸, 归肝、脾经, 具有平肝舒筋、和胃化湿的功效, 临床主要用于

湿痹拘挛、腰膝关节酸重疼痛、吐泻转筋等。研究表明皱皮木瓜中除含有木瓜蛋白酶、木瓜碱、胡萝卜素外, 还含有丰富的齐墩果酸(OA)^[2-3]。OA 为五环三萜类化合物, 具有护肝降酶、促进肝细胞再生、抗炎、强心、抗肿瘤等作用, 同时具有降糖、降脂、镇静等作用, 是开发肝病治疗和降血糖等药物的较为理想化合物之一, 在食品、医药和保健品等行业具有广阔的应用前景^[4]。目前木瓜中 OA 多采用乙醇回流法^[5]、超声波辅助法^[6]、超高压法^[7]、微波辅助法^[8]等进行提取, 未见采用超临界 CO₂ 提取法(SCFE)提取木瓜中 OA 的研究报道。

SCFE 系指利用超临界流体在临界温度与临界

[收稿日期] 20120420(001)

[基金项目] 江苏省自然科学基金项目(SBK200930185); 淮安市工业基金项目(HAG2011013)

[第一作者] 蒋顶云, 本科, 副教授, 从事应用化学与仪器分析的研究, Tel: 0517-83591165, E-mail: d. y. jiang1966@163.com

[通讯作者] * 蒋长兴, 博士, 副教授, 从事食品化学及毒理学的研究, Tel: 0517-83591165, E-mail: j1c2x3@gmail.com

压力附近具有特殊性能而进行的一种提取技术。该方法具有提取率和选择性高、分离彻底、工艺简单、操作费用低、操作温度低等优点,已成为目前天然药物提取的研究热点^[9-10]。本试验对 SCFE 提取皱皮木瓜中 OA 的工艺参数进行研究,以期 OA 的推广应用提供试验依据。

1 材料

DJ-02 型粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司),HA120-50-01C 型超临界提取装置(江苏淮安科研仪器有限公司),Waters 2487 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),微量移液器(上海求精生化试剂仪器有限公司)。

乙酸、甲醇为色谱纯,高纯二氧化碳气体(江苏红光化工有限公司),其余试剂均为分析纯,OA 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 1541175-201107),皱皮木瓜购于江苏省淮安市华润苏果超市,经淮阴工学院熊清平老师鉴定为蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai. 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

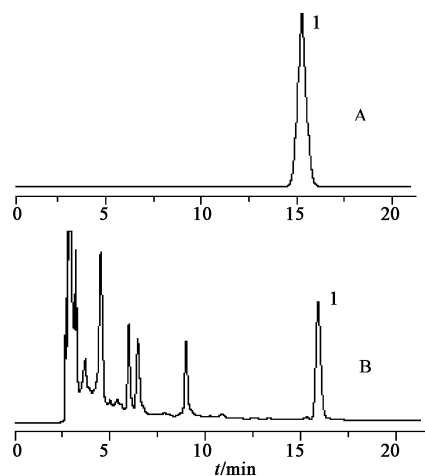
2.1 OA 样品制备 将皱皮木瓜洗净,切片,去籽,自然风干后粉碎,过筛,取 60 目粉末备用。称取适量皱皮木瓜粉装入料筒中,按皱皮木瓜粉-携带剂 1:30 向携带剂罐中加入相应量携带剂,将料筒置于提取釜中,分别将提取釜、分离釜的温度和压力调节至相应值,将携带剂压入提取缸内,调节 CO₂ 流量为 15 L·h⁻¹,提取 80 min 后,打开分离釜阀门,放出提取物,将提取物转至旋转蒸发器中,于 (70 ± 5) °C 真空浓缩回收携带剂至半浸膏,取出半浸膏,于 (70 ± 5) °C 真空干燥得干浸膏,干浸膏经粉碎得样品粉末。

2.2 OA 含量测定

2.2.1 色谱条件 Kromsil-C₁₈ 色谱柱(6 mm × 250 mm, 0.5 μm),流动相甲醇-0.2% 醋酸水溶液(90:10),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL,检测波长 215 nm^[11-12]。在该条件下能达到基线分离,见图 1。

2.2.2 溶液配制 对照品溶液的配制:精密称取 OA 对照品 20.00 mg,置于 25 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 0.8 g·L⁻¹ 的 OA 对照品溶液。

供试品溶液的配制:称取 OA 样品粉末约 5.00 mg,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。



A. 对照品; B. 样品; 1. 齐墩果酸

图 1 皱皮木瓜 HPLC

2.2.3 线性关系考察 准确吸取 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 6.0 mL 对照品溶液于 50 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀。按 2.2.1 项下色谱条件测定,以 OA 峰面积对 OA 质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.86 \times 10^6 X + 3.5 \times 10^3$ ($r = 0.9991$)。结果表明 OA 在 4 ~ 96 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.4 稳定性试验 按 2.2.1 项下色谱条件,对同一供试品溶液 4 h 内每隔 20 min 进样测定 1 次。结果 RSD 1.73% ($n = 12$),表明 OA 供试品溶液在 4 h 内稳定。

2.2.5 加样回收率试验 精密称取 50.00 mg 已知含量的 OA 样品 9 份,分别加入 OA 对照品 4.00 mg,用适量流动相溶解,转移至 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,取溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件测定,得 OA 平均回收率 98.79%, RSD 1.42%,表明该方法可靠性良好。

2.2.6 精密度试验 精密吸取 OA 对照品溶液 1.5 mL,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。按 2.2.1 项下色谱条件测定,重复进样 5 次。结果 RSD 1.49% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 样品测定 取适量供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,将测定结果代入 2.2.3 项下回归方程计算供试品溶液中 OA 含量,按公式 1 计算样品中 OA 质量分数。

$$C_{\text{样品}} = \frac{C_{\text{供试品}} \times 10}{m_{\text{样品}}} \times 100\% \quad (1)$$

2.3 单因素试验 由于皱皮木瓜中 OA 得率(X)在工业生产上具有经济控制意义;OA 质量分数(Y)具有质量控制意义,故本试验确定对各参数考察指

标为 X 与 Y 的算术平均值 Z 。根据预试验结果,确定影响 SCFE 提取皱皮木瓜中 OA 的主要因素有提取温度、提取压力、分离温度、分离压力及携带剂种类。为便于 SCFE 提取皱皮木瓜中 OA 工艺优化试验的进行,本试验对各考察因素先进行单因素考察。

2.3.1 提取温度的考察 按 2.1 项下方法进行提取,控制提取条件为提取釜压力 40 MPa,提取釜温度分别为 30,35,40,45,50,55,60,65 °C,分离釜压力 10 MPa,分离釜温度 25 °C,携带剂 95% 乙醇,结果见图 2。由图 2 结果可知,随着提取温度的升高, Z 值逐渐增大,当提取温度达 45 °C 时, Z 达最大;之后温度进一步升高时,因 X 下降引起 Z 逐渐变小。由曲线的变化趋势来看,在 40 ~ 55 °C 时 Z 变化不明显,此区间 Z 拥有峰值。故确定选择 40,45,50,55 °C 4 个水平进行正交试验优选。

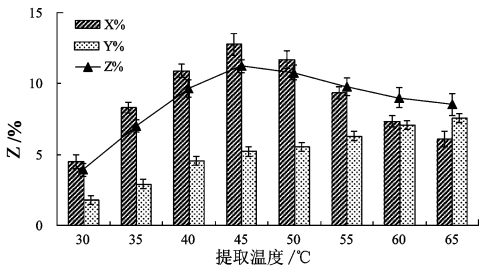


图 2 提取温度对 OA 提取的影响

2.3.2 提取压力的考察 按 2.1 项下方法进行提取,控制提取条件为提取釜压力分别为 20,25,30,35,40,45,50 MPa,提取釜温度 45 °C,分离釜压力 10 MPa,分离釜温度 25 °C,携带剂 95% 乙醇,结果见图 3。

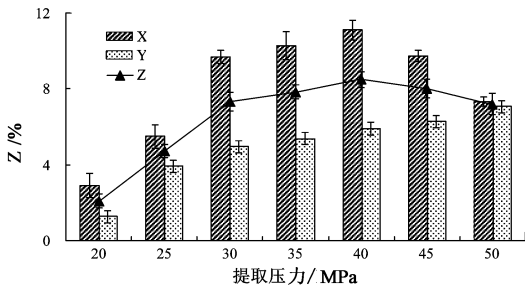


图 3 提取压力对 OA 提取的影响

由图 3 结果可知,随着提取压力的增大, Z 值出现先增后减的变化趋势。当提取压力 40 MPa 时, Z 达最大值,但 Z 在 35 ~ 50 MPa 变化不明显 ($P > 0.05$),故本因素宜选择 35,40,45,50 MPa 4 个水平进行正交试验优选。

2.3.3 分离温度考察 按 2.1 项下方法进行提取,控制提取条件为提取釜压力 40 MPa,提取釜温度 45

°C,分离釜压力 10 MPa,分离釜温度分别为 20,25,30,35,40,45,50 °C,携带剂 95% 乙醇,结果见图 4。由图 4 结果可知,当分离温度 < 40 °C 时,随提取温度的升高, Z 逐渐增大,40 °C 时 Z 达最大,之后随分离温度的增加 Z 逐渐变小。故本因素宜选择 30,35,40,45 °C 4 个水平进行正交试验优选。

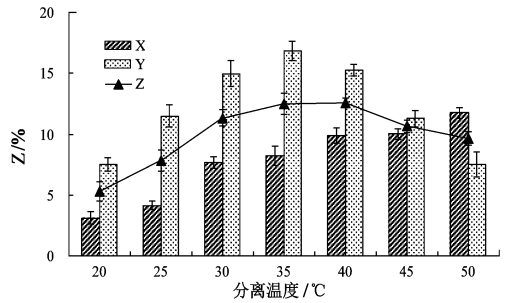


图 4 分离温度对 OA 提取的影响

2.3.4 分离压力考察 按 2.1 项下方法进行提取,控制提取条件为提取釜压力 40 MPa,提取釜温度 45 °C,分离釜压力分别为 4,6,8,10,12,14,16,18 MPa,分离釜温度 40 °C,携带剂 95% 乙醇,结果见图 5。由图 5 结果可知,当分离压力 8 MPa 时, Z 达最大, Z 在 6 ~ 12 MPa 拥有最大值,故本因素宜选择 6,8,10,12 MPa 4 个水平来进行正交试验优选。

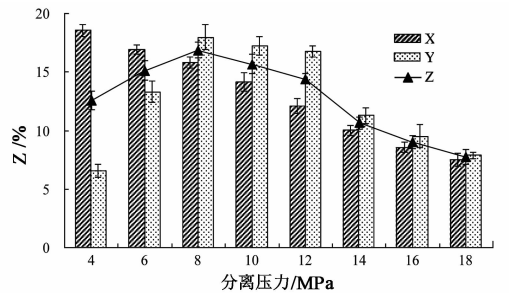


图 5 分离压力对 OA 提取的影响

2.3.5 不同携带剂的筛选 按 2.1 项下方法进行提取,控制提取条件为提取釜压力 40 MPa,提取釜温度 45 °C,分离釜压力 8 MPa,分离釜温度 40 °C,分别以甲醇(A),95% 乙醇(B),70% 乙醇(C),无水乙醇(D),氯仿(E),丙酮(F),乙酸乙酯(G),考察不同携带剂对 SCFE 提取 OA 的影响,结果见图 6。由图 6 结果可知,不同携带剂对皱皮木瓜中 OA 的提取效果存在显著差异 ($P < 0.05$)。 Z 大小顺序为 $D > B > C > E > A > G > F$,从提取效果考虑,宜选择 D,B,C,E 4 种携带剂来进行优化。但携带剂 E 和 A 的 Z 差异不明显 ($P > 0.05$),且携带剂 A 毒性相对较小,故综合考虑产品安全性和提取效果,本因素宜选择 D,B,C,A 4 种携带剂来进行下一步正交试验考察。

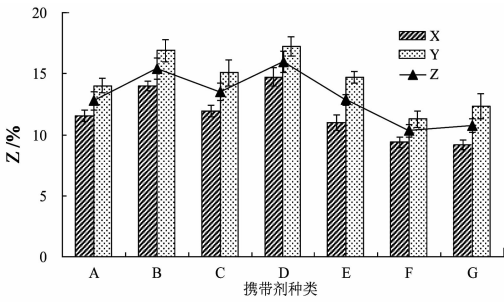


图6 不同携带剂对 OA 提取的影响

2.4 正交试验优选 在单因素试验基础上,选取提取温度、提取压力、分离温度、分离压力及携带剂种类为考察因素,各因素取 4 个水平,选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表安排试验。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 皱皮木瓜中齐墩果酸超临界 CO₂ 提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 提取 温度/℃	B 提取 压力/MPa	C 分离 温度/℃	D 分离 压力/MPa	E 携带剂
1	40	35	30	6	无水乙醇
2	45	40	35	8	70% 乙醇
3	50	45	40	10	95% 乙醇
4	55	50	45	12	甲醇

由表 2,3 结果可知,5 个因素对皱皮木瓜中 OA 提取影响大小顺序为 $D > E > B > C > A$,以极差最小的 A 因素为误差项进行方差估算,D,E 因素对试验结果影响显著,B,C 因素对试验结果影响不显著,确定最佳提取工艺条件为 $A_2B_2C_1D_2E_3$,即提取温度 45 ℃,提取压力 40 MPa,分离温度 30 ℃,分离压力 8 MPa,携带剂 95% 乙醇。

2.5 验证试验 按上述优选工艺进行 3 次验证试验,提取 3 批 OA 样品,测定 Z 值。结果显示 3 批 OA 样品的 Z 分别为 17.23%,17.56%,17.03%,RSD 1.26%,表明优选的提取工艺稳定性良好。

2.6 与文献方法提取效果的比较 称取相同质量的皱皮木瓜原料,分别采用超临界 CO₂ 提取法、乙醇回流法、超声波辅助提取法、超高压提取法、微波辅助提取法制备 OA 样品^[5-8]。结果 X 分别为 15.78%,8.32%,18.54%,19.05%,17.10%;Y 分别为 18.77%,2.25%,4.74%,3.16%,4.52%;Z 分别为 17.27%,5.29%,11.64%,11.11%,10.81%。由结果可知,采用超临界 CO₂ 提取法、超声波辅助提取法、超高压提取法、微波辅助提取法、超临界 CO₂ 提取法提取皱皮木瓜中 OA,其 X 值均明显高于

表 2 皱皮木瓜中齐墩果酸超临界 CO₂ 提取

工艺优选正交试验安排									%
No.	A	B	C	D	E	X	Y	Z	
1	1	1	1	1	1	13.85	16.00	14.93	
2	1	2	2	2	2	14.07	18.30	16.18	
3	1	3	3	3	3	11.01	15.04	13.02	
4	1	4	4	4	4	7.42	10.30	8.86	
5	2	1	2	3	4	9.01	12.51	10.76	
6	2	2	1	4	3	13.32	17.79	15.56	
7	2	3	4	1	2	14.21	18.23	16.22	
8	2	4	3	2	1	11.64	15.53	13.58	
9	3	1	3	4	2	10.16	14.15	12.16	
10	3	2	4	3	1	9.32	13.35	11.34	
11	3	3	1	2	4	13.68	16.62	15.15	
12	3	4	2	1	3	12.38	16.32	14.35	
13	4	1	4	2	3	15.46	17.96	16.71	
14	4	2	3	1	4	11.91	16.18	14.04	
15	4	3	2	4	1	10.32	14.12	12.22	
16	4	4	1	2	3	9.16	12.26	10.71	
K_1	13.26	13.64	14.09	14.88	13.02				
K_2	14.03	14.28	13.38	15.41	13.82				
K_3	13.25	14.15	13.20	11.46	14.91				
K_4	13.42	11.88	13.28	12.20	12.20				
R	0.78	2.40	0.89	3.95	2.71				

表 3 Z 值方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	1.65	3	0.55	1.000	
B	14.78	3	4.93	8.95	>0.05
C	1.99	3	0.66	1.20	>0.05
D	45.63	3	15.21	27.64	<0.05
E	16.02	3	5.34	9.71	<0.05

注: $F_{0.05}(3,3) = 9.28, F_{0.01}(3,3) = 29.50$ 。

乙醇回流法;同时超临界 CO₂ 提取法的 Y,Z 值均明显高于其他几种提取方法,表明采用超临界 CO₂ 提取法提取皱皮木瓜中 OA 优势明显。

3 讨论

在单因素试验中,OA 含量 Y 值随分离压力和温度的增加均出现先升高后降低的趋势,出现此变化的原因可能是由于温度和压力过低时,OA 从流体中析出量增大,与此同时,杂质的析出量增大,从而导致样品中 Y 值降低;当温度和压力过高时,OA 不能从流体中顺利析出,同样出现较低的 Y 值。

阿里红中总三萜酸的提取工艺优选及含量测定

尤努斯江·吐拉洪^{1*}, 木妮热·依布拉音², 吐尔洪·买买提¹

(1. 新疆大学化学化工学院, 乌鲁木齐 830046;

2. 新疆乌鲁木齐市疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830002)

[摘要] 目的:优化阿里红中总三萜酸的提取工艺,并建立其含量测定方法。方法:以齐墩果酸为对照品,采用分光光度法测定三萜酸含量;采用单因素试验考察提取溶剂种类及浓度、料液比、温度、提取时间及提取次数对总三萜酸得率的影响,在此基础上,采用L₉(3⁴)正交试验优选阿里红中总三萜酸提取工艺。结果:最佳提取工艺为30倍量90%乙醇于60℃超声提取3次,每次30min。在此条件下,阿里红中总三萜酸质量分数35.1%。各因素影响次序为提取温度>液料比>提取时间>乙醇体积分数。结论:阿里红中三萜酸含量很高,该优选工艺稳定可行,可推广于大生产。

[关键词] 阿里红; 总三萜酸; 正交试验; 超声提取

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0024-04

Optimization of Ultrasonic Extraction Technology and Content Determination of Total Triterpenoidic Acid from *Fomes officinalis*

Yunusjan TURAHUN^{1*}, Munire IBRAHIM², Turghun MUHAMMAD¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;

2. Urumqi Center for Disease Control and Prevention, Urumqi 830002, China)

[收稿日期] 20120416(021)

[基金项目] 新疆大学校院联合项目(XY110115);新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2011211A015)

[通讯作者] *尤努斯江·吐拉洪,讲师,学士,从事天然产物活性成分研究,Tel:13139697591,E-mail:yunus858@sina.com

[参考文献]

[1] 王绍美,何照范,郁建平. 木瓜营养成分分析[J]. 营养学报,2000,22(2):190.

[2] 郭学敏,洪永福. 皱皮木瓜化学成分的研究[J]. 中草药,1997,28(10):584.

[3] 查孝柱,谢晓梅,吕美红,等. 含齐墩果酸和熊果酸的10种果实类中药HPLC分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):60.

[4] 吴虹,魏伟,吴成义. 木瓜化学成分及药理活性的研究[J]. 安徽中医学报,2004,23(2):62.

[5] 殷彪,严红光,何波,等. 正交法优选宣木瓜叶齐墩果酸回流提取工艺[J]. 食品科技,2006,31(10):101.

[6] 李海鹏,徐怀德,孟祥敏,等. 光皮木瓜齐墩果酸超声波辅助提取及纯化工艺[J]. 农业工程学报,2008,24(10):222.

[7] 董海丽,陈怡平. 超高压提取木瓜中齐墩果酸的研究

[J]. 食品与发酵工业,2007,33(11):125.

[8] 丁之恩,殷彪,周根土,等. 利用微波辅助提取宣木瓜叶中活性物质的研究[J]. 经济林研究,2007,24(4):14.

[9] 谷满仓,钱亚芳,李大鹏. 超临界流体分离技术提取中药活性成分的研究进展[J]. 中国药业,2009,18(16):21.

[10] 熊清平,张强华,蒋长兴,等. 花生壳中木犀草素的超临界CO₂萃取工艺研究[J]. 食品科技,2011,36(12):241.

[11] 王岱杰,王晓,耿岩玲,等. 反相高效液相色谱测定不同品种皱皮木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 食品科学,2008,29(10):97.

[12] 韦建华,李耀华,蔡少芳,等. HPLC测定柿子中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):48.

[责任编辑 全燕]