

均匀设计法优化荷叶超临界 CO₂ 萃取工艺及萃取物 GC-MS 分析

尹慧晶¹, 钱一帆², 濮存海^{1*}

(1. 南京中山制药有限公司, 江苏南京 210012; 2. 南京中科生化技术有限公司, 江苏南京 210008)

摘要 目的: 研究超临界 CO₂ 萃取荷叶最佳萃取工艺及其萃取物的化学成分。方法: 采用均匀设计法以萃取压力、萃取温度、萃取时间为因素, 考察超临界 CO₂ 萃取荷叶的最佳萃取工艺条件并对萃取物进行 GC-MS 分析。结果: 最佳萃取工艺为: 萃取压力 26 MPa 萃取温度 40℃, 萃取时间 90 min, 并且从萃取物中分离出 37 个可识别峰, 共鉴定 26 个成分, 主要成分为 1-乙基-1H-吡咯-2-甲醛。结论: 采用均匀设计方法可以快速、准确地确定超临界 CO₂ 萃取技术萃取荷叶的最佳工艺, 为荷叶进一步开发利用提供实验依据。

关键词 荷叶; 超临界 CO₂ 萃取; 均匀设计; GC-MS 分析

中图分类号 R284.2 **文献标识码** A **文章编号** 1001-4454(2007)04-0464-03

Optimize the Extraction Process with Supercritical CO₂ Fluid from Lotus Leaves by the Uniform Design and Analysis on the Chemical Constituents by GC-MS

YIN Hui-jing¹, QIAN Yi-fan², PU Cun-hai¹

(1. Technology Centre of Nanjing Zhongshan Pharmaceutical Co. Ltd. Nanjing 210012, China; 2. Nanjing Zhongke Biochemical Technology Co. Ltd. Nanjing 210008, China)

Abstract Objective: To study the optimum parameters of the supercritical CO₂ fluid extraction of lotus leaves and chemical constituents of extractive matters. Methods: Supercritical CO₂ fluid extraction condition was selected by uniform design. The extraction pressure, extraction temperature, extraction time were three factors in the experiment. GC-MS was applied for analysing the extraction. Results: The optimum condition were obtained: the extraction pressure was 26 MPa, the extraction temperature was 40℃, the extraction time was 90 minutes. The major constituent was 1-ethyl-1H-pyrrole-2-carboxaldehyde in extractive matters. Conclusion: Uniform design can optimize the CO₂ Supercritical Fluid Extraction process quickly and accurately with satisfactory results.

Key words Lotus leaves; SFE-CO₂; Uniform desing; GC-MS

荷叶, 为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶, 始载于《本草纲目》, 味苦, 平, 无毒。《中国药典》2005 版记载有“清热解暑, 升发清阳, 凉血止血”的功效^[1]。荷叶气味清香怡人, 在食用和药用两方面都具有广泛的应用^[2]。人们常用它包裹食物, 味美可口的同时还能够清热祛湿、利水消肿, 而且市场上大部分减肥降脂保健茶中都含有荷叶。药理实验证明荷叶超临界 CO₂ 萃取物还有醒脾开胃, 促进食物消化的功能。荷叶的化学成分已多有报道^[3], 荷叶中多含莲碱、荷叶碱、原荷叶碱、亚美罂粟碱、前荷叶碱、槲皮素、柠檬酸等成分, 但对于荷叶萃取物成分提取分析鲜有报道^[4, 5], 本试验采用均匀设计方法优化荷叶超临界 CO₂ 萃取工艺, 并对萃取物进行 GC-MS 分析。

1 材料与仪器

1.1 材料 荷叶药材, 购自安徽亳州市药材公司, 经江苏省药品检验所中药室主任董小平教授鉴定为

为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶; CO₂ 为食品级 (南通市气体厂), 所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器 HA121-50-01 型超临界 CO₂ 萃取仪 (南通市华安超临界萃取有限公司); HP-6890/5973MSD 型色质联用仪 (美国惠普公司), NIST98 谱库。Agilent 7683 自动进样器。

2 方法与结果

2.1 超临界 CO₂ 萃取条件的筛选

2.1.1 试验方法: 将荷叶粉碎 (20 目), 称取一定量投入 1L 萃取釜中, 加热萃取釜和解析釜, 使达到预定温度, 送入一定流速的 CO₂ 气体, 调节各釜压力后开始循环萃取, 其中解析釜 I 的压力为 8±0.5 MPa 温度为 50℃; 解析釜 II 的压力为 5±0.5 MPa 温度为 35℃。各次试验中该条件保持不变, 按照均匀设计安排进行试验, 以萃取物得率为评价指标, 考察各因素水平对萃取效果的影响, 得出最佳工艺条

件。

2.1.2 均匀试验设计:通过预试验,发现对超临界CO₂萃取物得率影响最大的因素有萃取压力、萃取温度和萃取时间。我们选用均匀试验设计表 U₅(5³)进行最佳萃取工艺的筛选。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 均匀设计试验因素水平表			
实验号	因素 1	因素 2	因素 3
1	1	2	4
2	2	4	3
3	3	1	2
4	4	3	1
5	5	5	5

表 2 均匀设计试验安排及结果表				
实验号	A 萃取压力 (MPa)	B 萃取温度 (℃)	C 萃取时间 (m in)	萃取物 得率(%)
1	18	42	75	5.73
2	20	46	60	1.97
3	22	40	45	6.69
4	24	44	30	3.16
5	26	48	90	2.93

2.1.3 超临界 CO₂ 萃取结果与数据处理:用均匀设计软件 2.20 对均匀设计实验结果进行回归分析,回归数学模型为: $Y = 5.85 + 0.396X_1 - 1.67X_2 + 0.695X_3$, 相关系数 $r = 0.9995$; 回归显著性检验见表 3。

表 3 变量分析表				
变异来源	平方和	自由度	均方	均方比
回归	U=16.1	K=3	U/K=5.38	F=406.8
剩余	Q=0.0132	N-1-K=1	U/(N-1-K)=0.0132	
总和	L=16.2	N-1=4		

样本容量 N=5, 显著性水平 $\alpha = 0.05$, 剩余标准差 $S = 0.115$, F 检验值 $F_t = 406.8 > F$ 检验临床值 $F(0.05, 3, 1) = 215.71$, 回归方程显著。即荷叶最佳萃取工艺条件:萃取压力 26 MPa 萃取温度 40℃, 萃取时间 90 m in。为了验证此结果的准确性,我们在最佳条件下做了 3 次追加验证试验,萃取物得率分别为 6.93%、7.01% 和 7.23%, 平均萃取率为 7.06%。

2.2 荷叶萃取物的 GCMS 分析

2.2.1 气相色谱条件:玻璃毛细管柱 HP-5 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 载气为氦气, 流量为 40 ml / m in; 柱升温程序, 起始温度 50℃ 保持 1 m in 以 4℃ / m in 速度升至 260℃, 保持 15 m in; 进样量 2 μl 进

样口温度 280℃, 分流比: 10:1。

2.2.2 质谱条件:离子源为 EI 电离电压: 70 eV; 离子源温度: 230℃; 质谱范围: 50~500 aum; 四极杆温度: 150℃, 溶剂延迟时间: 2.5 m in。

2.2.3 按照上述的 GC-MS 条件对荷叶萃取物进行分析, 得到总离子流图, 用峰面积归一化法确定各组分在萃取物中的质量分数。每个组分的质谱图经计算机质谱库检索, 结果见表 4。

表 4 荷叶萃取物的化学成分表				
峰号	保留 时间 (m in)	化合物	相对 含量 (%)	符合度 (%)
1	8.486	柠檬烯	7.96	97
2	9.371	2,7-二甲基十一烷	0.82	96
3	9.377	3,3-二甲基正己烷	1.36	93
4	12.760	甲氧基环己烷	0.21	90
5	16.732	廿四烷	1.08	92
8	22.268	石竹烯	0.26	97
9	23.286	2,3,4-三甲基己烷	0.27	93
10	23.360	3,3-二甲基己烷	0.37	93
11	23.526	十九烷	1.51	97
12	23.652	3-乙基-5-(2-乙基丁基)-十八烷	0.65	93
13	24.103	2,5-对二叔丁基苯酚	9.01	3
14	24.863	2,4,6-三甲基辛烷	0.53	99
16	26.589	四十三烷	0.83	93
17	29.080	1-乙基-1H-吡咯-2-甲醛	14.93	92
18	29.286	2,3,4-三甲基己烷	0.21	88
19	29.378	3-乙基-3-甲基庚烷	0.37	93
20	29.618	廿八烷	1.50	88
23	31.063	十四烷酸	2.21	93
26	36.132	正十六酸	13.17	98
27	39.532	叶绿醇	3.45	99
28	40.138	9,12,15-三烯十八酸甲酯	10.89	99
29	42.692	γ-谷甾醇	7.25	92
31	47.184	5,6,6a,7,4H-10,11-甲氧基-6-甲基-4H-二苯并[de,g]喹啉	3.09	87
32	55.052	廿三烷	2.76	93
36	60.664	卅五烷	5.08	94
37	61.653	维生素 E	2.97	97

2.2.4 荷叶萃取物在不同溶剂中溶解性能比较:将荷叶萃取物分别溶解于丙酮、乙醚、乙酸乙酯中,按照上述的 GC-MS 条件进行分析, 得到总离子流图。结果荷叶在丙酮及乙酸乙酯中溶解出的成分较多, 在乙醚中溶解所得产物较少, 因此本试验选择乙酸乙酯为溶剂。

3 讨论

3.1 采用超临界 CO₂ 萃取技术获得荷叶萃取物得率高,速度快,并且无污染。但据文献^[4]报道,荷叶挥发性成分颜色为黄色油状液体,本试验使用超临界 CO₂ 萃取技术萃取荷叶挥发性成分时,所得萃取物的颜色表现为青绿色,这是由于超临界状态下 CO₂ 的溶解能力和渗透能力比较强,扩散速度快,而且是在连续动态条件下进行,萃取物中可能同时包含沸点高、挥发性小的脂溶性物质。

3.2 分析结果表明,用 GC-MS 对荷叶萃取物分离测定和结构鉴定,结果共分离出 37 个可识别峰,鉴定出 26 种化学成分,主要为单萜类化合物、饱和脂肪酸、生物碱及脂肪烃类化合物,共占总峰面积的 92.97%,其中 1-乙基-1H-吡咯-2-甲醛的含量最高。经 GC-MS 分析,荷叶中挥发性成分比较少,而且浓度低,因此在进样分析时需要调节分流比较低,进样量较高。

3.3 曾虹燕^[5]等人设计了 3 因素 4 水平的正交实验探讨超临界 CO₂ 萃取荷叶挥发油工艺,实验所选取的工艺参数为:萃取压力、萃取温度和 CO₂ 流量。

本实验通过预试验表现 CO₂ 流量对萃取物得率的影响极不显著,考虑到工业大生产的需要,将萃取时间作为因素进行考察,并且采用均匀设计方法设计了 3 因素 5 水平实验。均匀设计法的长处在于能从尽可能少的试验次数中揭示出因素与指标间的规律,因此,本实验在探讨的条件范围增大的基础上减少了试验次数,获得满意的结果,为荷叶进一步开发利用提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会·中国药典·一部·北京:化学工业出版社,2005;195.
- [2] 刘淑萍,樊淑彦,侯海妮·荷叶化学成分及药理作用研究进展·河北医科大学学报,2005,25(4):254-256.
- [3] 郑虎古,董泽宠,余靖,等·中药现代研究与应用·北京:学苑出版社,1998;3587.
- [4] 曾虹燕,苏杰龙,方芳,等·不同方法提取的荷叶挥发油化学成分分析·西北植物学报,2005,25(3):578-582.
- [5] 曾虹燕,冯波,方芳,等·超临界 CO₂ 萃取荷叶挥发油工艺的研究·中南林学院学报,2005,25(2):42-45.

(2006-09-28 收稿)

LSA-20 树脂吸附分离箭叶淫羊藿黄酮的研究

谢娟平,孙文基*

(西北大学 陕西省生物医药重点实验室,陕西西安 710069)

摘要 目的:研究 LSA-20 大孔吸附树脂吸附纯化箭叶淫羊藿黄酮的工艺条件。方法:以 UV 和 TLC 为检测方法,考察 LSA-20 大孔吸附树脂对箭叶淫羊藿黄酮的吸附和洗脱条件,并采用 UV 法测定各提取物中淫羊藿黄酮的含量。结果:LSA-20 大孔吸附树脂纯化淫羊藿黄酮的动态吸附容量为 15.3 mg/ml 提取物总黄酮含量可达 66.5%,提取率为 6.35%。结论:LSA-20 大孔吸附树脂能有效富集并纯化淫羊藿黄酮,85%乙醇可将绝大部分淫羊藿黄酮洗脱,具有工艺简便、快捷,产物纯度高,产率高的优点。

关键词 LSA-20 大孔树脂;箭叶淫羊藿;黄酮;吸附分离

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4454(2007)04-0466-03

大孔吸附树脂广泛用于药物的纯化,LSA-20 大孔吸附树脂为非极性树脂,在黄酮的纯化方面未见报道。淫羊藿是一种常用中药,药理实验表明,其具有抗骨质疏松、抗衰老、抗炎和雄性激素样作用等多种药理作用^[1]。箭叶淫羊藿为药典收载的淫羊藿品种之一。本实验对 LSA-20 大孔吸附树脂吸附分离和洗脱箭叶淫羊藿黄酮进行研究,建立了 LSA-20 大孔吸附树脂纯化淫羊藿黄酮的工艺条件。

1 仪器与材料

仪器:UV-2200 紫外分光光度仪(日本岛津);电子分析天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司)。树脂:LSA-20 大孔吸附树脂(西安蓝深有限公司)。

对照品:淫羊藿甙对照品(中国药品生物制品鉴定所)。试剂:所用试剂均为分析纯。

药材:箭叶淫羊藿,采于大巴山,经安康市药品检验所鉴定为箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum*)