

超临界CO₂萃取柴达木枸杞籽油工艺 与籽油成分研究

李国梁^{1,2}, 史俊友^{1,2}, 孙志伟^{1,2}, 王洪论¹, 索有瑞¹, 刘永军^{1,*}

(1中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:采用 L₉(3⁴)正交实验与单因素实验相结合的方法, 考察了萃取温度、压力、CO₂ 流量、时间等对超临界 CO₂ 萃取枸杞籽油出油率的影响, 优化了枸杞籽油的萃取工艺, 得出最佳工艺条件: 温度 45 ℃, 流量 30L/h, 压力 30MPa, 提取时间 60min, 在最佳工艺条件下枸杞籽油出油率为 18.86%。采用 HPLC-APCI-MS柱前衍生法分析了枸杞籽油的组成, 测得枸杞籽油中不饱和脂肪酸占 89.01%, 其中亚油酸与油酸含量最高, 分别占 63.05%和 21.13%。
关键词:超临界 CO₂ 萃取, 柴达木枸杞, 籽油, 正交实验, HPLC-APCI-MS分析

Study on the supercritical CO₂ extraction techniques and composition of seed oil from Qaidam Basin *Lyceum Barbarum*

LI Guo-liang^{1,2}, SHI Jun-you^{1,2}, SUN Zhi-wei^{1,2}, WANG Hong-lun¹, SUO You-ru¹, LIU Yong-jun^{1,*}

(1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;
2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Orthogonal tests L₉(3⁴) were used to investigate the effects of extraction temperature, pressure, CO₂ flux, extraction time on the yield of *Lyceum Barbarum* seed oil when the oil was extracted by supercritical fluid of carbon dioxide. The optimum parameters obtained from the results of orthogonal tests were as follows: extraction temperature 45 ℃, CO₂ flux 30L/h, pressure 30MPa, extraction time 60min. The yield of *Lyceum Barbarum* seed oil with supercritical CO₂ extraction was 18.86% under optimum condition. The content of the oil from *Lyceum Barbarum* seed was determined by HPLC-APCI-MS, with the unsaturated fatty acids being 89.01%, among which the linoleic acid and oleic acid were 63.05% and 21.13%, respectively.

Key words: supercritical CO₂ extraction; *Lyceum Barbarum* from Qaidam Basin; seed oil orthogonal test analysis by HPLC-APCI-MS

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2010)05-0257-04

枸杞是茄科植物枸杞 (*Lyceum barbarum*) 的成熟干燥果实^[1], 现宁夏、青海、山东、河南等地都有种植。1988年我国卫生部正式公布枸杞既是食品又是药品。枸杞在祖国传统医学中具有重要的地位, 其药用价值备受历代医家的推崇。枸杞籽为枸杞加工中的副产品, 占整粒的 3%, 加工 1t 鲜果可得枸杞籽 30kg。枸杞籽油系枸杞籽经压榨或萃取等方法精制而成, 油中含有大量的不饱和脂肪酸、V_E 及磷脂。枸杞籽油除了有食用价值外, 还有医疗保健作用, 可以用于对高血压、高血脂、动脉粥样硬化等心脑血管疾病的辅助治疗^[2]。超临界 CO₂ 流体萃取 (SFE-CO₂) 技术广泛应用于医药、食品、化工等领域。该工艺操

作方便, 且 CO₂ 无毒、无味、价廉易得、不易燃, 既可以保证提取的天然产物中无溶剂残留, 又可充分保持其活性^[3]。超临界萃取籽油的报道已经很多, 但对枸杞籽油的提取研究报道很少, 主要集中在理论数值模拟^[4]与简单的单因素实验研究等方面^[5-6], 而通过正交实验优化枸杞籽油的超临界 CO₂ 萃取工艺的研究未见报道。本实验对影响枸杞籽油的超临界萃取的主要因素进行研究, 并通过正交实验对萃取工艺进行了优化, 得到超临界萃取柴达木枸杞籽油的最佳工艺。脂肪酸分析方法已有大量报道, 最常见的是 GC-MS 法。但由于脂肪酸在紫外-可见光区吸收较弱, 光度法难以准确测定, 国外陆续报道了具有较高灵敏度的高效液相色谱荧光检测法 (HPLC-FLD), 荧光试剂主要有溴代香豆素类化合物^[7]和重氮甲烷类^[8]化合物。然而这些化合物不稳定, 本实验采用自制的新型荧光试剂 1, 2-苯并-3, 4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸酯 (BDETS)^[9]作为衍生化试剂, 以 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 作溶剂, 在 90 条

收稿日期: 2009-07-20 *通讯联系人

作者简介: 李国梁 (1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事天然产物化学研究。

基金项目: 中国科学院百人计划项目资助。

件下以 K_2CO_3 作催化剂,可获得稳定的荧光产物。采用梯度洗脱实现了枸杞籽油中脂肪酸衍生物的基线分离,并对籽油组成进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枸杞籽 柴达木枸杞榨汁后分离出来,晾干,粉碎后过筛; CO_2 纯度为 99.99%;水为 Milli-Q Gradient 去离子水;1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸酯(BDETS)自制;乙腈 色谱纯,德国 Merck 公司;N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 经减压蒸馏后使用。

超临界萃取装置 型号:HA221-50-06,江苏南通华安超临界萃取有限公司;粉碎机 9FZ-19型齿爪式粉碎机,四川省井研县永兴机械厂;土壤分析筛

南京土壤仪器厂;Agilent1100型高效液相色谱-质谱联用仪 Agilent公司,配备四元梯度泵;Elipse XDB-C8 色谱柱 4.6 ×150mm, 5 μ m, Agilent公司;Agilent 1100 Series LC /MSD Trap 配备大气压化学电离源(APCI)在线真空脱气机,荧光检测器,100位自动进样器。

1.2 实验方法

1.2.1 超临界提取 称取枸杞籽 400g,装入 2L 萃取釜内进行超临界 CO_2 萃取,打开 CO_2 贮气罐,对萃取釜进行加压,当萃取釜压力达到所需压强时,打开控制分离釜 I 和分离釜 II 压力的阀门,分别调整分离釜 I 的压力为 5~7MPa,分离釜 II 的压力为 4~5MPa,同时调节 CO_2 流量,保持温度和压力,每隔 15min 收集一次萃取物,称重,计算出油率。

$$\text{出油率} = \frac{\text{萃取所得籽油重量 (g)}}{\text{萃取所用原料的重量 (g)}} \times 100\%$$

1.2.2 正交实验设计 温度、压力、 CO_2 流量、时间、粒径是超临界萃取主要影响因素。本文首先通过粒径单因素实验确定最佳粒径,然后选取温度、压力、 CO_2 流量、时间作为影响因素,利用 $L_9(3^4)$ 的正交表设计正交实验,然后确定最佳工艺(因素及水平见表 1),共完成 9 组实验,每组实验重复 3 次取平均值。

表 1 正交实验因素水平表

水平	因素			
	A 温度 ($^{\circ}C$)	B CO_2 流量 (L/h)	C 压力 (MPa)	D 时间 (min)
1	40	20	20	20
2	45	30	25	40
3	50	40	30	60

1.2.3 枸杞籽油的分析 利用本课题组合成的荧光衍生试剂 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸酯(BDETS)作为脂肪酸柱前衍生化试剂,采用 HPLC-APCI-MS 法对枸杞籽油中脂肪酸进行分析。

脂肪酸皂化处理:取 100mg 枸杞籽油于具塞试管中,加入 1.0mL 2mol/L KOH 的乙醇溶液,充氮密封后,在 100 $^{\circ}C$ 水浴反应 0.5h,取出冷却至室温。滴加 2.0mol/L HCl 至 pH2.0,加入 500 μ L 正己烷超声处理 2min,静止分层,用注射器吸掉水层后,用去离子水洗至 pH7.0。氮气吹干,残余物重新溶解在 500 μ L 的乙腈中。

脂肪酸的衍生如图 1 所示,向盛有 10mg 无水 K_2CO_3 催化剂的 2mL 安培瓶中依次加入 180 μ L DMF, 50 μ L 混合脂肪酸的提取样, 120 μ L 衍生试剂溶液 (5.0×10^{-3} mol/L), 封口后于 90 $^{\circ}C$ 恒温水浴下振荡反应 45min,取出放冷后,加入 1000 μ L 乙腈水溶液 ($CH_3CN/H_2O, 1:1, V/V$) 稀释后进样 10 μ L 分析。

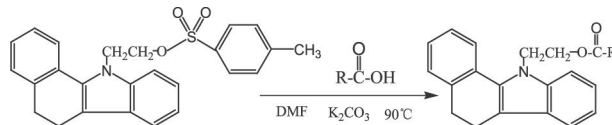


图 1 BDETS与脂肪酸衍生过程

Elipse XDB-C8 (4.6 ×150mm, 5 μ m, Agilent 公司)梯度洗脱:A 流动相:50%乙腈水溶液,B 流动相:100%乙腈。0到 50min,从 A 变到 B,然后运行 B 流动相 10min。检测波长:激发:279nm,发射:380nm。大气压化学电离源,正离子模式,雾化气:60psi,干燥温度 350 $^{\circ}C$,气化温度 450 $^{\circ}C$ 。

脂肪酸的含量确定方法:采用面积归一化方法(以峰值面积的百分比表示),计算各组分物质的量百分比。脂肪酸的衍生物通过柱后在线 APCI-MS/MS 鉴定^[10]。

2 结果与讨论

2.1 超临界 CO_2 萃取枸杞籽油工艺的确定

2.1.1 粒径对出油率的影响 物料粒径对超临界流体萃取的影响主要体现在以下三个方面:有效传质面积、颗粒床层的空隙率和超临界流体的渗透力。减小颗粒粒度将会增大颗粒群的比表面积,且超临界流体容易渗透到颗粒内部,有利于提高出油率。但粒度太小,颗粒间的接触面积将大大增加,致使有效传质面积降低,出油率降低;同时由于颗粒床层空隙率降低,将产生严重的“沟流”现象,对萃取操作极为不利。不同粒径得到的出油率见图 2。可以看出,粒径从 20~60 目出油率逐渐增加,但从 60~100 目出油率变化很小,而且当粒径小于 60 目时筛选比较困难,因此,我们选择粉碎粒径为 60 目进行以后的实验。

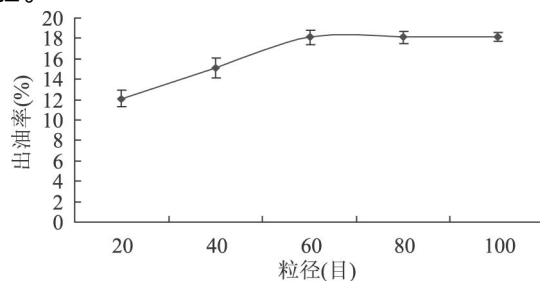


图 2 粒径对出油率的影响

2.1.2 萃取时间对出油率的影响 时间单因素实验结果见图 3,可以看出,枸杞籽油的出油率随萃取时间的延长而增加,但当时间延长至 40min 时,出油率增加幅度明显减小,当时间延长至 60min 时,出油率增加幅度变得更小,萃取时间超过 60min 出油率增长不明显。考虑到效率及成本等因素,正交实验时间范围选择在 60min 以内。

2.1.3 正交实验优化工艺 根据 $L_9(3^4)$ 的正交表设计的正交实验进行四因素三水平的实验,结果如表 2。

表 4 枸杞籽油中各种脂肪酸含量

峰号	脂肪酸	保留时间 (min)	峰面积	碎片离子峰	特征离子峰	百分含量 (%)
1	-亚麻酸	44.86	748.9	521.7	264.1, 246	1.01
2	-亚麻酸	45.23	1960.0	521.7	264.1, 246	2.82
3	棕榈油酸	46.69	341.2	497.6	264.1, 246	0.49
4	亚油酸	47.35	43824.6	523.7	264.1, 246	63.05
5	软质酸	49.28	5100.6	499.6	264.1, 246	7.34
6	油酸	49.75	14688.8	525.7	264.1, 246	21.13
7	硬脂酸	51.95	2442.4	527.6	264.1, 246	3.50
8	花生烯酸	54.38	396.3	555.7	264.1, 246	0.57

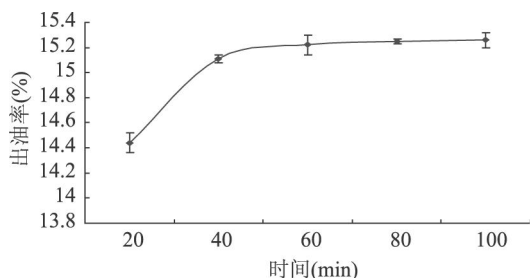


图 3 萃取时间对出油率的影响

表 2 正交实验结果及数据分析

实验号	A	B	C	D	出油率 (%)
1	1	1	1	1	7.94
2	1	2	2	2	13.43
3	1	3	3	3	18.74
4	2	1	2	3	17.11
5	2	2	3	1	17.66
6	2	3	1	2	15.52
7	3	1	3	2	18.56
8	3	2	1	3	15.59
9	3	3	2	1	12.02
k_1	13.37	14.54	13.01	12.54	
k_2	16.76	15.56	14.19	15.84	
k_3	15.39	15.43	18.32	17.14	
R	3.39	1.020	5.31	4.60	

从表 3 方差分析可知,压力的差异最大,呈显著水平 ($P < 0.05$),而温度、流量、时间在选定的实验范围内未呈现显著水平,因此压力是影响出油率的最主要因素,温度、流量、时间对出油率影响相对较小,而通过对各个因素的极差分析得出,各因素对出油率的影响程度从高到低依次为:压力 > 时间 > 温度 > 流量。由表 2 可知,当萃取温度在 45 时出油率达到最高值,当温度再升高时出油率减小,因为低于 45 时,温度的升高使得物质在超临界 CO_2 中的溶解度增高;但是当温度继续升高时, CO_2 的密度降低,其溶解能力相应降低,使得枸杞籽油出油率下降,因此最佳萃取温度为 45。当流量在 30L/h 时出油率最高,当流量再增大时出油率降低,因此最佳萃取流量为 30L/h。枸杞籽油的出油率随萃取时间的延长而增加,但当时间延长至 40min 时油的出油率增加幅度减小,在工业生产中考虑到效率和成本因素,应选择 60min。当压力从 20MPa 升高到 30MPa 时,出油率一直升高,从 13.01% 增至 18.32%,因为萃取压力增加,使超临界 CO_2 的密度增大,籽油溶解度增大,有利于油的萃取。但当压力较高时,动力消耗必然增加,同时也增加了不安全因素,因此在萃取的过程中选择的最终萃取压力为 30MPa。由以上分析得出最佳提取工

艺,即温度 45,流量 30L/h,压力 30MPa,萃取时间 60min,在最佳萃取条件下出油率为 18.86%。

表 3 正交实验方差分析

方差来源	离差平方和 SS	自由度 df	均方 S	F 值	P 值
A	17.481	2	8.741	9.413	0.096 > 0.05
C	46.579	2	23.289	25.082	0.038 > 0.05
D	33.805	2	16.903	18.203	0.052 > 0.05
误差	1.857	2	0.929	-	-

2.2 枸杞籽油的组成分析

质谱数据表明,所有的枸杞籽油衍生物表现出强烈的分子离子峰,其质量数为 $m/z [MH]^+$,分子离子碰撞裂解后产生的 m/z 246 和 264.1 碎片峰为衍生试剂分子的母核结构的特征峰(见图 4),其中 m/z 264.1 为脂肪酸衍生物裂解的特有离子峰。图 5 为籽油的衍生物色谱分离图,通过柱后在线质谱鉴定,在色谱图中前 40min 没有出现脂肪酸衍生物的色谱峰,40~60min 内出现的为脂肪酸衍生物的色谱峰,故对色谱窗口 40~60min 内对荧光相应信号作面积归一化,得到各个峰的面积以及相对百分含量,柴达木枸杞籽油中脂肪酸组成见表 4。柴达木枸杞籽油中含有 8 种脂肪酸,其中不饱和脂肪酸占 89.01%,其中亚油酸 (C_{182}) 与油酸 (C_{181}) 含量最高,分别为 63.05% 和 21.13%。不同产地的枸杞籽油分析见表 5,数据表明不同产区枸杞籽中都含有大量的不饱和脂肪酸,主要为亚油酸 (C_{182}) 和油酸 (C_{181})。宁夏枸杞籽油中含有 6 种脂肪酸,柴达木枸杞籽中比宁夏枸杞籽中多检出 -亚麻酸 (C_{183}) 和软脂酸两种脂肪酸,其含量分别为 1.01% 和 7.34%。

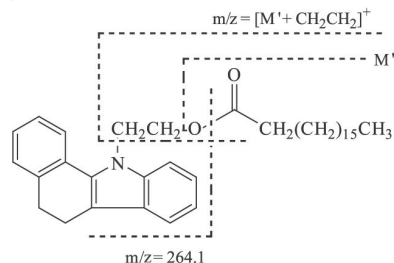


图 4 脂肪酸与 BDETS 衍生物的质谱裂解模式

3 结论

本研究通过正交实验对超临界萃取柴达木枸杞籽油提取工艺进行了优化,得到了高效、充分、快速的最佳萃取工艺:粒径 60 目,温度 50,流量 30L/h,压力 30MPa,提取时间 60min。最佳提取条件下出油率为 18.86%。通过 HPLC-APCI-MS 柱前衍生法分

(下转第 263 页)

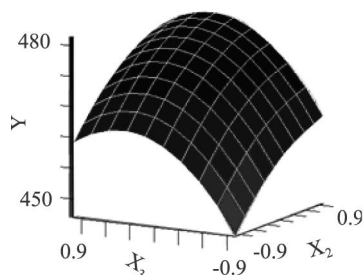


图 10 超声提取温度和时间对三萜提取率影响的响应面图
提取含量为 476μg/g(干重)。

为验证响应面法的可靠性,根据上述得到的最佳提取条件进行提取的验证实验,最终得到三萜实际提取率为 469μg/g,与理论值相差 0.7μg/g,因此,响应面法对灵武长枣三萜类化合物提取条件的优化是可行的,具有实际的应用价值。

3 结论

根据单因素实验和响应面分析法研究显示,超声波提取灵武长枣三萜类化合物的最佳工艺条件为:提取溶剂为 80%的乙醇,预浸时间为 20min,液固比 28:1,超声波功率为 400W、超声提取温度 65℃、时间 22min,提取 2 次。最佳工艺条件下的验证实验表明:灵武长枣三萜类化合物平均提取率可以达到 469μg/g。

参考文献

[1] 万德光, 黄林芳, 裴瑾. HPLC法测定川产苦丁茶中有效成

分齐墩果酸的含量 [J] 成都中医药大学学报, 2003, 26 (4): 43- 46.
[2] 曹艳萍, 杨秀利, 薛成虎. 红枣中齐墩果酸提取工艺的研究 [J] 食品科学, 2007, 28 (10): 165- 168.
[3] 吕杏放, 朱文斌, 杨卓荣, 等. 超声提取夏枯草中总三萜类成分的研究 [J] 数理医药学杂志, 2008, 21 (2): 202- 205.
[4] 李国章, 于华忠, 卜晓莹, 等. 分光光度法测定湘产苦丁茶中熊果酸含量 [J] 光谱实验室, 2006, 23 (2): 401- 403.
[5] 谭文广, 刘伟, 鲁菲菲, 等. 女贞子中三萜化合物的提取与含量测定 [J] 食品科学, 2006, 27 (11): 260- 264.
[6] 周俐斐, 芦柏震, 侯桂兰. 中药三萜类化合物的提取分离及测定方法研究进展 [J] 中药与天然药物, 2007 (3): 62- 65.
[7] 吕杏放, 朱文斌, 杨卓荣, 等. 超声提取夏枯草中总三萜类成分的研究 [J] 数理医药学杂志, 2008, 21 (2): 202- 205.
[8] 黎海彬, 张敏, 王崑, 等. 植物三萜皂苷的提取分离技术 [J] 食品工业科技, 2006, 27 (1): 201- 203.
[9] 许丽娜, 蔡博能, 尹连红, 等. 比色法测定大麻药及其提取物中总皂苷的含量 [J]. 大连医科大学学报, 2007, 5 (29): 448- 452.
[10] 秦学会, 阮美娟, 赵龙, 等. 响应面法优化超声波水提马齿苋黄酮的工艺 [J]. 天津科技大学学报, 2009, 24 (1): 19- 25.
[11] 王明艳, 杨凡, 李燕, 等. 响应面法优化百部多糖提取条件研究 [J] 食品科学, 2009, 30 (6): 80- 83.

(上接第 259 页)

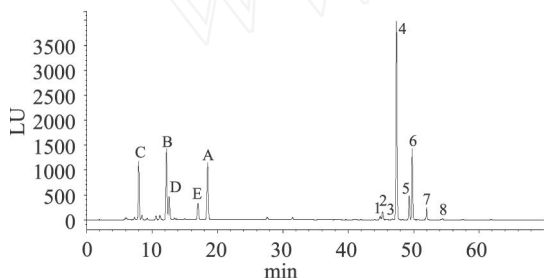


图 5 枸杞籽油衍生物的色谱分离图

A: 过量的衍生试剂 (苯并吡啶 - 9-乙氧基对甲苯磺酸酯);
B: 副产物苯并吡啶 - 9-乙醇; C、D、E: 未鉴定。

表 5 不同产地的枸杞籽油的组成对比分析

脂肪酸含量 (%)	柴达木枸杞	宁夏枸杞 ^[5]	宁夏枸杞 ^[6]
-亚麻酸	1.01	-	-
亚麻酸	2.82	2.80	3.40
棕榈油酸	0.49	6.10	7.30
亚油酸	63.05	68.30	67.80
软质酸	7.34	-	-
油酸	21.13	19.10	16.80
硬脂酸	3.50	3.00	3.20
花生烯酸	0.57	0.68	1.50

析了柴达木枸杞籽油的组成,其中不饱和脂肪酸占 89.01%,其中亚油酸(C_{18:2})与油酸(C_{18:1})含量最高,分别为 63.05%和 21.13%,检测出宁夏枸杞籽油中所没有的两种脂肪酸 - 亚麻酸(C_{18:3})和软脂酸,其含量分别为 1.01%和 7.34%。说明柴达木枸杞籽油是一种较为理想的食用保健油,具有极大的开发价值。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M] 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2000: 202.
[2] 苏宇静, 王辉. 枸杞籽油的开发应用 [J] 中国油脂, 2004 (8): 56- 58.
[3] Stahl E, Quirin K W, Gerard D. Dense Gases for Extraction and Refining [M]. Heidelberg: Springer- Verlag Press, 1988.
[4] 陈淑花, 刘学武. 超临界二氧化碳萃取枸杞籽油的实验研究与数值模拟 [J] 化学工业与工程技术, 2004, 25 (5): 11- 13.
[5] 潘太安, 刘敦华, 毛忠英, 等. 超临界 CO₂萃取枸杞籽油的研究 [J] 宁夏大学学报: 自然科学版, 2000, 21 (2): 156- 158.
[6] 白寿宁. 超临界 CO₂萃取枸杞籽油的研究 [J] 包装与食品机械, 2000, 18 (1): 18- 22.
[7] Takadate A, Masuda T, Murata C, et al. 3-Bromoacetyl- 6, 7-methylenedioxy coumarin as a highly reactive and sensitive fluorescence labeling reagent for fatty acids [J] Anal Sci, 1992, 8: 695- 697.
[8] Yoshida T, Uetake A, Yamaguchi H, et al. New preparation method for 9-anthryldiazomethane (ADAM) as a fluorescent labeling reagent for fatty acids and derivatives [J] Anal Biochem, 1988, 173: 70- 74.
[9] Wang H, Suo Y, Wang X. Extraction of Nitaria tangutorum seed oil by supercritical carbon dioxide and determination of free fatty acids by HPLC/APCIMS with fluorescence detection [J]. Separation and Purification Technology, 2007, 56 (3): 371- 377.
[10] 丁养军, 赵先恩. 液相色谱/质谱大气压化学电离源鉴定深海鱼油中中长链不饱和脂肪酸 [J] 分析化学, 2007 (3): 375- 381.