

超临界 CO₂ 萃取薄荷总黄酮的工艺研究

华燕青 王云云 李娟丽

(杨凌职业技术学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 目的:确定超临界CO₂萃取薄荷中总黄酮的最佳萃取工艺条件。方法:在单因素实验基础上,采用正交试验法,以总黄酮提取率为评价指标,研究了夹带剂组成、萃取压力、萃取温度、夹带剂用量、萃取时间对薄荷总黄酮提取率的影响。结果:以70%乙醇为夹带剂时,提取率高,优化工艺条件为:夹带剂用量6mL/g,萃取压力25MPa,萃取温度55℃,萃取时间90min。结论:超临界CO₂萃取方法具有工艺简便、产品纯度好、提取率高的优点。

关键词 薄荷 超临界CO₂萃取 总黄酮 萃取工艺 正交试验

中图分类号 R282.71 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2018)03-0076-03

基金项目 杨凌职业技术学院科学研究基金(A2015049)

薄荷为唇形科植物薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)的干燥地上部分,具有疏散风热、清利头目、利咽、透疹、疏肝行气的功效^[1],其主要化学成分有挥发油、黄酮类、萜烯类、酚酸类等^[2]。药理学研究表明,薄荷黄酮具有良好的抗病毒、抗氧化、抗炎等作用,其中含量较高的橙皮苷、香叶木苷、香蜂草苷、蒙花苷具有抗流感病毒、抗肿瘤、调节免疫力等良好的药理活性^[3]。目前薄荷中总黄酮的提取工艺主要采用了有机溶剂提取法和超声波提取法^[4-7],相对于这些提取方法,超临界CO₂萃取技术以超临界状态下的流体作为萃取剂,能有效从植物中萃取有效成分,具有萃取速度快、操作温度低、提取效率高、有机溶剂用量少等优点^[8],该技术已在植物黄酮类成分的提取中得到广泛应用^[9-10]。本研究采用超临界二氧化碳萃取技术对薄荷进行萃取,并探讨优化萃取工艺条件,以期对薄荷的进一步开发提供依据。

1 材料

1.1 仪器与设备 HA120-50-01型超临界萃取装置(江苏南通华安超临界萃取有限公司);UV1800紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);RA-52AA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);电子分析天平(常州科源电子仪器厂);KQ-100DE超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 药物与试剂 薄荷药材,购于北京同仁堂陕西经销部;二氧化碳,纯度99.5%,购于杨凌建一工业气体供应站;芦丁标准品(批号110753-201415)购于中国药品生物制品检定所;水为自制超纯水;无水乙醇、石油醚(30-60)、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠均为分析纯。

2 方法

2.1 薄荷总黄酮的提取方法 薄荷干燥茎叶粉碎过10目筛,准确称取干粉100g装入1L萃取釜中,启动冷循环,设定萃取与分离温度,达到设定温度后,打开钢瓶阀门,开启CO₂泵,CO₂经过滤后由压缩机压缩入萃取罐,达到设定压力,加入一定量的夹带剂进行超临界萃取,一定时间后收集萃取物,将萃取物用旋转蒸发器减压浓缩至膏状。所得膏状物用石油醚萃取除去脂溶性杂质,收集萃余相,用70%乙醇溶解,得总黄酮萃取溶液。

2.2 芦丁标准溶液的测定 吸收光谱的测定:准确称取干燥并恒重的芦丁标准品0.0121g,用70%的乙醇稀释定容至25mL量瓶中,摇匀,超声溶解,放冷,配成0.2mg/mL芦丁标准液。分别取2支25mL比色管,标记为1号、2号管。1号管作空白,准确吸取芦丁标准液1.0mL置于2号管中,两管各加入70%的乙醇至10.0mL,加入5%的亚硝酸钠1mL,摇匀,放置6min,加10%硝酸铝1mL,摇匀,放置6min,再加4%氢氧化钠10mL,加水至刻度,摇匀,放置15min。用1号管作空白对照,在190~600nm对2号管进行扫描,经过比较,确定其最佳吸收波长为510nm。

标准溶液工作曲线的绘制:准确吸取芦丁标准溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL,分别置于25mL量瓶中,按标准溶液相同方法显色,以70%乙醇为空白,在510nm下测定不同浓度标准溶液的吸光度,绘制标准曲线,得到吸光度(A)-芦丁标准溶液质量浓度(C)的回归方程: $A=14.859C-0.056$,相关系数 $r=0.9993$ 。

2.3 样品溶液的测定 准确吸取总黄酮萃取溶液各1.0mL置于25mL比色管中,采用与标准溶液相同的方法显色,测定总黄酮浓度,根据下式计算薄荷总黄酮提取率,式中C为总黄酮质量浓度(mg/mL),V为总黄酮萃取液体积(mL),m为薄荷原料质量(g)。

$$\text{提取率}(\%) = C \times V \times \text{稀释倍数} / m \times 10^{-3} \times 100\%$$

3 结果

3.1 夹带剂的选择 黄酮类成分极性较大,所以采用CO₂作为超临界流体进行萃取时需加入夹带剂。夹带剂种类首选乙醇,黄酮苷一般易溶于热水、甲醇、乙醇、稀碱液等强极性溶剂中。薄荷中含有大量的黄酮苷类物质,使用较大极性的溶剂提取效果较好^[7]。由于低浓度的乙醇在制冷过程中容易造成超临界流体萃取管路堵塞,因此选择50%、60%、70%、80%、90%乙醇为夹带剂,改变流体极性,进行超临界萃取,比较不同浓度乙醇对提取率的影响。

按照2.1项下的提取方法,控制萃取条件:萃取压力25MPa,萃取温度55℃,萃取时间60min,CO₂流量25L/h,夹带剂加入量600mL,考察总黄酮提取率的变化。结果表明采用70%乙醇体积分数时,总黄酮提取率最高,见表1,所以选定70%乙醇作为夹带剂进行超临界萃取。

表1 不同夹带剂对提取率的影响

夹带剂种类	50%乙醇	60%乙醇	70%乙醇	80%乙醇	90%乙醇
提取率(%)	2.25	2.71	3.62	3.47	2.16

3.2 单因素试验

3.2.1 夹带剂用量 按照2.1项下提取方法,在萃取温度55℃、萃取压力25MPa、萃取时间60min,以70%乙醇做夹带剂,分别按3、4、5、6、7mL/g加入夹带剂,考察不同用量的夹带剂对薄荷总黄酮提取率的影响。结果见图1。由图1可知,随着夹带剂用量的增加,总黄酮提取率逐渐增大,70%乙醇用量为6mL/g时的提取效果较好,用量增大后提取率变化不显著,进一步增大夹带剂用量会造成乙醇损耗增加,故选择6mL/g为适宜夹带剂加入量。

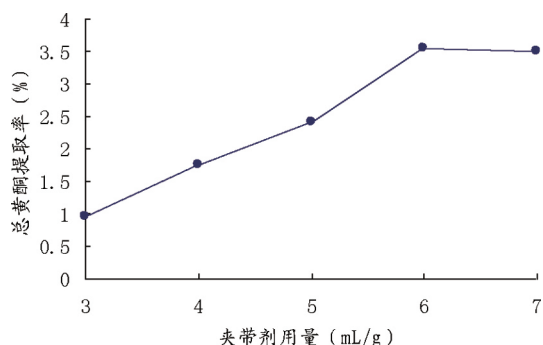


图1 夹带剂用量对提取率的影响

3.2.2 萃取压力 超临界流体具有很大的可压性,在一定温度下,压力增大,超临界流体的密度增加,溶质在流体中的溶解度增大,萃取效率提高,有利于提高总黄酮的萃取量。按照2.1项下的提取方法,设定萃取温度55℃,以70%乙醇为夹带剂,用量6mL/g,考察萃取压力为10、15、20、25、30MPa时,超临界萃取60min后,总黄酮提取率的变化。结果见图2。由图2可知,随着萃取压力增大,提取率升高。压力为30MPa的提取率相对于25MPa的提取率虽有少量增幅,但萃取压力过高,生产成本、不安全因素也会增加,因此萃取压力选择25MPa。

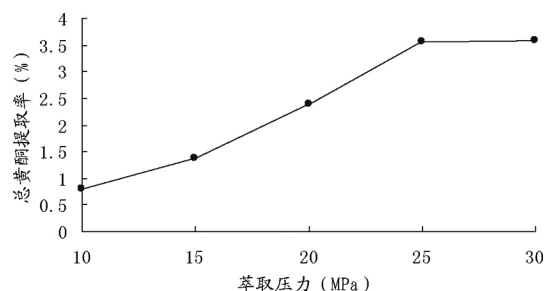


图2 萃取压力对提取率的影响

3.2.3 萃取温度 按照2.1项下的提取方法,在萃取压力25MPa,70%乙醇夹带剂用量6mL/g时,考察萃取温度分别为45、50、55、60、65℃时,超临界萃取60min后,考察不同萃取温度下总黄酮提取率的变化。结果见图3。由图3可知,总黄酮的提取率随温度升高呈上升趋势,萃取温度为55℃达到一个最大值,之后减小,因此正交试验选择50℃、55℃、60℃作为试验值。

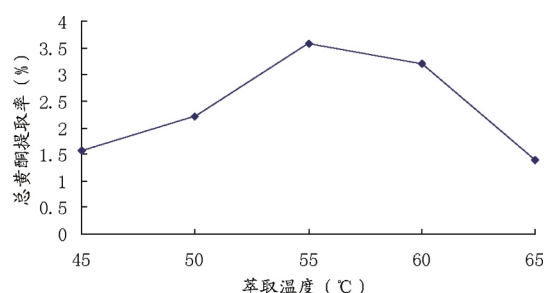


图3 萃取温度对提取率的影响

3.2.4 萃取时间 按照2.1项下的提取方法,在萃取温度55℃、萃取压力25MPa、夹带剂用量6mL/g条件下,选择萃取时间30、60、90、120、150min,考察不同萃取时间对薄荷总黄酮提取率的影响。结果见图4。由图4可知,萃取时间增加,总黄酮提取率逐渐增大,但增加趋势缓慢,萃取90min时,提取率最高,随后提取率下降。因此,正交试验选择60min、90min、120min为试验值。

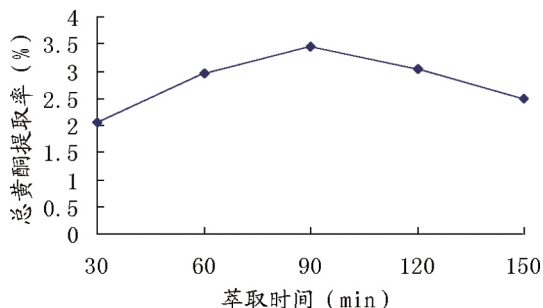


图4 萃取时间对提取率的影响

3.3 正交试验 根据单因素试验结果,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平,见表2,通过正交试验测定不同组合下薄荷总黄酮的提取率,并对所得试验数据进行极差分析,结果见表3。结果表明正交试验各因素的影响主次关系为:夹带剂用量>萃取压力>萃取时间>萃取温度。通过极差分析结果可知,最佳的工艺条件为: $A_3B_3C_2D_2$,即夹带剂用量6mL/g、萃取压力25MPa、萃取温度55℃、萃取时间90min。采用此优化的工艺条件进行超临界萃取操作,所得薄荷总黄酮的最高提取率达到3.72%,重复3次验证试验的平均提取率为3.58%,基本接近正交试验结果,故此法的最优工艺条件稳定可靠。

表2 正交试验水平

水平	A 夹带剂用量 (mL/g)	B 萃取压力 (MPa)	C 萃取温度 (℃)	D 萃取时间 (min)
1	4	15	50	60
2	5	20	55	90
3	6	25	60	120

表3 正交试验设计结果

试验组别	夹带剂用量 A	萃取压力 B	萃取温度 C	萃取时间 D	提取率 (%)
1	1	1	1	1	2.25
2	1	2	2	2	3.05
3	1	3	3	3	2.91
4	2	1	2	3	2.94
5	2	2	3	1	3.18
6	2	3	1	2	3.36
7	3	1	3	2	3.09
8	3	2	1	3	3.48
9	3	3	2	1	3.54
K1	2.74	2.76	3.03	2.99	
K2	3.16	3.24	3.18	3.17	
K3	3.37	3.27	3.06	3.11	
R	0.63	0.51	0.15	0.18	

4 讨论

超临界 CO_2 萃取技术在中草药有效成分的萃取中应用颇多,适用于非极性或极性小的化合物的提取,

但对极性物质的溶解度很低。薄荷中含有大量的黄酮苷类物质和少量的游离黄酮类,应采用强极性溶剂萃取,试验中使用40%乙醇为夹带剂时,物料容易结块,影响萃取效果。单因素试验中随着萃取温度的升高,超临界 CO_2 流体的密度会下降,但物质的扩散系数和传质效率增大,使 CO_2 流体溶解能力与温度成正比,导致物质在 CO_2 流体中的溶解度增大。但黄酮类物质化学结构不够稳定,部分随温度升高而分解,最终导致其含量下降。超过一定温度, CO_2 的密度降低,其溶解能力会降低,黄酮类成分的萃取率也下降。

本试验以采收期薄荷茎叶为材料,研究超临界 CO_2 萃取薄荷中黄酮类成分的最佳工艺条件,采用紫外分光光度法测定总黄酮含量,优选夹带剂种类,通过单因素试验和正交试验,探究夹带剂用量、萃取压力、萃取温度等对萃取率的影响。结果表明最佳的工艺条件为:以70%乙醇为夹带剂,其用量6mL/g,萃取压力25MPa,萃取温度55℃,萃取时间90min。超临界 CO_2 萃取法具有提取率高,产品的纯度好,有机溶剂用量少,工艺简单方便的优点。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:377.
- [2] 沈梅芳,李小萌,单琪媛.薄荷化学成分与药理作用研究新进展[J].中华中医药学刊,2012,30(7):1484.
- [3] 徐晶晶,徐超,刘斌.不同采收期薄荷中4个黄酮苷的含量测定[J].药物分析杂志,2013(12):2077.
- [4] 张秋燕,徐晓岚,张福平.薄荷总黄酮提取工艺研究[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(5):64.
- [5] 喻林华,方晰,田春燕,等.正交试验优选薄荷总黄酮超声提取工艺研究[J].中南林业科技大学学报,2012,32(8):94.
- [6] 侯学敏,李林霞,张直峰,等.响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J].食品科学,2013,34(6):124.
- [7] 高丹丹,郭鹏辉,祁高展,等.响应面法优化薄荷全草总黄酮的提取工艺[J].食品工业科技,2015,36(2):299.
- [8] 李卫民,金波,冯毅凡.中药现代化与超临界流体萃取技术[M].北京:中国医药科技出版社,2002:93.
- [9] 石全雨,缪伟伟,王志雄.超临界二氧化碳法萃取桑叶中总黄酮工艺研究[J].生物技术进展,2017,7(1):77.
- [10] 张兴桃,董增,张东京,等.超临界 CO_2 萃取法优化垂盆草总黄酮的提取工艺[J].基因组学与应用生物学,2017,36(4):1641.

第一作者:华燕青(1974—),女,药学硕士,讲师,主要从事制药专业教学与科研工作。
huay2004@163.com

修回日期:2017-11-11

编辑:吴宁