

文章编号: 1674-7054(2012)03-0258-03

# 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取技术分离和纯化 苦丁茶中熊果酸的工艺

李宏杨<sup>1,2</sup>, 刘飞<sup>3</sup>, 张凤琴<sup>3</sup>, 李小龙<sup>3</sup>, 刘国民<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学 热带生物资源教育部国家重点实验室 海南 海口 570228; 2. 海南大学 苦丁茶研究所 海南 海口 570228; 3. 湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室 湖南 株洲 412007)

**摘要:** 对超临界 CO<sub>2</sub> 萃取苦丁茶中熊果酸的工艺进行了研究, 并采用酸碱沉淀法纯化萃取液。结果表明: 在以无水乙醇作为夹带剂, CO<sub>2</sub> 流量为 20 L·h<sup>-1</sup>, 萃取温度为 45 °C, 萃取压力为 30 MPa, 萃取时间为 3 h 的萃取条件下, 萃取效果最好, 萃取率可达 0.453%, 最终能得到  $w = 21.44\%$  纯度的熊果酸粗品。该工艺优于传统的熊果酸提取方法, 适于产业化生产。

**关键词:** 超临界 CO<sub>2</sub>; 萃取技术; 苦丁茶; 熊果酸

中图分类号: R 284.1 文献标志码: A

超临界 CO<sub>2</sub> 萃取技术(SFE CO<sub>2</sub>) 是近年来国际上迅速发展的新兴技术。该技术提取物杂质少, 有效成分的提取率高, 具有提取快速、完全、节省溶剂、萃取的选择性较高等优点。随着中药现代化进程的加快, SFE CO<sub>2</sub> 技术提取天然产物有效成分已成为人们研究的热点<sup>[1-4]</sup>, 但目前尚未见采用该技术萃取苦丁茶(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng) 中熊果酸的报道。笔者采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取技术提取苦丁茶中的熊果酸, 并优化了萃取工艺, 用酸碱沉淀法对萃取物进行了初步纯化, 旨在为从苦丁茶中提取熊果酸提供新的方法。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 于 2009 年 4 月在云南省思茅地区采摘苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng) 功能叶作实验材料, 原料经干燥, 粉碎后过 40 目筛, 备用。

**1.2 仪器与试剂** 美国安捷伦 1200series 高效液相色谱仪及工作站, 日本岛津电子分析天平 AUY220, 北京普析 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 重庆艾科浦 AWJ1-3005-UT 超纯水机, 江苏华安 HA 221-50-06 超临界萃取装置, 北京来亨 L-117 型实验室喷雾干燥机; 熊果酸(Sigma, 纯度 ≥ 98.5%); 甲醇(色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

**1.3 对照品溶液的制备** 精密称取干燥至恒重的熊果酸对照品 5.1 mg 置于 50 mL 容量瓶中, 加入甲醇充分溶解, 定容, 得到熊果酸 0.102 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**1.4 样品溶液的制备** 将苦丁茶冬青粉末于 50 °C 下过夜烘干后, 称取约 80 g 置于萃取釜中, 萃取液干燥后称重, 用无水乙醇溶解并定容至 250 mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, HPLC 检测分析。参照文献[5]的方法, 萃取液定容后用  $w = 20\%$  的 NaOH 溶液调节 pH 值至 11.0, 离心去除多酚类物质沉淀, 上清液用  $\varphi =$

收稿日期: 2012-03-15

基金项目: 国家科技支撑计划子课题(2007BAD76B05-02)

作者简介: 李宏杨(1983-) 男, 海南大学农学院 2007 级硕士研究生。

通信作者: 刘国民(1955-) 男, 湖南祁东人, 教授, 博士, 博士生导师. E-mail: 13005082258@163.com

10% 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液调节 pH 值至 4.5, 然后加入等体积 pH = 4.0 的 HCl 溶液, 静置 1 h 后离心, 收集沉淀, 水洗至中性, 喷雾干燥, 甲醇溶解, HPLC 检测分析。

1.5 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取条件的选择 选择无水乙醇作为夹带剂, 以  $m_{\text{样品}} : V_{\text{无水乙醇}} = 100 \text{ g} : 30 \text{ mL}$  的比例加入无水乙醇, CO<sub>2</sub> 流量为 20 L · h<sup>-1</sup>[4-6]。在此实验条件下, 重点考察萃取温度、萃取压力和萃取时间对熊果酸萃取率的影响。

1.6 色谱条件 色谱柱: Eclipse XDB - C18 柱 (4.6 mm × 150 mm × 5 μm); 流动相为甲醇 - 磷酸混合液 ( $V_{\text{甲醇}} : V_{\varphi=0.2\% \text{的磷酸}} = 88 : 12$ ); 检测波长为 220 nm; 流速为 0.8 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温为 35 °C。

## 2 结果与分析

2.1 线性关系考察 吸取熊果酸对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别加入 5 mL 的容量瓶中, 甲醇定容, 依次进样 20 μL, 重复 3 次。以测得的峰面积 ( $X$ , 单位为 mAU · s) 平均值对进样量 ( $Y$ , 单位为 μg) 进行线性回归, 熊果酸的回归方程为:  $Y = 0.0056X + 0.0359$ ,  $R^2 = 0.9993$ , 线性范围为 0.204 ~ 2.04 μg。

2.2 精密度实验与重现性实验 吸取熊果酸对照品溶液 20 μL, 重复进样 6 次, 测得熊果酸峰面积的 RSD (变异系数) 为 0.73% ( $n = 6$ )。准确称苦丁茶冬青样品 5 份, 按照“1.4”的方法制成样品溶液, 平行 3 次进样分析。苦丁茶萃取物的平均得率为  $w = 5.81\%$ , RSD 为 1.1% ( $n = 6$ )。苦丁茶中熊果酸的平均萃取率为  $w = 0.453\%$ , RSD 为 1.32% ( $n = 5$ )。

2.3 温度对萃取率的影响 萃取时间 3 h, 分别在 20 MPa 和 30 MPa 的萃取压力下进行实验。在相同的萃取条件下, 在一定的温度内 (25 ~ 45 °C), 熊果酸萃取率随温度升高而显著提高。但是继续升高温度, 萃取率出现下降, 这可能是因为温度升高, CO<sub>2</sub> 密度降低, 其溶解能力也相应降低, 使萃取率下降。同时萃取物中杂质含量也随温度的升高而升高, 增加了纯化精制熊果酸的难度。因此 45 °C 为最佳萃取温度 (见图 1)。

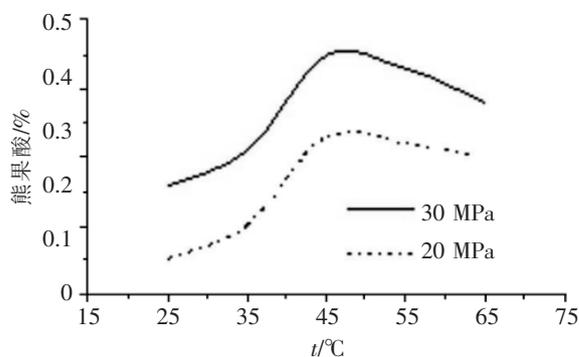


图 1 温度对萃取率的影响

2.4 压力对熊果酸萃取率的影响 萃取压力是 SFE

CO<sub>2</sub> 中重要的操作参数。萃取压力增加, 使 SFE CO<sub>2</sub> 的密度增大, 萃取效率也会随之提高。在萃取时间 3 h 和萃取温度 45 °C 条件下实验, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 萃取压力从 10 MPa 到 30 MPa 的过程中, 萃取率增加明显, 超过 30 MPa 以后, 萃取率升高缓慢。为了节约生产成本, 选择 30 MPa 作为萃取压力比较合理。

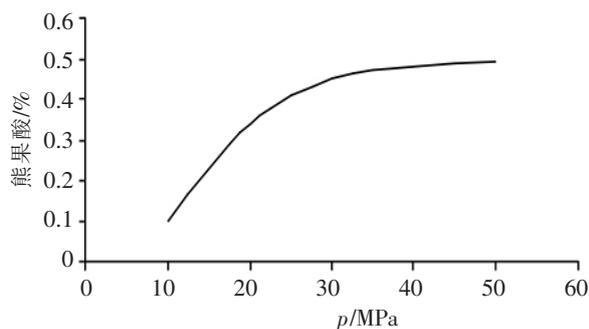


图 2 压力对萃取率的影响

2.5 时间对萃取率的影响 延长萃取时间会不断地提高萃取率, 但是萃取时间越长需要消耗越多的夹带剂和能量。从图 3 可以看出, 时间超过 3 h, 萃取率增加不明显, 说明 3 h 能使原料得到充分的萃取。

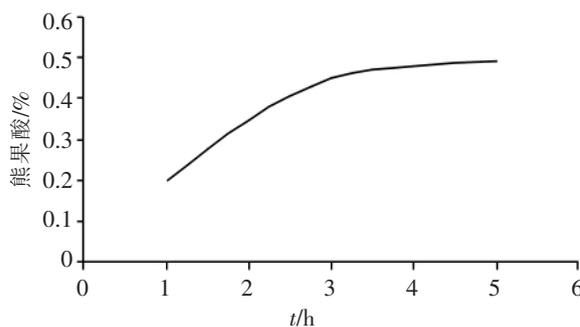


图 3 时间对萃取率的影响

2.6 熊果酸的酸碱沉淀实验 SFE  $\text{CO}_2$  萃取液减压浓缩后得到黄绿色膏状物,通过酸碱沉淀法纯化,得到浅黄色粉末状熊果酸粗品,HPLC 检测熊果酸的含量为  $w = 21.44\%$  酸碱沉淀的回收率达  $w = 84\%$ 。通过向萃取液中分步加酸和加碱,去除杂质中的主要成分多酚类和黄酮类化合物,效果明显,熊果酸的纯度比萃取物中提高了近 2 倍(见图 4)。

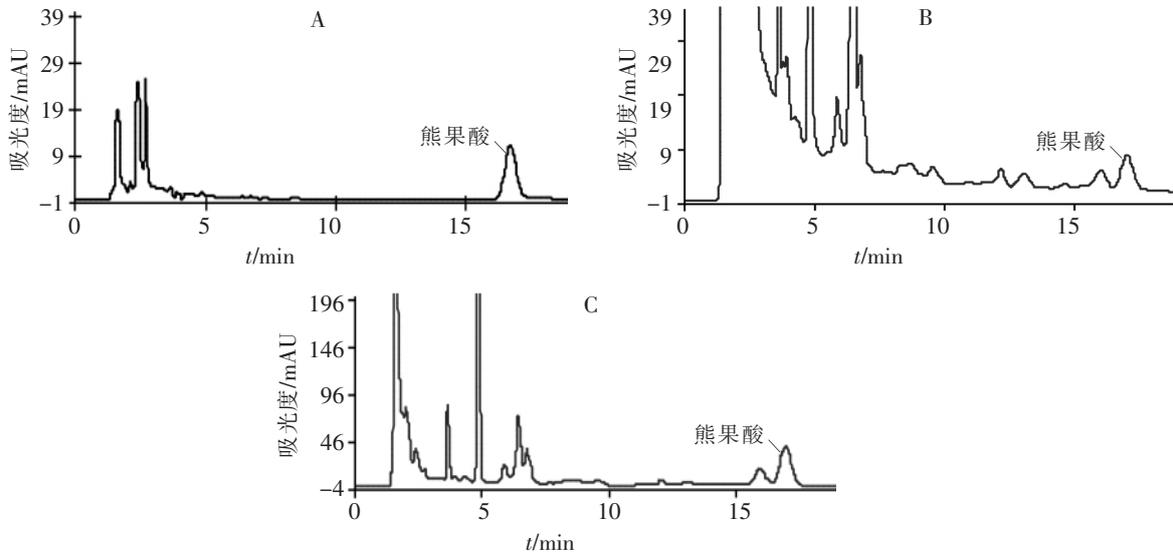


图 4 熊果酸对照品

A. 超临界  $\text{CO}_2$  萃取物; B. 酸碱沉淀物; C. HPLC 色谱图

### 3 结 论

1) 采用超临界  $\text{CO}_2$  萃取技术萃取苦丁茶中的熊果酸,最佳萃取条件是:以无水乙醇作为夹带剂( $m_{\text{样品}} : V_{\text{无水乙醇}} = 100 \text{ g} : 30 \text{ mL}$ ), $\text{CO}_2$  流量为  $20 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ,萃取温度为  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,萃取压力为  $30 \text{ MPa}$ ,萃取时间为  $3 \text{ h}$ 。在此萃取条件下,萃取率达到了  $w = 0.453\%$ ,为熊果酸的开发利用提供了新的方法。

2) 与传统方法(如渗漉法、煎煮法、回流、浸渍法等)相比,超临界  $\text{CO}_2$  萃取技术具有成本低、时间短、不破坏有效成分等优点,而且萃取物中杂质成分更少,熊果酸含量更高。因此,该技术更适用于开展熊果酸的产业化提取。另外,传统方法溶剂提取后的原料只能丢弃,而超临界  $\text{CO}_2$  萃取技术提取后,原料的性状、结构、形态几乎没有任何改变,可以继续提取超临界不适合的组分,为中药资源的合理开发利用提供了新方法。

3) 酸碱沉淀纯化工艺具有简便易操作、成本低廉、时间快速等优点,适用于熊果酸的产业化分离纯化。酸碱沉淀后,熊果酸粗品纯度达到了  $21.44\%$ ,可为熊果酸的进一步纯化和单体的获取提供基础材料。

### 参考文献:

- [1] 张镜澄. 超临界流体萃取[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 86.
- [2] 高福成. 现代食品工程高科技[M]. 北京: 中国工业出版社, 1997: 394.
- [3] 蒋胜岩, 赵良忠, 余有贵, 等. 夏枯草叶熊果酸超临界流体萃取工艺的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 294 - 297.
- [4] 刘艳辉. 正交设计法优化从车前草中萃取熊果酸的工艺研究[J]. 化工时刊, 2008, 22(3): 22 - 24.
- [5] 任秀莲, 周春山, 魏琦峰, 等. 反相高效液相色谱法测定苦丁茶中的熊果酸[J]. 光谱实验室, 2004, 21(4): 693 - 697.
- [6] 袁珂, 孙伟, 张晓明. 超临界二氧化碳萃取冬凌草中熊果酸的研究[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(2): 131 - 134.

(下转第 270 页)

## Rapid propagation of *Alpinia zerumbet* cv. *vaniegata*

PAN Mei , FU Rui-kan , WANG Jing-fei , LU De-ren , HUANG Sai

( Institute of Landscape Architecture & Garden Flowers , Hainan Academy of Agricultural Sciences , Haikou 571100 , China)

**Abstract:** Shoot tips were used as explants to mass propagate *Alpinia zerumbet* cv. *vaniegata*. The shoot tips were cultured on the MS medium at the presence of BA  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + sugar  $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for 30 days and produced adventitious shoots continuously. These shoots were transferred onto the MS medium supplemented with 6-BA  $2.0\text{--}2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + sugar  $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for further culture and were well proliferated with a proliferation coefficient of 4.0. The multiplied shoots grew normal with dark green color and were rooted well with stout roots on the 1/2MS medium supplemented with NAA  $1.0\text{--}1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  with a rooting rate of 93.0%. The rooted plantlets of *A. zerumbet* cv. *vaniegata* were transplanted in the mixed substrate ( river sand: perlite: surface soil = 1: 1: 1 ) , and survived upto 70.1% .

**Key words:** *Alpinia zerumbet* cv. *vaniegata*; shoot tip; rapid propagation

---

( 上接第 260 页)

## Supercritical Fluid CO<sub>2</sub> Extraction and Purification of Ursolic Acid from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng

LI Hong-yang<sup>1,2</sup> , LIU Fei<sup>3</sup> , ZHANG Feng-qin<sup>3</sup> , LI Xiao-long , LIU Guo-min<sup>1,2</sup>

( 1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources. MOE , Hainan University , Haikou 570228 , China;

2. Kudingcha Research Institute , Hainan University , Haikou 570228 , China;

3. Hunan Key Lab of Green Packaging and Biological Nanotechnology , Hunan University of Technology , Zhuzhou 412007 , China)

**Abstract:** Ursolic acid was extracted supercritically from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng with fluid CO<sub>2</sub>. The extract liquid was purified with acid and alkali and detected with high performance liquid chromatography ( HPLC ) . Optimal extracting conditions resulted to be absolute ethanol as entrainer , CO<sub>2</sub> flow rate at  $20 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$  , extracting temperature at  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  , extracting pressure at 30 MPa and extracting time for 3 h , and the extraction rate was upto 0.453% . Moreover , crude products of ursolic acid with a purity of 21.44% were produced finally. This extraction technology is superior to the traditional solvent extraction of ursolic acid , and suitable for industrial production.

**Key words:** supercritical fluid CO<sub>2</sub>; extraction; *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; ursolic acid