

超临界 CO₂ 萃取猕猴桃根三萜类化合物 工艺优化

李加兴¹, 孙金玉², 陈双平², 张朝晖³, 黄 诚¹, 王小勇⁴

(1. 吉首大学食品科学研究所, 湖南 吉首 416000; 2. 湖南省猕猴桃产业化工程技术研究中心, 湖南 吉首 416000;
3. 吉首大学化学化工学院, 湖南 吉首 410006; 4. 湘西老爹生物有限公司, 湖南 吉首 410006)

摘 要: 以湘西“米良1号”猕猴桃根为原料, 采用超临界 CO₂ 萃取法, 对其三萜类化合物的提取工艺进行优化。通过单因素试验探讨猕猴桃根生长期、粉碎粒度、萃取所用夹带剂种类及用量对三萜类化合物得率的影响, 并通过正交试验研究猕猴桃根三萜类化合物的最佳萃取工艺条件。结果表明, 采用生长期为3年的猕猴桃根为原料, 控制粉碎粒度60目, 按照1:3(g/mL)的用量加入70%乙醇溶液作为夹带剂, 其三萜类化合物的最佳萃取条件为萃取温度40℃、萃取压力22MPa、萃取时间3h、CO₂ 流速300kg/h, 此条件下得率可达1.994%。

关键词: 猕猴桃根; 三萜类化合物; 超临界 CO₂; 夹带剂; 萃取工艺

Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Triterpenoids from *Radix Actinidiae Chinensis*

LI Jia-xing¹, SUN Jin-yu², CHEN Shuang-ping², ZHANG Zhao-hui³, HUANG Cheng¹, WANG Xiao-yong⁴

(1. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China; 2. Research Center of Kiwi Fruit Industrialization Engineering and Technology of Hunan Province, Jishou 416000, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China; 4. Xiangxi Laodie Biotechnology Co. Ltd., Jishou 416000, China)

Abstract: *Radix Actinidiae Chinensis* from cultivar “Miliang No. 1” grown in west Hunan province was used as the raw material to extract triterpenoids by means of supercritical CO₂. The effects of material growth period, material particle size entrainer type, entrainer amount and four extraction parameters on extraction rate of triterpenoids were investigated by one-factor-at-a-time method, and four extraction parameters were optimized by orthogonal array design method. The optimal extraction conditions were determined as follows: material growth period 3 years, particle size 60 mesh, 70% (V/V) ethanol as entrainer, material-ethanol ratio 1:3 (g/mL), extraction temperature 40 °C, extraction pressure 22 MPa, extraction time 3 h, and CO₂ flow rate 300 kg/h. Under the optimal conditions, the extraction rate of triterpenoids was 1.994%.

Key words: *Radix Actinidiae Chinensis*; triterpenoids; supercritical CO₂; entrainer; extraction process

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0072-05

猕猴桃根(民间又叫藤梨根)为猕猴桃科猕猴桃属植物猕猴桃的根或根皮, 性寒、味苦, 能清热解毒、活血消肿, 民间常用于治疗肝炎、水肿、跌打损伤、风湿关节痛、乳汁不足、淋虫、带下、疮疖、瘰癧等^[1], 作为中药材已收入我国药典。现代研究表明^[2-6], 猕猴桃根含熊果酸、齐墩果酸、琥珀酸、胡萝卜苷以及精氨酸、赖氨酸、亮氨酸、丙氨酸等多种成分, 其提取物具有抗肿瘤、抗氧化、降酶保肝、免疫调节等功效。因此, 提取猕猴桃根中熊果酸、齐墩果酸等三

萜类化合物, 可用作生产医药与保健品的功效成分。目前提取猕猴桃根活性成分的方法主要采用溶剂提取法^[7], 虽然提取率较高, 但也存在溶剂用量大、溶剂回收繁琐、提取时间长和提取温度高等缺陷。相对而言, 超临界流体萃取法作为一种新型化工分离技术, 具有操作温度低、分离效果好、溶剂可循环使用且无溶剂残留等优点, 已被应用于提取中药中的三萜类化合物^[8-11]。若在超临界 CO₂ 萃取过程中加入一定量的夹带剂, 还可获得一般溶剂所达不到的萃取效果, 能显著增加流体的

收稿日期: 2011-06-29

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD10B01)

作者简介: 李加兴(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物资源开发利用与功能性食品。E-mail: jslijiaxing@sohu.com

溶解能力^[12]。三萜类化合物的苷元结构较大,极性低,具有亲脂性,而糖部分极性大,具有亲水性^[13]。因此,仅依靠非极性的超临界 CO₂ 流体很难将其完全萃取出来,还需添加具有一定极性的夹带剂。本实验以湘西“米良 1 号”猕猴桃根为原料,探讨其三萜类化合物超临界萃取条件,为工业化生产应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

“米良 1 号”猕猴桃根 湘西州永顺县石堤猕猴桃种植基地; CO₂(纯度>99.5%) 湖南长沙特种气体厂; 无水乙醇、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

ZNJ-80 型小型不锈钢粗碎机 北京兴时利和科技发展有限公司; XA-1 型固体样品粉碎机 江苏金坛市亿通电子有限公司; TMP-2 型上皿式电子天平 湘仪天平仪器设备有限公司; HA221-50-10-C 型超临界萃取装置 江苏南通市华安超临界萃取设备有限公司; HDY-400 振动筛 北京环亚天元机械技术有限公司; ZK072 型电热真空干燥箱 上海奈思环境试验设备有限公司; WYT 型手持式折射仪 北京中西泰安技术服务有限公司; DHS20-1 型多功能红外水分仪 浙江托普仪器有限公司; RE-52A 型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; DZF-6050 型真空干燥箱 上海博讯事业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 三萜类化合物萃取工艺流程

猕猴桃根→清洗干净→斩断成片→烘干→粉碎→过筛→称量→装料→超临界 CO₂ 萃取→猕猴桃根粗提物→分离→烘干→三萜类化合物
↑
夹带剂

1.3.2 操作要点

原料预处理: 猕猴桃根生长年份是影响其三萜类化合物提取率的重要因素, 选择 2 年以上的无病虫害、无腐烂霉变的猕猴桃根, 用自来水清洗干净, 斩切成片, 于 50℃ 真空干燥箱中干燥, 粉碎过 40 目筛。

装料: 首先将粉碎过筛后的猕猴桃根粉末按一定料液比加入 70% 乙醇溶液, 混合均匀, 然后再装填入超临界萃取设备的萃取釜中, 要求松紧适度。

超临界 CO₂ 萃取: 控制萃取温度、萃取压力、萃取时间和 CO₂ 流速等工艺参数, 萃取一定时间。

分离干燥: 用乙醚分离出猕猴桃根粗提物中的三萜类化合物, 回收溶剂后, 再经 45~55℃ 真空干燥即可得到成品。

1.3.3 萃取工艺的优化试验

首先, 设定萃取温度 45℃、萃取压力 25MPa、CO₂

流速 300kg/h、萃取时间 240min 的条件, 通过单因素试验探讨猕猴桃根的生长期、粉碎粒度、夹带剂(种类、体积分数和用量)等因素对三萜类化合物提取率的影响; 然后, 控制猕猴桃根的粉碎度为 60 目, 按 1:3(g/mL)的比例加入 70% 乙醇溶液作为夹带剂, 分别开展萃取温度、萃取压力、萃取时间和 CO₂ 流速等单因素对三萜类化合物得率的影响试验, 再在此基础上设计 L₉(3⁴)正交试验, 根据三萜类化合物的得率以判定最佳工艺条件。

1.3.4 三萜类化合物得率的计算方法

$$\text{三萜类化合物得率} / \% = \frac{\text{萃取物质量}}{\text{原料质量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 猕猴桃根生长期对三萜类化合物提取率的影响

以处于同一栽培基地上的生长期为 1、2、3、4、5、6 年的“米良 1 号”猕猴桃根为原料, 干燥后粉碎至 60 目左右, 对其三萜类化合物分别进行超临界 CO₂ 萃取试验, 结果见图 1。

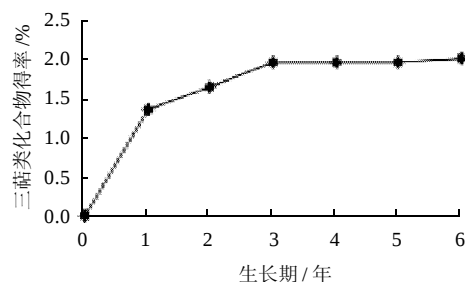


图 1 猕猴桃根生长期对三萜类化合物得率的影响

Fig.1 Effect of material growth period on extraction rate of triterpenoids

由图 1 可知, 随着猕猴桃根生长期的延长, 其三萜类化合物得率逐渐增加, 表明其含量的高低与生长期有密切关系。但猕猴桃根的生长期超过 3 年以后, 三萜类化合物的得率增幅很小。从缩短规模化生产周期的角度考虑, 用于提取三萜类化合物的猕猴桃根的生长期为 3 年左右较好。

2.2 猕猴桃根粉碎粒度对三萜类化合物提取率的影响

为了减少 CO₂ 流体在猕猴桃根中的扩散距离, 在投入超临界 CO₂ 流体萃取装置之前, 必须将猕猴桃根粉碎过筛。猕猴桃根粉碎过粗或过细都会对传质效果产生较大的影响, 从而降低萃取效率。为此, 分别对粉碎至 20、40、60、80、100 目的猕猴桃根开展三萜类化合物提取试验, 结果见图 2。

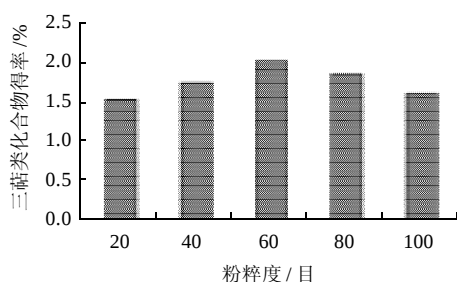


图2 猕猴桃根粉碎粒度对三萜类化合物得率的影响

Fig.2 Effect of material particle size on extraction rate of triterpenoids

从图2可知,猕猴桃根粉碎度小于等于60目时,三萜类化合物的得率随着其粉碎度的增大而相应增大;而当猕猴桃根粉碎度大于等于80目后,三萜类化合物的得率随着其粉碎度的增大反而逐渐下降,估计这是由于物料过细而导致其装填过紧,从而不能与超临界CO₂流体充分接触所致。因此,猕猴桃根的粉碎粒度以60目为宜。

2.3 夹带剂对猕猴桃根三萜类化合物得率的影响

2.3.1 夹带剂种类的选择

由于CO₂本身的非极性特点,大大限制了其应用范围。为了有效提取非脂溶性的、强极性的中药有效成分,常常要在CO₂中加入夹带剂,以改变CO₂流体的极性,大幅度提高收率^[14]。三萜类化合物大多具有较好的结晶性能,但由于糖分子的引入,使羟基数目增多,极性加大,不易结晶,因而可溶于水,易溶于热水、稀醇^[15]。因此,在试验过程中控制猕猴桃根粉末为40~60目,按照1:5(g/mL)的用量分别加入水、70%乙醇溶液、99.5%乙醚作为夹带剂,然后进行超临界CO₂萃取试验,并与不加任何夹带剂的空白组进行比较,结果见图3。

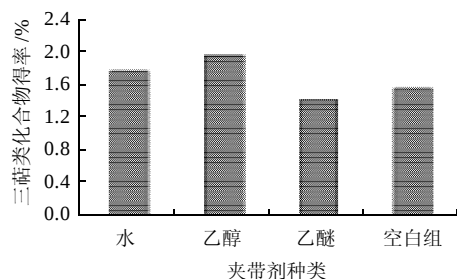


图3 夹带剂种类对猕猴桃根三萜类化合物得率的影响

Fig.3 Effect of entrainer type on extraction rate of triterpenoids

由图3可见,采用乙醚作夹带剂萃取三萜类化合物的得率最低,采用乙醇作夹带剂萃取三萜类化合物的得率最高;尽管用水作夹带剂也有较高的得率,但会增加萃取液黏度,给后续分离增加麻烦;采用乙醚作夹带剂的得率最低,不能充分萃取出三萜类化合物。由于熊

果酸、齐墩果酸等三萜类化合物极性较大,因此选用极性强的乙醇作夹带剂,可以取得较理想的萃取效果。

2.3.2 夹带剂浓度与用量的确定

控制猕猴桃根的粉碎度为40~60目,探讨不同夹带剂体积分数与用量对其三萜类化合物得率的影响,结果见表1。

表1 夹带剂体积分数与用量对猕猴桃根三萜类化合物得率的影响
Table 1 Effect of entrainer concentration and dosage on extraction rate of triterpenoids

夹带剂体积分数 / %	不同夹带剂用量(g/mL)条件下的猕猴桃根三萜类化合物得率 / %				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
60	1.635	1.667	1.679	1.683	1.686
65	1.699	1.741	1.796	1.857	1.872
70	1.893	1.946	2.046	1.987	1.990
75	1.931	1.954	1.975	1.965	1.969
80	1.927	1.946	1.953	1.961	1.965

从表1可知,在猕猴桃根中按1:3(g/mL)的比例加入70%乙醇溶液作夹带剂,三萜类化合物的得率最高。

2.4 超临界CO₂萃取工艺参数的确定

2.4.1 萃取温度与萃取压力的确定

萃取温度和压力是超临界CO₂萃取过程中的重要参数^[8-11]。与一般有机溶剂萃取相比,超临界CO₂萃取的速率和范围更大,萃取过程通过温度和压力的调节来控制与溶质的亲和性而实现分离^[16]。采用萃取时间3h、CO₂流速300kg/h的萃取条件,探讨萃取温度和萃取压力对三萜类化合物得率的影响,结果见表2。

表2 萃取温度与萃取压力对猕猴桃根三萜类化合物得率的影响
Table 2 Effect of extraction temperature and pressure on extraction rate of triterpenoids

萃取温度 / °C	萃取压力 / MPa	三萜类化合物得率 / %
30	18	1.608
35	20	1.910
40	22	1.955
45	24	1.931
50	26	1.874

从表2可知,当萃取温度为40℃、萃取压力为22MPa左右时,三萜类化合物得率相对较高。

2.4.2 萃取时间的确定

采用萃取温度40℃、萃取压力22MPa、CO₂流速300kg/h的萃取条件,探讨不同萃取时间对猕猴桃根三萜类化合物得率的影响,结果见图4。

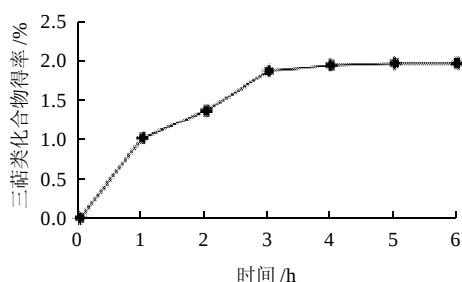


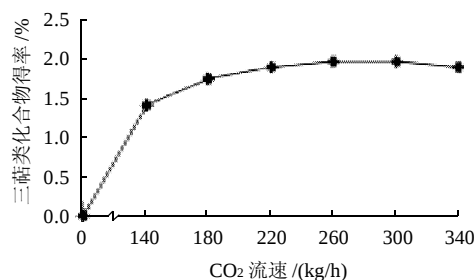
图4 萃取时间对猕猴桃根三萜类化合物得率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction rate of triterpenoids

由图4可知,随着萃取时间的延长,三萜类化合物的得率逐渐增加,但超过3h以后的三萜类化合物的得率增幅很小。因此,选择萃取时间为3h左右较为适宜。

2.4.3 CO₂流速的确定

在确保功效成分被充分提取的情况下,选择较为适合的CO₂流量可以减少能耗,降低生产成本。采用萃取温度40℃、萃取压力22MPa、萃取时间3h的萃取条件,探讨CO₂流速对猕猴桃根三萜类化合物得率的影响,结果见图5。

图5 CO₂流速对猕猴桃根三萜类化合物得率的影响Fig.5 Effect of CO₂ flow rate on extraction rate of triterpenoids

由图5可知,CO₂流速≤260kg/h时,三萜类化合物得率随着CO₂流速的增加而增加;CO₂流速≥260kg/h时,三萜类化合物得率随着CO₂流速的增加而降低。这是由于CO₂流速对超临界流体的萃取能力有双重影响,一方面因CO₂流体流量的增加,使流体在物料的传质接触时间减少而降低了萃取效率,另一方面却增加了传质速率和浓度差而有利于三萜类化合物的萃取。因此,选择CO₂流速为260kg/h左右较为适宜。

2.4.4 超临界CO₂萃取工艺的优化

根据单因素试验结果,选取萃取压力、萃取温度、萃取时间和CO₂流速四因素进行L₉(3⁴)正交试验,并根据三萜类化合物得率判定最佳提取工艺条件。正交试验的因素与水平见表3,试验设计及数据处理结果见表4。

表3 三萜类化合物超临界CO₂萃取工艺L₉(3⁴)正交试验因素与水平
Table 3 Factors and levels in orthogonal array design

水平	因素			
	A 萃取温度/℃	B 萃取压力/MPa	C 萃取时间/h	D CO ₂ 流速/(kg/h)
1	35	20	2	220
2	40	22	3	260
3	45	24	4	300

表4 L₉(3⁴)正交试验设计及数据处理结果

Table 4 Orthogonal array design and results

试验号	因素				得率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.282
2	1	2	2	2	1.891
3	1	3	3	3	1.834
4	2	1	2	3	1.957
5	2	2	3	1	1.986
6	2	3	1	2	1.849
7	3	1	3	2	1.805
8	3	2	1	3	1.873
9	3	3	2	1	1.851
K ₁	5.007	5.044	5.004	5.119	T=16.328
K ₂	5.792	5.750	5.699	5.445	
K ₃	5.529	5.534	5.625	5.545	
k ₁	1.669	1.681	1.668	1.706	
k ₂	1.931	1.917	1.900	1.815	
k ₃	1.843	1.845	1.875	1.848	
R	0.262	0.236	0.232	0.142	
优水平	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂	

由表4正交试验数据处理结果和极差R值可知,影响猕猴桃根三萜类化合物得率的因素主次顺序为A>B>C>D,即萃取温度>萃取压力>萃取时间>CO₂流速。工艺参数优化组合为A₂B₂C₂D₃,即萃取温度40℃、萃取压力22MPa、萃取时间3h、CO₂流速300kg/h。为了验证所得结果的准确性,在上述最佳工艺条件下进行3组验证实验,三萜类化合物得率分别为1.982%、1.996%和2.005%,平均值为1.994%,所得结果与正交试验相一致,即A₂B₂C₂D₃为最优化工艺参数组合。

3 结 论

研究表明,选用生长期为3年的猕猴桃根为原料,粉碎粒度60目,按料液比1:3(g/mL)加入70%乙醇溶液作为夹带剂,控制萃取温度40℃、萃取压力22MPa、萃取时间3h、CO₂流速300kg/h的萃取条件,猕猴桃根三萜类化合物的得率可达1.994%。

提取得到的猕猴桃根三萜类化合物为多组分混合物,尚存在少量的多糖与色素类物质,其分离纯化工艺与结构分析有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典:下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 2210-2212.
- [2] 楼丽君, 吕定量, 胡增仁, 等. 猕猴桃根抗肿瘤作用研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(6): 808-811.
- [3] 陈德轩, 潘立群. 抗肿瘤植物药藤梨根[J]. 中药材, 2004, 27(2): 86-87.
- [4] 殷杰, 房穗穗. 藤梨根研究进展[J]. 临床医学, 2009, 22(6): 1075-1077.
- [5] 白素平, 李长正, 黄初升, 等. 毛花猕猴桃地上部分化学成分的研究[J]. 中草药, 1997, 28(2): 69-72.
- [6] 王岁红, 李忠海, 钟海雁, 等. 猕猴桃根提取物保健功能研究进展[J]. 食品与机械, 2007, 23(6): 145-147.
- [7] 覃益民, 黄初升, 陈希慧, 等. 中越猕猴桃根三萜化学成分的研究[J]. 中草药, 1999, 30(5): 323-326.
- [8] 陈燕, 柳正良, 陈志东, 等. 优选超临界 CO₂ 萃取灵芝孢子粉中总三萜化合物的最佳工艺[J]. 药学服务与研究, 2010, 10(1): 34-36.
- [9] 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]. 海峡药学, 2007, 19(3): 62-65.
- [10] 崔星明, 王勇为, 陈光宇. CO₂ 超临界流体萃取芦笋中熊果酸的研究[J]. 上海农业学报, 2004, 20(1): 123-126.
- [11] 辛国, 王恩鹏, 张辉. 三萜类化合物的提取分离及测定方法研究[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(4): 378-379.
- [12] 廖传华, 黄振仁. 夹带剂对超临界 CO₂ 萃取过程的影响[J]. 香料香精化妆品, 2004(1): 34-37.
- [13] 黎海彬, 张敏, 王邕, 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.
- [14] 于恩平, 朱美文, 方之蓉, 等. 关于超临界萃取过程中使用夹带剂的研究[J]. 化学工程, 1989, 17(4): 21-24.
- [15] 王锋鹏, 孔令义, 吴立军, 等. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 292-293.
- [16] 宋启煌, 宋照斌. 超临界流体萃取技术发展动向[J]. 现代化工, 1996, 16(11): 16-19.