

米佳, 罗青, 禄璐, 等. 枸杞脂溶性物质的中试提取、成分分析及主要类胡萝卜素单体的制备 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 185–191. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090164

MI Jia, LUO Qing, LU Lu, et al. Pilot Extraction and Component Analysis of Fat-Soluble Substances from *Lycium barbarum* L. and the Preparation of Major Carotenoids Monomer[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 185–191. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090164

· 工艺技术 ·

# 枸杞脂溶性物质的中试提取、成分分析及主要类胡萝卜素单体的制备

米佳, 罗青<sup>+</sup>, 禄璐, 金波, 李晓莺, 曹有龙, 闫亚美<sup>\*</sup>  
(宁夏农林科学院枸杞科学研究所, 宁夏银川 750002)

**摘要:**为研究超临界 CO<sub>2</sub> 提取枸杞脂溶性物质的中试工艺及脂溶性物质的成分, 获得枸杞主要类胡萝卜素—玉米黄素双棕榈酸酯的单体制备工艺。分别研究了提取压力、温度、时间和助溶剂对枸杞脂溶性物质得率的影响, 并用正交试验优化了提取工艺, 采用比色法、HPLC 和 GC-MS 对枸杞脂溶性物质中的类胡萝卜素和脂肪酸进行了分析, 并采用高效制备液相色谱制备了玉米黄素双棕榈酸酯单体。结果表明, 综合考虑脂溶性物质的得率及品质时, 超临界 CO<sub>2</sub> 提取枸杞脂溶性物质的最佳中试工艺条件为: 温度 50 °C, 压力 30 MPa, 乙醇添加量 15%, 提取时间 1.5 h, 该工艺下枸杞脂溶性物质的得率、不饱和脂肪酸及其占总脂肪酸比例、总类胡萝卜素的含量均相对较高, 此条件下枸杞脂溶性物质的得率为 8.55%, 不饱和脂肪酸含量为 80.958%, 占总脂肪酸含量的 87.94%, 总类胡萝卜素含量为 37.64 mg·g<sup>-1</sup>, 其中玉米黄素双棕榈酸酯的含量为 29.54 mg·g<sup>-1</sup>; 高效制备液相色谱制备的玉米黄素双棕榈酸酯的单体纯度>99%。本研究获得了枸杞脂溶性物质的超临界 CO<sub>2</sub> 中试提取工艺及枸杞玉米黄素双棕榈酸酯单体制备条件, 为枸杞脂溶性物质的研究和开发利用提供基础。

**关键词:**超临界提取, 枸杞, 类胡萝卜素, 玉米黄素双棕榈酸, 脂肪酸

中图分类号: TS201

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)11-0185-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090164



本文网刊:

## Pilot Extraction and Component Analysis of Fat-Soluble Substances from *Lycium barbarum* L. and the Preparation of Major Carotenoids Monomer

MI Jia, LUO Qing<sup>+</sup>, LU Lu, JIN Bo, LI Xiaoying, CAO Youlong, YAN Yamei<sup>\*</sup>

(Institute of Wolfberry Science, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China)

**Abstract:** In order to study the pilot production process for supercritical CO<sub>2</sub> extraction of fat-soluble substances from *Lycium barbarum* L., and for obtaining the preparation process of zeaxanthin dipalmitate monomer. The effect of pressure, temperature, time and co-solvent on the extraction yield of *Lycium barbarum* L. fat-soluble substances was studied, the orthogonal test was then used to optimize the extraction rate based on single factor experiment. The carotenoids and fatty acids in the fat-soluble substance of *Lycium barbarum* L. were analyzed by colorimetry, HPLC and GC-MS, and the zeaxanthin dipalmitate monomer was prepared by high performance preparative liquid chromatography. The results showed that the best pilot production process was that 15% ethanol was added, the extract temperature reached 50 °C and pressure reached 30 MPa, and extract for 1.5 h, when the yield and quality of fat-soluble substances were both considered. Under this process, the extraction rate of fat-soluble substances, unsaturated fatty acids and their proportion in total fatty acids, and the content of total carotenoids were relatively higher. While the extraction rate of fat-soluble substances was 8.55%, the

收稿日期: 2021-09-13 +并列第一作者

基金项目: 宁夏重点研发计划 (2019BFG02026); 宁夏青年科技人才托举工程 (NXKJTJGC2020048)。

作者简介: 米佳 (1989-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 枸杞加工与贮藏, E-mail: lorna0102@126.com。

罗青 (1967-), 女, 本科, 副研究员, 研究方向: 枸杞加工与贮藏, E-mail: luqing640603@163.com。

\* 通信作者: 闫亚美 (1982-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 枸杞加工与贮藏, E-mail: yanyamei@163.com。

content of unsaturated fatty acids was 80.958%, which accounts for 87.94% of the total fatty acid content, the content of total carotenoid and zeaxanthin dipalmitate was 37.64 mg·g<sup>-1</sup> and 29.54 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. The monomer of zeaxanthin dipalmitate with purity greater than 99% was prepared by pre-HPLC. In this study, the pilot-scale extraction process for supercritical CO<sub>2</sub> extract of fat-soluble substance and the preparation conditions of the zeaxanthin dipalmitate monomer from *Lycium barbarum* L. were obtained, which provided a basis for the research, development and utilization of the fat-soluble substances of *Lycium barbarum* L..

**Key words:** supercritical fluid extraction; *Lycium barbarum* L.; carotenoids; zeaxanthin dipalmitate; fatty acids

枸杞(*Lycium barbarum* L.)属于茄科(Solana-ceae)枸杞属(*Lycium* L.),其果实富含多种功效物质,其中包括两种主要的脂溶性物质,一种是类胡萝卜素类物质尤其是玉米黄素双棕榈酸酯<sup>[1]</sup>,多项研究已证实,该物质对肝脏具有突出的保护作用,能够缓解由四氯化碳引起的小鼠肝细胞损伤<sup>[2]</sup>,对一般性肝损伤、肝纤维化程度和肝内氧化应激压力<sup>[3]</sup>,乙肝<sup>[4]</sup>等引起的肝损伤有缓解和改善作用,其对肝脏的保护能力与公认的肝脏保护剂-水飞蓟素相当,且具有良好的抗氧化活性<sup>[5]</sup>。另一种是脂肪酸,主要存在于枸杞籽中,枸杞籽中脂肪酸的含量大约为12%~17%<sup>[6]</sup>,这其中大约有90%为不饱和脂肪酸<sup>[7]</sup>,这类物质能够调节机体的脂类代谢、免疫,具有抗癌、预防和治疗心血管疾病、促进机体生长发育以及调控基因的表达等功能<sup>[8]</sup>。

超临界CO<sub>2</sub>提取技术是利用CO<sub>2</sub>在超临界状态下对溶质有很高的溶解能力,而在非超临界状态下对溶质的溶解能力又很低的这一特性,来实现对目标成分的提取和分离<sup>[9]</sup>。近年来逐渐应用于具有高附加值的油脂类物质的提取,如类胡萝卜素<sup>[10]</sup>、脂溶性维生素<sup>[11]</sup>、咖啡豆油<sup>[12]</sup>等,具有传质速率快、提取率高、操作条件温和、无有机溶剂残留等特点。该项技术在枸杞脂溶性物质,包括枸杞籽油、枸杞类胡萝卜素的提取中已有应用。目前超临界CO<sub>2</sub>应用于枸杞研究中多为单一玉米黄素或脂肪酸的提取,例如Guo等<sup>[13]</sup>用正交试验优化了枸杞籽油的提取工艺;周学义<sup>[14]</sup>以乙醇为夹带剂,获得了从枸杞中提取玉米黄质的超临界提取方法;牛东玲等<sup>[15]</sup>获得了枸杞脂溶性色素的超临界小量制备工艺,所得脂溶性成分为β-胡萝卜素、β-隐黄质和玉米黄素。而对于同时提取包括玉米黄素双棕榈酸酯等类胡萝卜素和脂肪酸的中试提取工艺研究极少报道。

枸杞富含水溶性的小分子糖(主要是果糖和葡萄糖)<sup>[16]</sup>,在实际生产中,伴随着提取压力或温度的升高,料渣易黏结,一方面造成提取不完全、提取率降低,另一方面,粘结在萃取釜中的料块难以取出,严重影响了生产。本研究在项目组现有的研究基础上,将枸杞子原料进行降糖处理后,以乙醇为助溶剂,研究枸杞脂溶性物质的超临界提取中试生产工艺,对其类胡萝卜素和脂肪酸成分进行分析,并制备了主要类胡萝卜素-玉米黄素双棕榈酸酯的单体。为枸杞子脂溶性化合物的研究和开发利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

枸杞(统货) 购自宁夏中宁枸杞交易市场;超纯CO<sub>2</sub> 纯度>99.99%,宁夏宁丰制氧厂;β-胡萝卜素(HPLC纯度≥96%)、玉米黄素双棕榈酸酯(HPLC纯度≥98%) 瑞士Carote Nature;甲醇、乙腈、甲基叔丁基醚、二氯甲烷 色谱纯, Fisher chemical;正庚烷、甲苯、异辛烷 色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;单个脂肪酸甲酯标准品、37种脂肪酸甲酯混标 上海安谱实验科技股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

HA220-40-48超临界萃取装置 江苏南通市华安超临界萃取有限公司;TU-1810紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;R-300旋转蒸发器 瑞士步琪有限公司;BS224S电子天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;1260高效液相色谱仪(包括G1311C泵,G1329B自动进样器,G1316A柱温箱,G1315D DAD检测器) 美国安捷伦科技有限公司;SZM-20超微粉碎机 山东泰安正信科技有限公司;超纯水制备系统 美国Millipore公司;GC-2010 Plus气相色谱仪 日本岛津;SP-2560(100 m×0.25 mm, 0.2 μm)毛细管色谱柱 上海安谱实验科技股份有限公司;DZKW-D-1恒温水浴 上海科恒实业发展有限公司;LD5-2B离心机 北京京立离心机有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 枸杞原料的预处理 参考文献方法<sup>[17]</sup>,将枸杞子除杂后取20 kg置于6倍质量的、45℃温水中,搅拌并浸泡30 min,沥水,重复操作4次,沥水后50℃热风烘干,粉碎过100目筛后备用。

1.2.2 预处理前后枸杞总类胡萝卜素、总糖及多糖含量的测定 预处理前后枸杞中的总类胡萝卜素、总糖和多糖用下列方法进行测定,测定前将样品放置烘箱50℃烘至恒重。

1.2.2.1 总类胡萝卜素的测定 参考文献方法进行测定<sup>[18]</sup>。称取枸杞样品约2 g,加3粒BHT后加液氮研磨,用10 mL四氢呋喃超声(功率为360 W)提取10 min,过滤后收集滤液,滤渣用相同提取工艺提取至无色,合并滤液后,加20 g无水硫酸钠脱水过滤,于35℃浓缩蒸干。然后用石油醚溶解并定容至25 mL,紫外分光光度计测定在460 nm处的吸光

度 A。同法制备不同浓度的  $\beta$ -胡萝卜素标准溶液, 绘制所得标准曲线为:  $y=0.0127x+0.029$ , 决定系数  $R^2=0.9993$ ,  $x$  为类胡萝卜素含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 线性范围为  $0.5\sim 5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $y$  为吸光值, 并由此计算总类胡萝卜素的含量。

1.2.2.2 总糖和多糖含量的测定 总糖的测定参考文献方法<sup>[19]</sup>, 以 1:10 的料液比, 沸水提取 20 min, 再重复提取两次后合并滤液即得到总糖提取液。以蒽酮比色法进行测定, 以葡萄糖为标准品绘制的标准曲线为  $y=0.0603x+0.0312$ , 其中  $y$  轴为 630 nm 处的吸光度值,  $x$  轴为葡萄糖的浓度,  $x$  轴的线性范围为  $0\sim 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 决定系数  $R^2=0.9991$ 。按照标准曲线计算样品中总糖的含量。

枸杞多糖的测定参考文献方法<sup>[20]</sup>, 以 1:25 的料液比, 用 90 °C 的水超声(240 W)提取 20 min 后浓缩, 以 4 倍体积的无水乙醇醇沉过夜即得到枸杞多糖, 以苯酚硫酸法进行测定, 以葡萄糖为标准品绘制的标准曲线为  $y=48.921x-0.0023$ , 其中  $y$  轴为 490 nm 处的吸光度值,  $x$  轴为葡萄糖的浓度,  $x$  轴的线性范围为  $1\sim 18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 决定系数  $R^2=0.9991$ 。按照标准曲线计算样品中多糖的含量。

### 1.2.3 超临界 $\text{CO}_2$ 提取枸杞脂溶性物质的工艺流程及优化

1.2.3.1 工艺流程 称取枸杞粉 10 kg, 按照比例加入乙醇, 装入 20 L 的萃取釜内, 设定温度, 通入  $\text{CO}_2$  气体并设定压力, 待压力稳定开始计时, 进行一定时间的静态提取, 然后打开气体出口阀门, 开始动态提取, 收集提取产物, 减压浓缩除去乙醇后即得到枸杞脂溶性物质。

1.2.3.2 单因素实验 分别考察提取压力(24、26、28、30、32 MPa), 温度(35、40、45、50、55 °C), 乙醇添加量(0、5%、10%、15%、20%)和提取时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)对枸杞脂溶性物质得率的影响。考察某一单因素时, 其他因素的固定水平为: 提取温度 45 °C, 提取时间 2 h, 提取压力 28 MPa, 乙醇添加量 10%。

1.2.3.3 正交试验 在单因素实验的基础上, 并考虑能耗, 选用正交表进行实验, 考察脂溶性物质的得率, 所采用的因素和水平见表 1。

表 1 正交设计试验因素水平表  
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment list

水平	因素			
	A 提取温度(°C)	B 提取压力(MPa)	C 乙醇添加量(%)	D 提取时间(h)
1	40	28	5	1.5
2	45	30	10	2
3	50	32	15	2.5

1.2.3.4 枸杞脂溶性物质得率的计算 将 1.2.3.1 中的枸杞脂溶性物质称重后计算得率, 枸杞脂溶性物质得率(%)=脂溶性物质的质量/装料量 $\times 100$ 。

### 1.2.4 枸杞脂溶性物质的成分分析

1.2.4.1 类胡萝卜素含量的测定 a.总类胡萝卜素的测定: 称取枸杞脂溶性物质 0.2 g, 用石油醚定容到 5 mL 待测, 测定方法同 1.2.2.1。

b.类胡萝卜素主要组分的测定: 称取约 35 mg 枸杞脂溶性物质用二氯甲烷溶解定容至 100 mL, 参考文献方法进行测定<sup>[18]</sup>。对照品的标准曲线如下,  $\beta$ -胡萝卜素为:  $y=1415.0476x+1.7267$ , 决定系数  $R^2=0.9996$ , 线性范围  $0\sim 0.1 \mu\text{g}$ ; 玉米黄素双棕榈酸酯的标准曲线为:  $y=5748.9452x-32.7139$ , 决定系数  $R^2=1.0000$ , 线性范围  $0\sim 3 \mu\text{g}$ 。

1.2.4.2 脂肪酸含量的测定 参照 GB 5009.168-2016 中的外标法进行测定。称取枸杞脂溶性物质 2 g 加入 10 mL 盐酸, 75 °C 振荡水浴中水解 40 min, 冷却后加入 95% 的乙醇溶液 10 mL, 用 50 mL 石油醚提取 3 次后得到脂肪, 继续用 2% 的氢氧化钠甲醇溶液回流皂化后, 最后加入 15 mL 正庚烷进行甲酯化得到待测液。色谱条件: 色谱柱: SP-2560 毛细管色谱柱(100 m $\times$ 0.25 mm, 0.2  $\mu\text{m}$ ); 升温程序: 100 °C 保持 5 min, 10 °C/min 升至 200 °C, 保持 2 min, 1 °C/min 升至 225 °C, 保持 8 min, 4 °C/min 升至 240 °C 保持 5 min; 载气: 氮气; 流速: 1.0 mL/min; 进样量 1.0  $\mu\text{L}$ ; 分流比: 100:1; 汽化室温度: 240 °C; 检测器温度: 260 °C。

1.2.5 枸杞主要类胡萝卜素—玉米黄素双棕榈酸酯单体的制备 用高效液相色谱法制备枸杞玉米黄素双棕榈酸酯单体<sup>[18]</sup>。称取枸杞脂溶性物质 0.2 g 溶解于 1 mL 二氯甲烷, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后等待进样。色谱条件: 色谱柱: YMC C30 色谱柱(250 mm $\times$ 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 洗脱液: A 相: 甲醇: 乙腈: 水: 三乙胺=81:14:5:0.08(v/v), B 相: 甲基叔丁基醚: 二氯甲烷=1:1(v/v); 洗脱梯度: 0~7 min: B 16%~75%, 7~11 min: B 75%~49.4%; 11~17 min: B 49.4%~16%; 进样量: 300~800  $\mu\text{L}$ , 检测波长: 450 nm; 馏分收集以基于色谱峰的模式, 采用 1.2.4.1b 中的方法进行测定分析。

### 1.3 数据处理

数据统计分析使用 SPSS 软件进行方差分析(ANOVA), 采用 Duncan 法对数据进行单因素方差分析, 显著性水平为 0.05, 所有实验均重复三次, 正交实验采用 Desin-Expert 软件进行设计, 采用 Origin 软件进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 预处理对枸杞主要成分的影响

枸杞中含有大量水溶性的小分子糖, 而超临界提取是在高温和高压的状态下进行的, 这就使得提取过程中料渣黏结, 影响提取效率, 因此, 本实验采用水提法除掉样品中的部分可溶性糖, 以此提高枸杞脂溶性物质的得率。如表 2 所示, 枸杞样品经预处理后, 单位质量的原料中总类胡萝卜素含量较处理前提高

2.67倍,总糖含量降低了约50%,多糖含量降低了21.41%,这是因为样品在预处理的时候用水提法去除可溶性糖的同时损失掉了部分多糖。总糖含量的降低可以有效减少物料在提取时的粘结,提高得率。

表2 预处理前后枸杞主要成分含量

Table 2 The main contents of *Lycium barbarum* L. before and after pretreatment

样品	总类胡萝卜素(mg·g <sup>-1</sup> )	总糖(%)	多糖(%)
处理前	3.00±0.41	53.88±2.52	5.65±0.09
处理后	11.01±0.63	27.65±2.96	4.44±0.64

## 2.2 单因素结果分析

超临界提取枸杞脂溶性物质的单因素实验结果如图1所示,随着提取压力的增大,得率不断增大,在压力为30 MPa时得率达到最高值,这是因为增大压力能够有效破坏植物组织的细胞结构,使得脂溶性物质溶出,从而增大了得率<sup>[21]</sup>,但继续增大压力得率会呈现下降的趋势,这可能是压力增大使得粉末的堆密度增加,降低了扩散能力,且CO<sub>2</sub>在物料中的传质时间变短,从而使得率降低<sup>[22]</sup>。

脂溶性物质的得率随着提取温度的增加呈现先升高再降低趋势,在45℃时得率最高。之后随着提取温度的增加,得率呈现下降的趋势,这是因为当大于一定温度时,高温会对类胡萝卜素、脂肪酸等物质造成破坏,造成类胡萝卜素的降解和异构化<sup>[23]</sup>。

随着乙醇添加量的增大和提取时间的延长,得率呈现先迅速增长后趋于平稳的趋势。类胡萝卜素是一类低极性物质,添加乙醇等夹带剂能够帮助其在CO<sub>2</sub>中的溶解,从而提高类胡萝卜素的得率<sup>[24]</sup>,增加提取时间能使提取过程更充分,但随着提取时间的延长,传质达到了顶点,效率开始降低,单位时间内的得率降低<sup>[25]</sup>。而助溶剂的添加量越多,后期产品中除掉助溶剂所需的能耗也越大,提取时间的不断延长也会造成能耗与产率不平衡,综合考虑仪器耐压和能耗问题,设计正交试验继续进行提取工艺的优化。

## 2.3 正交试验结果分析

2.3.1 正交试验结果 以脂溶性物质的得率为评价指标。表3结果表明,在本实验方案所取得的因素和水平下,最佳处方工艺组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>,各因素的重要指标程度依次为C>A>B>D。即乙醇添加量>提取温度>提取压力>提取时间。

2.3.2 验证试验 根据正交试验的结果,超临界CO<sub>2</sub>提取枸杞脂溶性物质的最佳工艺条件为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>,按照此试验条件进行验证,得到超临界提取枸杞脂溶性物质的得率为8.56%,优于正交试验各组的试验结果,表明该优化工艺条件结果可靠。即当提取温度为45℃,提取压力为30 MPa,乙醇添加量为15%,提取时间为1.5 h时枸杞脂溶性物质的得率最高。

## 2.4 枸杞脂溶性物质的成分分析

为考察枸杞脂溶性物质的品质,选取9组正交

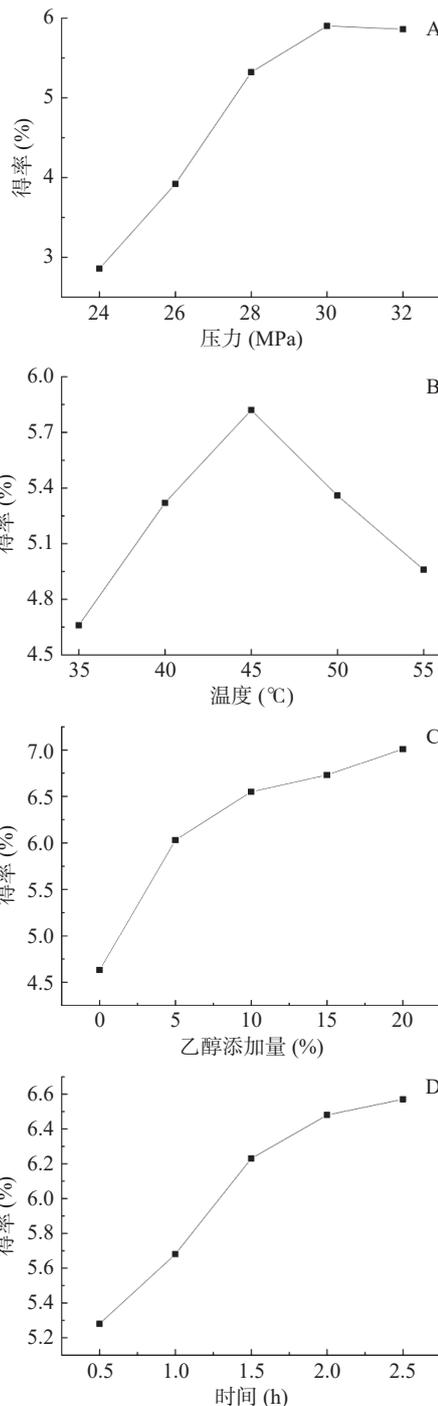


图1 单因素对枸杞脂溶性物质得率的影响  
Fig.1 Influence of single factor on the yield of fat soluble substance from *Lycium barbarum* L.

试验及优化试验的枸杞脂溶性物质进行类胡萝卜素和脂肪酸的含量和组分分析。

2.4.1 枸杞脂溶性物质中的类胡萝卜素 将枸杞脂溶性物质用二氯甲烷溶解后进行HPLC分析,枸杞脂溶性物质中总类胡萝卜素及主要组分的含量见表4,不同提取工艺下总类胡萝卜素的含量和组分差异较大,其中类胡萝卜素的主要成分为玉米黄素双棕榈酸酯,部分工艺条件下提取的脂溶性产物中检测到少量的β-胡萝卜素,总类胡萝卜素的含量约为17.59~39.52 mg·g<sup>-1</sup>,而玉米黄素双棕榈酸酯占总类胡萝卜

表 3 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验结果  
Table 3 Results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experiments

序号	因素				得率(%)
	A	B	C	D	
	提取温度(℃)	提取压力(MPa)	乙醇添加量(%)	时间(h)	
1	1	1	1	1	6.05
2	1	2	2	2	4.67
3	1	3	3	3	5.73
4	2	1	3	2	7.71
5	2	2	1	3	7.19
6	2	3	2	1	5.56
7	3	1	2	3	5.61
8	3	2	3	1	8.55
9	3	3	1	2	5.75
K <sub>1</sub>	5.48	6.46	6.33	6.72	
K <sub>2</sub>	6.82	6.80	5.28	6.04	
K <sub>3</sub>	6.64	5.68	7.33	6.18	
R	1.34	1.12	2.06	0.68	

表 4 类胡萝卜素含量结果  
Table 4 Results of carotenoids contents

序号	β-胡萝卜素 (mg·g <sup>-1</sup> )	玉米黄素双棕榈 酸酯(mg·g <sup>-1</sup> )	总类胡萝卜素 (mg·g <sup>-1</sup> )	玉米黄素双棕榈 酸酯/总类胡 萝卜素(%)
1	-	14.86	25.88	57.42
2	1.23	20.54	35.24	58.29
3	-	15.48	24.69	62.70
4	-	29.30	35.70	82.07
5	-	8.46	17.59	48.10
6	1.32	28.42	39.52	71.91
7	-	16.90	26.04	64.90
8	-	29.54	37.64	78.48
9	2.85	16.34	36.30	45.01
优化实验	-	26.50	32.75	80.92

注: -表示未检测到;表5同。

表 5 枸杞脂溶性物质中脂肪酸组成及含量

Table 5 Composition and content of fatty acids in fat-soluble substances of *Lycium barbarum* L.

脂肪酸类型	脂肪酸含量(%)									优化实验
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
肉豆蔻酸(C <sub>14:0</sub> )	0.100	-	0.066	0.073	0.040	0.075	0.074	0.095	0.052	0.042
棕榈酸(C <sub>16:0</sub> )	7.270	2.590	4.260	4.960	2.600	5.280	5.310	7.600	3.460	2.277
棕榈油酸(C <sub>16:1</sub> )	0.300	0.074	0.132	0.200	0.071	0.158	0.247	0.308	0.110	0.071
十七碳酸(C <sub>17:0</sub> )	0.117	0.067	0.096	0.125	-	0.098	0.093	0.067	-	-
硬脂酸(C <sub>18:0</sub> )	1.540	0.459	0.968	1.240	0.372	1.240	1.360	2.240	0.616	0.856
油酸(C <sub>18:1n9c</sub> )	12.500	3.780	7.570	10.100	3.460	9.760	11.000	17.400	5.640	7.060
亚油酸(C <sub>18:2n6c</sub> )	42.700	11.900	27.300	32.800	10.100	33.200	38.600	60.300	18.000	30.610
花生酸(C <sub>20:0</sub> )	0.354	-	0.149	0.360	0.132	0.303	0.267	0.316	0.068	0.110
γ-亚麻酸(C <sub>18:3n6</sub> )	1.060	0.298	0.650	1.000	0.243	0.846	0.968	1.440	0.432	0.335
花生烯酸(C <sub>20:1</sub> )	1.440	0.686	1.040	1.270	0.646	1.170	1.080	1.510	0.824	1.046
山萘酸(C <sub>22:0</sub> )	1.120	0.295	0.341	0.713	0.524	0.499	0.594	0.785	0.567	0.119
总脂肪酸	68.501	20.148	42.572	52.841	18.188	52.630	59.592	92.061	29.769	44.577
饱和脂肪酸	10.501	3.411	5.880	7.471	3.668	7.496	7.697	11.103	4.763	5.455
不饱和脂肪酸	58.000	16.738	36.692	45.370	14.520	45.134	51.895	80.958	25.006	39.122
饱和脂肪酸/不饱和脂肪酸	18.11	20.38	16.03	16.47	25.26	16.61	14.83	13.71	19.05	13.94
不饱和脂肪酸/总脂肪酸	84.67	83.07	86.19	85.86	79.83	85.76	87.08	87.94	84.00	87.76

素的 45.01%~82.07%, 在 6 号实验工艺条件下获得的脂溶性物质, 总类胡萝卜素含量最高为 39.52 mg/g, 其次为 8 号实验工艺条件下获得的脂溶性物质, 总类胡萝卜素含量为 37.64 mg/g, 而得率最高的优化工艺, 其总类胡萝卜素含量仅为 32.75 mg/g。

2.4.2 枸杞脂溶性物质中的脂肪酸 枸杞中的脂肪酸主要来自于枸杞籽, 枸杞籽油中大约含有 12%~17% 的脂肪酸, 其中约 90% 为不饱和脂肪酸, 其主要成分为亚油酸和油酸, 含量分别为 63%~72% 和 15%~21%<sup>[6-7,26]</sup>。不同提取条件下脂肪酸的组分含量有所差异, 已报道含有长碳链的甘油酯的溶解度会随着压力的升高而增大<sup>[27]</sup>, 随着提取时间的延长, 高碳链的脂肪酸甘油酯得率会显著增大, 而碳链短、分子量越低的脂肪酸甘油酯在超临界 CO<sub>2</sub> 中的溶解度较大, 在提取开始时更容易被提取出<sup>[28-29]</sup>。本研究采用 GC-MS 分析了超临界 CO<sub>2</sub> 提取的枸杞脂溶性物质中的脂肪酸种类和含量, 枸杞脂溶性物质中的脂肪酸种类和含量如表 5 所示, 不同提取工艺条件下枸杞脂溶性物质中的脂肪酸种类和含量有所差异, 共检测出脂肪酸 10~11 种, 其中不饱和脂肪酸有 5 种, 不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的 79.83%~87.94%。饱和脂肪酸有 6 种, 饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比值为 13.71%~25.26%。枸杞果实脂溶性物质中的脂肪酸含量最高的成分为亚油酸、油酸和棕榈酸, 分别占总脂肪酸含量的 55.53%~65.50%、17.78%~19.11% 和 8.26%~14.30%。在 8 号实验工艺条件下获得的脂溶性物质, 其脂肪酸含量最高, 为 92.061%, 不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的比例也最高, 为 87.94%; 在优化工艺条件下获得的脂溶性物质, 其脂肪酸含量远低于 8 号实验工艺条件。

综上,不同提取工艺条件下枸杞脂溶性物质的成分组成有较大的差异,对比9组正交实验和优化实验,在8号实验工艺条件下脂溶性物质的得率为8.55%,仅次于优化实验,而其中的脂肪酸含量最高,不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的比例也最高,为87.94%,总类胡萝卜素的含量相对较高,为37.64 mg/g,该工艺条件下脂溶性物质的不饱和脂肪酸含量和总类胡萝卜素含量均高于优化工艺;因此,在综合考虑脂溶性物质的得率和品质的情况下,确定枸杞脂溶性物质的最佳提取工艺为:提取温度50℃,压力30 MPa,乙醇添加量15%,提取时间1.5 h。

### 2.5 枸杞主要类胡萝卜素单体的制备

用高效液相色谱制备枸杞脂溶性物质的主要胡萝卜素组分 I,玉米黄素双棕榈酸酯标准品与组分 I 的 HPLC 色谱图见图 2,由图 2 可见,玉米黄素双棕榈酸酯标准品的保留时间为 50.096 min,枸杞类胡萝卜素组分 I 的保留时间为 50.401 min,标准品与样品的保留时间相近,可以判断组分 I 为玉米黄素双棕榈酸酯。利用 1.2.4.1b 中的玉米黄素双棕榈酸酯的标准曲线回归方程,计算得出组分 I 的纯度为 99.13%。玉米黄素双棕榈酸酯是枸杞中的特征性类胡萝卜素,在护肝、抗氧化等方面具有优异的功效,该单体可以为玉米黄素双棕榈酸酯的定性、定量分析提供高纯度的对照品或用于功效作用的研究等。

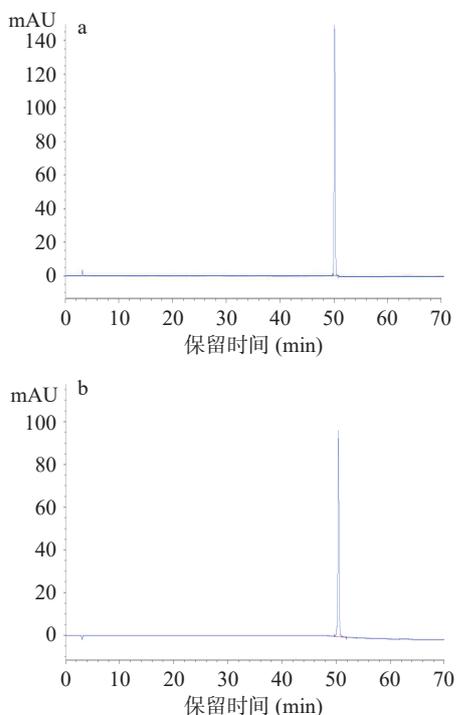


图2 玉米黄素双棕榈酸酯标准品(a)和类胡萝卜素组分 I (b)的 HPLC 谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of standard zeaxanthin dipalmitate (a) and carotenoids fraction I (b)

### 3 结论

本文首先将干果枸杞降糖后采用超临界 CO<sub>2</sub> 提取枸杞中的脂溶性物质,并分析了脂溶性物质中的脂

肪酸和类胡萝卜素的含量,综合考虑得率,不饱和脂肪酸含量和比例、总类胡萝卜素含量后,获得枸杞脂溶性物质最佳中试提取工艺:提取温度为 50℃,压力为 30 MPa,乙醇添加量为 15%,提取时间为 1.5 h;并采用高效制备液相制得了纯度>99% 玉米黄素双棕榈酸酯单体。为枸杞果实脂溶性物质的开发利用提供数据支持,为枸杞特征功效成分玉米黄素双棕榈酸酯的进一步研究提供基础。

### 参考文献

- [1] WANG C C, CHANG S C, INBARAJ B S, et al. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity[J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(1): 184–192.
- [2] KIM H P, KIM S Y, LEE E J, et al. Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* has hepatoprotective activity[J]. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 1997, 97(3): 301–314.
- [3] KIM H P, LEE E J, KIM Y C, et al. Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* fruit reduces experimentally induced hepatic fibrosis in rats[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25(3): 390–392.
- [4] LI J J, GAO H, LV Y. Zeaxanthin dipalmitate alleviates hepatic injury induced by superimposed chronic hepatitis B and non-alcoholic steatohepatitis in non-obese mice[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2017, 19(9): 910.
- [5] WOJDYŁO A, NOWICKA P, BĄBELEWSKI P. Phenolic and carotenoid profile of new goji cultivars and their anti-hyperglycemic, anti-aging and antioxidant properties[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48: 632–642.
- [6] 周建中, 高蕾, 王伟, 等. 不同提取方法对枸杞籽油品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(2): 110–111. [ZHOU J Z, GAO L, WANG W, et al. The analysis of *Lycium* seed oil by various extraction process[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(2): 110–111.]
- [7] 李国梁, 史俊友, 孙志伟, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取柴达木枸杞籽油工艺与籽油成分研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(5): 257–259. [LI G L, SHI J Y, SUN Z W, et al. Study on the supercritical CO<sub>2</sub> extraction techniques and composition of seed oil from Qaidam Basin *Lycium barbarum*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(5): 257–259.]
- [8] 张晓图, 杜晨红, 丁小娟, 等. 多不饱和脂肪酸的生物学功能及其在动物生产中的应用[J]. *动物营养学报*, 2017, 29(9): 3059–3067. [ZHANG X T, DU C H, DING X J, et al. Biological functions of polyunsaturated fatty acids and its application in animal production[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(9): 3059–3067.]
- [9] SAHENA F, ZAIDUL I S M, JINAP S, et al. Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction—A review[J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 95(2): 240–253.
- [10] ZAGHDOUDI K, FRAMBOISIER X, CÉLINE F, et al. Response surface methodology applied to supercritical fluid extraction (SFE) of carotenoids from persimmon (*Diospyros kaki* L.)[J]. *Food Chemistry*, 2016, 208(208): 209–219.

- [ 11 ] CHRONOPOULOU L, BOSCO C D, CAPRIO F D, et al. Extraction of carotenoids and fat-soluble vitamins from *Tetrademus obliquus* microalgae: An optimized approach by using supercritical CO<sub>2</sub>[J]. *Molecules*, 2019, 24(14): 2581.
- [ 12 ] SALAMATIN A A. Supercritical fluid extraction of the seed fatty oil: Sensitivity to the solute axial dispersion[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2020, 59(40): 18126–18138.
- [ 13 ] GUO L L, JUN Y S, YOU R S, et al. Supercritical CO<sub>2</sub> cell breaking extraction of *Lycium barbarum* seed oil and determination of its chemical composition by HPLC/APCI/MS and antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44(4): 1172–1178.
- [ 14 ] 周学义. 从枸杞、枸杞渣粕中提取玉米黄质的方法: 201110406665.9 [P]. 2013-06-05. [ ZHOU X Y. Extraction of zeaxanthin from *Lycium barbarum* and *Lycium barbarum* residue: 201110406665.9 [P]. 2013-06-05. ]
- [ 15 ] 牛东玲, 安绍芳. 一种枸杞子脂溶性色素的制备方法: 201510196410.2 [P]. 2015-09-09. [ NIU D L, AN S F. A preparation method of fat soluble pigment from *Lycium barbarum*: 201510196410.2 [P]. 2015-09-09. ]
- [ 16 ] 李越颀, 米佳, 闫亚美, 等. 不同产地宁夏枸杞主要化学成分分析[J]. *食品工业科技*, 2017(21): 293–295, 336. [ LI Y K, MI J, YAN Y M, et al. Main chemical constituents analysis of *Lycium barbarum* L. from different regions[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017(21): 293–295, 336. ]
- [ 17 ] 闫亚美, 曹有龙, 米佳, 等. 一种提取枸杞中的玉米黄质及其衍生物的方法: 201610768879.3 [P]. 2018-07-18. [ YAN Y M, CAO Y L, MI J, et al. A method for extracting zeaxanthin and its derivatives from *Lycium barbarum*: 201610768879.3 [P]. 2018-07-18. ]
- [ 18 ] 米佳, 禄璐, 戴国礼, 等. 枸杞色泽与其类胡萝卜素含量和组成的相关性[J]. *食品科学*, 2018, 39(5): 81–86. [ MI J, LU L, DAI G L, et al. Correlations between skin color and carotenoid contents in wolfberry[J]. *Food Science*, 2018, 39(5): 81–86. ]
- [ 19 ] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 中国轻工业出版社, 2007. [ CAO J K, JIANG W B, ZHAO Y M. Guidance of post-harvest physiological and biochemical experiments of fruits and vegetables[M]. China Light Industry Press, 2007. ]
- [ 20 ] 米佳, 杨雪莲, 禄璐, 等. 枸杞蜂花粉多糖超声波提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. *食品科学技术学报*, 2020, 38(1): 97–103. [ MI J, YANG X L, LU L, et al. Ultrasound-assisted extraction optimization and analysis of antioxidant activities of polysaccharides from bee pollen of wolfberry[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 38(1): 97–103. ]
- [ 21 ] KHAJEH M. Optimization of process variables for essential oil components from *Satureja hortensis* by supercritical fluid extraction using Box-Behnken experimental design[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2011, 55(3): 944–948.
- [ 22 ] 黄忆真, 李杰, 谈满良, 等. 西兰花籽油超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺及脂肪酸组成分析[J]. *中国油脂*, 2018, 43(12): 8–11, 24. [ HUANG Y Z, LI J, TAN M L, et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of broccoli seed oil and its fatty acid composition[J]. *China Oils and Fats*, 2018, 43(12): 8–11, 24. ]
- [ 23 ] PRADO J M, VEGGI P C, MEIRELES M A. Extraction methods for obtaining carotenoids from vegetables—review[J]. *Current Analytical Chemistry*, 2014, 10(1): 29–66.
- [ 24 ] LIMA M D A, CHARALAMPOPOULOS D, CHATZIFRAGKOU A. Optimisation and modelling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction process of carotenoids from carrot peels[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2018, 133(1): 94–102.
- [ 25 ] 陆少兰, 谭传波, 郝泽金, 等. 微波预处理-超临界 CO<sub>2</sub> 萃取牡丹籽油的工艺研究[J]. *中国油脂*, 2015, 40(5): 9–13. [ LU S L, TAN C B, HAO J Z, et al. Microwave pretreatment-supercritical carbon dioxide extraction of peony seed oil[J]. *China Oils and Fats*, 2015, 40(5): 9–13. ]
- [ 26 ] 汤丽华, 马桂娟. 宁夏枸杞籽油的化学成分分析[J]. *现代食品*, 2018(17): 114–118. [ TANG L H, MA G J, et al. Chemical composition analysis of *Lycium barbarum* seeds oil[J]. *Modern Food*, 2018(17): 114–118. ]
- [ 27 ] MANNINEN P, PAKARINEN J, KALLIO H. Large-scale supercritical carbon dioxide extraction and supercritical carbon dioxide countercurrent extraction of cloudberry seed oil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(7): 2533–2538.
- [ 28 ] ROY B C, GOTO M, HIROSE T. Temperature and pressure effects on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of tomato seed oil[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 1996, 31: 137–141.
- [ 29 ] HAMMAM H, SODERBERG I, SIVIK B. Physical properties of butter oil fractions obtained by supercritical carbon dioxide extraction[J]. *Fat Science and Technology*, 1991, 93(10): 374–378.