

# 陆英挥发油超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺优化及其成分分析

## Extraction optimization of volatile oil from chinese elder herb by supercritical CO<sub>2</sub> and its composition analysis

姜红宇 刘郁峰 谢国飞 刘燧琳 罗小芳 王宗成

JIANG Hong-yu LIU Yu-feng XIE Guo-fei LIU Yi-lin LUO Xiao-fang WANG Zong-cheng

(湖南科技学院湖南省银杏工程技术研究中心, 湖南 永州 425199)

(Hunan Provincial Engineering Research Center for Ginkgo Biloba, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425199, China)

**摘要:**以陆英为原料,采用单因素和响应面法优化其挥发油的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺,重点探讨 CO<sub>2</sub> 流量、萃取压力、萃取时间、萃取温度对陆英挥发油得率的影响,并通过气相色谱-质谱(GC-MS)对陆英挥发油成分进行定性定量分析。结果表明,优化的陆英挥发油提取工艺条件为:CO<sub>2</sub> 流量 25 L/h、萃取压力 30.5 MPa、萃取温度 45.0 °C、萃取时间 2.8 h,该条件下陆英挥发油得率为 0.86%。从陆英挥发油中鉴定出了 16 个成分,占挥发油含量约 93.87%,其中含量较多的有 3-甲基戊酸(29.37%)、3-甲基丁酸(13.83%)、E-4-己烯-1-醇(8.27%)等,另外 3-乙硫基丁醛(6.46%)含量也较多。

**关键词:**超临界 CO<sub>2</sub> 萃取;陆英;挥发油;成分分析

**Abstract:** The extraction conditions of volatile oil from Chinese elder herb by supercritical CO<sub>2</sub> were optimized by single factor experiment and response surface methodology. Flow rate of CO<sub>2</sub>, the pressure, temperature and time of extraction were employed to examine the influences of the yield of volatile oil. The chemical constituents were separated and identified by Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The optimal extracting conditions were flow rate of CO<sub>2</sub> 25 L/h, extraction pressure 30.5 MPa, at 45.0 °C for 2.8 h. The extraction rate of volatile oil from Chinese elder herb was 0.86%. 16 kinds of volatile compounds were separated from Chinese elder herb and accounted for 93.87% of the total extractions. The contents of the more compounds were 3-methylpentanoic acid (29.37%), 3-

methylbutanoic acid (13.83%), 4-hexene-1-ol (8.27%), and 3-(ethylthio) butanoic acid (6.46%), respectively.

**Keywords:** supercritical CO<sub>2</sub> extraction; Chinese elder herb; volatile oil; composition analysis

陆英草又名接骨草、八棱麻、走马风等,有活血散瘀、祛风除湿、消炎止痛、镇痉消肿、通经活络等功效<sup>[1-2]</sup>,可用于治疗黄疸型肝炎、风湿、脚气、痢疾、黄疸、肺炎、慢性气管炎、风疹瘙痒、冻疮、跌打损伤、骨折等疾病<sup>[3-5]</sup>,具有较高的药用价值<sup>[6-7]</sup>。现在虽有一些关于陆英中化学成分研究的文献<sup>[8-10]</sup>,但是其发挥药效的成分具体是哪些目前研究还很少<sup>[11-12]</sup>,蒋道松、廖琼峰<sup>[13][14]55-58</sup>对陆英挥发油的研究主要是鉴定其成分,提取的方法也是传统的水蒸气蒸馏法,提取工艺和得率都未见报道。陆英揉之有臭气,且味道较重,极其难闻,说明具有一些特殊气味的挥发性物质,这些挥发性物质在陆英中含量如何,有待研究分析。本试验拟采用响应面法优化超临界 CO<sub>2</sub> 萃取陆英挥发油的提取工艺,并通过气相色谱-质谱(GC-MS)进行陆英挥发油成分的定性分析,以期对陆英中挥发性物质的确认和进一步药效开发提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料及仪器

陆英:2016 年 4 月采自湖南科技学院旁西山,经清洗、烘干和粉碎,过 20 目筛后,于干燥箱中保存备用;

CO<sub>2</sub>:纯度>99.5%,永州市华兰钰兴气体有限公司;

试剂:均为分析纯;

电子天平:TE124S 型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

超临界 CO<sub>2</sub> 萃取仪:HA121-50-01 型,南通华安超临界萃取有限公司;

气质联用仪:QP2010 Plus 型,日本岛津责任有限公司。

**基金项目:**湖南省高校科技创新团队支持计划资助(编号:2012-318);湖南科技学院湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室开放基金资助(编号:XNZW16C03);永州市科技计划资助项目[编号:永科发(2016)27 号-11];湖南科技学院生物工程重点学科资助

**作者简介:**姜红宇,男,湖南科技学院讲师,博士。

**通信作者:**王宗成(1983—),男,湖南科技学院讲师,硕士。

E-mail:wangzongche@163.com

**收稿日期:**2017-03-16

## 1.2 试验方法

1.2.1 陆英挥发油的萃取方法 称取陆英干燥粉末 300 g, 放入超临界萃取仪萃取釜内, 设置萃取压力 30 MPa, 萃取温度 45 °C, CO<sub>2</sub> 流量 30 L/h, 萃取 2.5 h 后, 打开分离釜排料阀得淡黄色挥发油。

1.2.2 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取陆英挥发油的单因素试验 对 CO<sub>2</sub> 流量、萃取压力、萃取时间、萃取温度 4 个因素进行单因素试验, 以挥发油得率为指标, 确定各因素的优化区间。

(1) CO<sub>2</sub> 流量: 在萃取压力 30 MPa、萃取时间 3 h、萃取温度 45 °C 的条件下, 考察 CO<sub>2</sub> 流量(15, 20, 25, 30, 35 L/h) 对挥发油得率的影响。

(2) 萃取压力: 在 CO<sub>2</sub> 流量 25 L/h、萃取时间 3 h、萃取温度 45 °C 的条件下, 考察萃取压力(20, 25, 30, 35, 40 MPa) 对挥发油得率的影响。

(3) 萃取时间: 在 CO<sub>2</sub> 流量为 25 L/h、萃取压力 30 MPa、萃取温度 45 °C 的条件下, 考察萃取时间(1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 h) 对挥发油得率的影响。

(4) 萃取温度: 在 CO<sub>2</sub> 流量 25 L/h、萃取压力 30 MPa、萃取时间 2.5 h 条件下, 考察萃取温度(35, 40, 45, 50, 55 °C) 对挥发油得率的影响。

1.2.3 萃取工艺条件优化 在单因素试验基础上, 用 Design-Expert V8.0.6 软件, 以陆英挥发油得率为响应值, 以萃取压力、萃取时间、萃取温度为自变量, 进行三因素三水平响应面中心组合试验。

1.2.4 挥发油得率计算 按式(1)计算:

$$R = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R——挥发油得率, %;

$m_1$ ——陆英挥发油质量, g;

$m_2$ ——陆英干粉质量, g。

### 1.2.5 GC-MS 分析

(1) 气相色谱条件: 色谱柱为 Rt®-5MS 石英毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 载气为 He, 流速 1.0 mL/min; 进样口温度 250 °C; 检测温度 230 °C; 升温程序: 初始柱温 80 °C, 保持 4 min, 以 8 °C/min 速率升至 280 °C, 保持 4 min<sup>[14]56</sup>; 采取无分流进样, 进样量为 1.0 μL。

(2) 质谱条件: 离子化方式为 EI, 电子能量 70 eV, 离子源温度 250 °C, 质量扫描范围 40~400 amu<sup>[14]56</sup>。NIST107 标准质谱检索库。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 CO<sub>2</sub> 流量对得率的影响 由图 1 可知, 挥发油得率随 CO<sub>2</sub> 流量递增先明显增加, 25 L/h 后增加不明显, 30 L/h 后逐渐下降, 可能是随 CO<sub>2</sub> 流量增加, CO<sub>2</sub> 中的挥发油浓度相对减小, 萃取传质动力增大, 得率即增大, 而 CO<sub>2</sub> 流量过大时, CO<sub>2</sub> 在萃取罐中与物料接触的时间缩短使得率减少<sup>[15]</sup>, CO<sub>2</sub> 流量为 30 L/h 时, 提取陆英挥发油的效果更佳。

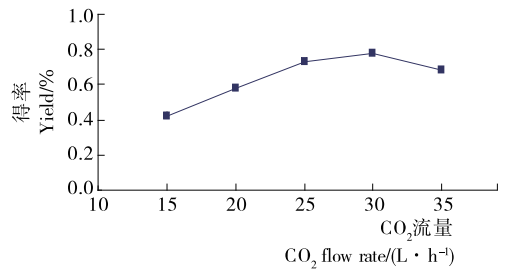


图 1 CO<sub>2</sub> 流量对得率的影响

Figure 1 Effect of CO<sub>2</sub> flow rate on the yield

2.1.2 萃取压力的影响 由图 2 可知, 得率随萃取压力递增明显增加, 30 MPa 后增加不明显。因为随萃取压力增大, 超临界 CO<sub>2</sub> 密度增加, 陆英挥发油溶解性能增大, 但随萃取压力增加到一定值时, 溶解性能增加不再显著<sup>[15-16]</sup>, 同时压力过大对设备安全性能要求高, 所以优选萃取压力为 30 MPa。

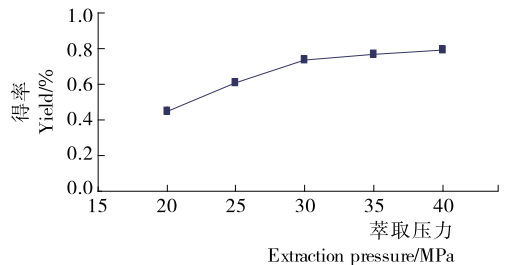


图 2 萃取压力对得率的影响

Figure 2 Effect of extraction pressure on the yield

2.1.3 萃取时间的影响 由图 3 可知, 得率随萃取时间延长先明显增加, 2.5 h 后增加不再显著。因为在萃取过程中, 超临界 CO<sub>2</sub> 流体将陆英挥发油从原料中萃取出来需要一段时间, 但是 2.5 h 后陆英原料中的挥发油可能已经很少, 萃取得率增加不再明显<sup>[15-16]</sup>, 考虑到生产周期, 萃取 2.5 h 即可。

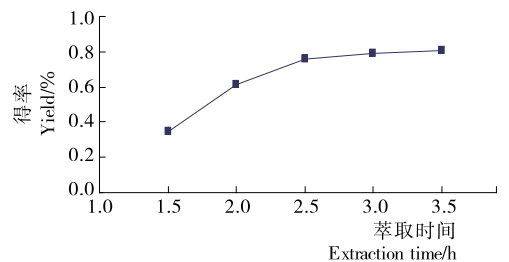


图 3 萃取时间对得率的影响

Figure 3 Effect of extraction time on the yield

2.1.4 萃取温度的影响 由图 4 可知, 得率随萃取温度递增先增加, 45 °C 后又下降, 可能是温度升高, 分子运动加快, 超临界 CO<sub>2</sub> 流量扩散能力和渗透能力都加强, 在一定温度范围内, 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取陆英挥发油的能力增强, 但是随着温度升高会降低超临界 CO<sub>2</sub> 流量的密度<sup>[15-16]</sup>, 使得率下降。因此, 萃取温度宜在 45 °C 左右。

### 2.2 响应面设计试验结果及分析

2.2.1 Box-Benhnken 设计方案及试验结果 对单因素试验结果分析, 由于 CO<sub>2</sub> 流量 25 L/h 后增加不明显, 且 30 L/h

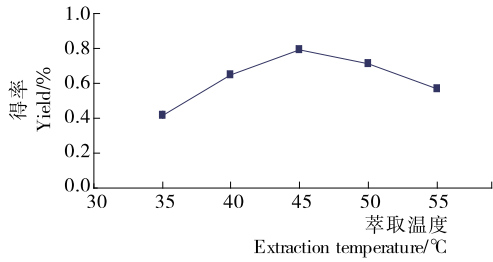


图 4 萃取温度对得率的影响

Figure 4 Effect of extraction temperature on the yield

时效果最佳,因此在固定 CO<sub>2</sub> 流量为 30 L/h 的条件下,选择萃取压力、萃取时间、萃取温度 3 个因素进行响应面优化陆英挥发油提取工艺,具体因素及水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

对试验数据进行多项拟合回归,得到陆英挥发油得率(Y)对萃取压力、萃取时间、萃取温度的多项回归模型方程为:

$$Y = 0.82 + 0.044A + 0.080B + 0.029C + 0.048AC - 0.010BC - 0.059A^2 - 0.062B^2 - 0.14C^2 \quad (2)$$

2.2.2 响应面回归模型的方差分析 为了检验模型的可靠性并确定各因素对陆英挥发油得率的影响程度,对模型进行了方差分析,结果见表 3。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Response surface experimental factor level table

水平	A 萃取压力/MPa	B 萃取时间/h	C 萃取温度/°C
-1	25	2.0	40
0	30	2.5	45
1	35	3.0	50

模型的  $F=46.43, P<0.0001$ ,二次模型是很显著的;失拟项  $P=0.2906>0.05$ ,说明模型是有意义的。3 个因素的一次项、二次项及萃取压力与萃取温度的交互项对陆英挥发油得率的影响均极显著( $P<0.01$ )。相关系数  $R^2 = 0.9835$ ,调整系数  $Adj.R^2 = 0.9623$ ,表明模型拟合程度较好;变异系数(CV)为 3.26%,说明模型的重现性很好,该试验方法可靠<sup>[17-19]</sup>,可以用该模型来分析和预测陆英挥发油的工艺条件。

表 2 响应面法试验设计及结果

Table 2 Design and result of response surface experimental

试验号	A	B	C	得率/%
1	-1	0	-1	0.58
2	0	1	1	0.69
3	-1	-1	0	0.56
4	1	0	1	0.74
5	1	0	-1	0.56
6	-1	0	1	0.57
7	0	0	0	0.83
8	0	-1	1	0.56
9	0	0	0	0.84
10	1	1	0	0.83
11	0	0	0	0.81
12	-1	1	0	0.73
13	1	-1	0	0.66
14	0	0	0	0.79
15	0	-1	-1	0.51
16	0	0	0	0.81
17	0	1	-1	0.68

表 3 响应曲面回归方程的方差分析†

Table 3 Variance analysis of response surface regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.210	9	0.024	46.43	<0.0001	**
A	0.015	1	0.015	30.24	0.0009	**
B	0.051	1	0.051	101.10	<0.0001	**
C	6.612E-003	1	6.612E-003	13.06	0.0086	**
AB	2.776E-017	1	2.776E-017	5.48E-014	1.0000	
AC	9.025E-003	1	9.025E-003	17.82	0.0039	**
BC	4.000E-004	1	4.000E-004	0.79	0.4037	
A <sup>2</sup>	0.015	1	0.015	29.19	0.0010	**
B <sup>2</sup>	0.016	1	0.016	31.70	0.0008	**
C <sup>2</sup>	0.088	1	0.088	173.00	<0.0001	**
残差	3.545E-003	7	5.064E-004			
失拟项	2.025E-003	3	6.750E-004	1.78	0.2906	
纯误差	1.520E-003	4	3.800E-004			
总和	0.220	16				

† \*\* 表示极显著( $P<0.01$ ); \* 表示显著( $P<0.05$ )。

2.2.3 最佳工艺条件 用 Design-Expert V8.0.6 软件设计优化得出最佳的萃取条件为:萃取压力 30.46 MPa、萃取时间 2.79 h、萃取温度 45.17 °C。考虑到实际操作的局限性,将超临界 CO<sub>2</sub> 萃取陆英挥发油的工艺调整为:CO<sub>2</sub> 流量 25 L/h、萃取压力 30.5 MPa、萃取温度 45.0 °C、萃取时间 2.8 h。在此条件下,经 3 次重复性验证实验,得到陆英挥发油的平均得率为 0.86%,与理论预测值(0.85%)基本相符,说明优化的提取工艺条件可靠。

### 2.3 GC-MS 分析

对超临界 CO<sub>2</sub> 萃取所得陆英挥发油进行 GC-MS 分析,得总离子流图见图 5,利用计算机标准谱库比对,对挥发油成分进行鉴定,并用峰面积归一化法计算各化合物的相对百分含量,各种成分见表 4。

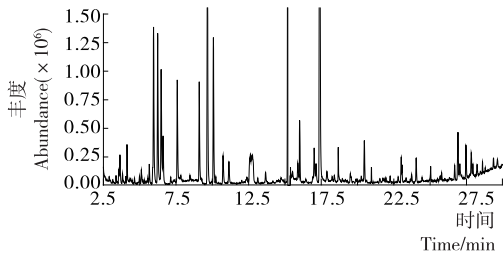


图 5 陆英挥发油的总离子流图

Figure 5 Total ion chromatogram of volatile oil from Chinese Elder Herb

表 4 陆英挥发油中的主要成分

Table 4 Main components of the volatile oil from Chinese Elder Herb

化合物名称	保留时间/min	相对含量/%
左旋-β-蒎烯	3.643	1.01
茨烯	4.128	0.98
2-甲基-5-异丙基环己酮	5.987	6.50
柠檬烯	6.243	5.85
苯并呋喃-2(3H)-酮	6.481	5.00
1-十三炔-4-醇	6.616	1.62
间甲基异丙基苯	7.594	3.63
正己醇	9.109	3.37
E-4-己烯-1-醇	9.667	8.27
E-3-己烯-1-醇	10.075	5.26
2-呋喃甲醛	11.158	0.86
3-甲基丁酸	15.192	13.83
3-乙硫基丁醛	16.012	6.46
水杨酸甲酯	17.142	0.97
3-甲基戊酸	17.389	29.37
3-烯丙基-2-甲氧基-苯酚	23.014	0.89

由表 4 可知,共鉴定出 16 个成分,占陆英挥发油含量约 93.87%,含量较多的有 3-甲基戊酸、3-甲基丁酸、E-4-己烯-1-醇等,其中 3-甲基戊酸、3-甲基丁酸在文献<sup>[13]</sup>中曾有报道,而含量较多的 E-4-己烯-1-醇、2-甲基-5-异丙基环己酮均未见报道。另外含硫化合物 3-乙硫基丁醛也未见报道且含量也较多,可能是陆英挥发油有臭味的原因。

## 3 结论

超临界 CO<sub>2</sub> 萃取陆英挥发油的最佳工艺条件为:CO<sub>2</sub> 流量 25 L/h、萃取压力 30.5 MPa、萃取时间 2.8 h、萃取温度 45.0 °C,在此条件下陆英挥发油得率为 0.86%。从陆英挥发油中鉴定出了 16 个成分,占陆英挥发油含量约 93.87%,含量较多的有 3-甲基戊酸(29.37%)、3-甲基丁酸(13.83%)、E-4-己烯-1-醇(8.27%)等。

由于药材的产地、气候、生产环境和采收季节不同,该研究发现了一些与文献不同的成分,可为陆英挥发油的进一步开发提供理论依据。但是这些成分尤其是可臭味成分是否与药效相关,仍需进一步分离进行药效学研究确认。

### 参考文献

- [1] 董立莎,胡静静,陈晓昱,等. 贵州苗药陆英的研究新进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2007, 29(6): 17-20.
- [2] 刘传安,邹盛勤. RP-HPLC 法测定陆英叶中绿原酸含量的研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(12): 2 334-2 335.
- [3] 邹盛勤,陈武. 陆英中乌索酸和齐墩果酸动态含量的研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(4): 642-643.
- [4] 李开泉,邹盛勤,陈武,等. 陆英中乌索酸提取工艺的正交优选[J]. 中草药, 2003, 34(9): 791-792.
- [5] 杨德泉. 薄层扫描法测定土家药陆英不同采收期叶与茎中 β-谷甾醇的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2005, 11(3): 26-27.
- [6] 邹盛勤,陈武. 中药陆英研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(13): 3 092-3 094.
- [7] 姚元枝,黎晓英,郭文博,等. 陆英 HMGS 基因 cDNA 克隆、不同器官中的差异表达及生物信息学分析[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1 578-1 582.
- [8] 陈武,李开泉. 陆英的生药学研究[J]. 宜春学院学报, 2002, 24(2): 7-9.
- [9] 廖琼峰,谢社平,陈晓辉,等. 陆英的化学成分研究[J]. 中药材, 2006, 29(9): 916-918.
- [10] 杨燕军,林洁红. 陆英化学成分的研究(1)[J]. 中药材, 2004, 27(7): 491-492.
- [11] 陈武,李开泉,熊筱娟,等. 陆英抗肝炎活性成分的研究[J]. 南昌大学学报:理科版, 2001, 25(2): 165-167.
- [12] 杨威,王茜莎,王敏伟,等. 陆英颗粒对急性实验性肝损伤的保护作用研究[J]. 中药材, 2005, 28(12): 1 085-1 089.
- [13] 蒋道松,裴刚,周朴华,等. 八棱麻挥发性成分分析[J]. 中药材, 2003, 26(2): 102-103.
- [14] 廖琼峰. 陆英药效物质基础研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2005.
- [15] 温俊峰,刘侠,高立国,等. 超临界萃取沙葱花挥发油的工艺优化及 GC-MS 分析[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 158-162.
- [16] 旷春桃,吴斌,唐宏伟,等. 山桐子油的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺优化及脂肪酸组成分析[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 154-157.
- [17] 李志文,王娜,刘翔,等. 马铃薯中 α-茄碱提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 167-172.
- [18] 景永帅,吴兰芳,王乾,等. 远志多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 152-156.
- [19] 张盼盼,王丽,时志军,等. 蓝莓果渣花青素的超声辅助提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 152-157.