超临界CO_2萃取-分子蒸馏对白术挥发油的提取分离和GC-MS分析

张忠义[1], 王　鹏[1], 雷正杰[1], 吴惠勤[2]

(1. 第一军医大学 珠江医院, 广东 广州 510282; 2. 中国广州分析测试中心, 广东 广州 510070)

摘　要: 用超临界CO_2萃取技术提取白术挥发油, 然后用分子蒸馏对所得的萃取物进行精分离, 得到蒸出物; 超临界萃取物收率为2.42% (*w*), 分子蒸馏蒸出物收率26.3% (*w*); 对超临界萃取物和分子蒸馏蒸出物分别进行GC-MS分析, 结果超临界萃取物检测出33个化合物, 分子蒸馏蒸出物检测出27个化合物, 主要成分均为2,7_二甲氧基_3,6_二甲基萘、γ_芹子烯、大根香叶烯等, 但相对含量有区别。

关键词: 超临界萃取; 二氧化碳; 分子蒸馏; 白术; 挥发油; 气相色谱-质谱法
中图分类号: O657.63; Q949.783.5　　文献标识码: A　　文章编号: 1004-4957(2003)04-0061-03

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎; 冬季植物下部叶枯黄、上部叶变脆时采挖, 除去泥沙, 烘干或晒干, 再除去须根。其味苦、甘, 性温, 归脾、胃经, 具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎之功效, 主治脾虚食少、腹胀泄泻、痰饮眩悸、水肿、自汗、胎动不安等。现代药理研究表明白术具有保肝、利胆、利尿、提高免疫力、抗肿瘤、扩张血管、抗凝血、降血糖、抑菌作用[1]。白术含挥发油约1.4%[1], 主要成分为苍术醇(atractylol), 苍术酮(atractylon), 芹子烯(selinene), 倍半萜内酯化合物白术内酯(atractylenolide) Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和8_β_乙氧基白术内酯Ⅲ (8_β_ethoxy atractylenolide Ⅲ) 等[1]。白术挥发油的提取方法主要为水蒸气蒸馏法和有机溶剂提取法[2]。国内外尚无用超临界CO_2萃取法对白术挥发油进行提取的报道。另外, 用分子蒸馏对超临界CO_2萃取所得的挥发油进行精分离, 使挥发油中相对分子质量小的成分相对含量提高, 有利于对挥发油的提纯分离。

1　实验部分

1.1　材料与仪器

市售白术, 购于广州市药材公司, 经珠江医院药材科周本杰鉴定为菊科植物白术的干燥根茎。HA_230_50_03超临界萃取装置(南通华安超临界实业公司生产, 2.5 L萃取釜), MD_S80分子蒸馏装置(广州汉维机电有限公司), HP6890/5973 GC/MS气相色谱-质谱联用仪(美国)。

1.2　超临界CO_2萃取

超临界CO_2萃取流程: CO_2钢瓶→冷冻系统→贮罐→高压泵→萃取釜→解析釜Ⅰ→解析釜Ⅱ→冷冻系统(循环)。

将粉碎至0.8 mm(20目)的白术9 kg投入超临界萃取釜中, 对贮罐进行冷却, 分别对萃取釜、解析釜Ⅰ、解析釜Ⅱ进行加热、当温度分别达到40 ℃、45 ℃、45 ℃时, 打开CO_2气瓶送气, 并打开高压泵对萃取釜、解析釜Ⅰ、解析釜Ⅱ加压, 当压力分别达到28 MPa、7~8 MPa、6~7 MPa时, 开始循环萃取, 调节流量为155~180 kg/h, 恒温恒压萃取3 h出料。

1.3　分子蒸馏

将分子蒸馏柱进行加热并对冷凝器进行冷却, 当温度分别达到80 ℃和3~5 ℃时, 打开真空泵抽真空, 当真空度达到800~1 000 Pa时, 将超临界萃取物218 g(190 mL)加热至60 ℃融化后从进料口加入, 调节转子刮膜的转速为250~300 r/min, 流速1.8~2.0 mL/min, 蒸馏2 h后出料。

1.4　GC-MS分离与鉴定

样品处理: 挥发油约1 g用50 mL乙醚溶解, 振摇5 min, 加无水硫酸钠(至不结块为止)干燥, 过滤, 挥去乙醚至5 mL, 即可进样。

收稿日期: 2002-08-09; 修回日期: 2003-05-08
基金项目: 广东省科技攻关项目(2KB01202S)
作者简介: 张忠义(1954-), 男, 湖南湘乡人, 主任药师.

GC 条件：SE_30 弹性石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)，柱前压 30 kPa，分流比 90∶1，进样量 1 μL，柱温 90~250 ℃，程序升温速率 8 ℃/min，进样口温度 260 ℃，载气为 He。

MS 条件：电离源 EI，离子源温度 230 ℃，连接线温度 280 ℃，倍增器电压 1 800 V，扫描范围 29~400 u。

2 结果与讨论

2.1 白术挥发油的提取得率

超临界 CO_2 萃取解析釜Ⅰ收集到黄色膏状半固体 218 g，收率 2.42%(*w*)，解析釜Ⅱ未出料。分子蒸馏的蒸出物为黄色油状液体，约 50 mL，得率 26.3%(*w*)。

2.2 GC-MS 分析

按上述 GC-MS 条件对超临界萃取物和分子蒸馏蒸出物进行分析鉴定，其总离子流图分别见图 1 和图 2，经计算机检索(质谱数据库 NIST98、Wiley 27.5 L)及人工解析质谱并与标准图[3]核对，超临界萃取物共鉴定出 33 个成分，主要有：2,7_二甲氧基_3,6_二甲基萘、γ_芹子烯、大根香叶烯等，峰面积归一化法定量测出它们的相对含量，结果见表 1；分子蒸馏蒸出物共鉴定出 27 个成分，主要有：2,7_二甲氧基_3,6_二甲基萘、γ_芹子烯、大根香叶烯等，峰面积归一化法定量测出它们的相对含量，结果见表 1。

表 1 超临界萃取物和蒸出物的化学成分

Table 1 Chemical components of extract of SFE and distillate of MD

No	t_R/min	Compound	Molecular formula	Relative molecular mass	Relative content/% SFE	Relative content/% MD	Similarity %
1	7.06	2_Methylbicyclo[4,3,0]non_1(6)_ene (2_甲基双环[4,3,0]壬_1(6)_烯)	$C_{10}H_{16}$	136	0.15	0.54	98
2	7.79	(−)_Aristolene((−)_马兜铃烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.09	0.64	99
3	8.35	6*S*_2,3,8,8_tetramethyltricyclo[5,2,2,0^{1,6}]undec_2_ene (6*S*_2,3,8,8_四甲基三环[5,2,2,0^{1,6}]十一_2_烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.23	1.32	95
4	8.67	δ_Selinene(δ_芹子烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.35	2.08	97
5	8.77	Longifolene_(V4)(长叶烯_(V4))	$C_{15}H_{24}$	204	0.22	1.09	99
6	8.94	Caryophyllene(石竹烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.94	3.76	93
7	9.06	γ_Elemene(γ_榄香烯)	$C_{15}H_{24}$	204	1.13	1.30	98
8	9.32	*trans*_β_Farnesene(反式_β_金合欢烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.05	0.21	98
9	9.45	α_Humulene(α_ 草烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.57	1.71	96
10	9.77	Ar_curcumene(芳_姜黄烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.40	0.96	98
11	9.97	β_Selinene(β_芹子烯)	$C_{15}H_{24}$	204	3.12	8.33	99
12	10.09	Selin_4,7(11)_diene(4,7(11)_芹子二烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.24	0.56	97
13	10.20	δ_Cadinene(δ_毕澄茄烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.13	0.28	97
14	10.49	(+)_β_Guaiene((+)_β_愈创木烯)	$C_{15}H_{24}$	204	1.06	1.54	98
15	10.73	γ_Selinene(γ_芹子烯)	$C_{15}H_{24}$	204	13.5	21.94	96
16	10.84	Selin_3,7(11)_diene(3,7(11)_芹子二烯)	$C_{15}H_{24}$	204		2.94	99
17	11.06	Germacrene B(大根香叶烯)	$C_{15}H_{24}$	204	9.32	9.33	99
18	11.32	Caryophyllene oxide(石竹烯氧化物)	$C_{15}H_{24}O$	220	0.25	0.37	95
19	11.68	(−)_Humulene epoxide Ⅱ((−)_ 草烯环氧化物Ⅱ)	$C_{15}H_{24}O$	220	0.09	0.15	97
20	12.44	2,7_Dimethoxy_3,6_dimethyl naphthalene (2,7_二甲氧基_3,6_二甲基萘)	$C_{14}H_{16}O_2$	216	38.11	27.67	97
21	12.56	β_Maaliene(β_马榄烯)	$C_{15}H_{24}$	204		0.23	93
22	12.66	α_Eudesmol(α_桉叶醇)	$C_{15}H_{26}O$	222	0.47		97
23	12.77	α_Guaiene(α_愈创木烯)	$C_{15}H_{24}$	204		0.27	99
24	12.96	Juniper camphor(刺柏脑)	$C_{15}H_{26}O$	222	0.26	0.25	96
25	13.11	Alloaromadendrene(别香橙烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.09		92
26	13.54	α_Patchoulene(α_广藿香烯)	$C_{15}H_{24}$	204	0.22	0.15	98
27	14.77	2,6,10_Dodecatrien_1_ol,3,7,11_trimethyl_,acetate,(*E*,*E*)_ ((*E*,*E*)_3,7,11_三甲基_2,6,10_十二碳三烯_1_醇醋酸酯)	$C_{17}H_{28}O_2$	264	0.55		90
28	14.85	6_Isopropenyl_4,8*a*_dimethyl_1,2,3,5,6,7,8,8*a*_octahydro_naphthalene_2_ol(6_异丙烯基_4,8*a*_二甲基_1,2,3,5,6,7,8,8*a*_八氢_萘_2_醇	$C_{15}H_{24}O$	220	0.19		96
29	15.16	Cyclohexanol,1,3,3_trimethyl_2_(3_methyl_2 methylene_butenylidene)_,(*Z*)_((*Z*)_1,3,3_三甲基_2_(3_甲基_2_亚甲基_3_亚丁烯基)_环己醇)	$C_{15}H_{24}O$	220	0.24		97
30	15.85	Benzene,1_methoxy_2_(1_methyl_2_methylenecyclopentyl)_ (1_甲氧基_2_(1_甲基_2_亚甲基环戊基)_苯)	$C_{14}H_{18}O$	202	5.22	0.49	95

(续表 1)

No	t_R/min	Compound	Molecular formula	Relative molecular mass	Relative content / %		Similarity %
					SFE	MD	
31	16.20	Methane, phenyl(2, 2, 3_ trimethylcyclopentylidene) _ (苯基(2, 2, 3_ 三甲基亚环戊基) _甲烷)	$C_{15}H_{20}$	200	0.79		98
32	16.51	*n* _Hexadecanoic acid(正十六酸)	$C_{16}H_{32}O_2$	256	1.51		96
33	17.50	2, 7_Dimethoxy _5_methyl _1, 4_naphthaquinone (2, 7_二甲氧基 _5_甲基 _1, 4 萘醌)	$C_{15}H_{20}O_2$	232	3.04	1.85	93
34	18.20	Osthol(渥斯脑)	$C_{15}H_{16}O_3$	244	0.40	0.51	94
35	18.59	(*Z*, *Z*) _9, 12_Octadecadienoic acid (9, 12(*Z*, *Z*) _十八碳二烯酸)	$C_{18}H_{32}O_2$	280	2.13		96
36	18.87	Linoleic acid ethyl ester(亚油酸乙酯)	$C_{20}H_{36}O_2$	308	0.38		98

2.3 讨　论

挥发油类成分因其相对分子质量较小, 亲脂性和低沸点, 采用超临界 CO_2 萃取易得到, 此法操作简单, 提取温度低, 无有机溶剂残留, 而且可提供惰性环境, 避免产物氧化, 不影响萃取物的有效成分, 可保存对热不稳定及易氧化的成分。

对挥发油等热敏性物料, 常规蒸馏操作温度高, 受热时间长, 会造成物料内某些组分分解或聚合。 而分子蒸馏由于蒸馏温度低、能降低物料沸点、物料受热时间短等优点, 特别适合于热敏性物料的分离纯化。

图 1 和图 2 分别是白术超临界 CO_2 萃取物和分子蒸馏蒸出物的总离子流图。 从图 1 看, 基线不平, 随着温度的升高, 基线呈上升的趋势, 可能是超临界 CO_2 萃取的挥发油中含有一些高沸点物质, 这些物质需进一步分离鉴定。

分子蒸馏蒸出物中检出 β_马榄烯、α_愈创木烯, 而超临界萃取物中未能检出。 可能是由于 β_马榄烯、α_愈创木烯在超临界萃取物中相对含量较低, 经分子蒸馏去掉其它成分后其相对含量相应增高所致。

由实验结果可见, 超临界 CO_2 萃取物在分子蒸馏前后的成分大部分相同, 但相对含量有较大的改变, 相对分子质量小的相对含量提高, 相对分子质量大的相对含量减少。 提示分子蒸馏可使挥发油中的相对分子质量较小的成分相对含量大大提高, 通过优化蒸馏条件, 可将分子蒸馏用于相对分子质量较小的成分的提纯分离。

本实验采用超临界 CO_2 萃取- 分子蒸馏联用对白术挥发油进行提取分离, 与传统方法相比, 具有低温、高效、无污染等优点, 如果能应用于中药产业化, 将具有非常广阔的前景。

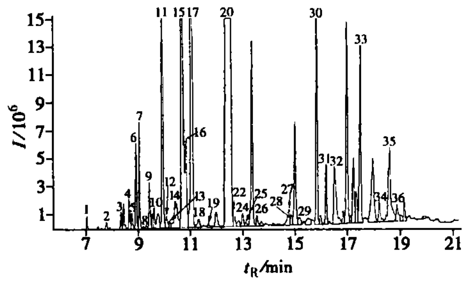

图 1　白术超临界萃取物的总离子流图
Fig. 1　TIC of extract of SFE from Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

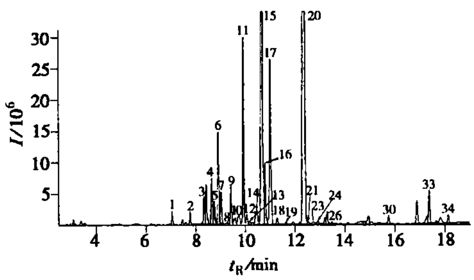

图 2　白术分子蒸馏蒸出物的总离子流图
Fig. 2　TIC of distillate of molecular distillation from Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

参考文献:

[1]　阴　健, 郭力弓. 中药现代化研究与临床应用 I [M]. 北京: 学苑出版社, 1993. 241.
[2]　乔小云, 李　俏, 陆晓和. 白术挥发油提取工艺研究[J]. 医药导报, 2001. 551- 552.
[3]　MCLAFFERTY F W. The Wiley/ NBS registry of mass spectral data[M] . America: A Wiley Insterscience Publication, 1989. 1143.

Analysis of Essential Oil from Rhizoma Atractylodis Macrocephalae by GC- MS with Supercritical CO_2 Extraction and Molecular Distillation

ZHANG Zhong_yi[1], WANG Peng[1], LEI Zheng_jie[1], WU Hui_qin[2]

刚果红与血清白蛋白相互作用的极谱分析

郑石英, 周 春, 罗登柏

(中南民族大学 化学与生命科学学院, 湖北 武汉 430074)

摘 要: 在pH 4.7 HAc–NaAc缓冲溶液中, 刚果红与蛋白质(BSA或HSA)作用形成络合物, 使刚果红–0.35 V(*vs* SCE)的还原峰电流下降, 峰电流的降低值同所加的BSA或HSA质量浓度在一定范围内呈线性关系; BSA和HSA的线性范围分别为0.5~12 mg/L和0.5~11 mg/L, 检出限分别为0.25和0.20 mg/L; 运用该法测定了人血清白蛋白样品, 结果令人满意。

关键词: 牛血清白蛋白; 人血清白蛋白; 刚果红; 极谱法
中图分类号: O657.14; Q512.1 文献标识码: A 文章编号: 1004–4957(2003)04–0064–03

蛋白质的定量测定是生物化学、药学、食品检验及临床分析中常涉及的重要内容。在蛋白质含量的测定方法中, 目前应用最多的是基于蛋白质染色反应的光度法。偶氮染料与蛋白质之间的染色反应已有报道[1~3]。偶氮化合物具有极谱活性, 偶氮染料–蛋白质络合物的极谱行为未见报道。作者发现在醋酸盐缓冲溶液中, 刚果红(双偶氮染料)有一灵敏吸附还原波, 加入蛋白质后, 该峰峰电流下降。其下降值与所加的BSA或HSA质量浓度呈线性关系, 可用于BSA或HSA含量的测定。方法简便快速, 灵敏度较高, 用于人血清样品的分析, 结果良好。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

JP_303、JP_2型极谱分析仪(成都仪器厂), 三电极系统: 滴汞电极为工作电极、饱和甘汞电极(SCE)为参比电极、铂丝电极为对电极; PXS_215型离子活度计(上海第二分析仪器厂)。

刚果红(上海试剂二厂), 5.0×10^{-4} mol/L; 牛血清白蛋白(BSA, Sigma公司), 100 mg/L, 4 ℃冰箱保存; 人血清白蛋白(HSA, Sigma公司), 100 mg/L, 4 ℃冰箱保存; HAc, 1.0 mol/L; NaAc, 1.0 mol/L; 使用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在10 mL小烧杯中, 依次加入1.5 mL HAc、1.5 mL NaAc、1.5 mL刚果红和一定量的BSA或HSA, 加水稀至10 mL, 以未加BSA或HSA的溶液作为空白。–0.1 V为起始电位, 测定–0.35 V处一阶导数波高(h_p), 计算Δh_p。

收稿日期: 2002–09–17; 修回日期: 2003–05–12
基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(99J063); 中南民族大学自然科学基金资助项目
作者简介: 郑石英(1977–), 女, 湖南隆回人, 硕士研究生; 罗登柏, 联系人.

(1. Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China;
2. China National Analysis Center, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Essential oil from Rhizoma Atractylodis Macrocephalae was extracted by supercritical fluid extraction (SFE) and the extractive separated by molecular distillation (MD). The extraction yield of 2.42% (w) and yield of distilled oil of 26.3% (w) were obtained. The constituents of extractive and distilled oil were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry. Thirty_three compounds from the extracttive and twenty_seven compounds from the distilled oil were identified, and their relative contents were determined by normalization method of area. The major constituents of both have been found to be 2, 7_dimethoxy_3, 6_dimethyl naphthalene, γ_selinene and germacrene B etc.

Key words: Supercritical fluid extraction; Carbon dioxide; Molecular distillation; Rhizoma atractylodis macrocephalae; Essential oil; GC–MS