

超临界二氧化碳萃取葡萄皮废渣中三萜类总组分

田丽婷, 马龙, 堵年生, 张烜, 刘涛(新疆医科大学毒理教研室, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要:目的 从葡萄酒厂废渣果皮中提取以齐墩果酸为主的三萜类总组分。方法 采用超临界二氧化碳萃取技术, 以正交试验优选最佳萃取工艺。结果 优化的萃取条件为: 萃取压力 35 MPa, 温度 55 ℃ 通过 80 目筛的粉末。结论 优化的萃取条件经实验证明工艺稳定可靠, 适合于工业化生产。

关键词:葡萄皮废渣; 三萜类总组分; 超临界二氧化碳萃取

中图分类号: R284.2; R464.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2004)01-0006-03

Extract total triterpene from waste residue of grape wine factory by supercritical carbon dioxide extraction

TIAN Li-ting, MA Long, DU Nian-sheng, ZHANG Xuan, LIU Tao (College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the extract technology of total triterpene from waste residue of grape wine factory.

METHOD Supercritical carbon dioxide. Orthogonal design was used to optimize the extract conditions. **RESULTS** The better extract conditions were established as the condition of 35 MPa, 55 ℃, grape skin powder through 80 meshes screen. **CONCLUSION**

The optimized condition is proved to be stable, which is suit to be applied in industrial production.

KEY WORDS: waste residue of grape skin; total triterpene constituent; supercritical carbon dioxide extraction

葡萄酒是色鲜味美、保健功能确凿、享誉全球的饮品, 其所拥有的顾客范围与数量超过了世界上任何一种饮品。然而不同种类的葡萄酒工业生产都无一例外地会留下大量废渣。新疆是我国最大的葡萄生产基地, 酿酒后废渣多作为饲料, 资源浪费巨大。而这些废渣以葡萄皮为主要组成部分。我们在前期研究中对葡萄皮的醇提物进行了硅胶柱色谱^[1-2], 首次分离得到一种生物活性物质——齐墩果酸(oleanolic acid, 简称 OA)。OA 是一种五环三萜类化合物, 是我国首次从植物中发掘出来的、治疗急性黄疸型肝炎和慢性病毒性肝炎比较理想的药物^[3]。国内外研究证实 OA 具有护肝、降糖、降血脂、抗过氧化、抗突变、抗癌、抑制 HIV-1 的复制^[4-8]等作用。我们以此废渣为原料, 用超临界二氧化碳萃取法(supercritical fluid extraction)萃取葡萄皮中的三萜类总组分并探索了最佳提取工艺。

1 实验材料与仪器

1.1 材料

葡萄皮, 购自某葡萄酒厂, 品种由新疆维吾尔自治区园艺所杨承时研究员鉴定; 液态二氧化碳, 由新疆大学提供;

1.2 仪器及试剂

HA-50-02 型超临界二氧化碳萃取仪、HP1100 型高效液相色谱仪、甲醇为优级纯(北京化工厂)、乐百氏饮用纯净水(广东乐百氏集团有限公司)

2 提取工艺筛选

2.1 HPLC 法测定 OA 的含量

2.1.1 色谱条件: 色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ 柱, 流动相为甲醇-水(85:15), 流速 1 mL/min, UV 波长 220 nm, 温度 40 ℃, 数据处理为外标法峰面积定量。

2.1.2 色谱曲线 见图 1a 与 1b

2.1.3 标准曲线绘制 精密吸取 OA 贮备液 0.15 mL, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制成 30 μg/mL 的对照溶液。精密吸取对照液 2, 4, 6, 8, 10 μL 进样, 以进样量对峰面积值回归, 得标准曲线方程为: $y = 182.79x + 1.4976$ ($r = 0.9990$)。结果表明, 进样量在 0.06 ~ 0.45 μg 内呈良好线性关系。

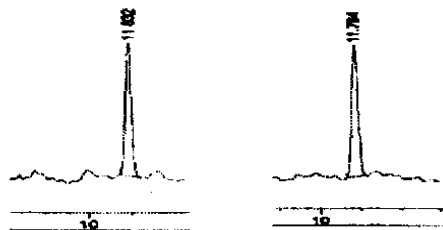


图 1 OA 的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of OA

A. 对照品; B. 样品

A. substance; B. sample

2.1.4 精密度试验 日内差: 精密吸取样品溶液, 在 1 d 内每隔 1 h 测定一次, 共测 6 次, 每次进样 5 μL, 样品中齐墩果酸峰面积积分值的 RSD 为 1.63%; 日间差同一份样品溶液, 每隔 1 d 测定一次, 连续 5 d, 每次进样 5 μL, 测得样品中

齐墩果酸峰面积积分值的 *RSD* 为 1.65 %。

2.1.5 重复性试验 同一批样品,平行 6 份,按相同方法处理测定,测得样品中齐墩果酸峰面积积分值的 *RSD* 为 1.61 %。

2.1.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品,共 9 份,分别加入 1 g/L^{-1} 齐墩果酸对照品的甲醇溶液 0.2、0.4、0.6 mL,每组 3 份,按“样品测定”项下测定,结果 9 次测得平均回收率为 101.68 %, *RSD* 为 2.05 %。

2.2 改性剂对萃取的影响

称取等量的两份葡萄皮,一份用适量乙醇润湿,一份不湿润;在相同条件下进行超临界二氧化碳萃取,萃取物用 HPLC 法测定 OA 含量,换算成萃取量,比较二者差别。结果加改性剂的葡萄皮中 OA 萃取量为不加改性剂 25.6 倍,因此,萃取时应加改性剂。

2.3 萃取压力、温度和原料粒度对萃取效果的影响

2.3.1 提取工艺的筛选 本试验选取萃取压力、温度和原料粒度 3 个因素,每个因素分 3 个水平见表 1; $L_9(3^4)$ 正交安排表,见表 2。

表 1 正交试验因素水平安排表

Levels	Factors		
	A 压力 MPa	B 温度 $^{\circ}\text{C}$	C 粒度
1	15	25	细粉
2	25	40	粗粉
3	35	55	整粒

2.3.2 试验流程 按正交表要求将干燥葡萄皮分别进行处理:样品粉碎后过 80 目筛(本试验中暂称为细粉)为细粉;样品粉碎未过 80 目筛为粗粉,样品不粉碎为整粒。称取各样品一定量,用适量有机溶媒润湿,装入样品槽中至满,按照正交表中设计的压力、温度、时间进行超临界二氧化碳萃取;每 30 min 接一次样,称重,记录。

表 2 正交试验结果

序号	A	B	C	OA 提取率 (%)
1	15	25	细粉	42.78
2	15	40	粗粉	24.50
3	15	55	整粒	25.51
4	25	25	粗粉	29.29
5	25	40	整粒	46.16
6	25	55	细粉	62.86
7	35	25	整粒	51.47
8	35	40	细粉	50.92
9	35	55	粗粉	90.80
K_1	92.79	123.54	156.56	
K_2	138.31	121.58	144.59	
K_3	193.19	179.17	123.14	
R	100.40	57.59	33.42	

2.3.3 HPLC 法测定样品中 OA 含量 将 9 份超临界提取物于水浴上加热溶解,用乙醇溶解、定容至 1000 mL,冷至室

中国现代应用药学杂志 2004 年 2 月第 21 卷第 1 期

温后精密吸取 2 mL 于 10 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,待测。各待测样品液用微孔滤膜过滤后进样,测定其峰面积,代入标准曲线方程,经换算得 OA 提取率。

2.3.4 结果与分析 以 OA 提取率(以 OA 在葡萄皮中含量为 1 %作为基数)为考察指标,做极差分析,结果见表 2。以各因素对 OA 提取率的影响为考察指标作了趋势图分析,结果表明:随压力增加萃取率也在上升;温度从 25 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 萃取率变化平缓,40 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 时萃取率迅速上升;样品从整粒到细粉萃取率逐渐上升。根据极差分析结果,结合趋势图,各因素的最佳水平为: $A_3B_3C_1$,即 35 MPa,55 $^{\circ}\text{C}$,细粉。对 OA 提取率影响最大的因素为压力。

2.3.5 重复试验 本次正交试验中,选择将 9 号样品的条件(35 MPa,55 $^{\circ}\text{C}$,粗粉)重复试验两次,HPLC 法测得其 OA 提取率分别为:90.0 %、92.3 %,表明正交试验重现性良好,测定方法稳定、可靠。

2.3.6 最佳工艺验证试验 试验流程同前,按照筛选出的最佳工艺进行萃取,每 30 min 接一次样,样品液经定容、稀释后 HPLC 法测定 OA 含量,得出提取率为 112 %,从而证实本次正交试验结果可靠。

2.4 萃取时间对萃取量的影响

以最佳工艺验证试验中每 30 min 接一次样的量为指标作时间趋势图,结果表明,超临界二氧化碳萃取三萜类总组分前 1 h 内已基本萃取完全。见图 2

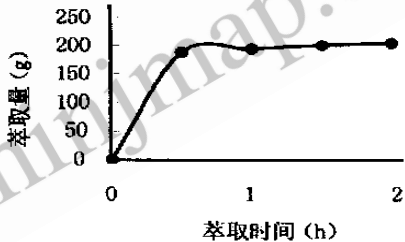


图 2 萃取时间对 OA 萃取量的影响

Fig 2 The effects of time on the extract quantity of total triterpene

3 讨论

实验证明用超临界二氧化碳萃取以 OA 为主的三萜类总组分时应加入改性剂。萃取效果受萃取压力、温度、时间、原料的形状、粒度等的影响。除压力是其中最重要的参数外,温度也是重要的参数,升温时,一方面分子的扩散系数增大、流体的黏度下降都会使传质系数增加,有利于萃取;另一方面流体的密度减小,溶质的溶解度会下降,不利于萃取。实验证明葡萄皮粉碎后过 80 目筛,筛下的细粉其萃取率高于筛上的粗粉,表明粉碎程度高有利于萃取。根据实际操作经验和时间-萃取量趋势图表明,表明时间对萃取量有影响。萃取物在前 30 min 内迅速被萃取出,而后随时间延长萃取量增加缓慢,1 h 后,接到的样少而稀,大部分为改性剂,因此建议在工业化大生产时,可适当缩短时间,提高劳动生产率。

4 小结

本课题建立的超临界二氧化碳萃取葡萄皮中以 OA 为

主的三萜类总组分的工艺为:萃取压力 35 MPa、温度 55 ℃、细粉。本工艺稳定、可靠,操作简便,省时省溶剂,不污染环境,萃取的杂质少^[9],适合工业生产。经超临界二氧化碳萃取出的以 OA 为主的三萜类总组分可直接制成药品或保健品,经提纯后其单体由于其生物活性高、药理作用广泛,可制成 OA 片应用于临床,或配入复方制剂中作为主成分,或作为辅成分增强疗效,开发前景广阔。

参考文献

- [1] 马龙,邓淑文,屈卫东,等.新疆和田红葡萄干保健功能试验研究[J].新疆医科大学学报,1999,22(1):3.
- [2] 赵江霞,马龙,堵年生,等.新疆和田红葡萄果皮化学成分的研究[J].新疆医科大学学报,2001,24(3):189.
- [3] 王兵,蒋朝辉.齐墩果酸的研究[J].中国药学杂志,1992,27(7):393.
- [4] 刘玉兰,王慧珠.齐墩果酸的降糖作用[J].中国药学杂志,1994,29(12):725.
- [5] Balanehru S, Nagarajan B. Intervention of adrimycin induced free radical damage[J]. Biochem Int,1992,28(4):735.
- [6] Niikawa M, Hayashi H, Sato T, *et al.* Isolation of substances from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait.) inhibiting the mutagenicity of benzo[a]pyrene in bacteria[J]. Mutat Res, 1993, 319(1):1.
- [7] Hsu HY, Yang JJ, Lin CC. Effect of oleanolic acid ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of the hematopoietic system postirradiation in mice[J]. Cancer Lett, 1997,111:1.
- [8] Kashiwad Y, Wang HK, Nagao T, *et al.* Anti AIDS agents 30. Anti HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids[J]. J Nat Prod,1998,61(9):1090.
- [9] 缪海均,柳正良,李云华.超临界流体萃取法——毛细管气相色谱法分析厚朴药材中厚朴和厚朴酚的含量[J].药物分析杂志,1998,18(3):182.

收稿日期:2002-06-24