

但将该甲醇水溶液进制备色谱, 不能将茶氨酸分离出来。

3.3.2 萃取: 在前处理过程中若不用被水饱和的氯仿萃取 1 次, 原料中咖啡因、可可豆碱等将会干扰后面的分离纯化。被水饱和的氯仿萃取后, 不仅能将咖啡因、可可豆碱萃取一大部分, 而且茶氨酸没有损失。

3.4 进样量的选择: 约 1 g 茶叶提取物用 20 mL 去离子水处理, 每次进样 1.5 mL, 分离效果很好, 但制备量偏小, 上柱量不足 20 mg; 当进样 2 mL, 突破了检测极限, 不能准确收集产品。将 20 mL 水溶液浓缩至 10 mL 左右, 每次进样 2 mL, 上柱量约 50 mg, 不影响分离度, 纯度亦符合质量要求 (98%, HPLC)。且根据分析色谱仪对相应收集液进行跟踪检测, 可知 III 部分为目标物茶氨酸的收集液 (图 2)。

3.5 制备柱的清洗与再生: 原料经水提、萃取、浓缩离心等预纯化, 尽管将茶氨酸的含量大幅提升, 但溶液中仍含有一些杂质, 如咖啡因、可可豆碱等, 在进行 HPLC 分离时, 杂质亦同步进入制备柱中, 且在制备流动相条件下无法完全被洗脱。这不仅严重损害柱寿命, 而且影响下一次分离效果。因此, 必须在每次分离纯化后用约 150 mL 分析纯乙腈冲洗制备柱, 然后再用甲酸水溶液平衡色谱柱, 进行下一次的分离纯化。

3.6 粗产品纯化条件的优化: 收集到的溶液, 经冷冻干燥后, 得淡黄色的粉末状晶体。面积归一化法定量, 其纯度为 98% 以上。但采用外标法, 其纯度仅为 90% 左右。于是对粗产品进一步纯化条件进行了探讨。

粗产品溶于水用活性炭进行处理后, 发现淡黄

色溶液变得澄清, 但茶氨酸被活性炭强烈吸附, 吸附率为 35%, 故用活性炭处理不可取。

茶氨酸易溶于水, 不溶于甲醇、乙醇等。通过考察茶氨酸在甲醇、乙醇中的溶解情况表明, 茶氨酸在二者中仅一小部分被溶解 (约 3%)。采用甲醇超声, 离心得白色粉末状晶体, 经外标法分析, 其纯度为 98% 以上, 且得率在 95% 以上。

4 结论

本实验建立的茶氨酸对照品的分离纯化方法通过原料预纯化, HPLC 分离制备, 结晶过程, 能得到高收率、高纯度的茶氨酸对照品, 且该方法具有生产周期短, 产品质量高, 方法简便, 生产费用低廉等特点。

References:

- [1] Yuan H B, Tong H R, Gao A H. The synthetic method and properties of theanine [J]. *Guangzhou Food Sci Tech* (广州食品工业科技), 2002, 18(2): 39-40.
- [2] Ekgor-Ott K H, Taylor A, Armstrong D W. Varietal differences in the total and enantiomeric composition of theanine in tea [J]. *J Agr Food Chem*, 1997, 45: 353-363.
- [3] Guo S P. Study on the determination of theanine in tea by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1996, 14(6): 464-466.
- [4] Zhao D, Wang C X. The latest research of theanine at home and abroad [J]. *Food Sci* (食品科学), 2002, 23(5): 145-147.
- [5] Chen Y. Study of method on extracting theanine [J]. *J Shaoxing Coll Arts Sci* (绍兴文理学院学报), 1997, 17(6): 71-75.
- [6] Li Y, Chen X. Synthesis and application of theanine [J]. *Guangzhou Food Sci Tech* (广州食品工业科技), 1998, 14(3): 23-26.
- [7] Chen Y, Tao W Y. Influences of plant hormones on the synthesis of theanine from tea callus [J]. *J Wuxi Univ Light Ind* (无锡轻工业大学学报), 1998, 17(1): 74-77.

超临界 CO₂ 流体萃取迷迭香中抗氧化活性成分的工艺研究

黄纪念^{1,2}, 屠鹏飞^{1*}, 蔡同一^{2*}

(1. 北京大学药学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学食品学院, 北京 100094)

摘要: 目的 考察影响超临界 CO₂ 流体萃取迷迭香中抗氧化物质的因素。方法 采用正交试验设计, 以两级萃取物中主要抗氧化活性成分鼠尾草酸含量作为考察指标, 对影响超临界 CO₂ 流体萃取鼠尾草酸工艺的因素进行研究。结果 得到了萃取鼠尾草酸的最佳工艺条件。一级分离的最佳试验工艺条件为: 萃取压力 40 MPa、萃取温度 55 °C、分离压力 5 MPa、分离温度 70 °C; 二级分离的最佳试验工艺条件为: 萃取压力 20 MPa、萃取温度 75 °C、分离压力 15 MPa、分离温度 80 °C。结论 超临界 CO₂ 流体萃取技术可用于迷迭香中抗氧化成分鼠尾草酸的提取。

关键词: 迷迭香; 超临界 CO₂ 流体萃取; 鼠尾草酸; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)02-0150-04

* 收稿日期: 2003-04-11

作者简介: 黄纪念(1971—), 男, 河南省汝南县人, 在读博士生, 研究方向为天然抗氧化剂。E-mail: hjinian@sohu.com

* 通讯作者 Tel: (010) 62091702 Fax: (010) 62092750

Study on active components of antioxidant from *Rosmarinus officinalis* by supercritical CO₂ fluid extraction

HUANG Ji-mian^{1,2}, TU Peng-fei¹, CAI Tong-yi²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China;

2. Food College, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: **Object** To study the conditions for the extraction of active components of antioxidant in *Rosmarinus officinalis* L. by supercritical CO₂ fluid extraction (SFE-CO₂). **Methods** Conditions for the extraction were studied by orthogonal test design by the content of carnosic acid in the two grade extract as index. **Results** The optimized conditions for the yield of carnosic acid were established. The best SFE conditions were: for separation I, extraction pressure 40 MPa, extraction temperature 55 °C, separation pressure 5 MPa, separation temperature 70 °C; for separation II, extraction pressure 20 MPa, extraction temperature 75 °C, separation pressure 15 MPa, separation temperature 80 °C. **Conclusion** This method is suitable to the extraction of antioxidant component carnosic acid from *R. officinalis* by SFE-CO₂.

Key words: *Rosmarinus officinalis* L.; supercritical CO₂ fluid extraction; carnosic acid; HPLC

迷迭香 *Rosmarinus officinalis* L. 系唇形科迷迭香属植物。本品原系香料植物,其成分主要有二萜类、黄酮类、三萜类化合物和精油,现已广泛应用于食品、药品、化妆品及日用品等方面^[1]。其二萜酚类成分具有明显的抗氧化、抗肿瘤、抗艾滋病病毒及抗微生物等活性,其中尤以鼠尾草酸的活性较强^[2~4]。

迷迭香中抗氧化物质的提取方法很多,如己烷、乙醇、甲醇、丙酮提取等,水蒸气蒸馏、分子蒸馏法也被采用。但这些方法有的会有有机溶剂残留,对人体有害,有的不能理想地控制提取的香气、味道及抗氧化能力,对产品质量不利。超临界流体萃取技术(supercritical fluid extraction, SFE)由于其成本低、无有机溶剂残留、无污染、节约能源、操作简便、环保等优点,已在天然抗氧化剂的提取分离方面得到广泛应用。SFE 应用于迷迭香抗氧化剂的提取及抗氧化有效成分的定量研究,近几年国外已有少数文献报道^[5~7],但国内还未见研究报道。本实验以鼠尾草酸为指标,研究了影响超临界 CO₂ 流体萃取迷迭香中抗氧化活性成分的因素,为迷迭香的进一步开发利用提供参考。

1 仪器材料

1 L SFE 超临界流体萃取设备(广州市轻工研究所制造);高效液相色谱仪:Agilent 1100 系列, G1315B DAD 检测器, G1313A ALS 自动进样装置。鼠尾草酸对照品(自制,纯度为 96.4%, HPLC 法, 230 nm)。乙腈(色谱纯),三氟乙酸(分析纯),水为双蒸水。迷迭香 *Rosmarinus officinalis* L. 的嫩茎叶由云南玉溪迷迭香种植基地提供,经北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定。

2 方法

2.1 超临界 CO₂ 流体萃取工艺:本实验采用二级分离工艺。将粉碎至一定粒径的迷迭香粉末(各条件下均为 200 g)装入萃取釜,对 SFE 系统加热,当温度达到预定温度时,打开 CO₂ 气瓶送气,当压力达到预定压力时,开始循环萃取,先用 10 MPa、40 °C、2 h 把精油萃出后,再次调节温度、压力、流量,并加入一定量夹带剂,恒温恒压萃取一定时间,从一、二级分离釜出料,通过真空旋转蒸发去掉夹带剂,分别获得一、二级萃取物。

2.2 鼠尾草酸含量的 RP-HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件:色谱柱:CAPCELL PAK C₁₈, ACR (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 连接预柱);流动相:乙腈-0.1% 三氟乙酸(52 : 48);检测波长:230 nm;柱温:30 °C;流速:1 mL/min。

2.2.2 对照品溶液的制备:精密称取鼠尾草酸 1.0 mg,置于 10 mL 棕色量瓶中,加乙腈至刻度,超声波混匀,得 0.1 mg/mL 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备:精密称取迷迭香超临界萃取物 10.0 mg,置于 10 mL 棕色量瓶中,加乙腈至刻度,超声波混匀,用微孔有机滤膜(0.45 μm)滤过,以滤过液作为待测供试品溶液。

2.2.4 标准曲线的制作:分别取 0.1 mg/mL 鼠尾草酸对照品溶液 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 μL,测定相应峰面积,重复 3 次,以平均峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,制得标准曲线 $Y = 1\,808.7X - 24.312$ ($r = 0.999\,996$)。结果表明,鼠尾草酸进样量在 0.2~8 μg 时与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 样品中鼠尾草酸含量的测定:分别吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积,按外标法计算鼠尾草酸的含量,重复 3

次,求平均值。

3 结果与讨论

根据预实验结果和设备情况,二级分离压力均定为 5 MPa,温度定为 50 ℃,95%乙醇作为夹带剂,用量为装料量的 40%,萃取时间为 3 h,CO₂ 流量为 12 L/h。选取萃取压力(A)、萃取温度(B)、一级分离压力(C)、一级分离温度(D)4 个主要因素,设计了 4 因素 3 水平的正交试验,对迷迭香中的鼠尾草酸进

行超临界 CO₂ 流体萃取。因素水平见表 1,实验方案及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 正交试验设计中的因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test				
水平	因 素			
	A / MPa	B/ ℃	C / MPa	D/ ℃
1	20	55	5	60
2	30	65	10	70
3	40	75	15	80

表 2 正交试验方案与结果分析

Table 2 Analytical results of orthogonal test

试验号		A	B	C	D	一级分离			二级分离	
						得率/ %	CA 含量/ %		得率/ %	CA 含量/ %
	1	20	55	5	60	6. 67	31. 97		0. 09	0
	2	20	65	10	70	3. 13	22. 27		1. 84	19. 36
	3	20	75	15	80	0. 11	13. 95		3. 33	56. 11
	4	30	55	10	80	3. 38	30. 49		1. 89	20. 52
	5	30	65	15	60	0. 35	8. 40		5. 73	28. 98
	6	30	75	5	70	8. 87	27. 94		0. 52	21. 46
	7	40	55	15	70	1. 66	24. 03		2. 45	26. 09
	8	40	65	5	80	2. 47	25. 75		0. 05	0
	9	40	75	10	60	0. 28	27. 92		0. 77	22. 36
一 级 分 离 （ 含 量 ）	k ₁	22. 73	28. 83	28. 55	22. 76	k ₁	25. 16	15. 54	7. 15	17. 11
	k ₂	22. 28	18. 81	26. 89	24. 75	k ₂	23. 65	16. 11	20. 75	23. 30
	k ₃	25. 90	23. 27	15. 46	23. 40	k ₃	16. 15	33. 31	37. 06	25. 54
	R	3. 62	10. 02	13. 09	1. 99	R	9. 01	17. 77	29. 91	8. 43

表 3 方差分析表

Table 3 Variance analysis

	方差来源	方差平方和	自由度	F 值	P 值
一 级 解 析	A	23. 38	2	3. 80	
	B	151. 30	2	24. 57	P < 0. 05
	C	304. 91	2	49. 52	P < 0. 05
	D(误差)	6. 16	2		
二 级 解 析	A	139. 68	2	1. 29	
	B	611. 95	2	5. 64	
	C	1 345. 31	2	12. 40	
	D(误差)	108. 50	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19. 00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99. 00$

分析正交试验结果可知:对于一级萃取物,影响鼠尾草酸含量的 4 因素中,分离压力最大,萃取温度次之,二者都达到了显著水平($P < 0. 05$),萃取压力和分离温度最弱,因此,4 因素影响的大小顺序为:分离压力> 萃取温度> 萃取压力> 分离温度,此时最佳试验条件为 A₃B₁C₁D₂,即萃取压力 40 MPa,萃取温度 55 ℃,分离压力 5 MPa,分离温度 70 ℃。

对于二级萃取物,4 因素影响鼠尾草酸含量的程度依次是:分离压力> 萃取温度> 萃取压力> 分离温度,此时最佳工艺条件为 A₁B₃C₃D₃,即萃取压力 20 MPa,萃取温度 75 ℃,分离压力 15 MPa,分离温度 80 ℃。此条件下得到的二级萃取物中鼠尾草酸的含量在整个实验中是最高的,达 56. 11%。这说

明,如果要得到鼠尾草酸含量高的萃取物,可以通过适宜的条件,分级萃取获得。可以想象,如果再增加分离级数如三级分离或四级分离,萃取物中鼠尾草酸的含量会更高。

当然,萃取物中鼠尾草酸的含量高并不代表萃取出来的鼠尾草酸多,因为鼠尾草酸的提取总量与萃取物的得率也有关。理论上,萃取物中的鼠尾草酸含量高,萃取物得率又高,则萃取出的鼠尾草酸就多。实际情况并非如此。从本实验结果可以看出,萃取物中鼠尾草酸的含量高,萃取物的得率并不一定高,反之亦然。因此,如果以得到较多的鼠尾草酸为目的,而不是想得到含鼠尾草酸较高的萃取物,则需综合考虑萃取物的得率和萃取物中的鼠尾草酸的含量两项指标。具体到本实验,鼠尾草酸的最高提取量(即萃取物中鼠尾草酸的含量×得率×200 g)为 4. 96 g,出现在 6 号试验(A₂B₃C₁D₂)中,即萃取压力 30 MPa,萃取温度 75 ℃,分离压力 15 MPa,分离温度 70 ℃,并不是萃取物中鼠尾草酸含量最高(56. 11%)的试验条件(A₁B₃C₃D₃),因为此时萃取物的得率较低(3. 33%),鼠尾草酸的萃取量仅为 3. 74 g。

4 验证试验

选取上述最佳条件进行验证试验。在 $A_3B_1C_1D_2$ 试验条件下, 一级萃取物中鼠尾草酸的含量为 35.24% ($n=3$); 在 $A_1B_3C_3D_3$ 条件下, 二级萃取物中鼠尾草酸的含量为 55.90% ($n=3$)。由此证明上述最佳试验条件是可信的。

5 结论

5.1 无论是对一级分离还是二级分离, 4 因素影响萃取物中鼠尾草酸含量的大小顺序都是: 分离压力 > 萃取温度 > 萃取压力 > 分离温度。

5.2 从正交试验结果可知, 以萃取物中鼠尾草酸含量为指标, 对于一级分离, 超临界 CO_2 流体萃取迷迭香中抗氧化活性成分的最佳试验工艺条件: 萃取压力 40 MPa、萃取温度 55 °C、分离压力 5 MPa、分离温度 70 °C; 对于二级分离, 超临界 CO_2 流体萃取迷迭香中抗氧化活性成分的最佳试验工艺条件: 萃取压力 20 MPa、萃取温度 75 °C、分离压力 15 MPa、分离温度 80 °C。

5.3 通过两级分离, 可使萃取物中的鼠尾草酸的含量达到 56.11%。如此高的含量为迷迭香中抗氧化

活性成分的进一步开发利用提供了依据。

References:

- [1] Tu P F, Xu Z H. Chemical constituents and their application from rosemary [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1998, 10(3): 62-68.
- [2] Paris A, Strukel J B, Renko M, *et al.* Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(8): 1426-1430.
- [3] Inatani R, Nakatani N, Fuwa H. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives [J]. *Agric Boil Chem*, 1983, 47(3): 521-528.
- [4] Richheimer S L, Matthew W, Bernart, *et al.* Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary [J]. *JA OCS*, 1996, 73(4): 507-514.
- [5] Senorans F J, Ibanez E, Caverio S, *et al.* Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical fluid extracts of rosemary plants [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 870: 491-499.
- [6] Lopez-Sebastian S, Ramos E, Ibanez E, *et al.* Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 13-19.
- [7] Ibanez E, Oca A, Murga G, *et al.* Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 1400-1404.

地黄在加工炮制过程中 HPLC 谱图的变化

温学森¹, 杨世林², 马小军², 郑俊华^{3*}

(1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 3. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要: 目的 考察地黄在加工炮制过程中糖类成分的变化。方法 在加工炮制的 4 个不同阶段(65 °C 烘焙 0, 1 和 6 d, 以及烘干样品切片后常压蒸制 4 h) 取样, 热水提取。色谱条件为: Sugar-pak-1 型阳离子凝胶柱(柱温 80 °C), 水为流动相(流速为 0.7 mL/min), 示差折光检测器检测。结果 鲜地黄中有 3 种主要成分, 分别为水苏糖(11%~15%)、蔗糖(0.30%~0.92%) 和梓醇(0.27%~0.88%)。经过加工炮制, 不同阶段的 HPLC 色谱图发生了显著变化。烘焙 1 d 后出现一个显著的单糖峰(保留时间为 10.2 min, 推定为半乳糖), 生地黄中该峰更加显著, 同时出现了棉子糖的色谱峰。熟地黄中, 果糖和葡萄糖的色谱峰十分显著。结论 根据 HPLC 色谱图的变化, 认为在烘焙阶段, 鲜地黄中水苏糖发生了脱半乳糖反应, 而在炮制熟地黄时, 由于蒸制又发生了脱果糖反应。地黄加工炮制的主要目的之一可能在于使水苏糖降解, 减轻胀气副作用。

关键词: 地黄; 加工炮制; 高效液相色谱; 水苏糖; 梓醇

中图分类号: R284.1; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0153-04

HPLC chromatogram changes with processing for roots of *Radix Rehmanniae*

WEN Xue-sen¹, YANG Shi-lin², MA Xiao-jun², ZHENG Jun-hua³

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union of Medical College, Beijing 100094, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Object** To investigate the saccharide changes of *Radix Rehmanniae* when being processed.

Methods The fresh roots were torrefied at 65 °C and sampled at 0, 1, and 6 d. The samples and 4 h-

* 收稿日期: 2003-05-22

基金项目: 国家自然科学基金重点资助课题(39930220)