

山杏叶中角鲨烯提取工艺的研究

彭艳芳, 段晓玮, 徐岩岩, 李洁

(河北民族师范学院 生物与食品科学学院, 河北 承德, 067000)

摘要: 以山杏 *Armeniaca sibirica* 叶为原料, 采取 SEF-CO₂ (CO₂ 超临界萃取法) 法提取山杏叶油, 用气相色谱-质谱 (GC-MS) 对其化学成分进行分析。共鉴定出 20 种化合物, 包括角鲨烯、烷烃、不饱和脂肪酸、酯类、植醇等化合物, 其中角鲨烯占精油总组分的 38.49%, 可见山杏叶油中以角鲨烯为主要成分。以单因素试验、正交试验对山杏叶中角鲨烯提取工艺进行研究, 确定提取山杏叶角鲨烯的最佳工艺条件为: 提取溶剂为石油醚 60~90℃, 提取温度为 60℃, 料液比为 1:10, 提取时间为 2.5 h。在最佳工艺条件下从山杏叶中提取出的角鲨烯含量最高可达 2.19 mg·g⁻¹。

关键词: 山杏叶; CO₂ 超临界萃取法; 角鲨烯; 提取工艺

中图分类号: S662.2; R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776(2020)02-0036-06

Extraction Technology of Squalene from *Armeniaca sibirica* Leaves

PENG Yan-fang, DUAN Xiao-wei, XU Yan-yan, LI Jie

(School of Biotechnology and Food Science, Hebei Normal University for Nationalities, Chengde 067000, China)

Abstract: In October 2016, leaves were collected from 20-year *Armeniaca sibirica* in Chengde, Hebei province. Leaf oil was extracted by supercritical CO₂ extraction technology, and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. 20 compounds were identified, including squalene, alkane, unsaturated fatty acids, esters, phytol, etc. Among them, squalene occupied 38.49% of essential leaf oil. Extraction technology of squalene was conducted by single factor and orthogonal design tests. The result demonstrated that the best technology was as follows: extraction solvent of petroleum ether (60-90℃), extraction temperature of 60℃, solid-liquid ratio of 1:10, and extraction duration of 2.5 hour, squalene content extracted of 0.219%.

Key words: *Armeniaca sibirica* leaf; supercritical CO₂ extraction technology; squalene; extraction technology

角鲨烯 (Squalene, C₃₀H₅₀, 2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯), 是一种高度不饱和和烃类化合物, 最初是在黑鲨鱼 Black shark 肝油中发现, 是一种重要的生物活性物质, 具有增强免疫力、抗癌、防癌及保湿养颜作用, 广泛应用于化妆品、医药、保健品、食品等行业^[1]。目前提取角鲨烯, 多以大鲨鱼 Shark 肝为原料, 资源短缺。因此, 寻找新的角鲨烯原料资源是提高角鲨烯产量、降低产品价格的必要途径。山杏 *Armeniaca sibirica* 是我国北方荒山绿化树种和经济树种, 浑身是宝, 山杏仁是生产杏仁露的原料, 山杏壳可以加工成活性炭, 山杏壳木醋液是绿色农用肥的主要原料; 民间常以发酵山杏叶做饲料喂猪, 猪生长快, 不生病。

收稿日期: 2019-09-07; 修回日期: 2020-01-16

基金项目: 河北省教育厅科技项目 (No.Z2015159); 承德市科学研究与计划项目 (No.20157008)

作者简介: 彭艳芳, 副教授, 从事植物资源和天然产物研究; E-mail: 1600390654@qq.com。李洁, 教授, 从事生物资源开发利用研究; E-mail: lijie0651@163.com。

研究发现, 山杏叶中含有大量黄酮、三萜类生物活性物质^[2], 张婷等^[3]发现山杏叶 40%乙醇提取物抗氧化活性最高。李洁等^[4]在蛋鸡饲料中添加 0.3%的山杏叶发酵物, 可提高蛋鸡产蛋量, 降低蛋壳破损率和料蛋比。我国山杏资源丰富, 从山杏综合利用的角度出发, 进一步研究山杏叶的成分及功能十分必要。

本研究以山杏叶为材料, 采用 SEF-CO₂ (CO₂ 超临界萃取法) 法提取山杏叶油, 在 GC-MS 成分分析的基础上, 对提取其中角鲨烯的溶剂、条件进行研究, 以期建立最佳提取工艺, 为山杏叶的深加工和综合利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 试验用山杏叶于 2016 年 10 月 10 日采自河北省承德市罗汉山, 分别从 4 棵山杏树(树龄约 20 a, 胸径约 10 cm) 的东西南北四个方向各采摘约 200 g 老叶, 混合均匀。一部分叶片于鼓风干燥箱 120℃ 杀青 5 min, 于 70℃ 烘干至恒质量, 然后用粉碎机粉碎, 过 100 目筛, 所得样品用于山杏叶油的制备; 另一部分叶片放在通风良好的室内自然干燥至含水量约 5%, 粉碎, 过 20 目筛, 将处理好的样品放在干燥器中用于山杏叶角鲨烯提取工艺研究。

1.1.2 试剂 30 ~ 60℃ 沸程的石油醚、60 ~ 90℃ 沸程的石油醚、环己烷均为分析纯; 角鲨烯标准品 (购自成都普菲德生物技术有限公司)。

1.1.3 仪器与设备 TRACE MS 2000 型气相色谱-质谱联用仪 (美国 Finnigan 公司)。FA1204B 电子分析天平 (上海精密科学仪器有限公司); 荣华 HH-1 数显恒温水浴锅 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); 101-2A 型电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); 安捷伦 (Agilent) 7820 型气相色谱仪。

1.2 试验方法

1.2.1 山杏叶油的制备 山杏叶油的制备采用 SEF-CO₂ 法。称取 10 g 干燥好的山杏叶样品放入脱脂棉布小袋中, 封好口; 于 40℃, 27.58 MPa 条件下提取 2 h, 提取结束后, 将提取物收集在小玻璃瓶中封口, 保存在 4℃ 的冰箱中, 以便进行 GC-MS 分析。

1.2.2 GC-MS 条件 DB-5MS 毛细管色谱柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。气化温度 280℃; 升温程序: 初始温度 80℃ (1 min), 以 5℃·min⁻¹ 升温速率升至 150℃, 再以 3℃·min⁻¹ 升温速率升至 180℃, 然后以 7℃·min⁻¹ 升温速率升至 260℃, 维持 20 min; 载气流量 1.0 mL·min⁻¹。EI 电离源, 离子源温度 200℃; 扫描质量范围 *m/z* (质子数/电荷数的比值) 40 ~ 610。

1.2.3 气相色谱条件 Agilent 色谱柱 HP-5 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 上分离, 进样口温度为 300℃, 火焰离子化检测器 (FID) 温度 300℃, 柱温 270℃, 载气流速 2 mL·min⁻¹。

1.2.4 角鲨烯标液 精密称取角鲨烯标准品 32.8 mg, 用石油醚溶解, 用 10 mL 容量瓶定容, 浓度为 3.28 mg·mL⁻¹, 将其稀释, 依次得到 0.328, 0.164 mg·mL⁻¹ 的标准溶液, 经气相色谱仪检测, 得到山杏叶角鲨烯标准品浓度与峰面积的标准曲线, 浓度与峰面积应成线性关系。

1.2.5 单因素试验 以山杏叶角鲨烯的含量为考察指标, 分别对提取时间、料液比、提取温度、提取溶剂 4 个影响提取率的因素进行考察, 设定提取时间分别为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h; 料液比分别为 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 (g·mL⁻¹), 提取温度分别为 50, 60, 70, 80, 90℃, 提取溶剂分别为 60 ~ 90℃ 的石油醚, 30 ~ 60℃ 的石油醚, 环己烷, 每组重复 3 次平行实验, 取其平均值。固定的单因素条件为提取时间 2 h、料液比 1:4 (g·mL⁻¹)、提取温度 60℃、提取溶剂 60 ~ 90℃ 的石油醚。

1.2.6 正交试验设计 在单因素试验的基础上, 以提取时间、料液比、提取温度 3 个因素建立 3 因素 3 水平的

正交试验,以山杏叶角鲨烯含量为评价指标,进一步选取最佳工艺条件。正交试验因素与水平见表1。

表1 3因素3水平正交试验设计
Table 1 Orthogonal test design of three factors and three levels

试验号	提取时间/h	料液比/(g·mL ⁻¹)	提取温度/℃	试验号	提取时间/h	料液比/(g·mL ⁻¹)	提取温度/℃
1	1(2.5)	1(1:6)	1(60)	6	2	3	1
2	1	2(1:8)	3(70)	7	3(3.5)	1	2
3	1	3(1:10)	2(65)	8	3	2	1
4	2(3.0)	1	3	9	3	3	3
5	2	2	2				

1.3 数据处理

采用 Excel 软件进行作图、数据分析。

2 结果与分析

2.1 山杏叶中角鲨烯的鉴定

采用 SEF-CO₂ 制备山杏叶油,用 GC-MS 进行成分分析(见图1、图2),从山杏叶中共检出79个色谱峰,鉴定出20个化合物,其中角鲨烯(38.49%) > 烷烃(9.36%) > 不饱和脂肪酸(9.1%) > 酯类(6.96%) > 植醇(3.71%),可见山杏叶油中以角鲨烯为主要成分,含量较高。

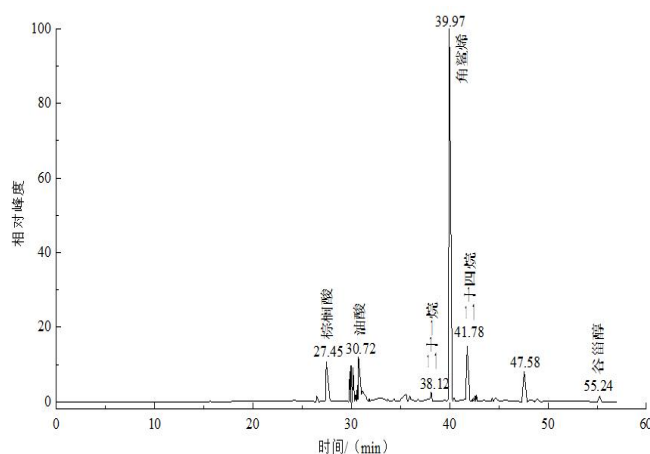
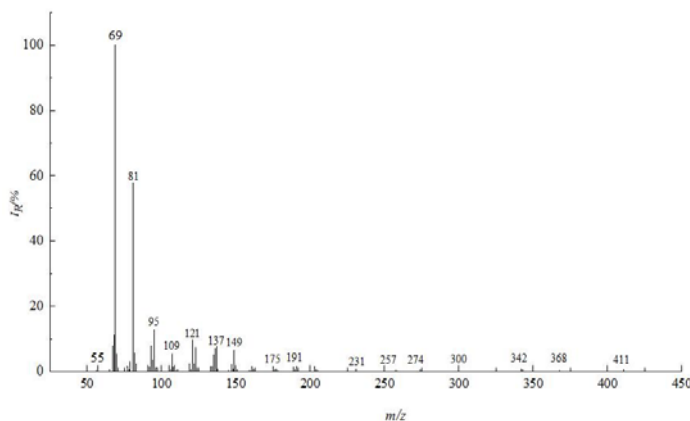
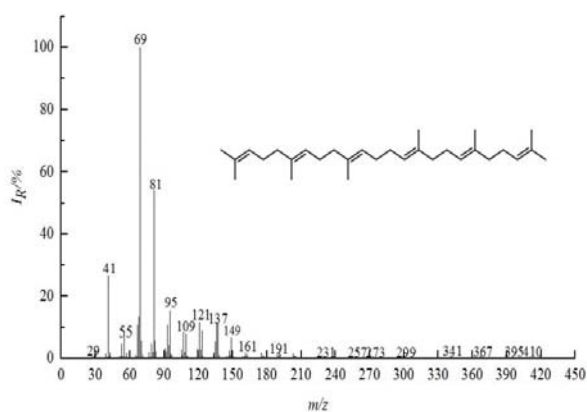


图1 山杏叶油总离子流色谱图($t=39.97$)

Figure 1 Total ion current chromatogram of oil from *A. sibirica* leaves



注: $t=39.97$ 代表总离子流色谱图中保留时间 39.97 min 被分离出的化合物。

图2 质谱库中角鲨烯标准质谱图(A)与 $t=39.97$ 色谱峰质谱图(B)的比较

Figure 2 Comparison on mass spectrum of squalene between standard and $t=39.97$ chromatographic peak (Figure 1)

2.2 山杏叶角鲨烯提取单因素试验结果

2.2.1 最佳提取时间 由图3可知,提取液中山杏叶角鲨烯的含量随着提取时间的增加而呈上升趋势,这是由于随着提取时间的增加,山杏叶角鲨烯大量迁移出,在1.0~2.5 h山杏叶角鲨烯迁移速度较快,超过2.5 h后角鲨烯迁移速度放慢,说明山杏叶中大部分内角鲨烯在2.5 h左右就已迁移出,为了尽可能的多提取出山杏叶中的角鲨烯,因此确定最佳的提取时间为3.0 h。

2.2.2 最佳料液比 由图 4 可知, 提取液中山杏叶角鲨烯的含量随着料液比的增加而增加, 在料液比 $\geq 1:8$ 时, 山杏叶中角鲨烯的含量趋于稳定。分析其原因是由于当料液比较低时, 固液体系间有效成分的浓度差随着料液比的提高而增大, 更有利于传质。由此确定超声处理的最佳料液比为 1:8。

2.2.3 最佳提取温度 由图 5 可得出, 当提取温度在 50 ~ 60℃时, 提取液中山杏叶角鲨烯的含量随着温度的升高而增加, 这是因为在温度较低时, 升温有利于山杏叶角鲨烯在石油醚中的溶解; 提取温度在 60 ~ 90℃时, 提取液中山杏叶角鲨烯的含量随着温度的升高而减少, 角鲨烯的沸点为 285℃, 对温度非常稳定, 理论上, 60 ~ 90℃升温同样应该有利于山杏叶角鲨烯的溶解移出, 但提取液中山杏叶角鲨烯的含量反而减少, 这可能是山杏叶中含有氧化物质, 在提取过程中一部分角鲨烯被氧化消耗掉^[5], 使得角鲨烯的含量减少。因此, 确定超声提取温度为 60℃。

2.2.4 最佳提取溶剂 根据图 6 得出, 提取溶剂为石油醚 60 ~ 90℃时, 提取液中山杏叶角鲨烯的含量最高, 其次为石油醚 30 ~ 60℃, 环己烷提取效果最差。高贵桃等^[6]对甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 综合利用中角鲨烯提取工艺的研究表明石油醚的提取效果好于正己烷(环己烷与正己烷性质类似)。另外考虑到石油醚 30 ~ 60℃在室温下即可气化, 对温度非常敏感, 因此, 确定最佳提取溶剂为石油醚 60 ~ 90℃。

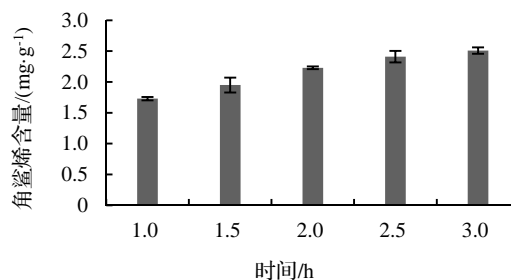


图 3 提取时间对山杏叶角鲨烯提取量的影响

Figure 3 Effect of extraction duration on squalene yield

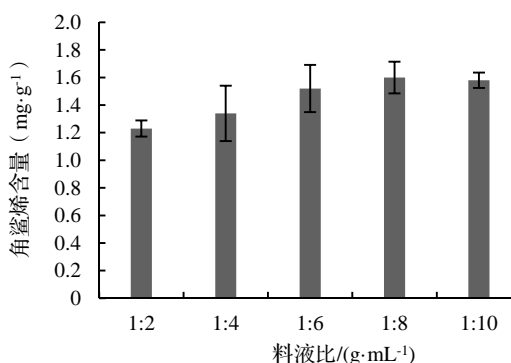


图 4 料液比对山杏叶角鲨烯提取量的影响

Figure 4 Effect of solid-liquid ratio on squalene yield

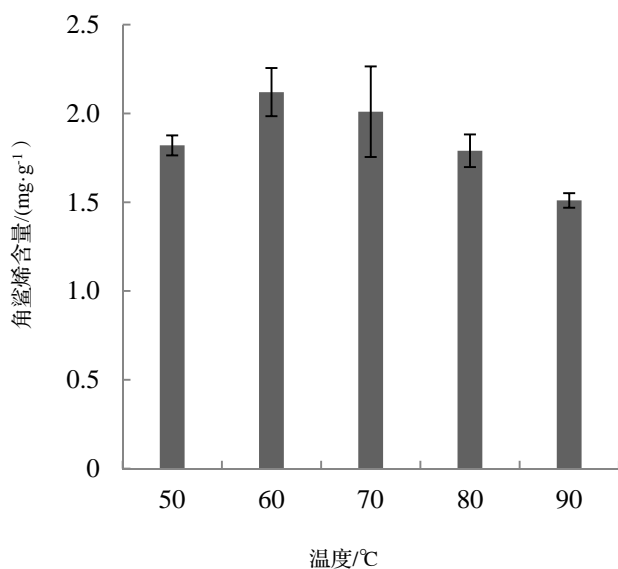


图 5 提取温度对山杏叶角鲨烯提取量的影响

Figure 5 Effect of extraction temperature on squalene yield

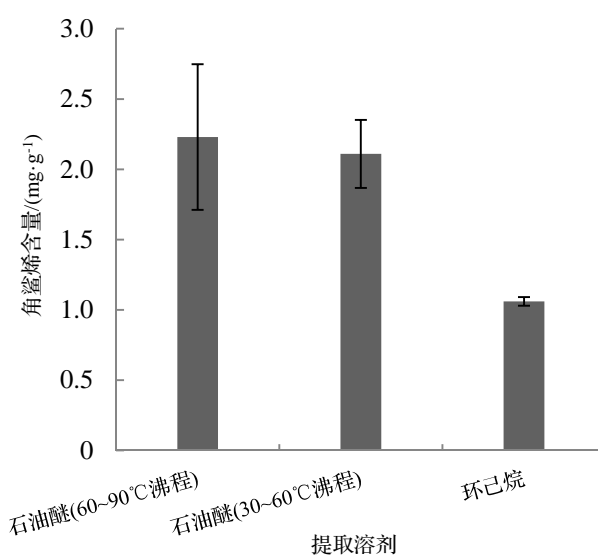


图 6 提取溶剂对山杏叶角鲨烯提取量的影响

Figure 6 Effect of extraction solvent on squalene yield

2.3 正交试验结果分析

以提取时间(A)、料液比(B)、提取温度(C)三个因素为自变量,经水浴冷凝后提取液中山杏叶角鲨烯含量为指标,进行正交试验,试验方案和结果如表2,从表2可见,各因素对提取液中山杏叶角鲨烯含量影响的大小次序为:C>B>A,即提取温度影响最大,料液比其次,提取时间影响最小。综合各因素的K值比较,计算得出山杏叶角鲨烯最佳提取工艺条件为C₁B₃A₁,即提取温度为60℃、料液比为1:10、提取时间为2.5h;而直接观看得到的最佳工艺条件为第6号试验,即C₁B₃A₂。因素C,B直接观看与计算结果皆一致,因素A直接观看与计算结果不一致,直接观看因素A,第二水平最好,即3.0h,而计算结果因素A采用第一水平时最好,即2.5h。

表2 正交试验L₉(3³)及结果
Table 2 Orthogonal test L₉(3³) and results

实验号	A/h	B/(g·mL ⁻¹)	C/℃	峰面积(210 nm)	山杏叶角鲨烯含量/(mg·g ⁻¹)	位次
1	2.5	1:6	60	109 890 394	2.14	2
2	2.5	1:8	70	82 977 979	1.62	6
3	2.5	1:10	65	104 009 997	2.03	3
4	3.0	1:6	70	56 936 979	1.11	9
5	3.0	1:8	65	94 446 864	1.84	4
6	3.0	1:10	60	11 218 133	2.19	1
7	3.5	1:6	65	81 010 808	1.58	7
8	3.5	1:8	60	74 322 135	1.45	8
9	3.5	1:10	70	88 783 122	1.73	5
K ₁	5.79	4.83	5.78			
K ₂	3.17	4.91	5.45			
K ₃	4.76	5.95	4.46			
k ₁	1.93	1.61	1.93			
k ₂	1.06	1.64	1.82			
k ₃	1.59	1.98	1.49			
极差R	0.34	0.37	0.49			
主次顺序		C>B>A				
优水平	A ₁	B ₃	C ₁			
优组合		C ₁ B ₃ A ₁				

注:K₁, K₂, K₃分别代表各因素下1, 2, 3水平所对应的试验结果之和;k₁, k₂, k₃分别为K₁, K₂, K₃的均值。

2.4 正交验证试验

由于直接观看得到的最佳工艺条件(C₁B₃A₂)与计算所得出的最佳提取工艺条件(C₁B₃A₁)不一致,因此需对上述两种提取工艺条件进行验证试验,每组试验重复3次。结果表明,直接观看的最佳工艺条件C₁B₃A₂得到的山杏叶角鲨烯含量为2.11 mg·g⁻¹,计算所得的最佳提取工艺条件C₁B₃A₁得到的山杏叶角鲨烯含量为2.08 mg·g⁻¹;F检验表明,两者之间不存在显著性差异。从极差R值来看,提取时间对提取液中山杏叶角鲨烯含量影响极小;再从生产上节约原材料、降低成本角度考虑,提取时间以2.5h为好。

3 结论与讨论

经单因素试验和正交试验得到山杏叶角鲨烯最佳提取工艺条件:提取溶剂为石油醚60~90℃,提取温度为60℃,料液比为1:10,提取时间为2.5h。由最佳提取工艺提取出的山杏叶中角鲨烯含量最高可达2.19 mg·g⁻¹,折合百分率为0.219%。

目前,角鲨烯的主要生产原料是深海鲨鱼的肝脏,由于资源有限,致使其商品价格昂贵。寻找新的角鲨烯

生产原料至关重要。有研究者报道一些植物油脂中含有角鲨烯, 如省沽油 *Staphylea bumalda* 籽油中角鲨烯含量可达 6.5%^[7], 苋属 *Amaranthus* 植物的种子油中为 4.9%^[8], 橄榄 *Canarium album* 油中为 0.7%^[9], 而这些研究的材料均为植物种子油, 需要先榨油再提取角鲨烯, 工艺复杂、成本高。目前尚未有山杏叶提取角鲨烯的相关报道, 以山杏秋天老叶为原料提取角鲨烯, 一方面促进了山杏资源的综合利用, 加长了山杏的产业链; 另一方面也拓宽了角鲨烯生产的原料来源, 对保护深海鲨鱼资源, 维护海洋生态平衡具有重要意义。

参考文献:

- [1] HUANG Z-R, LIN Y K, FANG J Y. Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology[J]. *Molecules*, 2009, 14: 540 – 551.
- [2] 彭艳芳, 李洁, 李旺, 等. 山杏叶桦木酸、齐墩果酸和熊果酸的研究[J]. *河北林果研究*, 2012, 27 (2): 157 – 160.
- [3] 张婷, 路佳, 李洁. 山杏叶提取物体外抗氧化活性研究[J]. *辽宁林业科技*, 2016, 4: 9 – 11.
- [4] 李洁, 于文清, 唐冠敏, 等. 山杏叶发酵物对蛋鸡生产性能和生化指标的影响[J]. *饲料研究*, 2011, 12: 75 – 77.
- [5] AMAROWICZ R. A natural antioxidant[J]. *Eu J Lipid Sci Technol*, 2009, 111 (5): 411 – 412.
- [6] 高贵桃, 杨敏丽, 梁新华. 甘草综合利用中角鲨烯的提取工艺研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38 (10): 2047 – 2049.
- [7] 贾春晓, 毛多斌, 杨靖, 等. 省沽油种子超临界 CO₂ 萃取物中角鲨烯和维生素 E 的 GC-MS 分析[J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19: 256 – 258, 289.
- [8] HE H P, CAI Y Z, SUN M, *et al.* Extraction and Purification of Squalene from *Amaranthus Grain*[J]. *J Agr Food Chem*, 2002, 50: 368 – 372.
- [9] NERGIZ C, ELIKKALE D. The effect of consecutive steps of refining on squalene content of vegetable oils[J]. *J Food Sci Technol*, 2011, 48: 382 – 385.