

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0010-10

超临界 CO₂ 萃取沉香油工艺优化及其脂肪酸成分分析

沈汝青¹,陆 麒¹,冯志豪²,朱 力²,朱宝璋²,谭 亮^{3*},丁志刚¹,皮 立³,杲秀珍³,丁 恺⁴¹海南香岛休闲农业科技发展有限公司,海口 570208; ²广州市浩立生物科技有限公司,广州 510220;³中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室 青海省藏药药理学和安全性评价研究重点实验室,西宁 810001; ⁴青海省草原总站草原保护科,西宁 810000

摘要:对超临界 CO₂ 萃取沉香油的最佳工艺进行了研究,并对精制精油中脂肪酸进行了含量测定。在单因素试验基础上,以 CO₂ 流量、萃取压力、萃取温度、萃取时间、夹带剂浓度为影响因素,沉香油萃取率为评价指标,通过正交试验考察了上述各因素对沉香油萃取率的影响。再利用分子分离技术对沉香油进一步加工精制以获得沉香精油,最后采用气相色谱法测定沉香精油中脂肪酸的含量测定。试验结果表明影响沉香油萃取率的因素主次顺序为:CO₂ 流量 > 萃取压力 > 萃取温度 > 夹带剂乙醇浓度 > 萃取时间,在 CO₂ 流量为 30 L/h,萃取温度 40 ℃,萃取压力 20 MPa,萃取时间 3 h,加入夹带剂 80% 乙醇为最佳萃取工艺条件下,沉香油萃取率最高为 3.34%。通过分子蒸馏的方式,在蒸馏温度 80 ℃,蒸馏压力 1 Pa 条件下,得到液体沉香精油 0.935%。气相色谱分析液体沉香精油中含有 36 种脂肪酸,其中棕榈酸、油酸、亚油酸含量排前三位,其含量总和占总脂肪酸的 45%。该萃取方法选择性好、稳定可靠,适用于沉香油的萃取。

关键词:超临界 CO₂ 萃取;沉香油;萃取工艺优化;分子分离技术;精油;气相色谱法;脂肪酸

中图分类号:R284.2;TQ646.4

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.002

Optimization of Supercritical CO₂ Extraction of *Aquilaria agallocha* (Lour.) Roxb. Oil and Analysis of Fatty Acid Components

SHEN Ru-qing¹, LU Qi¹, FENG Zhi-hao², ZHU Li², ZHU Bao-zhang², TAN Liang^{3*},
DING Zhi-gang¹, PI Li³, GAO Xiu-zhen³, DING Kai⁴¹Hainan Xiangdao Leisure Agricultural Science and Technology Development Co., Ltd., Haikou 570208, China;²Guang Zhou Hao li Technology Co., Ltd., Guangzhou 510220, China;³Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Pharmacology and Safety Evaluation, Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resource, Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;⁴Administrative offices of prairie protection, Grassland Station of Qinghai, Xining 810000, China

Abstract: The optimal conditions for extracting oil from *Aquilaria agallocha* (Lour.) Roxb. with supercritical CO₂ were studied. The contents of fatty acids in refined essential oil were determined. On the basis of single factor experimental methods, flow rate of CO₂, extraction pressure, extraction temperature, extraction time and concentration of the entrainer on the extraction ratio of raw material oil were studied by orthogonal array design. Then, the obtained essential oil was further refined by molecular separation technology. Finally, the contents of fatty acids in the essential oil were determined by gas chromatography. Experimental results showed that the order of factors affecting extraction ratio of oil from raw material was flow rate of CO₂ > extraction pressure > extraction temperature > concentration of the entrainer ethanol > extraction time. The highest extraction ratio of 3.34% in raw material oil was obtained with a flow rate of CO₂ of 30 L/h, extraction temperature of 40 ℃, extraction pressure of 20 MPa, extraction time of 3 h and concentration of the entrainer of 80% ethanol. After molecular distillation treatment, the content was 0.935% for liquid essential oil under the distillation

收稿日期:2018-10-11 接受日期:2018-11-27

基金项目:海南省重大科技计划(ZDKJ2016004);青海省重点实验室发展建设专项(2017-ZJ-Y10);青海省重点实验室专项(2017-ZJ-Y08)。

*通信作者 Tel:86-971-6132750;E-mail:tanliang@nwipb.cas.cn

temperature of 80 °C and distillation pressure of 1 Pa. Gas chromatographic analysis revealed that there were thirty-six kinds of fatty acids in liquid essential oil, among which the contents of palmitic acid, oleic acid and linoleic acid ranked in the top three, and their total content accounted for 45% of the total fatty acids. The extraction method has the advantages of good selectivity, stable and reliable, which is suitable for extraction of oil from *Aquilaria agallocha* (Lour.) Roxb.

Key words: supercritical CO₂ extraction; extracting oil of *Aquilaria agallocha* (Lour.) Roxb.; optimization of extraction technology; molecular separation technology; essential oil; gas chromatography; fatty acids

沉香为瑞香科(Thymelaeaceae)植物 *Aquilaria agallocha* (Lour.) Roxb. 含有树脂的木材,全年均可采收,割取含树脂的木材,除去不含树脂的部分,阴干^[1]。沉香主产地位于我国广东、广西、海南、云南和台湾等省区,具有行气止痛、温中止吐、纳气平喘的功效,用于胸腹闷疼痛^[2],胃寒呕吐呃逆,肾虚气逆喘急^[3]。沉香含挥发油的量较高,具有浓郁的香气,是沉香挥发性药效的主要成分^[4]。现代药理学研究表明,沉香挥发油中的一些倍半萜成分如沉香螺旋醇具有氯丙嗪样的安定作用;白木香酸具有一定催眠、麻醉和镇痛作用^[5]。

沉香是珍贵药材,随着中医药事业的发展,对沉香的需求量日益增加,其萃取工艺必然成为研究的重要部分。目前,有关沉香的研究有沉香叶、沉香种子中的化学成分研究^[6-9]、诱导形成沉香组分研究^[10]、沉香有效成分药理活性研究^[11]、沉香化学成分研究^[12-14]。对于沉香精油的萃取方面,已经有水蒸气蒸馏法、果胶酶预处理辅助萃取法、纤维素酶辅助萃取法、动态-微波辅助法、溶剂回流萃取法、亚临界流体萃取法等应用到沉香精油的萃取工艺中^[15-19]。也有超临界 CO₂ 萃取技术应用于沉香精油萃取工艺的文献报道^[20,21],然而在用超临界 CO₂ 萃取沉香油的工艺中,对于 CO₂ 流量、夹带剂浓度和用量条件的考察以及用超临界 CO₂ 萃取后用分子分离技术精制沉香油并采用气相色谱法对液体沉香精油进行脂肪酸组分的分析未见有相关文献报道。

本研究采用超临界 CO₂ 从沉香中萃取出沉香油,在单因素试验的基础上,通过正交试验考察了各因素的主次关系和它们之间的综合效应,从而优化了萃取工艺。然后再利用分子分离技术对沉香油进一步精制获得液体沉香精油并采用气相色谱法对其进行了脂肪酸含量测定。为沉香质量控制提供了一定参考,并为其资源的研究与开发利用提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收集海南定安县下坡村共3批沉香,经中国科学院西北高原生物研究所高庆波副研究员鉴定为瑞香科乔木植物沉香 *A. agallocha*。样品预处理:收集后将含树脂的部分阴干,粉碎,过40目筛,装入密封袋中密封,置干燥器中保存。

高纯二氧化碳气、高纯氮气、高纯氢气(纯度≥99.99%,西宁城北程盛电石供应站);37种脂肪酸甲酯混标(货号:CRM47885,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司),无水乙醇、氢氧化钾、三氟化硼、无水硫酸钠、氯化钠为分析纯;甲醇、正庚烷为色谱纯;实验用水为超纯水。

1.2 仪器

SFE-1L×2型超临界 CO₂ 萃取设备(广州市浩立生物科技有限公司,由华南理工大学联合研制);MDS-80a-I型一级沉香纯油专用分子分离设备(广州市浩立生物科技有限公司);Agilent 7890A/5975C型气相色谱仪(配备有氢火焰离子检测器 FID,美国安捷伦科技公司);76-SH 型数显恒温(玻璃)水浴电动搅拌机(上海达平仪器有限公司);梅特勒-托利多 ME403 型电子天平、梅特勒-托利多 AG135 型精密电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);TDL-40B 型低速离心机(上海安亭科学仪器厂);FM100 型高速旋转粉碎仪(北京格瑞德曼仪器设备有限公司);HH-2 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);101-1 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司);优普 UPE-II-40L 型超纯水机(上海优普实业有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 沉香油萃取工艺优化

沉香含树脂的部分阴干,粉碎后过40目筛,沉香粉置于电热鼓风恒温干燥箱内50 °C 干燥过夜,取出装入密封袋中密封,置干燥器中保存备用。取沉香干粉100 g,用定性滤纸和布袋包裹后用不同浓度

比例的乙醇浸润(物料:夹带剂=2:5,g/mL)过夜,次日置于萃取釜中,待水循环系统顺畅,制冷装置与萃取釜和分离釜达到设定温度后,打开压缩泵使高压泵达到所需压力,调整控制CO₂流量进行循环萃取,每隔0.5 h 收集萃取液。萃取时固定分离压力7.5 MPa,分离温度40 ℃。待收集完全后减压浓缩收集沉香油,计算沉香油萃取率。萃取率(Y)的数值以%表示,按式(1)计算:

$$Y = \frac{\omega_1}{\omega_2} \times 100 \quad (1)$$

式中:

Y——沉香油萃取率,单位为百分数(%);

ω_1 ——萃取沉香油的质量,单位为克(g);

ω_2 ——称取原料沉香粉的质量,单位为克(g)。

在单因素试验的基础上,以CO₂流量(A)、萃取压力(B)、萃取温度(C)、萃取时间(D)、夹带剂乙醇浓度(E)为影响因素,沉香油萃取率作为评价指标,正交试验优化萃取工艺。在相同萃取条件下,每批样品重复测定3次,测定结果以 \bar{x} 表示,采用SPSS 19.0软件进行数据处理和统计分析。

1.3.2 沉香油的醇化和精油的精制

将萃取的沉香油置于醇化罐进行升温醇化处理,至45 ℃时保持温度不变继续搅拌醇化1天,把醇化后的沉香物置于一级沉香纯油专用分子分离设备中进行不同阶段的分子蒸馏。蒸馏温度逐渐增加,蒸馏压力逐渐减小,并在一定的条件下接出馏分。以投入的沉香量为参照,计算馏分的含量。沉香精油含量(X)的数值以%表示,按式(2)计算:

$$X = \frac{\omega'_1}{\omega_2} \times 100 \quad (2)$$

式中:

X——沉香精油含量,单位为百分数(%);

ω'_1 ——萃取精油的质量,单位为克(g);

ω_2 ——投入原料沉香粉的质量,单位为克(g)。

1.3.3 液体沉香精油中脂肪酸含量测定方法

1.3.3.1 色谱条件

取单个脂肪酸甲酯标准溶液和脂肪酸甲酯混合标准溶液分别注入气相色谱仪,对各色谱峰进行定性分析。

色谱柱:HP-88毛细管柱(88%-氰丙基)芳基-聚硅氧烷强极性固定相,柱长100 m、内径0.25 mm、膜厚0.20 μm;进样口温度:220 ℃;检测器温度:250 ℃;程序升温(初始温度80 ℃,保持2 min;

80~190 ℃,升温速率10 ℃/min,保持10 min;190~210 ℃,升温速率1 ℃/min,保持20 min;210~230 ℃,升温速率4 ℃/min,保持10 min);载气:氮气;载气流速:2.0 mL/min;燃气:氢气;燃气流速:40 mL/min;分流比:100:1;进样体积:1.0 μL。

1.3.3.2 混合脂肪酸甲酯标准溶液制备

移取0.5 mL脂肪酸甲酯混标溶液至10 mL容量瓶中,用正庚烷稀释定容,置于4 ℃冰箱冷藏贮存。

1.3.3.3 液体沉香精油的皂化和脂肪酸的甲酯化

称取沉香精油100 mg于100 mL磨口平底烧瓶中,加入2 mL正庚烷溶解,再加入0.5 mol/L氢氧化钠甲醇溶液2 mL,置于80±1 ℃水浴上加热回流10 min,直至油滴消失。从回流冷凝器上端加入14%三氟化硼甲醇溶液5 mL,置于80±1 ℃水浴继续回流15 min。用少量水冲洗冷凝回流管,停止加热,从水浴上取下平底烧瓶,迅速冷却至室温。将内容物转移至50 mL离心管中,分别用3 mL饱和氯化钠水溶液清洗烧瓶3次,洗涤液合并至50 mL离心管中,准确加入10 mL正庚烷,振摇2 min后,以4000 rpm离心5 min。吸取上层正庚烷萃取溶液5 mL至25 mL具塞试管中,加入5 g无水硫酸钠,振摇1 min,静置5 min,吸取上层溶液到进样瓶中待测定。

2 结果与分析

2.1 沉香油萃取工艺优化试验结果

2.1.1 超临界CO₂萃取沉香油的单因素试验

2.1.1.1 CO₂流量的影响

固定试验萃取压力为20 MPa,萃取温度为40 ℃,萃取时间为3 h,夹带剂为80%乙醇(物料:夹带剂=2:5,g/mL)的条件下,考察了CO₂流量在10、20、25、30、35、40 L/h时对沉香油萃取率的影响,试验结果见图1。由图1可知,沉香油萃取率随着CO₂流量的增加先逐渐增加后趋于平稳但略有下降,在CO₂流量为30 L/h时萃取率最大。当CO₂流体量过小时,萃取液提前达到饱和,已经不能再萃取出沉香油,萃取不完全;当CO₂流体量过大时,萃取剂萃取沉香油则需要更长的时间。因此CO₂流量选择在25、30、35 L/h三个水平进行考察。

2.1.1.2 萃取压力的影响

固定试验CO₂流量为30 L/h,萃取温度为40

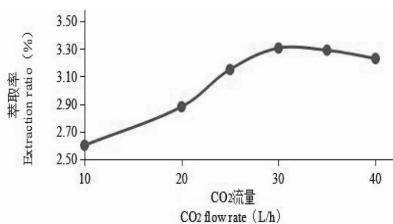
图 1 不同 CO₂ 流量对沉香油萃取率的影响

Fig. 1 Effect of different flow rate of CO₂ on extraction ratio of oil in *A. agallocha*

℃,萃取时间为3 h,夹带剂为80%乙醇(物料:夹带剂=2:5,g/mL)的条件下,考察了萃取压力为5、10、15、20、25、30 MPa时对沉香油萃取率的影响,试验结果见图2。由图2可知,沉香油萃取率随着萃取压力的升高先增加后略有降低,在萃取压力为20 MPa时萃取率达到最大值。随着萃取压力的逐渐升高,超临界流体CO₂的密度也随之增加,溶解力提高,从而使得萃取率增加。但随着萃取压力继续增加,超临界流体CO₂的黏度也随之变大,限制了沉香油的扩散速率,导致沉香油萃取率有所下降。因此萃取压力选择在15、20、25 MPa三个水平进行考察。

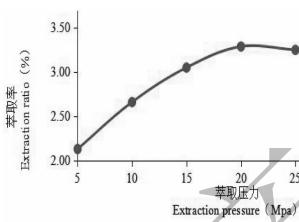


图 2 不同萃取压力对沉香油萃取率的影响

Fig. 2 Effect of different extraction pressure on extraction ratio of oil in *A. agallocha*

2.1.1.3 萃取温度的影响

固定试验CO₂流量为30 L/h,萃取压力为20 MPa,萃取时间为3 h,夹带剂为80%乙醇(物料:夹带剂=2:5,g/mL)的条件下,考察了萃取温度为25、30、35、40、45、50 ℃时对沉香油萃取率的影响,试验结果见图3。由图3可知,沉香油萃取率随着萃取温度的升高先增加后降低,在萃取温度为40 ℃时萃取率最高。随着萃取温度的升高,溶质的蒸汽压也随之增加,有利于其挥发性和传质速率的提高,溶解度增加,从而使得萃取率增加。但随着萃取温度继续升高,超临界流体CO₂的密度却随之降低,溶解力降低,萃取能力下降。因此萃取温度选择在35、

40、45 ℃三个水平进行考察。

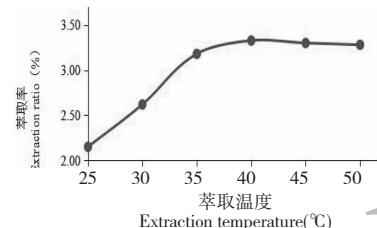


图 3 不同萃取温度对沉香油萃取率的影响

Fig. 3 Effect of different extraction temperature on extraction ratio of oil in *A. agallocha*

2.1.1.4 萃取时间的影响

固定试验CO₂流量为30 L/h,萃取压力为20 MPa,萃取温度为40 ℃,夹带剂为80%乙醇(物料:夹带剂=2:5,g/mL)的条件下,考察了萃取时间为1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 h时对沉香油萃取率的影响,试验结果见图4。由图4可知,沉香油萃取率随着萃取时间的延长逐渐增加,至萃取时间为3 h时萃取率最高,此后继续增加萃取时间萃取率增加不明显。随着萃取时间的进一步增加,沉香中沉香油逐渐减少,传质阻力逐渐下降,萃取率增长缓慢不明显。因此萃取时间选择在2.5、3、3.5 h三个水平进行考察。

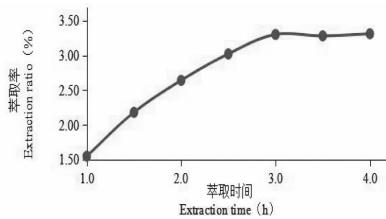


图 4 不同萃取时间对沉香油萃取率的影响

Fig. 4 Effect of different extraction time on extraction ratio of oil in *A. agallocha*

2.1.1.5 夹带剂的种类和浓度的影响

夹带剂的优点是可以降低超临界流体的操作压力或减少在操作中超临界流体的用量。对加入不同夹带剂的试验比较见图5。由图5可知,对沉香油的萃取率从大到小依次为:甲醇>乙醚>乙醇>乙酸乙酯>丙酮,但加入甲醇萃取的沉香油萃取率仍低于80%乙醇。

固定试验CO₂流量为30 L/h,萃取压力为20 MPa,萃取温度为40 ℃,萃取时间为3 h的条件下,考察了加入不同浓度50%、60%、70%、75%、80%、85%乙醇(物料:夹带剂=2:5,g/mL)作为夹带剂时

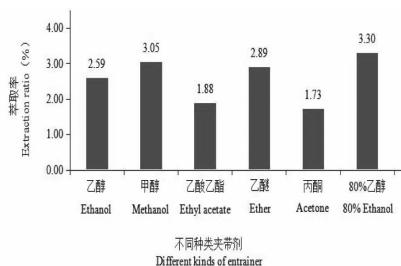


图 5 不同种类夹带剂对沉香油萃取率的影响

Fig. 5 Effect of different kinds of entrainer on extraction ratio of oil in *A. agallocha*

对沉香油萃取率的影响,试验结果见图 6。由图 6 可知,沉香油萃取率随着加入夹带剂乙醇浓度的增加逐渐增加,至乙醇浓度达到 80% 时萃取率最高,此后继续增加乙醇浓度萃取率有所下降。通过夹带剂浓度对萃取率的影响恰当地选用夹带剂,可以增加压力和温度对溶质在超临界流体中的溶解度变化的灵敏度,但考虑到优化生产工艺和降低生产成本与回收成本,乙醇浓度不宜过大。因此夹带剂乙醇

浓度选择在 75%、80%、85% 三个水平进行考察。

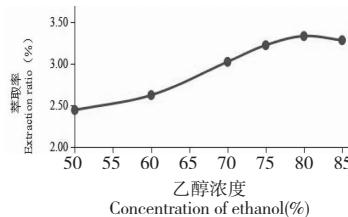


图 6 不同浓度乙醇对沉香油萃取率的影响

Fig. 6 Effect of different concentration of ethanol on extraction ratio of oil in *A. agallocha*

2.1.2 超临界 CO_2 萃取沉香油的正交试验

为全面考察超临界 CO_2 对沉香油萃取率影响的各因素,在单因素试验的基础上设计了正交实验。以 CO_2 流量、萃取压力、萃取温度、萃取时间和夹带剂乙醇浓度作为考察对象,设计了五因素三水平正交试验,以确定超临界流体 CO_2 萃取沉香油萃取率的适宜工艺条件。考察的因素及具体水平点见表 1,选用 $L_{27}(3^5)$ 正交表,正交试验结果与分析、方差分析结果分别见表 2、表 3。

表 1 正交试验设计的各因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平 Level	A CO_2 流量 Flow rate of CO_2 (L/h)	B 萃取压力 Extraction pressure (MPa)	C 萃取温度 Extraction temperature (°C)	D 萃取时间 Extraction time (h)	E 乙醇浓度 Concentration of ethanol (%)
1	25	15	35	2.5	75
2	30	20	40	3.0	80
3	35	25	45	3.5	85

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Results of orthogonal test and analysis

试验号 Test No.	因素 Factors					萃取率 Extraction ratio (%)
	A CO_2 流量 Flow rate of CO_2 (L/h)	B 萃取压力 Extraction pressure (MPa)	C 萃取温度 Extraction temperature (°C)	D 萃取时间 Extraction time (h)	E 乙醇浓度 Concentration of ethanol (%)	
1	1	1	1	1	1	1.50
2	1	2	1	2	2	2.41
3	1	3	1	3	3	2.03
4	1	3	2	3	3	2.33
5	1	1	2	1	1	2.13
6	1	2	2	2	2	2.75
7	1	2	3	2	2	2.57
8	1	3	3	3	3	2.41
9	1	1	3	1	1	2.22

续表2(Continued Tab. 2)

试验号 Test No.	因素 Factors					萃取率 Extraction ratio (%)
	A CO ₂ 流量 Flow rate of CO ₂ (L/h)	B 萃取压力 Extraction pressure (MPa)	C 萃取温度 Extraction temperature (℃)	D 萃取时间 Extraction time (h)	E 乙醇浓度 Concentration of ethanol (%)	
10	2	1	1	3	2	2.53
11	2	2	1	1	3	2.93
12	2	3	1	2	1	2.39
13	2	3	2	2	1	2.79
14	2	1	2	3	2	2.63
15	2	2	2	1	3	2.49
16	2	2	3	1	3	3.20
17	2	3	3	2	1	2.86
18	2	1	3	3	2	2.51
19	3	1	1	2	3	2.52
20	3	2	1	3	1	2.42
21	3	3	1	1	2	2.77
22	3	3	2	1	2	2.37
23	3	1	2	2	3	1.83
24	3	2	2	3	1	2.35
25	3	2	3	3	1	2.78
26	3	3	3	1	2	3.04
27	3	1	3	2	3	2.65
K ₁	20.34	20.50	21.50	22.65	21.45	
K ₂	24.33	23.91	21.66	22.76	23.57	
K ₃	22.73	22.99	24.24	21.99	22.37	
k ₁	2.26	2.28	2.39	2.52	2.38	
k ₂	2.70	2.66	2.41	2.53	2.62	
k ₃	2.53	2.55	2.69	2.44	2.49	
R	0.44	0.38	0.30	0.09	0.24	

表3 方差分析结果
Table 3 Analysis of variance

方差来源 Source	离差平方和 Sum of squares deviation S_j	自由度 Degree of freedom f_j	均方 Mean square S_j/f_j	F 值 F	显著性 Sig.
校正模型 Corrected model	2.350	8	0.294	4.909	0.002
截距 Intercept	168.300	1	168.300	2812	0.000
A	0.891	2	0.446	7.446	0.004
B	0.680	2	0.340	5.679	0.012
C	0.524	2	0.262	4.376	0.028
E	0.255	2	0.128	2.134	0.147
误差 D Error D	0.039	18	0.020		
总计 Total	171.728	27			
矫正后的总变异 Corrected total	3.428	26			

由表2可知,影响沉香油萃取率的各因素主次顺序为: CO_2 流量(A)>萃取压力(B)>萃取温度(C)>乙醇浓度(E)>萃取时间(D)。从k值分析,最佳萃取工艺为 $A_2B_2C_3D_2E_2$,而正交试验所得结果是 $A_2B_2C_3D_1E_3$ 。该正交设计无重复试验,采用SPSS 19.0软件进行方差分析,分析可知ss(萃取时间D)=0.039最小,它对整个试验结果影响最小,因而将它作为误差估计,用以检验其他因素作用的显著性,结果见表3。由表3可知,将萃取时间(D)作为误差时, CO_2 流量(A)、萃取压力(B)、萃取温度(C)对沉香油萃取率有显著性影响($P < 0.05$),乙醇浓度(E)对沉香油萃取率无显著性影响($P > 0.05$)。由此可知,直观分析与方差分析结果一致。

2.1.3 验证试验

直观分析最佳萃取工艺为 $A_2B_2C_3D_2E_2$,正交试验所得结果是 $A_2B_2C_3D_1E_3$,对工艺 $A_2B_2C_3D_2E_2$ 进行验证试验,平行测定3次,测得沉香油萃取率($n=3$)为 $(3.34 \pm 0.17)\%$,优于工艺 $A_2B_2C_3D_1E_3$ 测得的沉香油萃取率3.20%。综合各种因素,选定最佳萃取工艺为 $A_2B_2C_3D_2E_2$,即 CO_2 流量为30 L/h,萃取压力为20 MPa,萃取温度为40 °C,萃取时间为3 h,夹带剂乙醇浓度为80%。

2.2 沉香油的精制试验

在上述最佳萃取工艺条件下制得的沉香油无明显分层和沉淀,带有沉香特有的香气,但仍然需要进

行除酸、除杂处理。沉香的醇化程度对于沉香的品质而言,有着其至关重要的影响。故将其置于配备有恒温(玻璃)水浴电动搅拌机的醇化罐中进行醇化处理,逐渐升温至45 °C时保持温度不变,以60 rpm转速搅拌醇化1天。把醇化后的沉香产物置于一级沉香纯油专用分子分离设备中进行分子蒸馏:(1)在蒸馏温度50 °C,蒸馏压力200 Pa条件下,得到的馏分为水分;(2)继续升高蒸馏温度并降低蒸馏压力,在蒸馏温度80 °C,蒸馏压力1 Pa条件下,得到液体沉香精油。其颜色呈黄色又略带有红褐色,流动性差,带有沉香特有的香气。以投入的沉香量为参照,计算液体沉香精油的含量。结果得到液体沉香精油为0.935%(n=3)。

2.3 液体沉香精油中脂肪酸组成及含量测定

分别按“1.3.3.2”、“1.3.3.3”进行混合标准溶液和供试品溶液的制备,色谱条件按“1.3.3.1”项下内容操作,采用面积归一化法计算液体沉香精油中不同脂肪酸含量,标准品和样品的色谱图见图7,结果见表4。由表4可知:液体沉香精油中含有36种脂肪酸,棕榈酸含量最高为16.21%;其次是油酸和亚油酸,含量依次为14.31%、14.10%;十七碳酸、硬脂酸、花生酸、 α -亚麻酸、二十二碳酸、二十四碳一烯酸含量相当,均在4%左右;辛酸、二十四碳酸含量最低为0.27%左右。

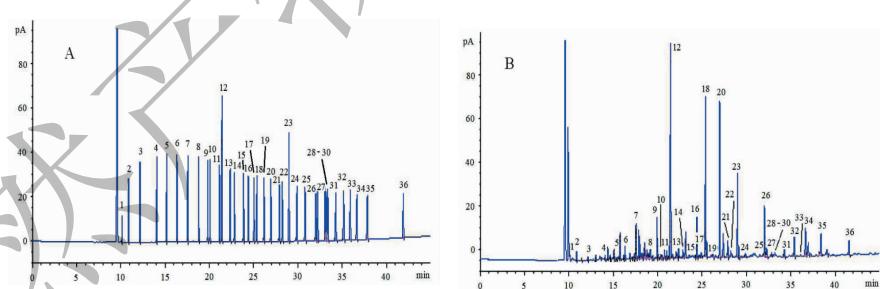


图7 混合标准品(A)和液体沉香精油(B)的GC色谱图

Fig. 7 The GC chromatograms of mixed reference substances (A) and liquid essential oil of *A. agallocha* (B)

- 注:1. 丁酸;2. 己酸;3. 辛酸;4. 壬酸;5. 十一酸;6. 月桂酸;7. 十三酸;8. 肉豆蔻酸;9. 肉豆蔻油酸;10. 十五碳酸;11. 十五碳一烯酸;12. 棕榈酸;13. 棕榈油酸;14. 十七酸;15. 十七碳一烯酸;16. 硬脂酸;17. 反式油酸;18. 油酸;19. 反式亚油酸;20. 亚油酸;21. 花生酸;22. γ -亚麻酸;23. α -亚麻酸;24. 二十一碳酸;25. 二十碳二烯酸;26. 二十二碳酸;27. 二十碳三烯酸;28. 芥酸;29. 二十碳三烯酸;30. 花生四烯酸;31. 二十三碳酸;32. 二十二碳二烯酸;33. 二十四碳酸;34. 二十碳五烯酸;35. 二十四碳一烯酸;36. 二十二碳六烯酸。
- Note: 1. Butyric acid; 2. Caproic acid; 3. Octanoic acid; 4. Decanoic acid; 5. Undecylic acid; 6. Lauric acid; 7. Tridecoic acid; 8. Myristic acid; 9. Myristoleic acid; 10. Pentadecanoic acid; 11. Pentadecenoic acid; 12. Palmitic acid; 13. Palmitoleic acid; 14. Heptadecanoic acid; 15. Heptadecenoic acid; 16. Stearic acid; 17. Elaidic acid; 18. Oleic acid; 19. Trans-linoleic acid; 20. Linoleic acid; 21. Arachidic acid; 22. Gamma linolenic acid; 23. α -Linolenic acid; 24. Heneicosanoic acid; 25. Eicosadienoic acid; 26. Behenic acid; 27. Carbonium; 28. Erucic acid; 29. Docosenoic acid; 30. Arachidonic acid; 31. Tricosanoic acid; 32. Docosadienoic acid; 33. Tetracosanoic acid; 34. Eicosapentaenoic acid; 35. Tetracosenoic acid; 36. Docosahexaenoic acid.

表 4 液体沉香精油中脂肪酸组成和含量测定(%,[—],_x,_n=3)Table 4 Composition and contents of fatty acids in liquid essential oil of *A. agallocha* (%,[—],_x,_n=3)

序号 No.	脂肪酸种类 Type of fatty acids	含量 Contents (%)	序号 No.	脂肪酸种类 Type of fatty acids	含量 Contents (%)	序号 No.	脂肪酸种类 Type of fatty acids	含量 Contents (%)
1	丁酸 Butyric acid	1.839	13	棕榈油酸 Palmitoleic acid	1.334	25	二十碳二烯酸 Eicosadienoic acid	0.719
2	己酸 Caproic acid	0.749	14	十七碳酸 Heptadecanoic acid	3.411	26	二十二碳酸 Behenic acid	4.976
3	辛酸 Octanoic acid	0.258	15	十七碳一烯酸 Heptadecenoic acid	0.976	27	二十碳三烯酸 Carbonium	1.007
4	癸酸 Decanoic acid	1.111	16	硬脂酸 Stearic acid	3.405	28	芥酸 Erucic acid	0.425
5	十一酸 Undecylic acid	1.173	17	反式油酸 Elaidic acid	1.392	29	二十二碳一烯酸 Docosenoic acid	0.364
6	月桂酸 Lauric acid	1.068	18	油酸 Oleic acid	14.31	30	花生四烯酸 Arachidonic acid	0.493
7	十三酸 Tridecoic acid	2.669	19	反式亚油酸 Trans-linoleic acid	0.643	31	二十三碳酸 Tricosanoic acid	0.916
8	肉豆蔻酸 Myristic acid	1.664	20	亚油酸 Linoleic acid	14.10	32	二十二碳二烯酸 Docosadienoic acid	2.458
9	肉豆蔻油酸 Myristolenic acid	2.779	21	花生酸 Arachidic acid	3.381	33	二十四碳酸 Tetracosanoic acid	0.279
10	十五碳酸 Pentadecanoic acid	0.429	22	γ-亚麻酸 Gamma linolenic acid	1.875	34	二十碳五烯酸 Eicosapentaenoic acid	2.472
11	十五碳一烯酸 Pentadecenoic acid	1.100	23	α-亚麻酸 α-Linolenic acid	3.785	35	二十四碳一烯酸 Tetracosenoic acid	3.006
12	棕榈酸 Palmitic acid	16.21	24	二十一碳酸 Heneicosanoic acid	0.695	36	二十二碳六烯酸 Docosahexaenoic acid	1.785

注:表中数据是指在液体沉香精油中所占比例。

Note: The data in the table refers to the proportion in liquid essential oil of *A. agallocha*.

3 结论

3.1 亚临界流体 R134a 和超临界 CO₂ 萃取沉香油的萃取率比较

本研究对超临界 CO₂ 萃取沉香油的最佳工艺进行了研究,在萃取工艺中,又增加了对 CO₂ 流量、夹带剂浓度和用量条件进行了更全面的考察,最终选定最佳萃取工艺为 A₂B₂C₃D₂E₂,即 CO₂ 流量为 30 L/h,萃取压力为 20 MPa,萃取温度为 40 ℃,萃取时间为 3 h,夹带剂乙醇浓度为 80%,最终测得沉香油提取率(*n*=3)为(3.34±0.17)%。其中,萃取时间对沉香油萃取率影响最小,乙醇浓度对沉香油萃取率无显著性影响(*P*<0.05),CO₂ 流量、萃取压力和萃取温度对沉香油萃取率有显著性影响(*P*>0.05)。本研究曾采用亚临界流体 1,1,1,2-四氟乙烷(R134a)提取沉香油的最佳工艺进行了研究,在料液比 1:30,提取时间 6 h,提取压力 1.55 MPa,提取温度 60 ℃,加入夹带剂 80% 乙醇为最佳提取工艺条件下,最终测得沉香油提取率(*n*=3)为(3.77

±0.21)%。对两组数据进行独立样本 T 检验,结果 Levene 方差齐性检验 *F*=0.036, *P*=0.855>0.05,说明两样本方差相等;进行方差齐性检验时, *t*=3.356,自由度 *df*=8,双尾检验概率 *P*=0.010<0.05,说明超临界 CO₂ 和亚临界流体 R134a 两种方法萃取沉香油的萃取率具有显著性差异。分析其原因可能是亚临界流体 R134a 在液态和临界点附近比超临界 CO₂ 具有更好的溶剂性能,提取沉香油的能力更强。

3.2 沉香萃取物醇化温度和时间的确定

在最佳条件下得到的沉香提取物带沉香特有醇厚的香气,但仍然存在酸味及杂气等,需进一步进行除酸、除杂处理,即将沉香萃取物经过醇化处理。沉香的醇化程度对于沉香的品质至关重要。本研究进行了逐渐升温醇化试验。结果表明:当温度超过 45 ℃时头香低分子挥发油也会慢慢蒸出,这些低分子挥发油对于香料的气味至关重要,并且温度更高会直接改变沉香的气味,影响到沉香的品质。时间的长短是影响沉香醇化的另一重要因素,通常醇化的

时间越长越有助于沉香的品质更加,但醇化时间并非越长越好,试验发现:当醇化时间超过 24 h 以后沉香提取物的颜色明显变深,由原来的黄色略带橙红色变为红褐色,品相变得很差。故最终确定在 45 ℃ 条件下持续搅拌 1 天进行醇化,为后续的分子蒸馏做准备。

3.3 液体沉香精油中脂肪酸组分分析

本研究采用气相色谱法分析液体沉香精油中含有 36 种脂肪酸,其中含量排前三位的脂肪酸分别是棕榈酸、油酸和亚油酸,其含量总和占总脂肪酸的 45%。植物最丰富的脂肪酸含 16 或 18 个碳原子,如棕榈酸(软脂酸)、油酸、亚油酸和硬脂酸。在脂肪酸平衡的基础上保持脂肪摄入,才能精力充沛。脂肪的主要功能是作为能源物质,在体内代谢后可释放大量能量供给人体使用,它能满足成人每日能量需要的 20%~50%。另外,脂肪由于能帮助脂溶性维生素的消化吸收。脂肪酸参与构成脑组织和身体细胞膜,保证身体各个细胞的功能正常发挥。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:185.
- 2 Zhou MH, Wang HG, Suolangjiba, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg leaves extract[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117:345-350.
- 3 Ma YQ(马永青), Yuan LH(袁丽华), Liu YL(刘永利). Advances in the chemical constituents and analytical methods of agarwood[J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2017, 34:181-192.
- 4 Yang JS(杨峻山). Review of the chemical constituents isolated from CHEN-XIANG[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 1998, 10:99-103.
- 5 Song ZY(宋振玉). Modern research on Chinese herbal medicine: Vol III (中草药现代研究:第3卷)[M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical Affiliated Press, 1997:1-30.
- 6 Duan ZW(段宙位), Xie H(谢辉), Dou ZH(窦志浩), et al. Enzymatic extraction and antioxidant activity of polyphenols from *Lignum aquilariae Resinatum* leaves[J]. *Food Sci Technol*(食品科技), 2016, 41:197-202.
- 7 Wu HT(吴海涛), Han DQ(韩东岐). Optimization of extraction and purification technology for four flavonoids in *Aquilaria sinensis* leaves by polyamide resin[J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2018, 30:47-51.
- 8 Gong B(弓宝), Chen DL(陈德力), Zhao XS(赵祥升), et al. Analysis and identification of fatty oil in *Aquilaria sinensis* seeds[J]. *Chinese J Tradit Med Sci Technol*(中国中医药科技), 2017, 24:51-52.
- 9 Li Y(李勇), Jiang HQ(蒋海强), Gong LL(巩丽丽). Analysis of constituents in supercritical fluid CO₂ extraction in *Aquilariae Lignum Resinatum* fruits by GC-MS[J]. *Chinese J Exp Tradit Med Formulae*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18:142-144.
- 10 Tao MH(陶美华), Wang L(王磊), Gao XX(高晓霞), et al. Effects of *Botryosphaeria rhodina* A13 on agarwood formation of *Aquilaria sinensis* excised twig[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:1719-1723.
- 11 Liu YY(刘洋洋), Chen DL(陈德力), Zheng W(郑威), et al. 2-(2-phenylethyl) chromones and anti-inflammation of agarwood produced via whole-tree agarwood-inducing technique from *Aquilaria sinensis*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2018, 30:789-794.
- 12 Guo PY(郭珮怡). Research on the small polar chemical constituents in Chinese *Aquilaria sinensis*[D]. Beijing: Minzu University of China(中央民族大学), 2015.
- 13 Zhang JF(张静斐), Wu HQ(吴惠勤), Huang XL(黄晓兰), et al. Investigation on characteristic constituents of agarwood by SPME/GC-MS[J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2017, 36:841-848.
- 14 Lin N(林娜), Chen J(陈静), Zhang WK(张万科), et al. Study on volatile oil components from *Lignum Aquilariae Resinatum* produced in Hainan[J]. *Hainan Medi J*(海南医学), 2016, 27:1383-1385.
- 15 Gong B(弓宝), Huang LB(黄立标), Feng JD(冯锦东), et al. Optimization of extraction conditions for volatile oil of eaglewood by orthogonal test[J]. *Flavour Frag Cosmet*(香料香精化妆品), 2011, 5:4-6.
- 16 Li MY(李明月), Shen HJ(沈华杰), He HS(何海珊), et al. Effect of pectinase treatment on extraction of essential oil from agarwood[J]. *China Forestry Sci Technol*(林业工程学报), 2017, 2:55-59.
- 17 Gong B(弓宝), Yang Y(杨云), Huang LB(黄立标), et al. Cellulase-assisted extraction of essential oil from eaglewood [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2013, 22:1833-1835, 1839.
- 18 Chen ZX(陈志雄), Fan YM(樊亚鸣), He ZZ(何芝洲), et al. Dynamic-microwave extraction of *Aquilaria* oil in pilot experiment scale[J]. *Food Sci Technol*(食品科技), 2012, 37: 200-203.

(下转第 35 页)