

超临界 CO₂ 萃取松针精油中萜烯类物质的工艺优化郝金伟¹, 张国锋², 赵晶^{*}¹黑龙江东方学院, 哈尔滨 150066; ²伊春市疾病预防控制中心, 伊春 153000

摘要:以新鲜的红松松针为原料,通过单因素试验研究萃取压力、萃取温度、萃取时间对超临界 CO₂ 萃取松针精油提取率和松针精油中萜烯含量的影响。以萃取压力、萃取温度、萃取时间为响应因素,松针精油的提取率和萜烯相对含量为响应值,进行 3 因素 3 水平的响应面分析。结果表明:超临界 CO₂ 萃取松针精油的最适工艺条件为:萃取压力 12 MPa,萃取温度 44 °C,萃取时间 1.7 h,在此条件下得到松针精油提取率为 1.71 ± 0.092%,萜烯相对含量为 72.38 ± 1.14%,与预测值一致。采用 GC-MS 对松针精油进行成分分析,鉴定出 48 种化合物,占总萃取物的 92.21%;其中的主要成分是萆澄茄油萜、异喇叭烯、石竹烯等化合物。

关键词:超临界 CO₂ 萃取;松针精油;响应面法;提取率;萜烯相对含量

中图分类号:TS272

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019) Suppl-0017-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.003

Optimization of supercritical CO₂ extraction of terpenes from pine needles essential oil

HAO Jin-wei¹, ZHANG Guo-feng², ZHAO Jing^{1*},¹East University of Heilongjiang, Harbin 150066, China; ²Yichun disease prevention and control center, Yichun 153000, China

Abstract: The effects of extraction pressure, extraction temperature and extraction time on the extraction rate and terpene content of pine needle essential oil from fresh Korean pine needles were studied by single factor experiment. Response surface analysis was carried out at 3 factors and 3 levels with extraction pressure, extraction temperature and extraction time as the response factors and extraction rate and relative content of terpenes of pine needle essential oil as the response values. Results show that supercritical CO₂ extraction of pine needle oil optimum process conditions for: extraction pressure 12 MPa, extraction temperature 44 °C, extraction time 1.7 h. Under these conditions, the pine needle oil extraction yield of 1.71% ± 0.092%, terpene relative content was 72.38% ± 1.14%, consistent with the predicted value. The constituents of pine needle essential oil were analyzed by GC-MS, and 48 compounds were identified, accounting for 92.21% of the total extract. The main components are cubeb oil terpenes, isohornene, caryophyllene and other compounds.

Key words: supercritical CO₂ extraction; pine needle essential oil; response surface method; extraction yield.; relative terpene content

红松(*Pinus koraiensis*)又名果松,是松科(Pinaceae)松属常绿乔木中的一种野生植物,受到国家Ⅱ级重点保护,它主要分布在我国东北长白山到小兴安岭一带^[1]。松针是一种持续的可再生资源,它除了含有挥发精油,还含有黄酮类、树脂、纤维素、木质素、叶绿素、多种维生素和微量元素等成分^[2,3];松针中含有一种具有特殊香味的物质-松针精油,国

外的研究认为,松针精油可以溶解人体内的老化物质,它可以通过调整和促进血液循环,来改善毛细血管的机制,提高免疫力,使身体组织年轻化^[4,5]。;松针精油含有石竹烯、大根香叶烯 D、蒎烯等萜烯类物质,这些成分具有消炎镇痛、抗菌、抗病毒等作用,并且在医疗方面已经有了广泛的应用^[6-9],因此研究松针精油中的萜烯类物质具有重要的意义。

目前,国内外用来提取松针精油的方法主要是水蒸气蒸馏法和有机溶剂法等,对超临界 CO₂ 萃取法的报道很少见;超临界 CO₂ 萃取法是一种环境友好型技术,具有提取效率高、无毒、无害、无污染等特

点^[10,11]。与有机溶剂萃取法相比,没有溶剂残留,CO₂有较为温和的临界压力与临界温度,对热敏物质几乎不会产生影响,也不会引起部分物质的氧化,该技术在食品、医药和化工等应用上有着广泛的前景,特别适用于热敏物质的分离^[12,13],但是该方法的重现性较差。本文充分的研究了萃取压力、萃取温度和萃取时间对松针精油提取率和萜烯相对含量的影响,并选择最佳的萃取范围进行 Box-Behnken 响应面设计,研究 3 个因素之间的交互作用,最后建立多元回归模型对萃取条件进行优化,为后续松针精油的开发利用提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜的红松松针产自伊春市;CO₂(食品级,纯度 >99.999%):杭州建海化工有限公司;甲醇(优级纯 GR):天津中和盛泰化工有限公司。

超临界 CO₂ 萃取仪(STF-110):美国 STF 公司;电子天平(AW220):沈阳杰龙仪器有限公司;气相色谱-质谱联用仪(7890A-5975C):美国安捷伦有限公司。

1.2 方法

1.2.1 松针精油萃取工艺流程

超临界 CO₂ 萃取松针精油工艺流程图见图

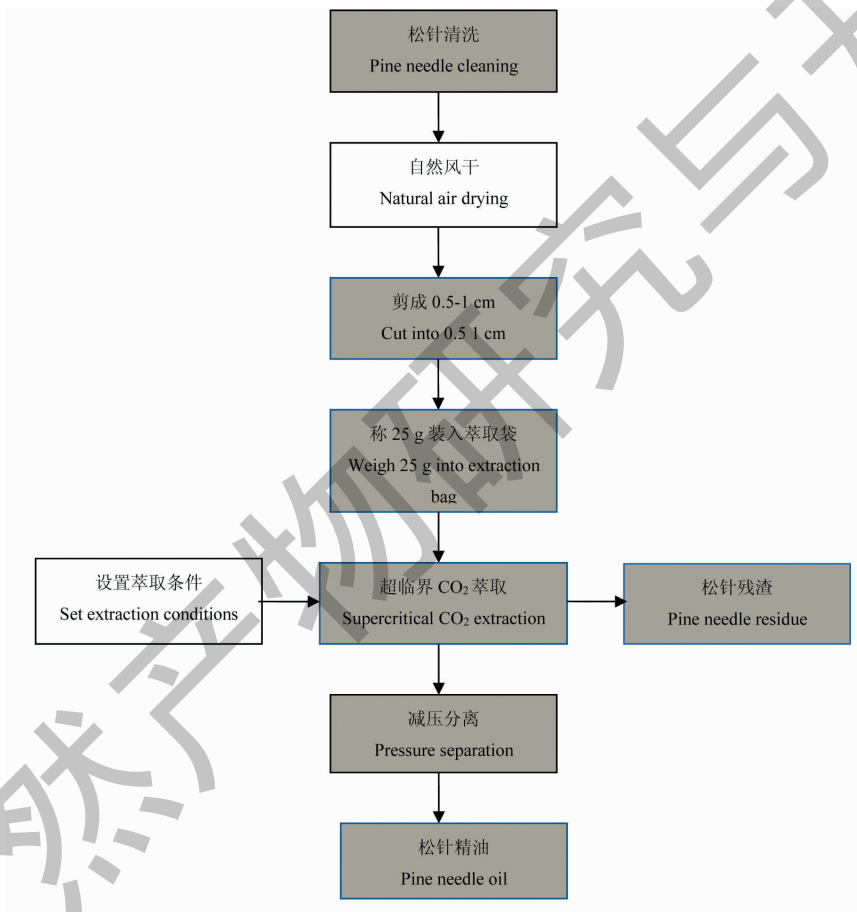


图 1 超临界 CO₂ 萃取松针精油工艺流程图

Fig. 1 Process flow chart of supercritical CO₂ extraction of pine needle essential oil

选择清洗去杂后晾干的松针,剪成 0.5 ~ 1cm 的小段,准确称取 25 g 松针装入萃取袋中,将萃取袋放入 100 mL 的萃取釜内,开机待 CO₂ 泵冷却器运行 15 min 后,按规定设置好萃取压力和萃取温度,打开 CO₂ 钢瓶的阀门,通过显示窗口调节 CO₂ 的流量。静态萃取 20 min 后,打开排料阀,收集分离釜中的淡黄色半透明的油状萃取物,收集后立即

密封低温保存,松针精油提取率的计算如下:

$$\text{精油提取率} = \frac{\text{提取精油质量(g)}}{\text{松针样品质量(g)}} \times 100\%$$

1.2.2 松针精油的成分分析与萜烯相对含量的确定

使用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)对松针精油进行分析。

GC 条件:色谱柱 HP-5MS 毛细管柱(30 mm × 0.25 mm × 0.2 μm);载气:高纯氦气(He),流速 0.8 mL/min;程序升温:初始温度 60 °C 保持 1 min,以 3 °C/min 升至 180 °C 保持 3 min,再以 5 °C/min 升至 230 °C 保持 5 min;分流比为 200:1。

MS 条件:EI 离子源,电子能量为 70 eV,传输线温度 250 °C,四级杆温度 150 °C,扫描范围为 m/z 35 ~ 550;采用全扫描模式,用 NIST 14 质谱库对松针

精油进行检索,对峰面积进行归一化分析,估计出各物质的相对含量。

1.2.3 单因素试验

称取 25 g 样品,萃取压力 8 ~ 16 MPa、萃取温度 30 ~ 50 °C、萃取流量为 10 ~ 17 mL/min、萃取时间为 0.5 ~ 2.5 h 的条件下,研究萃取压力、萃取温度和萃取时间 3 个因素对松针精油提取率的影响,单因素试验因素水平见表 1,每组试验重复 3 次,取平均值。

表 1 单因素试验因素与水平

Table 1 Factors and level of single factor test

因素 Factor	水平 Level
A 萃取压力 Extraction pressure(MPa)	8,10,12,14,16
B 萃取温度 Extraction temperature(°C)	30,35,40,45,50
C 萃取时间 Extraction time(h)	0.5,1,1.5,2,2.5

1.2.4 响应面优化试验

根据单因素试验的结果,利用 Design-Expert 的 Box-Behnken 试验设计,选择萃取压力、萃取温度和萃取时间以及各因素之间的交互作用对松针油提取

率的影响,以松针油提取率和萜烯的相对含量为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面试验,因素水平见表 2,其余因素均选择单因素实验得出的最佳水平。

表 2 响应面试验因素与水平表

Table 2 Variables and levels in response surface design

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 萃取压力 Extraction pressure(MPa)	10	12	14
B 萃取温度 Extraction temperature(°C)	40	45	50
C 萃取时间 Extraction time(h)	1	1.5	2

1.2.4 数据处理

用 Expert 整理数据,将单因素试验得出的数据用 Origin 8.5 作曲线图,用 Design-Expert 设计并分析松针精油的最佳提取条件。

2 结论

2.1 单因素试验

2.1.1 萃取压力的影响

由图 2 可知,随着萃取压力的增加,提取率呈逐渐上升;萃取压力在 12 MPa 时萜烯相对含量达到最大,之后急剧下降。主要是因为,随着压力的增加,超临界流体 CO₂ 的密度逐渐增大,溶解能力随着增加;但随着压力继续上升,CO₂ 的压缩能力减弱,流动性降低,影响其传质性,提取率增幅减少;此时有利于松针精油中醇类、醛类等极性较强的物质溶解,

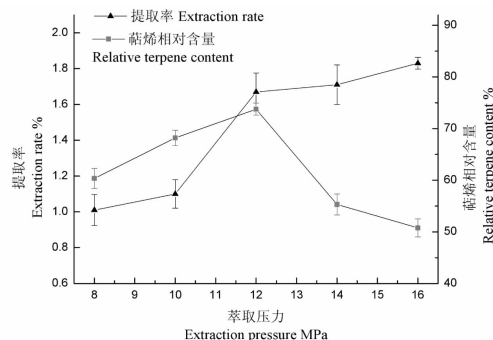


图 2 萃取压力对松针精油提取率和萜烯相对含量的影响

Fig. 2 Effect of extraction pressure on extraction rate and relative content of terpene of pine needles essential oil

使萜烯类物质下降^[14,15]。综合考虑,萃取压力在 12 MPa 时,提取率和萜烯相对含量为较佳。

2.1.2 萃取温度的影响

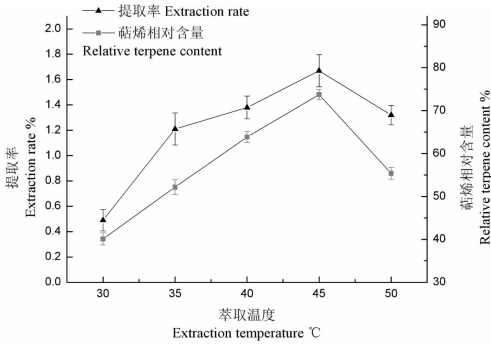


图3 萃取温度对松针精油提取率和萜烯相对含量的影响

Fig. 3 Effect of extraction temperature on extraction rate and relative content of terpene of pine needles essential oil

由图3可知,随着萃取温度的升高,松针精油的提取率和萜烯相对含量均呈先上升,后下降趋势。主要是因为萃取温度对超临界CO₂提取率和萜烯相对含量有双重影响:一方面温度升高,溶质分子的相对运动增加,从而降低了流体的粘度,提高了其扩散系数,使得被萃取组分的溶解度增加,进而提高了提取率和萜烯相对含量;但是随着温度的继续升高,萃取釜内的CO₂密度相对减少,导致其溶解能力下降,使得提取率降低^[16,17]。同时温度越高对松针精油中极性高、沸点高的醇类、醛类等含氧化合物的影响越大。综合考虑,萃取温度在45℃时,提取率和萜烯相对含量为较佳。

2.1.3 萃取时间的影响

由图4可知,随着萃取时间的增加,松针精油的提取率先快速上升,后来上升的比较缓慢;萜烯相对含量逐渐下降。主要是因为当95%的精油被萃取

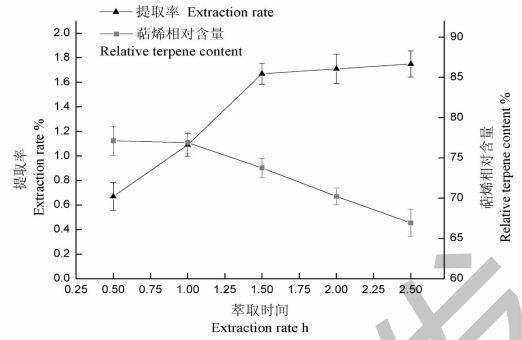


图4 萃取时间对松针精油提取率和萜烯相对含量的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on extraction rate and relative content of terpene of pine needles essential oil

出来之后,再进行萃取只会过多的消耗CO₂,降低提取率,增加提取成本;随着时间的增加,松针精油中的醇类、醛类等含氧化合物扩散速度逐渐减慢,相对较难萃取出来的物质也逐渐被萃取出来,使总体的分离效果降低,降低了萜烯类物质的含量^[18]。综合考虑,萃取时间在1.5h时,提取率和萜烯相对含量为较佳。

2.2 响应面实验

2.2.1 响应面设计

采用Design-Expert8.0.6软件对表3中的数据进行多元回归分析,分别得到以提取率(R_1)和萜烯相对含量(R_2)为响应值,萃取压力、萃取温度、萃取时间为变量的二元多次回归方程为:

$$R_1 = 1.66 + 0.25A + 0.049B + 0.14C - 0.015AB - 0.020AC - 0.018BC - 0.24A^2 - 0.14B^2 - 0.088C^2$$

$$R_2 = 73.81 - 6.17A - 4.80B + 0.46C - 5.65AB - 1.67AC - 0.99BC - 7.86A^2 - 7.99B^2 - 4.15C^2$$

表3 响应面实验设计与结果

Table 3 Experimental design and results for response surface analysis

序号 No.	压力 Pressure (MPa)	温度 Temperature (°C)	时间 Time (h)	提取率 Extraction yield (%)	萜烯相对含量 Relative terpene content (%)
1	1(14)	1(50)	0(1.5)	1.56	40.91
2	0(12)	0(45)	0	1.66	74.44
3	0	-1(40)	-1(1)	1.53	67.39
4	1	0	-1	1.71	55.31
5	-1(10)	0	1(2)	0.92	64.95
6	0	0	0	1.66	74.93
7	0	0	0	1.67	72.15
8	0	0	0	1.65	73.93

续表 3 (Continued Tab. 3)

序号 No.	压力 Pressure (MPa)	温度 Temperature (°C)	时间 Time (h)	提取率 Extraction yield (%)	萜烯相对含量 Relative terpene content (%)
9	1	-1	0	1.49	61.88
10	0	1	1	1.37	57.92
11	0	-1	1	1.24	65.49
12	-1	-1	0	0.98	63.71
13	0	1	-1	1.59	55.87
14	-1	0	-1	1.25	70.18
15	1	0	1	1.46	56.75
16	0	0	0	1.65	73.58
17	-1	1	0	1.11	65.35

2.2.2 提取率方差分析结果

提取率的方差分析见表 4。

表 4 提取率方差分析

Table 4 Variance analysis of extraction rate

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	1.03	9	0.11	724.62	< 0.000 1	***
A-压力 Pressure	0.48	1	0.48	3041.99	< 0.000 1	***
B-温度 Temperatur	0.019	1	0.019	120.44	< 0.000 1	***
C-时间 Time	0.15	1	0.15	940.80	< 0.000 1	***
AB	9×10^4	1	9×10^4	5.70	0.048 3	*
AC	1.600×10^3	1	1.600×10^3	10.14	0.015 4	*
BC	1.225×10^3	1	1.225×10^3	7.76	0.027 1	*
A ²	0.23	1	0.23	1476.15	< 0.000 1	***
B ²	0.080	1	0.080	506.12	< 0.000 1	***
C ²	0.032	1	0.032	205.38	< 0.000 1	***
残差 Residual	1.105×10^3	7	1.579×10^4			
失拟项 Lack of fit	8.250×10^4	3	2.750×10^4	3.93	0.109 7	
纯误差 Pure error	2.800×10^4	4	7.000×10^4			
总变异 Cor total	1.031	16				

$R^2 = 0.998 9$ $R^2_{Adj} = 0.987 5$

注: *** 差异超极显著 ($P < 0.000 1$); ** 差异极显著 ($P < 0.01$); * 差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: *** has extremely significant difference ($P < 0.000 1$); ** the difference is extremely significant ($P < 0.01$); * significant difference ($P < 0.05$).

由表 4 可知: $P < 0.000 1$, 模型是显著, 失拟项为 0.109 7 不显著, 说明方程具有良好的拟合度; 同时校正后修复系数 $R^2_{Adj} = 0.987 5$, 说明有 98.75% 的响应值变化可以被模型解释, 相关系数 $R^2 = 0.998 9$, 说明松针精油提取率与预测值非常接近, 拟合度高, 可以用来分析和预测松针精油的提取率

的大小。由此可以看出, A、B、C、A²、B²、C² 为极显著项, AB、AC、BC 为显著项。

从图 5 可知, 萃取压力与萃取时间的交互作用最大, 其次是萃取温度与时间, 影响最小的是萃取压力与萃取温度。主要体现在三维响应面图中的曲线有较大的坡度, 曲线较陡, 即对试验结果更显著; 其

次等高线呈椭圆形且密度较小,说明具有显著性^[19]。利用拟合方程确定最佳工艺条件,当萃取压力为 12.97 MPa,萃取温度为 45.53 °C,萃取时间为 1.85 h 时,松针精油的提取率达到最大值为 1.77%,此时萜烯的相对含量为 65.65%。

2.2.3 萜烯相对含量方差分析结果

萜烯相对含量方差分析见表 5。

由表 5 可知: $P < 0.0001$,模型是显著,失拟项为 0.4923 不显著,说明方程具有良好的拟合度;同时校正后修复系数 $R_{Adj}^2 = 98.65\%$,说明有 98.65% 的

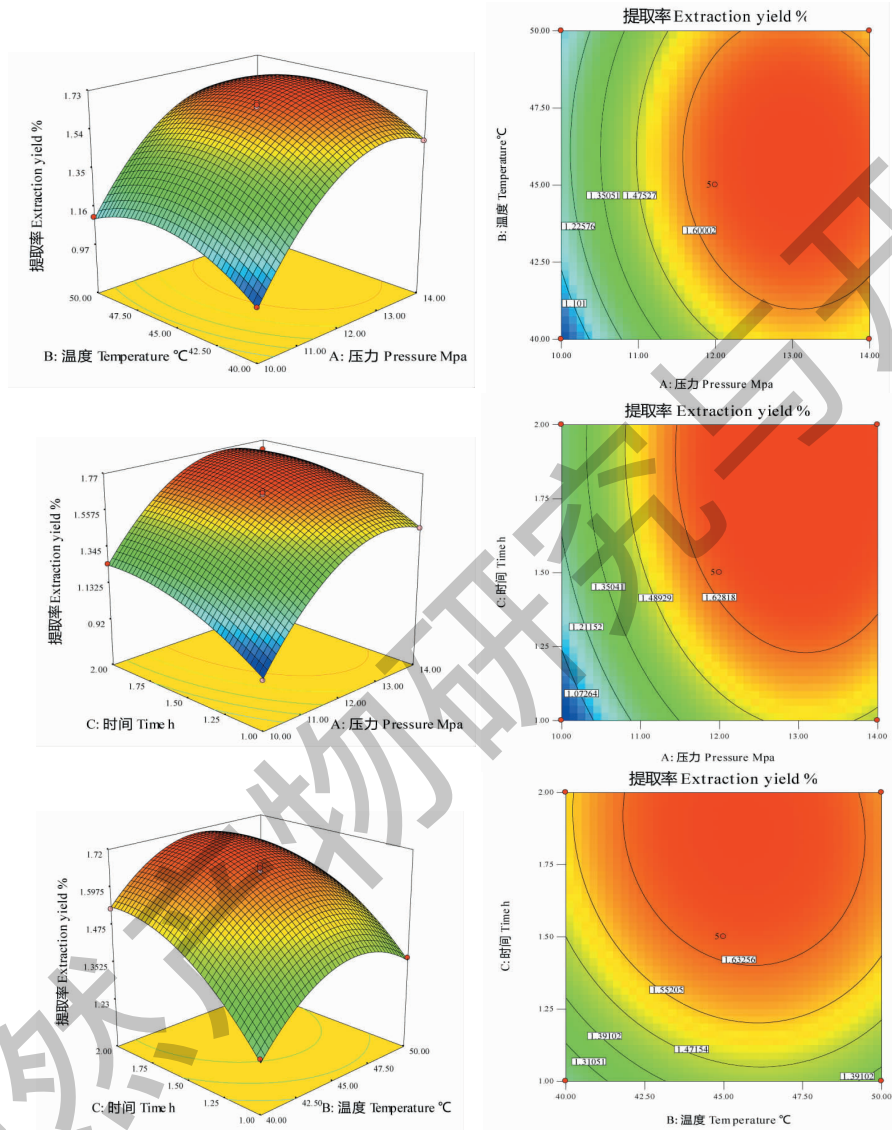


图 5 3 因素交互作用对松针精油提取率的影响

Fig. 5 Effect of interaction of 3 factors on extraction rate of pine needles

响应值变化可以被模型解释,相关系数 $R^2 = 0.9941$,说明松针精油提取率与预测值非常接近,拟合度高,可以用来分析和预测松针精油的提取率的大小。由此可以看出,A、B、C、AB、 A^2 、 B^2 、 C^2 为极显著项,AC 为显著项,BC 为不显著。

由图 6 可知,萃取压力与萃取温度的交互作用最大,其次是萃取压力与时间,萃取温度与萃取时间没有交互作用。利用拟合方程确定最佳工艺条件,

当萃取压力为 11.32 MPa,萃取温度为 44.05 °C,萃取时间为 1.57 h 时,松针精油的中萜烯的相对含量达到最大值为 75.34%,此时,松针精油的提取率为 1.55%。

2.2.4 最终优化参数的确定及验证

根据响应值的模型,对实验结果进行优化,使用 Design-Expert 8.0.6 软件中的优化方法,本文的目的是尽可能的使松针精油提取率最大的同时萜烯相对

含量也能达到最大值,来选择最佳的萃取条件。由响应面分析可知,松针精油提取率的最大值与萜烯相对含量的最大值不一致,因此,使用 Design-Ex-

pert8.0.6 软件中的优化程序,建立了最佳的优化方案,设定的优化参数见表 6,优化结果见图 7。

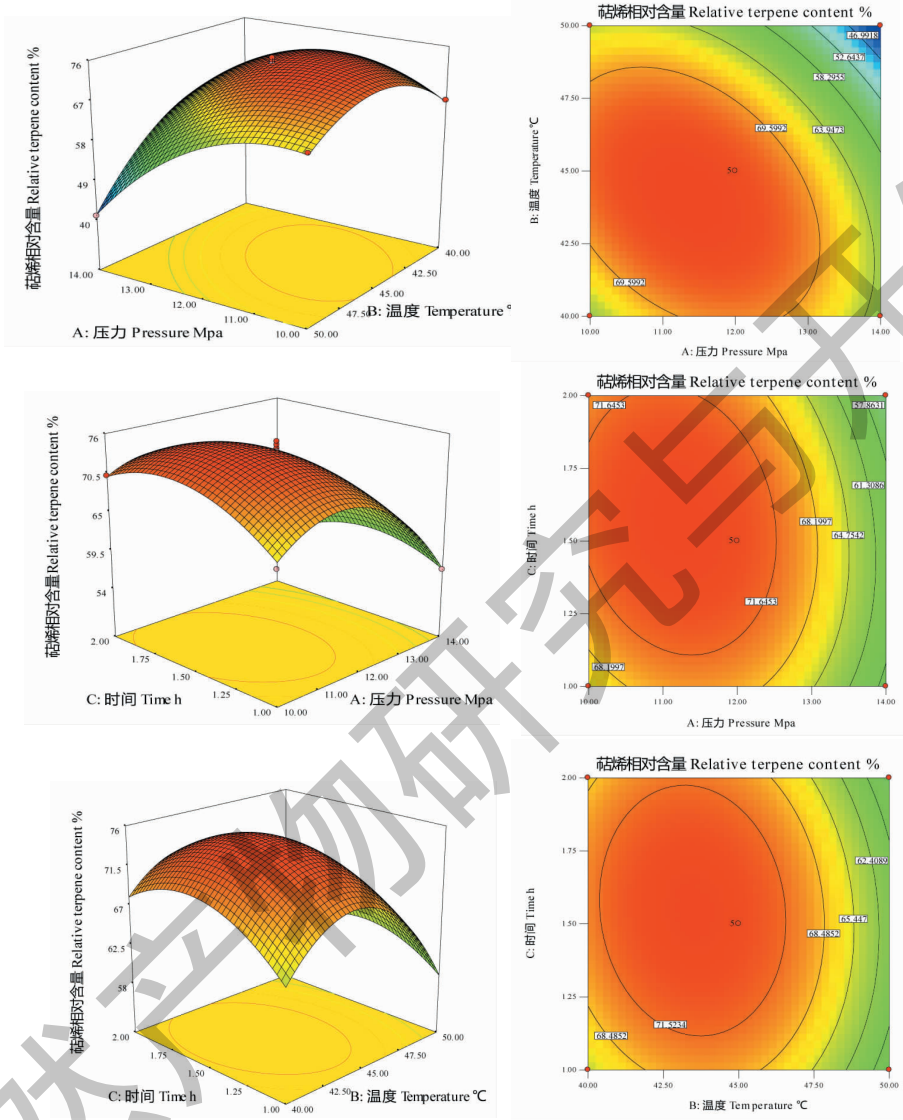


图 6 3 因素交互作用对萜烯相对含量的影响

Fig. 6 Effect of interaction of 3 factors on relative content of terpene

表 5 萜烯相对含量方差分析

Table 5 Relative terpene content of extraction rate

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	1 298.39	9	144.27	131.12	< 0.000 1	* * *
A-压力 Pressure	304.30	1	304.30	276.58	< 0.000 1	* * *
B-温度 Temperat	184.51	1	184.51	167.70	< 0.000 1	* * *
C-时间 Time	1.66	1	1.66	1.51	0.259 5	* * *
AB	127.80	1	127.80	116.16	< 0.000 1	* * *

续表 5 (Continued Tab. 5)

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
AC	11.12	1	11.12	10.11	0.015 5	*
BC	3.9	1	3.9	3.55	0.101 7	
A ²	259.91	1	259.91	236.23	< 0.000 1	***
B ²	268.58	1	268.58	244.11	< 0.000 1	***
C ²	72.58	1	72.58	65.96	< 0.000 1	***
残差 Residual	7.70	7	1.10			
失拟项 Lack of fit	3.23	3	1.08	0.96	0.492 3	
纯误差 Pure error	4.47	4	1.12			
总变异 Cor total	1306.09	16				

$R^2 = 0.9941$ $R_{Adj} = 0.9865$

注: *** 差异超极显著 ($P < 0.000 1$); ** 差异极显著 ($P < 0.01$); * 差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: *** has extremely significant difference ($P < 0.000 1$); ** the difference is extremely significant ($P < 0.01$); * significant difference ($P < 0.05$).

表 6 使用 Design Expert 8.0.6 设置 RSM 优化中的自变量和相应函数

Table 6 Set values of independent variables and corresponding values of functions in the RSM optimization using Design Expert 8.0.6

名字 Name	目标 Goal	最低限值 Lowest limit	最高限值 Upper limit	权重 Upper weight	重要性 Importance
A 萃取压力 Extraction pressure (MPa)	范围内 In range	10	14	1	3
B 萃取温度 Extraction temperature (°C)	范围内 In range	40	50	1	3
C 萃取时间 Extraction time (h)	范围内 In range	1	2	1	3
提取率 Extraction yield (%)	最大 Maximize	0.92	2	1	4
萜烯相对含量 Relative terpene content (%)	最大 Maximize	40.91	80	1	4

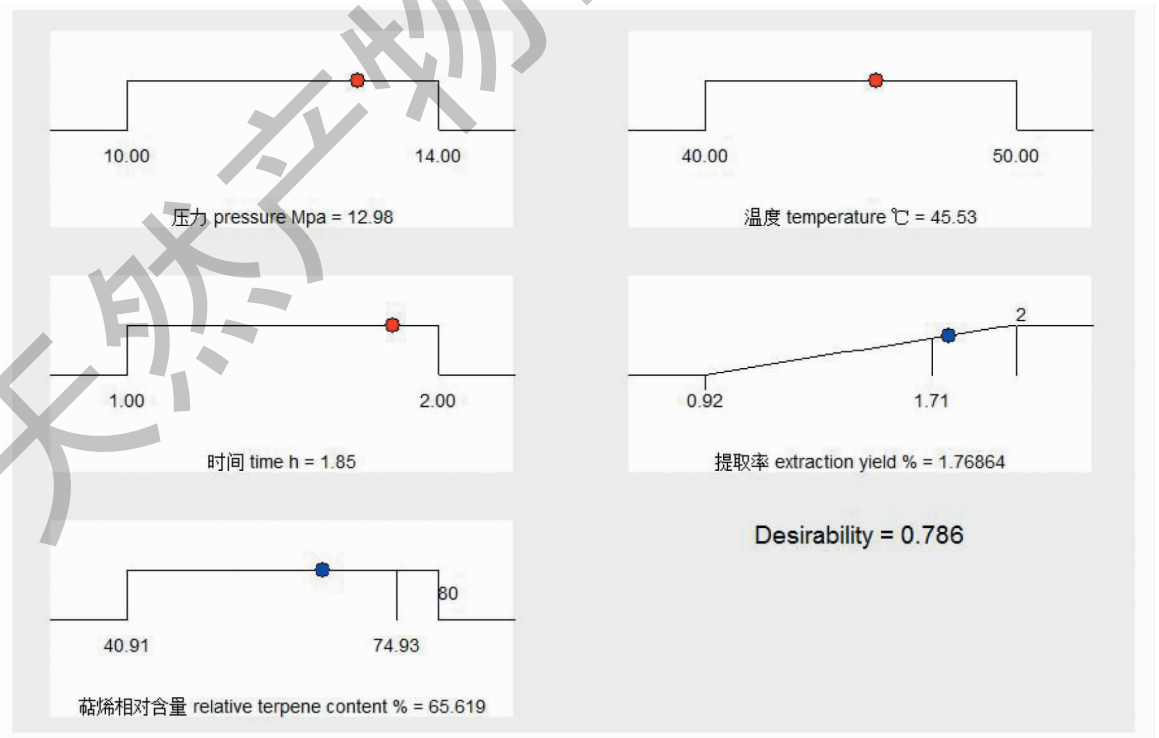


图 7 数值优化法实验结果

Fig. 7 Results of numerical optimization

由图 7 可知,最佳的方案为:萃取压力 12.22 MPa,萃取温度为 44.24 °C,萃取时间为 1.69 h,此时,松针精油的提取率为 1.71%,萜烯相对含量为 72.63%。综合考虑试验条件,将其调整为:萃取压力 12 MPa,萃取温度 44 °C,萃取时间 1.7 h;对该条件进行验证,得到松针提取率为 1.71% ± 0.092%,萜烯相对含量为 72.38% ± 1.14%。与回归方程的

预测值接近,因此该模型具有合理性,可以对试验进行分析。

2.3 松针精油成分分析

松针精油 GC-MS 分析总离子流图见图 8。

采用的峰面积归一化法对松针精油的组分及相对含量进行分析,结果见表 7。

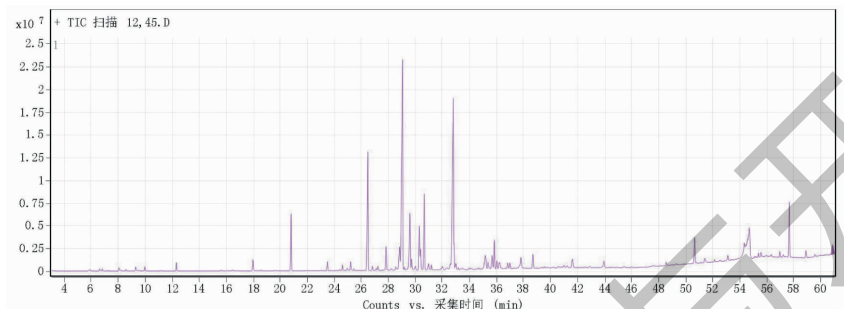


图 8 松针精油的总离子流图

Fig. 8 Total ion flow of pine needle essential oil

表 7 红松松针精油的化学成分及相对峰面积

Table 7 Chemical composition and relative peak area of pine needle essential oil

编码 Code	t_R (min)	化合物名称 Compound name	分子式 Molecular formula	分子质量 Molecular mass	相对百分含量 Relative percentage content (%)
1	9.296	萜烯 3-Carene	C ₁₀ H ₁₆	136.1	0.32
2	9.976	萜烯 D-Limonen	C ₁₀ H ₁₆	136.1	0.26
3	12.311	萜烯 (+)-4-Carene	C ₁₀ H ₁₆	136.1	0.53
4	17.978	乙醇,2-苯氧基 Ethanol,2-phenoxy-	C ₈ H ₁₀ O ₂	138.1	0.63
5	20.999	乙酸冰片酯 Bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.1	2.59
6	23.482	萜澄茄烯 Cubebene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	0.66
7	24.595	依兰油烯 Ylangene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	0.42
8	25.198	大根香叶烯 D Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	204.2	0.71
9	26.474	石竹烯 Caryophyllen	C ₁₅ H ₂₄	204.2	10.05
10	26.814	古巴烯 Copaene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	0.32
11	27.216	香橙烯 Aromandendrene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	0.33
12	27.827	丁香烯 Humulene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	1.86
13	28.213	β-古巴烯 beta. -copaene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	0.23
14	28.824	γ-依兰油烯 gamma. -Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	2.41
15	29.04	1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene, octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1- methylethyl)-, [3aS-(3a.alpha.,3b.beta., 4.beta.,7.alpha.,7aS*)]-萜澄茄油萜	C ₁₅ H ₂₄	204.2	21.38
16	29.589	γ-榄香烯 gamma. -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	5.57
17	29.713	α-依兰油烯 alpha. -Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	0.89
18	29.984	异喇叭烯 Isoledene	C ₁₅ H ₂₄	204.2	0.43

续表 7 (Continued Tab. 7)

编码 Code	t_R (min)	化合物名称 Compound name	分子式 Molecular formula	分子质量 Molecular mass	相对百分含量 Relative percentage content(%)
19	30.277	β -依兰油烯 beta.-Muurolene	$C_{15}H_{24}$	204.2	3.53
20	30.37	4-(4-羟基苯基)-2-丁酮 2-Butanone, 4-(4-hydroxyphenyl)-	$C_{15}H_{26}O$	222.2	1.05
21	30.656	喇叭醇 Ledol	$C_{15}H_{24}$	204.2	3.13
22	30.965	τ -杜松醇 tau.-Cadinol	$C_{15}H_{26}O$	222.2	0.51
23	31.174	萘, 1,2,4a,5,6,8a-六氢-4,7-二甲基-1-异丙基萘 Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.)]-	$C_{15}H_{24}$	204.2	0.34
24	32.342	胡萝卜醇 Carotol	$C_{15}H_{26}O$	222.2	0.35
25	32.566	兰桉醇 (-)-Globulol(-)-	$C_{15}H_{26}O$	222.2	0.43
26	32.798	异喇叭烯 Isoledene	$C_{15}H_{26}O$	222.2	20.33
27	32.991	氧化石竹烯 Caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	220.2	0.66
28	35.163	杜松醇 alpha.-Cadinol α -	$C_{15}H_{26}O$	222.2	1.36
29	35.364	表蓝桉醇 alpha.-Epiglobulol α	$C_{15}H_{26}O$	222.2	0.57
30	35.674	杜松醇 beta.-Cadinol β -	$C_{15}H_{26}O$	222.2	0.89
31	35.836	(Z)-5-戊烯-7-炔 5-Pentadecen-7-yne, (Z)-	$C_{15}H_{26}$	206.2	1.31
32	36.021	异芳香烃氧化物 Alloaromadendrene oxide-(1)	$C_{15}H_{24}O$	220.2	0.44
33	36.199	β -表蓝桉醇 beta.-Epiglobulol	$C_{15}H_{26}O$	222.2	0.68
34	36.825	12 甲基, 1,5,9,11-十三碳四烯 1,5,9,11-tridecatetraene, 12-methyl-(E,E)	$C_{15}H_{24}O$	220.2	0.32
35	36.988	顺式 Z- α -环氧红没药烯 cis-z. alpha.-bisabolene epoxide	$C_{15}H_{26}O$	222.2	0.53
36	38.689	1-((1s,3ar,4r,7s,7as)-4-羟基-7-异丙基-4-甲基八氢-1h-茚-1-基)乙酮 1-((1S,3aR,4R,7S,7aS)-4-Hydroxy-7-isopropyl-4-methyloctahydro-1H-inden-1-yl) ethanone	$C_{15}H_{26}O_2$	238.2	0.85
37	40.567	1-萘甲酸, 5-[2-(3-呋喃基)乙基] 十氢-1,4a-二甲基-6-亚甲基-, [1s-(1a,4ab,5b,8aa)] 1-Naphthalenecarboxylic acid, 5-[2-(3-furanyl) ethyl] decahydro-1,4a-dimethyl-6-methylene-, [1R-(1.alpha.,4a.beta.,5.beta.,8a.alpha.)]-	$C_{20}H_{28}O_3$	316.2	0.66
38	40.992	香澄烯氧化物(1) Aromadendrene oxide-(1) 2,6,10,14-己二酮-1-醇, 3,7, 11,15-四甲基-, 乙酸, (Z,E,E)	$C_{15}H_{24}O$	220.2	0.26
39	47.61	2,6,10,14-Hexadecatetraen-1-ol, 3,7, 11,15-tetramethyl-, acetate, (Z,E,E)	$C_{20}H_{28}O_3$	316.2	0.23
40	48.553	异芳香烃氧化物(2) Alloaromadendrene oxide-(2)	$C_{21}H_{34}O_3$	334.3	0.19
41	50.656	桑柏醇 Thunbergol	$C_{20}H_{34}O$	290.3	1.38
42	51.414	1-萘甲酸, 5-[2-(3-呋喃基)乙基] 十氢-1,4a-二甲基-6-亚甲基-, [1s-(1a,4ab,5b,8aa)] 1-Naphthalenecarboxylic acid, 5-[2-(3-furanyl) ethyl] decahydro-1,4a-dimethyl-6-methylene-, [1R-(1.alpha.,4a.beta.,5.beta.,8a.alpha.)]-	$C_{20}H_{28}O_3$	316.2	0.49
43	53.115	雄甾-17-酮, 3-乙基-3-羟基-, (5. α .) Androstan-17-one, 3-ethyl-3-hydroxy-, (5.alpha.)-	$C_{21}H_{34}O_2$	318.3	0.36

续表 7 (Continued Tab. 7)

编码 Code	t _R (min)	化合物名称 Compound name	分子式 Molecular formula	分子质量 Molecular mass	相对百分含量 Relative percentage content(%)
44	54.336	七-醇 1-Heptatriacotanol	C ₃₇ H ₇₆ O	536.6	0.71
45	55.38	异香橙烯环氧化物 isoaromadendrene epoxide	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316.2	0.15
46	55.558	二氢异硫醇-甲醇酯 Dihydro-isosteviol methyl ester	C ₂₁ H ₃₄ O ₃	334.3	0.32
47	56.965	2H-吡喃,2-(7-庚二酰氧基)四氢 2H-Pyran,2-(7-heptadecyloxy) tetrahydro-	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	336.3	0.32
48	57.212	七-醇 1-Heptatriacotanol	C ₃₇ H ₇₆ O	536.6	0.27

通过 GC-MS 分析,从松针精油的总离子流图(图 8)可见,共分离出 53 个离子峰,通过 NIST 14 质谱库的检索,共鉴定出 48 种主要成分见表 7,采用峰面积归一化估计出相对含量,占总色谱峰面积的 92.21%。其中萜烯类物质的相对含量为 73.55%,醇类物质的相对含量为 10.91%,酮类物质的相对含量为 3.8%,酯类物质的相对含量为 2.91%,还有 1.04%的萜烯类的氧化物。萜烯类物质中相对含量较高的为萆澄茄油萜(21.38%)、异喇叭烯(20.33%)、石竹烯(10.05%)、 γ -榄香烯(5.57%)。其中的萆澄茄油萜对常见的致病菌,如:金黄色葡萄球菌/大肠杆菌和沙门氏菌有抑制作用;石竹烯可以作为香料及药物的合成体^[20]。

3 结论

采用超临界 CO₂ 萃取技术对红松松针精油进行萃取,在单因素试验的基础上,利用 Design-Expert 软件,选择 Box-Behnken 试验设计法对松针精油提取率和萜烯相对含量工艺进行设计并优化。结果表明:3 种交互作用对松针精油的提取率均有显著性影响,AB、AC 的交互作用对萜烯相对含量均有显著影响。利用响应面分析方法所建立的数学模型对萃取工艺优化的结果为:萃取压力 12 MPa,萃取温度 44 °C,萃取时间 1.7 h,在此条件下得到松针精油提取率为 1.71% ± 0.092%,萜烯相对含量为 72.38% ± 1.14%,与预测值一致。采用 GC-MS 对超临界 CO₂ 萃取松针精油进行成分分析,鉴定出 48 种化合物,占总萃取物的 92.21%;其中的主要成分是萆澄茄油萜、异喇叭烯、石竹烯等化合物,并对松针精油所得成分进行分类,为接下来研究松针精油的抑菌效果提供了一些参考依据。

参考文献

1 Fan ZX, Zhang YD, Zhang H, et al. Study on the antioxidant

and antibacterial activities of essential oil of Korean pine needle[J]. J Beijing Forest Univ (北京林业大学学报), 2017, 39(8):98-103.

- Zhang JH. Study on Extraction and application performance of platycladus oriental essential oil[D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2017.
- Zhang X, Sun AD. Research progress on pine needle extract [J]. Chin Food Nutrit (中国食物与营养), 2009, 9:23-25.
- Bai J, Wu Y, Liu X, et al. Antibacterial activity of shikimic acid from pine needles of cedrus deodara against staphylococcus aureus through damage to cell membrane [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16:27145-27155.
- Apetrei CL, Tuchilus C, Aprotosoia AC, et al. Chemical, antioxidant and antimicrobial investigations of pinus cembra L. bark and needles [J]. Mol, 2011, 16:7773-7788.
- Yu J, Su J, Li F, et al. Identification and quantification of pine needle essential oil from different habitats and species of china by GC-MS and GC method [J]. Afr J Tradit Com Altern Med. , 2017, 14(6):1-9.
- Wu TQ, Zhang X, Zhang Z, et al. Ultrasonic-assisted extraction of bio-inhibitors from Korean pine needles [J]. China Forest Deputy Spec (中国林副特产), 2018, 153(2):1-4.
- Zhang Z, Guo S, Liu X. Synergistic antitumor effect of α -pinene and β -pinene with paclitaxel a gainst non-small-cell lung [J]. Drug Res, 2014, 65:181-191.
- Tumen I, Akkol E, Tastan H, et al. Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine (pinuspinaster-ait) [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 211:235-246.
- Tian G, Li ST, Zhao XJ. Optimization of extraction conditions of grape seed oil with supercritical CO₂ fluid [J]. Henan Chem (河南化工), 2015, 32(10):25-28.
- Silva RPD, Rocha-asantos TA, Duarte AC. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds [J]. Trend Anal Chem, 2016, 76:40-51.
- Yilmaz EE, Özvural EB, Vural H. Extraction and identifica-

- tion of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis vinifera*) using supercritical carbon dioxide [J]. *J Supercrit fluids*, 2011, 55:924-928.
- 13 Shi XF, Ren LM. Advances in supercritical CO₂ extraction of peony seed oil [J]. *Food Processing (食品加工)*, 2016, 41(6):47-54.
 - 14 Fu FH, Pan ZP, Xie QT, et al. Optimization of supercritical CO₂ process for the removal of terpenes from red orange oil [J]. *Hunan Agri Sci (湖南农业科学)*, 2016, 8:82-85.
 - 15 Zuknik MH, Norulaini NAN, Wan WS, et al. Solubility of virgin coconut oil in supercritical carbon dioxide [J]. *J Food Eng*, 2016, 168:240-244.
 - 16 Dai L, Dan YH, Wang ZX, et al. Optimization of supercritical CO₂ extraction process for rose essential oil [J]. *Food Ind Tech (食品工业科技)*, 2015, 3:266-269.
 - 17 Li YJ, Zhao RF, Li D. Study on supercritical CO₂ extraction of soybean oil [J]. *Food Ind Tech (食品工业科技)*, 2014, 5:206-212.
 - 18 Wang P. Study on supercritical CO₂ extraction of red pine kernel oil and its anti-aging function [D]. Harbin: Northeast Forestry University (东北林业大学), 2003.
 - 19 Fan ZX, Yuan S, Wang ZY. Study on extraction of Korean pine essential oil by response surface optimization and high shear emulsification [J]. *J Beijing Forest Univ (北京林业大学学报)*, 2015, 37:109-114.
 - 20 Li BC, Chen XP, Xiao WJ, et al. Extraction and GC-MS analysis of essential oil from pinus massoniana needles [J]. *Anhui Agri Sci (安徽农业科学)*, 2010, 38:4981-4983.

(上接第 8 页)

- 5 Liu MH, Ren MP, Chen JP, et al. Study on the antitumor activity of astragaloside saponins [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2009, 25(2):68-70.
- 6 Zhang W, Jiang Sh, Qian DW, et al. Study on the interaction between mangiferin and human intestinal bacteria [J]. *Acta Pha Sin (药理学学报)*, 2014, 8:1162-1168.
- 7 Yao XL, Pei CY, Wang ZQ. Content determination of isoflavone glucoside and formononetin in radix *Astragalus* from different producing areas and different harvesting periods and decoction pieces [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2012, 5:797-801.
- 8 Ma YL, Zhao HQ, Wang XY, et al. Systematic cluster analysis of *Astragalus* from different habitats [J]. *Acta Chin Med Pharmacol (中医学报)*, 2003.
- 9 Duan QM, Liang ZS, Yang DF, et al. Quality difference analysis of *Astragalus* from different regions [J]. *J Northwest A&F Univ: Nat Sci (西北农林科技大学学报: 自科版)*, 2010, 38:187-191.
- 10 Liu XQ, Li J, Xue HY, et al. Analysis on the content of isoflavone glucoside in *Astragalus* root slices prepared from different sources and grades [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2013, 5:874-880.
- 11 Shi ZY, Bao Zh, Jiang Yong, et al. Quantitative analysis of isoflavone glucoside and formononetin in *Astragalus* from different sources [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2007, 32:779-783.
- 12 Cao JJ. Effects of astragalus germplasm resources and environmental factors on quality [D]. Yangling: Northwest A&F University (西北农林科技大学), 2006.
- 13 Wang N, Gao J, Tang ZhSh, et al. Research progress on physiological ecology, quality and environment of *Astragalus membranaceus* [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2017.
- 14 Yu KZ, Liu J, Hong H, et al. Investigation and study of astragalus plantation origin, ecological environment and decoction specification [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2010, 35:1112-1115.
- 15 Wang YR, Guo QSh, Shao QS, et al. Effects of soil factors on the content of active ingredients in medicinal white chrysanthemum [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2010, 35:676-681.