

茶树花超临界 CO₂ 萃取工艺优化 及萃取物 GC-MS 分析^①

傅丽亚¹, 刘姝娟², 马梦君¹,
罗理勇^{1,3}, 曾 亮^{1,3}

1. 西南大学 食品科学学院, 重庆 400716; 2. 湖南省茶叶研究所, 长沙 410013;
3. 西南大学 茶叶研究所, 重庆 400716

摘要: 优化超临界 CO₂ 萃取茶树花工艺, 并对其萃取物进行 GC-MS 检测及定性定量分析. 考察萃取压力、温度和流量 3 个因素对茶树花萃取物得率的影响, 通过正交试验优化得到的最佳工艺条件为萃取压力 25 MPa, 萃取温度 40 ℃, CO₂ 流量 25 kg/h, 实际得率为 1.36%±0.09%. 经极差分析各因素的影响力由大到小为流量、压力、温度. 通过 GC-MS 检测结合保留指数判定, 初步鉴定出 97 种化合物, 分别是烷烃类 33.85%, 酯类 8.49%, 醛类 2.35%, 酮类 5.95%, 醇类 2.86%, 羧酸类 31.18%, 萜烯类 8.16% 及其他 7.16%.

关键词: 茶树花; 超临界 CO₂ 萃取; 气相色谱-质谱法; 保留指数

中图分类号: TS272.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)04-0123-09

茶树花(*Camellia sinensis* L.), 属完全花, 两性虫媒花, 花瓣一般呈白色, 少数呈淡黄色或粉红色, 开花时间为当年 10 月至次年 2 月^[1]. 据统计, 成龄茶园每 666.7 hm² 可采鲜花 200 kg 以上, 全国可采集鲜花 5 000 kt 左右^[2]. 茶树花是一种无需重新栽培、储量丰富、可再生的天然资源, 具有“寿命短、花期长、开花多、结实少”的特点. 茶树花自身含有丰富的营养和功能成分^[3], 如氨基酸^[4]、蛋白质^[5]、茶多酚^[6-8]、茶多糖、过氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、咖啡碱、维生素、微量元素等. 茶树花的抗氧化性与迷迭香相当^[9], 同时具有解毒、抑菌、降糖、延缓衰老、防癌抗癌和增强免疫力等功效^[9], 这些功能性将大力扩大茶树花的应用和发展空间.

植物精油的提取方法包括有机溶剂浸提法^[10]、水蒸汽蒸馏法^[11]、同时蒸馏萃取法、微波辅助萃取法^[12]、亚临界水萃取法(CSWE)^[13]和超临界 CO₂ 萃取法. 超临界 CO₂ 萃取技术利用流体临界点以上的某区域所具有的高渗透性、高扩散性和高溶解能力, 被广泛用于调味品、天然色素和传统中药有效成分的提取上. 超临界 CO₂ 萃取能保证有效成分不受热分解的影响, 且具有提取率高、纯度高、无溶剂残留及无污染的特点^[14], 所以超临界 CO₂ 萃取方法适合于提取茶树花精油等天然产物. 采用 GC-MS 结合保留指数的方式对茶树花萃取物中的挥发性成分进行定性定量分析可明显提高样品挥发性成分体系中定性分析的准确性和可靠性.

本文以真空冷冻干燥的茶树花为试验材料, 采用超临界 CO₂ 萃取法萃取茶树花香气成分, 并通过单因

① 收稿日期: 2014-05-08

基金项目: 国家自然科学基金(31100500); 重庆市科委自然科学基金(cstc2013jcyjA80021); 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2013B036).

作者简介: 傅丽亚(1988-), 女, 浙江宁波人, 硕士研究生, 主要从事茶树花相关产品的研究.

通信作者: 曾 亮, 副教授, 博士.

素试验与正交试验研究了各个因素对茶树花萃取物得率的影响,确定了萃取的最佳工艺条件,并通过 GC-MS 分析与 RI 值检索对超临界 CO₂ 萃取茶树花萃取物进行定性定量分析.

1 材料与方法

1.1 材 料

茶树花:2012 年 11 月采集自四川省峨眉山市茶树群体品种的茶树花鲜花,经真空冷冻干燥后冷藏保存备用.

1.2 试剂与仪器

二氯甲烷(色谱纯),成都市科龙化工试剂厂;无水乙醇(分析纯),成都市科龙化工试剂厂;99.5% CO₂,重庆北碚兴业气体有限责任公司;C₁₀—C₂₅ 正构混标烷烃(16 组分)标准品,美国 o2si 公司,上海安谱科学仪器有限公司代购;正辛烷与正壬烷(GC,≥99.5%),上海晶纯实业有限公司;其余试剂均为市售分析纯,实验用水均为蒸馏水.

GC-MS 气相色谱-质谱联用仪,日本岛津公司;PWC124 分析天平,上海京工实业有限公司;HA 121-50-01(02)型超临界流体萃取设备,江苏南通市华安超临界萃取有限公司;Scientz-30ND 冷冻干燥仪器,宁波新芝生物科技股份有限公司;FA102 型微型植物粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;DHG-9030 电热恒温鼓风干燥箱,上海齐欢科学仪器有限公司;其余均为实验室常用玻璃器皿.

1.3 方 法

1.3.1 材料预处理

采摘群体品种的茶树鲜花,−60 ℃真空冷冻干燥约 48 h,经高速粉碎机粉碎,过 40 目筛,密封冷藏保存备用.

1.3.2 工艺流程

茶树花→真空冷冻干燥→粉碎→过筛(40 目)→测定质量→装料密封→升温、升压至萃取条件→超临界 CO₂ 萃取→茶树花萃取物

超临界 CO₂ 萃取:称取茶树花 150 g 于 1 L 填料罐中,并在填料罐上端垫片下添加滤纸片,将填料罐放入萃取釜中密封.打开仪器电源、CO₂ 钢瓶气阀、萃取罐温度控制器并设定温度、循环阀及循环水电源,待温度稳定后打开进口阀,萃取罐气压达到和储罐相同压力时,改变调频器的频率,调节萃取罐至所需压力,先进行平衡 10~15 min 使得压力稳定.设置分离温度 35 ℃,调节分离压力 6 MPa,打开出口阀,用 CO₂ 流量计控制质量流量,萃取 2 h 后,用顶空进样瓶收集萃取物.

1.3.3 单因素试验

选择萃取压力、温度及 CO₂ 流量 3 个因素进行茶树花萃取工艺单因素试验.压力的 5 个梯度分别为 10,15,20,25,30 MPa,温度 45 ℃,CO₂ 流量 25 kg/h;温度的 5 个梯度分别为 35,40,45,50,55 ℃,压力 25 MPa,CO₂ 流量 25 kg/h;CO₂ 流量的 5 个梯度分别为 10,15,20,25,30 kg/h,压力 25 MPa,温度 40 ℃.每个试验 3 次重复.根据预试验结果,仪器设备在萃取压力 30 MPa 得到的数据比较稳定,大于 30 MPa 得到的数据不稳定;CO₂ 流量低于 35 kg/h 时得到的数据比较稳定,而高于 35 kg/h 则数据不稳定.

1.3.4 正交试验

根据单因素试验结果,以萃取压力、萃取温度、CO₂ 流量 3 个因素,每个因素 3 个水平,按 L₉(3³) 正交表设计,分离罐压力 6 MPa,分离温度 35 ℃,萃取时间 2 h,以所收集的茶树花萃取物得率为指标来评价提取参数的优化效果.

表 1 试验因素及水平表

因 素	水 平		
萃取压力/MPa	15	20	25
萃取温度/℃	40	45	50
CO ₂ 流量/(kg·h ^{−1})	15	20	25

1.4 数据处理

1.4.1 水分测定^[15]

称取过 40 目筛的茶树花 5 g 加入已恒质量的铝制烘皿中, 置于 103 °C ± 2 °C 的烘箱, 加热 4 h, 加盖取出, 于干燥器内冷却称量. 再置于烘箱内干燥 1 h, 冷却称量. 重复操作, 直至两次称量差不超过 0.005 g. 计算公式为

$$\text{水分} / \% = \frac{M_1 - M_2}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

其中: M_1 为试样和铝质烘皿烘前的质量(g); M_2 为试样和铝质烘皿烘后的质量(g); M_0 为试样的质量(g).

1.4.2 茶树花萃取物得率

分别称收集前后的顶空瓶的质量(g), 并按照公式(2)计算茶树花萃取物的得率:

$$\text{得率} / \% = \frac{M_2 - M_1}{m \times M_0} \times 100 \quad (2)$$

其中: m 为茶树花干燥样质量(g); M_0 为干质量占茶树花样比例(%); M_1 为顶空瓶收集萃取物前的质量(g); M_2 为顶空瓶收集萃取物后的质量(g).

1.5 茶树花萃取物 GC-MS 检测与分析

1.5.1 样品准备

20 μL 茶树花萃取物加入到装有 2 mL 二氯甲烷的顶空瓶中并密封冷冻保存.

1.5.2 GC-MS 条件

GC 条件: 色谱柱 DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 载气为高纯氦气(He), 柱前压为 50 kPa; 分流比 10 : 1; 进样量 1 μL; 升温程序: 柱温从 40 °C 开始, 保持 2 min, 以 5 °C/min 升温到 280 °C, 保持 5 min; 柱流量: 1.00 mL/min; 检测电压 350 V.

MS 条件: 标准谱图调谐; 电子电离源(EI); 检测器电压 830 eV; 离子源温度 230 °C; 溶剂延迟时间: 4.5 min; 电子能量 70 eV; m/z 扫描范围 40~400.

1.5.3 RI 的测定

正辛烷、正壬烷取 1 μL 用 25 mL 的容量瓶定容, 各取 2 mL 添加到加有 2 mL 10⁷ C₁₀—C₂₅ 的烷烃混标中, 以上述相同的 GC 条件进样分离, 记录 C₈—C₂₅ 各正烷烃的保留时间. 用线性升温公式计算各成分的 RI^[16-17], 计算公式为

$$RI = 100n + \frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n} \times 100 \quad (3)$$

其中: t_x 表示被分析组分的保留时间(min); t_n 表示碳原子为 n 的正烷烃($t_n < t_x$)的保留时间(min); t_{n+1} 表示碳原子为 $n+1$ 的正烷烃($t_x < t_{n+1}$)的保留时间(min).

1.5.4 数据处理及质谱检索

GC-MS-PC 联用检测得到的各组分峰采用峰面积归一法^[18-19]来确定各组分的相对含量. 各组分峰经计算机谱库(NIST05, NIST05s)检索, 对其鉴定流程为选取质谱匹配度最高物质, 对其进行相应的 RI 值检索, 以质谱匹配度与 RI 值匹配度最高的成分为最佳的鉴定结果^[20].

1.6 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件对结果进行统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 采用 origin 8.5 软件对结果做图形分析; 各组结果采用 Duncan 显著性差异测验进行单向方差分析, 显著水平小于 0.05.

2 结果与分析

2.1 萃取时间的确定

在研究过程中发现, 随着萃取时间的延长, 茶树花的水分、蛋白质等同时带出, 对分析结果造成很大的影响. 通过对比发现, 绝大部分的萃取物在 2 h 内被萃取出, 之后得到的萃取物含量极少, 故而选择 2 h

内收集的萃取物进行分析.

2.2 单因素试验结果

2.2.1 萃取压力对茶树花萃取物得率的影响

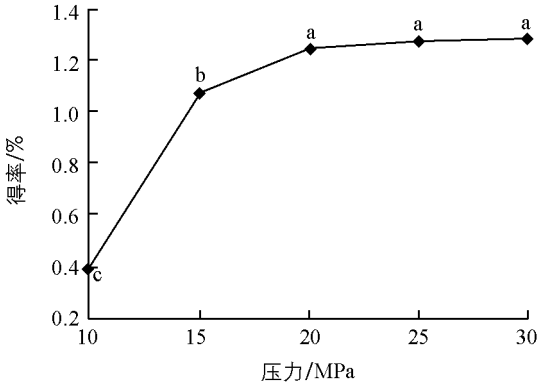
在萃取温度为 45 ℃, CO₂ 流量为 25 kg/h 的条件下, 试验研究了萃取压力为 10, 15, 20, 25, 30 MPa 时, 茶树花萃取物得率与压力之间的关系. 由图 1 可知, 随着萃取压力增大, 茶树花萃取物得率逐渐变大, 当压力增大到一定程度后, 得率不再随压力的变大而变大. 超临界 CO₂ 的萃取压力影响被萃取物的溶解度, 主要是由于压力的增加使得流体密度增大, 进而溶解力增强. 通过方差分析可知, 得率在 20 MPa 之前随着压力的增加而增加, 且达到显著水平. 压力在 20 MPa, 25 MPa 和 30 MPa 时, 萃取得率差异不显著, 从经济及安全方面来考虑, 压力过高会使得设备的成本增加, 且高压设备的安全因素存在不稳定性, 因此萃取压力选择 25 MPa.

2.2.2 萃取温度对茶树花萃取物得率的影响

在萃取压力为 25 MPa, CO₂ 流量为 25 kg/h 的条件下, 试验研究了萃取温度为 35, 40, 45, 50, 55 ℃ 时, 茶树花萃取物得率与温度之间的关系. 由图 2 可知, 在较低温度下, 随着萃取温度增加, 茶树花萃取物得率逐渐变大; 当温度达到一定值后, 得率达到最大值; 继续升高温度, 得率又逐渐变小. 随着温度的升高, CO₂ 流体的密度下降, 导致 CO₂ 流体的溶剂化效应下降, 从而使得萃取物在其中的溶解度下降^[21]. 如果温度过高, 低沸点的香气物质会大量损失, 萃取的都是高沸点香气物质, 降低了香气物质的总体品质. 通过方差分析: 得率在小于 40 ℃ 和大于 50 ℃ 时达到显著差异, 其他水平之间的变化不显著, 因此萃取温度选择 40 ℃.

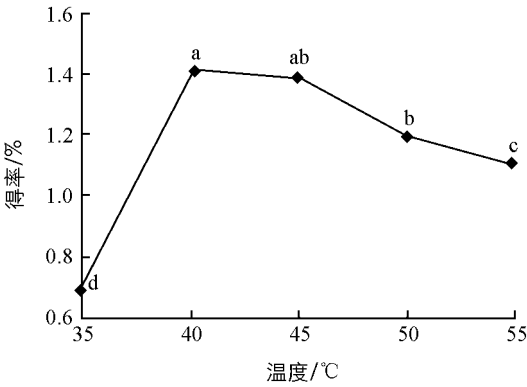
2.2.3 CO₂ 流量对茶树花萃取物得率的影响

在萃取压力为 25 MPa, 萃取温度为 40 ℃ 的条件下, 试验研究了 CO₂ 流量为 15, 20, 25, 30, 35 kg/h 时, 茶树花萃取物得率与 CO₂ 流量之间的关系. 由图 3 可知, 随着 CO₂ 流量的增加, 茶树花萃取物得率逐渐升高; 当 CO₂ 流量达到一定值后, 得率最大; 继续增大 CO₂ 流量, 得率减少; 而后虽然有升高趋势但效果不显著. CO₂ 流量增大到某一值后继续增大, 反而会导致萃取物得率的减少, 原因可能是萃取罐内 CO₂ 流速增加, 使 CO₂ 停留时间缩短, 从而使 CO₂ 与被萃取物的接触时间减少, 既增加了生产成本, 又降低了萃取率^[22]. 方差分析可知: 随着流量的增加, 得率先增加后下降再增加, 在后期随着 CO₂ 流量增加时萃取物得率的增加率不大. 20 kg/h 前后的水平都存在显著性差异, 其他 4 个水平之间的差异不明显, 因此 CO₂ 流量选择 20 kg/h.



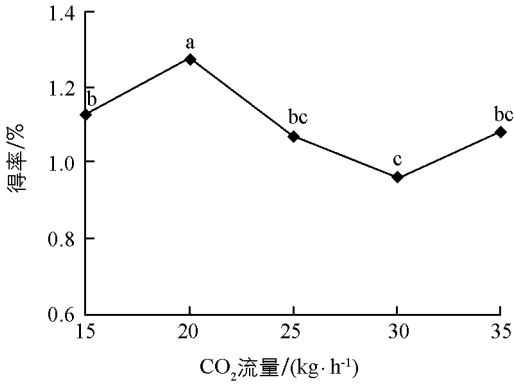
同一水平不同字母表示在 0.05 水平上差异有统计学意义.

图 1 压力影响示意图



同一水平不同字母表示在 0.05 水平上差异有统计学意义.

图 2 温度影响示意图



同一水平不同字母表示在 0.05 水平上差异有统计学意义.

图 3 CO₂ 流量影响示意图

2.3 正交试验及工艺优化

萃取压力 A 、萃取温度 B 、CO₂ 流量 C 的 $L_9(3^3)$ 正交设计表及直观分析见表 2, 方差分析结果见表 3.

表 2 $L_9(3^3)$ 正交表

试验号	A	B	C	得率/%
	压力/MPa	温度/℃	CO ₂ 流量/(kg · h ⁻¹)	
1	15	35	15	0.38±0.09h
2	15	40	20	1.07±0.03c
3	15	45	25	1.15±0.02b
4	20	35	20	0.62±0.04g
5	20	40	25	1.08±0.01c
6	20	45	15	0.72±0.02f
7	25	35	25	1.32±0.05a
8	25	40	15	1.03±0.02d
9	25	45	20	0.96±0.01e
k_1	2.60	2.32	2.13	
k_2	2.41	3.18	2.65	
k_3	3.30	2.83	3.54	
K_1	0.87	0.77	0.71	
K_2	0.80	1.06	0.88	
K_3	1.10	0.94	1.18	
R (极值)	0.30	0.29	0.47	
因素主次	$R_C > R_A > R_B$			
优化方案	$A_3 B_2 C_3$			

注：同一水平不同字母表示经 LSD 法检验在 0.05 水平上差异有统计学意义。

根据单因素的试验结果选择正交试验的各个因素和水平, 运用 SPSS 软件设计正交试验. 试验以萃取物得率为考察指标, 从中选取最佳萃取压力、萃取温度、CO₂ 流量的搭配方案, 确定超临界 CO₂ 法萃取茶树花萃取物的最佳工艺参数, 试验结果见表 2. 由极差分析结果可知最佳萃取条件为 $A_3 B_2 C_3$, 即萃取压力 25 MPa, 萃取温度 40 ℃, CO₂ 流量为 25 kg/h. 因素主次是 $R_C > R_A > R_B$, 即 CO₂ 流量对茶树花萃取物得率影响最大, 其次是萃取压力, 萃取温度对萃取物得率影响最小, 为进一步验证各因素对茶树花萃取物得率的显著性效果, 本试验进行了方差分析, 结果见表 3.

表 3 方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	sig [*]
校正模型	1.825 [*]	6	0.304	24.788	* *
截距	23.081	1	23.081	1 881.019	* *
A	0.438	2	0.219	17.828	* *
B	0.376	2	0.188	15.313	* *
C	1.012	2	0.506	41.224	* *
误差	0.245	20	0.012		
总计	25.152	27			
校正的总计	2.070	26			

注：* : $p < 0.05$; * * : $p < 0.01$; a. $R^2 = 0.881$ (调整 $R^2 = 0.846$).

由表 3 可知, 萃取压力、萃取温度及 CO₂ 流量 3 个因素对茶树花萃取物得率有显著性影响($p < 0.05$). 正交分析结果中各个因素均方为 $C(0.506) > A(0.219) > B(0.188)$, 表明 3 个因素对萃取得率影响由大到小顺序为 CO₂ 流量, 萃取压力, 萃取温度, 最佳萃取条件为 $A_3 B_2 C_3$, 与极差分析结果一致. 采用筛选出的最佳工艺参数条件进行试验, 茶树花萃取物的得率为 $1.36\% \pm 0.09\%$, 说明最后工艺优化得到的最佳工艺参数可行. 即: 萃取压力 25 MPa, 萃取温度 40 ℃, CO₂ 流量 25 kg/h. 同时, 最佳工艺参数条件与单因素试验中的温度因素条件(40 ℃)相同, 得率大小相当.

2.4 MS/RI 对超临界 CO₂ 萃取的茶树花萃取物香气成分的分析

采用超临界 CO₂ 萃取的茶树花萃取物是呈黄色且带有棕褐色的油状物，对其进行 MS 检测分析，结果见表 4。

表 4 香气成分及其质量分数

化 合 物	分子式	保留指数		质量分数/ %	鉴定方法 MS/RI
		<i>I</i> _{exp}	<i>I</i> _{lit}		
甲苯	C ₇ H ₈	<800	758.9	0.48	MS
亚异丙基丙酮	C ₆ H ₁₀ O	<800	792	0.12	MS
己醛	C ₆ H ₁₂ O	802	801	0.37	MS/RI
对二甲苯	C ₈ H ₁₀	867	865	0.07	MS/RI
2-庚酮	C ₇ H ₁₄ O	888	890	0.06	MS/RI
丙烯酸丁酯	C ₇ H ₁₂ O ₂	/	/	0.06	MS
壬烷	C ₉ H ₂₀	900	900	0.14	MS/RI
己酸	C ₆ H ₁₂ O ₂	990	990	0.64	MS/RI
2,2,4,6,6,-五甲基-庚烷	C ₁₂ H ₂₆	993	997	0.59	MS/RI
(E,E)-2,4-庚二烯醛	C ₇ H ₁₀ O	998	999	0.11	MS/RI
辛醛	C ₈ H ₁₆ O	1 001	1 001	0.09	MS/RI
α-苯乙醇	C ₈ H ₁₀ O	/	/	0.03	MS
苯乙酮	C ₈ H ₈ O	1 064	1 062	0.26	MS/RI
2-壬酮	C ₉ H ₁₈ O	1 090	1 091	0.05	MS/RI
芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	1 100	1 100	0.33	MS/RI
壬醛	C ₉ H ₁₈ O	1 103	1 103	0.11	MS/RI
苯乙醇	C ₈ H ₁₀ O	1 112	1 110	0.11	MS/RI
环氧芳樟醇氧化物	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	/	/	0.51	MS
癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	1 205	1 205	0.08	MS/RI
β-环柠檬醛	C ₁₀ H ₁₆ O	1 215	1 219	0.01	MS/RI
2,6,11-三甲基十二烷	C ₁₅ H ₃₂	/	/	0.06	MS
十四烷	C ₁₄ H ₃₀	1 400	1 400	0.26	MS/RI
α-紫罗酮	C ₁₃ H ₂₀ O	1 423	1 426	0.14	MS/RI
β-紫罗酮	C ₁₃ H ₂₀ O	1 479	1 477	0.33	MS/RI
β-环氧紫罗酮	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	1 482	1 473	0.11	MS/RI
十五烷	C ₁₅ H ₃₂	1 500	1 500	0.19	MS/RI
二氢猕猴桃内酯	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	1 530	1 520	0.28	MS/RI
7-甲基十五烷	C ₁₆ H ₃₄	/	/	0.44	MS
癸醚	C ₂₀ H ₄₂ O	/	/	0.06	MS
3-甲基十五烷	C ₁₆ H ₃₄	1 571	1 570	0.28	MS/RI
环十二烷	C ₁₂ H ₂₄	/	/	0.08	MS
邻苯二甲酸乙糠醇酯	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	/	/	0.07	MS
十六烷	C ₁₆ H ₃₄	1 600	1 600	1.47	MS/RI
紫丁香醇 A	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	/	/	0.13	MS
雪松醇	C ₁₅ H ₂₆ O	1 613	1 615	0.19	MS/RI
2,6,10-三甲基十五烷	C ₁₈ H ₃₈	/	/	0.24	MS
2,6,10,14-四甲基-十六烷	C ₂₀ H ₄₂	/	/	0.07	MS
十六醇	C ₁₆ H ₃₄ O	/	/	0.57	MS
十七烷	C ₁₇ H ₃₆	1 700	1 700	0.33	MS/RI
姥鲛烷	C ₁₉ H ₄₀	1 703	1 703	0.35	MS/RI
苯甲酸乙基己酯	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	/	/	0.11	MS
蛇麻烯	C ₁₅ H ₂₄	/	/	0.03	MS
肉豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1 759	1 761	0.23	MS/RI
α-柠檬烯双环氧化物	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	/	/	0.79	MS
二十三烯	C ₂₃ H ₄₆	/	/	0.06	MS
十八烷	C ₁₈ H ₃₈	1 800	1 800	0.17	MS/RI
植烷	C ₂₀ H ₄₂	1 807	1 806	0.26	MS/RI

续表 4

化 合 物	分子式	保留指数		质量分数/ %	鉴定方法 MS/RI
		<i>I</i> _{exp}	<i>I</i> _{lit}		
十六醛	C ₁₆ H ₃₂ O	/	/	0.04	MS
肉豆蔻酸异丙酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1 822	1 826	0.02	MS/RI
乙酸金合欢酯	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	1 831	1 834	0.03	MS/RI
咖啡因	C ₈ H ₁₀ N ₄ O	1841	1 840	4.52	MS/RI
二异丁基邻苯二甲酸酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	/	/	0.47	MS
叶绿醇	C ₂₀ H ₄₀ O	/	/	0.18	MS
水杨酸高孟酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	/	/	0.11	MS
十九烷	C ₁₉ H ₄₀	1 900	1 900	0.13	MS/RI
金合欢基丙酮	C ₁₈ H ₃₀ O	/	/	0.21	MS
十八醛	C ₁₈ H ₃₆ O	/	/	0.07	MS
棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1 924	1 921	0.23	MS/RI
邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	/	/	0.09	MS
十五碳酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	/	/	10.47	MS
棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1 978	1 975	0.01	MS/RI
棕榈酸乙酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1 992	1 992	0.68	MS/RI
二十烷	C ₂₀ H ₄₂	2 000	2 000	0.08	MS/RI
十七酸	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	2 060	2 068	0.10	MS/RI
二十一烷	C ₂₁ H ₄₄	2 100	2 100	2.97	MS/RI
植醇	C ₂₀ H ₄₀ O	2 109	2 119	0.74	MS/RI
十八烷基醛	C ₁₈ H ₃₆ O	/	/	0.07	MS
亚麻油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2 135	2 131	9.98	MS/RI
油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	2 145	2 144	4.51	MS/RI
亚油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	/	/	1.39	MS
硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	2 163	2 162	3.44	MS/RI
棕榈酰胺	C ₁₆ H ₃₃ NO	/	/	0.64	MS
二十二烷	C ₂₂ H ₄₆	2 200	2 200	2.12	MS/RI
棕榈醛	C ₁₆ H ₃₂ O	/	/	0.30	MS
亚麻酸甲基酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	/	/	0.21	MS
5-十八烯醛	C ₁₈ H ₃₄ O	/	/	0.48	MS
二十三烷	C ₂₃ H ₄₈	/	/	5.83	MS/RI
环氧十六碳烯	C ₁₆ H ₃₂ O	/	/	1.81	MS
二十一烷酸甲酯	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	/	/	0.89	MS
2-乙基-2-丙基-环己酮	C ₁₁ H ₂₀ O	/	/	0.29	MS
亚油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	/	/	0.35	MS
二十酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	2 362	2 380	1.80	MS/RI
二十四烷	C ₂₄ H ₅₀	2 400	2 400	2.61	MS/RI
顺-7-十四烯醛	C ₁₄ H ₂₆ O	/	/	0.62	MS
二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	2 500	2 500	14.29	MS/RI
角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	>2 500	/	2.61	MS
顺-9-二十三烯	C ₂₃ H ₄₆	>2 500	/	2.86	MS
辛酸烯丙酯	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	>2 500	/	3.48	MS
二辛酮	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	>2 500	/	4.39	MS

注: *I*_{exp} 为测定值; *I*_{lit} 为相关保留指数, “/”为未相匹配的保留指数与无法鉴定的物质.

由表 4 可知, 采用 GC-MS 联用技术和 RI 值检索对超临界 CO₂ 萃取的茶树花萃取物进行分析, 共分离出 97 种化合物, 初步定性的有 89 种. 定性得到的化合物主要包含 6 大类化合物, 分别为醇类、酮类、醛类、烯类、烷烃类和酯类, 占色谱流出组分总量的 92.84%. 其中烷烃类化合物种类最多, 分别是 22 种, 占 33.85%; 酯类化合物包含 16 种, 占总量的 8.49%; 醛类化合物包含 12 种, 占总量的 2.35%; 酮类化合物

包含 10 种, 占总量的 5.95%; 醇类化合物包含 10 种, 占总量的 2.86%; 羧酸类化合物包含 9 种, 占总量的 31.18%; 萜烯类化合物包含 6 种, 占总量的 8.16%。本试验得到的茶树花萃取物中的香气化合物, 部分化合物香气阈值低且具有典型的香气: 壬醛(花香、果香), 2,4-庚二烯醛(清香), 癸醛(甜橙和橘子香), 苯乙酮(甜香), 芳樟醇(铃兰香), α -紫罗酮(紫罗兰香), β -紫罗酮(紫罗兰香、柏木香), 2-庚酮(果香), 苯乙醇(花香), 己酸(椰子油香)。

近期, 大量的学者研究得出植物的芳香性挥发物质^[23-24]具有较高的药用价值, 不仅可以醒脑提神、平和心绪, 还能有助于神经系统、呼吸系统等疾病的治疗。试验得到的香气成分中的芳樟醇、蛇麻烯、雪松醇、苯乙醇、角鲨烯^[25]等, 它们大部分都具有保健药用的功能。芳樟醇具有催眠、镇静、抗抑郁的功效, 蛇麻烯具有抗炎、有效防止感冒的作用, 雪松醇有镇痛和治疗关节炎的功效, 苯乙醇具有缓解紧张、抗菌的效能, 角鲨烯不仅具有香气, 且具有良好的富氧能力, 因此其具有抗缺氧和抗疲劳且有提高疼体免疫力的功能。

3 结 论

1) 本试验采用真空冷冻干燥样品和超临界 CO₂ 相结合的方法, 通过单因素和正交试验探讨了茶树花香气物质提取的最佳工艺条件。真空冷冻干燥方法尽可能完整地保持了茶树花的天然香气, 同时结合超临界 CO₂ 萃取法优化得到香气物质的最大提取率。最佳工艺条件为萃取压力 25 MPa, 萃取温度 40 °C, CO₂ 流量 25 kg/h, 在此条件下茶树花萃取物的提取率可达到 1.36%±0.09%。经极差分析得各因素的影响力由大到小为 CO₂ 流量, 萃取压力, 萃取温度。

2) 处理后的萃取物进行 GC-MS 检测分析, 分析结果通过质谱库与 RI 值同时鉴定比对来定性, 峰面积归一法定量。初步鉴定出 89 种香气成分, 其中烷烃类化合物种类最多以及相对含量最高, 分别是 22 种, 占 33.85%, 除此之外还包括醇类、酮类、醛类、烯类和酯类。芳樟醇、苯乙醇等物质不仅气阈值低, 且具有典型的香气特征, 还具有保健药用的功能。

3) 超临界萃取法符合现在的绿色、环保理念, 因其得率与其他提取方式相当, 所以该方法能有效萃取类似茶树花精油的天然产物。但萃取过程中, 不仅易萃取高沸点的香气物质, 而且部分无香气或高阈值的物质也被萃取出, 影响萃取物的品质, 建议采用分子蒸馏等提纯方式提高萃取物的纯度。

参考文献:

- [1] 张 逸. 茶树花芽分化及花器官发育的形态学研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2012.
- [2] 梁名志, 浦绍柳, 孙荣琴. 茶花综合利用初探 [J]. 中国茶叶, 2002, 24(5): 16—17.
- [3] 田国政, 王东辉, 周光来, 等. 茶树花营养成分的分析与评价 [J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2004, 22(2): 26—28.
- [4] 李晋玲. 茶花氨基酸和蛋白质含量测定及研究 [J]. 茶业通报, 2003, 25(2): 61.
- [5] 苏松坤, 陈盛禄, 林雪珍, 等. 茶(*Camellia sinensis*)花粉营养成分的测定 [J]. 中国养蜂, 2000, 51(2): 3—5.
- [6] DANESI F, SAHA S, KROON P A, et al. Bioactive-Rich *Sideritis scardica* Tea (Mountain Tea) is as Potent as *Camellia sinensis* Tea at Inducing Cellular Antioxidant Defences and Preventing Oxidative Stress [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(14): 3558—3564.
- [7] YANG Zi-yin, TU You-ying, BALDERMANN S, et al. Isolation and Identification of Compounds from the Ethanolic Extract of Flowers of the Tea (*Camellia sinensis*) Plant and Their Contribution to the Antioxidant Capacity [J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(8): 1439—1443.
- [8] YANG Zi-yin, XU Yi, JIE Guo-liang, et al. Study on the Antioxidant Activity of Tea Flowers (*Camellia sinensis*) [J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2007, 16(1): 148—152.
- [9] YOSHIKAWA M, NAKAMURA S, KATO Y, et al. Medicinal Flowers. XIV. New Acylated Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides with Antiallergic Activity from Flower Buds of Chinese Tea Plant (*Camellia sinensis*) [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 55(4): 598—605.
- [10] 顾亚萍, 钱 和. 茶树花香气成分研究及其香精的制备 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1): 187—190.
- [11] 安红梅, 尹建军, 张晓磊, 等. 同时蒸馏萃取技术在食品分析中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2011, 32(12): 216—210.

- [12] VRYZAS Z, PAPADAKIS E N, PAPADOPOULOU-MOURKIDOU E. Microwave—Assisted Extraction (MAE)-Acid Hydrolysis of Dithiocarbamates for Trace Analysis in Tobacco and Peaches [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(8): 2220—2226.
- [13] 郭 梅, 黄卫红, 陆晓华, 等. 亚临界水萃取-固相萃取联用技术对沉积物中有机氯农药的萃取研究 [J]. 分析科学学报, 2004, 20(3): 257—259.
- [14] 方 向, 朱跃钊, 凌 祥, 等. 玫瑰精油超临界二氧化碳萃取的试验研究 [J]. 林产化学与工业, 2010, 30(3): 83—87.
- [15] GB/T 8304-2002, 茶 水分测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [16] 吕 玉, 史智佳, 曲 超, 等. 气相色谱-嗅闻-质谱联用分析牦牛肉的“膻味”成分 [J]. 食品科学, 2014, 35(2): 209—212.
- [17] 钟瑞敏, 曾庆孝, 张振明, 等. 气质联用结合保留指数对比在五种木兰科芳香精油成分鉴定中的应用 [J]. 分析测试学报, 2006, 25(5): 16—20.
- [18] 周雪芳, 唐 洪, 雷 茜, 等. 四川工夫红茶香气成分分析 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2011, 36(3): 178—182.
- [19] 南志奇, 牛小东, 艾 义, 等. 黔江肾豆营养成分分析 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2012, 37(2): 88—92.
- [20] 张玉朋, 张 莹, 容 蓉, 等. 气相色谱质谱联用结合保留指数分析薄荷挥发性成分 [J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(3): 247—249.
- [21] 李书国, 陈 辉, 李雪梅, 等. 超临界 CO₂ 流体萃取小麦胚芽油工艺的研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(8): 151—153.
- [22] 任 飞, 韩 发, 石丽娜, 等. 超临界 CO₂ 萃取技术在植物油脂提取中的应用 [J]. 中国油脂, 2010, 35(5): 14—19.
- [23] 苗爱清, 吕海鹏, 孙世利, 等. 乌龙茶香气的 HS-SPME-GC-MS/GC-O 研究 [J]. 茶叶科学, 2010, 30(S1): 583—587.
- [24] LEHRNER J, MARWINSKI G, LEHR S, et al. Ambient Odors of Orange and Lavender Reduce Anxiety and Improve Mood in a Dental Office [J]. Physiology & Behavior, 2005, 86(1/2): 92—95.
- [25] 钟冬莲, 汤富彬, 沈丹玉, 等. 油茶籽油中角鲨烯含量的气相色谱法测定 [J]. 分析试验室, 2011, 30(11): 104—106.

Optimization of SFE-CO₂ of Tea Flowers (*Camellia sinensis* L.) and Analysis of Its Extracts by GC-MS

FU Li-ya¹, LIU Shu-juan², MA Meng-jun¹,
LUO Li-yong^{1,3}, ZENG Liang^{1,3}

1. School of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Hunan Tea Research Institute, Changsha Hunan 410013, China;

3. Tea Research Institute, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Supercritical fluid extraction using carbon dioxide (SFE-CO₂) was employed to study the optimal process parameters of tea flower (*Camellia sinensis* L.) and aroma analysis was made of its extracts by GC-MS. Three parameters—pressure, temperature and CO₂ flow rate—were selected, and their influences on yield were investigated. Based on the results of an orthogonal experiment, the optimum process parameters were shown to be: extraction pressure 25 MPa, extraction temperature 40 °C and CO₂ flow rate 25 kg/h. Under such a condition, the actual yield of extracts was 1.36%±0.09%. The results of range analysis indicated that the order of the three parameters influencing the extraction yield was CO₂ flow rate>extraction pressure>extraction temperature. The results of GC-MS analysis from MS with retention index (RI) showed that there were 97 aroma compounds in the extracts of tea flowers. They were alkanes (33.85%), esters (8.49%), aldehydes (2.35%), ketones (5.95%), alcohols (2.86%), acids (31.18%), terpenes (8.16%), the others (7.16%).

Key words: tea flower; SFE-CO₂; gas chromatography-mass spectrometry; retention index

