

蜂蜡中二十八烷醇的制备工艺研究

杨浩^{1,2} 李利龙¹ 吴信² 向洋^{1*}

(1. 长沙理工大学 化学与生物工程学院 湖南 长沙 410114; 2. 中国科学院 亚热带农业生态研究所 湖南 长沙 410125)

摘要:以蜂蜡为原料制备二十八烷醇,研究了皂化温度、皂化时间、NaOH 体积分数、固液比等单因素对皂化提取过程的影响,通过正交试验及其方差分析结果确定最优皂化条件为:皂化温度 95 °C、皂化时间 3.5 h、NaOH 体积分数为 8%、固液比为 1:8。然后经过分子蒸馏技术纯化可以制得最高纯度为 89.78% 的二十八烷醇。

关键词:二十八烷醇;皂化;正交试验;分子蒸馏

中图分类号:TQ223.12⁺9 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2012)05-1053-05

The Extraction Process of Octacosanol from Beeswax

YANG Hao^{1,2} , LI Li-long¹ , WU Xin² , XIANG Yang^{1*}

(1. College of Chemistry and Biological Engineering ,Changsha University of Science and Technology , Changsha 410114 ,China; 2. Key Laboratory of Subtropical Agroecology ,Institute of Subtropical Agriculture ,the Chinese Academy of Sciences ,Changsha 410125 ,China)

Abstract: Octacosanol was prepared by beeswax. Temperature and time for saponification , NaOH concentration , the effect of the solid-liquid ratio on the extraction of saponification were studied. The result of orthogonal test and variance analysis showed that the optimal saponification conditions were: 95 °C 3.5 h , 8% of the mixture of NaOH and CH₃CH₂OH , 1:8 of solid - liquid ratio. By purification and molecular distillation technology 89.78% of alcohol had obtained.

Key words: octacosanol; saponification; orthogonal experiment; molecular distillation

蜂蜡是蜂蜜生产的重要副产物之一,在医疗保健、食品、化工、机械、光学、纺织、农林等多个领域都有应用,尤其是蜂蜡中包含的一些天然生物活性成分逐渐被发现,蜂蜡的开发利用引起了多方重视^[1]。二十八烷醇是一种存在于蔗蜡、虫蜡、蜂蜡中的一种重要天然活性物质,1937 年被发现可以治疗人体生殖障碍后,各国科学家开始对它不断进行深入的研究,现被公认为是一种良好抗疲劳物质^[2]。美国依利诺斯大学的 Cuerotn 博士从 1949 年起,经过 20 多年时间,对包括了以学生、军人、体育运动员、病人等研究对象的 894 人进行了 42 个项目的测试研究,确定了二十八烷具有以下生理调节功能:增加体力、耐力和精力;提高肌肉耐力;提高反应敏锐性,缩短反应时间;增加登高动力;提高能量代谢率,消除肌肉痉挛;增强包括心肌在内的肌肉功能;降低收缩期血压;提高基础代谢率;刺激性激素;促进脂肪分解^[3-5]。在美国,二十八烷醇已经通过了美国食品药品监督管理局许可,已作为一种安全的功能性添加

收稿日期:2012-05-15 修回日期:2012-08-13

基金项目:广东省中国科学院全面战略合作项目(2009B091300043)

作者简介:杨浩(1987—)男,硕士生,主要从事天然产物的提取与应用研究,E-mail: yanghaohu2005@126.com;*

通讯作者:向洋,教授,博士生导师,E-mail:xyang_csut@yahoo.com.cn。

剂被广泛应用于食品、药品、饲料、化妆品等^[6]。但目前大部分制备二十八烷醇的工厂均使用化学合成法,该方法原料成本高,制备工艺复杂,副产物多且高残留,从而影响了二十八烷醇的推广应用;而从天然产物制备二十八烷醇方法原料便宜,工艺简单,对设备要求较低,且安全无残留,毒副作用小,适用食品与药品等行业的需求。

1 材料和方法

1.1 实验材料

试剂:商品蜂蜡(江西省科学院);二十八烷醇标样(Sigma公司,纯度为99%);氢氧化钠、盐酸、无水乙醇、丙酮等均为分析纯。主要仪器:数显电热恒温水浴锅(中国科学院亚热带农业生态研究所);SD202-0(AS)型电热恒温鼓风干燥箱(中国科学院亚热带农业生态研究所);WH220型WIGGENS加热磁力搅拌器(中国科学院亚热带农业生态研究所);SHB-C循环水式多用真空泵(中国科学院亚热带农业生态研究所);气质联用设备(中国科学院亚热带农业生态研究所);其他设备均为实验室常用设备。

1.2 实验方法

1.2.1 提取和纯化工艺流程 如图1所示。

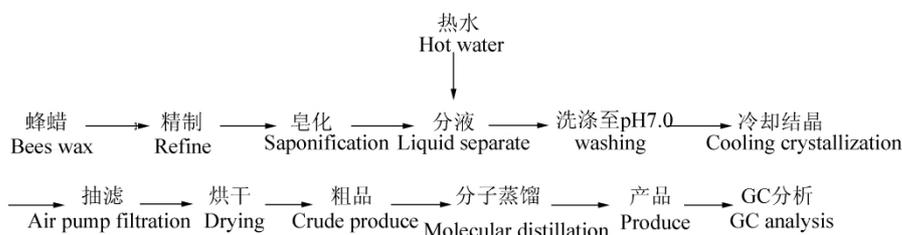


图1 提取和纯化工艺流程

Fig. 1 The process of extraction and purification

1.2.2 皂化工艺流程 蜂蜡→预处理→加入 NaOH 的乙醇溶液→加热反应→氯化钙溶液→加热反应→冷却。

1.2.3 精制蜂蜡皂化工艺条件的优化 本实验采用皂化工艺分离二十八烷醇。分别研究了皂化温度、皂化时间、NaOH 体积分数、固液比 4 个单因素对于蜂蜡中二十八烷醇皂化率的影响。取 5 g 精制蜂蜡加入 100 mL 三角瓶中皂化,在皂化过程中摇动三角瓶,使充分反应皂化,皂化结束停止加热,往皂化产物中滴入 3 滴体积分数 1% 的酚酞乙醇溶液作指示剂,立即用 0.5 mol/L 的盐酸标准溶液滴定,以溶液颜色由紫红色变为无色为滴定终点,读取消耗的盐酸标准溶液的体积,计算出皂化率。重复 3 次,取平均数。以皂化率为考察指标,确定二十八烷醇的最佳提取工艺。根据单因素试验结果设计正交实验。

1.2.4 分子蒸馏纯化 以皂化的蜂蜡为原料,使用短程蒸发器通过分子蒸馏技术进行纯化,条件为热蒸发面与冷凝结面间距为 2~15 cm,压力为 0.01~10 Pa,热蒸发面温度为 110~200 °C,冷凝结面温度为 -15~-18 °C,搅拌速度为 10~1 000 r/min,并且以上一次蒸馏残液作为下一次蒸馏原料的流程进行反复蒸馏,每次蒸馏直到蒸发器与冷凝器温度相差约 30~100 °C 时停止^[5]。

1.3 二十八烷醇的定量测定方法

实验采用“外标标准曲线法”二十八烷醇含量^[7]。

1.3.1 气相色谱条件^[8] Agilent6890NVersionN. 04. 13 气相色谱仪, FID; 色谱柱: HP-5(30 m × 320 μm × 25 μm); 柱温: 240 °C 保持 1 min,以 20 °C/min 的速度升至 300 °C,保持 10 min; 气化室温度: 300 °C; 检测器温度: 330 °C; 载气(N₂) 流速: 45.0 mL/min; 氢气(H₂) 流速: 40.0 mL/min; 助燃气(空气) 流速: 450 mL/min; 进样量: 1 μL。

1.3.2 二十八烷醇标准溶液制备 准确称取 50 mg 二十八烷醇标样到小烧杯后用三氯甲烷溶解,再转到 25 mL 容量瓶中,用三氯甲烷定容。分别移取 2, 4, 6, 8, 10 mL 标准液到 50 mL 容量瓶中,用三氯甲烷在超声波震荡条件下定容,配制成 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL 的梯度标液。测定时标液分别进样 1 μL。

1.3.3 标准曲线的绘制 以二十八烷醇质量浓度(mg/mL)为横坐标(X),以二十八烷醇峰面积为纵坐标(Y)作标准曲线,得到回归方程: $Y = 559.23X - 74.889$, $R^2 = 0.9992$ 。

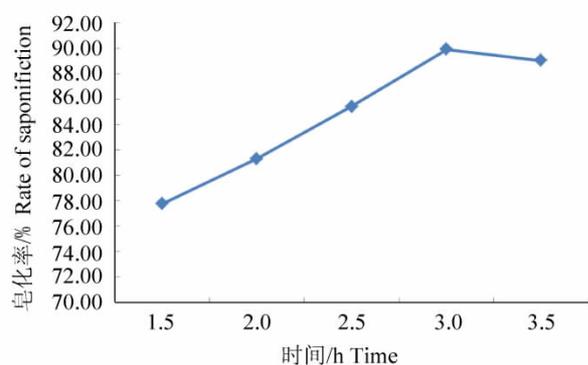


图2 皂化反应时间对于皂化率的影响

Fig. 2 Saponification time to the rate of saponification

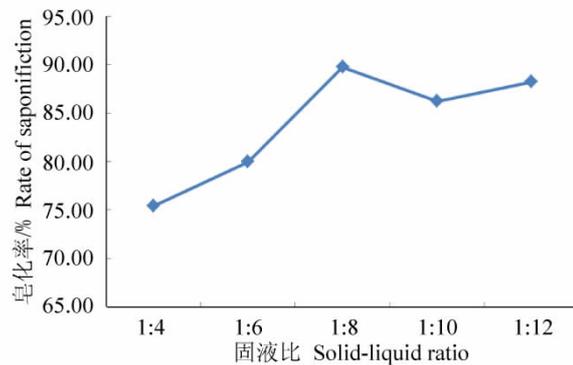


图3 皂化反应固液比对于皂化率的影响

Fig. 3 Saponification solid-liquid ratio to the rate of saponification

1.3.4 样品测定 与称取 50 mg 待测样品,置 25 mL 容量瓶中,三氯甲烷超声溶解定容。抽取样品溶液 1 μ L 进样,测定得到样品溶液中二十八烷醇的峰面积值,将峰面积值代入回归方程计算。得样品溶液二十八烷醇质量浓度,再由关系式: $C_1 = 25C_2/50$ 算出待测样品中二十八烷醇的含量 (C_1 : 样品溶液中二十八烷醇质量浓度; C_2 : 样品中二十八烷醇含量)。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 皂化时间对皂化率的影响 实验结果如图 2 所示,在 95 $^{\circ}$ C、料液比为 1:10、0.5 mol/L 的 NaOH 加入提取条件下,提取时间与皂化率成正比,当提取时间超过 3 h 时,皂化率继续增加但增加缓慢,因此为了节约时间、降低成本,以提取 3 h 为最佳的皂化时间。

2.1.2 固液比对皂化率的影响 实验结果如图 3 所示,在 0.5 mol/L 的 NaOH 加入 40 mL、皂化温度为 95 $^{\circ}$ C、皂化时间为 3 h 的提取条件下,当固液比为 1:(6~10) 时,皂化率随着固液比的增加而增大,但当固液比超过 1:8,皂化率反而有所下降,考虑到生产成本以及过量使用 NaOH 对于环境的污染,确定以料液比为 1:8 为最佳的皂化条件。

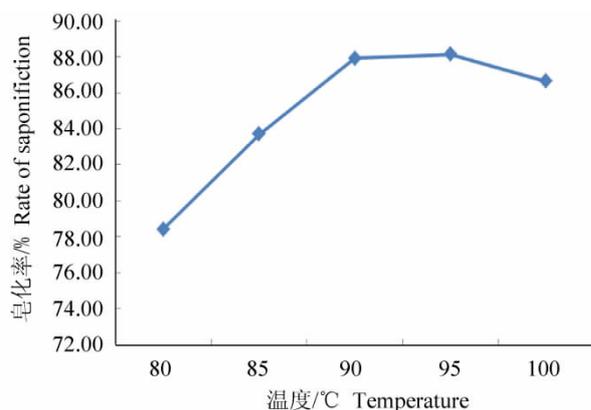


图4 皂化温度对于皂化率的影响

Fig. 4 Saponification temperature to the rate of saponification

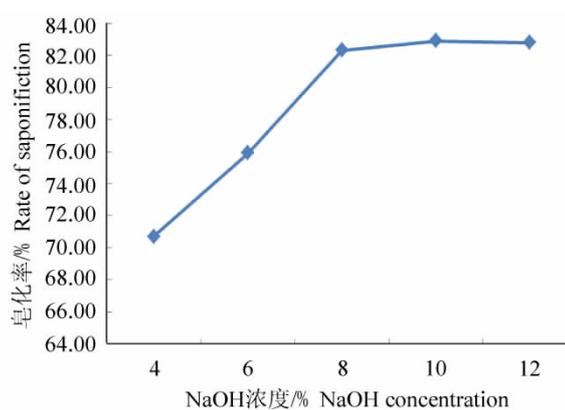


图5 皂化反应用 NaOH 浓度对于皂化率的影响

Fig. 5 Saponification with NaOH concentration to the rate of saponification

2.1.3 皂化温度对皂化率的影响 实验结果如图 4 所示,在料液比为 1:8、0.5 mol/L 的 NaOH 加入 40 mL、皂化时间为 3 h 的提取条件下,皂化率随着提取温度的升高而增加,但当提取温度超过 90 $^{\circ}$ C 时,皂化率开始减小,原因可能是随着皂化温度的升高导致皂化后的皂苷发生分解,并且考虑到高温对于生产设备的需求较高,因此以 90 $^{\circ}$ C 为最佳的皂化温度。

2.1.4 NaOH 体积分数对皂化率的影响 实验结果如图 5 所示,在料液比为 1:8、皂化温度为 90 $^{\circ}$ C、皂

化时间为 3 h 的提取条件下,皂化率随着 NaOH 体积分数的升高而增加,当 NaOH 用量的浓度升至 10% 皂化率不再随着 NaOH 浓度的增加而升高,因此我们以 NaOH 用量 10% 为最佳的皂化条件。

2.2 正交实验确定皂化最佳工艺参数

采用正交试验设计,确定最佳皂化工艺参数。

表 1 正交试验表确定最优条件

Tab.1 Orthogonal table to determine the optimal conditions

实验号 Experiment No.	A 皂化时间/h Saponification time	B 固液比 Solid-liquid ratio	C 皂化温度/℃ Saponification temperature	D NaOH 体积分数/% The concentration of NaOH	皂化率/% Saponification rate
1	2.5	1:6	80	8	85.86
2	2.5	1:8	90	10	84.11
3	2.5	1:10	95	12	83.01
4	3	1:6	90	12	84.52
5	3	1:8	95	8	90.42
6	3	1:10	80	10	83.79
7	3.5	1:6	95	10	87.61
8	3.5	1:8	80	12	85.27
9	3.5	1:10	90	8	89.01
k_1	252.98	257.99	254.92	265.29	
k_2	258.72	259.80	257.64	255.51	
k_3	261.89	255.81	261.04	256.54	
K_1	84.33	86.00	84.97	88.43	
K_2	86.24	86.60	85.88	85.17	
K_3	87.30	85.27	87.01	84.26	
R	2.97	1.33	2.04	4.16	

R 值得比较可以得出,NaOH 体积分数对于皂化率的影响最大,固液比与皂化温度产生的影响较小,并且得出最佳的实验配比为 $A_3B_2C_3D_1$ 。在该配比的实验中,最后的皂化率达到 90.42%。为了实验数据更加准确,进行 2 次验证实验,综合 3 次实验数据求取平均值为 89.97%。说明 $A_3B_2C_3D_1$ 为最佳配比即皂化温度为 95℃,皂化时间为 3.5 h,固液比为 1:8、NaOH 体积分数为 8%。

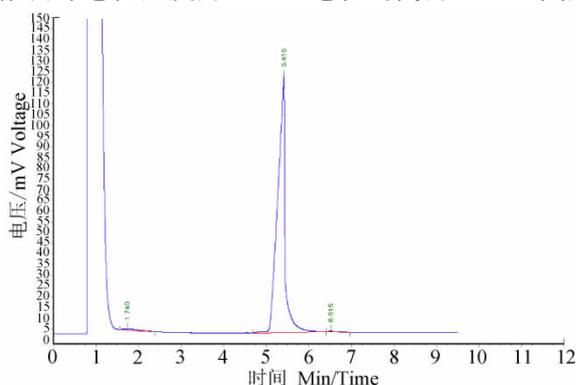


图 6 二十八烷醇标准品气相色谱检测图

Fig.6 Octacosanol standard gas chromatography map

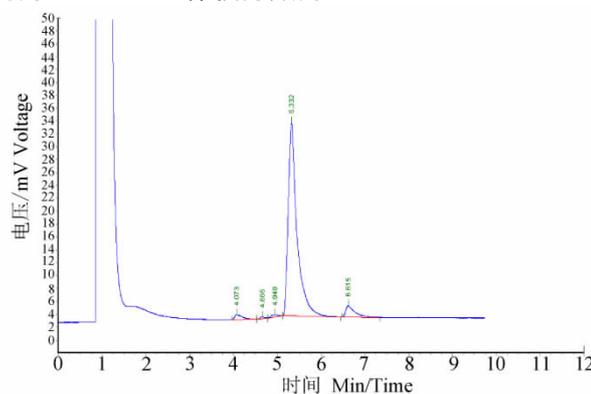


图 7 二十八烷醇制备样品气相色谱检测图

Fig.7 Octacosanol sample preparation gas chromatography map

2.3 二十八烷醇的纯化与检测

将提取的二十八烷醇混合物在薄膜蒸发器温度 170℃,分子蒸馏器温度 210℃ 条件下,采用分子

蒸馏技术将皂化制得的二十八烷醇的初提混合物进行纯化。然后通过气相色谱分析检测所制得二十八烷醇的纯度为 89.78% (图 6 和图 7)。

3 结 论

通过正交实验表明,对于精制蜂蜡的皂化时间 3.5 h,皂化温度为 95 °C,NaOH 体积分数为 8%,固液比 1:8 为最佳配置。经过测定证明,使用传统的皂化工艺将精制蜂蜡皂化后使用分子蒸馏技术纯化制备的二十八烷醇产品纯度高达 89.78%,完全符合医药和食品等行业的需求。

参考文献:

- [1]毛佳,陈建华,黄少烈.二十八烷醇的研究进展[J].广东化工,2007,34(3):57-58.
- [2]陈芳.米糠中二十八烷醇的提取精制及其抗疲劳功能的研究[D].北京:中国农业大学,2003.
- [3]颜伟玉,曾星凯,谢国秀.蜂王浆中不同活性组分对大鼠降血脂效果影响[J].江西农业大学学报,2009,31(5):826-829.
- [4]杨新跃,刘志勇,汪礼国.蜂花粉多糖液抑制肿瘤作用的实验研究[J].江西农业大学学报,2006,27(2):293-294,303.
- [5]Cureton T K. Effects of wheat germ oil on human in exercise[M]. U S: Illinois, Charles Thomas Publishesr,1972.
- [6]何新益.二十八烷醇的研究状况及应用[J].现代食品科技,2005(2):219-220.
- [7]刘方波,王兴国.分子蒸馏技术分离米糠活性物质二十八烷醇的研究[J].中国油脂,2006,31(11):50-52.
- [8]刘法锦,孙冬梅.GC法测定蜂蜡总烷醇中两种烷醇的含量[J].时珍国药研究,1998,9(2):128.

(上接第 1052 页)

- [3]Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T et al. Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo(*Perilla herba*) [J]. Japanese Journal of Psychopharmacology 2002, 22(1): 15-22.
- [4]饶光宇,陈秀芬,张高等.迷迭香二萜酚提取物对几种肝损伤的保护作用[J].中草药,2001,32(5):434-436.
- [5]Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis* [J]. Oncology reports, 2007, 17(6): 1525-1531.
- [6]曾超珍,郭玉,孙丽香.纤维素酶法提取构骨叶熊果酸的工艺研究[J].北方园艺,2009(9):216-218.
- [7]Steiner M, Priel I, Giat J et al. Carnosic acid inhibits proliferation and augments differentiation of human leukemic cells induced by 125-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid[J]. Nutrition and cancer 2001, 41(1/2): 135-14.
- [8]尹怀霞,黎锡流,潘兆广等.纤维素酶提取仙草多糖的研究[J].食品科技,2007(5):126-128.
- [9]钟世安,乔蓉,李维等.采用酶法提取荷叶中的荷叶碱[J].中南大学学报,2007,38(6):1135-1139.
- [10]吕晓玲,张琳琳,马立强等.迷迭香挥发油的酶法辅助提取工艺研究[J].食品工业科技,2010(7):233-234.