

超临界二氧化碳萃取冬凌草中熊果酸的研究



YUAN Ke

袁珂¹, 孙伟², 张晓明²

(1. 浙江林学院 食品与药学院, 浙江 临安 311300; 2. 河南宛西制药有限公司, 河南 西峡 474550)

摘 要: 研究了超临界 CO₂ 萃取(SCDE)冬凌草中熊果酸的工艺方法。确定了 1 kg 冬凌草 SCDE 的最佳工艺条件为: 萃取压力 20 MPa、粒度 40 目、温度 40 ℃、CO₂ 流量 20 L/h、萃取时间 3 h、夹带剂 95% 酒精用量为物料干质量的 30%, 产品得率 4.17%。同时采用 HPLC 测定了该工艺所得萃取物中熊果酸的含量为 6.24%。结果表明, 与传统法相比, 该法具有操作简便快速、溶剂用量少、

提取时间短, 有效成分提取率高, 测定时无杂质干扰等优点。

关键词: 超临界 CO₂ 萃取; 冬凌草; 熊果酸

中图分类号: TQ91; TS225.3; R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2006)02-0131-04

Study on Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Ursolic Acid in *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara

YUAN Ke¹, SUN Wei², ZHANG Xiao-ming²

(1. College of Food and Pharmacy, Zhejiang Forestry University, Lin'an 311300, China;

2. Henan Pharmacy-Company of Wanxi, Xixia 474550, China)

Abstract: Technique of supercritical carbon dioxide extraction(SCDE) of ursolic acid in *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara was studied. The optimal extraction conditions were achieved for 1 kg material as follows: extracting pressure 20 MPa, size of granules 40 mesh, extracting temperature 40 ℃, CO₂ flow rate 15 L/h, extracting time 3 h, modifier 95% alcohol, at dosage of 30% of raw material. The yield of product is 4.17%. The content of ursolic acid in the product is 6.24% determined by HPLC. The result shows that the method has the advantages of simple operation, less solvent consumption, short extraction time, high extraction yield and no interference of impurity during determination.

Key words: supercritical carbon dioxide extraction; *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara; ursolic acid

超临界 CO₂ 萃取(SCDE)技术是近年来国际上迅速发展的新兴技术,已广泛应用于医药、食品、化工等领域。该技术用于中草药成分的提取,具有工艺简单,操作方便,所用 CO₂ 惰性无毒,价廉易得的特点。该工艺萃取温度一般较低,可使中草药中有效成分免遭破坏,保持其生物活性,且萃取速度快,对脂溶性成分溶解度大,同时可通过改变操作条件来调节选择性,因此有效成分萃取率高。另外,利用该技术萃取一般不用或用较少的夹带剂,且减少了浓缩等操作环节,可大大节省溶剂、时间和能源,这些特点使 SCDE 技术在天然植物提取中显示出明显的优势及广阔的应用前景^[1-3]。

冬凌草(*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara)为一传统草药,俗称抗癌植物,该植物主要生长在我国黄河流域及其以南广大地区。冬凌草中的主要成分熊果酸具有较强的抗肿瘤活性。研究表明^[4],熊果酸不仅对多种致癌、促癌物有抵抗作用,而且对多种恶性肿瘤细胞有抑制生长作用。

作者研究了 SCDE 冬凌草中熊果酸并确定出最佳工艺条件,同时采用 HPLC 法对萃取物进行了含量测定。

收稿日期:2005-01-27

作者简介:袁珂(1959-),女,北京人,教授,硕士生导师,主要从事天然产物研究与新药开发。

1 实验

1.1 仪器

5 L-SFE 超临界 CO₂ 萃取装置(小试设备技术参数:装置体积 5 L,最高萃取压力 32 MPa,萃取温度 0~95 °C 可调,使用介质 CO₂,CO₂ 流量 0~60 L/h 可调);500L X₂-SFE 超临界 CO₂ 萃取装置(生产设备),均为广州市轻工业研究所生产。Agilent 1100 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;Alltech-2000 型蒸发光散射检测器,美国 Alltech 公司;自动进样器;HP 1100 化学工作站。

1.2 材料

冬凌草全草于 2003 年 10 月购自河南省济源市药材公司。熊果酸对照品,中国药品生物制品鉴定所。色谱纯甲醇,双蒸水,其它试剂均为分析纯。

1.3 工艺设计

将干燥的冬凌草全草进行粉碎过筛,然后在设定的条件下进行 SCDE,按每份投料 1 kg,以萃取得率为考察指标,系统考察夹带剂、萃取压力、萃取温度、萃取时间、CO₂ 流量及物料粒度对萃取率的影响,确定出最佳工艺条件。将最佳工艺条件下的萃取物进行样品处理及定容,然后取样进行 HPLC 测定。

1.4 色谱条件

色谱柱为 C₁₈ ODS 柱(4.6 mm × 150 mm),柱温 40 °C,流动相:甲醇-0.4% 冰醋酸(体积比 80:20),流速 0.8 mL/min,美国 Alltech (ELSD2000) 蒸发光散射检测器检测,漂移管温度 86 °C,气体流速 2.60 L/min。

2 结果与分析

2.1 最佳提取条件的确定

2.1.1 夹带剂的选择 在进行冬凌草萃取实验中,不加夹带剂时,熊果酸的提取效果很差,当不断改变萃取及解析条件时,通过 TLC 分析发现,均没有或只有少量熊果酸提出,因此,必须加入夹带剂。但夹带剂的加入量要适当,如果量太少,起不到作用,但量过多会改变萃取性质,使萃取主要在非临界的液态下进行,这样往往达不到理想的萃取效果。因此作者分别选用 95% 乙醇、丙酮和乙酸乙酯为夹带剂。在萃取温度 40 °C、CO₂ 流量 15~20 L/h、萃取压力 25 MPa、物料粒度 20 目、萃取时间 3 h 的条件下改变夹带剂用量进行萃取,结果见图 1。

由图 1 可见,95% 乙醇的提取率比其它溶剂高,而且 95% 乙醇价廉易得,安全,适合工业化生产,故选择 95% 乙醇作夹带剂,加入量为物料干质量的 30%。

2.1.2 萃取压力的影响 萃取压力是 SCDE 中最重要的操作参数。萃取压力增加,使 SC-CO₂ 的密度增大,萃取效率也会随之提高。在与 2.1.1 节相同的条件下,加入物料干质量 30% 的 95% 乙醇,改变萃取压力进行萃取,结果见表 1。

从表 1 看出,在其它参数固定的条件下,萃取率随萃取压力的升高而增大,在 5~20 MPa 之间这种增加较为明显,超过 20 MPa 时,萃取率增大不明显。考虑到过高的压力不仅对设备和操作提出更高的要求,生产成本也会相应增加,因此综合考虑萃取压力选择 20 MPa。

2.1.3 萃取温度的影响 在 SCDE 过程中,温度增加,分子扩散系数增大,流体的粘度下降,这都会增加传质系数,有利于萃取。在萃取条件同 2.1.2 节时,改变萃取温度进行实验,结果亦列入表 1。

结果表明,在 30~40 °C 之间,随温度升高萃取率增大,但在 50 °C 时,萃取率反而下降。这可能是由于继续升温时,CO₂ 密度降低,其溶解能力也相应降低,使萃取率下降;再者因为温度过高会对熊果酸

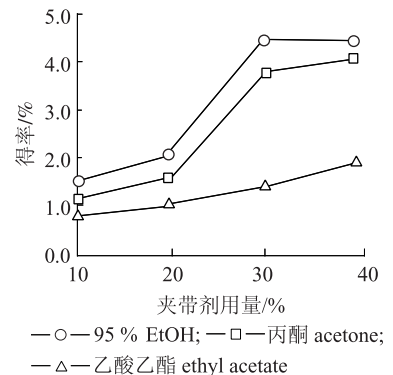


图 1 夹带剂对萃取得率的影响
Fig. 1 Effect of modifier on extraction yield

有一定程度的破坏。故最佳萃取温度选择 40 ℃。

2.1.4 萃取时间的影响 萃取时间增加有利于超临界流体与有效成分的溶解平衡,能提高萃取率。在萃取条件同 2.1.2 节时,改变萃取时间进行实验,结果亦见表 1。

由表 1 可知,随着时间的增加,萃取率逐渐增高,3 h 后几乎萃取完全,再延长已无意义。为提高效率,节省能源,因此萃取温度选择 3 h。

2.1.5 CO₂ 流量的影响 CO₂ 流量是影响萃取率的又一个因素。这种影响有两方面,一方面 CO₂ 流量增加,超临界 CO₂ 在萃取器中的停留时间减少,使流体与有效成分接触时间减小,萃取平衡受到影响;另一方面,流体流量增加,增加了流体的扰动,使传质速度加快,有利于萃取速率及萃取率的提高。在 2.1.2 节萃取条件下,改变 CO₂ 流量进行实验,结果亦列入表 1。

结果表明,随着 CO₂ 流量的增大,萃取率也增大。但流量若过大,与物料接触不够充分,萃取率会逐渐趋于缓和,且流量的增大会增加操作费用。综合考虑,流量选择 20 L/h 为好。

2.1.6 粒度的影响 粒度直接影响到 SCDE 的操作周期和萃取率。粒度大小直接与总表面积和固相传质系数有关。粒度越小,总表面积越大,传质越快,与流体接触面积越多,萃取率越高。固定其它参数,改变物料粒度进行萃取,结果见表 1。

由表 1 可知,随物料粒度变小,萃取率不断提高,但从 40 ~ 60 目萃取率提高不明显,考虑到工业上粉碎的难度和能耗,综合分析,选择最佳粒度为 40 目。

2.2 测试条件的确定

2.2.1 标准曲线绘制 精密称取熊果酸对照品 2.77 mg,加甲醇溶解定容至 25 mL,摇匀,配成质量浓度为 0.110 8 mg/mL 的对照品溶液。分别进样上述对照品溶液 2.0、5.0、10.0、15.0 和 20.0 μL,记录峰面积。结果熊果酸进样量在 0.221 6 ~ 2.216 μg 之间,峰面积与熊果酸进样量呈良好线性关系,回归方程略。

2.2.2 精密度实验 取按照 2.3 节方法处理所得到的冬凌草样品溶液进样 5 次,每次进样 5 μL,测定峰面积值,计算含量。结果相对标准偏差(RSD)为 1.69 %。

2.2.3 加样回收率实验 取已知含量的冬凌草药材,分别加入熊果酸对照品溶液适量,按样品萃取条件萃取及测定,3 次的平均回收率为 97.84 %, RSD 为 2.91 %。

2.3 最佳工艺下的重复性实验

精密称取冬凌草全草粗粉 3 份,分别为 1.235 6、1.105 6 和 1.072 3 kg,以实验所得最佳工艺条件进行萃取,得到萃取物后,摇匀,取出 5 mL,用甲醇溶解并定容至 100 mL,称定质量。抽滤除去少量不溶物,得清液用甲醇补足减失质量,取 1 mL 用甲醇溶解并定容至 25 mL 容量瓶中,取 10 μL 直接进样,记录峰面积,计算结果冬凌草萃取物中熊果酸的平均含量为 6.24 %, RSD 为 2.13 %。

2.4 超临界 CO₂ 萃取冬凌草中熊果酸的中试放大

采用 500LX₂-SFE 超临界 CO₂ 萃取装置,投料量 50 kg,选用最佳工艺进行萃取,取萃取物适量减压抽成干粉,称定质量,计算萃取物得率。同时将萃取物进一步处理并进行 HPLC 测定,见表 2。结果证明萃取物得率及萃取物中熊果酸的含量与小试基本一致,证明该萃取工艺进行工业化生产是可行的。

表 1 萃取条件对萃取率的影响

Table 1 Effects of various factors on extraction yield		
条件 conditions		萃取得率/% extraction yield
萃取压力/MPa extraction pressure	5	0.2
	10	1.1
	15	2.6
	20	3.8
	25	4.2
温度/℃ temperature	30	1.9
	35	2.6
	40	3.8
	45	4.2
	50	3.9
时间/h time	1	1.1
	2	2.5
	3	3.7
	4	4.1
	5	3.6
CO ₂ 流量/(L·h ⁻¹) CO ₂ flow rate	5	1.1
	10	2.1
	15	2.8
	20	3.8
	25	3.8
粒度/目 granularity/ mesh	5	2.7
	10	3.2
	20	3.7
	40	4.2
	60	4.3

3 结论

3.1 采用超临界 CO₂ 萃取(SC-DE)技术从1 kg 冬凌草中提取熊果酸的最佳工艺条件是:萃取压力 20 MPa,萃取温度 40 ℃,萃取

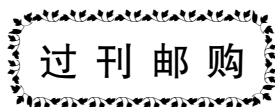
时间 3 h,CO₂ 流量为 20 L/h,物料粒度 40 目,以 95 % 乙醇为夹带剂,加入量为物料干质量的 30 %。采用该工艺萃取冬凌草中的熊果酸,产品平均得率为 4.17 % ,产品中熊果酸的平均含量为 6.24 %。

3.2 采用该技术进行萃取,具有提取快速、完全;节省大量溶剂,萃取的选择性较高;提取的杂质少,提取物不需脱色除杂,有效成分的提取率高等优点。若希望得到高纯度的熊果酸,则萃取物不需浓缩过程,可直接进行分离纯化,简化了操作,生产周期大大缩短,尤其是无需加热,能确保热敏性成分熊果酸最大限度地转移出来。

3.3 采用 SCDE 技术进行冬凌草有效成分的萃取尚未见报道。本实验获得了一套最佳工艺参数,且通过中试及 HPLC 测定证明,有效成分的提取率与小试相近,比传统的溶剂提取法(提得的熊果酸的含量为 0.414 %^[5])要高得多,因此进行工业化生产是可行的。

参考文献:

- [1]张镜澄. 超临界流体萃取[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
 [2]朱自强. 超临界流体技术——原理和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
 [3]袁海龙, 李仙逸, 张纯, 等. 超临界流体萃取——高效液相色谱法测定何首乌中磷脂成分[J]. 药学报, 1999, 34(9): 702-705.
 [4]刘晨江, 赵志鸿. 冬凌草的研究进展[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(10): 507-511.
 [5]袁珂, 董留民. HPLC 法测定冬凌草中熊果酸、齐墩果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(6): 1-2.



本刊编辑部尚有创刊以来的部分过刊库存,见下表。所有价格均含邮费,其中 1984 年第 4 期,1987 年第 1 期,1989 年第 4 期,1992 年第 1 期已售完。

年份	1982 ~ 1988	1989 ~ 1993	1994 ~ 1995	1996 ~ 2001	2002 ~ 2004
价格	10 元/年	15 元/年	20 元/年	30 元/年	40 元/年

另有 1994 年特刊《松香·松节油再加工专辑》,10 元/本; 2004 年增刊,主要为松香、松节油及其深加工研究论文,20 元/本; 2005 年增刊,主要内容为生物质能源、化学品和材料相关的研究论文,36 元/本(均含邮费)。

如有漏订或收藏不全需补购者可直接汇款至《林产化学与工业》编辑部,汇款人须在汇款单上写清详细地址,附言栏内注明所购年份、期号及数量。

编辑部地址:210042 南京市锁金五村 16 号 林化所内《林产化学与工业》编辑部,电话:(025) 85482493。