

第二类超临界流体萃取银杏叶有效成分的实验研究[△]

桂林天和药业有限公司(541001)

邓启焕*

上海华东理工大学国家重点实验室

高 勇

摘 要 建立了一套超临界流体萃取小试、中试装置,实现了银杏叶有效成分的分离,并分别探讨了压力、流体比、温度、时间、原料粒度、CO₂ 流量等因素对萃取得率和质量的影响。

关键词 超临界流体萃取 银杏叶有效成分 影响因素

银杏 *Ginkgo biloba* L. 叶的研究已成为国际上近代植物药开发的热点之一,对其活性化学成分的提取分离研究很多。银杏叶中银杏黄酮分黄酮醇苷、双黄酮和儿茶素 3 大类共 35 种,银杏内酯有银杏内酯 A、B、C、D、J、M 和白果内酯 6 种。国外主要采用的生产工艺是以 60% 丙酮为提取溶剂,经过一系列精制得产品 EGb 761;国内较多采用含水乙醇提取,树脂吸附生产工艺。这些工艺流程过于繁琐,成本高,收率低,产品的内在质量比较差,而且溶液提取方法中有机溶剂和重金属的残留还可能带来毒副作用^[1]。

超临界流体萃取(SCFE)因其独特的优点已在许多工业部门广泛的应用^[2~6]。

笔者以银杏叶有效成分分离为对象进行了第二类超临界流体萃取过程的实验研究。

在诸多超临界流体中,CO₂ 最受青睐,其特点在于:1)CO₂ 的临界温度低(31.06℃),与室温相接近,萃取通常在略高于室温的平和条件下进行,因而对易挥发组分或生理活性物质极少损失和破坏,特适合于天然活性物质成分的萃取分离。2)CO₂ 安全无毒,适合于食品或制药工业;萃取分离一次完成,且无溶剂残留。3)CO₂ 是一种不可燃的惰性气体,操作安全;CO₂ 通常为其他工业过程(如发酵

或氨合成)的副产物,价廉易得。4)CO₂ 在室温下的液化压力仅为 4~6 MPa,便于储存和运输,临界压力适中(7.14 MPa),操作条件易于达到^[7,8]。

对 CO₂ 的分子结构及分子间的研究表明:CO₂ 的偶极矩为零,极化率 $26.5 \times 10^{-25} \text{ cm}^3$,极性随压力增大无明显增加,但在 SCF 区其溶液能力与液态烷烃及甲苯相接近。SCF-CO₂ 的值可以通过温度、压力调节达到液态烷烃、芳烃苯及甲苯的值。

SCF-CO₂ 对低分子量的脂肪烃低极性的亲酯性化合物,如酯、醚、醛、内酯等表现出优异的溶解性能;对于大多数极性较强的物质,如糖氨基酸、淀粉、蛋白质等几乎不溶;强极性的官能团(如-OH、-COOH)的引进会使化合物溶解度降低,故多元醇、多元酸及多个羟基的芳香物质均难溶于超临界流体二氧化碳;分子量超过 500 的高分子化合物也几乎不溶。因而,对极性天然产物加工时,改用极性溶剂做为 SCF 可能是最直接的方法,但是一些极性溶剂都难以工业化:N₂O 易爆炸;氟里昂由于破坏臭氧层已被列为 21 世纪禁用物质;NH₃ 不仅临界温度较高,而且具有腐蚀性、与毒性等^[9,10]。

SCF-CO₂ 的特点之一是它具有极强的

* Address: Deng Qihuan, Guilin Tianhe Pharmaceutical Industry Ltd. Co., Guilin

邓启焕 男,24 岁。1997 年毕业于华东理工大学制药工程学院,学士学位,助工。曾获第四届“挑战杯”上海市三等奖、全国鼓励奖、上海市优秀论文奖等奖项,参与研究的 SCFE 技术/设计/生产方案已被企业采用生产香料/医药等产品。现主要从事 SCFE 技术应用和新型中药贴膏基质研究。

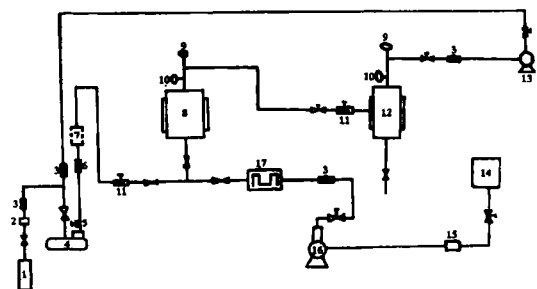
[△] 本文实验在上海华东理工大学国家重点实验室完成

均一化作用,文献^[11,12]表明至少有 140 种化合物可以与超临界 CO₂ 相溶,如正戊烷、环己烷、苯、甲苯、乙醇、丙酮等溶剂都能与 CO₂ 在中等压力和室温条件下形成相混溶状态,即能保持超临界流体溶解度参数(溶剂功能)的连续可调性,而且提高了超临界流体的 δ 值,即提高了混合超临界流体的溶剂功能。由于极性溶剂和极性共溶剂间可能形成某种特殊分子作用力,如 Lewis 酸-碱作用力、氢键力等,从而增加了溶剂溶解度和选择性,提高了混合超临界流体的溶剂功能。我们把这种混合超临界流体称为第二类超临界流体。

1 设备和方法

1.1 原料:CO₂ 由上海吴泾化工厂提供,纯度 99.5%。银杏叶由上海农工商总公司上海天工植物制品厂提供,为工业生产用叶,黄绿色或淡棕色,符合《中国药典》。

1.2 设备:建立了一套适合超临界流体萃取的小试(萃取器 500 mL、分离器 250 mL)、中试(萃取器 10 L、分离器 10 L)设备,并配备了一些必要的辅助设备,实验流程如图 1。



- | | | |
|----------|----------|----------|
| 1-二氧化碳钢瓶 | 2-过滤器 | 3,6-单向阀 |
| 4-压缩机 | 5,11-稳压阀 | 7-气相预热器 |
| 8-萃取器 | 9-热电偶 | 10-精密压力表 |
| 12-分离器 | 13-湿式流量计 | 14-流体的液槽 |
| 15-液相过滤器 | 16-高压泵 | 17-液相预热器 |

图 1 实验设备流程

实验设备流程包括:气体进料、液体进料、萃取器、分离器、温度控制、压力控制等 6 个部分。

1.3 实验方法:取绿色银杏叶干燥、粉碎,经过特殊的预处理后,小试每次 150 g 装到萃取器里(图 1-8),压紧密封。打开萃取器、分

离器(12)和系统其它的加热装置,进行整个系统的预热,同时设定萃取分离所需要的温度。启动泵(16),通入所选择的液体并计量。打开 CO₂ 的进气开关,启动压缩机(4),使压力达到实验所要求的范围。打开 8 的阀门,通入 CO₂ 流体。当温度和压力达到萃取的要求时,保持一定的时间,打开分离器(12)的进气阀门,进行分离操作。当实验压力为 10 MPa 时进行脱除银杏酚酸类和叶绿素等杂质;当实验压力大于 10 MPa 并稳定时,进行银杏叶有效成分的萃取分离收集。同时进行萃取条件、分离条件、萃取产物的实验测定。

1.4 分析方法:目前,银杏叶的有效成分基本上都采用 HPLC 测定,采用山柰素、槲皮素和异鼠李素作为对照品测定银杏总黄酮的含量^[13];采用银杏内酯 A、B、C、J、M 和白果内酯 A 为对照品测定银杏内酯的含量^[14]。

2 SCFE 的影响因素研究

SCFE 的流体比、CO₂ 流量、压力、时间、温度、银杏叶粉碎粒度等条件的变化,会影响银杏叶有效成分的质量,我们首先稳定实验条件使萃取物银杏叶有效成分的质量高于国际现行公认的质量标准(银杏黄酮含量 > 24% 和银杏内酯含量 > 6%),再进行第二类 SCFE 银杏有效成分的最佳工艺参数考察。

2.1 流体比:银杏黄酮是含多个羰基的极性化合物,分子量大多在 500 以上,银杏内酯是脂溶性成分。单独使用 SCF-CO₂ 很难达到满意效果和提取物标准,这是因为 CO₂ 本身性质的限制。我们首先进行第二类超临界流体的筛选,并确定为一种特殊的醇类物质。从实验结果来看,萃取率随流体比增加而增加,流体含量的增加不仅可以提高溶质在溶剂中的溶解度,还可以提高超临界萃取的选择性,增加了分离因子。见图 2。

2.2 温度:在 SCFE 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。所以,温度对实验萃取率的影响随温度升高而增加。在超临界流体萃取过程中,当温度升高时,单位体积流体

内,达到缔合能以上的 CO_2 分子数增加,溶解度就有增加,只有与溶质分子缔合的 CO_2 分子达到一定数目,溶质才能溶解在超临界流体中,溶解度才能增加。实验

结果如表 1 和图 3 所示,认为最佳萃取温度为 40°C 。

2.3 压力:压力是 SCFE 中最重要的操作参数,压力对超临界流体的相对体积质量、粘度和扩散系数的影响较大。实验表明:当

压力低于 10 MPa 时,超临界流体对银杏黄酮和银杏内酯的萃取率很低。在 $10\sim 20\text{ MPa}$ 压力范围内,随着压力的升高,有效成分的萃取率也随着上升。根据分析可知,在低压区, CO_2 的体积质量比较小,相应其溶解能力也较小,所以萃取率较低。在高压区,随着压力的增大,流体体积质量显著增加,有效成分的溶解能力相应增加。在过高压区,高压使生产成本明显提高,其萃取率增加有限。因此,最佳的萃取压力为 20 MPa 。见图 4。

表 1 温度变化与 SCFE 实验结果

萃取温度($^\circ\text{C}$)	30	35	40	45	50
萃取率(%)	2.892	3.182	3.343	3.364	3.418

2.4 粒度:粒度直接影响 SCFE 的操作周期和产品得率,从实验结果看,产品萃取得率随

粒度变小而直线上升。这是因为粒度的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,因此,溶质分子与超临界流体接触机会越多,萃取得率提高,萃取操作周期

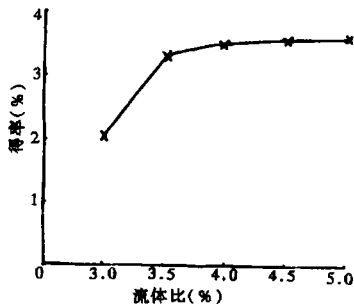
缩短。另外,银杏叶的粒度小,装填体积质量高,萃取器的利用率也高。粒度太小,银杏叶其它成分在萃取中也比较容易出来,影响了萃取产品的质量。在选择确定原料粒度时,还要注意银杏叶工业上粉碎的难度和能耗。综合以上分析,萃取银杏叶有效成分的最佳粒度为 5 目。见图 5。

2.5 操作时间:在 SCFE 过程中,决定萃取得率的一个基本因素就是超临界流体与溶质银杏叶有效成分的接触时间。

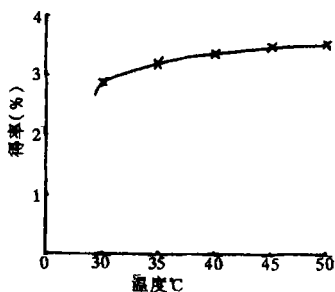
由图 6 分析可知,萃取时间增加,有利于超临界流体与溶质银杏叶有效成分的溶解平衡,增加萃取时间就增加萃取得率。

由于萃取一定时间后,随着银杏叶有效成分的减少,再增加萃取时间,萃取得率增加缓慢。随着时间的延长,超临界萃取的能耗也在增加。而且,银杏叶的其它无效成分也被萃取出来,直接影响超临界流体萃取产品的最终质量。综合实验结果,最佳萃取时间为 90 min 。

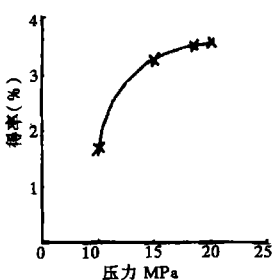
2.6 流量:SCF- CO_2 萃取流量的影响有两方面:一是增加临界流体流量,流体在萃取器中的停留时间减小,流体与溶质银杏叶有效



温度 40°C , 5 目,
90 min, 15 L, 20 MPa
图 2 流体比对萃取得率的影响

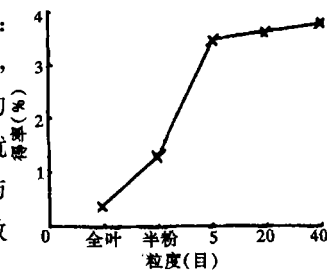


温度 40°C , 20 MPa, 15 L,
5 目, 流体比 3.5%
图 3 温度对萃取得率的影响



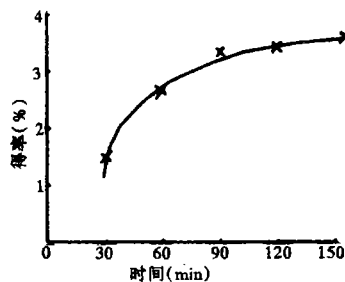
时间 90 min, 流体比 3.5%, 流量 15 L, 粒度 5 目, 温度 40°C

图 4 压力对萃取得率的影响



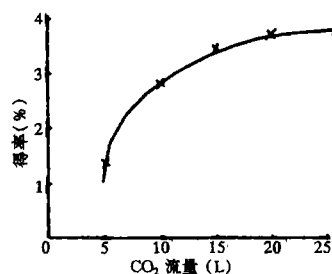
CO_2 流量 15 L, 时间 90 min,
温度 40°C , 压力 20 MPa,
流体比 3.5%

图 5 粒度对萃取得率的影响



粒度 5 目, CO₂ 流量 15 L,
流体比 3.5%, 温度 40℃

图 6 时间对萃取率的影响



粒度 5 目, 时间 90 min, 压力 20
MPa, 流体比 3.5%, 温度 40℃

图 7 流量对萃取率的影响

往往增加了萃取操作能耗; 流速增加, 相同时间里的萃取率增加了, 但单位质量流体的萃取率下降了。流体流速过低, 又会使萃取操作的时间延长, 设备利用率下降。所以, 要选择合适的循环流量和压缩比, 从实验结果分析来看, 流量选择 15 L 为好。

3 总结

本项目以银杏叶有效成分分离为对象, 进行了第二类 SCFE 过程的研究, 获得了大量的实验数据和理论分析结果, 为今后这一技术的工业化和其它同类的 SCFE 过程研究提供了参考。初步结论如下:

1) 利用超临界流体的溶解度参数研究了最常用的萃取剂 CO₂ 的溶剂功能, 表明 CO₂ 是亲脂性非极性溶剂, 以及分析了提高超临

界 CO₂ 的溶解度和选择性的途径。

2) 以银杏叶有效成分分离为对象, 建立了第二类 SCFE 技术及一套 SCFE 小试、中试的实验装置和实验方法。通过对 SCFE 过程的影响因素, 如流体比、CO₂ 萃取流量、萃取压力、萃取时间、萃取温度和银杏叶粉碎粒度的研究, 包括分离压力与温度的研究, 得到第二类 SCFE 银杏叶有效成分的最佳工艺参数。

3) 通过对 SCFE 方法与溶剂萃取方法的比较可知: SCFE 的萃取得率高 (3.4%), 比溶剂萃取方法 (1%) 高出 2 倍; SCFE 流程短, 萃取分离一步完成。萃取批试操作时间为 2 h, 比溶剂萃取方法 (24 h) 缩短 11 倍, 提高了工作效率; 银杏叶有效成分的质量 (银杏黄酮含量为 28%, 银杏内酯含量为 7.2%) 高于国际现行公认的质量标准; SCFE 采用 CO₂ 为萃取介质, 在 35℃~40℃ 进行萃取操作, 保持了银杏叶有效成分的天然品质, 而且不存在有害有机溶剂和重金属残留。

致谢: 银杏叶有效成分的测试委托上海华东理工大学分析测试中心完成, 特此致谢。

参考文献

- 1 刘桂霞, 等. 国外医药-植物药分册, 1994, 9(1): 10
- 2 Hubert P, et al. Chem Ind, 1982, 19(50): 25
- 3 宫地洋, 等. 药志(日), 1987, 107(5): 367
- 4 Johnston K P, et al. Chem Res, 1989, 28: 1115
- 5 Stahc. ETAL, Busenges Pyhs Chem, 1984, 88: 900
- 6 原永芳, 等. 药学报, 1996, 31: 282
- 7 吴俊生, 等. 分离工程. 上海: 华东理工大学出版社, 1992
- 8 林春绵, 等. 化学反应工程工艺, 1997, 13(1): 24
- 9 高勇. [博士学位论文]. 上海: 华东理工大学, 1994
- 10 骆赞椿, 等. 化工学报, 1990, 4(4): 395
- 11 Frnacls A M. J Phs Chem, 1954, 58: 1099
- 12 Mchagh M A, et al. Supercritical Fluid Extraction, Principles and Pracice. But Teruorth, Boston, 1986
- 13 Hasler A, et al. J Chromatogr, 1992, 605: 41
- 14 Beek T, et al. J Chromatogr, 1991, 543: 375

(1998-10-19 收稿)

A Study on Effective Components from Ginkgo Leaves (*Ginkgo biloba*)

by Second Supercritical Fluid Extraction

Deng Qihuan and Gao Yong (Guilin Tianhe Pharmaceutical Industry Ltd. Co., Guilin 541001)

Abstract A laboratory-pilot plant scale second supercritical fluid extraction (SCFE) equipment was

installed and used to optimize the SCFE conditions for the effective extraction of active components from leaves of *Ginkgo biloba* L.. Effects of six variables (pressure, temperature, extracting time, fluids ratio, CO₂ ratio, and size of powdered leaves) on the yield and quality of product were studied. As a result, a light-yellow product containing 28% flavonol glycosides and 7.2% terpene lactones were obtained.

Key words *Ginkgo biloba* L. supercritical fluid extraction (SCFE) effective components

干姜、姜皮、炮姜中辣味成分的 HPLC 测定[△]

山东农业大学食品科学系(泰安 271018) 黄雪松* 汪建民
山东林业学校 王兆升

摘 要 采用 HPLC 法测定了干姜、姜皮、炮姜中的姜酚含量分别为 1.022、0.28 和 0.25 g/100 g; 姜酮含量分别为 0.90、0.18 和 4.8 g/kg; 炮姜中的姜脑含量为 0.4 g/kg, 姜粉、姜皮中含微量姜脑。该测定方法快速、准确、简便。

关键词 生姜 辣味成分 姜皮 炮姜 HPLC 法

姜 *Zingiber officinale* Roscoe 的辣味成分包括姜酚、姜脑和姜酮^[1,2], 其中的姜酚又包括 6-姜酚[1-(3'-甲氧基-羟基苯)-3-酮-5-羟基癸烷], 8-姜酚[1-(3'-甲氧基-4'-羟基苯)-3-酮-5-羟基十二烷], 10-姜酚[1-(3'-甲氧基-4'-羟基苯)-3-酮-5-羟基十四烷]等。它们是姜中重要的药效成分, 具有抗氧化^[1]、抑制胃粘膜损伤^[2]、保肝利胆^[3]、镇痛解热^[4,5]等重要作用。近年研究发现辣味物质有抗衰老、抗肿瘤等作用^[6], 因此辣味物质含量高低对姜的药用功效有重要影响。但因其分离困难, 测定时干扰成分较多及无标样等问题而难以定量测定。笔者报道用 HPLC 法测定干姜、姜皮与炮姜中的辣味成分。

1 材料方法

1.1 材料: ①干姜: 生姜原料购自山东农业大学标本园种植“莱芜生姜”品种。将新鲜生姜洗净泥砂, 控干明水, 在高效多切机上切成 2~3 mm 厚薄片, 铺在竹匾上, 自然干燥至含水量 10% (以二甲苯为溶剂, 蒸馏法测定^[7]), 得干燥姜片, 干燥率为 8.3 : 1。干姜

磨碎, 过 200 目筛, 得姜粉。

②炮姜: 请本校药剂师侯昕代为加工制作, 即取干姜片置铁锅中炒至发炮鼓起, 表面呈焦黄色时, 取出喷少许清水, 晾干, 同姜粉磨碎、过筛。

③姜皮: 洗净新鲜生姜泥砂, 浸于清水中过夜, 剥取外皮晒干, 同干姜测定含水量, 磨碎、过筛。

1.2 主要试剂: 乙腈, 甲醇, AR; 其它为实验常规试剂。

1.3 测定方法

1.3.1 标样的获得: ①姜酚: 用干姜粉提取姜油树脂, 并经硅胶干柱层析、硅胶薄板层析、葡聚糖凝胶层析等分离纯化方法获得 6, 8, 10-姜酚同系数物 1.142 g, 并经紫外可见光谱、红外光谱、质谱分析证实^[1]。以香草醛为内标, 在 752-C 紫外分光光度计上于 280 nm 测定其含量为 98.5%。

②姜酮、姜脑的制备及含量: 见文献^[1,8]。

1.3.2 姜酚、姜酮、姜脑标准曲线的测定:

①仪器: Waters 高效液相色谱仪, M-490 紫

* Address: Huang Xuesong, Department of Food Sciences and Technology, Shandong Agricultural University, Taian
黄雪松 男, 42 岁, 博士, 教授, 主要从事食品科学、加工工艺和功能食品领域的研究, 共发表论文 60 余篇, 获省、校级科研成果奖励 7 项。
[△] 山东省教委资助课题