超临界 CO_2 流体萃取山茱萸中熊果酸的研究

韩志慧，陈俊英，张景伟，刘国际*

（郑州大学化工学院，河南 郑州 450002）

摘 要：**目的** 研究超临界 CO_2 萃取山茱萸中熊果酸的工艺条件。**方法** 探讨萃取压力、萃取温度、萃取时间、CO_2 流量、夹带剂类型及用量对熊果酸收率的影响，确定了超临界 CO_2 萃取山茱萸中熊果酸的适宜条件，并将超临界 CO_2 萃取法与传统的有机溶剂提取法进行了比较。**结果** 超临界萃取最优条件：萃取压力 35.0 MPa，萃取温度 318 K，选择无水乙醇为夹带剂，夹带剂体积分数为 4%，萃取时间 3 h，CO_2 流量为 8 kg/h。**结论** 超临界 CO_2 萃取法提取熊果酸比传统提取方法收率高，安全有效。

关键词：山茱萸；熊果酸；超临界流体 CO_2 萃取

中图分类号：R284.2；R286.02 **文献标识码**：B **文章编号**：0253-2670(2005)08-1159-04

Supercritical fluid CO_2 extraction of urosolic acid from *Cornus officinalis*

HAN Zhi-hui, CHEN Jun-ying, ZHANG Jing-wei, LIU Guo-ji

(College of Chemical Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: **Objective** To study the technology of supercritical fluid CO_2 extraction (SFE CO_2) on urosolic acid from *Cornus officinalis*. **Methods** The effects of pressure, temperature, time, CO_2 flow rate types, and volume of entrainer on the urosolic acid extracts were studied. The optium conditions for SFE CO_2 was determined. The technology of SFE CO_2 was compared with that of traditional solvent extraction. **Results** The optium extraction conditions were as follows: pressure 35.0 MPa, temperature 318 K, absolute ethyl alcohol entrainer, content 4%, time 3 h and flow rate of CO_2 8 kg/h. **Conclusion** SFE CO_2 excels the traditional solvent extraction in yield, safety and efficiency.

Key words: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; urosolic acid; supercritical fluid CO_2 extraction (SFE CO_2)

超临界流体萃取（supercritical fluid extraction，简称 SFE）是 20 世纪 70 年代兴起的一门新的分离技术，由于其具有传质速度快、溶解能力强、选择性高、低温操作、无溶剂残留、节能等优点，引起国内外有关专家及学者的普遍关注。随着中药现代化进程的加快，超临界 CO_2 萃取技术提取天然产物有效成分已成为人们研究的热点。山茱萸临床上习惯以其成熟果实去核后入药，具有补益肝肾、涩精固脱之功效。山茱萸果实中含有大量维生素、各种氨基酸、环烯醚萜苷类、皂苷、熊果酸、齐墩果酸等药用及营养保健成分。本实验采用超临界 CO_2 萃取技术提取山茱萸中有效成分熊果酸，对于合理开发利用资源具有重要的现实意义。

1 仪器与试药

Aglient 1100 高效液相色谱系统，DAD 检测器及色谱工作站；KQ—50 型超声波清洗器（昆山市淀山湖检测仪器厂）；R201 旋转蒸发器（上海申生科技有限公司）；索氏提取装置。

HL-(10+1)/40 MPa+1 L/30 MPa-Ⅱ X 型超临界萃取仪由杭州华黎泵业有限公司设计制造。根据实验需要 CO_2 和夹带剂可以同时进入萃取釜。两者体积比由调频器、计量泵控制。从钢瓶出来的 CO_2 气体，经过滤器进入制冷机中冷却液化，然后经过计量泵泵入管道，同时夹带剂由夹带剂泵泵入管道，两者在混合器中混合后进入萃取釜（在恒温水浴内保温）。达设定条件后，开始闭循环动态提取分离。含溶质的 CO_2 气体经过针阀降压进入分离器Ⅰ、Ⅱ，溶质分离，CO_2 循环使用。

乙腈、甲醇、乙酸铵（色谱纯）；乙醇、乙醚（分析纯）；水（二次重蒸水）；熊果酸对照品（中国药品生物制品检定所，批号 742-200111）。

山茱萸取自河南省西峡县当年采收干制的山茱

收稿日期：2004-10-16

基金项目：河南省重点科技攻关项目（0523020300）

作者简介：韩志慧（1970—），女，河南省南阳市人，郑州大学化工学院讲师，博士研究生，主要从事超临界流体原理和应用方面的研究。Tel：(0371) 3887503 E-mail：zhihuihan@zzu.edu.cn

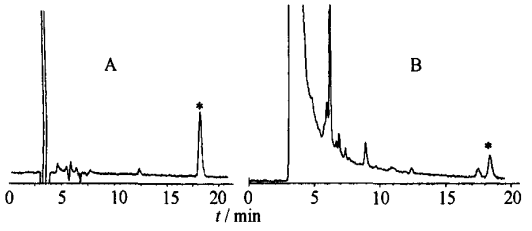
*通讯作者 刘国际 Tel：(0371) 67781101 E-mail：guojiliu@zzu.edu.cn

萸肉，经河南农业大学朱长山教授鉴定为山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的成熟果实，除去果核及梗，333 K 干燥 6 h，粉碎，过 40 目筛备用。

2 方法与结果

2.1 熊果酸的测定

2.1.1 色谱条件：色谱柱：Zorbax SB-C_{18} 柱（200 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-甲醇-水-乙酸铵（70∶16∶14∶0.5）；体积流量：0.7 mL/min；柱温：室温。HPLC 谱图见图 1，熊果酸色谱峰的保留时间约为 18.3 min，分离度大于 1.6。



*-熊果酸

*-urosolic acid

图 1 熊果酸对照品（A）和超临界 CO_2 萃取物（B）HPLC 色谱图

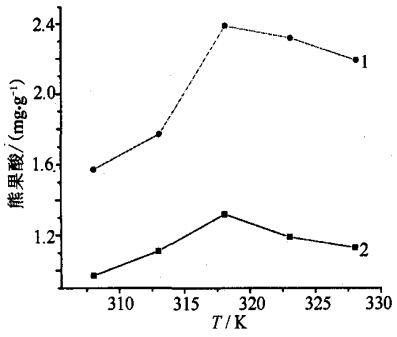
Fig. 1 HPLC chromatograms of urosolic acid reference substance (A) and extracte of SFE-CO_2 (B)

2.1.2 标准曲线的制备：精密称取熊果酸对照品 11.28 mg，用甲醇溶解于 10 mL 量瓶中。吸取该液 0.01、0.02、0.04、0.1、0.2 mL 置 1 mL 量瓶中，甲醇定容，进样 10 μL，测定。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程为 $A=0.007\ 61+2\ 211.908\ 12\ C$，$r=0.999\ 89$，线性范围 11.28～225.6 μg/mL。最小检出限（信噪比≥3）为 0.028 μg。

2.1.3 测定：取各溶液进样测定，采用外标法计算熊果酸的质量分数。

2.2 超临界 CO_2 萃取条件的选择：每次投料 120.00 g，分离釜Ⅰ、Ⅱ的压力均为 5 MPa，温度 323 K，在此实验条件下，重点考察了萃取温度、萃取压力、夹带剂的种类和用量、萃取时间和 CO_2 流量对萃取收率的影响。

2.2.1 萃取温度的选择：无水乙醇为夹带剂，夹带剂的体积分数为 4%，动态循环 3 h，分别考察了 25.0、35.0 MPa 压力下温度对萃取收率的影响。结果见图 2。318 K 为最佳萃取温度。表明温度影响超临界萃取的二重性：一方面温度升高，溶质挥发度增大，在 CO_2 中的溶解度增大；另一方面温度升高，CO_2 密度下降，溶剂的溶解能力下降。



1-35 MPa 2-25 MPa

图 2 温度对熊果酸收率的影响

Fig. 2 Effects of temperature on urosolic acid yield

2.2.2 萃取压力的选择：318 K 下压力对熊果酸收率的影响见图 3。结果表明：在 20.0～35.0 MPa，压力升高，CO_2 密度增加，熊果酸收率增加极为明显，超过 35 MPa 后，熊果酸收率随压力升高，增加不太明显，所以最佳压力选为 35 MPa。

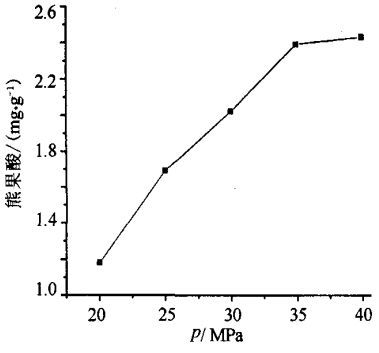


图 3 压力对熊果酸收率的影响

Fig. 3 Effects of pressure on urosolic acid yield

2.2.3 夹带剂种类的选择：CO_2 是一个极性较弱的 Lewis 酸，对极性较强、相对分子质量较大的物质，萃取效果不够理想。若在萃取时加入结构中含有低溶解度参数、低极性或电子给予作用的 Lewis 碱性基团的夹带剂，则对 CO_2 表现出极大的亲和性。含有这些特性的亲 CO_2 官能团包括硅氧烷、全氟醚、全氟烷烃、叔胺、脂肪醚、炔醇和炔二醇等。这些化合物的存在可有效地促进其他有机物在超临界 CO_2 中的溶解。人们在寻找高效的夹带剂的研究中还发现胺类及含有—OH、—C=O 等基团的夹带剂能有效地增大酸、醇、酚、酯等溶质在超临界 CO_2 中的溶解度。原因在于夹带剂与溶质形成了分子间作用力较强的氢键，氢键的形成对萃取效率有很大的影响。预试验发现在不加夹带剂的情况下，只有少量的熊果酸被提取出来。在萃取压力 35.0 MPa、萃取温度 318 K 时，实验选择不同的有机溶剂作为夹带剂来

考察其对熊果酸收率的影响。结果表明丙酮、乙醚作为夹带剂时，熊果酸的收率太低，而无水乙醇、甲醇、无水乙醇-乙二醇(95∶5)作夹带剂时，收率较高。考虑到甲醇和乙二醇的毒性，夹带剂选定为无水乙醇，见表 1。

表 1 夹带剂的种类对熊果酸收率的影响

Table 1 Effects of various entrainer on urosolic acid yield

夹带剂	熊果酸/(mg·g^{-1})
无水乙醇	2.39
无水乙醇-乙二醇(95∶5)	2.48
甲醇	2.26
95%乙醇	1.93
乙醚	1.57
丙酮	1.75

2.2.4 夹带剂用量的选择：萃取压力 35.0 MPa，萃取温度 318 K，无水乙醇为夹带剂，夹带剂的用量对熊果酸收率有非常明显的影响，见图 4。结果表明夹带剂体积分数为 4%的用量是最合适的。

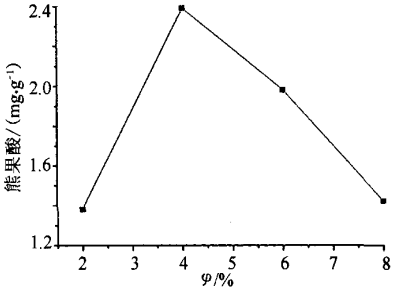


图 4 夹带剂的用量对熊果酸收率的影响

Fig. 4 Effects of entrainer volume on urosolic acid yield

2.2.5 萃取时间的选择：每隔 30 min 取样 1 次，实验发现萃取 3 h 后，熊果酸的增加极为缓慢，故确定最佳萃取时间 3 h，见图 5。

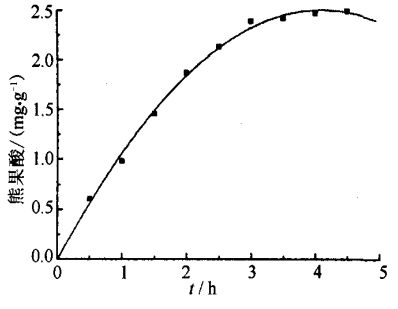


图 5 萃取时间对熊果酸收率的影响

Fig. 5 Effects of extracting time on urosolic acid yield

2.2.6 CO_2 流量的影响：CO_2 流量的变化对萃取效率主要有两方面的影响。一方面流量太大，溶解平衡远不能达到，不利于萃取率的提高，且过大流量易带走微细粉尘，堵塞高压管道；另一方面流量太小，萃取时间延长，不利于设备工作效率的提高。综合两方面，CO_2 流量为 8～10 kg/h 是合适的。

2.3 各提取方法的比较

2.3.1 SFE-CO_2 法：取 120 g 备用原料装入萃取釜中，萃取压力 35.0 MPa，萃取温度 318 K，以 4%无水乙醇为夹带剂，动态萃取 3 h，CO_2 流量为 8 kg/h，进行超临界萃取。合并分离器Ⅰ、Ⅱ萃取物，转移 0.5 g 至 50 mL 量瓶中，乙醇定容，超声溶解，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取滤过液测得山茱萸中熊果酸的质量分数为 2.39 mg/g。

2.3.2 超声波提取[1]：精密称取 1.000 2 g 山茱萸粗粉于具塞锥形瓶中，加入 40 mL 无水乙醇浸泡过夜，超声波振荡 30 min(水温过热换水)，滤过，置 50 mL 量瓶中，加乙醇至刻度。微孔滤膜滤过，测得山茱萸中熊果酸的质量分数为 2.13 mg/g。

2.3.3 索氏提取[2]：精密称取 1.000 8 g 山茱萸粗粉于索氏提取器中，加 75 mL 无水乙醚，水浴回流 4 h，提取液回收至干，用石油醚(30～60 ℃)浸泡 2 min，倾去石油醚，残留物加无水乙醇微热使溶解，移至 50 mL 量瓶中，并加乙醇至刻度。微孔滤膜滤过，测得山茱萸中熊果酸的质量分数为 1.81 mg/g。

2.3.4 醇提法[1]：精密称取 1.000 7 g 山茱萸粗粉，置圆底烧瓶中，加 40 mL 无水乙醇，浸泡过夜，水浴回流提取 2 h，趁热滤过至 50 mL 量瓶中，加乙醇至刻度。微孔滤膜滤过，测得山茱萸中熊果酸的质量分数为 2.08 mg/g。

2.3.5 酸解醇提法[3]：精密称取 1.006 g 山茱萸粗粉，加 10%硫酸溶液水解 4 h，滤过，残渣用水洗至中性。加入 40 mL 无水乙醇，水浴回流 2 h，乙醇定容至 50 mL 量瓶中，0.45 μm 微孔滤膜滤过，测得山茱萸中熊果酸的质量分数为 2.68 mg/g。

3 讨论

3.1 超临界 CO_2 提取山茱萸中熊果酸的适宜工艺条件为：萃取压力 35.0 MPa，萃取温度 318 K，以无水乙醇为夹带剂，夹带剂体积分数为 4%，动态萃取 3 h，CO_2 流量为 8 kg/h。

3.2 几种提取方法相比，酸解醇提法中熊果酸较高，说明部分熊果酸以苷的形式存在，超临界 CO_2 萃取法中熊果酸略低于酸解醇提法，避免了无机酸与大量有机溶剂的使用，具有成本低、杂质少，提取完全、环境良好等优点。

3.3 超临界 CO_2 提取物的 HPLC 图提示：在 30 和 55 min 左右出现两个很大的未知峰，这在其他几种溶剂提取中是没有的。为寻找新的植物化学组分提

供了新的方法。

3.4 溶剂提取后的原料只能丢弃，超临界 CO_2 提取后，原料的性状、结构、形态几乎没有任何改变，可以继续提取超临界不适合的组分，为中药资源的合理开发利用提供了新方法。

References:

[1] Xu D R, Ding Q, Wang Z T. Determination of urosolic acid and oleanolic acid in Zhibai Dihuang Pill by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (11): 996-997.

[2] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol Ⅰ. 2000.

[3] Xie Y, Hang T J, Chen Z. Determination of oleanolic acid and urosolic acid in Chinese traditional drugs by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26 (9): 615-616.

纳米黄芪粉的显微结构和有效成分溶出的研究

马培艳[1,2]，傅正义[1]，苏艳丽[1]

(1. 武汉理工大学 材料复合新技术国家重点实验室，湖北 武汉 430070；2. 武汉理工大学理学院，湖北 武汉 430070)

摘 要：目的 对黄芪药材进行纳米级粉碎的研究。**方法** 采用 HSCS 超细粉碎机进行纳米粉碎，Zeta PALS 光散射粒度分布及电位分析仪进行粒度分析和 Zeta 电位测定，并采用显微观察法对药物组织结构进行显微特征的观察。**结果** 纳米黄芪悬浮液中固体颗粒平均粒径为 81.7 nm，大部分细胞壁被破碎，黄芪皂苷和多糖直接进入水中。**结论** 黄芪纳米化后可促进有效成分的溶出。

关键词：蒙古黄芪；纳米粉碎；显微特征；皂苷

中图分类号：R286.02 **文献标识码：**B **文章编号：**0253-2670(2005)08-1162-03

Microscopic characteristics and effective component's dissolution of nano particles of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*

MA Pei-yan[1,2], FU Zheng-yi[1], SU Yan-li[1]

(1. State Key Laboratary of Advanced Technology for Material Synthesis and Processing, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China; 2. School of Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao; nano-pulverization; microscopic characteristics; saponin

纳米技术在生物、医学领域的飞速发展对传统中医药产生了深刻的影响。纳米雄黄、纳米石决明等药物已被制备出来[1~4]，但是草药由于多纤维而使其纳米化成为难题。日本奈良机械所研制的 HSCS 超细粉碎机采用先进的超细粉碎方式，通过高速自转的粉碎环获得传统粉碎机粉碎介质所得不到的强大离心力和剪切力，在短时间内将植物粒子粉碎成亚微米的超细粉末。该仪器的密闭磨腔外套有水冷却装置，使整个粉碎过程在接近室温、无污染环境下操作，保证了药物在粉碎过程中活性成分不被破坏。

黄芪为豆科植物，具有强心利尿、降血压等作用。现代药理研究表明，该药对心血管系统、血液系统、肾功能、物质代谢及肿瘤均有良好的作用。有研究表明黄芪有增强机体非特异免疫和增强机体抵抗力的功能[5]。其主要的化学成分为黄芪皂苷和多糖。本实验通过 HSCS 超细粉碎机将黄芪粉碎到纳米量级，并研究了粉碎前后药物的显微特征的变化，为研究纳米技术对中药有效成分的溶出、生物利用度的影响提供参考。

1 仪器与材料

HSCS 超细粉碎机(日本奈良机械所)，Zeta PALS 光散射粒度分布及电位分析仪(美国 Brook haven 公司)，Orthoplan 偏光显微镜(西德莱茨公司)。黄芪药材购于武汉街道口中药店，经湖北省中医药研究院中药研究中心鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根；所用试剂均为分析纯。

2 纳米黄芪粉体制备和表征

2.1 纳米黄芪粉体的制备：将黄芪洗净烘干，常规粉碎，过 180 目筛，得黄芪细粉。取 10 g 细粉，加蒸馏水作分散剂，投入 HSCS 超细粉碎机的投料罐中

收稿日期：2004-11-25