

超临界 CO₂ 萃取白首乌中的 C₂₁ 甾苷

吕志敏¹, 田 鹭^{1,2,*}, 朱卫华²

(1.盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224003; 2.江苏大学化学化工学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 目的: 对白首乌中 C₂₁ 甾苷超临界 CO₂ 流体萃取工艺参数进行优化。方法: 采用 L₁₆(4⁵) 正交试验, 以萃取压力(A)、萃取温度(B)、萃取时间(C)、原料粒度(D)、夹带剂量(E)作为考察因素, 每个因素选四个水平, 采用 2- 去氧糖反应法测定各萃取条件下 C₂₁ 甾苷的相对含量, 以波长 590nm 处吸光度为判定依据, 确定最优萃取条件。结果: B、D、E 因素对 C₂₁ 甾苷提取能力的影响最大, C 因素影响最小。结论: 最优萃取条件为萃取压力 30MPa、萃取时间 90min、萃取温度 55℃、原料粉碎粒度 40 目、夹带剂量 2.0ml/g。

关键词: 白首乌; C₂₁ 甾苷; 超临界 CO₂ 萃取; 正交试验

Supercritical Carbon Dioxide Extraction of C₂₁ Steroidal Glycosides from *Cynanchum bungei* Decne. Root

LÜ Zhi-min¹, TIAN Lu^{1,2,*}, ZHU Wei-hua²

(1. College of Chemistry and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Objective: To optimize the parameters of supercritical CO₂ extraction of C₂₁ steroidal glycosides from *Cynanchum bungei* Decne. root by orthogonal design. Methods: Five affecting factors such as extraction pressure, extraction temperature, extraction duration, particle size of material and 95% ethanol (entrainer) dosage were investigated by single factor test, and each factor was assigned with four levels for orthogonal design. Absorbance at 590 nm was taken to represent C₂₁ steroidal glycoside content as the index to determine the optimal extraction conditions. Results: The Temperature, the particle size of material and the 95% ethanol dosage were the main factors affecting the extraction of C₂₁ steroidal glycosides, while the extraction duration presented the smallest effect. The optimal extraction conditions were as follows: pressure, 30 MPa; particle size of material, 40 mesh; 95% ethanol dosage, 2.0 ml/g; temperature 55 °C; and extraction duration 90 min.

Key words: *Cynanchum bungei* Decne. root; C₂₁ steroidal glycosides; supercritical CO₂ extraction; orthogonal test

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)12-0127-04

白首乌味甘、苦, 性微温, 它因含有多种有效活性成分而具有良好的防癌抗癌、调节氧代谢、降低血脂、增强免疫及保护肝脏、养血补血、乌须黑发等功效^[1-2]。C₂₁ 甾体酯苷类是白首乌的特征活性成分和主要药效成分, 在体外实验中, C₂₁ 甾苷具有卓越的清除超氧阴离子自由基^[3]和羟自由基^[4]的能力; 在动物实验中, 它能够调节免疫功能^[5]、抵抗内源性自由基对机体的氧化损伤^[6]。鉴于 C₂₁ 甾苷引人注目的药理活性, 它的相关研究亦受到日益广泛的重视。

目前文献报道的 C₂₁ 甾苷的主要提取方法有 95% 乙醇回流提取^[7-8]、乙酸乙酯回流提取^[9]、氯仿室温提取^[10]、甲醇室温提取^[11]、石油醚-异丙醇(3:2)混合溶剂渗漉提取^[12]等。这些方法都存在一定的局限性, 比如有机溶剂

的残留, 热敏性物质或化学不稳定性成分会发生变化等。超临界 CO₂ 萃取法(supercritical carbon dioxide extraction)是近 20 年来国际上发展迅速的新一代化工分离技术, 与传统方法比较, 有许多独特的优点, 如操作温度低、分离效率高且无溶剂残留等。有关超临界 CO₂ 萃取技术在提取白首乌活性成分方面的研究还未见报道。因此, 开展超临界 CO₂ 流体萃取技术分离提取白首乌天然有效成分 C₂₁ 甾苷的研究, 对充分开发利用白首乌资源有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜白首乌 江苏滨海。

收稿日期: 2008-08-25

作者简介: 吕志敏(1953-), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然物的提取与分离。E-mail: luzm@ycit.cn

* 通讯作者: 田鹭(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然物的提取与分离。E-mail: heron.tian@163.com

HA121-50-01型超临界萃取装置 江苏南通华安超临界萃取有限公司; 冷冻干燥机 北京康博医药公司; 720B 可见分光光度计 上海尤尼柯公司; 二氧化碳(纯度 $\geq 99.9\%$) 盐城气体化工有限公司。

1.2 工艺流程

新鲜白首乌 \rightarrow 去皮 \rightarrow 粉碎 \rightarrow 冷冻干燥 \rightarrow 干粉过筛 \rightarrow 装料 \rightarrow 超临界 CO_2 萃取 \rightarrow 减压分离 \rightarrow 萃取液

1.3 样品测定

将各组超临界 CO_2 萃取液真空旋转蒸发至干, 用冰乙酸转移至 100ml 容量瓶中, 并用冰乙酸定容至刻度, 混匀。取此溶液各 2ml, 于 10ml 容量瓶中定容至刻度。参照文献[13], 取 1ml, 加三氯化铁-硫酸-冰乙酸试剂(5% 的三氯化铁溶液 1ml, 水 1.5ml, 浓硫酸 5ml, 混匀后加冰乙酸至 100ml) 3ml, 混匀, 反应达 2h, 在波长 590nm 处测定吸光度。参比管以 1ml 冰乙酸代替上述 1ml 的样品液。

1.4 C_{21} 甾苷的萃取

称取 100g 白首乌粉样品, 置于 1L 萃取罐中, 密封系统。将分离器 I 和分离器 II 的温度和压力分别控制在 55°C 、7MPa, CO_2 流量控制在 25L/h。待装置达到指定的萃取温度后开始进行萃取实验, 萃取结束后, 将分离器 I 和分离器 II 所得产物合并, 并测其吸光度, 比较各萃取条件下 C_{21} 甾苷的相对含量。

2 结果与分析

2.1 萃取压力对吸光度的影响

固定萃取温度 45°C 、萃取时间 3h、原料粒度 40 目、夹带剂量 1.0ml/g, 改变萃取压力, 考察萃取压力对 C_{21} 甾苷吸光度的影响, 结果见图 1。

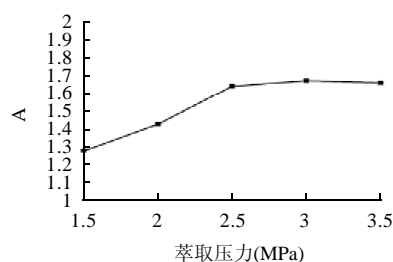


图1 萃取压力对 C_{21} 甾苷吸光度的影响

Fig.1 Effects of pressure on extraction of C_{21} steroidal glycosides

由图 1 可以看出, C_{21} 甾苷的吸光度随萃取压力变化在 25MPa 时达最大。这是因为当压力增加时, CO_2 的密度也增加, 其溶解能力增强, 故吸光度随压力的增大而增大。压力大于 25MPa 后萃取率开始降低是因为随着萃取压力的升高传质速率降低, 从而影响了 CO_2 的溶解能力, 导致吸光度下降。从实验结果可知, 25MPa

为较佳萃取压力。

2.2 萃取温度对吸光度的影响

固定萃取压力 25MPa、萃取时间 3h、原料粒度 40 目、夹带剂量 1.0ml/g, 改变萃取温度, 考察萃取温度对 C_{21} 甾苷吸光度的影响, 结果见图 2。

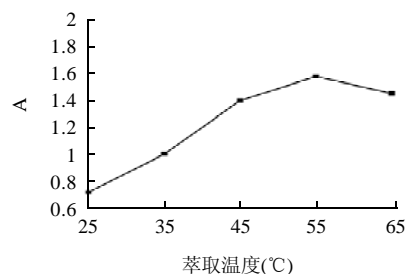


图2 萃取温度对 C_{21} 甾苷吸光度的影响

Fig.2 Effects of temperature on extraction of C_{21} steroidal glycosides

图 2 表明, 随着萃取温度的升高, C_{21} 甾苷的吸光度增加, 但当温度升高到 55°C 后, C_{21} 甾苷吸光度趋于下降, 这是因为在较低的温度下, C_{21} 甾苷在超临界 CO_2 中的溶解过程属于动力学控制, 温度升高, C_{21} 甾苷在超临界 CO_2 中的扩散能力增强, 溶解速率加快, 吸光度增加。在较高的温度下, C_{21} 甾苷在超临界 CO_2 中的溶解过程属于热力学控制, 温度升高, 超临界 CO_2 的密度降低, 导致 C_{21} 甾苷在超临界 CO_2 中的平衡溶解度减小, 吸光度下降。

2.3 萃取时间对 C_{21} 甾苷吸光度的影响

固定萃取压力为 25MPa、萃取温度为 55°C 、原料粒度 40 目、夹带剂量 1.0ml/g, 改变萃取时间, 考察萃取时间对 C_{21} 甾苷吸光度的影响, 结果见图 3。

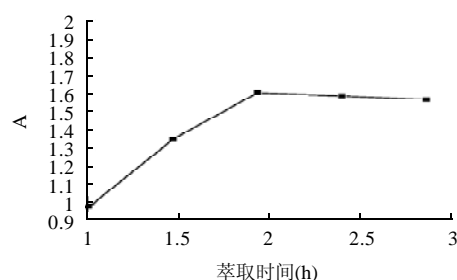


图3 萃取时间对 C_{21} 甾苷吸光度的影响

Fig.3 Time course of extraction of C_{21} steroidal glycosides

从图 3 可见, C_{21} 甾苷的吸光度随提取时间的延长而增加, 但到一定时间后吸光度增加趋势趋于平缓并略有下降, 这表明提取时间过长, 对提高 C_{21} 甾苷萃取能力的意义不大, 因此选择 2h 为最佳萃取时间。

2.4 原料粒度对 C_{21} 甾苷吸光度的影响

固定萃取压力 25MPa、萃取时间 2h、萃取温度 55°C 、夹带剂 1.0ml/g, 改变原料粒度, 考察原料粒度对 C_{21} 甾

苷吸光度的影响, 结果见图4。

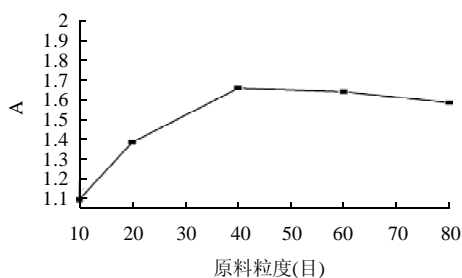


图4 原料粒度对C₂₁甾苷吸光度的影响

Fig.4 Effects of particle size of material on extraction of C₂₁ steroidal glycosides

从扩散理论上说, 原料粉碎得越细, 与萃取溶剂的接触面越大, 扩散面也越大, 故扩散速度越快, 萃取效果越好。但粉碎得过细的原料粉末, 不适于萃取, 因为过细的粉末在萃取时虽能提高其萃取效果, 但吸附作用亦增加, 因而使扩散速度受影响。由图4可以看出, 在选择95%乙醇为夹带剂的情况下, 40~60目的粉碎粒度为最宜。

2.5 夹带剂量对C₂₁甾苷吸光度的影响

固定萃取压力25MPa、萃取时间2h、原料粒度60目、萃取温度55℃, 改变夹带剂用量, 考察夹带剂量对C₂₁甾苷吸光度的影响, 结果见图5。

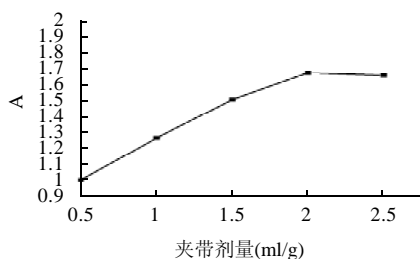


图5 夹带剂量对C₂₁甾苷吸光度的影响

Fig.5 Effects of 95% ethanol dosage on extraction of C₂₁ steroidal glycosides

结果表明, 随着95%乙醇量的增加, C₂₁甾苷的吸光度先升高后降低。夹带剂量达到2.0ml/g后, 吸光度减小, 即对C₂₁甾苷的提取能力减小, 因此选择夹带剂量2.0ml/g为最佳。

2.6 超临界CO₂萃取C₂₁甾苷正交试验

为确定各因素对C₂₁甾苷相对含量的影响及各因素之间的相互作用, 在以上单因素试验得出的相对较佳的试验条件的基础上, 设计L₁₆(4⁵)正交试验, 考察萃取压力(A)、萃取温度(B)、萃取时间(C)、原料粒度(D)、夹带剂量(E)对C₂₁甾苷相对含量的影响, 因素水平及结果见表1, 方差分析结果见表2。

表1 正交试验因素水平及结果

Table 1 Design and results of orthogonal test for optimizing supercritical CO₂ extraction of C₂₁ steroidal glycosides and range analysis

试验号	A 压力 (MPa)	B 温度 (℃)	C 时间 (h)	D 原料粒度 (目)	E 夹带剂量 (ml/g)	吸光度
1	20	35	1.5	20	0.5	0.7055
2	20	45	2.0	40	1.0	1.6231
3	20	55	2.5	60	1.5	1.4604
4	20	65	3.0	80	2.0	1.3360
5	25	35	2.0	60	2.0	1.7356
6	25	45	1.5	80	1.5	1.6937
7	25	55	3.0	20	1.0	0.8855
8	25	65	2.5	40	0.5	1.2829
9	30	35	2.5	80	1.0	1.1148
10	30	45	3.0	60	0.5	1.7439
11	30	55	1.5	40	2.0	1.8405
12	30	65	2.0	20	1.5	0.8096
13	35	35	3.0	40	1.5	0.9586
14	35	45	2.5	20	2.0	1.6350
15	35	55	2.0	80	0.5	1.0001
16	35	65	1.5	60	1.0	1.2353
K ₁	1.281	1.121	1.346	1.001	1.183	
K ₂	1.372	1.661	1.285	1.416	1.207	
K ₃	1.367	1.279	1.373	1.536	1.218	
K ₄	1.207	1.166	1.224	1.274	1.619	
R	0.165	0.540	0.149	0.535	0.436	
优水平	A ₂	B ₂	C ₃	D ₃	E ₄	
主次顺序	B > D > E > A > C					

表2 正交试验方差分析

Table 2 Variance analysis for the results of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
压力	0.074	3	1.370	
温度	0.723	3	13.389	*
时间	0.054	3	1.000	
粒度	0.636	3	11.778	*
夹带剂量	0.523	3	9.685	*
误差	0.05	3		

注: F_{0.05(3,3)}=9.280; *.表示差异显著。

由表1可知, 各因素对超临界CO₂萃取C₂₁甾苷能力的影响程度由大到小为萃取温度>原料粒度>夹带剂用量>萃取压力>萃取时间。由表2可知, 因素B、D、E对C₂₁甾苷提取能力有显著性影响, 其他两个因素没有显著性影响。适宜的提取工艺为A₂B₂C₃D₃E₄, 即萃取压力25MPa、萃取时间150min, 萃取温度45℃、原料粒度60目、夹带剂量2.0ml/g。为验证所得结果的准确性, 在此最佳工艺条件下进行验证实验, 测得吸光度为1.8765, 高于正交试验中吸光度最高组。

3 结论

通过单因素试验和正交试验得出超临界CO₂萃取白

首乌中 C_{21} 甾苷的最佳工艺条件为萃取压力 30MPa、萃取温度 55℃、萃取时间 1.5h、原料粉碎粒度 40 目、夹带剂量 2.0ml/g。

参考文献:

- [1] 肖培根, 连文琰. 中药植物原色谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 379
- [2] 张士侠, 李心, 尹家乐, 等. 江苏地产白首乌 C_{21} 甾苷抗衰老作用研究[J]. 实用老年医学, 2007, 21(2): 104-107.
- [3] 宋俊梅, 丁霄霖. 白首乌对超氧阴离子自由基清除作用的研究[J]. 食品科学, 1997, 18(9): 61-64.
- [4] 宋俊梅, 丁霄霖. 白首乌中 C_{21} 甾苷元清除羟自由基的功能[J]. 无锡轻工大学学报, 1998, 17(2): 43-46.
- [5] 宋俊梅, 王增兰. 白首乌 C_{21} 甾苷对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(6): 588-593.
- [6] 宋俊梅, 王元秀, 丁霄霖. 白首乌 C_{21} 甾苷抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(12): 22-25.
- [7] 娄红祥, 李铎. 华北白前中的 C_{21} 甾体类成分[J]. 药学学报, 1992, 27(8): 596-602.
- [8] LI J, KADOTA S, KAWATA Y, et al. Constituents of the roots of *Cynanchum bungei* DECNE. Isolation and structures of four new glucosides, bungeiside-A, -B, -C, and -D[J]. Chem pharm Bull, 1992, 40(12): 3133-3137.
- [9] 木全章, 周茜兰. 西藏牛皮消化学成分的研究[J]. 云南植物研究, 1986, 8(2): 169-170.
- [10] TSUKAMOTO S, HAYASHI K, MITSUHASHI H, et al. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants.LXII[J]. Tetrahedron, 1985, 41(5): 927-934.
- [11] SUGAMA K, HAYASHI K, MITSUHASHI H. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LXVI. The structures of three new glycosides, cynapanosides A B and C from the Chinese drug 'XU-Chang-Qing', *Cynanchum paniculatum* Kitagawa[M]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, 34(11): 4500-4507.
- [12] 龚树生, 刘成娣, 刘锁兰, 等. 白首乌化学成分的研究[J]. 药学学报, 1988, 23(4): 276-280.
- [13] 宋俊梅, 丁霄霖. C_{21} 甾苷提取方法的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(9): 61-65.