

超临界 CO₂ 萃取结晶岩白菜素工艺初探

高杰, 张文成*, 潘见

(合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

摘要: 采用单因素试验法探讨超临界 CO₂ 萃取结晶过程中压力、温度、夹带剂对岩白菜素纯度、结晶率的影响, 并借助扫描电镜进行晶体形貌考察, 利用高效液相色谱进行纯度检测。实验结果表明, 超临界 CO₂ 萃取结晶后得到的岩白菜素晶体在结晶板上按纯度梯度分布; 选择较佳工艺参数为压力 15MPa, 温度 55℃, 时间 50min, 流量 15L/min 时, 得到岩白菜素晶体的纯度超过 92%, 结晶率达 60% 以上。

关键词: 超临界 CO₂; 萃取; 萃取结晶; 岩白菜素

Primary Study on Technology of Bergenin Crystallized by Supercritical CO₂

GAO Jie, ZHANG Wen-cheng*, PAN Jian

(Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: The effect of pressure, temperature and entrainers of extraction and crystallization on the purity and the crystal ratio of bergenin were investigated via single factor test, observing shape of crystal with scanning electron microscope (SEM), determining purity of bergenin by high performance liquid chromatography (HPLC). The result showed that the crystal of bergenin was distributed in grad on crystallization board; when we select the optimized parameters: pressure 15 MPa, temperature 55 °C and ethanol, the purity of bergenin was more than 92% and the crystal ratio was more than 60%.

Key words supercritical CO₂; extraction; recrystallization; bergenin

中图分类号: TQ420.66

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0264-04

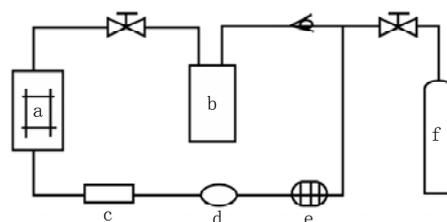
岩白菜素, 又名岩白菜内酯、矮茶素、佛手配质, 是虎耳草科植物岩白菜、落新妇的有效成分。《中华人民共和国药典》2005 版收录为镇咳祛痰药, 主要用于治疗慢性支气管炎^[1], 此外国外的药理研究表明它还具有抗炎、护肝、促进病变组织恢复, 免疫增强, 抗 HIV 病毒等功效^[2-4], 精制纯化岩白菜素有助于后续中药新药开发或进行结构修饰改性。

目前, 岩白菜素的分离纯化工艺主要是采用传统的溶剂提取法和化学溶剂结晶分离等技术^[5-6], 其分离率低, 产品质量差; 关于超临界流体结晶纯化岩白菜素的研究未见文献报道。超临界流体萃取结晶为新型分离技术^[7], 具有高效分离纯化某些天然产物有效成分的功能^[8]。为此, 作者以岩白菜素为研究对象, 采用超临界 CO₂ 萃取结晶技术进行分离纯化方面研究, 以期获得高纯中药有效成分——岩白菜素。本研究重点考察了萃取结晶压力, 温度和夹带剂对岩白菜素的影响。

1 材料与方

1.1 设备

40MPa 超临界二氧化碳萃取结晶装置(自行研制), 1.6L 梯度结晶釜(高径比 10:1), 工艺流程如图 1; HI-tachiX-650 扫描电子显微镜 日本日立。



a. 萃取结晶釜; b. 分离釜; c. 热交换器; d. 过滤器; e. 压缩机; f. CO₂ 钢瓶。

图 1 实验装备工艺流程

Fig.1 Flow chart of experimental apparatus

1.2 材料

岩白菜素(含量为 70%) 合肥拓峰生物工程有限公司; 岩白菜素标准品 中国药品生物制品检定所; 二

收稿日期 2007-08-11

*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29976008)

作者简介: 高杰(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物超临界萃取结晶。

氧化碳(99.8%, 食品级)、无水乙醇(分析纯)、丙酮(分析纯)、甲醇(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯) 上海试剂厂。

1.3 色谱检测条件^[9-10]

Waters HPLC 系统: 包括 515 型输液泵; 2487 紫外双波长检测器; 色谱柱 Waters Symmetry Shield C₁₈ (5μm, 4.6mm × 150mm); 流动相: 甲醇:水=40:60(V/V), 流速 0.8ml, 检测波长 275nm。

1.4 方法

选择对萃取结晶效果有显著影响的压力、温度、夹带剂等条件进行单因素试验, 进行初步的工艺参数优化研究。

结晶率按下式^[11]计算:

$$A = \frac{m \times y_1}{m \times y_0} \times 100\%$$

式中, A 为结晶率, %; m₀ 为原料质量, g; y₀ 为原料中岩白菜素的含量, %; m₁ 为结晶板上晶体质量, g; y₁ 为萃取结晶后岩白菜素的含量, %。

2 结果与分析

2.1 压力对萃取结晶的影响

2.1.1 压力对萃取结晶率的影响

控制结晶釜温度为 55℃, 时间 50min, CO₂ 流量为 15L/min, 夹带剂为乙醇, 结晶板材料为不锈钢板条件下, 选择压力分别为 10、12、15 和 18MPa 进行实验。得压力—结晶率变化曲线如图 2 所示。

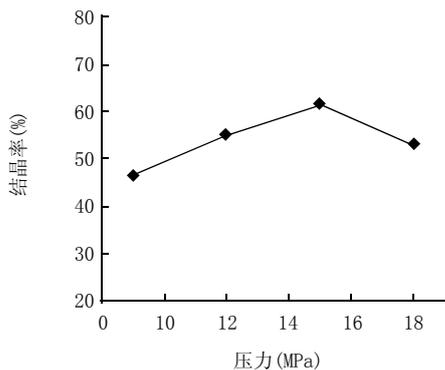


图2 萃取结晶压力对结晶率的影响
Fig.2 Effects of pressure on crystal ratio of bergenin

2.1.2 结晶板上结晶分布

根据图 2 的变化规律, 在选择结晶量较多的压力条件 15MPa, 其他条件不变的情况下, 将结晶板自底至顶平均分成三部分, 由下自上取样, 得结晶版位置—纯度变化曲线如图 3 所示。

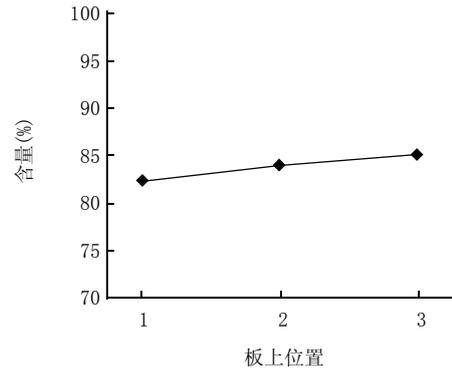


图3 岩白菜素晶体在板上的分布
Fig.3 Distribution of bergenin on crystal board

2.1.3 压力对结晶纯度的影响

由图 3 可知, 在相同压力条件下, 同一板上不同位置的结晶纯度不同, 上部结晶纯度最大, 下部结晶纯度最小, 为进一步说明压力与结晶纯度的关系, 取板中部结晶为研究对象, 分别测定其在 10、12、15 和 18MPa 条件下的纯度, 得压力—纯度变化曲线如图 4 所示。

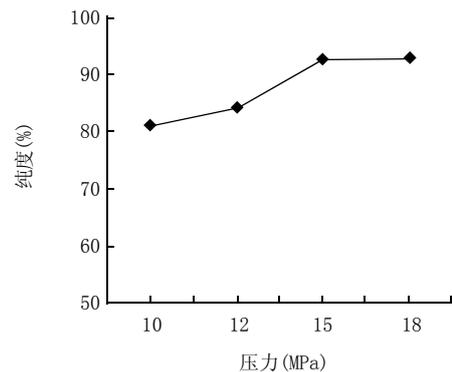


图4 压力对结晶纯度的影响
Fig.4 Effects of pressure on purity of bergenin

由图 2 可知在其他条件不变的情况下, 随着萃取结晶压力的升高, 岩白菜素的结晶量先增大再减小。这主要是由于在较低压力取值范围, 随着压力增大超临界 CO₂ 的萃取能力增强, 在此阶段萃取结晶占优势; 而当压力超过一定值后, 超临界 CO₂ 的溶解性提高, 溶解能力增强, 此时结晶出的晶体重新被溶解, 对结晶形成负作用, 导致结晶量减少。从晶体纯度上来看, 由图 3 可知岩白菜素晶体在结晶板上呈梯度分布, 结晶板上部的晶体纯度最高, 这可能是由于结晶过程中各种物理化学因素综合作用, 产生类似薄层层析的效果从而导致晶体纯度呈梯度分布。而图 4 的变化曲线则表明压力越高, 所得晶体的纯度就越高, 在其他条件不变的情况下当压力为 15MPa 时, 产品纯度就已超过 92%。

2.2 温度对萃取结晶的影响

在压力为 15MPa, 时间 50min, CO₂ 流量为 15L/min, 夹带剂为乙醇, 结晶板材料为不锈钢板条件下, 选择温度分别为 35、45、55 和 65℃。全板取样得温度—结晶率变化曲线如图 5 所示。

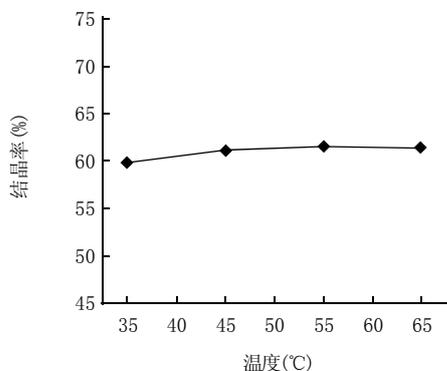


图5 温度对结晶率的影响

Fig.5 Effects of temperature on crystal ratio of bergenin

由图 5 可知在一定的温度范围内适当的升高温度有利于结晶的产生, 但当温度超过某一定的限度后, 结晶量开始减少, 这种现象可能是由于温度升高导致分子的运动加剧, 提高了结晶速度, 而当温度达到一定值后岩白菜素分子“活性”大于结晶板吸附作用, 抗吸附结晶占优势, 引起结晶量下降。所以应控制萃取结晶温度不超过 65℃。

2.3 夹带剂对萃取结晶的影响

2.3.1 夹带剂对萃取结晶率的影响

在萃取压力分别为 15MPa, 萃取温度为 55℃, 萃取时间为 50min, CO₂ 流量为 15L/min, 结晶板材料为不锈钢的条件下, 按照极性顺序分别选择甲醇, 无水乙醇, 丙酮和乙酸乙酯四种夹带剂, 得夹带剂—结晶率变化图如图 6 所示。

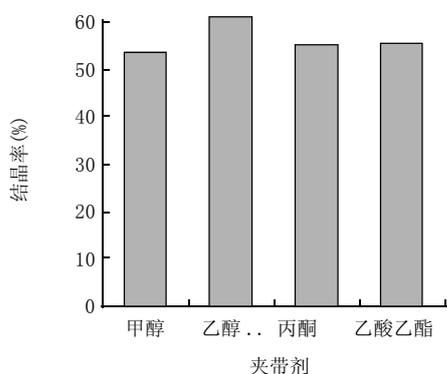


图6 不同夹带剂对结晶率的影响

Fig.6 Influence of different entrainers on crystal ratio of bergenin

2.3.2 夹带剂对结晶形貌的影响

在以上的实验条件下, 将不同夹带剂协同所得到的岩白菜素晶体在电子显微镜下进行观察, 得不同夹带剂条件下晶体的 SEM 图(如图 7 所示)。

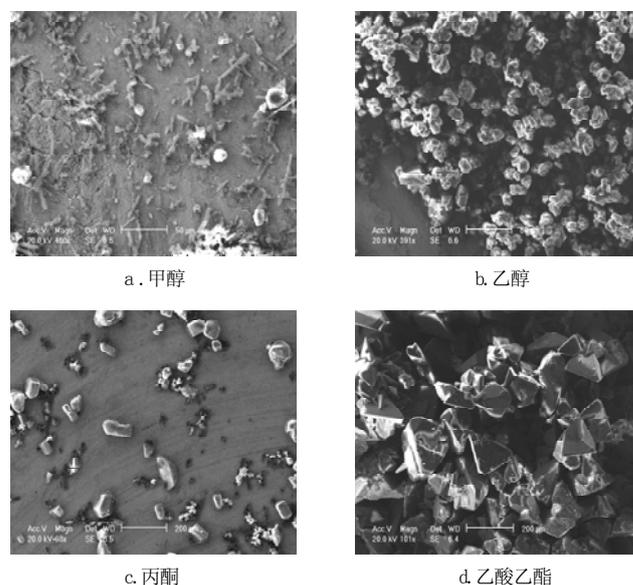


图7 不同夹带剂协同作用下晶体的 SEM 图

Fig.7 Scanning electron microscope (SEM) of bergenin crystal with four kinds of entrainer respectively

由图 7 可以看出, 在其他工艺参数相同的条件下, 不同夹带剂协同超临界 CO₂ 萃取结晶岩白菜素所得的晶体形貌存在着一定的差异, 如甲醇作为夹带剂所得晶体多为棒状, 乙醇作为夹带剂多为立方体, 丙酮为长方体, 而乙酸乙酯则多为三角形, 并且从图 7 中也可以看出 b 晶体的颗粒度比较均匀, 粒径也最小。产生这些差异的原因初步分析是由于不同夹带剂与超临界 CO₂ 结合形成不同性质的结晶溶剂, 这些不同结晶溶剂与溶质间的相互作用力如氢键、静电力、分子间作用力等不同, 导致溶质在结晶时不同晶面上的生长速率不同从而产生不同的晶体形貌。

3 结论

3.1 超临界 CO₂ 萃取结晶岩白菜素中晶体在结晶板上按纯度梯度结晶分布, 且板上部的晶体纯度最高。

3.2 随着结晶压力的升高, 结晶板上晶体的纯度也相应的增大, 但超过一定范围之后随压力的升高结晶量降低; 随着温度的升高结晶率先增后降。

3.3 选择不同的夹带剂对岩白菜素的结晶率、晶体的形貌都有影响; 考虑药物的生物利用度, 一般选择结晶颗粒度较均匀, 粒径较小的晶体进行生产。

3.4 在本实验条件下, 较佳的工艺参数为萃取结晶压力 15 MPa, 温度 55℃, 夹带剂为无水乙醇, 时间

发酵菜籽粕脱毒工艺优化研究

陆 豫¹, 余 勃^{1,*}, 藏 超¹, 杨胜远², 邓丽娟¹

(1. 南昌大学中德联合研究院, 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌市生物化工重点实验室, 江西 南昌 330047;
2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004)

摘 要: 目的: 探索菜籽粕固体混菌发酵脱毒的最佳工艺条件。方法: 采用中心组合旋转实验设计, 评价发酵工艺中的 5 个关键因素, 即初始 pH、接种量、发酵温度、发酵时间和水料比及其交互作用对硫甙脱除率的影响, 确定最佳反应条件。结果: 建立了 5 个发酵条件的一个 2 次多项式数学模型, 该模型极显著 ($p < 0.0001$), 拟合优度良好。借助模型方程产生的等高线图及统计软件, 分析得出最大硫甙脱除率下各个因子的最适水平分别为 pH5.1, 接种量 6.2%, 水料比 2:1, 发酵时间 47h, 发酵温度 29℃。在此条件下, 硫甙脱除率达到了 97%。结论: 应用响应曲面法可适用于不同复配菌种的发酵工艺优化方法, 科学有效的。

关键词: 菜籽粕; 脱毒; 固体发酵; 中心旋转组合设计

Optimization of Culture Medium of Multiple Strains for Reduction of Toxicity in Rapeseed Meals

LU Yu¹, YU Bo^{1,*}, ZABG Chao¹, YANG Sheng-xuan², DENG Li-juan¹

(1. Sino-German Joint Research Institute, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang Key Laboratory of Biochemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Objects: To research the optimization of reduction of toxicity by fermentation of rapeseed meals. Methods: A central composite rotatable design with two star points according to the principles of response surface methodology was adopted. The influences of pH, time, temperature, seed content and the ration of water to material and their interactions on the reduction of toxicity were valuated and the optimum variable combination for the highest reduction ratio was determined with the assistance of statistical software and the contour plots. Results: A good quadratic polynomial model was obtained. According to the ANOVA, the model was significant ($p < 0.0001$) and there was no lack of fit. By analyzing the contour plots generated by the model, the optimal levels for each variable were as follow: pH5.1, time 47 h, temperature 29 °C, seed content 6.2% and the ratio

收稿日期 2007-05-18

*通讯作者

作者简介: 陆豫(1957-), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物化工。

50min, CO₂ 流量为 15L/min; 重复试验结果都得到纯度超过 92% 岩白菜素晶体, 且结晶率达 60% 以上。

参考文献:

- [1] 夏从龙, 刘光明, 马小匡. 岩白菜素的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17: 432-433.
- [2] NAZIR N, KOUL S, QURISHI M A, et al. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis-A flow cytometric study[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 112: 401-405.
- [3] HWA-KYUNG L, HACK-SEANG K, HONG-SERCK, et al. Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of Mallotus japonicus, on carbon tetrachloride-intoxicated rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2000, 72: 469-474.
- [4] KAKUKO A, KIYOSHI S, MASAATSU U. Effects of bergenin on experimental ulcers—prevention of stress induced ulcers in rats[J]. General Pharmacology, 1980 (11): 361-368.
- [5] 孙敏, 师冰, 徐榕雪. 岩白菜素提取工艺制剂及质量标准研究综述[J]. 云南中医中药杂志, 2005, 26: 56-57.
- [6] 王刚, 麻兵继. 岩白菜素的研究概况[J]. 安徽中医学院学报, 2002, 21: 59-61.
- [7] 潘见, 朱剑中. 物质成分的超临界流体结晶分离方法[P]. 中国专利: 1220906A. 1999-06-30.
- [8] 张文成, 潘见, 陈克勋. 超临界CO₂萃取结晶穿心莲内酯的工艺优化[J]. 食品科学, 2005, 26: 119-122.
- [9] 任静, 李多伟, 陈俐宏, 等. 反相高效液相色谱法测定鬼灯檠中岩白菜素的含量[J]. 理化检测: 化学分册, 2005, 41: 329-330.
- [10] 张文珠, 师彦平, 刘霞, 等. 中药岩白菜素的反相高效液相色谱分析[J]. 分析科学学报, 2003, 19: 525-527.
- [11] 张文成, 潘见, 张兴元. 夹带剂对超临界CO₂萃取结晶穿心莲内酯的影响[J]. 农业工程学报, 2006, 22: 224-227.