

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.03.008

文章编号: 1005- 8982 (2017) 03- 0041- 04

论著

超临界 CO₂ 萃取银杏叶中总黄酮醇苷的 夹带剂工艺条件

刘雯¹, 李素娟², 马丹凤³

(1.湖北省武汉市普爱医院 药剂科,湖北 武汉 430032;2.湖北省武汉市东西湖区人民医院 药剂科,
湖北 武汉 430040;3.湖南省儿童医院 药剂科,湖南 长沙 410007)

摘要:目的 探讨夹带剂在超临界二氧化碳 CO₂ 中萃取银杏叶总黄酮醇苷的工艺条件。**方法** 以夹带剂加入方式、夹带剂种类、夹带剂加入量及夹带剂流速为考察因素,总黄酮醇苷的提取率作为考察指标,用 L₉(3⁴) 正交表优化工艺条件,高效液相色谱法测定总黄酮醇苷含量。**结果** 夹带方式选择预浸 + 动态萃取模式,以 95%乙醇作为夹带剂,加入量 300 ml,加入流速 10 ml/min。在上述条件进行超临界萃取时,总黄酮醇苷提取率可达 5.03%。萃取压力 20 MPa,萃取温度 60℃,出口温度 70℃,用 95%乙醇液态收集萃取物,动态萃取时间 1 h。**结论** 该实验优选的工艺明显提高超临界 CO₂ 萃取银杏叶中总黄酮醇苷的提取效率。

关键词: 夹带剂;超临界 CO₂ 萃取;总黄酮醇苷;正交实验

中图分类号: R284

文献标识码: A

Process condition of entrainer in extracting total favonol glycosides from *Ginkgo* leaves by supercritical CO₂

Wen Liu¹, Su-juan Li², Dan-feng Ma³

(1. Department of Pharmacy, Wuhan Pu'ai Hospital, Wuhan, Hubei 430032, China;
2. Department of Pharmacy, the People's Hospital of East and West Lake District,
Wuhan, Hubei 430040, China; 3. Department of Pharmacy, Hunan Children's
Hospital, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: Objective To research the process condition of entrainer in extracting total favonol glycosides from *Ginkgo* leaves by supercritical CO₂. **Methods** The optimum extraction technology condition was investigated by orthogonal experiment [L₉(3⁴)] with extraction rate of total favonol glycosides as the evaluation index, and with the addition way, kind, amount and flow rate of entrainer as investigation factors. The content of total favonol glycosides was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The adding way of entrainer is the presoak treatment plus dynamic extraction type, the entrainer was 95% alcohol, with 300 ml infusing volume and 10 ml/min flowing rate. The best factors of supercritical fluid extraction were as follows: extraction pressure 20 MPa, extraction temperature 60℃, outlet temperature 70℃, collecting extracts with 95% alcohol, dynamic extraction time 1 h. Under the processing conditions, the extraction rate of total favonol glycosides was 5.03%. **Conclusions** Supercritical CO₂ extraction with the optimized process significantly improves the extraction of total flavonol glycosides from *Ginkgo* leaves.

Keywords: entrainer; supercritical CO₂ extraction; total favonol glycosides; orthogonal experiment

银杏叶为银杏科植物银杏的干燥叶,其药用价值很高。银杏叶中含有黄酮苷类化合物、萜类内酯化合物及少量多酚类、酮类、生物碱等成分^[1]。其药理作用包含对中枢神经系统的保护和心血管系统的调节^[2]。

采用超临界二氧化碳 CO_2 萃取银杏叶中黄酮类化合物,在超临界流体中加入部分夹带剂,极大地增加提取效率^[3-5]。曾琦华等^[6]研究表明,夹带剂的选择对超临界 CO_2 萃取银杏叶中黄酮类化合物有着重要影响。张玉祥等^[7]研究得出,银杏内酯类受夹带剂影响不大,而黄酮类化合物需要更多夹带剂的结论。本文研究不同的夹带剂加入种类及加入方式下进行超临界 CO_2 萃取银杏叶中黄酮类化合物,并对实验条件进行正交优化。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

银杏叶购自本地药材市场,槲皮素 批号:100081-200907)、山柰素 批号:110861-201310)、异鼠李素(批号:110860-201410)均购自中国食品药品检定研究院,甲醇为色谱纯,乙醇、磷酸为分析纯。Speed SFC 超临界萃取仪(美国 Applied Separations 有限公司),Ulti Mate 3000 液相色谱仪(美国赛默飞科技有限公司),AUW220D 分析天平(日本岛津科技有限公司)。

1.2 夹带剂单因素考察

银杏叶粉碎过 20 目筛,30℃减压干燥 2 h,每次称取 50 g 置于萃取釜中。参考张玉祥^[7]和孙婷^[8]的研究,选择固定萃取压力 20 MPa,萃取温度 60℃,出口温度 70℃,95%乙醇液态收集萃取物,动态萃取时间 1 h。分别对夹带剂加入方式、夹带剂种类、夹带剂加入量及夹带剂流速进行考察。

1.2.1 夹带剂加入方式 选取 95%乙醇作为夹带剂,添加量 100 ml,动态萃取时加入流速为 10 ml/min。添加方式:① 预浸。萃取前将 100 ml 夹带剂全部加入萃取釜中,浸泡 12 h 后进行动态萃取。② 预浸 + 动态萃取。萃取前将 50 ml 夹带剂加入萃取釜中,浸泡 12 h 后进行动态萃取,剩余 50 ml 夹带剂通过泵在动态萃取开始时按照加入流速加入。③ 预浸 - 静态萃取 + 动态萃取。萃取前将 50 ml 夹带剂加入萃取釜中,浸泡 12 h 后先按照萃取条件静态萃取 1 h,剩余 50 ml 夹带剂通过泵在静态萃取完成后动态萃取开始时按照加入流速加入。

1.2.2 夹带剂种类 采取预浸 + 动态萃取,夹带剂添加量 100 ml,动态萃取时加入流速为 10 ml/min。夹带剂选择无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇进行萃取。

1.2.3 夹带剂加入量 采取预浸 + 动态萃取,选取

95%乙醇作为夹带剂,动态萃取时加入流速为 10 ml/min。分别选择 100、200、300 和 400 ml 夹带剂进行萃取,预浸夹带剂量均为 50 ml。

1.2.4 夹带剂流速 采取预浸 + 动态萃取,选取 95%乙醇作为夹带剂添加 100 ml。夹带剂流速设定 5、10、15 和 20 ml/min。

1.3 夹带剂的正交优化

为全面考察夹带剂在超临界 CO_2 萃取银杏叶黄酮类化合物中的影响,在单因素的基础上采用 L₉(3⁴) 的正交设计,进行各因素之间协同作用的考察。取银杏叶原料 50 g,萃取压力 20 MPa,萃取温度 60℃,出口温度 70℃,95%乙醇液态收集萃取物,以夹带剂加入方式、夹带剂种类、夹带剂加入量及夹带剂流速作为考察因素,以总黄酮醇苷的提取率为考察指标,确定夹带剂的最佳工艺条件。见表 1。

表 1 L₉(3⁴)因素水平表

水平	A 夹带剂加入方式	B 夹带剂种类	C 夹带剂加入量/ml	D 夹带剂流速 (ml/min)
1	预浸	无水乙醇	100	5
2	预浸 + 动态萃取	95%乙醇	200	10
3	预浸 - 静态萃取 + 动态萃取	70%乙醇	300	15

1.4 分析方法

1.4.1 总黄酮醇苷的测定方法 采用高效液相色谱法 high performance liquid chromatography, HPLC^[9]。选取 Thermo C18 填充柱,以甲醇 - 0.1%磷酸溶液 50 : 50 为流动相,检测波长为 360 nm。

1.4.2 对照品溶液制备 分别取槲皮素对照品 12.52 mg、山柰素对照品 12.60 mg、异鼠李素对照品 8.33 mg,置于 250 ml 量瓶中,加甲醇稀释并定容刻度,制成对照品混合溶液。

1.4.3 线性考察 吸取混合溶液进样,依次进样 3、6、9、12、18 μl,采用上述色谱方法测定,以各自色谱峰面积 - 浓度做标准曲线,得到各自的回归方程。见表 2。

表 2 回归方程

对照品	回归方程	R ²
槲皮素	Y=1.036X - 0.4444	0.9984
山柰素	Y=0.6401X - 1.3463	0.9995
异鼠李素	Y=0.3697X + 0.1889	0.9944

1.4.4 样品含量测定 将收集的银杏叶萃取液用 95%乙醇定容至 100 ml,取 10 ml 提取液挥干,残

渣加甲醇溶解转移至 50 ml 量瓶,加甲醇至刻度,作为供试品溶液。溶液过 0.22μ m 滤膜进行 HPLC 分析。进样量 10μ l,记录色谱峰面积,带入标准曲线计算总黄酮醇苷含量,按下列公式计算总黄酮醇苷的提取率。

$$\text{总黄酮醇提取率} = \frac{\text{总黄酮醇苷质量}}{\text{银杏叶干物质取样量}} \times 100\%$$

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 萃取剂单因素试验

选择预浸 + 动态萃取的萃取方式提取率 4.891%) 高于预浸 - 静态萃取 + 动态萃取 (4.727%), 并远高于仅预浸的萃取方式 (3.005%)。95%的乙醇作为夹带剂提取率 (4.905%) 高于其他 3 种夹带剂的水平。夹带剂

表 3 L9(3⁴)正交试验结果

实验号	A	B	C	D	总黄酮醇苷的提取率/%
1	1	1	1	1	2.971
2	1	2	2	2	3.053
3	1	3	3	3	2.676
4	2	1	2	3	4.803
5	2	2	3	1	4.914
6	2	3	1	2	4.313
7	3	1	3	2	4.552
8	3	2	1	3	4.493
9	3	3	2	1	4.275
总黄酮醇苷的提取率/%					
k ₁	2.900	4.109	3.926	4.053	
k ₂	4.677	4.153	4.044	3.973	
k ₃	4.440	3.755	4.047	3.991	
极差 R	1.777	0.398	0.121	0.080	
因素 (由大到小)	A、B、C、D				
优方案	A ₂ B ₂ C ₃ D ₃				

表 4 萃取银杏叶中总黄酮醇苷工艺条件的方差分析

总变异	自由度	SS	MS	F 值	P 值
A	2	5.584	2.791	507.636	0.000
B	2	0.286	0.143	26.000	0.042
C	2	0.029	0.014	2.636	0.237
D	2	0.011	0.003	1.000	0.571
误差	2	0.010	-	-	-

的加入量从 100~400 ml、流速从 5~20 ml/min 对提取率的影响不大,基本维持在同一水平。见表 3、4 和图 1~4。

2.2 正交实验优化结果

夹带剂条件正交试验各因素对总黄酮醇苷提取

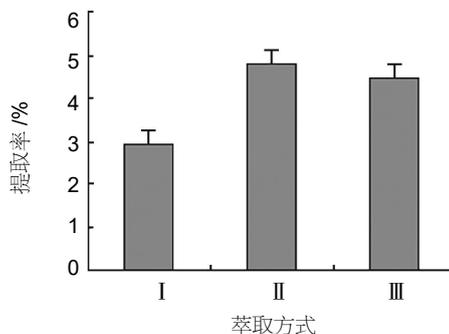


图 1 夹带剂加入方式的影响

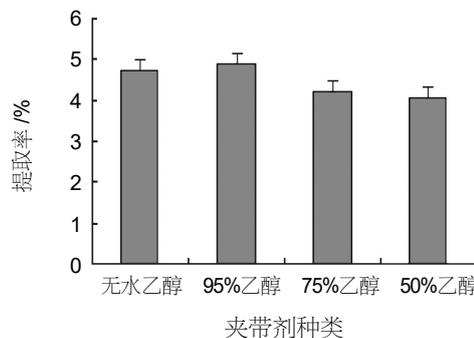


图 2 夹带剂种类的影响

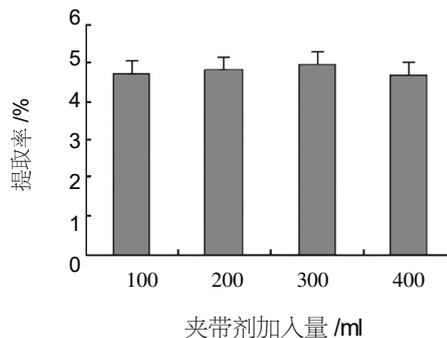


图 3 夹带剂加入量的影响

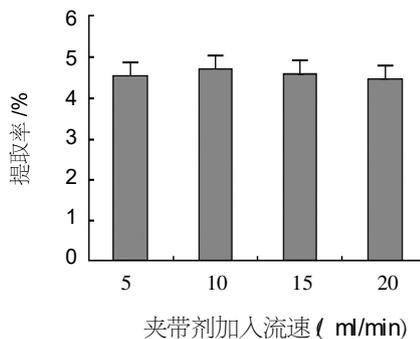


图 4 夹带剂加入流速的影响

率影响的由大到小依次为 A、B、C、D,其最佳组合条件为 A₂B₂C₃D₃,最优条件下提取率达 4.914%。

3 讨论

3.1 夹带剂加入方式的影响

萃取方式 II:预浸 + 动态萃取总黄酮醇苷的提取率最高。因为样品在较多的乙醇溶液中预浸,待萃取成分处于更加液态的环境中,使超临界流体 CO₂ 的扩散阻力较大,在萃取中传质效果不好,进而影响整个萃取效率。而采用较少的乙醇溶液进行预浸,在动态萃取中不断加入新鲜的夹带剂,使整体萃取环境更加顺畅,传质速度也得到较大提高,从而使整个萃取过程更加顺利,提高萃取效率。萃取方式 III 是在预浸完成后先静态萃取,萃取效果相对于方式 II 略微降低,这是因为预浸状态下乙醇溶液对样品起到溶胀作用,再进行静态萃取并没有对整个过程中产生太大影响,而且静态萃取拉长整个萃取时间,样品在高压环境下有效成分有所损失,所以萃取效率有所下降。

3.2 夹带剂种类的影响

95%乙醇作为夹带剂总黄酮醇苷的提取率最高。这是因为在 CO₂-乙醇-水的三元体系中,乙醇相对于水更易溶于 CO₂ 中,乙醇溶液的含水量越少,其在超临界体系中的溶解性越高,传质过程更为顺畅,提取率越高。而 95%乙醇与无水乙醇比较,含水量相差不大,而在预浸的过程中,95%乙醇对基质的溶胀效果更明显,所以其提取率也更高。

3.3 夹带剂加入量的影响

300 ml 夹带剂用量下总黄酮醇苷的提取率最高。这是因为夹带剂能够增加超临界 CO₂ 的溶解能力及选择性,使待萃取物质更易被萃取出来。而随着夹带剂的进一步增多,提取率未得到提升,这说明夹带剂的加入要适量,夹带剂过多会使萃取环境呈液态,不利于萃取进行,而且会产生更多的残留溶剂。

3.4 夹带剂流速的影响

10 ml/min 流速下总黄酮醇苷的提取率最高。这是因为随着流速的增加,处于待萃取物质分子周围的夹带剂浓度增强,其传质过程更加迅速,而随着流速的进一步增加,会使得夹带剂分子不能完全有序地排列到基质的周围,导致整体夹带剂浓度增加而局部夹带剂浓度呈减少的趋势,从而使萃取效率在逐渐减弱。

3.5 正交优化

夹带剂条件正交试验各因素对总黄酮醇苷提取率影响的由大到小依次为 A、B、C、D,其最佳组合条

件为 A₂B₂C₃D₃。夹带剂加入方式对总黄酮醇苷提取有影响,而夹带剂的种类也有影响。由于各单因素最佳实验条件并不在正交表中,按照单因素最佳条件与正交表中最佳条件分别进行 3 次实验验证,总黄酮醇苷提取率分别为 (5.03±0.07)% 和 (4.97±0.05)%,故夹带剂最佳条件选择为预浸 + 动态萃取。

本实验研究夹带剂在超临界 CO₂ 中萃取银杏叶总黄酮醇苷的工艺条件,以总黄酮醇苷的提取率作为考察指标,采用单因素试验对夹带剂加入方式、夹带剂种类、夹带剂加入量及夹带剂加入流速进行考察,采用正交试验进行工艺优化,确定夹带剂最佳工艺条件。结果表明,采用预浸 + 动态萃取模式,选取 95%乙醇作为夹带剂,加入量 300 ml,加入流速 10 ml/min,在萃取压力 20 MPa,萃取温度 60℃,出口温度 70℃,95%乙醇液态收集萃取物,动态萃取时间 1 h 的条件下进行超临界萃取,总黄酮醇苷提取率高达 5.03%。对比国内目前对超临界 CO₂ 萃取银杏叶中总黄酮醇苷研究,明显高于张玉祥等^[4]的 4.16%,并且为超临界 CO₂ 萃取夹带剂的加入方式提出一个全新的思维方法,为进一步拓展超临界 CO₂ 萃取的应用范围提供依据。

参 考 文 献:

- [1] 王浴生,邓文龙,薛春生. 中药药理与应用[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,2000.
- [2] 邵继平,王伯初,陈欣,等. 银杏叶提取物药用价值的研究进展[J]. 重庆大学学报,2003,22(1): 130-133.
- [3] DOOLEY K M. The use of entrainers in the supercritical extraction of soils contaminated with hazardous organics[J]. Ind Eng Chem Res, 1989, 26: 2058.
- [4] IKUSHIMA Y, SAITO N, GOTO T. Selective extraction of oleic, linoleic acid, methyl esters from their mixture with supercritical carbon dioxide-entrainer systems and a correlation of the extraction efficiency with a solubility parameter[J]. Ind Eng Chem Res, 2002, 28(9): 1-109.
- [5] ROOP R K, AKGERMAN A. Entrainer effect for supercritical extraction of phenol from water[J]. Ind Eng Chem Res, 1989, 28(10): 1542-1546.
- [6] 曾琦华,黄少烈. 夹带剂在银杏叶超临界 CO₂ 萃取中的应用研究[J]. 广东药学,2001,11(6): 7-10.
- [7] 张玉祥,邱蔚芬. CO₂ 超临界萃取银杏叶有效成分的工艺研究[J]. 中国中医药科技,2006,13(4): 255-256.
- [8] 孙婷. 超临界 CO₂ 萃取银杏叶黄酮及其含量测定的研究[J]. 中国食品学报,2005,5(3): 126-129.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:296-297.

(童颖丹 编辑)