

· 论 著 ·

超临界流体萃取红豆杉中有效成分的工艺优化*

唐 倩¹, 杨元娟^{1△}, 杨 宪²

(1. 重庆医药高等专科学校药系 400030; 2 重庆赛诺药业股份有限公司 400041)

摘要:目的 建立超临界流体萃取(SFE)技术对红豆杉有效成分的萃取方法。方法 实验以有效成分紫杉醇、总黄酮和 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ(10-DAB Ⅲ)的收率以及在浸膏中的含量为指标,分别对夹带剂种类与组成、萃取温度、萃取压力和动态循环时间等因素进行观察,利用高效液相色谱法和紫外分光光度法对萃取物进行含量测定。结果 当 85%乙醇水溶液为夹带剂、萃取温度为 44℃、萃取压力为 27 Mpa、动态萃取时间为 2 h、进行 SFE 时,有利于有效成分紫杉醇、总黄酮和 10-DAB Ⅲ的萃取。SFE 紫杉醇、总黄酮和 10-DAB Ⅲ的收率分别是传统方法的 2.93、1.23、2.18 倍。结论 SFE 可以有效萃取出紫杉醇、总黄酮和 10-DAB Ⅲ 3 种成分。

关键词:红豆杉;超临界流体萃取;紫杉醇;总黄酮;10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.009

中图分类号:R979.1;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)23-3173-02

Process optimization of supercritical fluid extraction of active ingredients in taxus*

TANG Qian¹, YANG Yuan-juan^{1△}, YANG Xian²

(1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China;

2. Chongqing Sino Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 400041, China)

Abstract:Objective To establish the supercritical fluids extraction(SFE) method to extract the effective components from taxu. **Methods** Taking the yield and content of taxol, total flavonoids and 10-DAB Ⅲ as indexes, some influence factors such as co-solvent variety and its composition, the extraction temperature, pressure and dynamic extraction were studied. **Results** The experimental results showed that when 85% ethanol as co-solvent was used for 2 h of dynamic extraction under the extraction temperature of 44℃ and pressure of 27 MPa, the yield of the main active component was 2.93, 1.23, 2.18 times as much as that of the traditional method. **Conclusion** The main active component taxol total flavonoids and 10-DAB Ⅲ can be effectively extracted by SFE.

Key words: taxus; SFE; taxol; total flavonoids; 10-DAB Ⅲ

红豆杉为红豆杉科常绿乔木,其所含紫杉醇(Taxol)和 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ(10-DAB Ⅲ)成分是最有效的抗癌剂之一,10-DAB Ⅲ也是化学合成紫杉醇的重要中间体,红豆杉所含黄酮成分中,如金松黄酮除抗肿瘤外,还有抗自由基和抗衰老的作用^[1-5]。传统对紫杉醇等成分的提取有浸渍提取或渗漉法^[5]。但容易造成有效成分的损失,为克服这些缺陷,本实验以有效成分紫杉醇、10-DAB Ⅲ和总黄酮的收率为指标,对红豆杉的超临界流体萃取(supercritical fluids extraction, SFE)工艺进行了优化。

1 材料与方 法

1.1 材料 将红豆杉枝叶中粉于 40℃减压干燥至恒重;样品经重庆市中药研究院张毅副研究员鉴定为红豆杉枝叶。

1.1.1 试剂 紫杉醇和芦丁标准品均购自中国药品生物制品检定所,10-DAB Ⅲ标准品来自 sigma 公司。甲醇、乙腈为色谱纯(美国 SK Chemicals 公司),CO₂ 为医用级,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

1.1.2 仪器 HA220-50-06 超临界萃取装置(江苏南通华安超临界萃取有限公司)、RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、层析柱(10 mm×200 mm)、UV-pc1800 紫外分光光度计(北京普析)和高效液相色谱仪(日本岛津 2010AHT)等。

1.2 方法

1.2.1 SFE 装置与操作 采用萃取釜为 1 L 的超临界 CO₂ 循环萃取设备^[6-9],原料每次用约 200 g,加入适量夹带剂混匀并装入萃取釜中,升温加压到萃取需要的条件,静态浸泡一定时间,再在该温度和压力下使 CO₂ 循环,流速为 15 kg/h。设定分离釜 I、II 的温度与压力均为 50℃、8 MPa,在分离釜和萃取釜条件下,溶于超临界流体的成分因溶解度降低而分离出来,沉降在分离釜中,循环一定时间后,在分离釜底部接收萃取物并减压干燥,去除夹带剂,并对其中的主要成分进行含量测定。

1.2.2 样品测定 紫杉醇和 10-DAB Ⅲ采用柱层析,并用 HPLC 进行分析^[10-12],醇提取物或超临界提取物先用氯仿萃取除去低极性组分,40℃旋转蒸发至干,所得残渣通过装有等量硅胶 G 的层析柱,再以氯仿-甲醇或氯仿-异丙醇的体积比为 99:1 或 93:7 混合液洗脱,挥去有机溶剂后用适量甲醇溶解并用 HPLC 进行分析。对于总黄酮,以测定芦丁含量计算,采用 UV 法分析,将醇提取物或超临界提取物置于 50 mL 容量瓶中,加 5%亚硝酸钠溶液 1.0 mL,混匀,放置 6 min;加 10%硝酸铝溶液 1.0 mL,放置 6 min;加 4%氢氧化钠溶液 10.0 mL,混匀,放置 15 min,定容,供试品有絮状物,过滤,于 500 nm 波长处测定吸收度,同时准确称取芦丁对照品 10 mg,加 80%乙

* 基金项目:重庆市教育委员会立项资助项目(KJ072201)。△ 通讯作者,E-mail:yang_1889@sina.com。

醇制成浓度为 0.20 mg/mL 的芦丁对照品溶液,在相同条件下测定吸收度,通过计算,得出总黄酮的量。

2 结果

本实验结果表明,SFE 能够成功应用于红豆杉有效成分的萃取,尤当 SFE 以 85% 乙醇溶液作夹带剂、萃取温度为 44 °C、萃取压力为 27 MPa、动态循环时间为 2 h 时,为最佳萃取条件。在 SFE 实验中,固定超临界 CO₂ 的流速为 15 kg/h,所用夹带剂与原料比保持不变,为 0.7 mL/g 原料,静态浸泡时间为 0.5 h。

3 讨论

在 SPE 实验中,观察所用夹带剂的种类以及组成、萃取温度、萃取压力和萃取时间对萃取效果的影响。

3.1 流体材料对 SFE 效果的影响 使用 CO₂ 作为萃取剂,其原因为:CO₂ 有较适宜的临界条件和溶解度参数^[13-15],有机物溶解能力强,廉价易得,无毒,惰性,易于分离;且 CO₂ 不会产生任何新的“三废”物质,利于环境保护^[9]。

3.2 夹带剂种类对 SFE 效果的影响 选取萃取温度为 50 °C,萃取压力为 30 MPa,静态保持时间为 0.5 h,根据紫杉醇、总黄酮和 10-DAB III 成分的挥发度和极性情况,选用 4 种夹带剂,分别为无水乙醇、85% 乙醇、乙酸乙酯和丙酮,观察夹带剂种类对 SFE 效果的影响。结果表明:85% 乙醇作夹带剂最利于 3 种成分的萃取。以无水乙醇为夹带剂对红豆杉 SFE 进行了研究,其效果优于传统浸渍或渗漉提取,而以 85% 乙醇作夹带剂萃取效果较无水乙醇好,其原因可能由于乙醇中的水具有较好的溶胀作用,带水的乙醇可以很好的透过萃取基质细胞壁;另外紫杉醇和 10-DAB III 均具有一定的极性,带水的乙醇因其极性较大,故对红豆杉成分的溶解度提高作用更显著;当以丙酮为夹带剂时,红豆杉枝叶中紫杉醇和 10-DAB III 提取效率比纯 CO₂ 增加不多,这可能由于夹带剂与溶质分子间主要是通过氢键起作用,乙醇比丙酮易于与溶质形成氢键,因而对萃取有较大的影响。

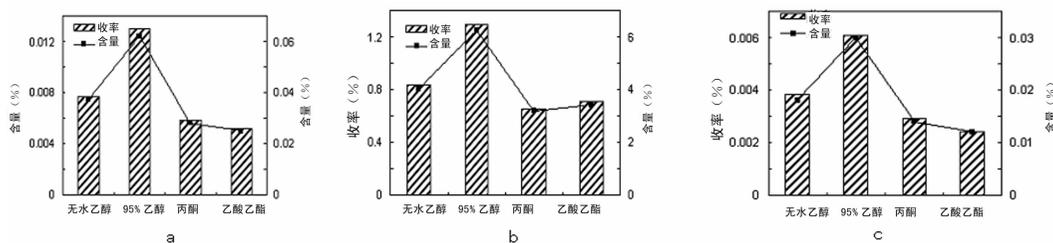
3.3 观察萃取温度对 SFE 效果的影响 选取萃取压力为 30

MPa,静态浸泡时间为 0.5 h,以 95% 的乙醇溶液作夹带剂,观察萃取温度对萃取效果的影响。结果表明:较低温度有利于紫杉醇和 10-DAB III 的萃取,说明温度升高导致超临界流体 CO₂ 分子间作用力减小,密度降低,故紫杉醇在其中的溶解度降低,虽温度升高紫杉醇与 CO₂ 分子的热运动加快,分子间缔和的机会增加,但对于紫杉醇和 10-DAB III 而言,温度升高萃取效果影响不明显;而对于总黄酮,温度的升高导致其饱和蒸汽压的增大占据了主要影响,而超临界流体密度的减小对其萃取效果作用不明显;综合紫杉醇、10-DAB III 及总黄酮的收率,选择萃取温度为 44 °C。

3.4 夹带剂组成对 SFE 效果的影响 选取萃取温度为 44 °C,萃取压力为 30 MPa,静态浸泡时间为 0.5 h,夹带剂乙醇的水溶液浓度在 60%~95% 变化,观察所用夹带剂乙醇水溶液的浓度对萃取效果的影响。结果表明:水的加入使超临界流体的极性增大,溶质在超临界流体中的溶解性发生变化;但水的加入又使红豆杉中水溶性的杂质更多的溶解出来。由实验结果可知:在选定温度、压力等其他条件不变的情况下,以 85% 乙醇水溶液作夹带剂有利于紫杉醇、10-DAB III 和总黄酮成分的萃取。

3.5 萃取压力对 SFE 效果的影响 选取萃取温度为 44 °C,静态浸泡时间为 0.5 h,夹带剂为 85% 乙醇,观察萃取压力对萃取效果的影响。结果表明:当萃取压力为 27 MPa 时,紫杉醇和总黄酮的萃取收率较高,低于 27 MPa 时,超临界流体的密度较低导致紫杉醇在其中的溶解度较小,阻碍萃取的进行;高于 27 MPa 时,超临界流体的黏度较大,阻碍溶质在超临界流体中的传质。对于 10-DAB III,在选定的温度下,高于 27 MPa 及小于 31 MPa 时,收率和含量仍随压力的升高而增大。

3.6 动态萃取时间对 SFE 效果的影响 适当地延长静态浸泡时间,有利于溶质在萃取溶剂与基质之间达到平衡,在萃取温度为 44 °C,萃取压力为 27 MPa,夹带剂为 85% 的乙醇溶液时,静态保持时间为 0.5 h,动态萃取时间对 SFE 效果的影响,见图 1。



a: 夹带剂种类对紫杉醇萃取效果的影响; b: 夹带剂种类对总黄酮萃取效果的影响; c: 夹带剂种类对 10-DAB III 萃取效果的影响。

图 1 夹带剂种类对萃取效果的影响

图 1 表明:动态萃取时间延长至 2 h 时,紫杉醇和 10-DAB III 收率增大但在浸膏中含量降低,说明萃取的其他成分增多,总黄酮的收率和纯度均升高。故保持适当动态萃取时间较好。

表 1 传统提取与 SFE 结果比较

成分	传统方法的收率(%)	SFE 的收率(%)	SFE 浸膏的含量(%)	SFE 收率比传统方法收率倍数
紫杉醇	0.004 85	0.013	0.11	2.93
总黄酮	1.05	1.29	9.14	1.23
10-DAB III	0.002 475	0.005 4	0.053	2.18

3.7 SFE 与传统提取方法的比较 将本研究优化的提取条件与传统提取方法进行对比^[5],结果见表 1。由表 1 可知,SFE 红豆杉中有效成分,显著优于传统提取方法。因而 SPE 研究为红豆杉的进一步开发和综合利用提供了新的依据。

参考文献:

- [1] 解雪梅,温远影.白豆杉的化学成分分析[J].植物学通报,1996,13(2):41.
- [2] 周丽,张睿,马燕,等.红旱莲总黄酮的(下转第 3177 页)