

穿心莲内酯超临界 CO₂ 重结晶工艺初探

张文成¹, 潘 见¹, 谢慧明¹, 陈克勋²

(1. 合肥工业大学农产品生物化工教育部重点实验室, 合肥 230069; 2 中国科学技术大学化学与材料学院, 合肥 230026)

摘 要: 采用单因素实验法探讨超临界 CO₂ 重结晶压力、温度、时间对穿心莲内酯的纯度和结晶率的影响, 并借助扫描电镜进行晶体形貌考察, 利用高效液相色谱仪进行纯度检测。结果表明, 采用超临界 CO₂ 重结晶技术得到的穿心莲内酯晶体形貌更加细小, 并呈絮状分布在结晶板上; 选择较佳纯化工艺参数为重结晶压力 14 MPa, 温度 55℃, 时间 60 min, CO₂ 流量 20 L/min 时, 得到的穿心莲内酯纯度达 90% 以上, 结晶率超过 45%。

关键词: 超临界 CO₂; 重结晶; 穿心莲内酯; 扫描电镜; 高效液相色谱

中图分类号: S337

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2004)05-0203-04

0 引 言

穿心莲 [*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees] 是爵床科, 穿心莲属一年生草本植物。穿心莲主要有效成分为二萜内酯和黄酮类化合物, 其中穿心莲内酯 (*Andrographolide*) 类化合物临床上用于治疗急性胃肠炎、扁桃体炎、肝炎和抗癌^[1,2]等。穿心莲内酯的高效分离纯化是提高穿心莲药草附加值的重要渠道。

超临界流体萃取 (supercritical fluid extraction, SCFE) 作为高新“绿色”技术在食品、医药、化工等领域已有二十多年的历史^[3,4], 且具有高效性、可调性等优点已用于开发某些天然产物活性成分^[5]; 但在分离纯化上, SCFE 技术还存在一定的局限性^[6,7]。例如, SCFE 技术在提取分离天然药草中高纯结晶性天然活性成分时遇到许多障碍: 同类/系杂质强干扰、产品得率低、管道滞留/堵塞等问题。为此, 作者选择具有晶体结构的穿心莲内酯为研究对象, 拟采用超临界流体 (supercritical fluid, SCF) 重结晶技术进行分离纯化方面的深度研究^[8,9]。

所谓 SCF 重结晶, 是指在一定的压力和温度下, 以 SCF 作为萃取剂和结晶溶剂, 当 SCF 与多组分混合物接触发生萃取传质后, 在结晶器上形成结晶分离的过程。由于萃取、层析、吸附和重力沉降等存在一定的差异, 使各组分分别结晶析出, 并在结晶器上呈差异性分布, 故可在结晶器的上部、中部或下部可得到较高纯度的组分; 而通过二次萃取结晶, 即重结晶来增加不同组分之间的结晶差异性, 以提高分离效果。该技术一般采用 CO₂ 作为 SCF, 同时选择合适的夹带剂来增强超临界 CO₂ (supercritical CO₂, SC-CO₂) 的溶解选择性和结晶效果。SC-CO₂ 重结晶, 其工艺参数与首次萃取结晶相互牵连。首次萃取结晶主要控制的压力、温度在文献 [6] 中已有报道, 而重结晶工艺参数的选择除了考虑提

高产品的纯度外, 也兼顾考虑得率, 即结晶率。因首次萃取结晶操作与重结晶操作中, 纯度与结晶率之间存在非定向性矛盾, 正交实验法处理数据存在一定的局限性, 为此本论文主要探讨了 SC-CO₂ 重结晶压力、温度、时间单因素影响因子对穿心莲内酯晶体形貌、纯度、结晶率的影响。为下一步采用 Box-Behnken 曲面响应法进行工艺参数的优化提供一定的数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验设备、仪器

40 MPa 超临界 CO₂ 萃取结晶装置 (如图 1), 1.6 L 结晶釜 (高径比 10:1), 为了详细描述本论文 SCF 重结晶技术所用装置, 特提供了图 2 所示结晶器的结构简图; HITACHI X-650 扫描电子显微镜; Waters 高效液相色谱系统 (515 型输液泵, 2487 紫外双光束检测器)。

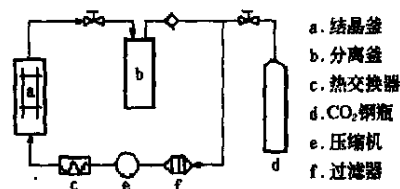


图 1 实验装备的工艺流程

Fig. 1 Flow chart of experimental apparatus

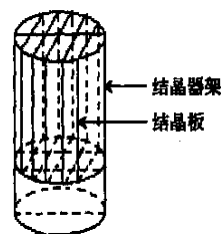


图 2 结晶器简图

Fig. 2 Sketch of crystallization ware

1.2 实验材料

穿心莲浸膏 (穿心莲内酯含量为 30%) 和高纯穿心莲内酯 (含量为 95%) 由合肥拓峰生物工程有限责任公司生产; 穿心莲内酯标准品购于中国生物制品检定所; 二氧化碳 (99.8% 食品级)。

1.3 实验方法

收稿日期: 2004-02-09 修订日期: 2004-07-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29976008)

作者简介: 张文成 (1973-), 男, 山东烟台人, 博士生, 主要从事天然产物有效成分超临界流体分离纯化新方法、新技术研究。山东 合肥工业大学农产品生物化工教育部重点实验室, 230069。Email: zwc1012@163.com

1.3.1 实验过程

实验分 4 步进行。

- 1) 原材料预处理, 即用乙酸乙酯在温水浴条件下溶解首次萃取结晶原料, 再过滤、浓缩;
- 2) 将滤液通过料管(或料泵)移入萃取结晶釜中, 且料液的最大高度以不没及结晶板下端为限;
- 3) 根据设计的实验工艺参数进行滤液 SC-CO₂ 重结晶;
- 4) 采用扫描电镜法 (Scanning electron microscopy, SEM)、高效液相色谱 (High pressure liquid chromatography, HPLC) 法对实验结果选择性取样观察、分析。

结晶率按下式计算:

结晶率 (%) = $\frac{\text{结晶板上晶体质量 (g)}}{\text{进样质量 (g)}} \times 100\%$

1.3.2 检测方法

HPLC 法检测产品纯度, 其色谱条件^[10]: 流动相为 甲醇-水 = 65:35 (V/V), 流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 205 nm。

2 结果与分析

2.1 压力对重结晶穿心莲内酯的影响

为了研究压力对 SC-CO₂ 重结晶穿心莲内酯的综合效果, 实验原料采用首次萃取结晶条件^[6]为: 压力为 16 MPa, 温度 55℃, 时间 90 min, CO₂ 流量 20 L/min, 进行萃取结晶, 选择收集结晶器上部产品。重结晶实验在控制结晶釜温度 55℃, 时间 60 min, CO₂ 流量为 20 L/min 条件下, 选择压力为 8、10、12、14 和 16 MPa 进行实验。将结晶板自底至顶部平均分为 2 段, 在上部取样, 得压力-纯度/结晶率变化曲线, 如图 3 所示。而为了考察压力对晶体形貌的影响, 选择高纯穿心莲内酯 (含量 95%) 为原料, 实验条件: 首次和重结晶压力都选择 9、12 MPa, 温度 55℃, 时间 60 min, CO₂ 流量 20

L/min 进行实验, 实验结束后进行取样观察, 结果如图 4 所示。

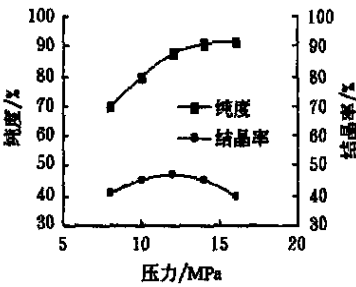


图 3 压力对重结晶穿心莲内酯纯度和结晶率的影响
Fig 3 Effect of pressure on the content and the crystal ratio of andrographolide recrystallization

由图 3 变化曲线可知, 在其它工艺参数不变的条件下, 随着压力的升高, 结晶板上部晶体的纯度越来越高, 且先急后缓, 而结晶率先升后降。可能是因压力升高, SC-CO₂ 溶解穿心莲内酯相对其它杂质的能力强, 携带晶体析出量也多, 出现纯度及结晶率的增加; 而压力超过一定值后, 穿心莲内酯与 SC-CO₂ 分子间的作用力将大于结晶板的表面吸附力、分子重力等, 致使 SC-CO₂ 的“超强”溶解能力削弱结晶, 导致 SC-CO₂ 携带穿心莲内酯向分离釜迁移, 在管道壁、分离釜等处析出穿心莲内酯的量增加, 所以在压力-结晶率曲线上出现拐点。由图 4 可以看出, SC-CO₂ 重结晶压力越高, 晶体颗粒度越小, 重结晶相对首次萃取结晶得到的晶体颗粒更加细小, 且呈絮状团簇。说明经过重结晶处理, 穿心莲内酯的颗粒细度得到更大的提高。由图 3、4 综合分析, 可以判断经过首次萃取结晶的穿心莲内酯, 重结晶压力在较低的压力点就能获得较优的分离纯化效果和较高的结晶率, 且产品的颗粒度更加理想。因实验要对纯度和结晶率进行综合评价, 本实验较适宜的重结晶压力 14 MPa, 产品纯度在 90% 以上, 结晶率 (重结晶得率) 也超过 45%。

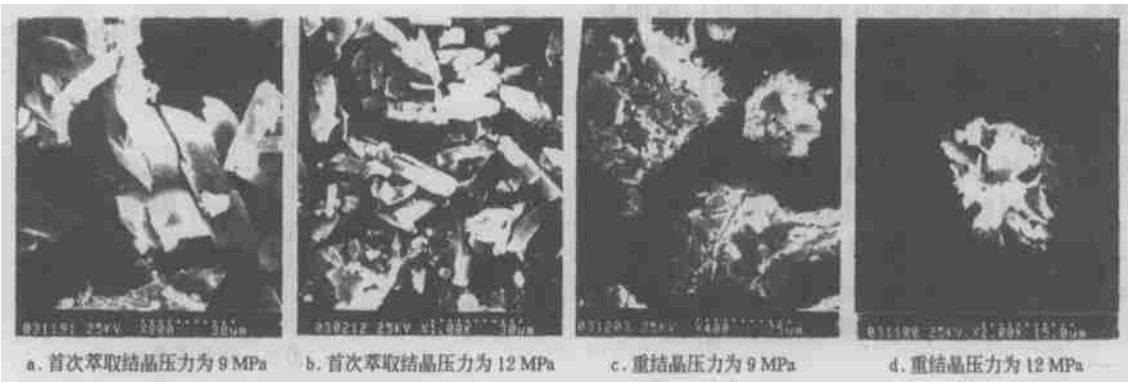


图 4 超临界 CO₂ 结晶穿心莲内酯晶体形态的扫描电镜图
Fig 4 Scanning electron microscopy micrographs of the andrographolide crystals obtained by supercritical CO₂ extraction crystallization

2.2 温度对重结晶穿心莲内酯影响

为了研究温度对 SC-CO₂ 重结晶穿心莲内酯的综合效果, 选择重结晶压力 14 MPa, 时间 60 min, CO₂ 流量 20 L/m in。实验温度分别为 35、45、55 和 65。结晶板自底至顶部平均分为 2 部分, 在上部取样, 得温度-纯度/结晶率变化曲线, 如图 5 所示。

由图 5 可知, 适当升高温度有利于提高 SC-CO₂ 重结晶穿心莲内酯的纯度, 也有利于增加结晶率; 而温度超过 55 后, 穿心莲内酯的纯度和结晶率都有所下降。可能是温度升高, 分子活性增强, 当超过结晶板表面吸附力、重力、分子间作用力等的束缚, 部分溶解在 SC-CO₂ 中的穿心莲内酯将“迁移”到分离釜中, 同时杂质组分在结晶板上结晶析出量增加, 致使结晶析出穿心莲内酯的纯度和结晶率都有所下降。所以, 选择较佳重结晶温度为 55。

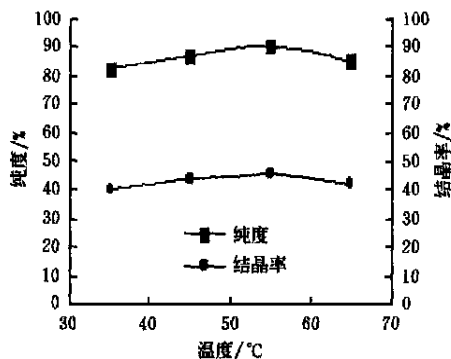


图 5 温度对重结晶穿心莲内酯纯度和结晶率的影响

Fig 5 Effect of temperature on the content and the crystal ratio of andrographolide recrystallization

2.3 时间对重结晶穿心莲内酯影响

在重结晶压力为 14 MPa, 温度 55, CO₂ 流量 20 L/m in 条件下, 选择实验重结晶时间分别为 40、50、60、70 和 80 min 时, 将结晶板平分为 2 段, 由上段取样, 得时间-纯度/结晶率变化曲线, 如图 6 所示。

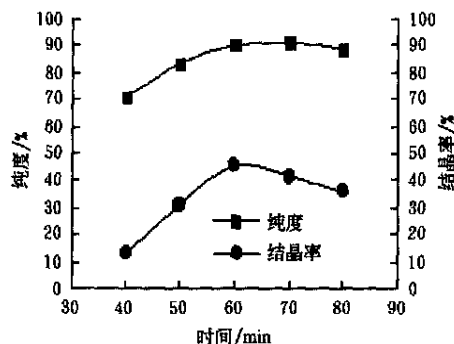


图 6 时间对重结晶穿心莲内酯纯度和结晶率的影响

Fig 6 Effect of time on the content and the crystal ratio of andrographolide recrystallization

由图 6 可知, 在其它工艺参数不变的情况下, 穿心莲内酯纯度与时间呈正相关, 而当时间超过 60 min 后, 纯度增长率变缓慢; 而结晶率在 60 min 后出现下降趋势, 说明重结晶时间过长, SC-CO₂ 可能会携带更多结

晶析出的絮状穿心莲内酯向分离管道、分离釜迁移。考虑到晶体纯度与结晶率的综合提高, 所以本实验选择的重结晶时间为 60 min。结晶析出的穿心莲内酯纯度在 90% 以上, 最高纯度达 92.5% (图 7), 结晶率超过 45%。

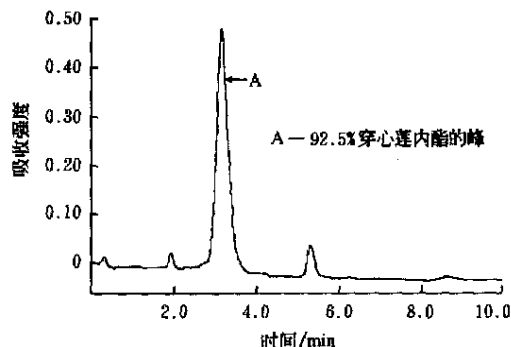


图 7 穿心莲内酯晶体高效液相色谱检测谱图

Fig 7 High pressure liquid chromatography graphs showing the purity of andrographolide crystal

3 结论

1) 在本实验条件下, 选择首次萃取结晶压力为 16 MPa, 温度 55, 时间 90 min, CO₂ 流量为 20 L/m in 制备原料, 优选出较佳的重结晶工艺参数为重结晶压力 14 MPa, 温度 55, 时间 60 min, CO₂ 流量为 20 L/m in 时, 多次实验结果都会获得 90% 以上的高纯穿心莲内酯, 纯度最高达到 92.5%, 重结晶得率超过 45%。

2) 重结晶不但能很大程度上提高了穿心莲内酯的纯度, 而且重结晶的产品呈絮状团聚, 颗粒度更加细小, 在很大程度上能改善穿心莲内酯的溶解性, 突出其在食品、医药、保健品中的效价与效用。

总之, 通过 SC-CO₂ 重结晶技术可改良传统的 SCFE 的分离纯化效果, 一定程度上也能改善 SC-CO₂ 萃取结晶条件, 特别是降低压力, 缩短工作时间。所以, 本研究所用的 SC-CO₂ 萃取-结晶技术可用来分离纯化部分天然产物有效成分, 也可提供“安全、可靠”的高质量产品, 如无溶剂残留等^[1]; 而且通过重结晶强化, 能得到更高纯度的产品, 这为开发高质量食品、医药、保健品原料提供一条新途径。

[参考文献]

- [1] Kapil A, Koul IB, Banerjee S K, et al Antihepatotoxic effects of major diterpenoid constituents of *Andrographis paniculata* [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1993, 46(1): 182- 185
- [2] Matsuda T, Kuroyanagi M. Cell differentiation-inducing diterpene from *Andrographis paniculata* Nees [J]. *Chemical Pharmacology Bulletin*, 1994, 42(6): 1216
- [3] Hans B, Charlotta T, Lena D, et al Determination of food constituents based on SFE: applications to vitamins A and E in meat and milk [J]. *Journal of Biophysics Methods*, 2000, 43: 391- 401.
- [4] Russell T, Fariba D, Nei R. Current issues relating to

- anti-solvent micronisation techniques and their extension to industrial scales [J]. *Journal of Supercritical Fluid*, 2001, 21: 159- 177.
- [5] 马海乐. 生物资源的超临界流体萃取[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社出版, 2000: 6.
- [6] 潘 见, 张文成, 谢慧明, 等. 压力、温度对穿心莲内酯超临界 CO₂ 萃取- 结晶的影响[J]. *农业工程学报*, 2003, 19 (6): 194- 196.
- [7] 朱自强. 超临界流体技术—原理和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000, 9.
- [8] 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.
- [9] 潘 见, 杨 克, 张文成. 超临界 CO₂ 萃取天然产物技术及发展[J]. *精细与专用化学品*, 2001, 14: 14- 16.
- [10] 胡学桥, 潘 见, 张文成, 等. 反相高效液相色谱法快速测定穿心莲中三种内酯含量[J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2001, 24(6): 1083- 1086.
- [11] 李志义, 李 岳, 丁信伟. 超临界流体在超细粉体制备中的应用[J]. *化学工业与工程技术*, 2001, 21(4): 6- 11.

Primary study on the technology of andrographolide recrystallization by using supercritical CO₂

Zhang Wencheng¹, Pan Jian¹, Xie Huiming¹, Chen Kexun²

(1. Key Laboratory of Bioprocess of State Education Ministry, Hefei University of Technology, Hefei 230069, China;

2 School of Chemistry and Material, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract The effect of pressure, temperature and time of secondary grade crystallization on the purity and the crystal ratio of *andrographolide* were investigated via single factor experiments, observing shape of crystal with scanning electron microscopy (SEM), determining purity of *andrographolide* by high pressure liquid chromatography (HPLC). The result showed that the particle of *andrographolide* as much smaller, moreover, the crystal of *andrographolide* was distributed in floccule on crystallization board; When the optimized parameters (pressure 14 MPa, temperature 55 °C, time 60 min) were selected the content of *andrographolide* was more than 90%, the crystal ratio was more than 45%.

Key words: supercritical CO₂ (SC-CO₂); recrystallization; *andrographolide*; scanning electron microscopy (SEM); high pressure liquid chromatography (HPLC)