

# 超临界 CO<sub>2</sub> 提取分离银杏叶药用成分的工艺研究

陈从贵, 潘 见, 张宏康, 谢慧明, 张 鉴

(合肥工业大学)

**摘 要:** 该文从理论与实践两方面着手, 研究探讨超临界 CO<sub>2</sub> 提取分离银杏叶药用成分的适用性和可操作性, 提出溶剂浸提与超临界流体萃取相结合的生产工艺, 既可降低生产成本, 保证产品质量, 又可大幅度削减设备造价, 为超临界流体萃取技术的实际应用创造条件。

**关键词:** 银杏叶; 药用成分; 超临界 CO<sub>2</sub>; 分离工艺

**中图分类号:** S337

**文献标识码:** A

**文章编号:** 100226819(2002)0420142204

银杏叶的成分相当复杂, 其中的药用成分主要是银杏黄酮和萜内酯, 但药用成分在干叶中的含量很低, 故分离与纯化相当困难。目前, 银杏叶药用成分的生产主要采用溶剂萃取法和树脂吸附法, 得到银杏黄酮和内酯含量较高的标准提取物(EGB), 但从成品质量来看, 分离效果还不甚理想。超临界 CO<sub>2</sub> 萃取具有诸多优点, 利用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取 EGB 已受到工程界的高度关注, 国内外已有这方面的报道<sup>[1-6]</sup>, 并取得阶段性实验结果。但要实现 EGB 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取的工业化生产, 生产工艺问题仍需进一步研究。

## 1 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取银杏叶药用成分的适应性

### 1.1 黄酮类化合物

银杏黄酮类化合物主要包括单黄酮类、双黄酮类和儿茶素类等, 代表性药用成分主要是山奈酚、槲皮素和异鼠李素等单黄酮类化合物, 约占银杏干叶的 0.2% ~ 1.8%。由于这类成分的分子结构中都具有 4 个以上的羟基官能团, 并且常以甙的形式存在于叶片中, 即分子中引入了强亲水基, 分子极性较强, 易溶于热水或醇溶液, 故在纯超临界 CO<sub>2</sub> 中的溶解度极小, 加之这类成分的低挥发性。因此, 从理论上讲, 超临界 CO<sub>2</sub> 直接萃取银杏黄酮的实用性较差, 产业化面临的问题非常棘手。这也为研究工作者提出了新的研究课题。

### 1.2 萜内酯类化合物

银杏萜内酯类化合物主要包括银杏内酯和白果内酯, 在干叶中的总含量约为 0.1%。银杏内酯为二

萜类化合物, 由 6 个五元环组成, 其中 3 个内酯环, 2 个戊烷环, 1 个四氢呋喃环, 属于高度含氧原子的萜类。这些氧原子的结构主要为羟基- C- 内酯型, 属极性原子, 在分子中的分布比较集中, 并具有多个手性中心, 这就决定了其高度笼状分子的特殊构型, 使其表现出较强的分子极性。在已发现的银杏内酯中, 有 A、B、C、M 和 J 五种, 结构极其相似, 但所含的羟基数目和位置则有所不同, 由此产生了分子极性差异, 以银杏内酯 J 和 C 极性最强, 银杏内酯 A、B 极性较强。而白果内酯则属倍半萜类, 分子结构中只有 1 个戊烷环和 3 个内酯环, 含有两个羟基团, 与银杏内酯相比, 白果内酯的分子极性较弱。另外, 萜内酯类化合物虽然具有一定的分子极性, 但可溶于极性较低的有机溶剂。由此可见, 银杏萜内酯在超临界 CO<sub>2</sub> 中应具有较高的溶解能力, 有利于超临界 CO<sub>2</sub> 萃取, 并以白果内酯的萃取适应性最强。

### 1.3 酚酸类化合物

酚酸类化合物在标准 EGB 中, 一直被当作有害成分而受到严格限制。传统生产工艺中, 如何除去这类成分始终是困扰 EGB 生产企业的技术难题。酚酸类化合物属羟基酚类物质, 羟基酚类化合物主要包括白果酸、银杏酚、白果酚、氢化白果酸和氢化白果亚酸等, 其中白果酸、氢化白果酸、氢化白果亚酸为羟基取代的水杨酸衍生物; 白果酚和银杏酚分别为羟基取代的苯酚和间苯二酚衍生物。羟基酚类化合物的总量约占银杏干叶重的 1% ~ 2%, 属含量较高的物质。这类化合物的分子极性较低, 为脂溶性物质, 并具有一定的挥发性, 因此有利于超临界 CO<sub>2</sub> 萃取。

## 2 银杏叶药用成分的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 仪器设备

32 M Pa—2.5 L 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取系统(自行研

收稿日期: 2002201214

基金项目: 安徽省“九五”科技攻关计划项目(96130152); 机械工业技术发展基金资助项目(97JA 0708)

作者简介: 陈从贵, 副教授, 合肥工业大学生物与食品工程学院, 230069

制), 如图 1 所示; Waters515 高效液相色谱仪(美国产, 含 PDA 检测器和示差折光检测器); 蒸馏水器; 微波炉; 真空干燥箱; 电子天平等。

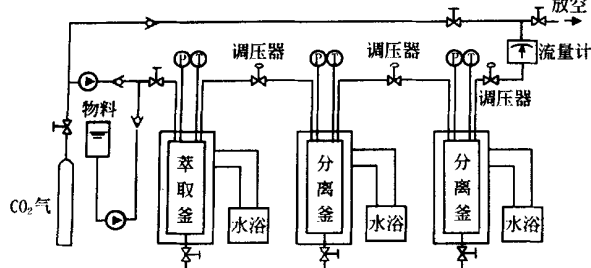


图 1 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取实验装置

Fig 1 The apparatus of supercritical CO<sub>2</sub> extraction

### 2.1.2 原辅材料及试剂

银杏叶(江苏邳州), 标准 EGB(江苏邳州), 95% 乙醇液(食品级), 90% 银杏内酯 GA、GB(美国 Sigma 公司), 95% 白果内酯 BB(美国 Sigma 公司), 甲醇(A.R), 乙酸乙酯(A.R), 槲皮素(国家生物制品鉴定检验所)、CO<sub>2</sub>(食品级, 合肥碳酸钙厂)。

### 2.1.3 方法

表 1 不同夹带剂条件, 银杏干叶超临界 CO<sub>2</sub> 静态萃取结果

Table 1 Result of extracting substances from ginkgo leaves by supercritical CO<sub>2</sub> with different modifiers

无水乙醇、蒸馏水、银杏干叶的质量比				
CO <sub>2</sub> 夹带剂	醇 料为 3 10	醇 料为 1.5 10	醇 料为 0 10	醇 水 料为 1 3 10
分离结果	深绿色液态絮状物	墨绿色液态絮状物	少许褐色粘稠物	褐色液态絮状物
干燥后结果	褐色粘稠物	褐色粘稠物	褐色粘稠物	褐色粘稠物
产品得率	0.63%	0.58%	0.11%	0.87%

由表 1 可见, 不同超临界流体萃取剂萃出产品的得率虽然相差明显, 但产品得率总体水平低, 且所得萃取物组分基本相同, 以叶绿素、胶质等杂质成分为主, 有效成分的含量极低(HPLC 检测精度下降)。一方面, 由于银杏叶中含有大量的脂溶性杂质, 如叶绿素、多元酚、蜡质等, 药用成分含量较低, 且药用成分的分子极性也相对较强, 因此, 无夹带剂的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取只提取出少量的杂质成分, 而加入强极性夹带剂的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取, 也不能有效克服叶片对药用成分的束缚作用, 获得良好的分离效果; 另一方面, 相同工业化生产能力的条件下, 直接萃取法势必要求高压萃取装置容量过大, 造成设备一次性投资过高, 且高压下固体物料难于做到连续化操作, 不利于超临界 CO<sub>2</sub> 萃取银杏叶药用成分的工业化。由此可见, 要想从根本上解决问题, 就需要引入其它分离技术, 来改变原料的存在状态, 提高超临界 CO<sub>2</sub> 分离银杏叶药用成分的能力和实用性。

试验原料的准备: 银杏干叶先用微波干燥至易碎状态, 破碎成约 10 目的碎片, 备用; 外购 EGB 浸膏(GA、GB、BB 合计为 4.81%) 先用 95% 乙醇溶解, 去粘稠不溶物, 过滤后得澄清乙醇溶解液, 用作超临界 CO<sub>2</sub> 萃取的分离原料。

碎叶片装入超临界流体萃取吊篮中, 以无水乙醇作夹带剂, 用超临界 CO<sub>2</sub> 直接萃取;

碎叶片先用不同浓度的乙醇溶剂浸提, 再利用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取分离;

标准 EGB 乙醇溶解液采用超临界 CO<sub>2</sub> 液——液萃取分离;

银杏总黄酮与银杏总内酯的分析检测采用 HPLC 法<sup>[6]</sup>。

## 2.2 结果与分析

### 2.2.1 不同夹带剂条件对银杏干叶超临界 CO<sub>2</sub> 静态直接萃取的影响

萃取压力 26~28 MPa, 温度 55℃, 分离压力 5.0 MPa, 温度 45℃, 萃取时间 3 h(分两次卸料), 夹带剂为无水乙醇和蒸馏水, 对银杏干叶进行超临界 CO<sub>2</sub> 静态直接萃取分离, 结果见表 1。

### 2.2.2 不同乙醇浓度浸提液对超临界 CO<sub>2</sub> 富集银杏黄酮的影响

先用乙醇法浸提银杏叶复合成分, 再用超临界流体动态分离浸提液, 富集银杏总黄酮。其分离工艺过程见图 2。

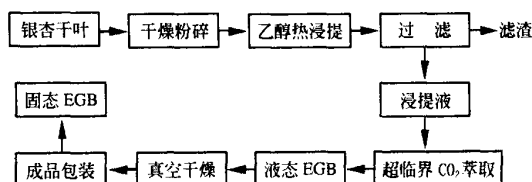


图 2 银杏叶药用成分超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺流程

Fig 2 The technological process of extracting Phytochemical compounds from ginkgo biloba leaves with supercritical CO<sub>2</sub>

银杏黄酮类物质属超临界流体难萃取物质, 但利用超临界流体可萃取出其它组分, 收集萃余物并干燥, 得富含银杏总黄酮的银杏浸膏。工艺条件设定

为: 萃取压强 18 MPa、温度 50 ; 分离压强 3.5 MPa、温度 20 ; CO<sub>2</sub> 流量约 0.05 L/min (折算成标准状态下的液体), 动态连续萃取 60 min (CO<sub>2</sub> 循环使用)。以萃余物为产物, 检测银杏总黄酮含量及其浸膏产品得率。

结果表明: 对于 95% 的乙醇浸提液, 超临界 CO<sub>2</sub> 的分离能力极弱, 萃余物的得率仅 0.5%, 银杏总黄酮含量为 2.83%, 超临界 CO<sub>2</sub> 只是将浸提液从萃取釜转移到了分离釜, 而并不能实现银杏叶药用成分的有效分离; 60% 的乙醇浸提液, 超临界 CO<sub>2</sub> 的分离能力最强, 萃余物的得率为 19.52%, 银杏总黄酮含量为 8.51%; 50% 和 70% 的乙醇浸提液, 超临界 CO<sub>2</sub> 的分离能力次之。超临界 CO<sub>2</sub> 的分离结果和浸膏得率见图 3、图 4。

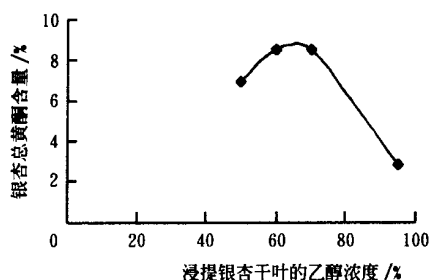


图 3 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取分离不同乙醇浓度浸提液的银杏总黄酮含量

Fig 3 Effect of extracts from ginkgo leaves with different ethanol solution on total flavonoids contained in supercritical CO<sub>2</sub> extracts

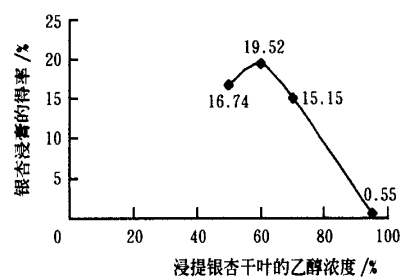


图 4 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取分离不同乙醇浓度浸提液的银杏浸膏得率

Fig 4 Effect of extracts from ginkgo leaves with different ethanol solution on the yield of powdery extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> extraction

### 2.2.3 不同超临界 CO<sub>2</sub> 萃取时间对内酯成分分离效果的影响

对外购 EGB 浸膏的乙醇浸提液, 按图 1 的分离工艺, 用超临界 CO<sub>2</sub> 动态分离 (CO<sub>2</sub> 循环使用), 收集第一级分离釜的产物, 分析检测其总内酯成分 (以 GA、GB、BB 合计)。超临界 CO<sub>2</sub> 动态分离的工艺条件为: 萃取压强 22 MPa、温度 45 ; 第一级分离压

强 9.2~9.5 MPa、温度 40 ; 第二级分离压强 4.5 MPa、温度 25 ; CO<sub>2</sub> 流量约 0.05 L/min (折算成标准状态下的液体)。

结果表明: 超临界 CO<sub>2</sub> 对银杏总内酯有较强的分离能力, 本试验条件下, 萃取 10 min 可将银杏总内酯从 4.81% 提高到 10.44%, 但随着萃取过程的进行, 第一级分离物的总内酯含量呈现出下降——上升——再下降的变化规律, 而分离物的得率则表现出上升——下降——再上升的变化关系。由此可见, 银杏叶药用成分中内酯类成分易于被超临界流体萃取, 并优先溶出; 而且萃取压力达到 9.2 MPa 时, 也能产生明显的分离效果, 使第一级分离釜中的某些成分向第二级分离釜转移, 导致第一级分离物

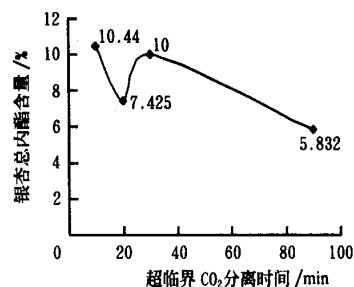


图 5 不同超临界 CO<sub>2</sub> 萃取分离时间的银杏总内酯含量

Fig 5 Effect of supercritical CO<sub>2</sub> extracting time on total terpenes content in extraction

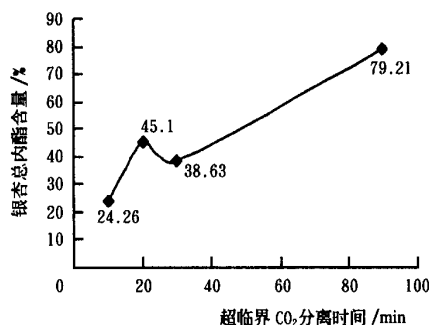


图 6 不同超临界 CO<sub>2</sub> 萃取分离时间的银杏总内酯含量

Fig 6 Effect of supercritical CO<sub>2</sub> extracting time on the yield of EGB

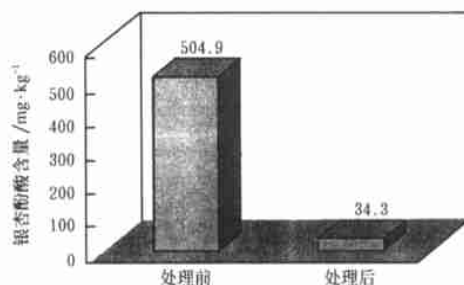


图 7 EGB 超临界 CO<sub>2</sub> 处理前后酚酸含量的变化

Fig 7 Effect of supercritical CO<sub>2</sub> extraction on ginkgo acid contained in EGB

中的总内酯含量和得率产生上述变化规律。因此,合理选择萃取压力,控制分离时间,并借助于吸附等其它分离方法,可获得高纯度的银杏总内酯产品。这已在后续的研究中得到了进一步证明。超临界 CO<sub>2</sub> 的分离结果和浸膏得率见图 5、图 6。

#### 2.2.4 SCFE 对脱除羟基酚类化合物的影响作用

原料为外购 EGB 产品(酚酸含量约 500 mg/ökg), 8%~10% 食用乙醇作夹带剂, 萃取压力 26 MPa、温度 55~60 °C, 分离压力 5 MPa、温度 35~40 °C, 动态萃取 30~40 min, EGB 中酚酸含量从 504.9 mg/ökg 降至 34.25 mg/ökg (见图 7), EGB 回收率 90%。

可见,利用掺入夹带剂的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取能有效除去羟基酚类物质,大大降低标准 EGB 中酚酸类有害成分的残留。此外,鉴于羟基酚类也是一种具有药用价值的生理活性物质,且具有较好的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺性,便于在分离釜中收集。因此,在 EGB 生产过程中,利用超临界 CO<sub>2</sub> 富集此类物质将具有重要的实际意义。

### 3 结 论

1) 银杏叶药用成分的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取不仅技术可行,而且对银杏总内酯、羟基酚等药用成分有显著的分选能力。

2) 对于银杏叶药用成分的提取分离,应用超临界 CO<sub>2</sub> 直接萃取技术,将面临生产设备投资大、难于连续化生产等诸多问题,不利于超临界 CO<sub>2</sub> 萃取技术的产业化。而超临界 CO<sub>2</sub> 萃取技术与传统溶剂浸提法相结合的工艺方法,既可提高产品质量,又可

大幅度削减设备造价,将为超临界流体萃取技术的实际应用创造条件。

3) 采用 60% 的乙醇溶液浸提银杏干叶,其浸提液最适合黄酮类物质的超临界 CO<sub>2</sub> 分离,从萃余物中可获得银杏总黄酮含量和得率较高的 EGB 产品。

#### [参 考 文 献]

- [1] 真锅明义,山下哲郎,原田腾寿等.日本公开特许公报[P],昭61-12622(1986).
- [2] Manabe Akiyoshi, Yamashita Tetsuro, Harada Katsumihisa, et al. Process for the supercritical extraction and separation of solid samples[P]. EP0308675A1.
- [3] Teris A Van Beek, Larry T Taylor. Sample Preparation of Standardized Extracts of Ginkgo biloba by Supercritical Fluid Extraction [J]. Phytochemical Analysis, 1996, Vol 7, 185~191.
- [4] 姚渭溪.银杏叶中活性成分的提取工艺、测定及其进展[J].中草药,1995,8,157~159.
- [5] 孙震,刘泽勇,赵双记等.超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取银杏叶中黄酮研究[J].银杏产业开发,1997,1,9~13.
- [6] Chen Conggui, Zhang Hongkang, Pan Jian. Discussion on the Technology of Extracting Pharmaceutical Compounds from Ginkgo Biloba Leaves with Supercritical CO<sub>2</sub> [A]. Proceedings of 97 International Seminar on Ginkgo [C]. Beijing, 1997. 11, 202~203.
- [7] 张鉴,潘见,谢慧明等.反相高效液相色谱法测定银杏叶提取物中5种银杏内酯的含量[J].分析化学,2000,28(1):53~56.
- [8] 谢慧明,骆祥峰,张文成等.银杏黄酮苷提纯工艺研究[J].农业工程学报,2001,17(3):103~106.

## Technology for Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Separation of Phyto-pharmaceutical Compounds From Ginkgo Leaves

Chen Conggui, Pan Jian, Zhang Hongkang, Xie Huiming

(College of Biological and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230069, China)

**Abstract** Based on theoretical analyses and practical application, the applicability and operability of using supercritical CO<sub>2</sub> extraction for the separation and purification of phyto-pharmaceutical compounds from ginkgo leaves were explored. Results show that supercritical CO<sub>2</sub> extraction combined with traditional solvent extraction is a trend for the industrialization of extracting pharmaceutical compounds from ginkgo leaves. This combined extraction method can reduce the production and apparatus cost, and it is a warranty for the product quality. This leads to a bright future for the industrialization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction.

**Key words:** ginkgo leaves; phyto-pharmaceutical compounds; supercritical CO<sub>2</sub>; separation technology