

生物碱的超临界流体 萃取研究进展

□张涛 蔡建国 (华东理工大学中药工程研究所 上海 200237)

摘要: 综述了超临界流体萃取技术应用于生物碱分离的研究进展, 分析了影响生物碱提取效果的各个因素, 除温度、压力、溶剂、萃取时间等常见因素外, 碱化剂能够改善生物碱的分离效果, 夹带剂的使用则提高了超临界流体的萃取能力。

关键词: 超临界流体 萃取 生物碱 影响因素

生物碱是存在于植物组织内的一类含氮的有机化合物, 种类繁多, 大多数具有复杂的环状结构, 氮原子多结合在环内, 有类似于碱的性质, 能和酸结合成盐, 也有少数物质所含的氮原子不结合在环上而是结合在侧链上, 或是几乎不具有碱性, 但在习惯上仍然包括在生物碱的范围内。生物碱大多具有特殊而明显的生物活性^[1], 如小檗碱具有显著的抗菌作用, 吗啡的镇痛作用很强, 喜树碱、紫杉醇等在临床上用于抗肿瘤治疗。

超临界流体萃取技术利用超临界流体所具有的特殊溶解能力进行天然植物有效成分提取, 相对于传统的水蒸气蒸馏或溶剂萃取法具有其独特的优势。超临界流体在具有较高的溶解能力的同时还具有较高的传质速率、较好的流动性能和很快达到平衡的能力。而且, 由于温度和压力在临界点附近的微小变化能够引起溶解能力的显著变化, 这使得超临界流体具有良好的可调节性和选择性^[2]。

超临界流体分离生物碱的研

究较早, 德国和美国的学者对超临界CO₂从咖啡豆中脱除咖啡因的工艺进行了深入研究, 并进行了商业规模的生产, 这也是第一个产业化的超临界萃取项目^[3]。近20年来, 随着超临界流体萃取技术理论和应用研究的深入, 在分离生物碱的广度和深度上均取得了较大进展。

一、超临界流体萃取生物碱的研究现状

生物碱在中草药等天然物质中的分布很广, 种类也比较多。到

收稿日期: 2003-01-28

* 联系人: 张涛, 硕士, 从事超临界流体萃取天然物质有效成分研究, E-mail: m001103@sohu.com。

[World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 41

目前为止,从自然界中分离到的生物碱已有1万多种。超临界流体萃取生物碱的研究范围也相应较广,按照得到的分离产物的结构大致可分为:1. 托品烷衍生物,如东莨菪碱;2. 哌啶衍生物,如胡椒碱、槟榔碱、烟碱、去甲基烟碱;3. 喹诺里西啶衍生物,如羽扇豆碱;4. 苯胺衍生物,如辣椒碱、麻黄碱;5. 苜基四氢异喹啉衍生物,如罂粟碱、小檗碱、吗啡、可待因;6. 苜基四氢异喹啉衍生物,如秋水仙碱;7. 苜基苯乙胺衍生物,如石蒜碱;8. 麦角生物碱,如麦角胺;9. 单萜吲哚衍生物,如育亨宾、钩藤碱、土的宁、长春多灵、长春花碱、奎宁;10. 嘌呤类生物碱,如咖啡因、可可碱、茶碱;11. 其他,如川芎嗪等。

近来,应用超临界流体技术研究开发了一批较有价值的生物碱,如 Lee Huen等^[4]利用超临界CO₂从长春花中得到了长春多灵和长春花碱;Brachet A等^[5]从曼陀罗属植物中分离得到了天仙子胺和东莨菪碱,并且在古柯叶中分离出了可卡因;Lopez-Avila Viorica^[6]等从钩藤属植物中得到了钩藤碱。在国内也进行了相关研究,如从光菇子中分离秋水仙碱^[7]的研究等。

此外, Vafai Shiva^[8]等还测定了一些生物碱和其他物质在298K温度下的固体摩尔体积,这对于建立超临界萃取的数学模型有很大的帮助。这些生物碱有阿托品、盐酸小檗碱(含结合水)、二水合去甲氧基马钱子碱、辣椒碱、二水合酒石酸麦角胺、胡椒碱、奎宁、马钱子碱、可可碱、茶碱和盐酸

育亨宾,此外还包括茶和青霉素V。

二、超临界流体萃取生物碱的影响因素

目前,使用超临界流体萃取技术分离生物碱同分离植物挥发油等其他组分相比还显得较为困难。其主要原因是生物碱大部分都具有极性,生物碱类化合物大多数是与有机酸结合成盐存在于植物中,有些则与一些特殊的酸结合,其中只有个别的生物碱由于碱性弱或是很弱,不易或是不能和酸结合成稳定的盐,从而可能以游离碱的形式存在于植物组织中^[9]。因此,在进行超临界萃取生物碱的研究中不但需要分析实验的压力、温度等较常见的因素,往往需要使用CO₂以外的溶剂,并考虑使用夹带剂、碱化剂等手段来提高生物碱的得率和分离操作的选择性。

1. 操作压力和操作温度

操作压力和操作温度是超临界流体萃取技术的基本影响因素,也是生物碱分离操作的基本参数。Saldana M.D.A.等^[10]从茶叶中提取咖啡因、茶碱、二甲基黄嘌呤的分离曲线表明压力和温度对于分离效果有着极显著的影响。一般认为在较低压力时,萃取率随压力升高而增加很快,但超过一定压力范围后,变化趋于平缓^[11],这是因为在低压区,较小压力的增加会导致密度的显著增加,而在高压区这种影响相对减弱。对于温度而言,温度的升高会引起溶质蒸汽压的

升高,而有利于萃取操作,但同时也会导致超临界流体密度的降低,使得溶解能力降低,致使分离效果变差。对于分离生物碱的应用来说,由于其在植物组织内的结合较为紧密,采取较高的压力和温度相对有利。提取辣椒碱的研究表明^[12],对于一些含有强极性基团如羟基、羧基、苯羟基的物质,需要较高的压力。李玲等^[13]在分离靛玉红的研究中利用双水平、双因子设计法得到的计算结果显示压力的优化条件在高压区,而温度的优化条件在高温区;有关的系统法实验也验证了这一点。但是有一些生物碱长时间处于光、热环境中会发生变性,因此对于特定的分离研究,需要进行具体的分析,以确定适合其自身特点的过程。

2. 溶剂的选择

萃取溶剂的选择对于超临界萃取生物碱有着特殊的意义。在萃取植物挥发油、香料等物质的时候,采用CO₂作为萃取溶剂比较常见,这是因为CO₂无毒、无味、不易燃烧、后续处理简单而且价格便宜,适合天然产物的分离。但是CO₂是一种非极性溶剂,研究表明非极性的物质更容易被CO₂溶解^[14];而极性的物质更容易被极性的溶剂,如N₂O、CHF₃等溶解。Stahl Egon等^[15-16]定量测定了可待因、蒂巴因、罂粟碱、吗啡在CO₂、N₂O和CHF₃中的溶解度,证实鸦片碱在CHF₃中的溶解度最高;在40℃、80~20mPa的条件下考察多种纯生物碱、生物碱盐和含有生物碱的

药用植物时,证实生物碱出于具有极性而较难提取,而 N_2O 比纯 CO_2 更为有效,同时 N_2O 也是分离非极性物质的良好溶剂,而生物碱盐的存在降低了生物碱在超临界流体中的可溶解性。

3. 碱化剂的使用

超临界萃取生物碱同其他应用相比,必须考虑到生物碱在植物组织中的结合状态,而使用碱化剂处理原料,可以使原来与酸结合的生物碱盐转变成游离态,减小生物碱同植物组织的联系程度,从而提高萃取效率。原永芳等^[17]在从延胡索中提取延胡索乙素时,考察了作为碱化剂的氢氧化钙和二乙胺对于萃取得率的影响。结果表明,二者的萃取率相似。对产物进行色谱分析,前者的杂质峰明显比后者少,而且前者对于设备的腐蚀也相对较小。Heemann Volker等^[18]在 $70^\circ C$ 、 25 mPa 的条件下添加6% (质量百分比)的柠檬酸钾来分离烟草中的烟碱,烟草中烟碱的含量从1.98%降至0.20%,同样表明使用碱化剂可在一定程度上提高超临界萃取生物碱的分离效率。

4. 夹带剂的影响

生物碱大多数都带有极性,在 CO_2 中加入少量夹带剂,可以有效地改善超临界萃取的分离效果。Dobbs^[19]等发现,使用夹带剂的分离效果要好于增加操作压力,虽然前者会降低溶剂的密度,而后者刚好相反。夹带剂的使用使得操作有可能在较低的压力下进行。此外,极性夹带剂可以明显的增加极性溶质的溶解度,但不能对

非极性溶质作用,而非极性夹带剂如果分子量相近,对极性及非极性夹带剂都可发生作用。于恩平等^[20]使用乙醇作为夹带剂可以从罗汉果中分离出纯 CO_2 所不能得到的罗汉果苷V。这说明加入夹带剂不仅可以加大溶质在溶剂中的溶解度,还可以提高其选择性。夹带剂的加入方法可根据实际情况有所不同^[21]。当基体束缚因素作用是主要影响因素时,可用静态法加入;当萃取物在超临界流体中的溶解度为主要因素时,可用动态法,也可二者连用。较为常见的夹带剂有甲醇、乙醇、苯、水、丙醇、乙酸乙酯等。卞俊等^[22]使用甲醇作为夹带剂静态加入洋金花中分离东良莨碱,其萃取率要高于溶剂法。Kim Jin Woong等^[23]使用甲醇、乙醇、水作为夹带剂,还在实验中系统考察了上述夹带剂中掺混2%~18% (体积百分比)的二乙胺或三乙胺后对于生物碱分离效果的影响,结果表明,当使用含有10%二乙胺的甲醇作为夹带剂时,粗榷碱的得率提高了28%,这可能是因为夹带剂改变了溶剂的极性,使得分离效果提高,也可能是因为二乙胺的碱化作用使得生物碱转变为游离的状态,或是两者兼而有之。

5. 萃取时间

萃取时间是超临界萃取生物碱的另一个重要因素,Rincon J.和De Lucas A.^[24]对从制烟废料中分离烟碱实验的得率进行了模型分析,通过一个基于热量传递类比得到的模型,在相同流量的条件

下,较短萃取时间的得率的预测值要比实际得率低,而萃取时间较长的时候预测值比实际得率高,这可能是因为烟碱在烟草中一部分呈游离态、一部分呈结合态,因此一部分烟碱可以在萃取初期较为容易的分离,而剩余的部分则比较难以分离,从而造成了预测值与实际得率之间的偏差。

三、展望

超临界流体萃取技术的可调节参数较多,在使用碱化剂和夹带剂后,可有效地改善超临界萃取的分离效果,同时提高其选择性。当目标产物为热敏性成分时,也可在近常温工作。因此,该技术日益广泛应用于生物碱等天然成分的分离。现阶段超临界流体萃取技术越来越多的和高效液相色谱、色质联用^[25-26]等分析测试手段综合,这也预示了超临界流体萃取技术的广阔应用前景。但是由于生物碱结构复杂、极性较强、与植物组织结合紧密;同时,有关生物碱在超临界流体中的相际平衡、溶解度、高压下分子的行为等研究较为困难,影响了超临界萃取工艺的设计和工业化,这都有待于今后深入研究。

参考文献

- 1 化工百科全书编辑委员会. 化工百科全书第14卷. 北京: 化学工业出版社, 1997.
- 2 邓修, 吴俊生. 化工分离工程. 北京: 科学出版社, 2000.
- 3 朱自强. 超临界流体技术原理与应用. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- 4 Lee Huen, Hong Won Hi, Yoon Ji Ho.

- Extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by using supercritical carbon dioxide [J]. *Biotechnol. Tech.*, 1992, 6 (2) : 127~130.
- 5 Brachet A., Mateus L., Cherkaoui S. Application of central composite designs in the supercritical fluid extraction of atropine alkaloids in plant extracts [J]. *Analisis*, 1999, 27 (9) : 772~778.
- 6 Lopez-Avila, Viorica, Benedicto, Janet, Robaugh Dave, Supercritical fluid extraction of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. [J]. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1997, 20 (4) : 231~236.
- 7 姜继祖, 叶开润, 廖周坤等. 超临界CO₂萃取光菇子中的秋水仙碱的研究 [J]. *中草药*, 1997, 28 (3) : 147~149.
- 8 Vafai Shiva, Drake Bruce D., Smith Richard L, Jr. Solid molar volumes of interest to supercritical extraction at 298 K : atropine, berberine hydrochloride hydrate, brucine dihydrate, capsaicin, ergotamine tartrate dihydrate, naphthalene, penicillin V, piperine, quinine, strychnine, theobromine, theophylline, and yohimbine hydrochloride [J]. *J. Chem. Eng. Data*, 1993, 38 (1), 125~127.
- 9 陆蕴如. *中药化学*. 北京: 学苑出版社, 1995.
- 10 Saldana M. D. A., Mohamed R. S., Mazzafra P. Supercritical carbon dioxide extraction of methyl-xanthines from mate tea leaves. [J]. *Braz. J. Chem. Eng.*, 2000, 17 (3) : 251~259.
- 11 王欣, 李元瑞. 超临界流体萃取过程参数的优化选择 [J]. *中国油脂*, 2000, 25 (6) : 200~204.
- 12 张国宏. 超临界二氧化碳萃取技术提取胡椒风味成分的研究. [J]. *食品科学*, 1997, 18 (11) : 21~24.
- 13 李玲, 陈志强, 李修禄. 超临界流体萃取法在中药材质量控制中的应用 [J]. *药学学报*, 1995, 30 (2) : 133~137.
- 14 Stahl Egon. Extraction of natural products with the means of supercritical gases. [J]. *Rev. Latinoam. Quim.*, 1980, 11 (1) : 1~7.
- 15 Stahl Egon, Willing E. Extraction of natural substances using supercritical and liquefied gases [J]. *Mikrochim. Acta*, 1980, 2 (5-6) : 465~74.
- 16 Stahl Egon, Willing E. Extraction of alkaloids with supercritical gases in direct coupling with thin-layer chromatography [J]. *Planta Med.*, 1978, 34(2) : 192~202.
- 17 原永芳, 李修禄, 柳正良等. 超临界流体萃取法及高效液相色谱法分析延胡索中的延胡索乙素的含量 [J]. *药学学报*, 1996, 31 (4) : 282~286.
- 18 Heemann volker., Schmekel Gerald, Ehling Uwe, Hauser Bernhard. Alkaloid extraction from tobacco using carboxylates in supercritical carbon dioxide. *Ger. DE 4002784 C1* 18 Apr 1991, 6 pp.
- 19 Dobbs J M, wong J M, Lahiere R J, Non-polar cosolubility enhancement in supercritical fluid carbon dioxide [J]. *Ind Eng Chem Data*, 1986, 31 303~308.
- 20 于恩平, 朱姜文, 方之蓉等. 关于超临界萃取过程中使用夹带剂的研究 [J]. *化学工程*, 1989, 17 (4) : 21~24.
- 21 陈淑莲, 游静, 王国俊. 超临界流体萃取在天然药物化学分析中的应用 [J]. *分析测试技术与仪器*, 2000, 6 (1) : 16~20.
- 22 卞俊, 蔡定国, 顾明娟等. 超临界二氧化碳流体萃取洋金花中莨菪碱的研究 [J]. *中国药学杂志*, 1996, 31 (10) : 588~590.
- 23 Kim Jin Woong, Choi Young Hae, Yoo Ki Pung. Supercritical fluid extraction of alkaloids from plants. *Int. Appl. WO 2001062761 A1* 30 Aug 2001, 24 pp.
- 24 Rincon J., De Lucas A., Garcia M. A. Preliminary study on the supercritical carbon dioxide extraction of nicotine from tobacco wastes [J]. *Sep. Sci. Technol.*, 1998, 33 (3) : 411~423.
- 25 Song, Kyu Min, Yoon, Ji Ho, Lee, Huen. Extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* using supercritical carbon dioxide. *Biochem. Eng. 2001, Proc. AsiaPac. Biochem. Eng. Conf.*, 566~568.
- 26 Nossack Ana C., Vilegas Janete H.Y., Von Baer Dietrich. Supercritical fluid extraction and chromatographic analysis (HRGC-FID and HRGC-MS) of *Lupinus* spp. Alkaloids [J]. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2000, 11 (5) : 495~501.

(责任编辑: 柳莎 刘维杰)

香港立法会决定额外拨款 3800万港元订立中药标准

香港立法会财务委员会已通过一项法案, 决定额外拨款3800多万港元, 以订立香港的中药标准。

香港卫生署副署长林秉恩在立法会财务委员会上表示, 这笔拨款将用作4年的员工薪酬、购买药材样本、植物标本及各种设备的费用, 以及各项会议所需费用等开支。

据透露, 加上较早前立法会已经同意的800万港元, 香港订立中药标准的整个计划将耗资4600多万港元。这一计划的第一步, 是在3年内为60种药材订立香港的中药标准, 包括常见当归、人参、三七、甘草、何首乌、黄连、银杏叶、穿心莲、麻黄、西洋参、夏枯草、葛根等。

林秉恩透露, 目前已委聘香港中文大学及香港浸会大学对8种药材进行研究和化验工作, 有关工作将在本年最后一个季度完成, 明年初将会公布这8种药材的香港中药材标准。

香港特区政府计划为200种香港常用的药材订立中药标准, 包括统一常用药材的名称、为药材加工方法订立标准、确定有效药材的来源、以及以客观方法区别药材, 以保障公众健康。

(文摘)

Progress of Study on Extraction of Alkaloids by Supercritical Fluid

Zhang Tao and Cai Jianguo

(Institute of Chinese Herbal Medicine Engineering, East China University of Science and Engineering, Shanghai 200237)

This article summarizes the progress of the study on the application of the technology of supercritical fluid extraction to the isolation of alkaloids, and analyzes the factors that may affect the result of the isolation. It also indicates that besides the general factors, such as temperature, pressure, solvent and the time of extraction, extraction result can be improved by adding alkalis while the extraction capacity of supercritical fluid can be enhanced due to the use of cosolvents.

Key Words: supercritical fluid extraction, alkaloids, affecting factors

Toxic Theories of Chinese Herbal Medicines and Their Study Progress

Liu Shumin, Luo Mingmei and Li Yujie

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040)

As for the deep study and correct understanding of the toxicity of Chinese herbal medicines, should be well handled the contradiction that not only the curative effectiveness of poisonous medicines should be brought into full play, but also their toxic reaction and side-effects should be reduced to the minimum so as to establish a set of complete world criteria for the assessment of the safety of Chinese medicines, and this is an important task for the acceleration of the modernization and internationalization of Chinese medicines. This article generally reviews the history and methods of the study on poisonous Chinese medicines and proposes that people should get out of the misunderstanding of poisonous Chinese medicines on the basis of summing up the valuable experience of our predecessors, and carry out the study on the toxicology of Chinese herbal medicines by making use of the knowledge of modern pharmacology and toxicology and advanced experimental means.

Key Words: toxicity of Chinese herbal medicine, source of theory, experimental research

Transformation of Protoplast-derived Colonies by *Agrobacterium tumefaciens* in *Taxus yunnanensis*

Luo Jianping, Jiang Shaotong and Pan Lijun

(Department of Biotechnology and Food Technology, Hefei University of Technology, Hefei 230009)

In order to isolate cell lines with high paclitaxel productivity via molecular mutagenesis, the transformation of *Taxus yunnanensis* protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens* was studied. Protoplasts were obtained from friable, light yellow callus of *T. yunnanensis* in enzyme solution. Callus in the exponential growth phase of 15–20 days after subculture produced the highest yield of viable protoplasts. When cultured in liquid medium composed of B5 salts, KM vitamin and organic components and 0.45 mol/L fructose and supplemented with 3.0 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L KT, protoplasts underwent sustained divisions and formed cell colonies. Although *A. tumefaciens* failed to transform freshly isolated protoplasts and protoplasts with regenerated cell walls, transformants were obtained by co-cultivating protoplast-derived minicolonies consisting of 10 or more cells with the strain B6S3. The transformants were confirmed by opine analysis. The transformation frequency was about 5%. HPLC analysis showed that there was a significant difference in paclitaxel content among all transformants. The highest paclitaxel content in transformants was found to be 0.076%, which was 6 times as high as in control callus. The transformant with high paclitaxel accumulation showed a lower cell growth as compared to its control. During subculture the transformant remained unchanged with respect to cell growth and paclitaxel accumulation. Although the paclitaxel accumulation in the transformants was not high enough to produce paclitaxel for commercial purposes, the method described in the present study would provide an opportunity to isolate cell lines with high paclitaxel productivity from mutagenized single cell culture via T-DNA insertion.

Key Words: *taxus yunnanensis*; protoplasts; *agrobacterium tumefaciens*, transformation; paclitaxel

Isolation and Purification of Polysaccharides in *Zizyphus Jujuba* MILL and Determination of their Molecular weight

Yang Yun Meng Jiang and Miao Mingsan

*(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008)**Li Zhenguo (Henan Institute for Drug Control, Zhengzhou 450008)*