

摘 要

近 20 年来, 超临界萃取技术受到广泛的重视并被视为一种洁净的高效提取技术。本文首先综述了超临界萃取技术的特点和优势及在化工、医药、食品等领域内的应用情况, 并全面总结了国内外近年来薯蓣皂素提取工艺研究的进展情况。

作为甾体激素类药物原料的薯蓣皂素的传统提取工艺是有机溶剂提取法, 存在着过程安全性差、溶剂污染环境、工艺周期长及操作费用高等缺点。本文主要以超临界 CO_2 萃取技术为关键技术从薯蓣属植物水解物中提取薯蓣皂素, 同时比较了传统的索式萃取法以及超声波辅助萃取法, 为超临界 CO_2 萃取技术工业上应用于薯蓣皂素的提取进行可行性研究。

以薯蓣属植物水解物为原料, 以薯蓣皂素收率作为目标函数, 实验考察了超临界萃取的萃取温度、萃取压力、原料粒度、 CO_2 气体流速、 CO_2 用量及萃取时间等因素对萃取收率的影响。实验结果表明: 萃取温度对薯蓣皂素收率影响最大; 随着萃取压力和 CO_2 流速的升高, 总收率和薯蓣皂素收率的提高。低目数的水解物对萃取有利, 但总的来说, 原料粒度对萃取效果影响不大。

通过实验得出一个最佳工艺条件, 并综合比较了各种萃取方法, 结果表明超临界萃取薯蓣皂素是可行的。此外, 在此基础上, 对实验数据进行了经验关联并提出几点建议。

关键词: 超临界 CO_2 萃取
薯蓣皂素
超声波辅助萃取
索氏萃取
可见光分光光度法

ABSTRACT

Supercritical fluid extraction (SFE) has received much attention and is being considered as one of clean and highly effective technology in the last twenty years. In the thesis, the advantages and features of supercritical fluid technology for chemical, medicine and food application were summarized firstly. The research status for extraction of diosgenin using various kinds of extraction methods home and abroad were also intensively reviewed.

Diosgenin is a steroidal compound very useful in pharmaceutical industry as a natural source of steroidal hormones. The industrial extraction of diosgenin involved mineral hydrolysis of chopped tuber followed by extraction using organic solvent such as petrol, but this process had its disadvantages. The extraction stage was dangerous and waste of solvent, which was very harmful to environment and people's health. Moreover, the total extraction took much time, particularly when screening large sample numbers. The thesis reported that supercritical CO₂ was used to extract diosgenin following acid hydrolysis from the tuber of herbal plants. By comparing SFE with Soxhlet extraction and ultrasound-assisted extraction, the feasibility of extraction of diosgenin using supercritical CO₂ was obtained.

The influences of some factors on the supercritical CO₂ extraction yield were investigated, which included extraction temperature, extraction pressure, the particle size of the material, the fluid rate, the amounts of CO₂ used and extraction time. The experimental results demonstrated that the extraction temperature showed the greatest influences on the yield of diosgenin. The total yield and diosgenin yield increased with the increasing extraction pressure and the fluid rate. Though the material of bigger size benefited for the yield of diosgenin, the particle size had not great influences on diosgenin yield.

Based on above investigation, the optimum conditions were obtained and the promising future of industrialization for extraction of diosgenin with SF-CO₂ were pointed out. Experimental model was related and some valuable suggestion was also proposed.

Keyword: Supercritical CO₂ extraction
Diosgenin
Ultrasound-assisted extraction
Soxhlet extraction
Spectrophotometry

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢之处外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得天津大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：严伟

签字日期：2003年1月20日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解天津大学有关保留、使用学位论文的规定。特授权天津大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

(保密的学位论文在解密后适用本授权说明)

学位论文作者签名：严伟

导师签名：李淑芳

签字日期：2003年1月20日

签字日期：2003年1月20日

前言

甾体激素药物是目前许多临床疾病及计划生育所需重要药物。目前全世界合成甾体激素药物所用的起始原料 60%以上为薯蓣皂素^[64]。从薯蓣属植物中提取薯蓣皂素最早工艺为原料粉碎-直接酸水解-用石油醚提取-提取物浓缩-干燥五步法后得薯蓣皂素。但由于部分皂甙被禁锢在细胞壁上变成对酸性水解稳定的细胞壁结构组分,因而存在水解不彻底,皂素收率低等缺点。故而增加了预发酵处理而成为六步法,使收率得到提高。目前国内外工业生产薯蓣皂素普遍采用后者。但仍然存在着如下缺点:1)石油醚易燃,故对水解物进行抽提时安全性差;2)石油醚抽提时耗溶剂量大,且后处理较繁杂,有害溶剂残留难除尽;3)工艺步骤多,流程长。因而,选择新的提取技术应是工艺改进的关键和研究的重点。

近年来全球能源短缺和环境污染的日益严重使世人越来越清醒的认识到绿色化学技术发展的必要性和必然性。超临界萃取技术是近二十年来出现的一种新型分离工艺,由于它具有低能耗、无环境污染、操作简单、参数易控制等特点越来越受到人们的广泛关注,已在食品、医药、香精香料、化学工业、能源工业、生物化工、分析化学等领域显示出广阔的应用前景。超临界二氧化碳萃取所用萃取溶剂为超临界二氧化碳流体,其无毒、无污染等特性而被认为是有机溶剂的理想取代剂。将它应用于天然物中具有药用或食用价值的有效成分的开发已成为当前研究热点。

薯蓣皂甙作为甾体皂甙中的一种,主要存在于穿地龙、黄山药、柴黄姜和盾叶薯蓣等薯蓣属植物中,其水溶液振摇后易起持久性的泡沫,且有溶血作用。薯蓣皂甙是由薯蓣皂甙元(薯蓣皂素是商品名)和糖组成。薯蓣皂甙经酸性水解掉糖后变成薯蓣皂甙元。薯蓣皂甙元有 $\Delta^5, 3\beta\text{-OH}$ 的结构,易引入 $\Delta^4, 3\text{-酮}$ 或 $\Delta^4, 3\text{-酮}$ 。用它制备的妊娠双烯醇酮酯是合成各种甾体抗炎药和女用避孕药的主要中间体,所以薯蓣皂甙元广泛用于制造可的松、睾丸素、黄体酮和口服避孕药等二十多种甾体激素,也可用于制备洗涤剂、乳化剂和发泡剂等。

本课题是天津市自然科学基金项目,旨在研究采用超临界二氧化碳萃取技术代替石油醚萃取从薯蓣属植物水解物中提取薯蓣皂素的可行性和最佳工艺条件,为该技术的工业应用提供必要参数。本课题所研究的主要内容是:

- 1) 超临界萃取工艺适宜的工艺参数的选择,如萃取温度、萃取压力、原料粒度、气体流速、 CO_2 用量及萃取时间等的选择。
- 2) 考察超声波辅助萃取工艺和传统溶剂萃取工艺-索氏萃取法,并与超临界二氧化碳萃取工艺进行比较。

3) 以可见光分光光度法为主要的定量分析方法, 同时结合熔点测定法、高效液相色谱分析三种提取方法所得萃取产物中薯蓣皂素的纯度。

通过实验研究, 在最佳工艺条件下, 超临界二氧化碳萃取薯蓣皂素收率高于传统索氏提取工艺的皂素收率, 产品纯度也达到优等品的水平, 并且省去六步法中的浓缩和干燥处理工序, 大大缩短了操作周期, 从而圆满完成了该课题。

第一章 文献综述

1.1 超临界萃取技术简介

超临界流体萃取过程 (Supercritical Fluid Extraction, 简称 SFE) 是通过利用处于临界温度和临界压力以上的流体具有的特异增加的溶解能力而发展出来的化工分离新技术。早在 100 多年前, J. B. Hannay 就发现无机盐在高压乙醇或乙醚中溶解度异常增加得现象 (英, 皇家学会志, 1879)。到 20 世纪 60 年代已有不少研究者从各方面研究这一特殊的溶解度增加现象。人们还发现处于临界压力和临界温度以上的流体对有机物溶解度增加的现象是非常惊人的, 一般能增加几个数量级, 在适当条件下甚至可达到按蒸汽压计算得到浓度的 10^{10} 倍 (油酸在超临界乙烯中的溶解度)。但是应用这一特殊溶解能力的新型分离技术——超临界流体萃取过程却是近 20 多年的事^[1-4]。1978 年联邦德国建成从咖啡豆脱除咖啡因的超临界 CO_2 萃取工业化装置 (处理量达到 27kt/a)。分离过程采用二氧化碳为萃取溶剂, 由于超临界 CO_2 流体兼有气体和液体的特性, 溶解能力强, 传质性能好, 加之 CO_2 无毒, 惰性, 无残留等一系列优点, 所以新工艺过程可以生产出能保持咖啡原有色、香、味的脱咖啡因咖啡。这是其他分离技术都无法达到的效果。同年在联邦德国 Essen 首次召开“超临界流体萃取”国际会议, 从基础理论、工艺过程和设备等方面讨论该项新技术。紧接着几年中, 采用超临界 CO_2 流体从啤酒花中萃取酒花浸膏的大规模工业化装置也先后在联邦德国和美国等地投产。至此, 超临界流体技术名声大振, 受到人们广泛的关注。20 世纪 80 年代以来, 国际上投入大量人力、物力进行研究。研究范围涉及食品、香料、医药和化工等领域, 并取得一系列进展^[5-8]。表 1.1 列出超临界流体萃取工业化部分进展。

我国超临界流体萃取研究始于 20 世纪 80 年代初, 从基础数据、工艺流程和实验设备等方面逐步发展。研究工作得到国家各级科学技术部门的大力支持, 经历 20 余年的努力, 我国超临界流体萃取技术研究和应用已取得显著成绩^[9-15]。据不完全统计, 全国已建成 10 余套工业规模萃取装置, 中小型设备达百余套。超临界流体萃取在我国已逐步走向工业化, 有多种产品进入市场, 其发展方兴未艾。

表 1.1 超临界流体萃取工业化进展^[6]

Table 1.1 Industrialization progress of SFE

投产年份	厂名	国家	萃取对象	萃取釜容积/L
1978	HAG Co.	德国	咖啡	
1982	SKW/Trostberg	德国	啤酒花	6500*3
1984	Barth Co.	德国	啤酒花, 咖啡	500*1
	Natural Cane		啤酒花, 红辣椒	1000*2
	SKW/Trostberg	德国	茶, 咖啡	
	富士香料	日本	香料	
1985	Pflzer	美国	啤酒花	
1986	SKW/Trostberg	德国		200*2
	富士香料	日本	香料, 色素	300*1
1987	Barth Co.	德国	啤酒花	4000*4
	Messer			200*1
	Grelshelm	日本	香料	100*1
	Yasuma			
1988	SKW/Trostberg	德国	茶叶	
	武田药品	日本	药品脱溶剂	1200*1
	Maxwell (GF)	美国	咖啡	25kt/a
	CAL Pflzer		香料	100*4
1989	长谷川香料	日本	香料, 精油	300*2
	HAG Co.			3000*3
	茂利制油	日本	色素	500*1
	Ensco Inc.		固体废料	2000*1
	Phillip Morris	美国	烟草	7000*8
	高砂香料	日本	香料	420*1
1990	Jacob suchard		咖啡	360*14
	HAG Co.	德国	咖啡	50kt/a
	SKW/Trostberg	德国	香料	200*2
	Barth Co.	德国	咖啡	220*1

	Raps Co.		香料	1000*2
	Johns Maas. Inc.	美国	啤酒花	4000*2
	Pltt-Des Co.	美国	啤酒花	500*3
				3000*4
1991	富士香料	日本		300*1
	SKW/Trostberg	意大利	咖啡	20kt/a
	Barth Co.	德国		4000*2
	Texa Co.		炼油废料	2000*3
1993	长谷川香料	日本	香料	500*2
	Agrisana		药物	300*3
1994	Barth Co.	印度	香料	200*2
				300*1
	南方面粉厂	中国	食品	300*2

1.1.1 超临界流体萃取技术的优势、特点及其局限性

物质处于其临界温度 (T_c) 和临界压力 (P_c) 以上状态时, 向该状态气体加压, 气体不会液化, 只是密度增大, 具有类似液体的性质, 同时还保留气体性能,

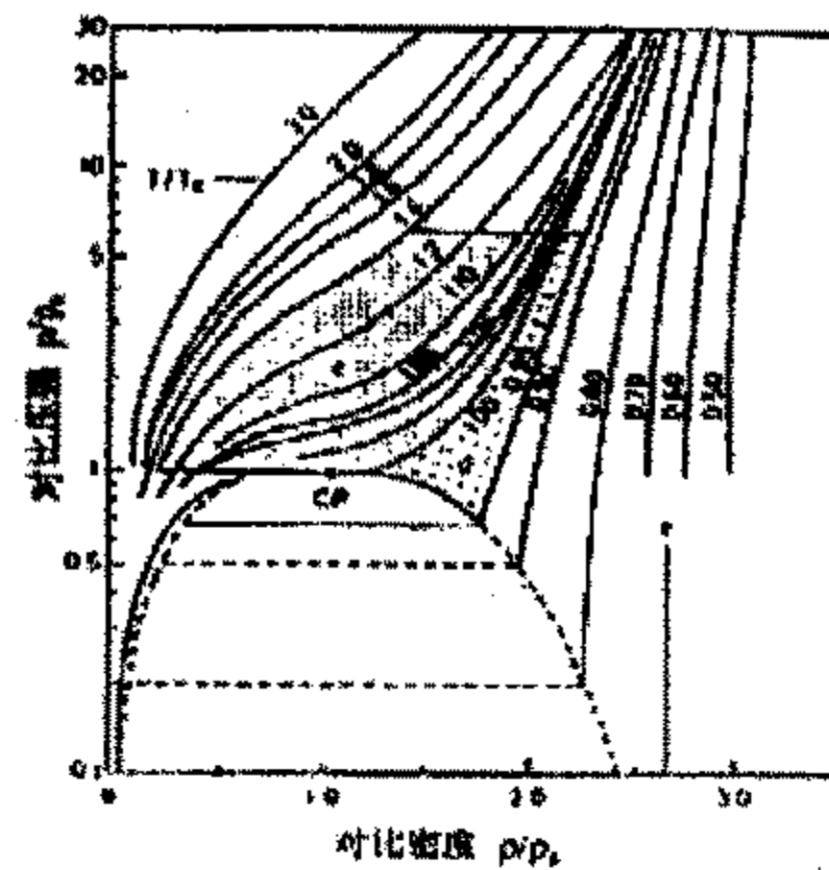


图 1.1 纯 CO_2 的对比压力-对比密度图

Fig. 1.1 Relative pressure-contrast density relation of CO_2

这种状态的流体称为超临界流体 (Supercritical Fluids, 缩写为 SF), 该流体表现出若干特殊的性质。表 1.2 列出超临界流体的密度, 扩散系数和粘度与一般气体, 液体的对比。从表 1.2 的数据可知, 超临界流体的密度比气体大数百倍,

具体数值与液体相当。其粘度仍接近气体，但比起液体来，要小 2 个数量级。扩散系数介于气体和液体之间（大约是气体的 1/100，比液体要大数百倍）。因而气体既具有液体对溶质有较大溶解度的特点，又具有气体易于扩散和运动的特性，传质速率大大高于液相过程。也就是说超临界流体兼有气体和液体的性质。图 1.1 为纯 CO₂ 的对比压力-对比密度图，图中所示的阴影部分给出了超临界流体的范围。在对比压力 $P_r > 1$ ，对比温度 T_r 为 1.0 与 1.2 之间的这一区域，超临界流体表示出极大的可压缩性。流体密度从气体般的密度 ($\rho_r = 0.1$) 上升到液体般的密度 ($\rho_r = 2.0$)，很明显，压力和温度的微小变化都可以引起流体密度很大的变化，并相应地表现为溶解度的变化。因此，人们可以利用压力，温度的变化来实现萃取和分离的过程。

表 1.1 超临界流体与气体和液体性质的比较^[8]

Table 1.1 Comparison of some properties of SF with gas and liquid

性质	气体	超临界流体		液体
	101.325kPa, 15-30℃	T_c, P_c	$T_c, 4P_c$	15-30℃
密度/(g/ml)	$(0.6-2) \times 10^{-3}$	0.2-0.5	0.4-0.9	0.6-1.6
粘度/(g/(cm·s))	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(3-9) \times 10^{-4}$	$(0.2-3) \times 10^{-2}$
扩散系数/(cm ² /s)	0.1-0.4	0.7×10^{-3}	0.2×10^{-3}	$(0.2-3) \times 10^{-5}$

注：本数据只表示数量级关系。

从图 1.1 和表 1.2 可以得出超临界流体的四个主要特性：

- 1) 超临界流体密度接近于液体。
- 2) 超临界流体的扩散系数介于气态与液态之间，粘度则接近气体而比液态低约 1-2 个数量级，其传递过程类似于气体，因而在进行萃取时传质速率要远大于液态萃取过程。
- 3) 当流体状态从汽-液平衡区变化到临界区时，蒸发热急剧下降，至临界点时则汽-液相界面消失，蒸发焓为零，其热容变为无穷大，因而在临界点附近进行分离操作更有利于传热和节省能量。
- 4) 高沸点物质在超临界流体中的溶解度比其在气体中的溶解度高出 1-2 个数量级以上，且由于流体在临界点附近的压力和温度的微小变化都会导致流体密度很大的变化，从而使溶质在流体中的溶解度发生相当大的变化。

超临界萃取技术就是利用流体的这种非同寻常的性质，通过调节温度或/和

压力在高于临界温度和临界压力的条件下,从目标物中萃取有效成分。当降温减压时,溶解在 SF 中的有效成分立即与气态溶剂分离,以达到提取目标成分的目的。

超临界流体萃取工艺具有如下特点:

- (1) 超临界流体萃取兼具精馏和液-液萃取的特点:由于溶质的蒸气压、极性及其分子量大小是影响溶质在超临界流体中溶解度的重要因素,使在萃取过程中被分离物质间挥发度的差异和它们分子间亲和力的不同这两种因素同时起作用,如超临界萃取物被萃出的先后常以它们的沸点高低为序。
- (2) 操作参数易于控制:仅就萃取剂本身而言,超临界萃取的萃取能力取决于流体的密度,而流体的密度很容易通过调节温度和压强来加以控制,这样易于确保产品质量的稳定。
- (3) 溶剂可循环使用:在溶剂分离与回收方面超临界萃取优于一般液-液萃取和精馏,被认为是萃取速度快、效率高、能耗少的先进工艺。
- (4) 适合于分离热敏性物质,且能实现无溶剂残留:超临界萃取工艺的操作温度与所用萃取剂的临界温度有关,目前最常用的萃取剂 CO₂ 的临界温度由于接近室温,故能防止热敏性物质的降解,达到无溶剂残留。这一特点使超临界萃取技术用于天然产物提取成为研究热点。

可作为超临界流体的物质很多,一般为低分子量化合物,如 CO₂、H₂O、C₂H₄、C₂H₆、NH₃、N₂O、SF₆、CF₂Cl₂等。表 1.3 列出文献介绍可作为超临界流体的部分溶剂及其临界性质^[8]。

表 1.3 部分超临界流体溶剂的临界数据^[8]

Table 1.3 Supercritical data of some compounds

化合物	沸点/°C	临界温度 T _c /°C	临界压力 P _c / MPa	临界密度/(g/cm ³)
CO ₂	-78.5	31.06	7.39	0.448
CH ₄	-164.0	83.0	4.60	0.160
C ₂ H ₄	-103.7	-9.50	9.50	0.200
C ₃ H ₈	-44.5	97.0	4.26	0.220
N ₂ O	-89.0	36.5	7.23	0.457
H ₂ O	100	374.2	22.0	0.344

从表 1.3 中各化合物的临界数据可以看出,CO₂最受注意。由于超临界 CO₂

密度大, 溶解能力强, 传质速率高; CO_2 临界压力适中, 临界温度 31°C , 分离过程可以在接近室温条件下进行; 便宜易得, 无毒, 惰性且极易从萃取产物中分离出来等一系列优点, 当前绝大部分超临界流体萃取都以 CO_2 为溶剂。

超临界 CO_2 (SC- CO_2) 萃取技术用于药物、食品等的提取和纯化等方面具有以下优点^[16]: 1) 适于分离热敏性物质。由于 CO_2 的临界温度 ($T_c=31.06^\circ\text{C}$) 易于达到, 故可在室温下对天然植物的有效成分进行提取, 从而防止了热敏性物质的氧化和逸散, 而且能使高沸点、低挥发度、易热解的物质远在其沸点之下萃取出来。2) 超临界 CO_2 萃取为绿色化学工艺。所用溶剂 CO_2 具有无毒、无味、不燃、不腐蚀、价格便宜、易于精制、易于回收等优点。与传统溶剂萃取法相比, 无溶剂残留; 同时不仅避免了大量有机溶剂的使用, 也防止了提取过程对人体健康的危害和对环境的污染。3) 萃取速度快、效率高、能耗少。由于超临界 CO_2 萃取能力取决于流体密度, 因而很容易通过调节压力或/和温度使 CO_2 与萃取物迅速分为两相 (气、液), 达到迅速地、选择性地提取的目的。不仅萃取效率高、耗能低, 而且萃取物杂质少, 有效成分高度富集。4) 超临界 CO_2 还具有抗氧化灭菌作用, 有利于保证和提高天然物产品的质量。5) 超临界 CO_2 萃取比溶剂萃取的步骤少, 流程短, 操作参数也易于控制, 产品质量稳定且无有机溶剂的残留。上述的这些优势无疑为人们提供了一种提取、分离、制备及浓缩的全新方法。

然而, SFE 技术也有其局限性: 1) 高压下操作必然会对设备提出更高要求; 2) 设备的一次性投资费用较高; 3) 对工艺操作人员及技术要求较高等。另外单独使用超临界萃取技术有时达不到生产指标, 这就需要和其他化工分离技术相结合, 就中草药有效成分提取而言, 由于中草药成分复杂, 近似化合物很多, 单独采用该方法可能会满足不了纯度要求。中药复方起疗效作用的物质为广义的化学成分, 不仅包括挥发油, 生物碱、黄酮类、皂甙类小分子化合物, 也包括多糖、蛋白、肽等生物大分子等, 而 SC- CO_2 萃取仅对中药中的某些非极性和弱极性的有效成分的提取具有优越性, 因而, 在中药有效成分提取工艺过程中, 还应考虑与其它分离、纯化技术相结合。但鉴于 SFE 的特殊优势和高质量产品, 它仍是一种颇具生命力的绿色生产技术。随着研究的进一步深入, SFE 技术作为中药现代化的关键技术之一, 将在中药的提取分离及兼顾单方、复方中药的开发方面显示出更大的潜力, 成为实现中药现代化的重要途径之一。同样, 分析型 SFE 技术在中药质量分析方面也具可观前景。

1.1.2 超临界萃取技术的应用与进展

1.1.2.1 超临界萃取技术在中草药有效成分提取中的应用进展

SFE 技术用于提取中草药中有效成分有着非常广泛的应用前景。近十多年来日本学者宫地洋^[17]等,对紫草、蛇床子、茵陈蒿、连翘、桑白皮、红花、月见草油等的 SC-CO₂ 萃取工艺进行了研究,结果发现 SFE 与传统的溶剂法相比,收率高,有效成分高度浓缩,药理效果好,且毒性降低。日本的系川秀治^[18]等以 TLC 为指标,对黄连、苍术、良姜等有效成分进行提取,证明均能用 TLC 检出它们的有效成分。近年来国内这方面的研究也非常活跃,有上百种的中草药被用 SFE 法进行了研究,并有不少论文发表。非极性的 SC-CO₂ 对那些亲脂性、分子量小的非极性物质具有较高的溶解度,其萃取效果常优于传统的提取方法。研究表明,压力的升高会增大 SF 的密度,从而提高 SF 的萃取能力。适当提高温度可提供待萃取成分克服其解离时动能势垒必需的热能,同时也有利于提高其挥发度和扩散能力。然而对于中药中的某些极性有效成分,单一组分的 SC-CO₂ 萃取仅靠改变压力和温度常难以达到理想的效果,这是由于 CO₂ 本身的分子结构和物理特性限制了它的溶剂功能。CO₂ 的特点之一是它具有极强的均一化作用,能与众多的非极性或极性溶剂混溶。

在 SC-CO₂ 萃取体系中,加入一种少量的、可以与之混溶的、挥发性介于二者之间的物质即改性剂,可以大大增加溶质在 SC-CO₂ 流体中的溶解度和选择性,增加溶质对温度、压力的敏感程度,改变溶剂的临界参数。常用的改性剂有水、醇、酮、酯等^[19]。如在 30℃、20MPa 条件下提取柴胡时,萃取出来的主要成分是柴胡挥发油,而将温度提高到 65℃、压力提高到 30MPa 条件下则可萃取出 2-3% 的柴胡皂甙,但加 60%乙醇作改性剂时,柴胡皂甙的收率会提高到 3.06%。另外也有学者研究了在超临界条件下用不同浓度的乙醇作改性剂进行梯度萃取。如廖周坤等^[20]在超临界条件下用不同浓度乙醇作改性剂,梯度萃取臧雪灵芝,所得皂甙粗品最高达到 2.46%,多糖达到 2.06%;而仅用 SC-CO₂ 萃取物中则几乎没有多糖成分。目前对混合溶剂的理论和应用研究相当活跃,根据萃取物的性质选择合适的改性剂,对提高溶解度、改善选择性和增加收率、实现 SFE 技术的工业化生产,将会起到关键作用。另外,一些难挥发性亲水性物质如蛋白质、多肽等难溶于 SC-CO₂ 中。最近 Johnson 等^[21]的研究发现:氟代醚、氟代酯等表面活性剂与水在 CO₂ 中形成稳定透明的胶囊,能使蛋白质溶于 SC-CO₂ 中而被萃出,并且不改变螯合的蛋白质构型和生物学活性。这一发现为超临界萃取天然药物中难挥发性、亲水性物质提供了一种新的方法。

1.1.2.2 超临界萃取技术在痕量药检及中药质量控制方面的应用

随着社会进步,人们越来越关心残留在药物、食品中的有毒物问题,许多国家制定了严格的法规和限量标准用于监测药物、食品中的农药残留物、有害

重金属或其他有毒化合物，同时要求更可靠的制样方法和快速、灵敏的分析检测手段监控这些痕量甚至超痕量有毒物。传统的方法是采用有机溶剂萃取或其他技术使目标检测物从待测样品中分离出来，再用适当的仪器进行定性和定量分析。然而传统的溶剂法制样繁杂费时，且大量使用环境有害的有机溶剂，而超临界萃取技术在分析化学领域制备药检样品，则显示出快速、安全经济、环境无害等特性。目前分析型超临界萃取用于痕量药检制样正受到广泛重视^[22]。

SFE 技术用于痕量药检制样时目前最广泛使用的萃取剂也是 CO_2 。SFE 技术用于制备痕量药检制样近十年来已有大量文章发表。有人采用 SFE 技术对各种基质（如土壤、淤泥、水、植物、蔬菜及生物体等）中的各种农残（如有机氯农药、有机磷农药、特异性杀虫剂等）的回收与检测策略进行了综述报道^[23]。Dirk Sterzenbuch^[24]等用超临界技术分析海底沉淀中的含氯农药并与传统的溶剂法进行了比较，发现超临界萃取农残的效果与有机溶剂萃取相当或优于有机溶剂萃取，且所需样品量少，对环境无污染，对研究人员无害。研究表明， SC-CO_2 对非极性或低极性的农残如有机氯农药有较高溶解度，而对中等极性的有机磷农药及其他强极性的农药，溶解度一般都很低。因而，许多研究者采用加入适当的极性改性剂的 SC-CO_2 从各种基质中回收极性的农残^[25]。另外 Park 和 Maxwell^[26]等针对不同物系将超临界萃取与吸附结合的在线吸附和非在线吸附型制样方法，以便消除检测干扰背景物质，使预处理后的样品不需进一步纯化而能直接进行仪器分析。

近年来，SFE 技术无论在中药农残检测制样方面，还是在农残脱除工艺的开发方面，均引起国人的广泛关注。但由于中药材成份复杂，其中许多成分的结构和理化性质等与农药相似，因而怎样使农残尽可能地回收而药用成份损失尽可能低，是目前 SFE 技术应用于中药农残脱除工艺的关键。有人^[27]采用 SFE 与吸附相结合的技术从啤酒花中去除农残时，首先除去了 87% 的农残，而后再通过改变 SFE 条件从啤酒花中提取出了有效成分苦味酸。在中药除农残方面可借鉴这一方法。张曙明等^[28]在综述中药中农药残留量研究状况及安全控制时介绍了 SFE 在该领域中应用。

SFE 原理用于仪器分析的超临界色谱（SFC）近年来也获得快速发展。由于超临界色谱具有高效快速、操作条件易于交换等特点而成为一种比较理想的药物分析分离方法。SFC 以 SF_6 作为流动相，使其具有气相色谱（GC）的分离效率和高压液相色谱（HPLC）的溶剂强度，从而可从复杂的基体中有效分离与检测天然物中的待测组分，有些样品甚至不需要进一步纯化。从第五届国际 SFC&SFE 会议信息表明，SFC 继续朝着 GC 和 HPLC 难于分析的领域扩展，对那些通常被认为

难挥发、沸点高达 1000℃的物质通过改变参数,可按照化学类型或沸点进行分离。近年来 SFC 的论文很多^[29-32],在分析胺类、芳香油、鸦片碱等的应用日益广泛。开管柱型 SFC 分离胺类^[29]、氨基吡啶^[30]效果良好;填充柱 SFC 分离内酰胺、安息香类镇静剂等已取得了成功^[31];制备型色谱已经问世它,可用来纯化不饱和脂肪酸, Terfloth^[32]用 Prikle 型固定相制备苜蓿酮香豆素,一次进样就可分离 5mg 药物;刘志敏等^[33]用 SFC 法分离测定银杏叶提取物含量,发现这种方法定量结果准确,重现性好。另外, SFC 与 GC、HPLC、薄层色谱及质谱等联用,大大拓宽了 SFC 的应用范围,特别是 SFC/MS 联用为分析高分子量和热敏性化合物提供了重要的分析手段^[34],是进一步开发的重要方面。

总之, SFE 技术既可用于从中草药中提取有效成份,又可用于从中草药中脱除有害成分而不带来环境污染或二次污染,随着人们对回归自然、保护地球环境意识的不断增强,环境无害的 SFE 技术将会得到进一步的开发和应用,在中药现代化进程中发挥越来越大的作用。

1.1.2.3. 超临界萃取技术在其它方面的应用

1. 在食品方面的应用

传统的食用油提取方法是己烷萃取法,但此法生产的食用油溶剂残留量超出了食品管理法的规定。美国用 SC-CO₂ 提取豆油和玉米油^[35]获得成功,产品质量大幅度提高。目前,已经可以用 SC-CO₂ 从葵花籽、红花籽、花生、小麦胚芽、棕榈、可可豆^[36]中提取油脂,提出的油脂中含中性脂质,磷含量低,色度低,无臭味。这种方法比传统的压榨法收率高,且不存在溶剂法的溶剂残留问题。专家们认为这种方法可以使油脂提取工艺发生革命性的改进。

咖啡中含有的咖啡因对人体有害而需从咖啡中除去。传统的工业方法是用二氯乙烷来提取,但二氯乙烷不仅提取咖啡因,也提出了咖啡中的芳香物质,且残存的二氯乙烷难以除净,影响咖啡的质量。Zosel^[37]博士开发的用 SC-CO₂ 从咖啡豆中提取咖啡因的专利技术,现已由西德的 Hag 公司实现工业化生产,并被世界各国普遍采用。这一技术的最大优点是取代了原来在产品中残留的、对人体有害的微量卤代烃溶剂,咖啡因的含量可从原来的 1%左右降低至 0.02%,而且 CO₂ 良好的选择性可以保留咖啡中的芳香物质。

2. 在医药保健方面的应用

Stahl 教授^[38]采用 SFE 法对许多药用植物中有效成分如各种生物碱、芳香性成分及油性组分实现了满意的分离,并获得专利。鱼油和 ω -3 脂肪酸有益于健康,可以从浮游植物中获得,且其中不含胆固醇。Helga 等人^[39]用 SFE 法从藻类中萃

取该类物质获得成功。另外,用 SFE 法从银杏叶中提取的银杏黄酮,从鱼的内脏、骨头等提取的多烯不饱和脂肪酸 (DHA、EPA),从沙棘籽中提取的沙棘油,从蛋黄中提取的卵磷脂等对心脑血管疾病具有独特的疗效。

在抗生素药品生产中,传统方法常用丙酮、甲醇等有机溶剂,但要将溶剂完全除去而又保留原来的药性非常困难,若采用 SFE 法则可以符合要求。

3. 天然香精的提取

用 SFE 法萃取香料^[40]不仅可以有效地提取芳香性组分,还能提高产品纯度,保持其天然香味,如从桂花、茉莉花、菊花、梅花、米兰花、玫瑰花中提取花香精,从胡椒、肉桂、薄荷提取辛香料,从芹菜籽、生姜、芫荽籽、茴香、砂仁、八角、孜然中提取精油,不仅可以用作调味香料,而且某些精油还具有较高的药用价值。

4. 天然色素的提取^[41]

目前国际上对天然色素的需求逐年增加,主要用于食品加工、医药和化妆品,不少发达国家已经规定了使用合成色素的最后期限,在我国禁用合成色素也势在必行。溶剂法生产的色素纯度差、有异味和溶剂残留,无法满足国际市场对高品质色素的需求,SFE 技术克服了以上这些缺点。目前国内用 SFE 法提取天然色素如辣椒红色素的技术已经成熟。

5. 在化工方面的应用

超临界技术还用来制备液体燃料^[42]。以甲苯为萃取剂,在 $P_c = 10\text{MPa}$, T_c 在 $400\text{--}440^\circ\text{C}$ 范围内进行萃取,在 SF 分子的扩散作用下,促进煤中有机质深度热分解,能使近三分之一的有机质转化为液体产物;此外,还从煤炭中萃取出含硫等化工产品^[43]。最近还开发了超临界污水处理工艺^[44]。俄罗斯、德国还把 SFE 法用于重油脱沥青技术^[45]。

6. 生物工程方面的应用

近年来的出版物记载^[46],超临界条件下的酶催化反应可用于合成和拆分手性化合物。另外超临界或亚临界水可作为一种酸催化剂,催化纤维素迅速转化为葡萄糖。

1.1.2.4. SFE-CO₂ 在产业化上所面临的问题^[47]

(1) 产品的选择:产品选择是否合适是影响超临界萃取工艺能否实现工业化的关键因素。虽然超临界萃取对许多产品有很好的萃取效果,可是由于在经济效益上不及

传统的提取工艺,使得该工艺直接用于工业化生产的例子很少。所以,只有选择高附加值的产品作为萃取对象,超临界萃取将真正成为人们广泛使用的绿色提取工艺技术。

- (2) 萃取釜: 由于超临界萃取的实现条件一般为高温、高压条件,而高温、高压操作对釜必然提出很高的要求。
- (3) 装置规模: 超临界萃取装置属于高压设备,投资费用昂贵,规模越大,投资费用就越高,规模不当则会给企业经营造成一个包袱,选择规模一般根据自己企业经营范围和产品来确定。如从茶叶中提取咖啡因,则需要大型装置,一般容积大于1000L。对一般的提取,超临界萃取装置宜中小型较为实际,每套装置配置 2-3 个萃取釜效率会高一些。
- (4) 装置的清洗: 由于整个装置是在高压下工作,为防止泄露,装置的管件尽可能采用焊接连接,就中草药的萃取来说,必会遇到叶绿素、蜡质等粘着设备和管道内壁,这就给清洗带来了不少麻烦,需添置辅助设备来清洗。如果清洗不彻底将直接影响产品质量。

1.2 植物中有效成分的提取,分离与纯化

1.2.1. 植物中有效成分的提取^[48]

植物中有效成分的提取、分离和纯化,一般以利用溶剂为多。溶剂的不同,浸出的成分也不同。近年来。物理方法,如色谱、逆流分溶等进展很快,缩短了对植物中有效成分研究的周期。但无论用何种方法,首先应掌握各种有效成分的理化性质,尤其是对于不同溶剂包括酸,碱等的性能,以及各种分离的原理,即可灵活应用而不拘泥一法。

一. 溶剂提取法

溶剂提取法是根据植物中各种有效成分在溶剂中的溶解性质,选用对活性成分溶解度大,对不需要溶出成分溶解度小的溶剂,从而将有效成分从组织内溶解出来。相似相溶规律是选择适当溶剂提取植物中有效成分的主要依据之一。

1. 溶剂的选择

运用溶剂提取法的关键,是选择适当的溶剂。溶剂选择适当,就可以比较顺利地将需要的成分提取出来。选择溶剂要注意以下三点: 1) 溶剂对有效成分溶解度大,对杂质溶解度小; 2) 溶剂不能与其中的有效成分起化学变化; 3) 溶剂要经济,易得,使用安全等。常见的提取溶剂可以分以下三类:

(1) 水 一种强的极性溶剂。植物中的亲水性的成分,如无机盐、糖类、分子不太大的多糖类、鞣质、氨基酸、蛋白质、有机酸盐、生物碱及甙类等都能被水

溶出。为了增加某些成分的溶解度，也常采用酸水及碱水作为提取溶剂。水价廉安全，但溶出物中杂质较多，需要进一步分离纯化、且易起泡、粘液多、后处理困难。此外，水提取液还易酶解，发霉和发酵。

(2) 亲水性有机溶剂 也就是与水能混融的有机溶剂，如乙醇（酒精）、甲醇（木精）、丙酮等，以乙醇最常用。乙醇的溶解度性能比较好，对植物细胞的穿透力强。亲水性组分除蛋白质、淀粉、粘液质等外，大多数都能在乙醇中溶解，难溶于水的，亲脂性成分在乙醇中溶解度也较大。还可以根据被提物成分的性质，采用不同浓度的乙醇进行萃取。用乙醇提取与用水提取相比，溶剂用量少，提取时间短，溶解出的水溶性杂质也少。乙醇作为有机溶剂，虽易燃，但毒性小、价廉、提取时间比水提短、杂质少、提取液不易发霉变质、乙醇可回收利用，所以乙醇是最常用的溶剂。甲醇的性质与乙醇相似，但因其有毒性一般使用较少。

(3) 亲脂性有机溶剂 也就是与水不能混溶的有机溶剂，如石油醚、苯、氯仿、乙醚、乙酸乙酯、二氯乙烷等。这些溶剂的选择性强，不能或不容易提取出亲水性杂质。但这类溶剂挥发性大，多易燃（氯仿除外），一般有毒、价格较贵、设备要求较高、且他们透入植物组织的能力较弱、往往需要较长时间反复提取才能提取完全。如果药材中含有较多的水分，用这类溶剂就很难浸出其有效成分，因此，大量提取时，直接应用这类溶剂就有一定的局限性。

2. 提取方法

用溶剂提取植物中有效成分，常用浸渍法、渗漉法、煎煮法、回流提取法及连续回流提取法等。同时原料的粉碎度、提取时间、提取温度、设备条件等因素也都能影响提取效率，必须加以考虑。

(1) 浸渍法 浸渍法系将待提取的植物粉末或碎块装入适当的容器中，加入适宜的溶剂（如乙醇、稀醇或水）浸渍物料以溶出其中成分的方法。本法比较简单易行，但浸出率较差，且如果用水为溶剂，其提取液易发霉变质，须注意加入适当的防腐剂。

(2) 渗漉法 渗漉法是往提取物的粗粉中不断添加溶剂，使其渗过粗粉，下端出口流出浸液不需要分离，适用于有效成分含量较低或贵重药材的提取，新鲜及易膨胀的药材和无组织结构的药材不宜用渗漉法。渗漉法对原料粒度及工艺技术条件要求较高，操作条件不当会影响渗漉效果和溶剂的利用率。

(3) 煎煮法 煎煮法是我国最早使用的传统的浸出方法。所用容器一般为陶器，砂罐，或铜器，搪瓷器皿，不宜用铁锅，以免药液变色。直火加热时最好时常搅拌，以免局部药材受热太高，容易焦糊。

(4) 回流提取法 应用有机溶剂加热提取，需采用回流加热装置，以免溶剂挥发损失。小量操作时，可在圆底烧瓶上直接回流冷凝器。在水浴加热回流，一般

保持沸腾约一小时放冷过滤，再在药渣中加溶剂，做第二、三加热回流分别约半个小时，至基本提尽为止。此法提取效率较冷浸法高，大量生产中多采用连续提取法。

(5) 连续提取法 应用挥发性有机溶剂提取有效成分，不论小型实验或大型生产均以连续提取法为好，而且需用溶剂量少，提取成分也较完全。实验室常采用脂肪提取器或称索氏提取器。连续提取法，一般需数小时才能提取完全。提取成分受热时间长，对热不稳定的成分不宜采用此法。

二. 水蒸气蒸馏法

水蒸气蒸馏法是利用蒸汽压力的不同将两种或更多的液体从原料中提取出来的方法。该法适于具有挥发性，能随水蒸气蒸馏而不被破坏，与水不发生反应，难溶或不溶于水的化学成分的提取。此类成分沸点多在 100℃ 以上，并在 100℃ 左右有一定的蒸汽压。用水蒸气提取挥发性组分一般认为是通过水散作用使待提取组分从植物中渗透出，被带到原料表面的成分呈油斑状，与水组成两相混合液带出。

三. 升华法

固体物质受热直接气化，遇冷后又凝固为固体化合物，称为升华。植物中一些成分具有升华性质，故可利用升华法直接从中提取出来。例如：樟木中的樟脑，在本草纲目中已有详细记载，为世界上最早应用升华法提取药材有效成分的记述。

升华法虽简单易行，但植物完全炭化后，往往产生挥发性的焦油状物，黏附在升华物上，不易精制除去，其次，升华不完全，产率低，有时还伴随有分解现象。

四. 超临界萃取技术

近 10 年来，随着超临界流体提取技术的迅速发展^[49]，在天然药用植物中有效成分提取中应用越来越广泛。它和上述提取技术相比较，具有提取率高，无溶剂残留，天然植物中活性成分和对热不稳定成分不易被分解破坏等优点。同时还可以通过控制温度和压力的变化，来达到选择性提取和分离纯化的目的。因此，在当今人们渴望回归大自然的潮流中，该提取方法备受青睐。但是超临界 CO₂ 对极性物质的萃取有一定的局限性，加入夹带剂可以改善，但对设备要求较高。

五. 超声提取法

超声提取法是对提取过程进行超声强化处理，近年来在中药研究中有较多的应用。超声波的热效应，机械粉碎作用及空化作用成为超声技术在中药提取法应用中的三大理论依据^[50]。

在超声场中由于被破碎物等所处的浸提介质中含有大量的溶解气体和微小

的杂质,它们包围在被破碎物等的胶质外膜周围,为超声波作用提供了必要条件。空化中产生的极大压力造成细胞壁和整个生物体破裂,而且整个破裂过程在瞬间完成,同时超声波产生的振荡作用加强了胞内物质的释放,扩散及溶解。超声波破碎过程是个物理过程,无化学反应发生,被提取的生物活性物质在短时间内保持不变,缩短了破碎时间,可极大地提高提取效率。超声波作用的效果不仅取决于超声波的强度和频率,而且与被破碎物的结构有一定的关系。

超声波在陆地植物^[51-54]和海洋植物^[55-56]中的天然成分提取中的应用已经显示出明显的优势,并已逐步被人们所注意。目前虽已进行了一些研究,但都是仅在实验室规模上,针对某些单个提取对象进行简单的工艺条件实验。

1.2.2. 植物中有效成分的分离和精制

提取液浓缩后一般仍然是混合物,需进一步除去杂质,进行分离,纯化(精制),具体方法随其有效成分性质的不同而异。

一. 系统溶剂分离法

一般是将总提取物,选用三,四中不同极性溶剂,由低极性到高级性分步进行提取分离。利用有效成分的化学性质,在不同极性溶剂中的溶解度进行分离纯化,是最常用的方法。

广而言之,向提取溶液中加入另一种溶剂,析出其中某种或某些有效成分,或析出其杂质,也是一种溶剂分离的方法。此外,也可利用其中某些成分在酸或碱中溶解,某些成分在加碱或加酸变更溶液的 pH 值后,成不溶物而析出以达到分离。

二. 两相溶剂萃取法

1. 萃取法

两相溶剂提取法又简称为萃取法,是利用混合物中各组分在两种互不相溶的溶剂中分配系数不同而达到分离的方法。

2. 逆流分配法

逆流分配法又称逆流分溶法,逆流分配法与两相溶剂逆流法原理一致,但加样量一定,并不断在一定溶剂的两相溶剂中,经多次移位萃取分配而达到混合物的分离。

三. 沉淀法

在提取液中加入某些试剂后产生沉淀,以获得有效成分或除去杂质的方法。

四. 盐析法

盐析法是在提取液中加入无机盐至一定浓度,或达到饱和状态,可使某些成分在水中溶解度降低,以沉淀析出,而与水溶性较大的杂质分离。

五. 结晶法

一般来说,植物中有效成分在常温下多半是固体物质,都具有结晶的通性,可以根据溶解度的不同用结晶法达到分离精制的目的。

六. 絮凝法

吸附澄清技术是应用吸附澄清剂(又称絮凝剂)对不稳定的胶体溶液或浑浊液进行处理,使之澄清稳定的一种新兴制剂技术,在保留大多数有效成分的前提下,去除提取液中的杂质,用于中药制剂的工艺改进及分析。目前,应用较广泛的澄清剂有 ZTC+1、101 澄清剂和聚壳糖等^[57]。

七. 酸碱法^[58]

酸碱法是利用有效成分在水中的溶解度和溶液的酸碱度有关的性质,在溶液中加入适量的酸或碱,调节 pH 至一定范围,是这些成分溶解或析出,以达到提取分离的方法。一般酸性或中性成分,如黄酮甙、芳香酸、多元酸、香豆素及树脂等,在碱性水溶液中都较易溶解,在酸性水溶液中析出,而某些碱性成分,如大多数的生物碱,有机胺等,在酸性水溶液中较易溶解,可用酸性水提取,加碱则产生沉淀而析出。

八. 超滤法

超滤是一项膜分离技术,是 80 年代初发展起来的一种新兴的应用技术,它主要利用一种多孔的半透膜,凭借一定的压力,对液体进行分离,迫使小分子的物质通过,大分子的物质被截留,从而达到分离,提纯,浓缩的目的。其主要特点是在分离过程中,具有耗能低,有效膜面积大,分离效率高,可在常温,低压下进行操作等优点,对分离热敏性,芳香性和对化学物质有反应的药物尤为适合^[59]。特别是在中药制剂,保健滋补品和注射剂的制备方面显示出较大的优越性,取得很好的社会效应和经济效应^[60]。

1.3 薯蓣皂甙元简介

1.3.1 概述

皂甙是存在于植物界的一类比较复杂的甙类化合物,它的水溶液易引起肥皂样泡沫,且具有溶血和与胆固醇形成复合物的特征,皂甙的这些物理及生物学性质,构成了皂甙的经典含义,因此很早为人们所认识。皂甙按其皂甙元结构可以划分为两大类:其一为甾体皂甙,另一类为三萜皂甙。甾体皂甙多分布于百合科、薯蓣科和玄参科等;而三萜皂甙大部分分布于五加科、豆科、桔梗科和远志科等。一般来说,甾体皂甙是作为合成甾体激素及其相关药物的原料。甾体皂甙是由甾体皂甙元和糖组成。所以,薯蓣皂甙作为甾体皂甙其中的一种,也是由薯蓣皂甙

元和糖组成的。本课题的目标产物薯蓣皂素（薯蓣皂甙元的商品名）是通过薯蓣皂甙水解了糖后经提取和精制得到的。薯蓣皂甙结构如下：

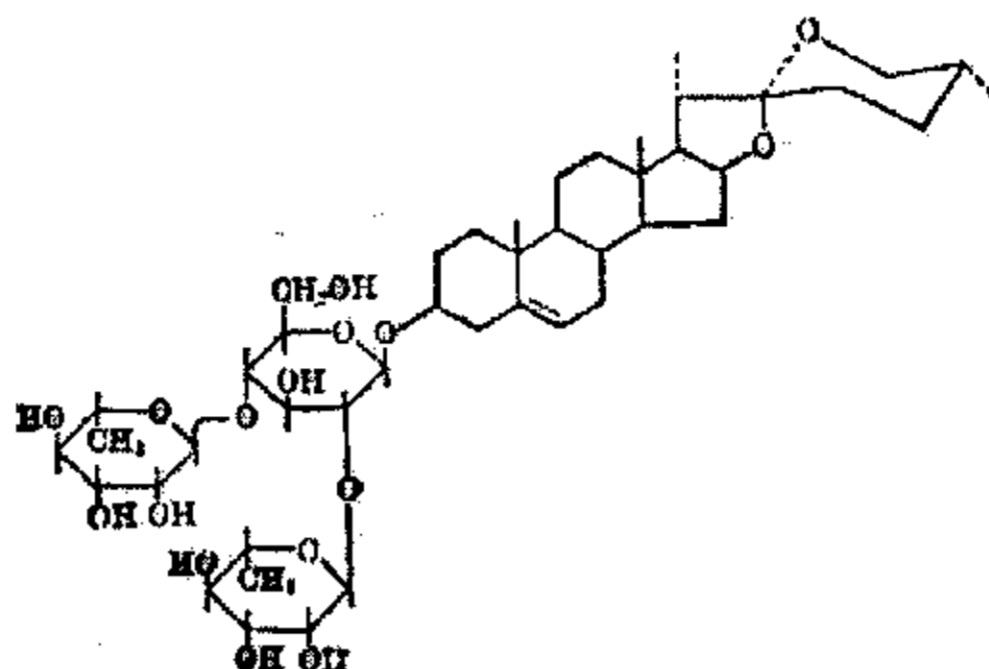


图 1.2 薯蓣皂甙结构式

Fig. 1.2 structure of dioscin

文献^[61]提到，本世纪三十年代中期，日本学者藤井胜也等人最早从山萆薢（*Dioscorea tokoro* Makino）中分离得到的薯蓣皂甙元。薯蓣皂甙元的发现和应用，为从植物界获得资源丰富和经济的天然甾体原料开辟了新途径^[62]，此后对植物中的甾体皂甙元的研究，受到广泛的关注。国外已对 100 多种薯蓣属植物中的薯蓣皂甙元及其他皂甙元进行了研究和测定，从中已分离出 40 多个甾体皂甙元。有些已用于生产，如菊叶薯蓣（*Dioscorea composita*）、多花薯蓣（*D. floribunda*）、墨西哥薯蓣（*D. mexicana*）等。此外，发现了 *Nolina greeni*、*Smilacina stellata*、*Costus speciosus* Sim(闭鞘姜)等非薯蓣属植物中也含有较多的薯蓣皂甙元。目前全世界合成皮质激素药物所用的起始原料 60%以上为薯蓣皂素^[63]。

50 年代末，我国对国产野生薯蓣属植物及其含有的薯蓣皂甙元进行了全国性的普查工作，发现我国约有 80 多种薯蓣属植物，但只有根状茎组的 20 种薯蓣含有薯蓣皂甙元，为资源的开发利用提供了依据。50 多年以来，我国先后建立了 40 多个薯蓣皂甙元的生产厂，除已提供国内合成多种甾体药物外，还部分出口。我国已成为世界继墨西哥之后第二个生产薯蓣皂甙元的大国。另外，危地马拉、波多黎哥、印度等国都有一定量的生产^[64]。目前我国已用于生产薯蓣皂甙元的植物有穿地龙、盾叶薯蓣、黄山药和柴黄姜等。

1.3.2 薯蓣皂甙元的结构、性质及用途^[65]

1. 结构：薯蓣皂甙元的分子式为 $C_{27}H_{42}O_3$ ，分子量为 414.61。其别名有薯蓣皂甙配基、野薜素、地奥配质，商品名称为薯蓣皂素，其化学名称为 Δ ，3-羟基，25R-螺甾烯，英文名为 Diosgenin，其结构式如下：

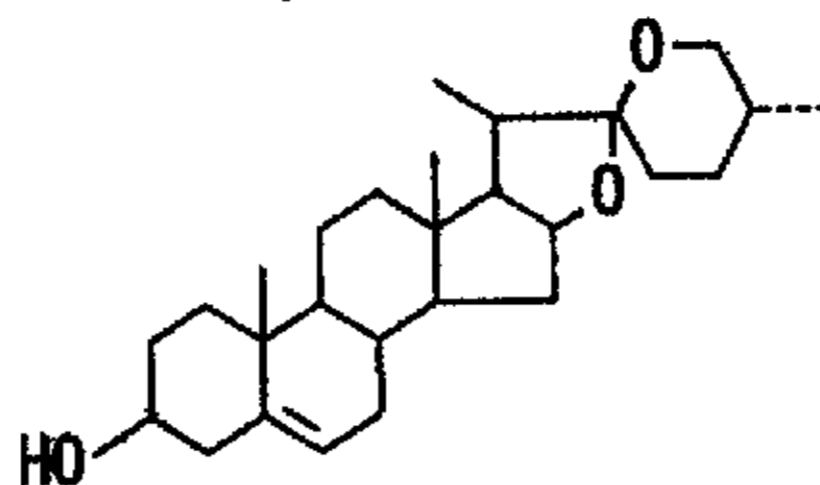


图 1.3 薯蓣皂甙元结构式

Fig. 1.3 structure of diosgenin

- 性质：薯蓣皂甙元为白针状结晶（甲醇中）或结晶性粉末，有刺激性气味，但无任何毒性。熔点 204-207℃，比旋度 -129° （25℃， $C=1.4$ ，氯仿）能溶于石油醚，汽油，乙醇等有机溶剂或醋酸中，与洋地黄甙结合而沉淀。
- 用途：薯蓣皂甙元有 $\Delta^5, 3\beta\text{-OH}$ 的结构，易引入 $\Delta^4, 3\text{-酮}$ 或 $\Delta^1, 3\text{-酮}$ 。用它制备的妊娠双烯醇酮酯是合成各种甾体抗炎药和女用避孕药的主要中间体，所以薯蓣皂甙元广泛用于制造可的松、睾丸素、黄体酮和口服避孕药等二十几种甾体激素，也可用于制取洗涤剂，乳化剂和发泡剂等。
- 其质量标准：

指标名称	优等品	合格品
外观	白色针状结晶性粉末	白色针状结晶性粉末
熔点/℃	≥ 198	≥ 195
水分/%	≤ 0.5	≤ 2.0
臭味	无油腻味	无油腻味
纯度	不超过微浊	不超过微浊
醇不溶物/%	≤ 0.15	≤ 0.25

1.3.3 薯蓣皂甙元的鉴别^[66]

- 颜色反应：由于甾体皂甙元与硫酸、高氯酸、改良 Liebermann 试剂等可产生不同的颜色反应，因而根据各种皂甙元反应的不同表现便可进行鉴别。与浓硫酸在 40℃ 反应 1 小时，薯蓣皂甙元所产生的颜色反应为橙色。
- 薄层色谱：生药样品经酸水解提取后，点于硅胶 G 薄层上，以 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (95:5) 展开，取出喷 5% H_2SO_4 乙醇溶液，在 105℃ 烤箱中放置数分钟，薯蓣皂甙元斑点呈紫红色，紫外灯下观察显蓝色荧光。

1.3.4 薯蓣皂甙元的提取与分离

一、传统方法提取薯蓣皂素工艺

Rothrock^[67]最早首创直接酸水解工艺用于生产皂素。将薯蓣片先以硫酸或盐酸在一定温度，压力下催化水解，再以汽油对水解物进行抽提得到薯蓣皂素。由

于薯蓣属植物只有根茎含有甾体皂甙，根状茎中除皂甙外还含有大量淀粉，水解的作用就是水解淀粉，从而使淀粉和皂甙分离。自此法开发成功以来，直接酸水解工艺已沿用多年，此方法工艺较成熟，但缺点也较大：（1）水解不彻底，皂素收率很低，一般在 2%左右；（2）由于重量约占 50%，体积约占 90%的纤维渣贯穿生产过程始终至最后才排除，因而消耗了大量的化工原料，动力和劳力；（3）薯蓣皂素中其他的有用成分未能得到综合利用。

Hardman 等^[68-71]认为：构成植物壁的纤维体和非纤维素糖可由特种酶的作用或葡萄糖转移作用共价地结合在一起，使皂甙的糖部分并入细胞壁。由于部分皂甙被“禁锢”在细胞壁上变成对酸性水解稳定的细胞壁结构组分。因而，单纯酸水解皂素产率不高。基于这一原理，研制开发了先经预发酵处理而后再经酸水解的方法。预发酵的目的一方面使淀粉水解，另一方面就是在某些水解酶的作用下破坏细胞壁的结构，促使皂甙释放出来。也有人^[72-73]认为酶解的主要作用是使一部分的呋甾醇皂素转化为螺甾醇皂素，而螺甾醇皂素比呋甾醇皂素更易转化为薯蓣皂素。最早在美国专利^[74]中将新鲜薯蓣压出汁液自然发酵后再酸解，皂素收率略有提高。国内四川省生物研究所^[75]将盾叶薯蓣粉先经发酵处理，充分发挥其酶解的作用，再用酸水解，最终皂素产率比直接酸水解法提高 23.4-39.8%。北京医学院药学院^[76]也曾研究先经自然发酵而后酸水解工艺，皂素收率提高 54%，上述发酵法简便易行但难控制，往往引起霉变，同时有副反应发生，生成皂素衍生物，使产品质量不合要求，产量下降。

为克服自然发酵的弊端，前苏联鲁明切娃等^[77]使用提纯的纤维素酶和果胶酶发酵，水解后薯蓣皂素收率提高 30-40%。周振起等^[78]将薯蓣植物浸泡后带水磨碎，分离后用提纯的液化酶和糖化酶作用，再经酸水解，皂素收率提高 54.3-69.5%。上述酶均能显著的提高薯蓣皂素的产率，但其价格昂贵且不能利用淀粉。赵书申等^[77]人研究应用黑曲霉菌发酵并酸水解薯蓣属植物，黑曲霉菌中的某些菌株具有多种活性很强水解酶系，有利于提高皂素的产率，同时普遍具有将淀粉转化为柠檬酸的能力，可联合生产薯蓣皂素和柠檬酸两项产品。实验中分别采用了黑曲霉 5016，3008 和钴-827 三种菌种，发酵后的滤渣以硫酸或盐酸常压水解，再用 120#汽油或沸程 60-90℃的石油醚进行索氏提取，而后再经浓缩，结晶，干燥，可得薯蓣皂素产品。其中以黑曲霉钴-827 发酵效果最好，所得薯蓣皂素收率提高 97.6%。这一工艺方法已形成专利^[79]。

现有的从薯蓣属植物中提取薯蓣皂素的生产大多使用溶解汽油作为提取剂，此法提取皂素效率低，时间长，且皂素的提取率仅为 80-90%，尚有 10%的皂素滞留在余渣中。另外，由于汽油易燃易爆，操作时不够安全，用汽油提取的皂素产品中常含有水解副产物及蜡等杂质，影响了产品的质量。为了寻找一种安全，高

提取率的皂素提取方法,李永狮等^[80]经过了大量的研究发现:热的 85-95%乙醇对薯蓣皂素有较大的溶解度,易将薯蓣皂素从薯蓣属水解物中提取出来。水解物中含有的大量酸性树脂及茄类色素对乙醇的溶解度甚小,并可与氢氧化钙形成钙盐而出去。水解物中的腊及叶绿素等可通过在酸性乙醇中活性炭吸附予以去除。而在浓缩结晶过程中,室温下水解副产物在乙醇中的溶解度较薯蓣皂素略大,因而它大部分留在母液中,从而可得到较高纯度的薯蓣皂素。基于上述原理,采用乙醇代替汽油做溶剂提取薯蓣皂素,具有工艺简短,操作安全,产品质量好等优点。首先将薯蓣属植物进行常温加压水解,经干燥后用 85-95%乙醇回流加热提取,再经过滤,浓缩,洗涤,结晶,干燥等步骤,最终可得含量为 95%以上的薯蓣皂素。此法也形成专利。

为了进一步缩短生产周期,减少动力消耗,提高产率和产品质量,周雯等^[81]将穿山龙薯蓣根茎粉碎后浸渍发酵并筛除纤维素,过滤后的滤渣用盐酸-丙酮混合液直接酸解和萃取,同时放入少量活性炭脱色,而后得薯蓣皂素产品。此工艺的优点在于酸解,萃取,脱色同时进行,缩短了工艺过程。

二. 新兴方法提取薯蓣皂素工艺

1. 超临界萃取薯蓣皂素工艺

超临界流体技术是近二十年来新兴的一种分离工艺。由于它具有低能耗。无污染,工艺简单,易实现自动控制等特点,和传统的溶剂法相比,具有明显的优越性,在化工,能源,食品和药物等工业中引起了广泛的兴趣和应用。关于应用超临界流体萃取技术从薯蓣属植物中提取薯蓣皂素的工艺,国内外均有一定的研究报道。

Michelle 等^[82]分别采用两种工艺路线从 barbasco 根中萃取皂素。一种工艺是水解和超临界萃取同时进行。向 19ml 不锈钢萃取柱中加入 0.5g 干的 barbasco 根, 2ml 异丙醇和 2ml 3N 的对苯磺酸直接进行超临界萃取,实验采用程序升压,压力最高至 30MPa,萃取箱的温度为 250℃,萃取剂为用 10%氯仿改性的超临界二氧化碳流体,用甲苯接收萃取产品,总萃取时间为 70min,经超临界色谱分析可知皂素收率达 100±10%;另一种工艺是先水解而后超临界萃取。首先将 barbasco 根加酸水解,而后向萃取柱中只加入此水解物进行超临界萃取。分析表明所得皂素收率为 100±10%。此法克服了传统方法的缺点,产品收率高,但其萃取温度较高,且超临界流体需要改性。

Liu Ben 等^[83]也采用超临界流体萃取技术提取薯蓣皂素。所用原料为湖北的穿地龙,首先将原料切碎成小片加酸水解,水解物加入不锈钢柱中,在一定的温度和压力下超临界萃取皂素,CO₂流速为 1.5-3.6ml/min,确定最佳萃取压力为 210atm,最佳萃取温度为 33℃,适宜的萃取时间是 40-70min,研究结果表明所

得皂素收率较传统汽油法提高 33%。此法萃取温度接近室温,且 CO_2 流体无需改性,降低了能耗和过程的复杂性。但该实验仅限于分析型仪器规模。

国内学者葛发欢等^[94]采用超临界 CO_2 萃取技术,从黄山药水解物中萃取薯蓣皂素,考察了萃取压力,温度,时间,流量,夹带剂及分离条件等对收率的影响,确定了最佳工艺条件:以药用酒精做夹带剂,最佳萃取压力为 29MPa,温度为 55℃, CO_2 流量为 12kg/kg 原料·h,萃取时间为 3h。分别进行了小试和中试放大,取得较满意的效果。但由于使用了夹带剂,萃取所得的粗皂素产品仍需要进一步的将皂素和药用酒精分离,使得皂素的后续精制过程不可缺少,同时也考察了没有夹带剂的超临界萃取工艺,但皂素的收率低于使用夹带剂的皂素收率。

2. 超声波协助提取薯蓣皂素工艺

近年来,超声波协助提取作为一种有效提取方法,因其简单,方便,快速和安全等优点得到了广泛的应用。利用超声波能量来强化单元操作速度(如固、液萃取等),以达到提高萃取率的效果。在相同传质领域里,用超声波强化最多的是液、固萃取。高频和低频都能强化萃取。但低频时达到同样的强化程度小于高频。与液、固萃取相比,超声波用于液、液萃取的报道要少一些。超声波产生的脉动和控制的空化作用可以大大增加湍流强度及相接触面积,从而强化传质。

王昌利等^[95]根据超声波的热效应,机械粉碎和空化作用,对以穿山龙为原料提取薯蓣皂素的提取工艺进行了多因素的研究,证明超声提取薯蓣皂素的提取工艺具有省时,节能,提取率高等优点,可以作为实验室和大生产的模拟工艺。实验得出超声提取薯蓣皂素的最佳工艺流程和参数为:穿山龙初粉(18-60目)加入 50%乙醇浸泡 36h,以频率为 1MHz 超声波处理 30min,过滤,药渣再重复处理一次,合并滤液,浓缩精制即可。

但超声波协助提取薯蓣皂素工艺还未见报道。

综上所述,薯蓣皂素传统的有机溶剂提取工艺的不可避免的工艺安全性差、有机溶剂污染环境、工艺周期长及操作费用高等缺点迫切需要开发新的提取工艺来适应新的发展要求。超临界 CO_2 萃取技术作为新兴的绿色提取工艺近年来被广泛应用于天然物的提取中。虽然一些国内外的学者尝试用超临界 CO_2 萃取薯蓣皂素,但他们的工艺条件限制了大工业生产。为了进一步的探讨超临界萃取薯蓣皂素的工业化应用前景,本课题以薯蓣属植物水解物为原料,在不同的操作条件下考察超临界 CO_2 萃取薯蓣皂素的萃取效果。同时还对超声波辅助萃取和索氏萃取进行了考察,并比较三种提取工艺,评判超临界萃取技术的优越性。

第二章 实验部分

2.1 原料及试剂

2.2.1 原料来源及预处理

实验中所使用的原料为薯蓣属植物水解物，原料色泽呈灰褐色，粒度大小不等，为天津药业集团提供。

对本实验原料主要进行如下预处理：

- (1) 把原料薯蓣属植物水解物用万能粉碎机进行粉碎工作。
- (2) 把粉碎后的原料用筛子分成小于20目、20—40目、40—60目、60—80目、大于80目五组，分别用试剂袋密封待用。

2.1.2 化学试剂来源及规格

实验中所用试剂的来源与规格如下：

表 2.1 化学试剂一览表

Table 2.1 The sources and specification of the reagents

试 剂 名 称	规格	产地
色谱乙醇	色谱纯	天津市化学试剂三厂
无水乙醇	分析纯	天津市化学试剂三厂
汽油	120#	天津大学第三药品库
液体石蜡	化学纯	天津市清华津英科技有限公司
甲醇	色谱纯	天津市康科德科技有限公司
薯蓣皂素标准品	TLC	百灵威化学技术有限公司
高氯酸	分析纯	天津市东方化工厂
冰醋酸	分析纯	天津市化学试剂一厂
香草醛	化学纯	天津市石英钟厂霸州市化工分厂
石油醚 (bp. 60-90℃)	分析纯	天津大学科威公司
二氧化碳	纯度 99.9%	四知气体公司

2.2 实验仪器设备

本次实验中所用仪器及型号如表 2.2 所示。

表 2.2 实验设备一览表

Table 2.2 The list of experimental instruments

设备名称	型号	产地
超临界萃取仪器 (小试)	Spe-ed SFE	美国 Applied - Separations 公司
电子天平	BP210s	北京赛德利斯有限公司
电热恒温水浴锅	HH. SY21 - Ni8	天津市中环实验电炉有限公司
电热干燥箱	DNG79 - 1 型	天津市南郊东泥沽实验仪器设备厂
旋转蒸发器	RE-52A	上海亚荣生化仪器厂
YP 型电子天平	YP1200	上海天平仪器厂
超声清洗器	KQ-200DF 型	昆山超声仪器有限公司
湿式流量计	LML - 1 型	长春仪器总厂
空气压缩机	J03 9504	上海跃进电机厂
万用电炉	220V. AC. 1000W	天津市泰斯特仪器有限公司
万能粉碎机	FE80 型	齐家务科学仪器厂
电热煲	ZDHW	河北中兴仪器有限公司
标准熔点管	硬质中性玻璃	华西医科大学仪器厂
高压液相色谱仪岛津	LC10A	日本岛津公司
可见分光光度计	9100	北京瑞利分析仪器公司
傅立叶变换红外光谱仪	Nicolet 560	美国 Nicolet 公司

2.3 实验方案的确定

2.3.1 实验路线和方法的选择

甾体激素药物是目前许多临床疾病及计划生育等所需的重要药物。目前全世界合成甾体激素药物所用的起始原料 60%以上为薯蓣皂素。从薯蓣属植物中提取薯蓣皂素传统的工艺过程为原料粉碎——直接酸水解——酶发酵——用石油醚提取——抽提物浓缩——干燥六步法后得薯蓣皂素,但这一传统方法却存在着提取时间长,皂素收率低等缺点。为克服这一难题,目前国内外有人开始考虑以薯蓣属植物水解物做原料,采用超临界二氧化碳萃取代替石油醚萃取这一步,初步的实验研究也进一步表明,超临界萃取技术具有替代石油醚萃取的可行性和优越性。与此同时,外加能量萃取也是近年来发展较快的新型洁净提取技术,它在很多方面表现出了很好的优越性。

本实验拟以薯蓣属植物水解物作为原料,以超临界二氧化碳萃取为关键技术,研究代替石油醚萃取——浓缩——干燥后处理的可行性和最优化条件,与传统溶剂萃取法即索氏萃取法进行比较,以寻求提高薯蓣皂素目标产物的收率,从而建立一个安全、高效、简捷的提取薯蓣皂素的新型洁净工艺。

本实验中主要考察以下几个方面:

1. 超临界萃取工艺适宜的工艺参数的选择,如萃取温度、萃取压力、原料粒度,气体流速、CO₂用量及萃取时间等的选择。
2. 外加能量-超声波辅助萃取法工艺参数的选择,如萃取时间、超声仪器功率、溶剂用量等。
3. 考察传统溶剂萃取法-索氏萃取法,得到薯蓣皂素收率和萃取时间的关系。并与超临界萃取法和超声波辅助萃取法进行比较。
4. 以可见光分光光度法为主要的定量分析方法,同时结合熔点测定法、高效液相色谱分析三种提取方法所得萃取产物中薯蓣皂素的纯度。

2.3.2 实验原理

1. 超临界萃取实验原理

超临界萃取即超临界流体在超临界状态下的萃取过程。由于在超临界状态下超临界流体有极大的可压缩性,扩散系数介于气态与液态之间,粘度则接近气体而比液态低约1-2个数量级,其传递过程类似于气体,因而在进行萃取时传质速率要远大于液相萃取过程。

同时,当流体从汽-液平衡区变化到临界区时,蒸发热急剧下降,至临界点则汽-液相界面消失,蒸发焓为零,其热容变为无穷大,因而在临界点附近进行分离操作更有利于传热和节省能量。

SFE 技术就是利用超临界流体的这种溶解度增强的性质,通过调节温度或/和压力在高于临界温度和临界压力的条件下,从目标物中萃取有效成分。当改变温度或/和压力时,溶解在超临界流体中的有效成分立即与气态的超临界流体分离,以达到提取目标成分的目的。

2. 索氏萃取法实验原理

索氏萃取法是众多溶剂萃取法中的一种。溶剂萃取法的实质即是建立在物理溶解过程上的固-液萃取,一般并无化学反应的发生,固体物料中的溶质组分直接溶入溶剂中,或与有机溶剂形成互溶体,而达到提取的目的。固-液萃取过程的速度通常是由扩散过程控制的,液相在固体颗粒内的扩散常常是萃取的控制步骤。扩散速度的影响因素包括固体颗粒内部的内扩散阻力和颗粒外部的边界层阻力。颗粒内扩散阻力的大小一般与粒度有关,因此改变原料的粒度会影响萃取速度,相应影响萃取效率与萃取率。不同的溶剂会改变颗粒外部的边界层阻力,并

且颗粒中物质的溶解度也不同,因而改变溶剂同样可改变萃取率。影响萃取率的另一因素就是颗粒中物质在溶剂中的溶解度,即受到相平衡或者说相间推动力的影响。

索氏萃取法即通过溶剂的蒸发与回流,使每次与萃取物相接触的萃取剂都是新鲜溶剂,从而提高固液萃取推动力,达到提高萃取速度与萃取效率的目的。本实验中所采用溶剂均为石油醚 (bp. 60-90℃)。

3. 超声萃取法实验原理

1) 超声波热学机理: 和其他形式的能一样, 超声能也会转化为热能。生成的热能多少取决于介质对超声波的吸收, 所吸收能量大部分或全部将转化为热能, 从而导致组织温度升高。这种吸收声能而引起温度升高是稳定的。所以超声波可以在瞬间使内部温度升高, 加速有效成分的溶解。

2) 超声波机械机制: 超声波的机械作用主要是辐射压强和超声压强引起的。辐射压强可能引起两种效应, 其一是简单的骚动效应。其二是在溶剂和悬浮体之间出现摩擦。这种骚动可使蛋白质变性, 细胞组织变形。而辐射压将给予溶剂和悬浮体以不同的加速度。即溶剂分子的速度远大于悬浮体的速度, 从而在它们之间产生摩擦, 这力量足以断开两碳原子之键, 使生物分子解聚。

3) 超声波空化作用: 由于大能量的超声波作用在液体里, 当液体处于稀疏状态下时, 液体会被撕裂成很多小的空穴, 这些空穴一瞬间闭合, 闭合时产生高达几千大气压的瞬间压力, 即称为空化效应。这种空化效应可细化各种物质以及制造乳浊液, 加速待测物中的有效成分进入溶剂, 进一步提取可以增加有效成分提取率。

超声波热学机理, 超声波机械机制和空化作用将成为超声技术协助提取的三大理论依据。

天然植物药用成分大多为细胞内产物, 提取时大多需要将细胞破碎, 而现有的机械或化学方法有时难于取得理想的粉碎效果。研究表明: 利用超声波的强烈振动、高的加速度、强烈的空化效应、搅拌作用等, 都可以加速有效成分进入溶剂, 从而提高了提出率, 缩短了提取时间, 节约了溶剂, 并且免去了高温对提取成分的影响。

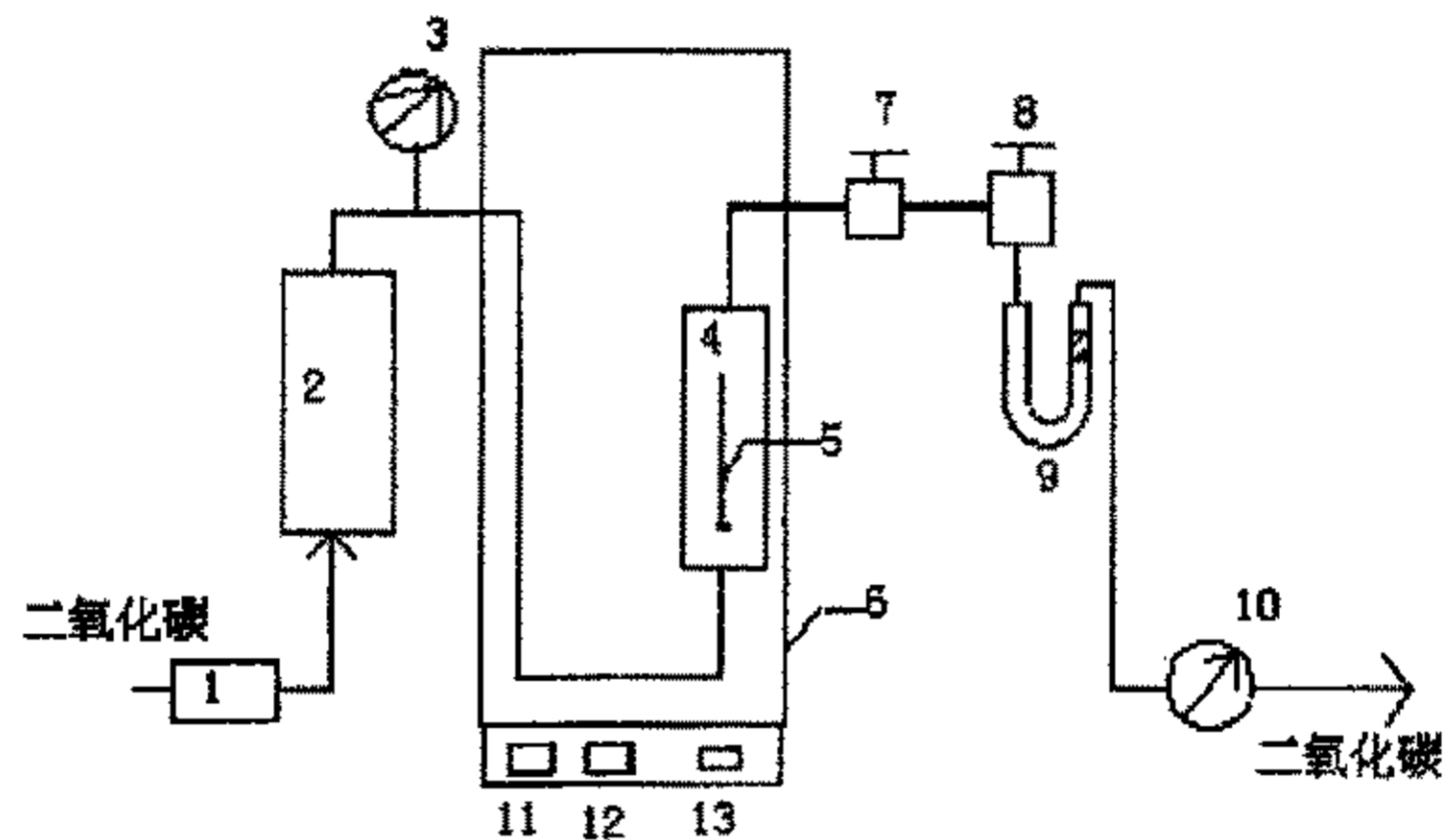
2.4 实验装置与实验操作步骤

2.4.1 超临界萃取实验

1. 超临界萃取装置

超临界实验装置如图 2.1 所示, 它主要由三部分组成, 即升压系统、萃取系

统和接收系统。其中升压系统主要由图中 1、2、3 组成，萃取系统主要由 4、5、6 组成，接收系统主要由 9、10 组成。其工作过程为：从钢瓶出来的 CO_2 通过冷却槽冷却，再经升压装置后（见图中 1、2、3）达到所需压力，送入萃取系统和原料接触，被萃取成分溶解在 SC-CO_2 中，萃取物随 SC-CO_2 通过降压阀进行节流膨胀改变压力或通过改变温度降低 SC-CO_2 密度，在分离器内 CO_2 变为常压气体，并与萃取物分离，萃取物用 U 形玻璃接收瓶接收， CO_2 通过湿式气体流量计测量后放空。



1-冷温槽 2-高压泵 3-压力表 4-萃取柱 5-热电偶

6-恒温箱 7-调节阀 8-微调节阀 9-U形管接收器 10-气体流量计

11-箱体温度控制显示 12-萃取柱温度控制显示 13-微调节阀温度控制显示

图 2.1 超临界萃取试验流程图

Fig. 2.1 Schematic diagram of supercritical fluid extraction apparatus

2. 超临界萃取实验操作步骤

主要操作步骤分三大部分：

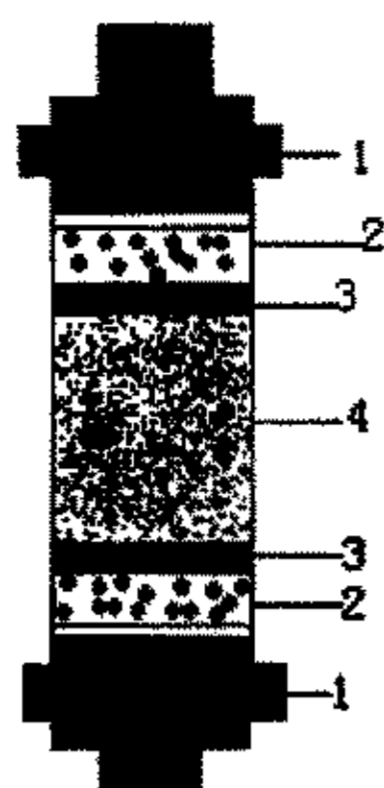
1. 物料的称取：采用电光天平精确称量 3.0g。

2. 萃取柱的填装：

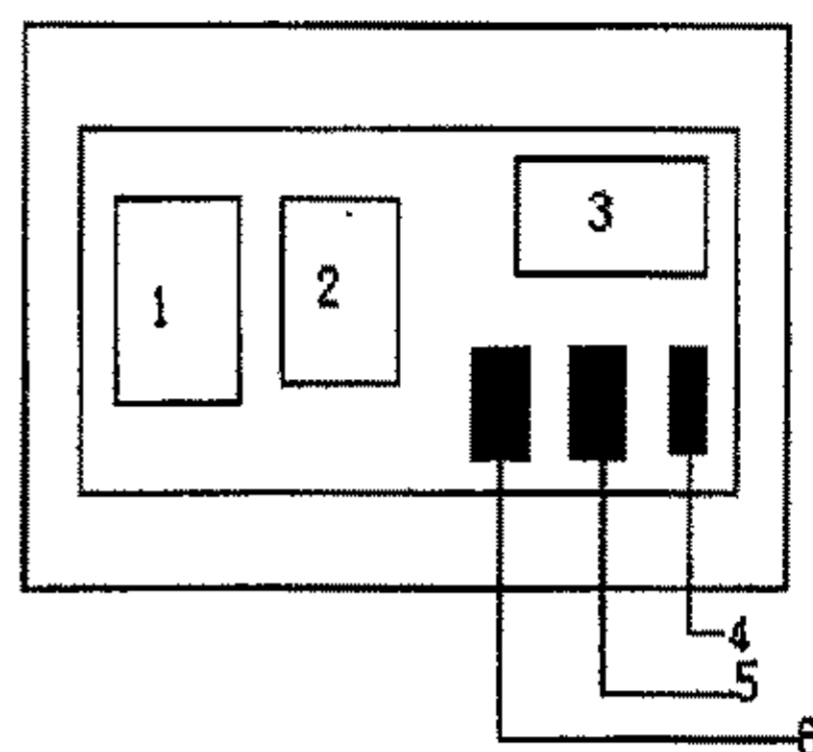
实验室用萃取柱共有三种不同的规格：10 毫升、32 毫升、100 毫升。本试验采用 32 毫升的手拧式密封萃取柱，其基本模型如图 2.2 所示。

操作过程中，首先把柱体一端的螺栓拧紧，另一端的螺栓拧下来，用一根填塞棒向柱体内塞入脱脂棉，再在脱脂棉上装入少许粒径为 3-4mm 的玻璃珠，以有利于超临界 CO_2 的分布，从而增大超临界流体与萃取物的接触面积；然后，在萃取柱中装入样品，并填塞好；待样品全部装填完毕，在样品上部再加入一层玻璃珠和脱脂棉，使柱体内物料脱脂棉间几乎没有空隙；最后，拧紧萃取柱另一端的

螺栓即可。



1-螺栓 2-脱脂棉
3-玻璃珠 4-物料



1-箱体温度 2-阀温 3-萃取柱温度
4-箱体总开关 5-箱体加热开关 6-微调阀加热开关

图 2.2 超临界流体萃取柱示意图

图 2.3 温度控制面板示意图

Fig.2.2 Supercritical extraction vessel

Fig.2.3 Board of temperature controller

3. 超临界萃取装置的操作步骤

- (1) 开启空气压缩机电源，压缩空气至 7kgf/cm^3 ，待压缩机工作停止时，打开通气阀使之与 SFE 设备连通，打开 SFE 主泵电源，观察压力表确认空压符合要求；
- (2) 打开 CO_2 钢瓶阀，连通 SFE 主泵，开启冷温槽使之冷却至 0°C 以下。检查并确认 SFE 恒温箱上各阀均处于待操作状态，进口、出口、放空共六个阀均关闭严紧，微调阀基本关闭；
- (3) 将装好原料的萃取柱放在恒温箱支架上，标有“上”的一端朝上放置，用螺丝头把架子固定住，拧紧压缩螺扣和固定螺扣，卡好电热偶；
- (4) 开启 SFE 恒温箱上主电源，加热箱体。设定恒温箱控制面板上箱体装置的温度（如图 2.3 所示），设定好微萃取柱温度、调阀的温度、恒温箱体温度；通过控制面板上显示的温度检测箱体和萃取柱的温度；
- (5) 旋转主泵调节阀升压至 10MPa 左右，打开恒温箱 inlet 进口阀稍放气， CO_2 气进入萃取柱，确认气路通畅，检查萃取柱上连接件及整个管路有无漏气现象；
- (6) 待各显示温度达到设定温度后，顺时针缓慢旋转主泵调节阀（空气循环压力表显示上升的空气压力），设定最终压力。同时注意 SFE 恒温箱显示的萃取柱温度变化，确保实验温度和压力均在期望值；
- (7) 稳定 15-20 分钟后，将事先称量好的 U 形管接入装置出料处，记录此时的流量计读数和 U 形接受器重量，缓慢打开出口阀，排出流体。观察流量计，小心调节微调阀将 CO_2 流速控制在 $2\text{-}3\text{L/min}$ ；
- (8) 萃取初期先萃出黄色杂质，待 U 形管出口棉花处内壁上有白色粉末均匀分布时，关闭微调阀 8，换上另一支称重完毕的 U 形管，记录流量计读数，开始

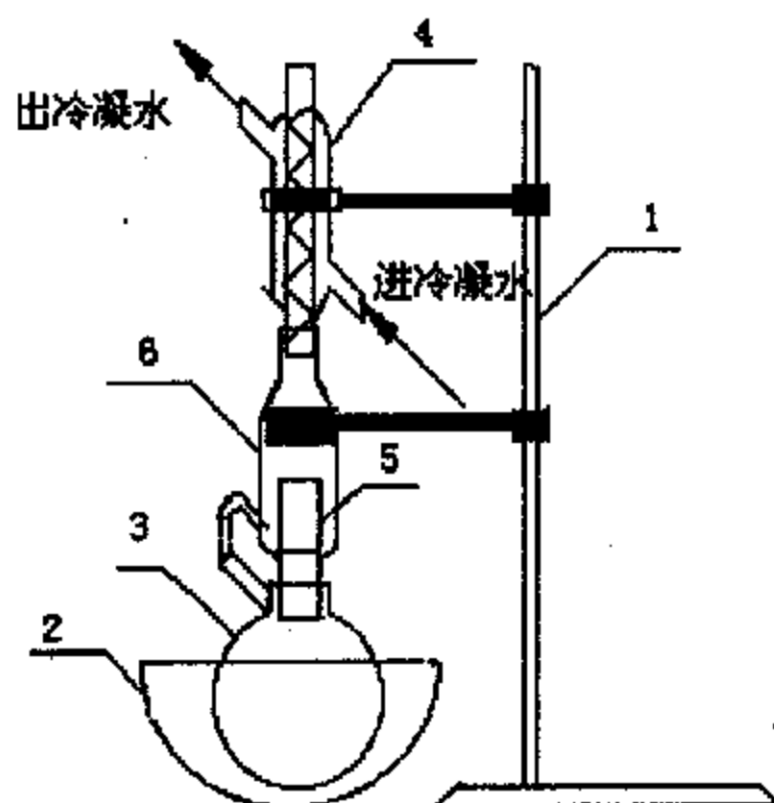
收集目标产物。称量接收杂质 U 形管的重量并记录下来。在每个时间间隔后，称量接受器重量并记录流量计读数。在两次称重接受器质量接近后，关闭微调阀 8，取下 U 形管接收器称重，并记录此时的流量计读数；

(9) 实验结束后，先关闭 CO₂ 钢瓶总阀，切断恒温箱电源，而后关闭进口阀和出口阀，打开放空阀，排出萃取柱内存的 CO₂，卸掉萃取柱的压力。待恒温箱和萃取柱冷却后，卸去萃取柱，关闭放空阀。逆时针旋转空气压力控制把手，关掉输送到泵的空气，这时空气压力表显示为 0bar，箱体的控制阀均达到“关”的位置。最后，关闭空气压缩机的总阀和电源；

(10) 设备的清洗：本实验中，考虑到薯蓣皂素对乙醇的溶解度较大，尤其是热的 85%-95% 的乙醇溶液，因此本操作采用热的乙醇溶液进行清洗 3-4 次，出料管路清洗和排气管路都需要清洗。管路中的残留乙醇一般通过挥发去除。

2.4.2 索氏萃取实验

索氏萃取实验装置如图 2.4 所示。



1-铁架台	2-电热煲	3-圆底烧瓶
4-冷凝柱	5-萃取物料	6-索氏萃取柱

图 2.4 索氏萃取试验装置图

Fig. 2.4 Experimental apparatus of Soxhlet extraction

实验操作步骤：

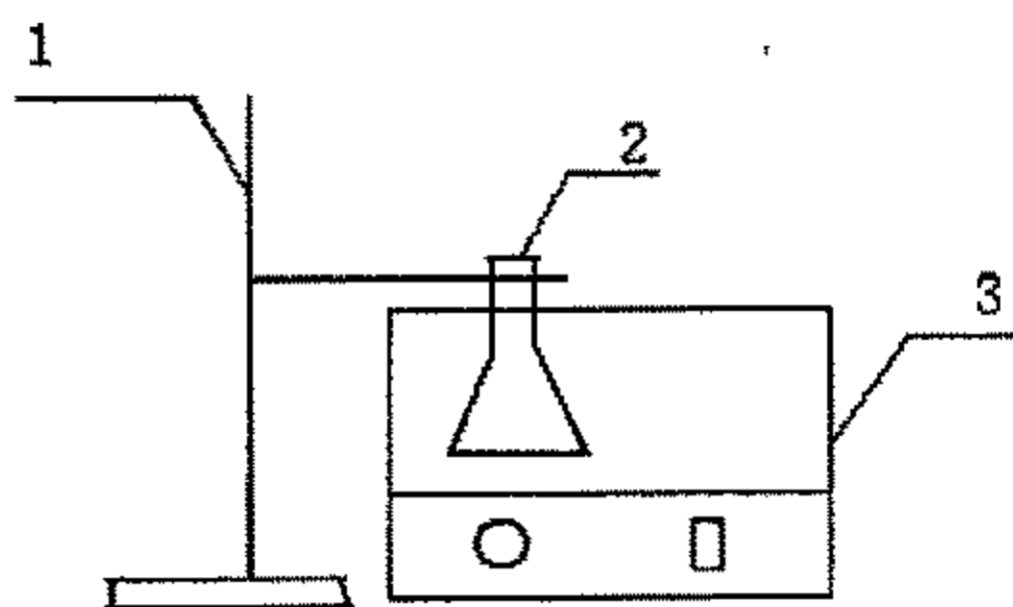
- (1) 按图 2.4 所示连接装置，并检查装置的气密性；
- (2) 用电子天平称量 5.0g 原料，用滤纸裹成圆柱形，放入索氏萃取器内；
- (3) 在容量为 250ml 的容量瓶内加入 200ml 石油醚 (bp. 60-90℃) 汽油。打开冷凝水控制阀后，用电热煲加热，控制加热电压在 220V，回流速度保持稳定在适当水平；
- (4) 设定时间 (本实验为 6 小时)，停止加热后，萃取液经过两次减压过滤，一

次膜过滤后, 剩余溶液在旋转蒸发器中蒸发浓缩, 待浓缩至溶剂剩余量约 5ml 时, 停止蒸发, 再经过一次减压抽滤, 并用少量石油醚进行洗涤, 并将所得产物放入烘箱进行干燥。

2.4.3 超声萃取实验

本实验原料为 20-40 目薯蓣属植物水解物, 所用溶剂为石油醚, 所采用仪器为昆山超声仪器厂生产的超声清洗器。考察超声仪器功率、萃取时间、溶剂加入量、溶剂加入方式等因素对萃取收率的影响。

超声萃取装置如图 2.5 所示。



1-铁架台 2-平底烧瓶 3-超声清洗器

图 2.5 超声萃取装置

Fig. 2.5 Experimental apparatus of ultrasonic-assisted extraction

实验操作步骤:

- (1) 用电子天平称量 3.0g 原料, 放入 250ml 平底烧杯内, 同时加入一定量的溶剂, 并将烧杯固定在超声清洗器内;
- (2) 设定超声清洗器的超声波强度, 超声时间等操作参数;
- (3) 启动超声清洗器, 开始超声辅助萃取薯蓣皂素实验;
- (4) 超声结束后, 将烧瓶从超声清洗器中取出, 减压过滤得到萃取液并测量其体积; 取出少量萃取液薯蓣皂素含量测定, 剩余溶液在旋转蒸发器中蒸发浓缩, 待浓缩至溶剂剩余量约 5ml 时, 停止蒸发, 再经过一次减压抽滤, 并用少量溶剂进行洗涤后, 并将所得产物放入烘箱进行干燥。

2.5 分析方法

2.5.1 薯蓣皂素定性分析方法 - 红外光谱法

红外光谱分析是常见的定性分析方法, 本实验通过对比薯蓣皂素标准品和萃

取得到的薯蓣皂素产品的红外光谱来确定萃取得到产品是否为薯蓣皂素, 同时也可通过比较说明萃取得到的产品的纯度。

薯蓣皂素红外光谱法测定的实验步骤:

- (1) 取少量薯蓣皂素标准品和 8 倍量化学纯的三氧化铝粉末于研钵中, 充分混合后碾成粉末;
- (2) 用特殊的压片装置压成圆形薄片;
- (3) 将圆形薄片放进傅立叶变换红外光谱仪中, 在整个红外波长范围内扫描圆形薄片; 得到薯蓣皂素标准品的红外光谱图;
- (4) 用同样的方法, 得到薯蓣皂素产品的红外光谱图;
- (5) 将薯蓣皂素标准品和薯蓣皂素产品的红外光谱图重叠在一起, 比较两者, 看二者是否吻合良好。

2.5.2 薯蓣皂素定量分析方法

2.5.2.1 可见光分光光度法^[96]

薯蓣皂甙元是由薯蓣属植物水解而得到, 是制药工业合成甾体激素的主要原料之一。以报道的定量测定方法有: 重量法、红外分光光度法、比色法、微量电位滴定法、气相色谱法等。这些方法都必须把皂甙元分离, 精制后再测定, 这样势必造成一定误差。我们借鉴关于人参中皂甙元含量的测定方法, 以高氯酸-香夹兰醛为显色剂, 以冰醋酸为溶剂, 在 530nm 处对薯蓣皂甙元含量进行分光光度法定。实验结果表明, 本法操作比较简单, 皂甙元从植物中提取后不需要分离精制可直接测定, 并且此方法在一定程度上具有专属性, 灵敏度高, 重现性好。

1. 可见光分光光度法测定薯蓣皂甙元含量的实验步骤:

- (1) 若待测物料为液体, 取待测液适量置于 10ml 容量瓶中; 若待测物料为固体, 则取少量固体溶于石油醚中, 取少量溶液置于 10ml 容量瓶中;
- (2) 将容量瓶放入 70-80℃ 的水浴中挥去溶剂;
- (3) 向 10ml 容量瓶分别加入 0.2ml 新配置 5% (m%) 的香夹兰醛冰醋酸溶液, 0.8ml 高氯酸, 摇匀, 放入 70℃ 的水浴中反应 15min;
- (4) 冰水冷却, 加冰醋酸将其定容到 10ml;
- (5) 放置 30min 后, 以试剂做参比, 在波长 530nm 处测定其吸光度;

2. 绘制标准曲线的实验步骤:

- (1) 精确称量薯蓣皂甙元标准品 25.00mg, 用少量石油醚溶解, 然后用石油醚定容到 100ml;
- (2) 分别准确吸取 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60ml 于 10ml 的容量瓶

- 中，70-80℃水浴挥去溶剂；
- (3) 分别加入新配置的 5% (m%) 的香夹兰醛冰醋酸溶液，0.8ml 高氯酸，摇匀，放入 70 的水浴中反应 15min；
- (4) 冰水冷却后加冰醋酸将其定容到 10ml；
- (5) 放置 30min 后，以试剂做参比，在波长 530nm 处测定其吸光度；

表 2.3 标准曲线的测量数据
Table 2.3 Measured data of the standard curve

浓度 (mg/ml)	吸光度 1	吸光度 2	吸光度平均值
0.0025	0.067	0.066	0.0665
0.0050	0.123	0.121	0.1220
0.0075	0.155	0.155	0.1550
0.0100	0.203	0.204	0.2035
0.0125	0.231	0.232	0.2315
0.0150	0.274	0.275	0.2745

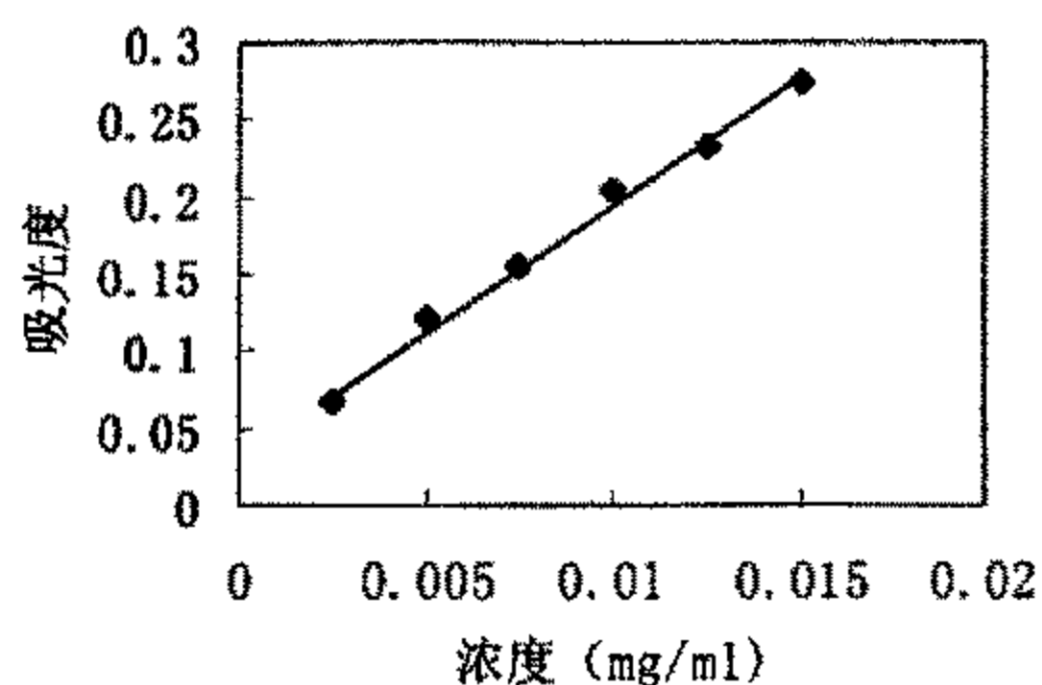


图 2.6 薯蓣皂素的工作曲线

Fig. 2.6 The standard curve of Diosgenin

由最小二乘法得到薯蓣皂素标准曲线方程为： $Y=0.0338+1.1619429X$ ，其中 Y 为吸光度，X 为薯蓣皂素浓度 (mg/ml)。

2.5.2.2 高压液相色谱分析法^[67]

1. HPLC 分析条件

检测器：紫外检测器	色谱柱：C18 10 μ ×250mm×4.00mm
检测器波长：210nm	柱温：45℃
流动相：100%甲醇	取样：5 μ l

2. HPLC 分析方法

采用面积归一化方法进行分析处理。

3. HPLC 分析操作步骤

- (1) 称取待测样品约 0.0100g, 定容于 2ml 的试管中;
- (2) 取标准样品约 0.0100g, 同样定容于 2ml 试管中, 用以对比;
- (3) 向高压液相色谱仪器中打入色谱纯的甲醇进行洗涤, 并走基线;
待基线平稳后, 采用高压液相色谱对各待测样品进行分析;
- (4) 按峰面积总和为 100, 待测样品的主峰峰面积除以峰面积总和即得到样品的纯度。

2.5.2.3 熔点测定法^[68]

熔点测定法是通过测定样品的熔距来判定薯蓣皂素产品的质量, 其方法简单, 快捷, 故在实际生产中被广泛采用。

熔点测定步骤:

- (1) 取少量待测样品于研钵中, 轻轻研磨成粉末;
- (2) 采用标准熔点测量管, 从一端导入少量粉末, 而后在空管中自上而下自由下落 5-6 次, 使毛细管中待测样品高度达 3-4mm;
- (3) 当液体石蜡温度显示大约 180℃时, 控制温升速度在 1.0-1.5℃/min, 用橡皮筋在另一支温度计固定上有待测样品的毛细管, 使待测物料和温度计的水银球紧贴在一起, 待温度接近 190℃时放入此温度计;
- (4) 仔细观察毛细管中待测样品的状态, 当管中样品开始熔化时, 记录下初熔点, 当样品恰好完全熔化时, 记录终熔点;
- (5) 重复测量两次, 取其平均值作为最终测量结果;
- (6) 研钵用面巾纸清理干净后, 研磨下一个待测样品, 准备下一个熔点测定。

第三章 结果与讨论

3.1 超临界萃取法实验研究

超临界萃取条件的选择依赖众多因素,如溶质在溶剂中的溶解度、溶剂的密度和流量、萃取温度、压力及原料粒度等,这些都需要通过实验来确定。实验原料为薯蓣属植物根茎的水解物,本实验共使用了二批原料,由于产地的不同,实验结果略有差异。

实验称取薯蓣属植物水解物 3.0g, CO₂ 流速均为 2.0-3.0L/min (考察 CO₂ 流速影响的实验除外),当 CO₂ 用量达到 280 升时停止萃取实验。实验开始初期,超临界 CO₂ 先萃取出黄色的杂质,萃取进行了一段时间后,白色的薯蓣皂素开始被萃取出来,这时替换接受器,开始接受薯蓣皂素产品。实验分别考察了萃取温度、萃取压力、原料粒度、CO₂ 流速、萃取时间和 CO₂ 用量等因素对薯蓣皂素收率及总收率的影响,所得收率根据以下公式计算得到:

$$\text{薯蓣皂素收率} = \frac{\text{超临界萃取得到薯蓣皂素产品的质量}}{\text{原料质量}} \times 100\%$$

$$\text{总收率} = \frac{\text{超临界总萃取物的质量}}{\text{原料质量}} \times 100\%$$

CO₂ 流速由湿式气体流量计显示,由流量计读出的 CO₂ 用量体积数和湿度流量计中水的温度及大气压,再根据理想气体状态方程: $PV=mRT/M$ 计算出萃取所用 CO₂ 的质量。

3.1.1 温度对薯蓣皂素收率的影响

在超临界萃取实验中,萃取温度对萃取过程的影响是由温度引起的两个相互竞争的因素的结果。一方面,温度的变化直接导致超临界 CO₂ 的密度变化,从而影响着萃取的收率,另一方面,温度的变化能改变固体溶质在超临界 CO₂ 的升华压,也对萃取收率有显著的影响。所以,对萃取温度的研究是考察超临界萃取工艺参数的一个重要部分。本实验分别进行了压力为 30MPa, 40MPa, 50MPa 下, 70℃, 80℃, 90℃时的超临界萃取实验,实验结果见表 3.1。

表 3.1 温度对薯蓣皂素收率的影响

萃取压力 (MPa)	30			40			50		
萃取温度 (°C)	70	80	90	70	80	90	70	80	90
杂质收率 (%)	4.44	6.67	5.11	7.36	6.92	7.43	11.43	8.93	10.32
薯蓣皂素收率 (%)	7.76	9.50	8.29	7.93	10.10	8.97	8.49	9.97	9.23
总收率 (%)	12.20	16.17	13.40	15.29	17.02	16.40	19.92	18.90	19.55

由表 3.1 和图 3.1 可见, 20-40 目水解物在 30MPa 压力条件下, 温度从 70℃ 升高到 80℃, 薯蓣皂素收率 7.76% 升至 9.50%, 从 80℃ 升高到 90℃, 薯蓣皂素收率却降到 8.29%。在 40MPa 恒压条件下, 温度从 70℃ 升高到 80℃ 时, 薯蓣皂素收率由 7.93% 升至 10.1%, 当温度继续升高到 90℃ 时, 收率却降到 8.97%; 同样在 50MPa 恒压条件下, 温度由 70℃ 升高到 90℃ 的过程中, 薯蓣皂素收率也是先由 8.49% 上升到 9.97%, 而后降至 9.23%。而杂质收率随温度变化没有明显规律性。

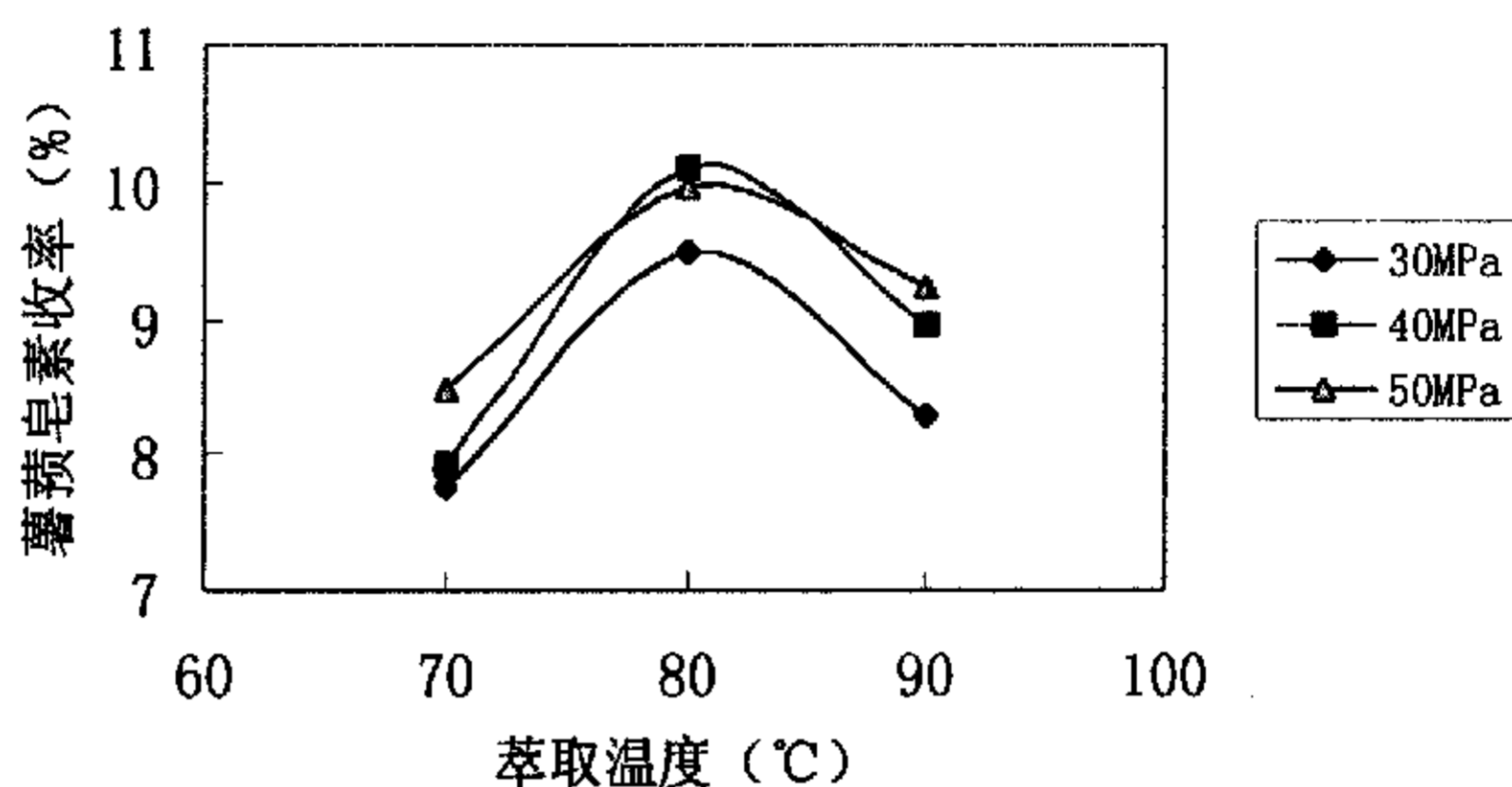


图 3.1 温度对薯蓣皂素收率的影响

Fig. 3.1 Influence of temperature on extraction yield of Diosgenin

从图 3.1 可见, 随温度的升高, 薯蓣皂素收率先是增加, 而后降低, 这说明温度对薯蓣皂素收率影响很大, 其原因是温度对萃取效果影响的两个因素相互竞争的结果。在恒压条件下, 温度从 70℃ 上升至 80℃ 的过程中, 因温度升高而引起的皂素在 SF-CO₂ 中升华压升高这一有利于促进萃取的因素占主导地位, 薯蓣皂素收率呈上升趋势; 温度从 80℃ 升至 90℃ 的过程中, 因温度升高而引起的 SF-CO₂ 密度的降低这一不利于萃取的因素占主导地位, 薯蓣皂素收率呈下降趋势。考虑到薯蓣皂素是非热敏性物质, 故温度选择 80℃。

3.1.2 压力对薯蓣皂素收率影响

在超临界萃取实验中, 压力大小是影响 CO₂ 流体溶解能力关键因素之一。当萃取温度固定不变时, 压力的变化将直接导致超临界 CO₂ 密度的变化, 从而影响超临界萃取的效果。本实验在温度为 70℃, 80℃, 90℃ 下, 考察了 30 MPa, 40 MPa, 50 MPa 三个压力下的薯蓣皂素萃取情况。实验结果见表 3.2。

表 3.2 压力对薯蓣皂素收率的影响

Table 3.2 Influence of pressure extraction yield of Diosgenin product

萃取温度 (°C)	70			80			90		
萃取压力 (MPa)	30	40	50	30	40	50	30	40	50
杂质收率 (%)	4.44	7.36	11.43	6.67	6.92	8.97	5.11	7.43	10.32
薯蓣皂素收率 (%)	7.76	7.93	8.49	9.50	10.10	9.97	8.29	8.97	9.23
总收率 (%)	12.20	15.29	19.92	16.17	17.02	18.90	13.40	16.40	19.55

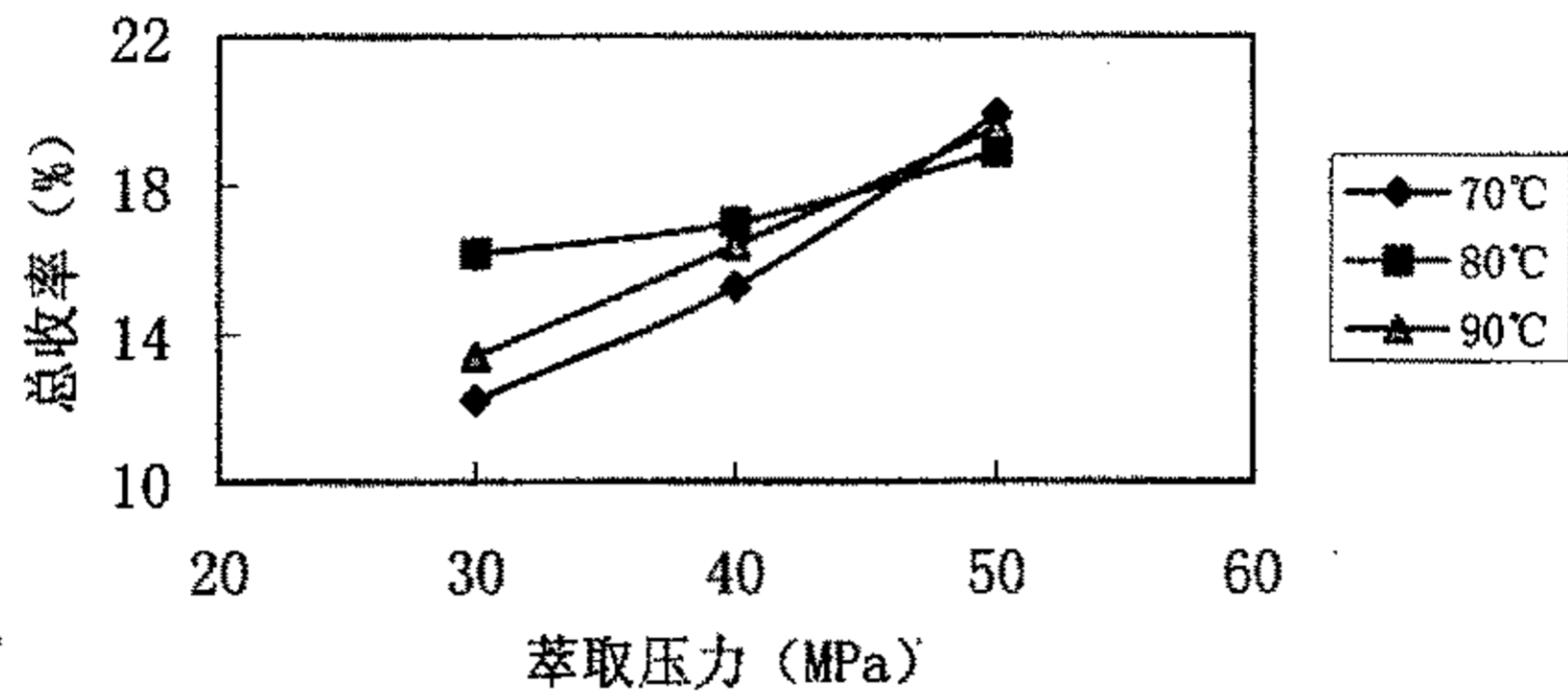


图 3.2 压力对总收率的影响

Fig. 3.2. Influence of pressure on total extraction yield

由表 3.2 和图 3.2 可见, 20-40 目水解物在 70°C 恒温条件下, 压力由 30MPa 升高到 50MPa, 总萃取收率从 12.20% 上升到 19.92%, 其升高率为 63.3%; 在 80°C 恒温条件下, 压力由 30MPa 升高到 50MPa, 总萃取收率从 16.17% 上升到 18.90%, 其升高率为 16.9%; 在温度为 90°C 时, 压力由 30MPa 升高到 50MPa, 总萃取收率从 13.40% 上升到 19.55%, 升高率为 45.9%。从升高率可以看出, 压力对总收率影响在 70°C 时最大, 90°C 次之, 80°C 影响最小。杂质收率随着压力的升高而增加, 这和总收率的变化趋势是一样的。

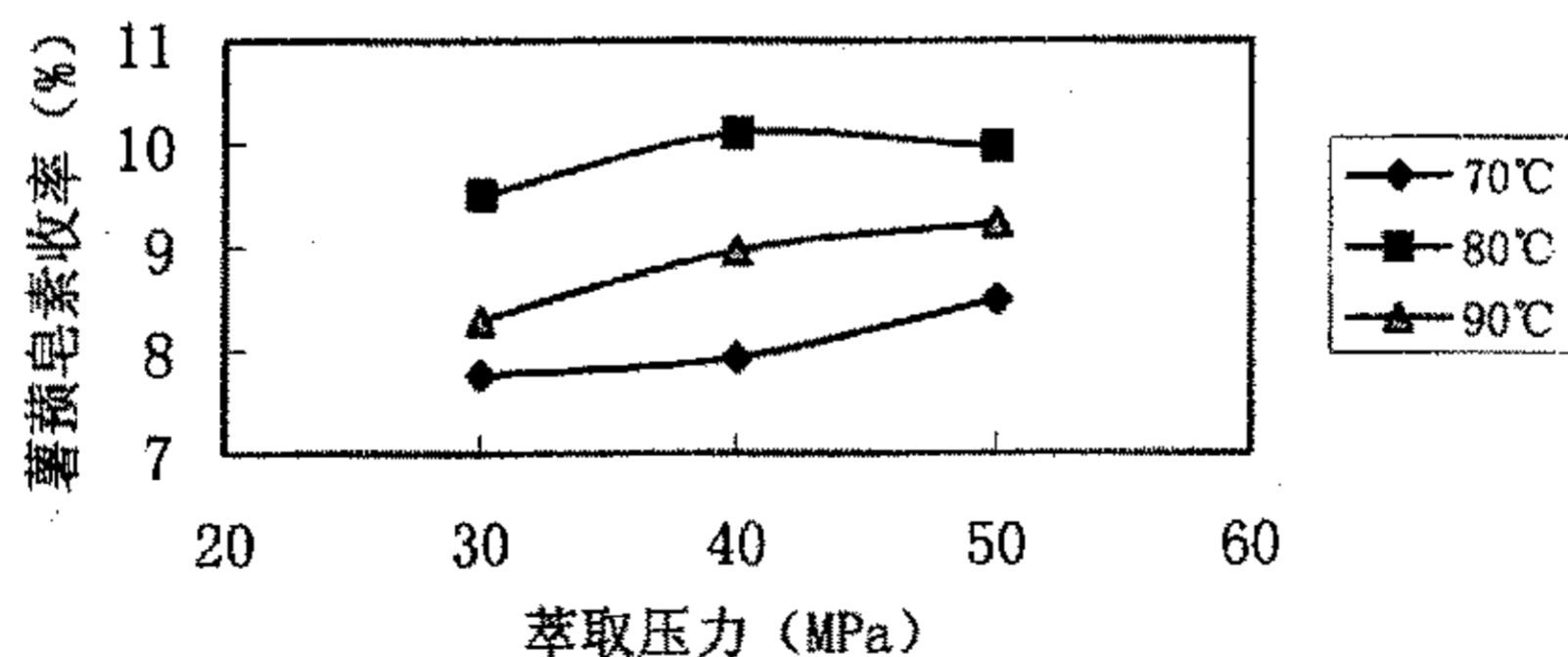


图 3.3 压力对薯蓣皂素收率的影响

Fig. 3.3 Influence of pressure on extraction yield of Diosgenin

由表 3.2 和图 3.3 可见, 20-40 目水解物在 70°C 和 90°C 恒温条件下, 压力由 30MPa 升高到 50MPa, 薯蓣皂素收率均随压力升高而增加, 上升率分别为 9.4%

和 11.3%；在 80℃ 恒温条件下，薯蓣皂素收率在压力从 30MPa 升高到 40MPa 的过程中是呈上升趋势，当压力继续上升时，薯蓣皂素收率变化不大。

从图 3.2 可以看出，当压力达到 50MPa 时，三个温度条件下的总萃取收率近乎相等，但是在 50MPa 时的薯蓣皂素收率却有很大的差异，这说明同在 50MPa 的超临界萃取在不同温度条件下表现出不同的选择性，其中 80℃ 时萃取选择性最高，90℃ 次之，70℃ 最差。

综上所述，虽然压力对总收率的影响在恒定温度下表现十分明显，但是它对提高薯蓣皂素收率的贡献却不大，换句话说，在恒定温度下，压力的升高大大的促进了水解物中杂质的萃出。从图 3.3 可以看出，压力对薯蓣皂素收率的影响远远低于温度对薯蓣皂素收率影响大。以薯蓣皂素收率为目标函数，压力选择在 40MPa。

3.1.3 CO₂ 流速对薯蓣皂素收率的影响

超临界 CO₂ 作为超临界萃取的溶剂，其通过萃取柱的速度对萃取效果产生重大影响。一方面，提高 CO₂ 流速，有利于溶剂和物料的两相接触面间的滞留层厚度减小，容易形成湍流，增大扩散系数，有利于传质；另一方面，CO₂ 流速提高必然是溶剂在萃取柱中的停留时间缩短，这样就降低的一定时间内的溶质的扩散量，不利于传质，所以 CO₂ 流速对萃取效果的影响也是两个相互竞争的因素竞争的结果。本实验用 20-40 目水解物在 80℃，40 MPa 条件下进行流速影响超临界萃取实验，实验结果见表 3.3。

表 3.3 CO₂ 流速对薯蓣皂素收率的影响

Table 3.2 Influence of rate of CO₂ on yield of Diosgenin product

CO ₂ 流速 (L/min)	温度 (°C)	压力 (MPa)	CO ₂ 用量 (L)	薯蓣皂素收率 (%)	总收率 (%)
2	80	40	350	9.18	14.06
3	80	40	350	9.30	14.56
4	80	40	350	9.89	15.14

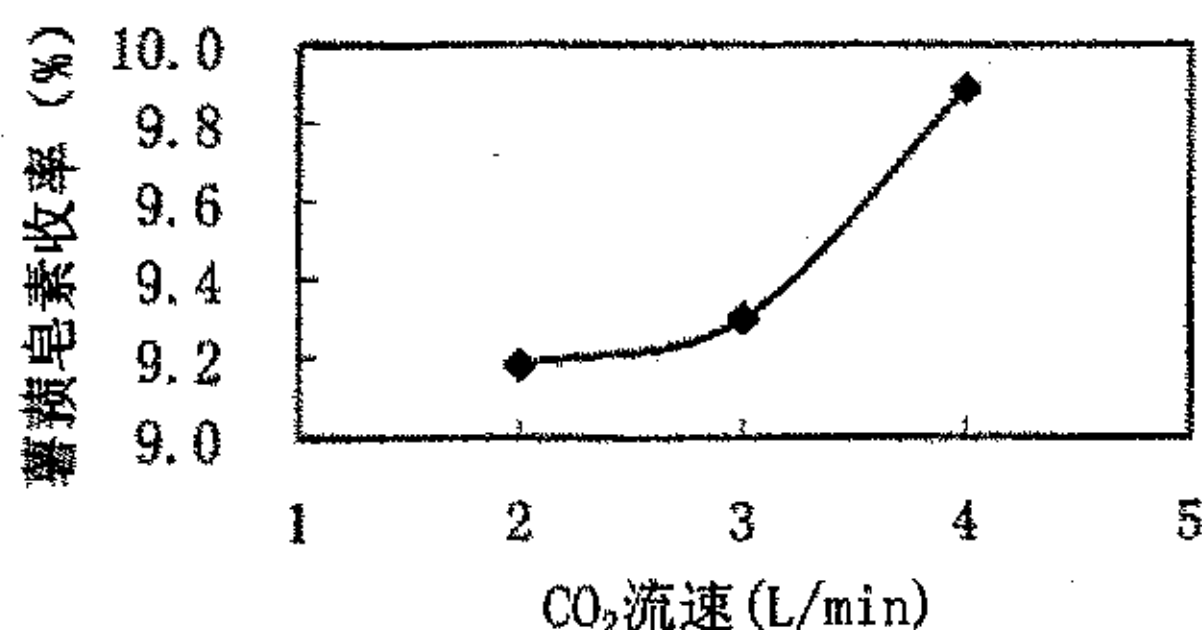


图 3.4 CO₂ 流速对薯蓣皂素收率的影响

Fig. 3.4 Influence of rate of CO₂ on extraction yield of Diosgenin

由表 3.3 和图 3.4 可见, 第二批 20-40 目水解物在 80℃, 40MPa 下, CO₂ 流速在 2L/mim, 3L/mim, 4L/mim 下的薯蓣皂素收率分别为 9.18%, 9.30%, 9.89%, 总萃取收率分别为 14.06%, 14.56%, 15.14%。CO₂ 流速对薯蓣皂素收率的影响呈上升趋势。这说明流速的提高有利于溶剂和物料的两相接触面间的滞留层厚度减小, 容易形成湍流的这一因素占主导地位, 有利于萃取的进行。在本实验过程中, 如果流速过大, 容易将 U 形玻璃接收管的橡胶塞冲开, 所以为安全起见, 本实验 (除考察流速影响外) 的 CO₂ 流速均控制在 2.0-3.0 L/mim。

3.1.4 原料粒度对薯蓣皂素收率的影响

原料粒度直接关系到物料与超临界 CO₂ 两相的相接触面积, 目数越大, 物料颗粒越小, 这样物料的比表面积越大, 并且缩短了溶质从物料内部扩散到流体的路径, 减小内部扩散阻力, 因此大的原料目数有利于提高萃取效果。但目数越大, 越容易造成萃取器内的沟流和死角, 同时整个萃取床层阻力也会随之增大, 从而降低萃取的效果。

表 3.4 原料粒度对薯蓣皂素收率的影响

Table 3.4 Influence of particle size on yield of Diosgenin

温度 (°C)	压力 (MPa)	原料粒度 (目)	CO ₂ 用量 (L)	薯蓣皂素收率 (%)	总收率 (%)
80	40	20-40	280	10.40	17.02
80	40	40-60	280	9.67	16.59
80	40	60-80	280	9.60	15.47

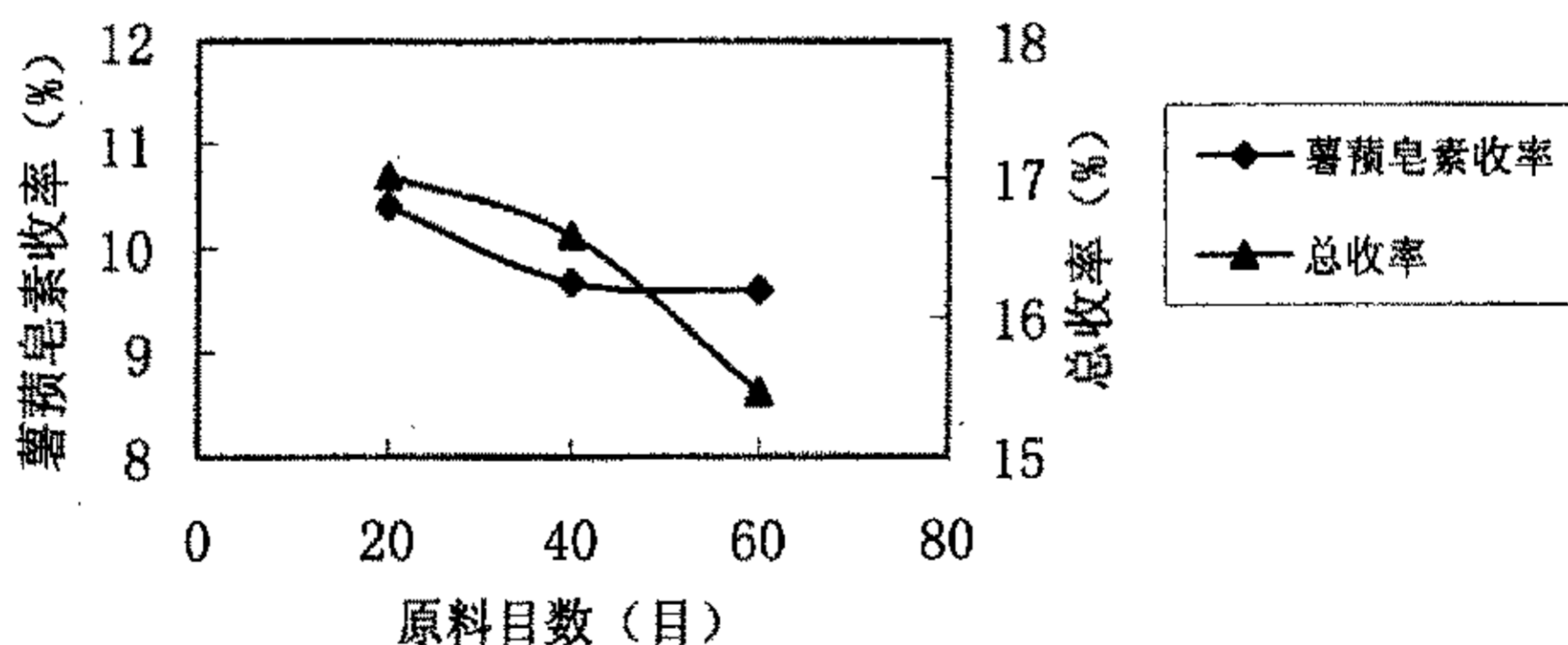


图 3.5 原料粒度对薯蓣皂素收率的影响

Fig. 3.5 Influence of particle size on extraction yield of Diosgenin

由表 3.4 和图 3.5 可见, 随着原料目数的增加, 薯蓣皂素收率和总收率都呈下降趋势。这说明, 通过降低原料粒度达到提高萃取效果的做法对超临界萃取薯蓣皂素是不合适的。其原因与水解物自身性质密切相关。40-60 目的水解物已经是非常细的粉末状的固体, 在装入萃取柱的过程中, 在缺少好的流体分布设备的条件下, 必然造成整个萃取床层阻力增加, 沟流和死角的出现将不可避免, 势必影响萃取效果。

3.1.5 CO₂用量对皂素收率的影响

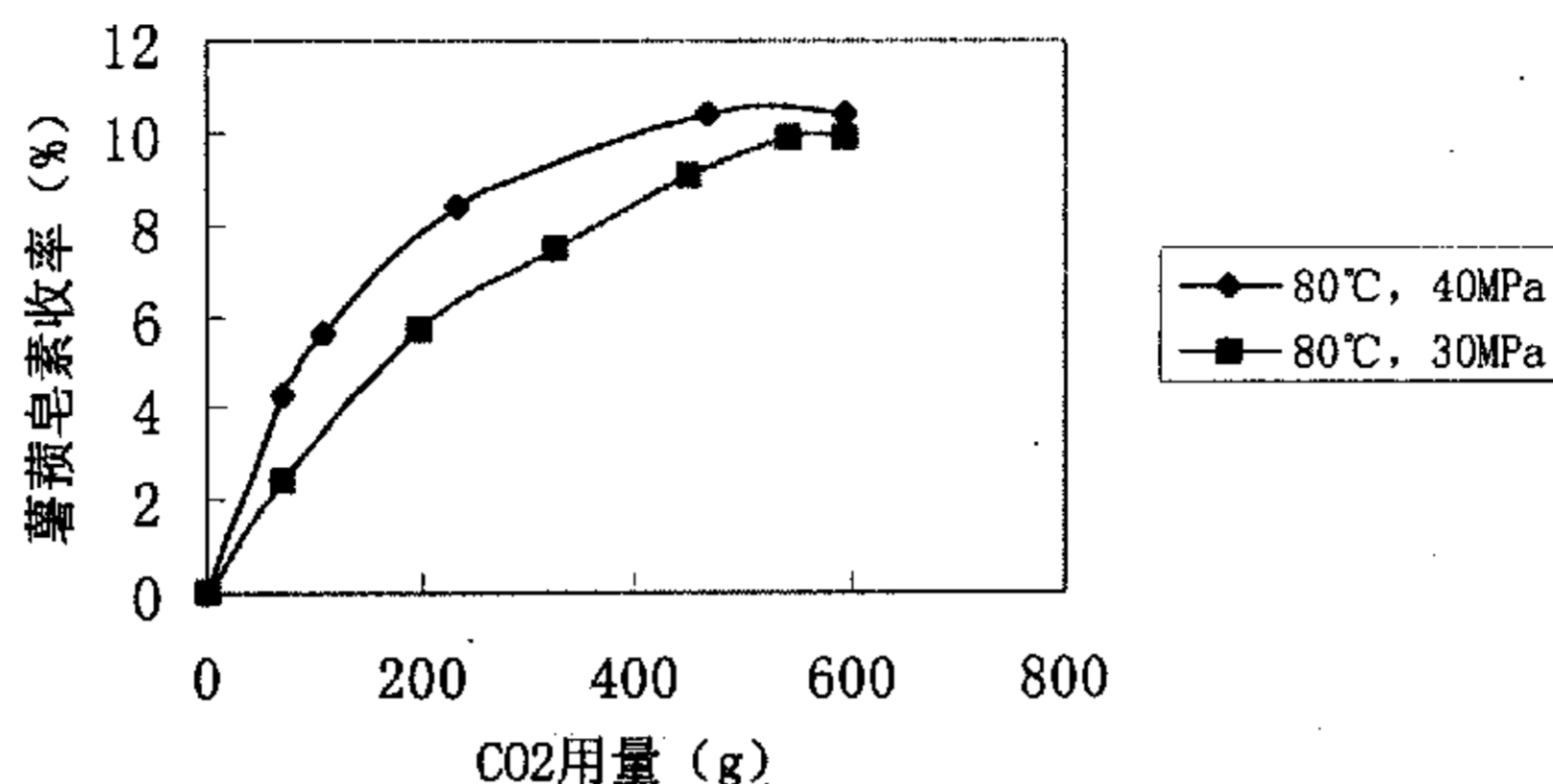


图 3.6 薯蓣皂素收率与 CO₂ 用量的函数关系图

Fig. 3.6 Extraction yield of Diosgenin as a function of SC-CO₂ amount used

由图可以看出, 萃取过程可分为三个阶段, 最初阶段萃取曲线几乎呈直线上升, 随后曲线上升幅度变小, 最后当 CO₂ 用量达到 600 克以后, 几乎成为一条水平直线, 薯蓣皂素收率基本不变, 超临界 CO₂ 萃取完成。

3.1.6 最佳工艺条件的确定

为确定最佳的工艺条件, 本实验还对萃取温度及萃取压力在已考察的范围之外做了一定的延伸实验。在 55°C, 30MPa 条件下超临界萃取薯蓣皂素, 将其结果与 30 MPa 下其他温度条件下的数据进行比较, 从表 3.5 可以看出降低萃取温度不利于超临界萃取的进行。此外, 还在做了 40MPa, 100°C 的超临界萃取实验, 将其与 40MPa 下其他温度下萃取收率进行比较, 从表 3.5 可以看出温度对萃取效果的影响与上述分析一致, 是两个因素相互竞争的结果。从而, 最佳萃取温度选择为 80°C。

表 3.5 温度对薯蓣皂素收率的影响

Table 3.5 Influence of temperature on yield of Diosgenin product over a larger range

温度 (°C)	压力 (MPa)	原料粒度 (目)	CO ₂ 用量 (L)	薯蓣皂素收率 (%)	总收率 (%)
55	30	20-40	280	6.00	11.15
70	30	20-40	280	7.76	12.20
80	30	20-40	280	9.50	16.17
90	30	20-40	280	8.29	13.40
70	40	20-40	280	7.93	15.29
80	40	20-40	280	10.1	17.02
90	40	20-40	280	8.97	16.40
100	40	20-40	280	7.69	13.70

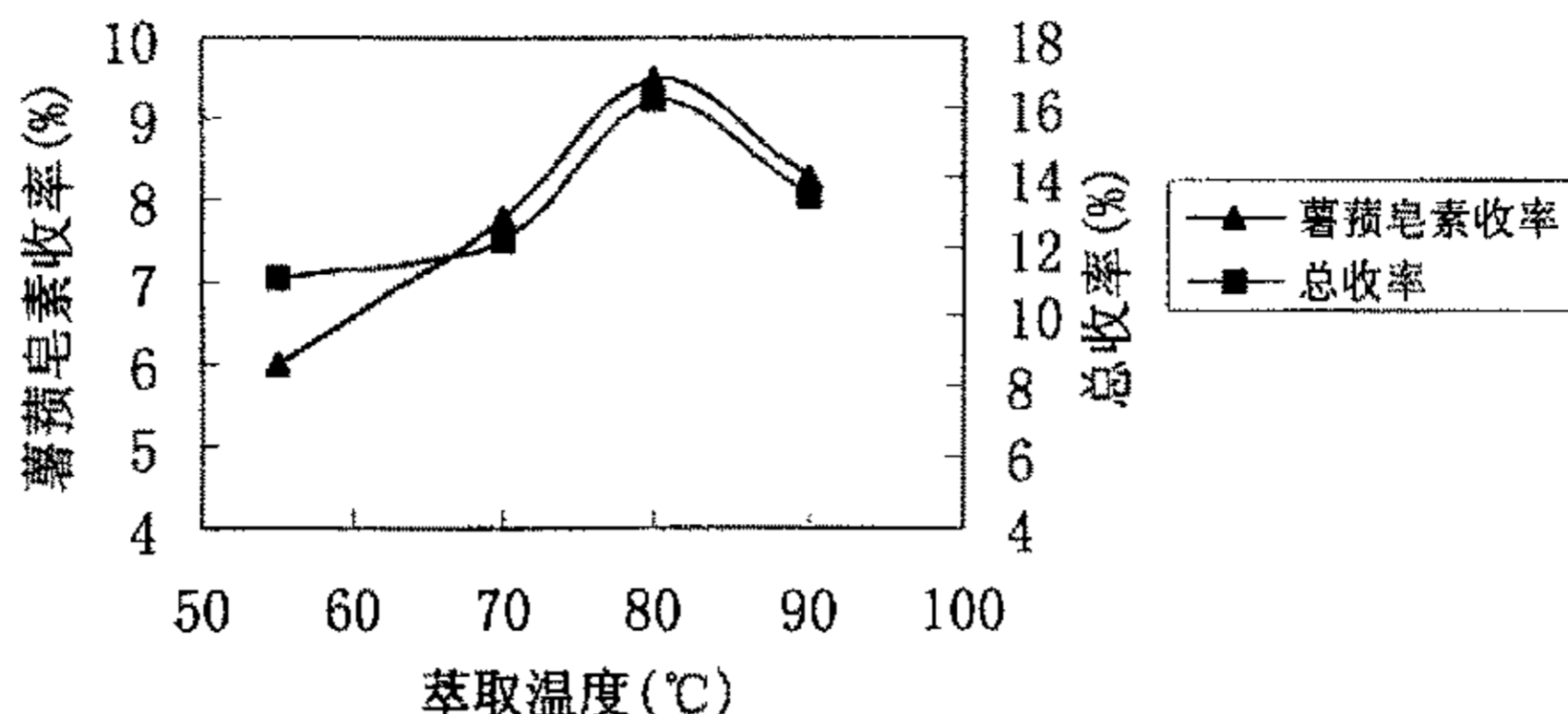


图 3.7 30MPa 压力下萃取收率随温度变化关系图

Fig. 3.7 Influence of temperature on yield of Diosgenin at 30MPa

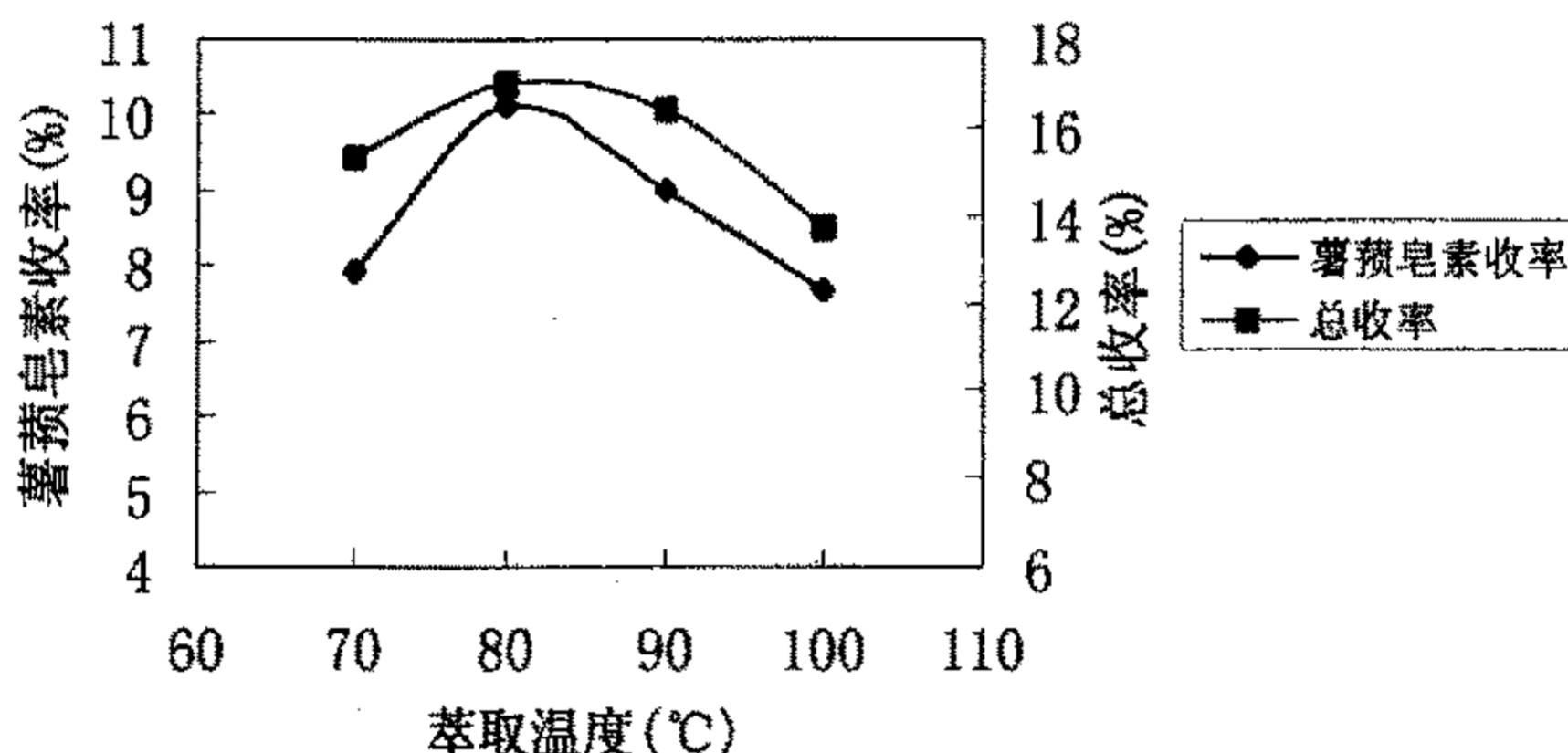


图 3.8 40MPa 压力下萃取收率随温度变化关系图

Fig. 3.8 Influence of temperature on yield of Diosgenin at 40MPa

本实验还在 20MPa 下进行了超临界萃取实验,但在此压力条件下,薯蓣皂素很难被超临界 CO₂ 萃取出来。其原因可能是 20MPa 下的超临界 CO₂ 密度较低,故薯蓣皂素在其中的低溶解度导致薯蓣皂素较难地被萃取出来。从表的数据分析,以薯蓣皂素萃取率为目标函数,最佳的萃取压力为 40 MPa。如果考虑工业生产的设备投资成本和操作费用,因此择最佳萃取压力为 30MPa。

本实验还在最佳工艺条件下进行了两次重复性实验,两次实验得到的薯蓣皂素收率的平均值为 10.10%,绝对误差为 0.6%,相对误差为 6%。

3.1.7 超临界 CO₂ 萃取实验小结

超临界 CO₂ 从薯蓣属植物根茎水解物中萃取薯蓣皂素的实验表明采用超临界萃取技术得到薯蓣皂素产品的工艺是可行的。其萃取的最佳工艺条件是:萃取温度 80°C,萃取压力 30-40MPa,CO₂ 流速为 2-3L/min,萃取时间为 2 小时,薯

蒺皂素收率达到 10%。

3.2 超声波辅助萃取实验研究

3.2.1 正交实验

超声波辅助萃取是利用超声波的热效应,空化效应和机械振动机制来辅助溶剂萃取。本实验是利用超声波辅助有机溶剂萃取薯蓣属植物水解物,而后经分离,纯化过程得到薯蓣皂素产品。在超声波辅助萃取实验中,众多因素影响着的萃取的进行。所以考察影响因素,包括超声波功率,超声波频率,超声作用时间和溶剂用量等因素,对薯蓣皂素收率的影响是该实验的一个重要内容。

为了考察超声波辅助萃取薯蓣皂素的可行性和更好的了解各因素对超声辅助萃取效果的影响,本实验采用正交实验来分析各个因素对萃取收率的影响的显著程度,确定哪些为主要影响因素,以薯蓣皂素收率为目标函数,确定超声波辅助萃取的最佳工艺条件。本实验所得薯蓣皂素收率和薯蓣皂素含量根据以下公式得到:

$$\text{薯蓣皂素收率} = \frac{\text{超声波辅助萃取得到薯蓣皂素产品的质量}}{\text{原料质量}} \times 100\%$$

$$\text{薯蓣皂素含量} = \frac{\text{超声波辅助萃取液中薯蓣皂素的质量}}{\text{原料质量}} \times 100\%$$

本实验选用的是 $L_4(2^3)$ 正交表,因素选择分别为超声波功率,超声作用时间和溶剂用量,且各因素选取两个水平,共进行 4 个超声波辅助萃取实验。正交表如表 3.6 所示。

表 3.6 超声波辅助萃取正交实验

Table 3.6 Experiments of ultrasound-assisted extraction

实验号	因素	超声波功率	超声时间 / (min)	溶剂量 / (ml)
	水平			
1		弱	30	30
2		弱	60	60
3		强	30	60
4		强	60	30

3.2.1 正交实验结果与讨论

超声作用后的萃取液经减压过滤后的滤液用可见光分光光度法测定滤液中薯蓣皂素含量,实验结果见表 3.7。接着对正交实验数据进行极差分析。 $L_4(2^3)$

正交表中，每个因素的一水平和二水平出现两次，所以 I /2 和 II /2 分别为一，二水平的萃取效果的平均值，表中的极差为两个平均值中最大与最小之差。表中极差的大小反映各因素水平的变化对萃取效果的影响，极差大的表明该因素的两个水平对萃取效果影响大，在对该因素的水平进行选取时要认真考虑，极差小的表示该因素的两个水平对萃取效果没有什么影响，可以根据别的要求确定其水平。

因此从表 3.7 可以看出，溶剂量这个因素的两个水平的极差最大，达到 3.925%，超声功率这个因素的两个水平的极差次之，为 1.685%，而超声时间这个因素的两个水平的极差最小，仅为 0.505%。从极差分析，可以很明显得到结论，三个因素对萃取效果影响显著程度次序为：

溶剂量 \longrightarrow 超声波功率 \longrightarrow 超声时间

表 3.7 正交实验结果及极差分析

Table 3.7 Results and discussion of ultrasound-assisted extraction

因素 实验号	超声波功率	超声时间 (min)	溶剂量 (ml)	薯蓣皂素含量
1	弱	30	30	1.69%±0.2
2	弱	60	60	6.12%±0.5
3	强	30	60	7.30%±0.4
4	强	60	30	3.88%±0.3
I	7.81%	8.99%	5.57%	
II	11.18%	10.00%	13.42%	
I + II	18.99%	18.99%	18.99%	
I /2	3.905%	4.495%	2.785%	
II /2	5.59%	5.00%	6.71%	
极差	1.685%	0.505%	3.925%	

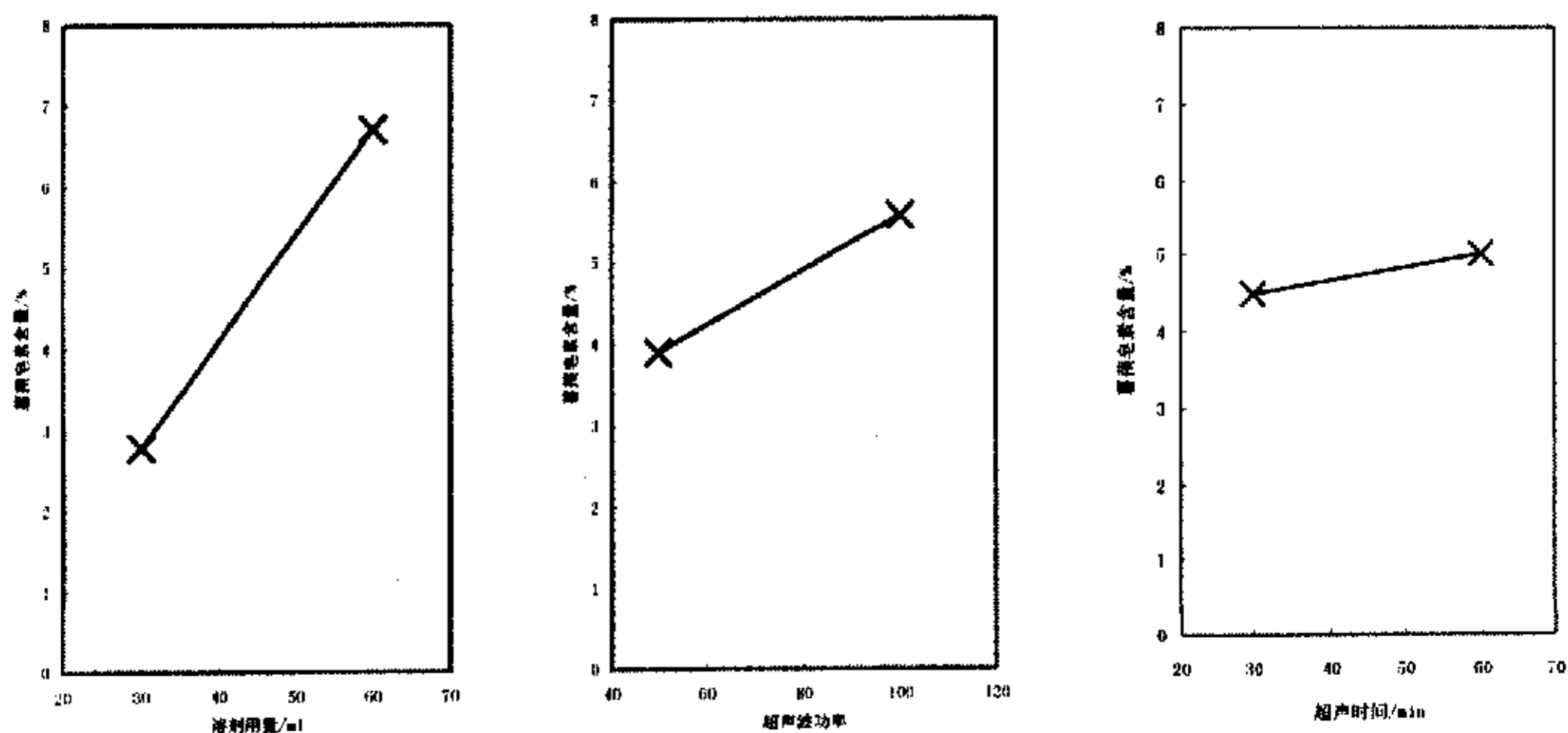


图 3.8 三个因素与萃取效果的关系

Table 3.8 Relation of three factors with extraction effect

从图 3.8 的三个图很清晰看出三个因素对萃取效果影响显著程度次序为：
溶剂用量 \longrightarrow 超声波功率 \longrightarrow 超声时间

考虑到溶剂量为最显著的因素，所以通过增加溶剂用量的方法在原有超声条件下考察超声波辅助萃取薯蓣皂素的程度。具体的操作如下：溶剂用量为 80ml，用强功率的超声波超声作用萃取薯蓣皂素 60min，用可见光分光光度法测得萃取液中薯蓣皂素的含量达到 8.36%。这与溶剂用量为 60ml 的实验结果相比，薯蓣皂素含量仅提高 1.06%。表明一次性超声波提取薯蓣皂素的收率不高。

另外，本实验还进行了多次超声波辅助萃取实验研究。将几次超声波辅助萃取后的萃取液经减压过滤后合并滤液，浓缩，过滤，洗涤，干燥后得到薯蓣皂素产品。实验结果见表 3.8。

表 3.8 多次超声萃取薯蓣皂素实验结果

Table 3.8 The results of ultrasound-assisted extraction of Diosgenin

萃取次数	每次超声时间 (h)	共用溶剂量 (ml)	薯蓣皂素收率 (%)
一次	1	100	5.60
两次	1	200	7.44
三次	1	300	8.35
四次	1	400	8.98

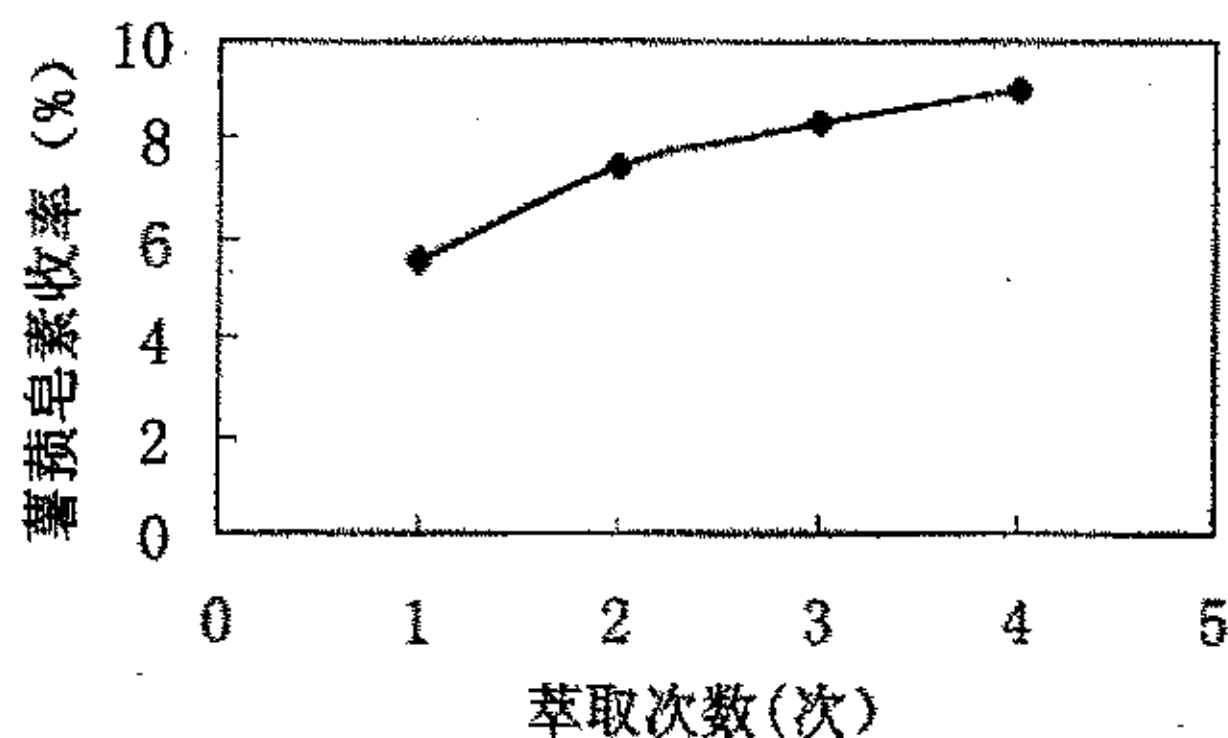


图 3.9 薯蓣皂素收率随萃取次数的关系图

Fig 3.9 Influence of extraction times on yield of Diosgenin

由表 3.8 和图 3.9 可以看出，当超声波辅助萃取连续萃取四次后，薯蓣皂素收率由一次萃取的 5.60% 逐渐上升到四次萃取后的 8.98%，薯蓣皂素收率到达较高的水平。虽然萃取时间较索氏萃取有所缩短，但原料和溶剂用量之比达到 1/133 (g/ml)，这样需要回收的溶剂量太大，对环境污染严重。

3.3 索氏萃取实验研究

在索氏萃取实验中，所用原料均为 20-40 目薯蓣属植物根茎水解物 3g，采用电热煲加热，加热电压为 220V，萃取装置均为 250ml 索氏萃取装置。实验结果如图 3.9 所示。本实验的薯蓣皂素收率和薯蓣皂素含量根据以下公式得到：

$$\text{薯蓣皂素收率} = \frac{\text{索氏萃取得到薯蓣皂素产品的质量}}{\text{原料质量}} \times 100\%$$

$$\text{薯蓣皂素含量} = \frac{\text{索氏萃取液中薯蓣皂素的质量}}{\text{原料质量}} \times 100\%$$

表 3.9 索氏萃取时间对薯蓣皂素收率的影响

Table 3.9 Influence of Soxhlet extraction on content of Diosgenin

索氏萃取时间 (h)	溶剂用量 (ml)	薯蓣皂素含量 (%)
6	200	10.44
10	200	11.02
16	200	11.14

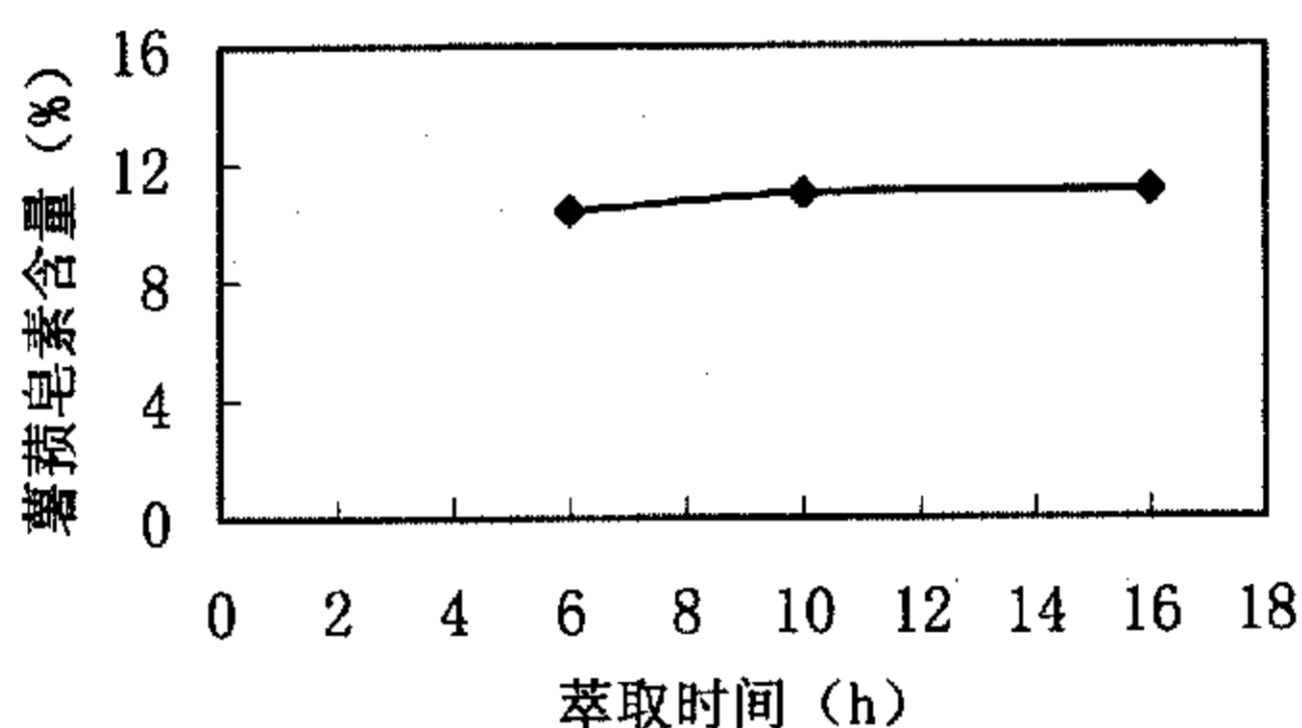


图 3.10 薯蓣皂素含量随萃取时间的关系

Fig 3.10 Influence of extraction time on content of Diosgenin

从表 3.9 和图 3.10 可以看出, 萃取 6 小时后薯蓣皂素含量为 10.44%, 萃取 10 小时后其达到 11.02%, 上升率为 5.55%, 萃取 16 小时后其达到 11.14%, 上升率也仅为 6.70%, 这说明薯蓣皂素含量在索氏萃取 6 小时后随萃取时间变化不大, 萃取 6 小时后就可认为索氏萃取结束。

要想得到薯蓣皂素产品, 索氏萃取后的萃取液还需经过减压过滤, 减压浓缩, 过滤, 洗涤, 干燥等步骤。在后面的步骤中薯蓣皂素的损失不可避免, 所以薯蓣皂素的收率将比薯蓣皂素含量降低 1-2%, 本实验萃取 16 小时后的薯蓣皂素收率为 9.71%。在后续分离和精制过程中, 薯蓣皂素的损失的原因可归纳为以下几点:

1. 在萃取液减压过滤的过程中, 少许薯蓣皂素因压力的降低而析出;
2. 由于杂质的存在, 减压浓缩不能将所有溶剂全部蒸发掉, 因此有少许薯蓣皂素留在母液中;
3. 为保证薯蓣皂素产品的质量, 必须用新鲜的溶剂洗涤薯蓣皂素产品, 这就造成一定的薯蓣皂素损失。

3.4 薯蓣皂素产品的分析结果

3.4.1 红外光谱定性分析结果

将超临界萃取, 超声波辅助萃取和索氏萃取得到的薯蓣皂素产品在整个红外光谱范围内扫描得到各自的红外光谱图。将他们和薯蓣皂素标准品的红外光谱图重叠比较, 结果见图 3.11, 3.12, 3.13。

从图 3.11, 3.12, 3.13 可以看出, 每个图中的两条曲线都吻合的很好。这说明超临界萃取和超声波辅助萃取得到是薯蓣皂素。此外, 三种萃取方法得到的薯蓣皂素产品都具有很高的纯度。

3.4.2 可见光分光光度分析结果

由于可见光分光光度法在薯蓣皂素定性分析上有专属性的特点, 且它可适用与固, 液体产品的分析, 本实验将可见光分光光度法选为薯蓣皂素的定量析方法, 分析结果如表 3.10 所示。

表 3.10 超临界萃取的薯蓣皂素产品的纯度分析结果

Table 3.10 Analytical results of the purity of Diosgenin using SFE

温度(°C)	70			80			90		
压力(MPa)	30	40	50	30	40	50	30	40	50
薯蓣皂素纯度 (%)	97.3	96.2	97.5	97.3	97.5	94.9	93.4	94.1	96.8
	±0.3	±0.2	±0.3	±0.5	±0.2	±0.4	±0.2	±0.3	±0.4

由表 3.10 看出, 超临界萃取得到的薯蓣皂素产品的纯度在 95%左右, 在最佳工艺条件 (80°C, 40MPa) 下薯蓣皂素的纯度达到最高, 为 97.5%。

表 3.11 超声波辅助萃取和索氏萃取的产品的分析结果

Table 3.11 Analytical results of the purity of Diosgenin using ultrasound assisted extraction and Soxhlet extraction

萃取方法	薯蓣皂素产品纯度 (%)
超声波辅助萃取法	98.1%±0.2
索氏萃取法	98.3%±0.2

从表 3.10 和 3.11 发现, 三种方法得到的薯蓣皂素产品的纯度相当, 这表明超临界萃取薯蓣皂素工艺在无需后续分离和精制过程的情况下, 薯蓣皂素产品的质量已经达和传统提取工艺相当的水平。这充分显示了超临界萃取工艺在提取薯蓣皂素的过程中传统方法无法比拟的优越性。

此外, 可见光分光光度法测定了超临界萃取前期得到的杂质中薯蓣皂素的含量, 约为 0.4%。

3.4.3 高效液相色谱法分析结果

高效液相色谱分析以 100%的甲醇为流动相, 在波长 210nm 处进行了三种萃取方法得到的薯蓣皂素产品的含量分析实验。实验结果见表 3.12。

表 3.12 薯蓣皂素产品的高效液相色谱的分析结果

Table 3.12 Analytical results of the content of Diosgenin using HPLC

萃取方法	薯蓣皂素产品纯度 (%)
超声波辅助萃取法	83.0498
索氏萃取法	82.9286
超临界萃取 (80℃, 40MPa)	82.1918

采用此高效液相色谱法测定的薯蓣皂素标准品的含量仅为 90%左右, 这与薯蓣皂素标准品的实际 99.9%的含量有较大差距。这说明此高效液相检测方法在流动相选择或检测波长的选择上还有所缺陷。但从三种方法的薯蓣皂素产品的含量和标准品的含量进行纵向比较, 还是可以发现三种方法的薯蓣皂素产品的质量已经达到优等品的标准。

3.4.4 熔点测定法分析结果

熔点测定法作为薯蓣皂素的质量的检测方法因其方便, 快捷而被许多薯蓣皂素生产企业广泛使用。本实验也进行了三种萃取方法得到的薯蓣皂素产品的熔点测定。具体结果见表 3.13。

表 3.13 薯蓣皂素产品熔点测定的分析结果

Table 3.13 Analytical results of the range of melting point of Diosgenin

萃取方法	薯蓣皂素产品熔点 (℃)	误差范围 (℃)
超声波辅助萃取法	202-207	±1
索氏萃取法	202-206	±1
超临界萃取法 (70℃, 30MPa)	202-205	±1
超临界萃取法 (80℃, 30MPa)	202-206	±1
超临界萃取法 (80℃, 40MPa)	202-207	±1
超临界萃取法 (90℃, 50MPa)	201-206	±1

将所测得的薯蓣皂素产品的熔点范围和质量标准进行对照, 发现三种方法的产品初熔点都大于 198℃, 且熔距小于 10℃。所以可以看出所有的产品都达到优等品的标准。

3.5 讨论

本实验采用的超临界萃取工艺与先前国内外的文献报道的有较大区别。虽然 Michelle 等^[82]超临界萃取薯蓣皂素工艺路线其中有一种是将水解和提取结合在一起, 即将酸水解和超临界 CO₂ 萃取同时在萃取柱内进行, 大大简化了整个提取

工艺。但这种方法的萃取温度较高,达到 250℃,并且同时超临界 CO₂ 需要改性。Liu Ben 等^[83]也对超临界 CO₂ 提取薯蓣皂素进行研究,他以薯蓣属植物水解物为原料,在无需将超临界 CO₂ 流体改性和萃取温度接近室温的条件下可以有较好的萃取效果。但该实验仅限于分析型仪器规模。国内学者葛发欢等^[84]采用超临界萃取技术,从黄山药水解物中萃取薯蓣皂素,他同时考察了有夹带剂和没有夹带剂的两种超临界萃取工艺。结果表明在其选择的萃取条件下,有夹带剂的超临界萃取工艺的皂素收率要高于无夹带剂的皂素收率。由于使用可夹带剂萃取得到的皂素粗品仍需要进一步的分离,使的后续精制工艺不可缺少。与上述已见报道的超临界萃取薯蓣皂素工艺相比,本工艺是采用薯蓣属植物水解后得到的水解物为原料,用纯的超临界 CO₂ 流体在温度在 70-90℃,压力在 30-50MPa 的范围内萃取薯蓣皂素。在 80℃, 40MPa 的最佳工艺条件下,萃取两小时后薯蓣皂素收率高于传统的溶剂萃取工艺。没有使用夹带剂,因此无需后续的分离步骤;并且采用了两步的产品接收方式,所得的薯蓣皂素即能达到优等品的质量标准,无需后续的精制步骤。总之,通过改变萃取条件,采用纯的超临界 CO₂ 萃取薯蓣皂素也能有很好的效果。

3.6 实验数据的经验关联

如果知道收率和时间关系,就可以确定最佳的萃取操作时间,以及评价过程的经济性。所以它对于超临界萃取过程的优化有着的重要意义。在具体过程特征不是十分了解的情况下,经验公式是关联实验数据的一个有效手段。Nailk^[89]在处理超临界萃取过程的实验数据时,提出一个萃取率(y)与萃取时间(t)的关系式,其形式与 Langmuir 经验方程相似

$$y = \frac{y_{\infty} t}{b + t} \quad (1)$$

式中, t 是萃取时间 (min), y (g 皂素/g 物料) 是萃取 t min 后的收率, y_∞ 是萃取时间为无限长时的皂素收率, b 是常数。方程 (1) 可以通过数学处理而线性化

$$\frac{1}{y} = \frac{b}{y_{\infty}} \frac{1}{t} + \frac{1}{y_{\infty}} \quad (2)$$

如果萃取过程的外扩散是整个萃取过程的控制步骤,且皂素与水解物固体基质没有很强的化学作用,那么萃取过程就非常似于一个物理脱附过程。这时就可能用与 Langmuir 经验方程相似的经验模型来描述萃取过程。所以我们使用方程 (2) 对不同实验条件下的皂素收率与萃取时间的关系的实验数据进行关联。结果见表 3.14。表中, y_b 是萃取时间为 1hr 时皂素的收率。R 为方程的相关系数。

表 3.14 不同实验条件下方程中的常数

Table 3.14 The constants of equation(1) under different experimental condition

温度/°C	压力/MPa	y_{∞}	y_b	b/y_{∞}	b	R
70	30	7.76	4.98	4.20	32.59	0.9623
70	40	7.93	5.11	4.19	33.23	0.9716
70	50	8.49	7.17	1.50	12.74	0.9981
80	30	9.50	7.41	1.75	16.63	0.9964
80	40	10.1	8.80	0.88	8.88	0.9991
80	50	9.97	8.43	1.13	11.27	0.9987
90	30	8.29	6.78	1.69	14.01	0.9987
90	40	8.97	8.13	0.73	6.55	0.9913
90	50	9.23	7.72	1.37	12.64	0.9810

从表 3.14 可以看出关联方程的相关系数的最小是 0.9623, 最大是 0.9991。说明该关联式与实验数据基本吻合, 薯蓣皂素的超临界萃取过程十分近似于 Langmuir 型的物理脱附过程。这为以后建立适当的理论模型提供了有意义的参考。

3.7 问题与建议

1. 由于时间原因, 本文仅完成了超临界 CO_2 萃取小试实验和在此基础上的最优条件的确定。为了进一步考察其工业应用前景, 还必须进行全面的中试放大实验。
2. 本实验所得到黄色杂质未进行定性分析。建议在可能的情况下对杂质进行质谱鉴定, 以便进一步改进酶发酵和酸水解工艺。
3. 在本实验的超声辅助萃取实验中, 由于实验仪器的限制, 功率调节有限, 超声频率固定, 因而建议有条件的话, 应在大的正交表内更加全面的考察各个因素对皂素收率的影响。
4. 在色谱分析中, 可能是吸收波长和流动相选择不当, 本实验采用的高效液相色谱分析条件并不成熟, 且所用的计算薯蓣皂素的含量的面积归一法也存在较大误差, 所以建议进一步对 HPLC 法测定薯蓣皂素含量进行更深入的研究。
5. 本实验采用的萃取物分步接收杂质和皂素的临界点是通过目测根据两种萃取物颜色上的差异来判断, 但要在工业应用, 还需更深入的工艺和设备研究。

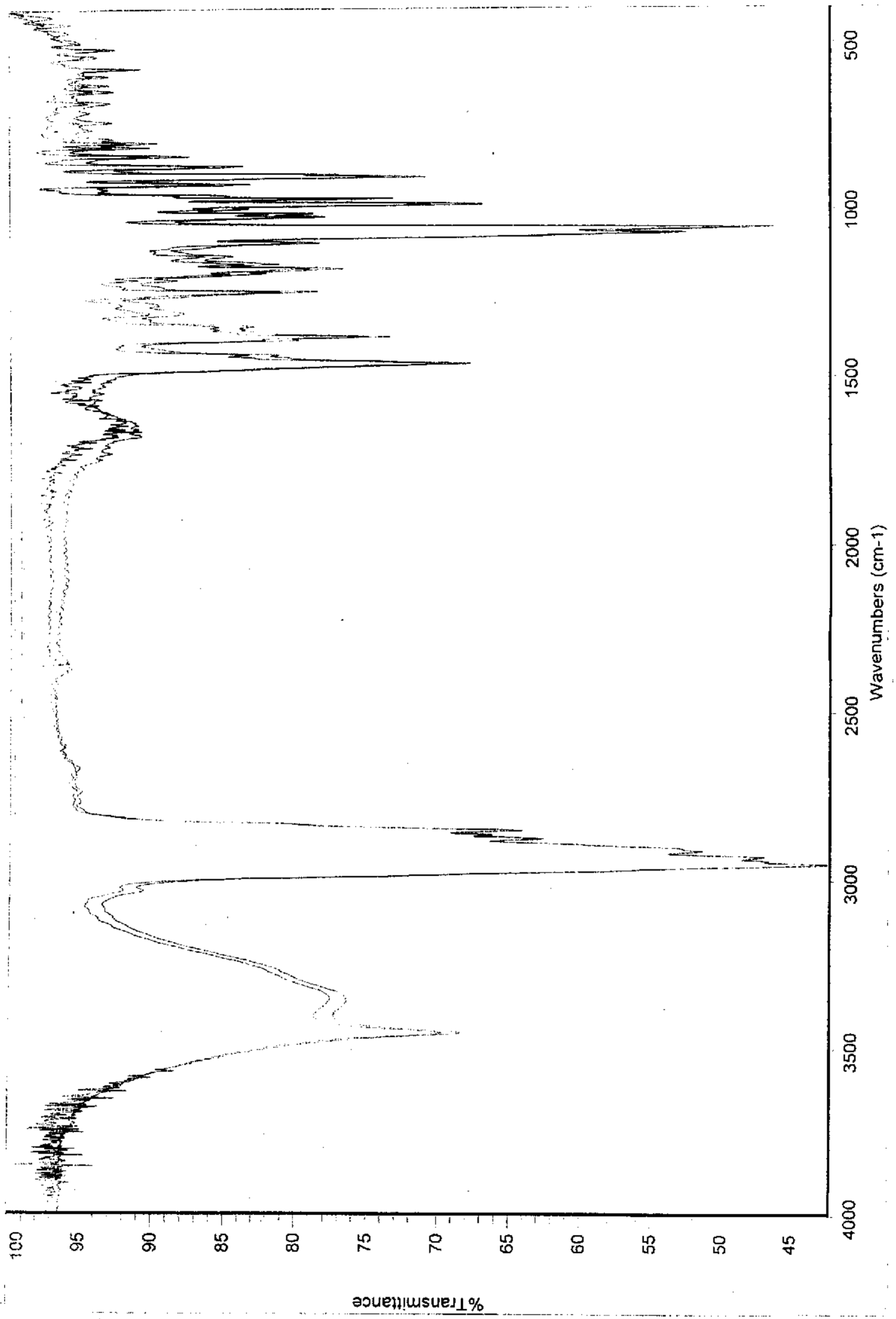


图 3.11 超临界萃取的薯蓣皂素(上)和薯蓣皂素标准品(下)的红外光谱图
Fig 3.11 Infrared spectrum of the extracts of SFE(below) and diosgenin standard(above)

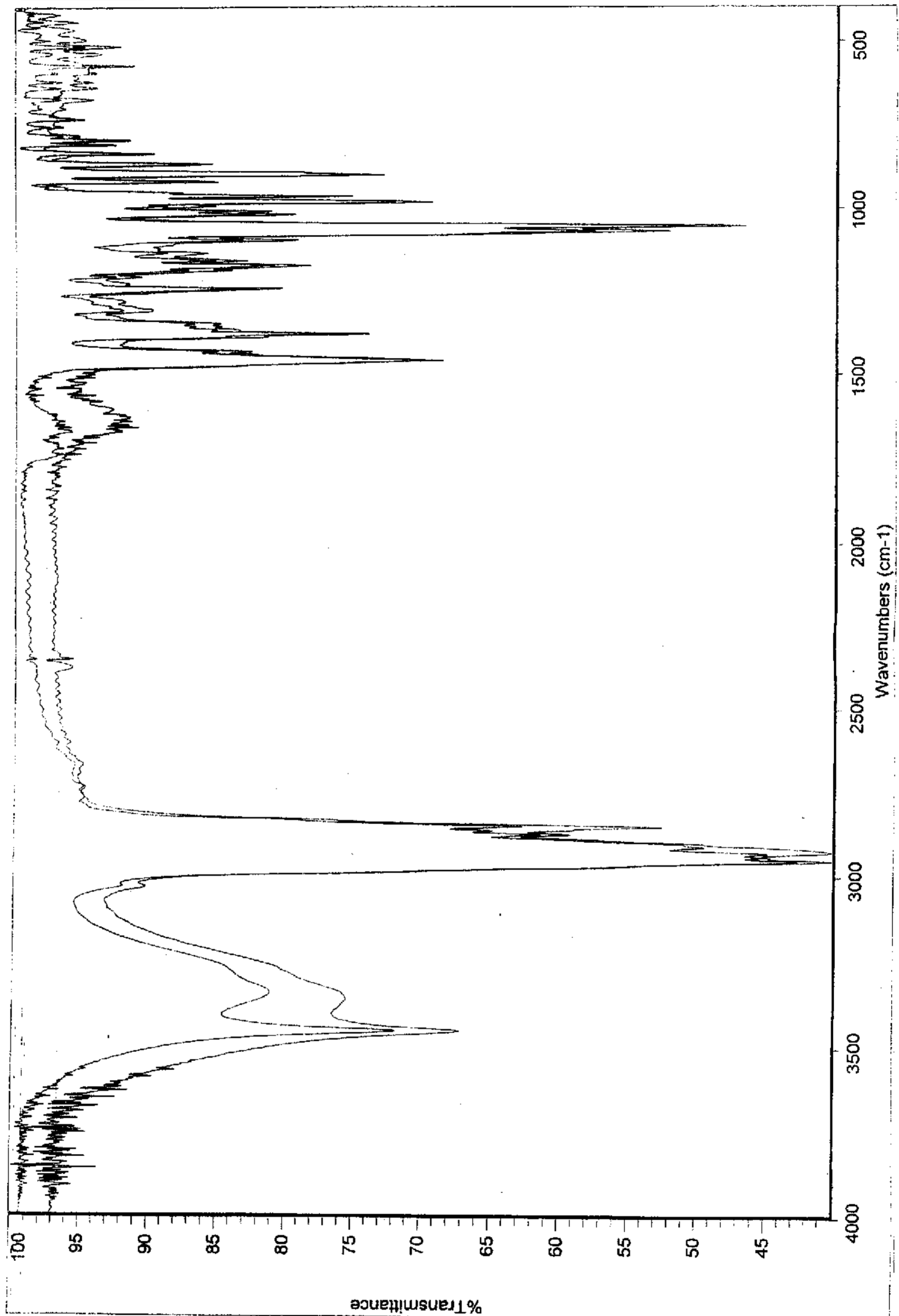


图 3.12 超声辅助萃取的薯蓣皂素(上)和薯蓣皂素标准品 (下) 的红外光谱图
Fig 3.12 Infrared spectrum of the extracts of ultrasound assisted extraction(below) and diosgenin standard(above)

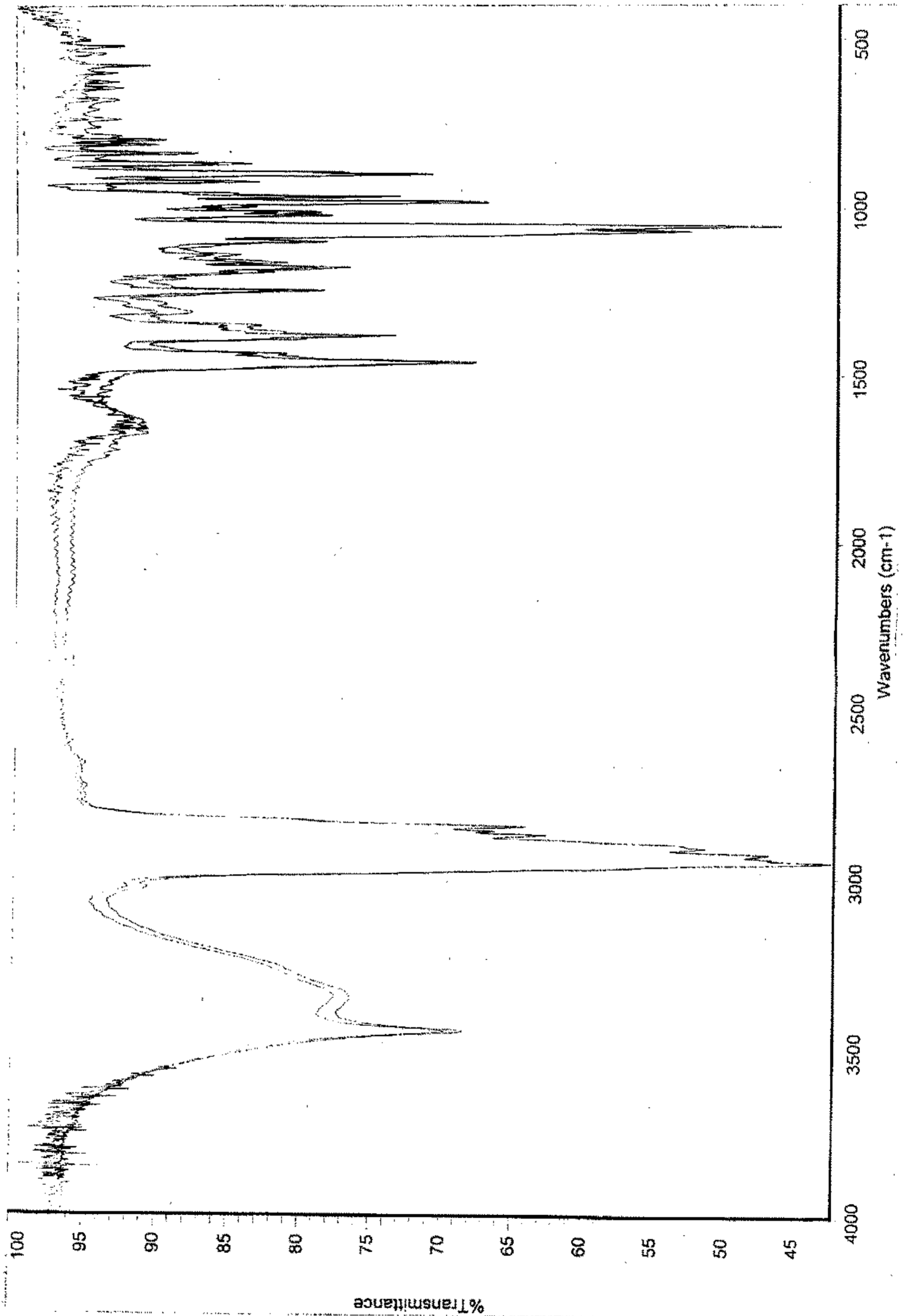


图 3.13 索氏萃取的薯蓣皂素(上)和薯蓣皂素标准品(下)的红外光谱图
Fig 3.13 Infrared spectrum of the extracts of Soxhlet extraction(below) and diosgenin standard(above)

第四章 结论

通过对环境友好的高效分离技术-超临界 CO_2 萃取用于天然薯蓣皂素提取的研究,并以薯蓣皂素收率为目标函数,对所得薯蓣皂素产品进行可见光分光光度法分析,所得结果与传统索氏萃取和超声波辅助萃取进行比较,旨在探讨采用超临界 CO_2 萃取技术从薯蓣属植物中萃取薯蓣皂素的可行性和最佳工艺条件,为该技术的工业应用提供必要的参数。现得出以下几点结论:

1. 本实验在温度为 $70\text{--}90^\circ\text{C}$, 压力为 $30\text{--}50\text{MPa}$ 的操作范围内对超临界 CO_2 萃取薯蓣皂素工艺进行了考察,以薯蓣皂素收率为目标函数,得到超临界萃取薯蓣皂素的最佳工艺条件是目数为 $20\text{--}40$ 目的水解物在温度为 80°C , 压力为 40MPa , CO_2 流速在 $2\text{--}3\text{L}/\text{min}$ 的条件下萃取 2 小时。在此最佳工艺条件下,超临界萃取薯蓣皂素收率可达到约 10%。
2. 根据实验,皂素收率随温度的升高,先是增加,而后降低,体现了温度影响的两个因素相互竞争的结果;总收率和皂素收率随压力和 CO_2 流速的升高而增加;目数小的物料有利于萃取。但从总的影晌程度来看,皂素收率受温度影响最大,压力影响次之,粒度和 CO_2 流速影响最小。
3. 与国内外的已见报道的超临界萃取薯蓣皂素的文献^[80-82]相比,本实验在选择不同于其温度和压力范围的情况下,采用纯的超临界 CO_2 流体作为萃取溶剂,取得高的薯蓣皂素萃取收率。
4. 避免了使用夹带剂,经减压分离后可直接得到薯蓣皂素产品,无需经过后续的分离步骤,大大缩短了整个萃取工艺流程和操作周期。
5. 由于杂质和薯蓣皂素先后被超临界 CO_2 萃取出来,采用萃取物分两步的收集方法,即先得到杂质,后得到皂素产品。可见光分光光度法和熔点测定法分析得到薯蓣皂素纯度达到 97%,薯蓣皂素产品即可达到优等品的质量标准。
6. 索氏萃取 16 小时后的薯蓣皂素收率达到 9.71%,超声波辅助萃取四次后皂素收率达到 8.98%,而在最佳工艺条件下超临界 CO_2 萃取 2 小时得到的皂素收率为 10.4%。从薯蓣皂素收率方面来看,超临界萃取效果明显优于索氏萃取和超声波辅助萃取。
7. 就萃取时间比较,超临界萃取 2 小时后就能达到萃取终点,超声波辅助萃取所用时间次之,四次萃取总共需要 4 小时,而索氏萃取需 10 个小时才能基本达到萃取终点。所以超临界萃取的萃取效率是最高的,体现了超临界 CO_2 流体在溶解能力和传质上的优越性。

8. 虽然超声波辅助萃取在多次萃取后也能达到满意的萃取收率，且在萃取时间方面较索氏萃取有优势，但是其需要消耗大量溶剂。所以超声波辅助萃取薯蓣皂素工艺较索氏萃取的优势不明显。

参考文献

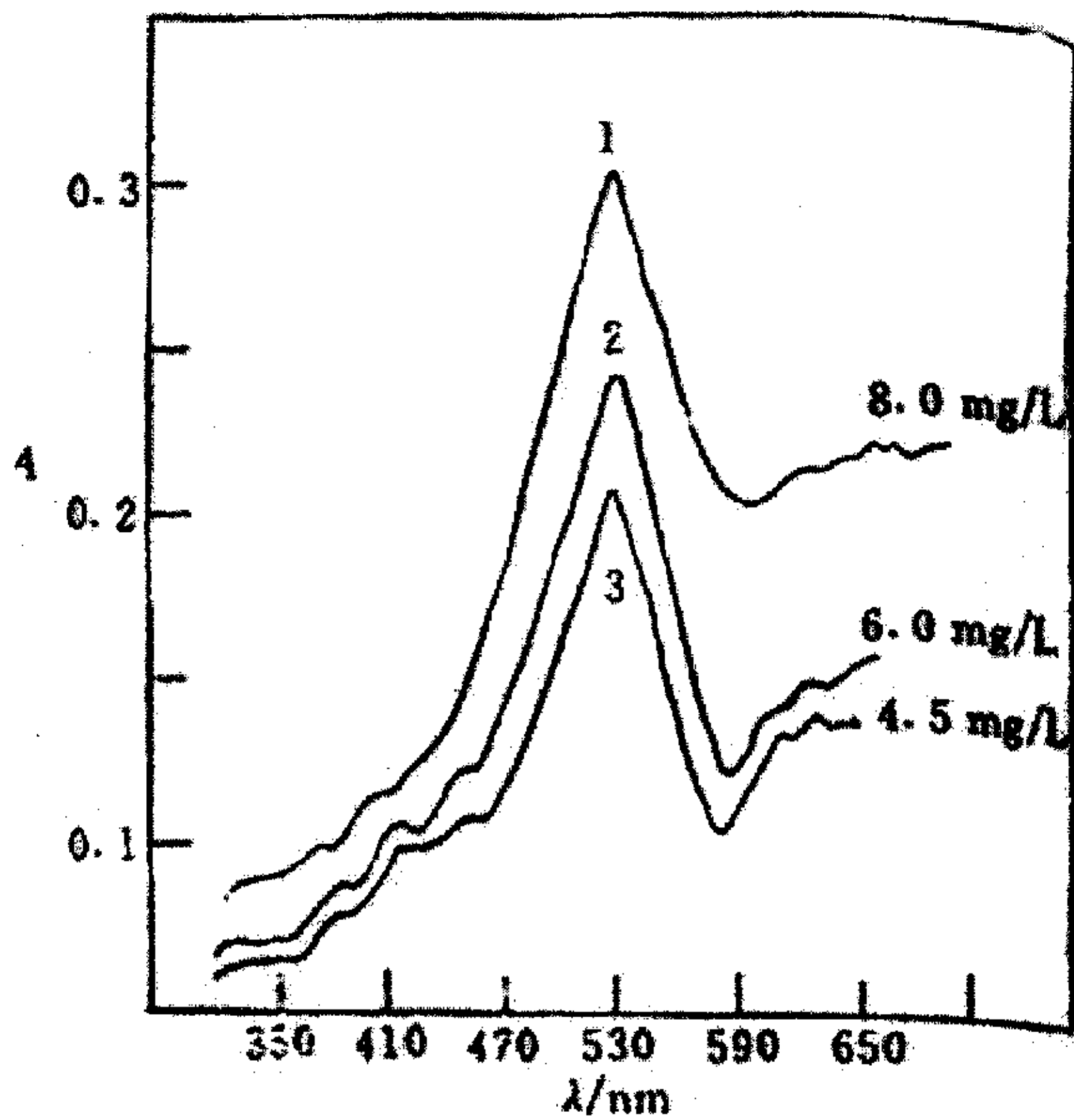
- [1] Zosel K, et al, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1978, 17:702;710;716; 731; 738;746
- [2] Stahl E, Quirin K W, Gerard D, *Dense Gases for Extraction and Refining*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlay, 1986
- [3] Lack E, Marr R., *Sep. Sci. and Tech.* 1988, 23(1-3):63
- [4] Reverchon E J., *Supercrit. Fluids.* 1997, 10:1
- [5] Randall L D, Bowman L M., *Sep. Sci. and Tech.* 1982, 17(1):13-117
- [6] 奥村丞司, *香料 (日)*, 1987, (155): 95
- [7] Moyler D A. *Flavour & Fragrance J.* 1993, 8:235
- [8] 张镜澄等, *超临界流体萃取*, 北京: 化学工业出版社, 2000, 2; 7: 8
- [9] 张镜澄, *广州化工*, 1984, (3): 35
- [10] 沈忠耀, 杨基础, *全国超临界流体技术学术及应用研讨会论文集*, 石家庄: 1996
- [11] 杨基础, 沈忠耀, *化工进展*, 1997, (4): 34
- [12] 陈维扭, *超临界流体萃取的原理和应用*, 北京: 化学工业出版社, 1998
- [13] 张镜澄, 曾健青, *第二届全国超临界流体技术及应用研讨会论文集*, 广州: 1998
- [14] 陈虹, 张承红, *化学进展*, 1999, 11 (3): 227
- [15] 朱自强, *超临界流体技术——原理和应用*, 北京: 化学工业出版社, 2000
- [16] 葛发欢, 辉国钧, 李青等, *超临界 CO₂ 流体萃取技术在天然产物提取及药物分析中的最新研究进展和前景*, *中药材*, 1995, 18 (6): 316
- [17] 宫地洋等, *超临界萃取生药成分的研究*, *药学杂志 (日)*, 1987, 107 (5): 367
- [18] 系川秀治等, *TLC 为标准的生药成分的超临界萃取法*, *药学杂志 (日)*, 1987, 107 (7): 506
- [19] 徐海军, 李国钟, *夹带剂在超临界萃取中的应用*, *化学工程*, 1991, 19 (2): 58
- [20] 廖周坤, 姜继祖, *超临界 CO₂ 萃取藏药灵芝中总皂甙及多糖的研究*, *中草药*, 1998, 29 (9): 601
- [21] Johnston K P. et al, *Water in Carbon Dioxide Microemulsions: An Environment for Hydrophiles Including Proteins*, *Science* 1996, 271:624
- [22] 李淑芬, 陈宝良, 韩金玉, *一种新的绿色化学技术: 超临界萃取作为样品制样技术在痕量药检分析中的应用*, *化工进展*, 1999, 16 (6): 356
- [23] Camel V., *The determination of pesticide residues and metabolites using supercritical fluid extraction*, *Trends in Anal Chem.*, 1997, 16(6):356
- [24] Dirk Sterzenbach, Bend W. Wenclawiak, Volker Weigelt, *Trace analysis methods for SFE CO₂*, *Anal chem.*, 1997, 69:831
- [25] Camel V., *The determination of pesticide residues and metabolites using supercritical fluid extraction*, *Trends in Anal Chem.*, 1997, 16(6):356

- [26] Parks O W, Maxwell R J., A high-throughput supercritical fluid extraction system for the of samples, *J. Chromatogr. Sci.* 1994, 32:290
- [27] Josef S H, Manfred G H, Adian F S, Process with compressed gases used in the foodstuff technology, 2nd International Symposium Fluids, 284
- [28] 张曙明, 田金改, 高天兵, 陈建民, 中药中农药残留量研究及安全控制, *分析测试学报*, 1999, 18 (6): 79
- [29] Macaudiere P, Caude R., et al, Quantitative analysis of polymer additives by coupled SFE/SFC, *J Chromatogr*, 1987, 405:13
- [30] Armstrong D W, Tang Y, Ward T., et al, High pressure combustion and flames in supercritical fluid, *Anal Chem*, 1993, 65:1114
- [31] Macaudiere P, Caude R., et al, Enantiomer fractionation by preparative supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr Sci*, 1989, 27:83
- [32] Terfloth G T, Prikle W H, Lynam K G, Evaluation of retention mechanisms displayed by a porous glassy carbon stationary phase, *J Chromatogr*, 1995, 705:185
- [33] 刘志敏, 赵锁齐, 王仁安, 杨光华, 超临界色谱法测定银杏叶提取物中黄酮化合物, *分析化学*, 1999, 27 (2): 214
- [34] Robert P, Mikloe J, Arpad S., Microscale supercritical fluid extraction coupled SFC/MS to investigate the extraction efficiency of thermally labile materials. *J. Chromatogr*, 1998, 819:249
- [35] Friedich J P, List G R, Herking A J., Petroleum-Free Extraction of Oil from Soybeans with Supercritical Carbon Dioxide, *JAOCS*. 1982, 59:288
- [36] Roselius W, et al, Examination of the Solubility of Natural Oil in Above-Critical Carbon Dioxide, U. S. P4, 322, 445
- [37] Zosel K, Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Caffeine, U. S P4, 247, 570
- [38] Stahl E, et al, Diffusion in Supercritical Fluid, *Phanta Med*, 1978, 34:192
- [39] Helga G, Bjorn S, Lipase-catalyzed Alcoholysis of Cod Liver Oil in Supercritical Carbon Dioxide, *JALCS*, 1995, 72(4):399
- [40] Naik S. N. Lentz H. et al, Extraction of Spices and Flavors from Plant Material with Supercritical Carbon Dioxide, *Chem. Ind*, 1982, 7:399
- [41] Reverchon E. Mathematical Modeling of Supercritical Extraction of Paprika, *AICHE J.* 1996, 42:1765
- [42] Ross D. et al, Modelling the Solubility of Solids in Supercritical Fluids with Density as the Independent Variable, *Fluid phase Equilibria*, 1983, 10:319
- [43] Whitehead J C, Separation Processes for Recovering Hydrocarbon from Coal: Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Aqueous Cleaning, *Coal Mining*, 1979, 71:66
- [44] Christos B, Kostis M, Application of Supercritical Fluid Extraction in Industrial Waster Treatment: Thermodynamic Modeling and Design.

- Sep. Sci. and Tech. 1998, 33(3):387
- [45] Gearhart J A, Garwin L, Supercritical Extraction of Hydrocarbon from Organically Modified Smectite, *Hydrocarbon Processing*, 1976, 55:125
- [46] 黄泰康, 中成药学 (第三版), 北京: 中国医药科技出版社, 1996. 上册: 610
- [47] 郑琴, 张辉, 超临界二氧化碳萃取技术在中草药提取上应用及产业化面临的问题, *时珍国医国药*, 2000, 11(12):1137-1138
- [48] 国家药品监督管理局培训中心, 中药现代化资料汇编, 2001, 275
- [49] Lee ML, et al. Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, *Chromatographic Conferences, Inc Provo VT*. 1990, 437
- [50] 赵兵, 王玉春, 欧阳藩等, 超声波在植物提取中的应用, *中草药*, 1999, 30(9): 附1-附3
- [51] 郭孝武等, *陕西师范大学学报*, 1991, 19(3): 89
- [52] 郭孝武, 超声提取对黄连素提出率的影响, *中国中药杂志*, 1996, 20(11): 673
- [53] 郭孝武等, *陕西师范大学学报*, 1996, 24(1): 50
- [54] 郭孝武等, *陕西师范大学学报*, 1997, 25(1): 47
- [55] 路得明, 张中南, 超声波对盐藻的破碎作用, *青岛海洋大学学报*, 1992, 22(3) 18
- [56] 路得明, 郭红玉, 超声方法提取藻胆体, *应用声学*, 1997, 16(1): 47
- [57] 姬斌, 吸附澄清剂在中药制剂中的应用简介, *新疆中医药*, 2000, 18(1): 48-49
- [58] 黄泰康编, 中成药学, 北京: 中国医药科技出版社, 620
- [59] Shimizu T, et al. *Zeitschrift Fuer Naturforschung, Section C, Biosciences*, 1995, 50(5-6):463
- [60] Atsushi N, et al. *Chem. Pharm Bull (Tokyo)*, 1990, 38(10): 2862
- [61] 葛发欢, 史庆龙等, 超临界萃取法从薯蓣属植物中提取薯蓣皂素[P], CN: 1240791, 1998
- [62] 中国医学科学院药物研究所, 中草药现代研究[M], 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996
- [63] 中国化工进出口公司天津分公司, 薯蓣皂素专题调研报告[R], 天津, 1978
- [64] 陈延镛, 甾体皂甙元的生产现状[J], *医药工业*, 1985, 16(1): 33
- [65] 奚若月, 张国明等, 中国化工医药产品大全, 北京: 科学出版社, 第二卷: 934
- [66] 魏璐雪, 袁昌鲁等, 中药制剂分析[M], 上海, 上海科学技术出版社, 1997
- [67] Rothrock J W., *Ind Eng Chem.*, 1957, 49:186
- [68] Hardman R, et al, *Photochem.*, 1971, 10:519
- [69] Hardman R, et al, *Planta Med*, 1971, 20:350
- [70] Hardman R, et al, BR 1239555, 1971
- [71] Hardman R, et al, US 3620919, 1971
- [72] Denis D, et al, *Planta Medica*, 1986:474
- [73] Roland H, et al, *Photochemistry*, 1971, 10:757
- [74] Luis M., US 2912362, 1959
- [75] 四川省生物研究所薯蓣综合利用研究组, 预发酵提高薯蓣皂素产率及淀粉

- 综合利用的研究[J], 植物学报, 1975, 17(3): 242-246
- [76] 北京医学院药学系, 中草药通讯, 1977, (4): 17
- [77] Руманева ГИ и др, Прикладная Биохимия ИМикробиология, 1975. 4(11):554
- [78] 周振起, 封玉贤, 薯蓣属植物提取皂素的工艺研究[J], 中草药, 1985, 16(7): 15-17
- [79] 赵书申, 柳卫莉, 姚鼎文等, 用黑曲霉发酵联产薯蓣皂素和柠檬酸[P], CN:85108564A, 1987
- [80] 李永狮, 许跃辉, 陈延镛, 从薯蓣属植物中提取薯蓣皂素的方法[P], CN: 111250A, 1995
- [81] 周雯, 应用盐酸-丙酮混合液从穿地龙中直接提取皂素[J], 中草药, 1996, 27(4): 207-208
- [82] Michelle A., Peter B., Frederick J., Extraction of compounds from plant materials using supercritical fluids[P], US:5252729, 1993
- [83] Liu Ben, Lockwood Brain, Gifford Larry, Supercritical fluid extraction of diosgenin from tubers of *Dioscorea nipponica*[J]. Journal of Chromatography Analysis, 1995, (690)250-253
- [84] 史庆龙, 葛发欢, 林秀仙等, 第二届全国超临界流体会议论文集[C], 广州, 1998, 10
- [85] 王昌利, 张振光等, 超声提高薯蓣皂甙得率的实验研究[J], 中成药, 1994, 16(4): 7-8
- [86] 陈战国, 耿征等, 薯蓣皂甙元的分光光度法测定[J], 分析化学, 1996, 24(2): 227-229
- [87] 赵景婵, 郭治安等, 穿山龙中薯蓣皂苷元的高效液相色谱法测定[J], 2000, 20(1): 27-28
- [88] 国家药典委员会编, 中华人民共和国药典, 北京: 化学工业出版社, 2000, 二部附录 42
- [89] S. N. Naik, H. Lentz, R. C. Macheshwari; Extraction of perfumes and flavours from plants materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium conditions; Fluid Phase Equilibri[J], 1989, 49:116-126

附录 I 薯蓣皂素全波长扫描图



薯蓣皂甙元吸收光谱

1. 8.0mg/L 2. 6.0.0mg/L 3. 4.5mg/L 薯蓣皂甙元

附录 II 超临界萃取实验数据

温度	压力	物料量/g	杂质质量/g	杂质收率/%	CO ₂ /L	出料/g	皂素收率/g
55℃	30 MPa	3.0046g	0.1548	5.15	20	0.0594	
					90	0.1138	
					160	0.1405	
					230	0.1636	
					280	0.1803	
20-40 目							
70℃	30 MPa	3.0089g	0.1335	4.44	20	0.0702	
					80	0.1532	
					150	0.1921	
					220	0.2154	
					280	0.2336	
20-40 目							
70℃	40 MPa	3.0073g	0.2213	7.36	20	0.0500	
					110	0.1494	
					180	0.1960	
					250	0.2333	
					280	0.2385	
20-40 目							
70℃	50 MPa	3.0079g	0.3438	11.43	40	0.1049	
					60	0.1562	
					130	0.2360	
					210	0.2549	
					280	0.2554	
20-40 目							
80℃	30 MPa	3.0070g	0.2006	6.67	20	0.0479	
					40	0.0737	
					110	0.1417	
					180	0.2036	
					250	0.2722	
280	0.2866	9.50					
20-40 目							
80℃	40 MPa	3.0091g	0.2082	6.92	40	0.1292	
					60	0.1508	
					130	0.2529	
					210	0.3130	
					280	0.3134	
20-40 目							
80℃	50 MPa	3.0052g	0.2684	8.93	50	0.1814	
					70	0.2047	
					140	0.2652	
					210	0.2286	
					280	0.2996	
20-40 目							

温度	压力	物料量/g	杂质量/g	杂质收率/%	CO ₂ /L	出料/g	皂素收率/g
90℃ 20-40 目	30 MPa	3.0044g	0.1535	5.11	20	0.0565	8.29
					90	0.1361	
					160	0.2036	
					230	0.2367	
					280	0.3491	
90℃ 20-40 目	40 MPa	3.0070g	0.2234	7.43	40	0.1398	8.97
					60	0.1798	
					130	0.2498	
					200	0.2687	
					280	0.2698	
90℃ 20-40 目	50 MPa	3.0054g	0.3103	10.32	60	0.2072	8.97
					80	0.2085	
					150	0.2498	
					200	0.2678	
					280	0.2698	
100℃ 20-40 目	40 MPa	3.0056g	0.1807	6.01	40	0.1446	7.69
					80	0.2067	
					140	0.2310	
					210	0.2312	
					280	0.2312	
80℃ 40-60 目	40 MPa	3.0050g	0.2077	6.91	50	0.1471	9.67
					70	0.1754	
					140	0.2591	
					210	0.2885	
					280	0.2908	
80℃ 60-80 目	40 MPa	3.0067g	0.1768	5.88	40	0.1118	9.60
					60	0.1570	
					130	0.2885	
					280	0.2722	
					280	0.2866	
80℃ 20-40 目	40 MPa	3.0065g	0.2037	6.77	40	0.1262	9.80
					60	0.1468	
					130	0.2479	
					210	0.2940	
					280	0.2947	

附录III HPLC 分析图

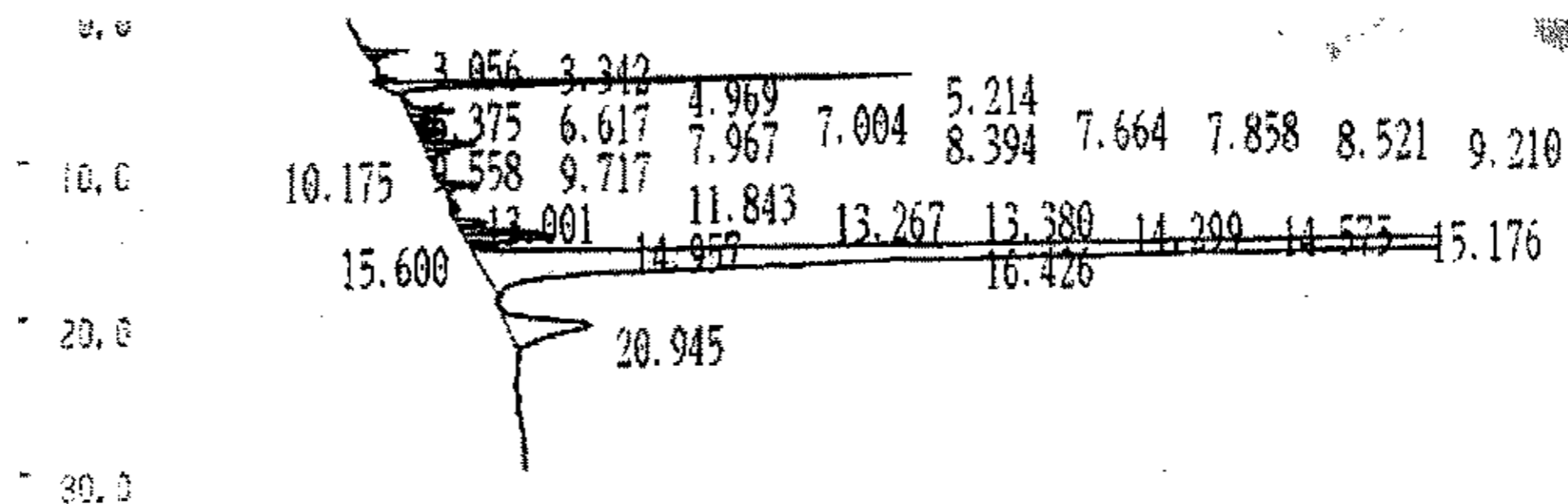


图 1 为超临界萃取得到薯蓣皂素的 HPLC 图

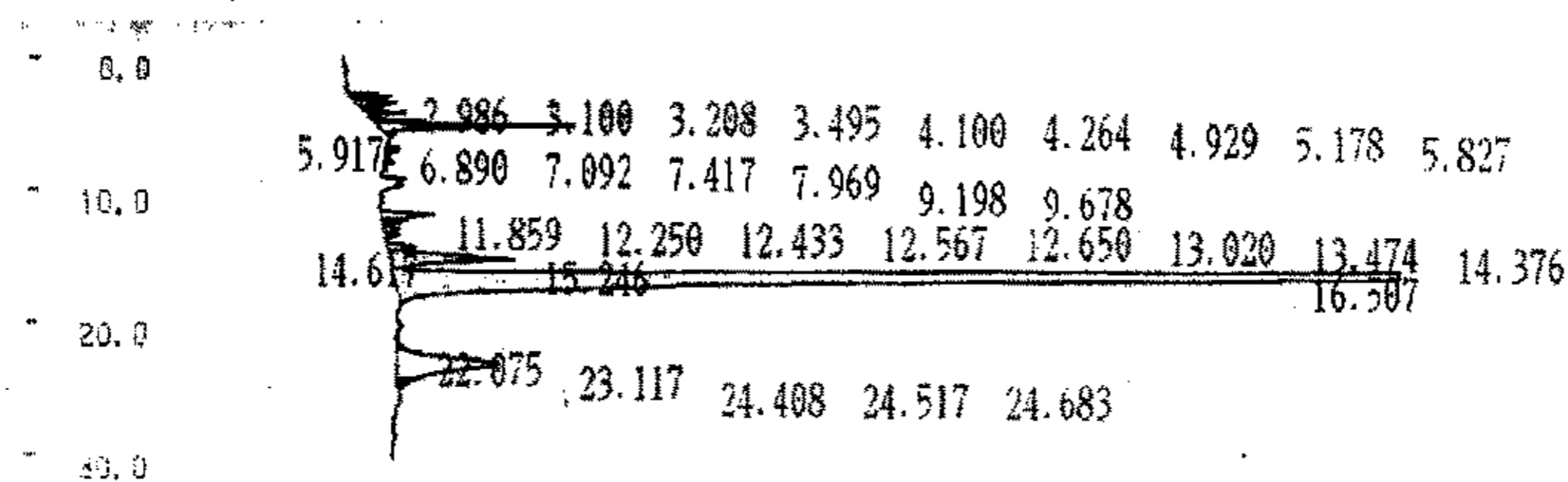


图 2 超声波辅助萃取得到薯蓣皂素的 HPLC 图

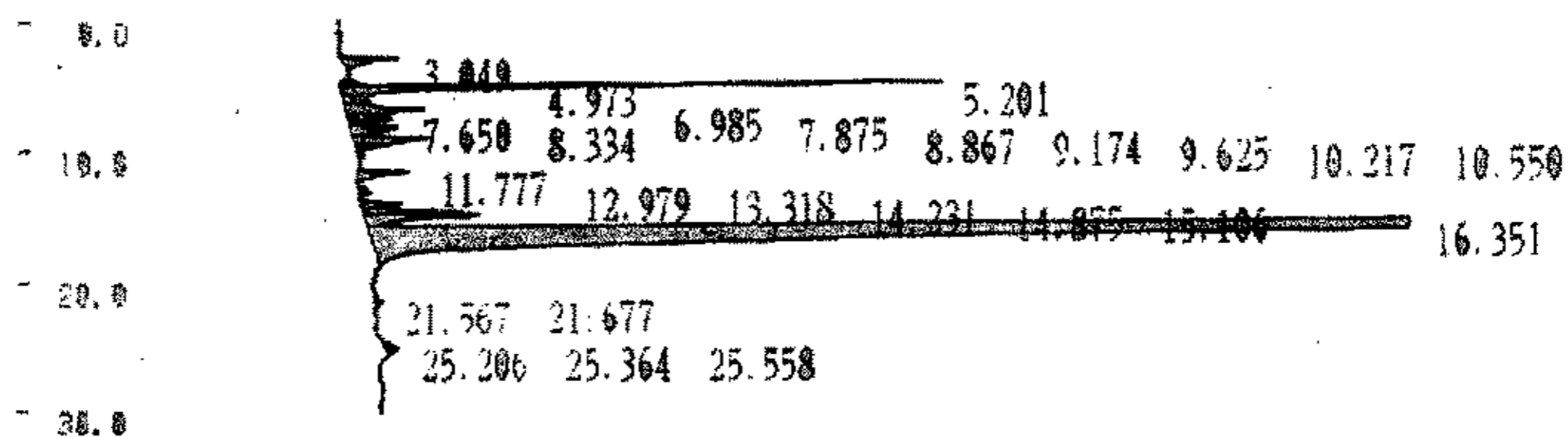


图 3 索氏萃取得到薯蓣皂素的 HPLC 图

已发表的文章

1. 严伟, 李淑芬, 田松江, 超声波协助提取技术, 化工进展, 2002, 21 (9): 649-651
2. Shufen Li, Wei Yan, Shaokun Tang, Extraction of Diosgenin with Supercritical CO₂, 1st International Symposium on Supercritical Fluid Technology for Energy and Environment Application, Suwon, Korea, Nov. 2002: 83-86

致谢

本论文是在李淑芬教授的亲切关怀和悉心指导下完成的。李老师渊博的学识，严谨的治学态度，诲人不倦的先辈风范及对科学前沿敏锐的洞察力，都给我留下了深刻的印象，使我终生受益，在此表示由衷的感谢。同时，在论文实验研究过程中，唐韶坤老师、田松江老师和李静同志都提出了许多宝贵意见，并对实验给予了大力支持和热情帮助，在此表示衷心的感谢。

感谢参与了部分实验的陈广辉同学和安道强同学的支持和帮助，及其他师弟、师妹们的帮助。向所有关心、支持本课题工作的老师、同学及给予实验帮助的单位和个人表示真诚的感谢。

向多年来一直支持和鼓励我的父母、家人及朋友以诚挚的谢意。

最后，感谢为本文承担评审、答辩和复审的全体老师。