

斛兵博士文丛

HUBING BOSHI WENCONG

合肥工业大学研究生科技创新基金资助出版

穿心莲内酯超临界 CO_2 萃取结晶研究

著 张文成 ○ 导师 潘 见

合肥工业大学出版社

合肥工业大学研究生科技创新基金资助出版

穿心莲内酯超临界 CO_2 萃取结晶研究

著 张文成 导师 潘 见

合肥工业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

穿心莲内酯超临界 CO₂ 萃取结晶研究/张文成著. —合肥:合肥工业大学出版社, 2008. 12

(斛兵博士文丛)

ISBN 978-7-81093-865-5

I. 穿… II. 张… III. 穿心莲—内酯—超临界流动—二氧化碳—萃取—结晶—研究 IV. R282.71

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 195307 号

穿心莲内酯超临界 CO₂ 萃取结晶研究

张文成 著 策划编辑 马国锋 责任编辑 吴毅明 孟宪余

出版	合肥工业大学出版社	版次	2008 年 12 月第 1 版
地址	合肥市屯溪路 193 号	印次	2008 年 12 月第 1 次印刷
邮编	230009	开本	710 毫米×1000 毫米 1/16
电话	总编室:0551—2903038	印张	9.5
	发行部:0551—2903198	字数	145 千字
网址	www.hfutpress.com.cn	印刷	合肥工业大学印刷厂
E-mail	press@hfutpress.com.cn	发行	全国新华书店

ISBN 978-7-81093-865-5

定价: 28.00 元

如果有影响阅读的印装质量问题,请与出版社发行部联系调换。

《斛兵博士文丛》出版委员会学术委员会

主任委员：徐枏巍

副主任委员：陈心昭 赵 韩

委 员（按姓氏笔画为序）：

史铁钧 刘全坤 陈心昭

张崇巍 杨伯源 费业泰

赵 韩 钟玉海 徐枏巍

出版编辑委员会

主任委员：吴玉程 马国锋

委 员：朱 红 王其东 高 隽

孟宪余 王 磊 李军鹏

黄 飞 权 怡

出版说明

为贯彻教育部《关于实施研究生教育创新计划 加强研究生创新能力培养 进一步提高培养质量的若干意见》（教研〔2005〕1号）文件精神，培养研究生创新意识、创新能力，提高研究生培养质量，合肥工业大学设立了研究生科技创新基金，以支持和资助研究生的教育创新活动，为创新人才的成长创造条件。学校领导高度重视研究生教育创新，出版的《斛兵博士文丛》就是创新基金资助的项目之一。

《斛兵博士文丛》入选的博士学位论文是合肥工业大学2007年度部分优秀的博士学位论文。为提高学位论文的出版质量，《斛兵博士文丛》以注重创新为出版原则，充分展示我校博士研究生在基础与应用研究方面的成绩。

《斛兵博士文丛》的出版，得到了校学位委员会、学术委员会和有关专家的大力支持，也得到了研究生导师和研究生的热情支持，我们谨此表示感谢，希望今后能继续得到他们的支持与帮助。

我们力求把这项工作做好，但由于学识水平有限，书中难免存在不足之处，敬请读者给予批评指正。

合肥工业大学研究生学位论文出版编辑委员会

2008年12月

总 序

当今世界科学技术突飞猛进，知识经济飞速发展，以经济和科技为基础的综合国力的竞争日趋激烈。而科技的竞争、经济的竞争乃至综合国力的竞争，归根结底是人才的竞争。面对新的形势、新的要求，党中央先后作出了实施“科教兴国”、“人才强国”战略和走自主创新道路，建设创新型国家的重大决策。胡锦涛同志在党的十七大报告中又提出，建设人力资源强国和创新型国家是我国全面夺取建设小康社会新胜利的两大新目标。高等学校是国家创新体系的重要组成部分，肩负着培养自主创新型人才的历史使命。研究生教育处于高等教育的最高层次，是国家培养高层次创新型人才的主要渠道。研究生，特别是博士研究生的科研工作，一般处于本学科的前沿，具有一定的创造性。为鼓励广大研究生，特别是博士研究生选择具有重大意义的科技前沿课题进行研究，进一步提高研究生的创新意识、创新精神、创新能力，激励、调动我校博士研究生及其指导教师进一步重视提高博士学位论文质量和争创优秀博士学位论文的主动性和积极性，展示我校博士研究生的学术水平，为他们的尽快成才搭建平台，学校经过精心策划，编辑出版了《斛兵博士文丛》。

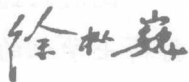
此次入选《斛兵博士文丛》的论著，均为2007年毕业并获得博士学位的博士研究生学位论文，是在广泛动员、严格把关的基础上，根据质量第一、公平公开、规范评审的原则认真遴选出来的。同时这些论著注重坚持基础研究与应用研究并举，是兼顾

理论价值与实践意义的最新研究成果。可以说，这套《斛兵博士文丛》（第二卷）虽然也可能有这样或那样的不足，但基本反映了我校博士研究生所具有的坚实的理论基础、系统的专门知识，以及较高的学术造诣和分析能力；体现了他们崇尚学术、追求真理、勇于创新的科学精神，实事求是、严谨认真的治学态度，不断进取、追求卓越的学术品格；展现了我校“勤奋、严谨、求实、创新”的校风学风。

建校 63 年来，学校充分发挥人才培养、科学研究和服务社会的功能，为国家和社会培养了一大批杰出人才，一代又一代的莘莘学子在这里勤奋耕耘、茁壮成长。出版《斛兵博士文丛》也是我校实施研究生教育创新工程、培养研究生创新精神、提高研究生创新能力的一个重要举措。合肥工业大学经过 63 年的建设和发展，逐步形成自身的办学特色，也取得许多令人瞩目的成就。我们正在不断改善办学条件，逐步完善相关政策，营造有利于高层次创新型人才尽快成长的良好环境，确保学校多出人才、快出人才、出好人才。

我衷心希望广大研究生特别是博士研究生，发扬我校优良的传统、校风、学风，在合肥工业大学自由宽松、开放和谐、充满生机和活力的学术环境中奋发努力、锐意进取、勇于创新，通过自己的辛勤劳动和刻苦钻研写出更好的论文，为进一步提高我校的学术水平、科研创新能力和综合实力作出更大的贡献，努力把学校建设成为国内先进、国际知名的创新型高水平大学。

合肥工业大学校长
教授、博士生导师



二〇〇八年十一月

致 谢

本文是在导师潘见教授的悉心指导和关怀下完成的。从论文的选题、实验方案的确定、实验过程到最后论文的撰写,每一环节都倾注了导师的大量心血。本人在攻读博士学位期间,导师的渊博知识、严谨的治学态度、求实创新的工作精神和宽阔的胸怀,对我产生了深刻的影响,使我在学术上和思想上都有了很大的进步,让我受益颇深。在此论文完成之际,谨向他致以崇高的敬意和衷心的感谢。

在论文撰写过程中,袁传勋研究员、谢慧明副教授、王国霞副教授、曾庆梅副教授等都给予了无私的关怀和帮助;在实验结果检测、数据整理过程中,中国科学技术大学陈克勋博士也提供了许多帮助和支持,使得我的毕业论文能够顺利完成,在此向他们致以诚挚的谢意。

在实验过程中,本实验室王武老师(在读博士)、胡学桥老师、陈群博士、雍技师弟、杨毅师弟、张庆勇师弟、何明海师弟等都给予了许多帮助,在此,向他们表示最诚挚的谢意。

此外,在实验过程中,得到了中国科学技术大学测试中心的多位老师的支持和帮助,在此,表示深深的谢意。

感谢合肥拓峰生物工程有限责任公司谢慧猛副总经理多年来在我学习、工作、生活等诸多方面的关心和照顾,以及合肥拓峰公司所提供的许多实验条件和对个人在社会舞台上锻炼的机会。

感谢国家自然科学基金项目(项目编号:29976008)资助。

感谢我的妻子宜霖及家人对我的理解与支持。

最后,向所有关心、支持和帮助过我的老师、同事、同学、朋友、师兄弟姐妹们表示感谢。

张文成

2005年3月于合肥

摘要

穿心莲内酯是一种重要的中药有效成分。其作为注射剂原料,有极高的纯度要求。为了高效分离穿心莲内酯,作者以穿心莲浸膏为实验原料,采用超临界流体萃取结晶法进行了穿心莲内酯的分离纯化研究。系统地分析了超临界流体萃取结晶机理,并对影响萃取结晶的因素进行了解析;研究了超临界 CO_2 ($\text{SC}-\text{CO}_2$) 萃取结晶工艺参数,如压力、温度、时间、流量、结晶器以及材质、板间距、结晶器的表面形态等对目标产物——穿心莲内酯的纯度、结晶率、形貌、结晶度、晶型、分子结构等的影响,并采用高效液相色谱、扫描电镜、X 射线粉末衍射、红外光谱法进行了实验结果分析;利用响应曲面法建立了相关工艺模型;考察了夹带剂强化、磁场强化和重复萃取结晶法对超临界 CO_2 萃取结晶穿心莲内酯的影响。

理论分析和实验研究结果表明:

(1) $\text{SC}-\text{CO}_2$ 萃取结晶法可有效分离浸膏中的穿心莲内酯,重复萃取结晶 3 次后,产品的纯度仍可达 98% 以上。

(2) $\text{SC}-\text{CO}_2$ 萃取结晶穿心莲内酯时,晶体在结晶板上依纯度呈梯度分布。

(3) 依表面吸附、晶核形成、晶体生长和梯度结晶四方面分析,超临界流体萃取结晶具有下列特征:

① 结晶器为超临界流体萃取结晶提供了一个表面吸附场,能降低结晶过程的界面活化能,从而形成吸附结晶,所以结晶器是影响萃取结晶的一个重要因素;

② 就晶核形成、晶体生长而言,温度、压力的变化影响着结晶成核的过饱和度和结晶成核的能垒,而外场,如磁场、电场等也能影响结晶成核的能垒;

③ 就梯度结晶而言,溶质中不同组分因物性及受结晶板表面作用效果的

不同,导致在结晶板上形成不同的迁移阻尼系数,从而产生梯度结晶分离。

(4)影响萃取结晶的三个主要外因:

①工艺条件,其中压力、温度影响超临界流体萃取结晶时具有两面性,即压力或温度在促进萃取的同时却抑制了结晶,或在促进结晶的同时却抑制了萃取;

②结晶器,其表面形态、材质、板间距的变化,不同程度上都能影响萃取结晶效果;

③外场,如磁场、电场对萃取结晶能产生正相或负相作用。

(5)在萃取结晶温度 55℃、时间 90min、CO₂ 流量 15L/min、压力小于等于 25MPa 条件下,结晶板上部穿心莲内酯的纯度,随着压力的升高而增加;结晶板上部穿心莲内酯的结晶率在低于 15MPa(原料纯度 90%)时呈增加趋势,而超过 15MPa 后呈下降趋势;晶体颗粒度随压力的升高而变细小、无规则;XRD 分析结果表明:穿心莲内酯的结晶度随着压力的增加而提高,压力大于等于 25MPa 时,穿心莲内酯大部分进入分离釜,晶体的溶解性强于吸附结晶作用,因而萃取作用显著;IR 分析结果表明:萃取结晶压力的变化不会改变穿心莲内酯晶体的分子结构。

(6)在萃取结晶压力为 16MPa、时间 90min、CO₂ 流量 15L/min 条件下,萃取结晶温度在 35℃~65℃范围内变化,当温度达到 55℃时,萃取结晶穿心莲内酯的纯度最高,且适当提高温度有利于缩短萃取结晶时间、改善晶体的颗粒度和均匀性;XRD 分析结果表明:随着温度的升高,所得晶体的结晶度有所增加;IR 分析结果表明:超临界 CO₂ 萃取结晶温度的变化不会改变穿心莲内酯晶体的分子结构。

(7)在萃取结晶压力为 16MPa、温度 55℃、CO₂ 流量 15L/min 条件下,延长结晶时间,有利于提高穿心莲内酯的纯度和改良晶体形貌。但过度延长时间将降低工作效率,一般选择时间约为 90min。

(8)在萃取结晶压力 16MPa、温度 55℃、时间 90min 条件下,适当增加 CO₂ 流量,有利于穿心莲内酯结晶,更有利于缩短萃取结晶时间。但流量超过一定值后,穿心莲内酯纯度却与流量呈负相关性。

(9)用响应曲面法(RSM)进行了超临界 CO₂ 萃取结晶穿心莲内酯工艺模型的选择和验证。根据该模型进行了工艺参数的优选,以结晶率与纯度

为指标,实验所得穿心莲内酯超临界 CO_2 萃取结晶优化工艺条件为:压力 15~20MPa、温度 50°C ~ 60°C 、时间 60~90min。

(10)优选不锈钢材质的结晶板,可获较优萃取结晶率和产品纯度;随着结晶器高径比的增大,结晶率增加,而纯度的增长率不大,所以结晶器高径比一般选择为 6:1~8:1;随着结晶板间隙的变小,萃取结晶率先增后降,穿心莲内酯纯度变化率却不明显,所以较优的结晶板间隙为 0.4~0.6cm;结晶板由下至上,穿心莲内酯晶体颗粒越来越规则,颗粒度也有所增加。

(11)夹带剂、磁场、重复萃取结晶均可增强超临界 CO_2 萃取结晶效果:

①乙醇、丙酮、异丙醇、乙酸乙酯四种夹带剂中,乙酸乙酯分离纯化效果最好,且也能与前处理工序中选择的浸提溶剂相统一,减少采用多种溶剂存在的污染。

②磁场强化法对超临界 CO_2 萃取结晶穿心莲内酯具有促进作用;在萃取结晶温度为 55°C 、时间 60min、 CO_2 流量 15L/min、磁场强度 0.1T 条件下,压力在 8~16MPa 范围内变化时,相比无磁场作用,结晶率提高了 5% 左右。

③重复萃取结晶法既能提高穿心莲内酯的纯度,也能改善超临界 CO_2 萃取结晶条件,特别是降低压力、缩短工作时间,且重复萃取结晶法得到的产品呈絮状团聚,颗粒度更细小,有利提高穿心莲内酯的溶解性能,可改良药用产品的生物利用度。

(12)选择首次萃取结晶压力为 16MPa、温度 55°C 、时间 90min、 CO_2 流量 15 L/min,而重复萃取结晶压力为 14MPa、温度 55°C 、时间 60min、 CO_2 流量 15 L/min 条件下再萃取结晶 2 次后能获得 98% 高纯穿心莲内酯的产品,其元素分析、UV 分析结果与参考文献所报道或标准对照品基本一致,而 IR 图谱也与标准对照品完全一致。

显然,超临界 CO_2 萃取结晶技术可高效分离纯化穿心莲内酯等天然产物有效成分,能得到更高纯度、更优质量的“绿色”产品,这为开发新型高档医药、食品、保健品原料提供了一条新途径。

关键词:穿心莲内酯;超临界流体; CO_2 萃取结晶;机理;梯度结晶;模型;工艺优化;工艺条件;结晶器;强化措施

ABSTRACT

Andrographolide is an important active ingredient from Chinese herb-*Andrographis paniculate* (Burm) Nees, which is required very high quality, especially purity, to develop new-type injection. In order to separate and purify andrographolide with high efficiency, the author chooses extraction of *Andrographis paniculate* (Burm) Nees as experimental material, investigating the mechanism of supercritical fluid extraction and crystallization, analyzing the influencing factors; With HPLC (High performance liquid chromatography), SEM (Scanning electron microscope), XRD (X-ray diffraction), IR (Infrary), et al., analyzing and studying the effect of extraction and crystallization pressure, temperature, time, CO₂ flux and the structure of crystallization ware on purity, crystallization ratio, crystal morphology, crystallization degree, molecule structure of andrographolide, and so on; also optimizing the correlative processing technology with Response Surface Methodology (RSM); Investigating the means of enhancing supercritical fluid extraction and crystallization, such as entrainer, magnetic field, recrystallization.

All theoretic analysis and experimental results are as follows:

(1) The technology of supercritical CO₂ extraction and crystallization can separate and purify andrographolide from extraction of *Andrographis paniculate* (Burm) Nees; the purity of the product is more than 98% after three times of extraction and crystallization.

(2) Andrographolide formed by supercritical CO₂ extraction and crystallization is distributed on the crystal board in purity grades.

(3) According to the speciality of supercritical fluid extraction and crystallization, we analyze the principle of extraction and crystallization from surface adsorption, crystal nucleus formation, crystal growth and gradient crystallization: a. crystallization ware comes into a surface adsorbing field for extraction and crystallization, which can debase interface activation energy, inducing adsorption crystallization, so crystallization ware is one of the main factors that influence extraction and crystallization; b. As crystal nucleus is forming and crystal is growing, temperature and pressure can influence supersaturation and energy bulkwark of crystal nucleus formation, and those outside fields, such as magnetic field, electric field, can also influence energy bulkwark of crystal nucleus formation; c. as gradient crystallization goes, different matter quality from components in solution and different effects between component and crystallization board surface can form different damping to moving coefficient, resulting in gradient crystallization and separation.

(4) According to the principle analysis of extraction and crystallization, author finds three main external factors which can influence extraction and crystallization: a. technological conditions, thereinto pressure and temperature can influence extraction and crystallization with positive and negative function; b. the structure of crystallization ware including material, distance between crystallization board and surface shape can also influence extraction and crystallization; c. outer fields, such as magnetic field, electric field, can influence extraction and crystallization with positive and negative function, too.

(5) When temperature is 55℃, time 90min, CO₂ flux 15L/min, and the pressure is less than 25MPa, the higher the pressure, the higher the purity of on the upside of crystallization board with supercritical CO₂ extraction and crystallization; with the increase of pressure, comparative crystallization mass on the upside firstly increase, when pressure is more than 15MPa (material purity 90%), crystallization mass then decrease;

with the increase of pressure, the particle size is smaller and smaller and more and more ruleless; according to XRD analysis, with the increase of pressure, the diffraction peak of impurity is decreasing, while the intensity of diffraction peak from andrographolide increasing, that is, the crystallization degree is improved with the increase of pressure. According to IR analysis, molecule structure of andrographolide is not changed with the increase of pressure. When the pressure is higher than 25MPa, the extraction of andrographolide is in predominance, which can weaken crystallization function, thus many andrographolide is found in separation container.

(6) We select the technological conditions that pressure is 16MPa, time 90min, CO₂ flux 15L/min, and temperature changes between 35°C and 65°C. When temperature is 55°C, the purity of andrographolide is the highest, what's more, the moderate increase of temperature is advantageous to improve the particle size and the homogenization of crystal as well as shorten the time of crystallization; but over-high temperature can decrease the purity of andrographolide. According to XRD analysis, the crystallization degree is improved with the increase of pressure; according to IR analysis, molecule structure of andrographolide is not changed with the increase of temperature.

(7) When pressure is 16MPa, temperature 55°C, CO₂ flux 15L/min, the increase of time is advantageous to improve the purity of andrographolide and crystal morphology. But too long time would depress the efficiency, so we select time 90min as extraction and crystallization condition.

(8) When pressure is 16MPa, temperature 55°C, time 90min, the increase of CO₂ flux will help andrographolide crystallization to some extent, it also will shorten time of extraction and crystallization; While the CO₂ flux exceeds a certain value, the purity of andrographolide could be reduced.

(9) For the first time, the model of technology of supercritical CO₂ extraction and crystallization is built with Response Surface Methodology, which is advantageous to select technological parameters, such as pressure of 15-20MPa, temperature of 50℃-60℃, time of 60-90min, the quality of andrographolide is better, the purity and the crystallization ratio of andrographolide is higher.

(10) The board made of stainless steel is preferentially selected from plain glass, ground glass and stainless steel as crystallization board, the crystallization ratio and the purity of andrographolide is the best; moreover, the crystallization ratio is increased with the increase of the ratio of height to diameter, while the purity change indistinctively, especially when the pressure exceed 20MPa, so we set the ratio of height to diameter from 6 : 1 to 8 : 1; Increasing the width between crystallization boards, the crystallization ratio of andrographolide is firstly increased, then decreased, the purity also change indistinctively, the moderate width between boards varies from 0.4 to 0.6cm; From the downside of the crystallization board to the upside, the morphology of crystal particulate becomes more and more regular, the diameter of particulate is bigger and bigger.

(11) Entrain, magnetic field, recrystallization can all enhance the effect of extraction and crystallization of andrographolide; a. selecting ethyl acetate as entrainer from ethanol, acetone, petrohol, ethyl acetate, this effect of separation and purification of andrographolide is best, moreover, realizing the unification of extraction solvent and entrainer, and can eliminate the pollution between solvents; b. magnetic field enhancing can improve supercritical CO₂ extraction and crystallization. On condition that temperature is 55℃, time 60min, CO₂ flux 15L/min, magnetic field intensity 0.1T, when pressure changes is from 8MPa to 16MPa, crystallization ratio of andrographolide is increased about 5% to without magnetic field; c. recrystallization not only improve the purity of andrographolide, also improve the crystallization technology parameters,

especially debasing pressure; the crystal particle by recrystallization is reunited in floccule, which is advantageous to improve the solubility of the crystal particulate.

(12) When pressure is 16MPa, temperature 55°C, time 90min, CO₂ flux 15 L/min in first extraction and crystallization, and recrystallization pressure is 14MPa, temperature 55°C, time 60min, CO₂ flux 15 L/min, after three times of extraction and crystallization, we can obtain 98% andrographolide; According to analysis, we find that the results of Element and UV (Ultraviolet) are basically consistent with document reports and standard sample, and the result of IR is wholly consistent with standard sample.

To sum up, we can use the technology of supercritical CO₂ extraction and crystallization to separate and purify andrographolide and some other active ingredients from natural materials, and can obtain "green" and safe products with high quality, which is advantageous to be used to develop high grade medicine, food and healthy food.

Key words: Andrographolide; Supercritical fluid; CO₂ extraction and crystallization; Principle; Gradient crystallization; Model; Optimization; Technology condition; Crystallization ware; Intensifying measure

符号表

G	吉布斯自由能
σ	表面张力
E	能量
μ_i	偶极距
a	极化度
P	超临界流体的压力
T	温度
t	时间
h	普郎克常数
ν_0	电子的振动频率
c	溶液的浓度
ρ	密度
s	过饱和度
J_N	单位时间单位体积形成晶核的数量
u_0	流速
γ	比表面能
C_f	迁移系数
C_s	迁移阻尼系数
q	固体表面结构因子
ϵ_f	固体表面粗糙度
μ	流体粘度
δ	厚度
Box—Behnken	响应曲面法中的一种模式