

克感利咽口服液中挥发油的超临界萃取工艺研究

丁金龙, 施少斌, 秦春梅, 冯冲, 沈健民
(广州王老吉药业股份有限公司, 广东 广州 510450)

摘要:目的 研究克感利咽口服液处方 4 味药材超临界萃取的最佳方法。方法 分别以萃取率、薄荷醇萃取量作为指标, 通过正交试验、气相色谱测定、SAS 统计分析, 研究超临界萃取工艺。结果 试验工艺水平范围内, 温度和时间对萃取率和薄荷醇萃取量都有显著影响, 压力对萃取率和薄荷醇萃取量都无显著影响; 影响萃取的超临界萃取较优工艺为温度 55 ℃, 时间 150 min, 压力 27 MPa; 影响薄荷醇萃取量的超临界萃取较优工艺为温度 45 ℃, 时间 150 min, 压力 22 MPa。结论 克感利咽口服液原料超临界萃取是可行的。

关键词:克感利咽口服液; 超临界萃取; 正交设计; SAS 统计

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)09-1325-04

Supercritical extraction technique for essential oils in Keganliyan Oral Liquor

DING Jin-long, SHI Shao-bin, QIN Chun-mei, FENG Chong, XIAN Jian-min
(Guangzhou Wanglaoji Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou 510450, China)

Abstract: Objective To optimize supercritical extraction technique from four medicinal materials, which are the part components in the recipe of Keganliyan Oral Liquor and are extracted traditionally for essential oils. **Methods** Extraction ratio and menthol extraction quantity were taken as evaluated indexes. Supercritical extraction technique was researched with orthogonal tests, gas chromatography, and SAS statistic. **Results** Within the test levels, temperature and time showed evident effect on extraction ratio and menthol extraction quantity, while pressure did not show any evident effect on them. The preferable technique to extraction ratio is temperature at 55 ℃, time for 120 min, and extracted pressure at 27 MPa; and the preferable technique to menthol extraction quantity is temperature at 45 ℃, time for 120 min, and extracted pressure at 22 MPa. **Conclusion** The optimized supercritical extraction technique for Keganliyan Oral Liquor is feasible.

Key words: Keganliyan Oral Liquor; supercritical extraction; orthogonal design; SAS statistic

克感利咽口服液是广州王老吉药业股份有限公司(原广州羊城药业股份有限公司)和中国中医研究院广安门医院合作研制的中药三类新药, 具有疏风清热、解毒利咽之功效^[1], 1999 年正式投产上市, 2004 年成为国家中药保护品种。克感利咽口服液传统提取工艺包括挥发油的提取、黄芩的乙醇提取和其他药材的水提取。其中, 挥发油的提取是对处方中金银花、荆芥、薄荷、防风综合进行水蒸气蒸馏, 提取分离出挥发油, 从而作为克感利咽口服液配方的一种组成, 不过挥发油提取率较低。超临界萃取技术是当今方兴未艾的一门新技术, 由于其可低温萃取且萃取时间短、产品纯度高、污染少等原因, 因而近些年来其在中药有效成分的提取、分离等方面格外引人注目。为此, 本实验拟对克感利咽口服液的传统的

挥发油蒸馏提取工艺进行改革, 改用超临界萃取工艺, 并研究了压力、温度、时间等超临界萃取工艺参数对药材萃取率、指标成分薄荷醇萃取量的影响, 并通过 SAS 统计分析对超临界萃取工艺进行优化。

1 仪器与试剂

5 L—SFE 超临界 CO₂ 萃取装置(广州市轻工研究所); VARIAN—3900 气相色谱仪(美国 Varian 公司); 20B 型粉碎机(广州市德章机械设备有限公司); Bp211—D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

金银花(河南登封)、荆芥(河北承德)、薄荷(江苏太仓)、防风(黑龙江泰康)经本公司质量管理部药材组陈志伟鉴定分别为金银花 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾、荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥梗、薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的

收稿日期: 2005-11-20

基金项目: 广东省关键领域重点突破项目(2003A30907)

作者简介: 丁金龙(1976—), 男, 江苏淮安人, 广州医药集团有限公司博士后, 主要从事中药学研究, 已发表学术论文 10 多篇。

Tel: (020) 86200716 E-mail: along31@tom.com

干燥茎叶,防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根;薄荷醇(中国药品生物制品检定所,批号:728-200005);氮气、氢气和空气为色谱纯(广州气体厂有限公司);甲醇(分析纯);醋酸乙酯(分析纯)。

2 方法与结果

2.1 薄荷醇的 GC 法测定^[2~4]

2.1.1 色谱条件:色谱柱:美国 Phenomenex 公司 ZB-WAX 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);固定液:聚乙二醇,涂布浓度为 100%;柱流量:1.0 mL/min;载气:N₂ 25 mL/min;H₂ 30 mL/min,空气 300 mL/min, FID 检测器;检测器温度为 250 ℃;进样口温度 210 ℃,进样量 2 μL,分流进样,分流比为 20:1,柱温程序升温 50~235 ℃,初始温度保持 2 min 后,60 ℃/min 升至 120 ℃后保持 5 min,10 ℃/min 升至 150 ℃后,再 60 ℃/min 升至 235 ℃后保持 10 min。每样重复 3 次测定。

2.1.2 标准曲线的制备:精密称取薄荷醇对照品 20.50 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成 0.41 mg/mL 的对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 1、2、4、6、8、10 μL,置 10 mL 量瓶中,加醋酸乙酯至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,分别取续滤液 2 μL,注入气相色谱仪中,测定峰面积。以质量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线图,计算回归方程为 $Y = 537\ 297 X - 4\ 423.2$, $r = 0.999\ 6$,表明薄荷醇在 0.041~0.41 μg/μL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.3 供试品溶液的制备及测定:分别取克感利咽超临界萃取正交试验样品,搅匀,取约 1 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加醋酸乙酯至刻度,摇匀;精密吸取 1 mL,置 5 mL 量瓶中,加醋酸乙酯至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 2 μL,注入气相色谱仪中,测定峰面积。根据标准曲线及稀释度计算薄荷醇的质量分数。每样重复 3 次测定。

2.2 萃取率和薄荷醇萃取量的计算:萃取率=萃取物质量/药材质量×100%。薄荷醇萃取量(mg/g)为每克药材中萃取得薄荷醇量。根据气相色谱分析结果,计算出每克萃取物中薄荷醇的质量,再结合相应的萃取率,即可计算出每次实验的薄荷醇萃取量。

2.3 试验结果的统计分析:采用统计分析软件 SAS 进行统计分析。

2.4 超临界萃取与测定:将金银花、荆芥、薄荷、防风药材粉碎至约 40 目。经预试验,实验按 3 因素 3

水平正交试验设计,其中萃取压力分别为 17、22、27 MPa,萃取温度分别为 35、45、55 ℃,萃取时间分别为 90、120、150 min。金银花、荆芥、薄荷和防风按质量比 72:72:43:43 混合均匀,进行超临界萃取。将混匀药粉填满萃取罐,称量罐中物料质量,然后进行萃取。解析时保持解析压力 5 MPa,解析温度 50 ℃。每隔 30 min 收集一次萃取物,并称量萃取物质量。计算萃取率和薄荷醇萃取量。每个试验重复 3 次。实验结果见表 1。

表 1 超临界萃取正交试验结果

Table 1 Orthogonal tests results of supercritical extraction

试验号	压力/ MPa	温度/ ℃	时间/ min	萃取率/ %	薄荷醇萃取 量/(mg·g ⁻¹)
1	17	35	90	1.82±0.11	0.413±0.008
2	17	45	120	1.89±0.09	0.520±0.028
3	17	55	150	2.23±0.11	0.499±0.015
4	22	35	120	1.95±0.11	0.447±0.041
5	22	45	150	2.03±0.04	0.587±0.003
6	22	55	90	1.90±0.06	0.461±0.020
7	27	35	150	1.89±0.01	0.433±0.024
8	27	45	90	1.78±0.07	0.475±0.018
9	27	55	120	2.40±0.06	0.490±0.009

2.5 超临界萃取工艺对萃取率和薄荷醇萃取量的影响

2.5.1 Duncan 分析:经 SAS 统计软件 Duncan 分析,不同因素对萃取率的影响见表 2。可见,在实验水平范围内,随着萃取压力的增大,萃取率呈现出逐渐提高的趋势,但不同的压力水平对萃取率的影响并没有显著的差异;在实验水平范围内,随着萃取温度的升高,萃取率呈现出逐渐提高的趋势,但 35 ℃与 45 ℃之间萃取率提高水平并不显著,而 55 ℃时萃取率则有显著的提高;随着萃取时间的延长,萃取率也呈现出逐渐提高的趋势,萃取 120 min 与萃取 90 min 相比,萃取率显著提高,但 120 min 后,萃取时间的延长对萃取率的提高并无显著影响。

经 SAS 统计软件 Duncan 分析,不同因素对薄

表 2 不同因素对萃取率的影响

Table 2 Effects of different factors on extraction ratio

影响因素	萃取率/%	Duncan	grouping
压力/MPa	27	2.02	A
	22	1.96	A
	17	1.95	A
温度/℃	55	2.14	A
	45	1.91	B
	35	1.88	B
时间/min	150	2.05	A
	120	2.04	A
	90	1.84	B

荷醇萃取量的影响见表 3。可见,在实验水平范围内,随着萃取压力的增大,薄荷醇萃取量先呈现出逐渐提高的趋势,到一定程度后又呈现出下降趋势,但不同的压力水平对薄荷醇萃取量的影响并没有显著的差异;在实验水平范围内,随着萃取温度的升高,薄荷醇萃取量先呈现出逐渐提高的趋势,到一定程度后又呈现出下降趋势,但不同的萃取温度水平对薄荷醇萃取量的影响具有一定的差异,其中,35℃与 55℃、45℃与 55℃之间对薄荷醇萃取量的影响并无显著差异,但 35℃与 45℃之间对薄荷醇萃取量的影响有显著差异;随着萃取时间的延长,薄荷醇萃取量呈现出逐渐提高的趋势;但不同的萃取时间水平对薄荷醇萃取量的影响具有一定的差异,其中,萃取 120 min 与萃取 90 min 相比,薄荷醇萃取量显著提高,但 120 min 后,萃取时间的延长对薄荷醇萃取量的提高并无显著影响。

表 3 不同因素对薄荷醇萃取量的影响

Table 3 Effects of different factors on menthol extraction quantity

影响因素	薄荷醇萃取量/(mg·g ⁻¹)	Duncan	grouping
压力/MPa	22	0.509	A
	17	0.471	A
	27	0.461	A
温度/℃	45	0.525	A
	55	0.479	B
	35	0.444	B
时间/min	150	0.510	A
	120	0.495	A
	90	0.440	B

2.5.2 回归分析:在考虑交互作用的基础上采用 SAS 统计软件进行萃取率的多元回归分析,结果见表 4。其中 x_1 代表压力, x_2 代表温度, x_3 代表时间, * 代表交互作用, Model 为回归模型。在压力、温度、时间 3 个因素中,压力对萃取率影响不显著,温度和温度对萃取率影响显著。该结果与前述不同因素对萃取率的影响效果相一致。同时,压力与温度之间存在着交互作用,而且对萃取率影响显著;而压力与时间、温度与时间之间对萃取率的影响则不存在交互作用。

在考虑交互作用的基础上采用 SAS 统计软件进行薄荷醇萃取量的多元回归分析,结果见表 5。在压力、温度、时间 3 个因素中,压力对薄荷醇萃取量的影响最不显著,温度对薄荷醇萃取量影响最显著。同时,压力与温度之间存在着一定的交互作用,但对薄荷醇萃取量的影响并不显著;而压力与时间、温度与时间之间对薄荷醇萃取量的影响则不存在交互作用。

表 4 萃取率的多元回归分析

Table 4 Multivariate regression analysis for extraction ratio

方差来源	离均差平方和	方差	F 值	Pr>F
x_1	0.020 398 39	0.010 199 20	0.55	0.591 3
x_2	0.271 228 07	0.135 614 04	7.26	0.006 9
x_3	0.283 194 45	0.141 597 23	7.58	0.005 9
$x_1 * x_2$	0.144 108 59	0.072 054 29	3.86	0.046 4
$x_1 * x_3$	0.000 000 00			
$x_2 * x_3$	0.000 000 00			
Model			4.81	0.005 2

表 5 薄荷醇萃取量的多元回归分析

Table 5 Multivariate regression analysis for menthol extraction quantity

方差来源	离均差平方和	方差	F 值	Pr>F
x_1	0.010 239 10	0.010 199 20	2.20	0.139 5
x_2	0.034 665 31	0.135 614 04	7.46	0.004 4
x_3	0.016 013 19	0.141 597 23	3.44	0.054 1
$x_1 * x_2$	0.003 309 05	0.072 054 29	0.71	0.504 1
$x_1 * x_3$	0.000 000 00			
$x_2 * x_3$	0.000 000 00			
Model			3.45	0.013 8

2.6 超临界萃取工艺的优化及验证:若单纯从萃取率的角度考虑,在实验水平范围内,超临界萃取最优工艺为温度 55℃,时间 120 min,压力 27 MPa。若单纯从薄荷醇萃取量的角度考虑,在实验水平范围内,超临界萃取最优工艺为温度 45℃,时间 120 min,压力 22 MPa。若从挥发油的角度考虑,则不能仅仅看重超临界萃取率的高低,更应注重挥发油指标性成分萃取率的高低,同时考虑到实际生产的效率和经济效益,因而在本实验研究条件下,确定超临界萃取的较优工艺为温度 45℃,时间 120 min,压力 22 MPa。

根据优化工艺,在萃取压力 22 MPa、萃取温度 45℃、萃取时间 120 min 条件下,保持解析压力 5 MPa,解析温度 50℃,每隔 30 min 收集一次萃取物,进行超临界萃取,实验重复 3 次,结果萃取率为 2.01%,薄荷醇萃取量为 0.578%,该结果与前述正交试验结果基本一致。

3 讨论

超临界萃取技术在中医药方面已得到了日益广泛的应用,但迄今大量的研发工作几乎都集中在单味药物的提取方面,而中药复方由于其成分多而复杂,且各成分之间可能存在协同或拮抗作用,药理作用复杂。因此利用超临界萃取技术研究复方难度较大,目前国内外的研究报道也很少^[5]。但可以预计这

种技术将为中药应用开辟出更为广阔的新领域。

影响中药材超临界萃取的因素有很多,包括超临界流体的流量、夹带剂、物料粒度以及萃取过程的萃取参数如压力、温度、时间和解析压力、温度等^[6]。本实验由于实验条件的限制,仅研究了萃取压力、萃取温度及萃取时间对克感利咽口服液处方药材超临界萃取效果的影响,未能进行更系统的研究。

超临界萃取是否可以替代传统的水蒸气蒸馏挥发油的提取,其实还有很多的工作要做,包括传统挥发油与超临界萃取物的化学组成的异同,提取产物应用方法上的异同,特别是两者间在药效学方面的异同。关于这些方面的研究工作,部分正在进行之中,部分工作已经完成,研究结果将另文阐述。

致谢:超临界萃取实验得到广州中医药大学新药中心苏子仁老师、李耿同学和广东药学院梁润芳

同学的大力帮助。

References:

- [1] Chen S Z, Yang Y J, Gu L Z, et al. Study on the antioxidant of Keganliyan Oral Liquor by ESR [J]. *China J Tradit Chin Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2002, 9 (6): 329-330.
- [2] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [3] Wang C G, Wang C L. Mensuration of menthol in *Oleum Menthae Dementiolatum* by gas chromatography [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (11): 1252-1253.
- [4] Nozal M J, Bernal J J. Extraction of thymol, eucalyptol, menthol, and camphor residues from honey and beeswax, determination by gas chromatography with flame ionization [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 954 (1-2): 207.
- [5] Wang C Z, Shi R, Wu Z H, et al. Applications of supercritical fluid extraction on the study of Chinese traditional medicine [J]. *Res Inf Tradit Chin Med* (中药研究与信息), 2005, 7 (2): 20-23.
- [6] Xiao X L, Gan H T, Qie D L. Extraction of active constituents from Chinese traditional medicine by supercritical CO₂ [J]. *Chem Ind Eng Prog* (化工进展), 2001 (5): 7-9.

人参皂苷 Rg₃ 与羟丙基-β-环糊精包合作用的研究

林东海¹, 侯茂奇¹, 陈继永², 李金明², 刘珂¹

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2. 山东省天然药物工程技术研究中心, 山东 烟台 264003)

摘要:目的 研究人参皂苷 Rg₃ 与羟丙基-β-环糊精 (HP-β-CD) 在水溶液中的包合作用、包合比及包合过程中的热力学参数变化。方法 采用相溶解度法、薄层色谱法、红外光谱法、核磁共振法测定人参皂苷 Rg₃ 与 HP-β-CD 在水溶液中包合作用、包合比及包合过程中热力学参数变化。结果 在水溶液中人参皂苷 Rg₃ 与 HP-β-CD 均可形成 1:1 摩尔比可溶性包合物; 人参皂苷 Rg₃ 的苷元部分可能嵌入 HP-β-CD 分子的疏水性空穴中, 两个葡萄糖裸露在环糊精腔外。对包合物进行了鉴定和确证, 表明人参皂苷 Rg₃ 与羟丙基-β-环糊精已经形成包合物。人参皂苷 Rg₃ 与 HP-β-CD 在水溶液中的包合过程可自发进行 ($\Delta G < 0$), 且为放热反应 ($\Delta H < 0$), 同时也是熵减过程 ($\Delta S < 0$)。结论 人参皂苷 Rg₃ 与 HP-β-CD 在水溶液中可自发形成 1:1 摩尔比可溶性包合物, 从而增加溶解度。选择适宜的包合温度将有利于包合作用的进行。

关键词: 人参皂苷 Rg₃; 羟丙基-β-环糊精; 溶解度; 包合比; 热力学参数

中图分类号: R283.6; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)09-1328-04

Inclusion of ginsenoside Rg₃ with hydroxypropyl-β-cyclodextrin

LIN Dong-hai¹, HOU Mao-qi¹, CHEN Ji-yong², LI Jin-ming², LIU Ke¹

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Shandong Engineering and Technology Research Center for Natural Drugs, Yantai 264003, China)

Abstract: Objective To investigate the inclusion of ginsenoside Rg₃ with hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) in aqueous solutions, inclusion molar ratio of host and guest molecules, and change of thermodynamic parameters during the inclusion process. **Methods** The measurements of the inclusion mechanism, inclusion molar of the host and guest molecules, and change of thermodynamic parameters were carried out by the following methods: phase solubility, IR, NMR, and TLC methods, respectively. **Results** The results indicated that the inclusion compound of ginsenoside Rg₃-HP-β-CD was formed. The content analysis of the inclusion compound showed that the inclusion ratio of ginsenoside Rg₃-