

冬凌草中冬凌草甲素的超临界 CO₂ 萃取工艺研究

陈莹, 吕惠生, 张敏华*

(天津大学石油化工技术开发中心 绿色化学合成与转化教育部重点实验室, 天津 300072)

摘要:目的 采用超临界萃取技术从冬凌草中萃取冬凌草甲素。方法 以冬凌草甲素的提取率为指标, 通过正交试验考察萃取工艺条件, 得到冬凌草甲素的超临界 CO₂ 适宜的萃取工艺条件, 采用 HPLC 法对萃取物进行定量分析。结果 冬凌草甲素的超临界 CO₂ 适宜的萃取工艺条件为: 压力 35 MPa, 温度 328.15 K, 夹带剂流量 4 mL/min, CO₂ 流量 25 g/min, 各影响因素对萃取收率的影响程度: 夹带剂流量 > 压力 > 温度 > CO₂ 流量。冬凌草甲素的提取率为 0.402%, 优于文献中报道的 0.39% 的提取率。结论 采用超临界萃取技术从冬凌草中萃取冬凌草甲素实用可行。

关键词: 冬凌草; 冬凌草甲素; 超临界 CO₂ 萃取

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)02-0232-03

冬凌草甲素是冬凌草中二萜类成分的主要有效成分, 具有清热解毒、消炎止痛、健胃活血及抗肿瘤等药理作用^[1,2]。冬凌草甲素的传统制备工艺是以冬凌草为原料, 采用有机溶剂进行提取, 然后采用色谱分离、重结晶等方法进行分离和精制。该法需要大量使用乙醚、丙酮、氯仿等有机溶剂, 产品生产成本较高, 对环境影响较大, 且流程冗长, 操作费时麻烦。超临界流体萃取技术是兴起于 20 世纪 60 年代的一种新型的提取分离技术。超临界流体密度接近于液体, 而黏度和扩散系数接近于气体, 因此利用这一特性, 通过调节系统的操作压力和温度, 选择性的萃取出所需要的物质。CO₂ 以其独有的优势成为首选的超临界萃取剂, 该溶剂安全、无毒, 萃取产品中不存在溶剂残留问题, 超临界 CO₂ 萃取过程中易挥发组分或生理活性物质极少损失或破坏, 特别适于天然活性物质成分的萃取分离^[3,4]。因此本实验采用超临界萃取技术从冬凌草中萃取冬凌草甲素。

1 仪器与材料

SFE-2000 型超临界流体萃取装置(美国 Thar 公司); Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

干燥冬凌草全草, 产地河南省济源市, 冬凌草甲素质量分数为 0.465%; 冬凌草甲素对照品, 自制, 质量分数 ≥98%; 二氧化碳, 质量分数为 99.9%, 天津市六方气体厂; 测定用甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 超临界萃取流程: 将干燥的冬凌草粉碎过筛,

筛分为 40 目以下、40~80 目以及 80 目以上粒度的样品, 存放待用; 将粉碎过筛后的冬凌草放入萃取器中, 开启实验装置控制系统, 输入萃取压力、萃取温度、CO₂ 流量和夹带剂流量等实验操作值; CO₂ 冷却水浴温度达到设定值后, 启动自动背压阀, 开启 CO₂ 钢瓶, 启动 CO₂ 进料泵, 夹带剂进料泵, 开始反应; 反应完成后, 依次关闭各泵, 系统降温泄压; 而后从旋风分离器中放出萃取物至取样瓶中, 称量, 采用 HPLC 法分析检测其中冬凌草甲素的质量分数。

2.2 冬凌草甲素的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱分析条件: ZorBax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以水-甲醇(45:55)为流动相; 体积流量为 1 mL/min; 柱箱温度 303.15 K; 进样量 1 μL; 检测波长 238 nm。

2.2.2 标准曲线的制备: 用甲醇溶解冬凌草甲素对照品, 配制成不同质量浓度的冬凌草甲素甲醇溶液, 用 HPLC 分析检测。以冬凌草甲素的质量为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得到回归方程 $Y = 7126.55X - 8310.6$, $r = 0.99904$ 。

2.3 提取率的计算: 得出样品中冬凌草甲素的质量, 并测定萃取物中冬凌草甲素的质量, 计算得出提取率(提取率 = 样品中冬凌草甲素的质量分数 × 提取液的总质量 / 加入的原料冬凌草的质量 × 100%)。

2.4 单因素试验考察

2.4.1 夹带剂的筛选: 在超临界萃取过程中通常采用 CO₂ 作为萃取剂, 由于超临界 CO₂ 的相对分子质量较大, 以及极性较强的溶质分子溶解能力较差, 在一定程度上限制了其应用。为了有效提取那些有极

* 收稿日期: 2009-05-05

作者简介: 陈莹(1983—), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士研究生, 从事超临界流体萃取技术方面的研究。E-mail: skidayou@163.com

* 通讯作者 张敏华 Tel: (022)27406119 E-mail: mhzhang@tju.edu.cn

性的成分,常常需要在超临界 CO_2 中加入一定量的夹带剂,以调节其极性,提高待萃物在其中的溶解度。常见的具有较强极性的夹带剂有水、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸和醋酸乙酸乙酯等^[5]。冬凌草甲素有一定的极性,需要加入一定量夹带剂来提高其提取率。本实验选择甲醇、乙醇、丙酮、95 %乙醇为夹带剂,其他工艺条件分别为:原料目数 40 ~ 80 目,温度 323.15 K,压力 20 MPa, CO_2 流量 20 g/min,夹带剂流量 2 g/min,萃取时间 4.5 h。在萃取实验过程中,从分离器中定时(0.5 h)取样,采用 HPLC 法分析提取液中冬凌草甲素的质量浓度,计算提取率结果见图 1。

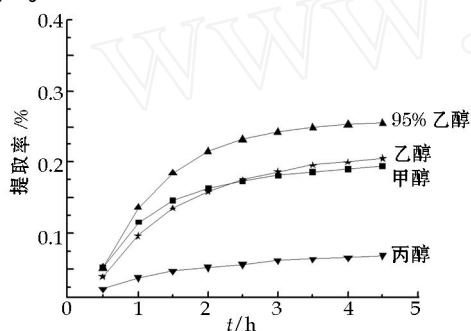


图 1 不同夹带剂对冬凌草甲素提取率的影响

Fig 1 Effect of different cosolvents on oridonin yield

可以看出,在实验考察的范围内,冬凌草甲素的提取率由高到低的顺序为:95 %乙醇 > 甲醇 ≈ 乙醇 > 丙酮。冬凌草甲素分子有一定极性,甲醇、乙醇与冬凌草甲素形成氢键的能力较强,且溶解度均较大,因而提取率较高;95 %乙醇因其水的存在使极性更强,考虑到萃取物为中药有效成分,且 95 %乙醇价格较低,因此应考虑将含水乙醇作为提取冬凌草甲素夹带剂的首选。

实验进一步考察了乙醇溶剂中含水量的影响。选择含水量分别为 0 %、5 %、10 %、15 %、20 %乙醇水溶液为夹带剂进行冬凌草甲素的提取。结果表明:采用无水乙醇为夹带剂时,冬凌草甲素的提取率最低,为 0.205 %。随着夹带剂中水的比例增大,冬凌草甲素的提取率先上升后下降,当水的含量为 10 %时提取率最高,达到 0.381 %;当水含量高至 20 %时,冬凌草甲素的提取率为 0.3 %,并在实验结束后,萃取釜底发现有少量液体残余,萃取效果下降。肖观秀^[6]对 CO_2 -乙醇-水体系的相行为的研究表明,在一定实验条件下,水含量过大,该体系有可能已经呈现分相状态,造成萃取效果下降。因此,超临界萃取冬凌草甲素实验中采用的夹带剂较适宜的水含量为 10 %。

2.4.2 萃取时间的确定:以 10 %乙醇水溶液作为夹带剂,其他萃取工艺条件为,原料目数 40 ~ 80 目,温度 323.15 K,压力 20 MPa, CO_2 流量 20 g/min,夹带剂流量 2 g/min,考察萃取时间对冬凌草甲素提取率的影响,结果见图 2。

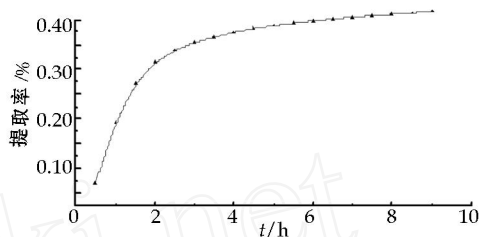


图 2 萃取时间对冬凌草甲素提取率的影响

Fig 2 Effect of time on oridonin yield

可以看出,在萃取初期,即萃取时间到 3 h 之前,随着萃取时间的延长,冬凌草甲素的提取率增长很快,随着萃取时间的延长,提取率增长逐渐缓慢。随着萃取时间延长至 6 h,提取率增长已十分缓慢,在萃取时间为 3 h 时,提取率增长存在一个明显的转折点。在实际操作过程中,选择合适的操作时间,既要达到提高萃取收率的目的,又要减少系统的操作时间和溶剂的用量,因此确定适宜的萃取时间为 3 h。

2.5 萃取过程的正交试验分析:通过单因素试验确定了夹带剂(90 %乙醇)和萃取时间(3 h)的实验条件后,采用正交试验考察萃取压力(A)、萃取温度(B)、夹带剂用量(C)、 CO_2 流量(D)对冬凌草甲素提取率的影响,确定超临界 CO_2 萃取冬凌草甲素的最优条件,结果见表 1。

通过分析可以确定超临界 CO_2 萃取冬凌草甲素的压力、温度、夹带剂流量和 CO_2 流量最佳参数水平为 $A_3B_4C_4D_3$,即压力 35 MPa,温度 328.15 K,夹带剂流量 4 mL/min, CO_2 流量 25 g/min。

2.6 验证试验:为验证结果的可靠性,多次重复实验条件 $A_3B_4C_4D_3$,即压力 35 MPa,温度 328.15 K,夹带剂流量 4 mL/min, CO_2 流量 25 g/min,结果冬凌草甲素提取率为 0.402 %,高于正交表中所列的各组试验结果,也优于文献中报道的 0.39 %的提取率^[7]。

3 讨论

冬凌草甲素传统的分离提纯方法步骤多、周期长、能耗高,越来越不适应日趋严格的环保要求,采用超临界萃取技术从冬凌草中萃取冬凌草甲素的工艺研究,解决了传统的冬凌草甲素提取制备工艺存在的问题,获取了高质量的制药原料。

通过实验萃取工艺条件考察,选择 90 %乙醇水溶液作为夹带剂,适宜的萃取工艺条件:压力 35

表 1 正交试验设计和结果

Table 1 Design and results of orthogonal test

试验号	A/ MPa	B/ K	C/ (mL · min ⁻¹)	D/ (g · min ⁻¹)	提取率/ %
1	20	308 15	1	15	0. 091
2	20	318 15	2	20	0. 201
3	20	323 15	3	25	0. 295
4	20	328 15	4	30	0. 371
5	30	308 15	2	25	0. 293
6	30	318 15	1	30	0. 129
7	30	323 15	4	15	0. 375
8	30	328 15	3	20	0. 347
9	35	308 15	3	30	0. 349
10	35	318 15	4	25	0. 391
11	35	323 15	1	20	0. 201
12	35	328 15	2	15	0. 345
13	40	308 15	4	20	0. 368
14	40	318 15	3	15	0. 349
15	40	323 15	2	30	0. 308
16	40	328 15	1	25	0. 213
K ₁	0. 2395	0. 2753	0. 1585	0. 2900	
K ₂	0. 2860	0. 2675	0. 2868	0. 2793	
K ₃	0. 3215	0. 2948	0. 3350	0. 2980	
K ₄	0. 3095	0. 3190	0. 3763	0. 2893	
R	0. 0700	0. 0515	0. 2178	0. 0188	

MPa ,温度 328. 15 K,夹带剂流量 4 mL/ min ,CO₂ 流量 25 g/ min ,各影响因素对提取率的影响程度: 夹带剂流量 > 压力 > 温度 > CO₂ 流量;冬凌草甲素的提取率可达到 0. 402 % ,优于文献中报道的 0. 39 % 的提取率。

参考文献:

[1] 吴孔明,张覃沐,王庆端,等. 冬凌草甲素对肿瘤细胞钠泵活性的影响[J]. 中国药理学报,1987,8(3):271.
[2] 葛 铭,马用法,张中兴,等. 冬凌草甲素和乙素对人体肝癌 BEL-7402 细胞株杀伤作用的研究[J]. 药学通报,1981,16(5):6.
[3] 耿中峰,吕惠生,张敏华. 石蒜中加兰他敏的超临界 CO₂ 萃取工艺研究[J]. 中草药,2008,39(4):543-546.
[4] 徐晓芳,吕惠生,张敏华,等. 超临界 CO₂ 萃取烟叶中茄尼醇的影响因素分析[J]. 中草药,2007,38(10):1504-1505.
[5] 于恩平,朱美文,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.
[6] 肖观秀. 超临界萃取技术提取石蒜中加兰他敏的工艺研究[D]. 天津:天津大学,2005.
[7] 邢 洁,张典瑞,张学顺,等. 超临界 CO₂ 萃取-柱色谱分离联用制备冬凌草甲素新工艺的研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(23):1804-1807.

高效液相色谱-二极管阵列检测法测定冠心宁注射液中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、阿魏酸、迷迭香酸和丹酚酸 B

张 雪,褚文静,刘伟娜,侯海妮,黄喜茹 *

(河北医科大学药学院 分析化学教研室,河北 石家庄 050017)

摘 要:目的 建立高效液相色谱-二极管阵列检测法同时测定冠心宁注射液中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、阿魏酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 6 种水溶性成分。方法 采用 DiamonsilTM C₁₈ 色谱柱(250 mm ×4. 6 mm ,5 μm);流动相为甲醇-5 %冰醋酸,进行梯度洗脱;体积流量 1. 0 mL/ min;进样体积 20 μL;柱温 30 ;检测波长 286 nm。结果 在此色谱条件下 6 种水溶性成分可完全分离。丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、阿魏酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 的线性范围分别为 87. 68 ~ 438. 40 ng($r = 0. 999\ 3$),29. 68 ~ 148. 40 ng($r = 0. 999\ 7$),14. 03 ~ 70. 16 ng($r = 1. 000\ 0$),30. 40 ~ 152. 00 ng($r = 0. 999\ 9$),103. 70 ~ 518. 40 ng($r = 0. 999\ 6$),193. 20 ~ 966. 00 ng($r = 0. 999\ 6$)。平均回收率丹参素为 98. 2 % (RSD 为 0. 27 %),原儿茶酸为 98. 4 % (RSD 为 1. 2 %),原儿茶醛为 99. 2 % (RSD 为 1. 3 %),阿魏酸为 98. 9 % (RSD 为 0. 96 %),迷迭香酸为 98. 1 % (RSD 为 0. 82 %),丹酚酸 B 为 99. 3 % (RSD 为 0. 31 %)。结论 该方法简单、准确、重现性好,可用于冠心宁注射液的质量控制。

关键词:冠心宁注射液;丹参素;原儿茶酸;原儿茶醛;阿魏酸;迷迭香酸;丹酚酸 B;高效液相色谱;二极管阵列检测
中图分类号:R286. 02 文献标识码:A 文章编号:0253 - 2670(2010)02 - 0234 - 03

冠心宁注射液具有活血化瘀、通脉养心、扩张冠脉增加冠脉血量、加速缺血心肌修复、促进梗死区心肌再生、解除微血管痉挛,改善微循环,抑制血小板聚集、抗血栓形成、抗氧化及保护心脏微血管内皮细

胞等作用,临床用于冠心病、心绞痛、脑栓塞等心脑血管疾病、肺脏、肝脏、肾脏等疾病的治疗。处方中含丹参和川芎,丹参为该制剂的君药。制剂中有效成分主要为丹参的水溶性成分丹参素、原儿茶酸、原

* 收稿日期:2009-04-26
基金项目:河北省中医药局资助项目(05057);河北省科技厅科技项目(062761372)
作者简介:张 雪(1984 -),女,河北邯郸人,在读硕士研究生,从事药物分析研究。E-mail:zhangxuedd@sina.com
* 通讯作者 黄喜茹 Tel:(0311)86265623 E-mail:hxr@163.com