

超临界 CO₂ 流体萃取技术降低哈蟆油中雌激素的工艺优选

王永生^{1,2}, 罗阳¹, 王诗涵², 王诗惠², 曲晓波^{1*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 吉林大学, 长春 130021)

[摘要] **目的:** 优选超临界 CO₂ 流体萃取技术降低哈蟆油中雌激素含量的工艺条件。**方法:** 采用放射免疫法测定雌激素(雌二醇、雌三醇)含量, 以哈蟆油中雌激素的平均去除率为指标, 通过正交试验考察萃取温度、萃取时间、萃取压力、夹带剂用量对雌激素 CO₂ 超临界萃取工艺的影响。**结果:** 最佳萃取工艺条件为温度 50 ℃, 压力 30 MPa, 乙醇夹带剂用量 35 mL, 萃取时间 4 h; 雌激素平均除去率 32.12%, 1-甲基海因剩余率 88.7%。**结论:** 优选的 CO₂ 超临界萃取工艺稳定可行, 能有效降低哈蟆油中雌激素含量且基本保留了哈蟆油润肺止咳的有效成分。

[关键词] 哈蟆油; 雌激素; 超临界 CO₂ 萃取工艺; 放射免疫法; 雌二醇; 雌三醇

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0016-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180016

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140722.1450.008.html>

[网络出版时间] 2014-07-22 14:50

Optimization of Supercritical CO₂ Fluid Extraction Process for Deduction of Estrogen in Ranae Oviductus

WANG Yong-sheng^{1,2}, LUO Yang¹, WANG Shi-han², WANG Shi-hui², QU Xiao-bo^{1*}

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize supercritical CO₂ fluid extraction process for reducing the content of estrogen in Ranae Oviductus. **Method:** The content of estrogen (estradiol and estriol) was determined by radioimmunoassay, taking average removal rate of estrogen in Ranae Oviductus as index, orthogonal design was adopted to optimize supercritical CO₂ fluid extraction process with entrainer dosage, extraction temperature, time and pressure as factors. **Result:** Optimum process conditions were as follows: extracted 4 h at temperature of 50 ℃ and pressure of 30 MPa, with 35 mL of ethanol as entrainer; average removal rate of estrogen was 32.12%.

[收稿日期] 20140417(007)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI03B07)

[第一作者] 王永生, 博士, 博士生导师, 从事中药有效成分研究, Tel: 0431-86172298, E-mail: 13944165683@163.com

[通讯作者] * 曲晓波, 博士, 博士生导师, 从事中药开发及药理学研究, Tel: 0431-86172508, E-mail: quxiaobo0504@hotmail.com

- [12] 杨全, 严寒静, 李艳辉, 等. 药用真菌桑黄菌丝体多糖提取工艺的研究[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(6): 697.
- [13] 梁大勇, 赵晨, 黄芳, 等. 响应面法优化桑黄发酵液总多糖的提取工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(4): 114.
- [14] 范传颖, 陶正明, 吴志刚. 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定铁皮石斛中多糖含量的比较[J]. 浙江农业科学, 2013(7): 799.
- [15] 李晓红, 邹昀员, 田易玲, 等. 苯酚-硫酸法测定茶藨子叶状层菌发酵菌丝多糖含量[J]. 山东中医杂志, 2013, 32(5): 346.
- [16] 于立芹, 范毅, 陈玲, 等. TLC与GC法测定红薯叶多糖的单糖组成[J]. 河南科学, 2011, 29(2): 150.
- [17] 王钦博, 杨焱, 周帅, 等. 八种桑黄粗多糖化学组成与体外免疫活性的比较[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(5): 873.

[责任编辑 刘德文]

surplus ratio of 1-methyl hydantoin was 88.7%. **Conclusion:** This optimized supercritical CO₂ extraction process is stable and feasible, which has a good effect on reducing the content of estrogen in *Ranae Oviductus* and basically retains active ingredients for moistening lung to arrest cough.

[**Key words**] *Ranae Oviductus*; estrogen; supercritical CO₂ extraction process; radioimmunoassay; estradiol; estriol

哈蟆油又称雪蛤、林蛙油、哈士蟆油,味甘、咸,性微温,具有补肾益精、养阴润肺的功效^[1]。在前期研究基础上^[2-6],发现未经处理的哈蟆油中雌二醇、雌三醇质量分数分别为 0.038%、0.0003%。虽然雌激素在哈蟆油中含量较低,但作为一类具有广泛生物活性的类固醇化合物,通常较低含量就会对内分泌系统、心血管系统及机体代谢产生较大的影响^[7]。哈蟆油常需要长期服用才会产生较好疗效,势必会增加雌激素在体内的累积。而且摄入的雌激素可能会刺激卵巢分泌更多雌激素,使其在体内堆积,增加卵巢癌、乳腺癌等生成的几率^[8-10]。故为了降低服用哈蟆油可能存在的潜在危险,本实验拟降低哈蟆油中雌激素含量。

1-甲基海因是哈蟆油润肺止咳的主要化学成分,具有抗炎镇咳的生物活性^[11],2010年版《中国药典》^[12]中将其作为哈蟆油的定性指标。目前,国内外尚未报道过降低哈蟆油中雌激素含量的有效方法。本实验采用放射免疫法测定哈蟆油中雌激素的含量变化,运用超临界二氧化碳流体萃取技术^[13]降低哈蟆油中雌激素(雌二醇、雌三醇)含量^[14],通过正交试验优选萃取工艺条件,结合 1-甲基海因含量为验证指标,在降低哈蟆油中雌激素含量的同时,尽可能保留哈蟆油中有效成分含量,使其服用更加安全有效。

1 材料

HI221-40-11 型超临界二氧化碳萃取仪(南通市华安超临界萃取有限公司),GAMMAmatic II 型放射免疫测定仪(康强公司),9140mbe 101-2 型电热鼓风干燥箱(上海博讯事业有限公司医疗设备厂)。哈蟆油购自吉林省白山市,经长春中医药大学姜大成教授鉴定为蛙科动物中国林蛙 *Rana temporaria chensinensis* David 雌蛙的干燥输卵管;人血清雌二醇(E₂)及血清雌三醇(E₃)放射免疫分析试剂盒(潍坊三维生物工程集团有限公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 雌激素的处理 取未经提取的哈蟆油,粉碎,过 20~60 目筛,精密称定 0.2 g 溶于甲醇 20 mL 中,超声提取 20 min,于 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,重复上述步骤 2 次,合并上清液,减压浓缩,即得未经提取的哈蟆油雌激素提取液,待测定时,加甲醇 5 mL 定容。

2.2 雌激素的含量测定 采用放射免疫法测定,按 E₂ 和 E₃ 放射免疫分析试剂盒说明书的方法进行操作,见表 1,摇匀,分别于 37 °C 温育 2,1 h,各加入分离剂 500 μL,摇匀,室温放置 15 min,于 3 500 r·min⁻¹ 离心 20 min,抽弃上清液,测定沉淀的放射性计数(CPM)。

表 1 雌二醇及雌三醇的检测步骤

试剂	雌二醇				雌三醇			
	NSB	S ₀	S ₁ ~S ₅	U	NSB	S ₀	S ₁ ~S ₅	U
水	100							
零标准	100	100			150	50		
对照品			100				50	
样品				100				50
标记物	100	100	100	100	100	100	100	100
抗体		100	100	100		100	100	100

注: NSB 代表非特异结合, S₀~S₅ 为 6 个不同质量浓度的对照品, U 为样品。

2.3 E₂ 和 E₃ 对照品的测定 放射免疫试剂盒中含有不同质量浓度的对照品 6 瓶,每瓶 1 mL,标号 S₀~S₅,质量浓度依次为 20,100,500,1 500,5 000

ng·L⁻¹。根据雌二醇检测步骤,取各对照品 100 μL 置于 6 个小瓶中,各加入¹²⁵I-标记物和抗体 100 μL,其中 S₀ 另加零标准 100 μL,摇匀,按 2.2 项下方法

处理,运用 γ 计数仪测量各对照品和 NSB 的 CPM。同法测定 E_3 各对照品及 NSB 的 CPM。

2.4 结合率计算 用 $S_0 \sim S_5$ 的 CPM 值减去 NSB 的 CPM,得到的数值用 -NSB 表示,以 B_0 表示对照品 S_0 的 -NSB, B 表示对照品 $S_1 \sim S_5$ 的 -NSB,根据人血清放射免疫分析试剂盒说明,结合率计算方式选择为 B/B_0 。以对照品质量浓度为横坐标,结合率为纵坐标,得 E_2 和 E_3 对照品的回归方程分别为 $Y = -0.014X + 77.67 (R^2 = 0.995)$, $Y = -0.124X + 88.76 (R^2 = 0.991)$ 。

2.5 样品测定 取未经处理的哈蟆油,按 2.1 项下方法处理,采用放射免疫法平行测定 3 次,取平均值,结果未经处理的哈蟆油中雌二醇、雌三醇质量浓度分别为 $0.380, 27.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,质量分数依次为 0.038% 和 0.000 3%。

2.6 CO_2 超临界萃取工艺优选 选择温度、时间、压力、夹带剂量为考察因素,以萃取后 E_2 和 E_3 平均去除率为指标,取哈蟆油 9 份,每份 100 g,粉碎过 20~60 目筛,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 2 哈蟆油中雌激素超临界萃取工艺正交试验因素水平

水平	A 温度 /℃	B 时间 /h	C 压力 /MPa	D 夹带剂量 /mL
1	30	2	25	35
2	40	3	30	45
3	50	4	35	55

表 3 哈蟆油中雌激素超临界萃取工艺正交试验安排及直观分析 %

No.	A	B	C	D	雌二醇 去除率	雌三醇 去除率	平均 去除率
1	1	1	1	1	20.34	21.88	21.11
2	1	2	2	2	24.53	22.98	23.76
3	1	3	3	3	25.51	23.45	24.48
4	2	1	2	3	26.06	24.00	25.05
5	2	2	3	1	27.18	25.78	26.48
6	2	3	1	2	26.42	24.56	25.49
7	3	1	3	2	26.73	27.78	27.25
8	3	2	1	3	26.13	28.34	27.23
9	3	3	2	1	34.21	30.00	32.12
K_1	23.117	24.470	24.610	26.570			
K_2	25.673	25.823	26.977	25.500			
K_3	28.867	27.363	26.070	25.587			
R	5.750	2.893	2.367	1.070			

表 4 雌激素平均去除率方差分析

方差来源	SS	F	P
A	49.796	23.500	<0.05
B	12.574	5.934	>0.05
C	8.555	4.037	>0.05
D(误差)	2.119	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素对萃取工艺的影响顺序为 $A > B > C > D$ 。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 A 对萃取工艺具有显著性影响,其他因素则均无显著性影响,确定最佳组合为 $A_3B_3C_2D_1$,即温度 50℃,提取时间 4 h,压力 30 MPa,夹带剂用量 35 mL。

2.7 验证试验 取哈蟆油药材粉末 3 份,每份 100 g,按优选的工艺条件进行提取,合并提取液,浓缩,减压干燥得干膏,测得干膏中 E_2 质量分数分别为 0.024 9%, 0.025 3%, 0.025 3%, E_3 依次为 0.000 210%, 0.000 208%, 0.000 209%,计算雌激素的平均除去率依次为 32.31%, 32.05%, 31.99%, 1-甲基海因剩余率分别为 88.6%, 88.3%, 89.2%。说明优选的萃取工艺稳定可行且基本保留了哈蟆油润肺止咳的有效成分。

3 讨论

本文采用超临界 CO_2 法降低哈蟆油中雌激素含量,是根据超临界法可将极性、沸点、相对分子质量不同的物质依次萃取出来的原理,通过改变压力、温度等因素,使哈蟆油中雌激素含量最大限度地降低。同时萃取流体 CO_2 为绿色无污染气体,可避免化学试剂残留,且该法适合用于工业化大生产。

前期考察了脱脂哈蟆油提取工艺,1-甲基海因的剩余率达 87%^[15]。验证试验中增加测定了 1-甲基海因剩余率,采用 HPLC 测定该成分含量,色谱条件为 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水 (10:90),流速 0.3 mL·min⁻¹,检测波长 235 nm;结果发现优选的萃取工艺可使哈蟆油中 E_2 和 E_3 的去除率约分别达到 33.88% 和 30.33%,同时 1-甲基海因剩余率达 88.7%。

检测雌激素含量的方法有气相色谱法、固相萃取-HPLC^[16]等,其中 HPLC 检测应用较多^[17-19],但该法耗时较长且操作复杂。本文选用放射免疫法,根据带有¹²⁵I 标记和不带标记的抗原与抗体竞争性结合的原理,可精确地测定极微量物质的含量,具有

高度特异性和灵敏性。人血清放射免疫试剂盒附带了 E₂, E₃ 对照品、分离剂及¹²⁵I 标记物等,无需在试验时配置,操作方法简单,一次可进行多个样品的测定,节约了准备时间。

[参考文献]

[1] 常乐,刘汶,张琳. 哈蟆油的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(5):405.

[2] 王永生,姜大成,王恩思. 哈蟆油脂溶性化学成分的研究[J]. 中成药,2006,28(1):93.

[3] 刘玉翠,王永生,姜大成. 哈蟆油脂溶性化学成分研究[J]. 吉林中医药,2005,25(5):56.

[4] 王永生,姜大成,孟勤,等. HPLC 测定哈蟆油中十六烷酸胆甾醇酯含量研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(13):990.

[5] Mao C Y, Yang P, Wang Y S, et al. Synthesis, evaluation of analgesic and gastric ulcerogenic activities and the metabolites in rat plasma of hydantoin ibuprofen conjugates[J]. Lett Drug Des Discov,2013,10(9):895

[6] 王鹤. 脱脂哈蟆油胶囊 HPLC 色谱指纹图谱研究[D]. 长春:长春中医药大学,2009.

[7] 赵泽文,常青,梁志清. 环境雌激素对健康的影响[J]. 中国临床康复,2004,8(9):1724.

[8] 王思园. 雌激素的利与弊[J]. 中国疗养医学,2011,20(11):1014.

[9] Turan V K, Sanchez R I, Li J J, et al. The effects of steroidal estrogens in ACI rat mammary carcinogenesis: 17β-estradiol, 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol, 16α-hydroxyestradiol, and 4-hydroxyestrone [J]. J

Endocrinol,2004,183(1):91.

[10] Li J J, Kirkmam H, Hunter R L. Sex difference and gonadal hormone influence on syrian hamster kidney esterase isozymes[J]. J Histochem Cytochem,1968,17(6):386.

[11] Lu H B, Kong D J, Wu B, et al. Synthesis and evaluation of anti-inflammatory and antitussive activity of hydantion derivatives[J]. Lett Drug Des Discov,2012,9(6):638.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:239.

[13] 胡金芳,杨文文,杨帅,等. 正交试验优选白花蛇舌草超临界二氧化碳萃取条件及 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(5):96.

[14] 王春霖,王丽兰,姜言功,等. 哈士蟆油甾体性激素定量分析及药理作用[J]. 中国通报,1985,10(2):44.

[15] 王永生,吴斌,孔德娟,等. 脱脂哈蟆油提取工艺[J]. 特产研究,2010(4):22.

[16] 李龙飞,金莹,赵晓磊,等. 固相萃取-HPLC 法测定水样中雌激素残留[J]. 食品研究与开发,2013,34(23):60.

[17] 孔庆德,朱豫新. HPLC 法同时测定牛乳中 3 种雌激素残留量[J]. 石河子科技,2009(2):32.

[18] 林奕之,张世英,梁伟,等. HPLC 法同时测定肉与肉制品中沙丁胺醇和 8 种雌激素残留量[J]. 中国公共卫生,2002,18(12):1499.

[19] 李龙飞,赵晓磊,何金兴,等. 牛奶中雌激素残留检测方法研究进展[J]. 乳业科学与技术,2013,36(3):24.

[责任编辑 刘德文]

欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊(2013 年扩刊版)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于 1995 年 10 月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,242 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfx_2010@188.com,网址:www.syfxzz.com。