

超临界 CO₂ 流体技术萃取当归挥发油的工艺优选

李晓宁, 杨银花, 赵博琛, 兰颐, 安静, 王琼, 王文平, 吴清*
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 优选超临界 CO₂ 流体萃取当归挥发油的工艺条件。方法: 以藁本内酯含量和出油率的综合评分为指标, 采用 HPLC 测定藁本内酯含量, 通过 L₉(3⁴) 正交试验考察萃取压力、温度、时间对萃取效果的影响。结果: 当归挥发油的最佳萃取工艺为萃取压力 30 MPa, 萃取温度 50 ℃, 萃取时间 2 h, CO₂ 流量 25 L·h⁻¹, 分离釜 I 压力 8 MPa, 温度 50 ℃, 分离釜 II 压力系统尾压, 温度 35 ℃。结论: 萃取的当归挥发油得率高、质量好, 优选的工艺稳定可行。

[关键词] 当归; 超临界 CO₂ 流体萃取; 藁本内酯

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)14-0027-03

[doi] 10.11653/syfyj2013140027

Optimization of Supercritical CO₂ Fluid Extraction Process for Volatile Oil from *Angelica sinensis*

LI Xiao-ning, YANG Yin-hua, ZHAO Bo-chen, LAN Yi, AN Jing, WANG Qiong, WANG Wen-ping, WU Qing*
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize supercritical CO₂ fluid extraction process parameters of volatile oil from *Angelica sinensis*. **Method:** With composite score of the content of ligustilide and yield of volatile oil as index, the content of ligustilide was determined by HPLC, L₉(3⁴) orthogonal test was used to investigate effect of extraction temperature, extraction pressure, extraction time on extraction efficiency. **Result:** Optimum process parameters were as follows: extraction pressure 30 MPa, extraction temperature 50 ℃, extraction time 2 h, flow rate of CO₂ 25 L·h⁻¹, pressure of separation kettle I 8 MPa with temperature at 50 ℃, separation pot II pressure of the system tail pressure with temperature at 35 ℃. **Conclusion:** This optimized process was stable and feasible,

[收稿日期] 20130109(036)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073059)

[第一作者] 李晓宁, 硕士生, 从事中药新技术研究, Tel: 13522025015, E-mail: lxiaoning2011@126.com

[通讯作者] * 吴清, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, E-mail: qwu@vip.sina.com

- [11] 杨晓宁, 禹玉洪, 李阳, 等. HPLC 法测定丁香酚与大鼠血浆蛋白的结合率[J]. 中草药, 2010, 41(3): 391.
- [12] 黄勇, 牟景丽, 陈慧, 等. 平衡透析法、超滤法结合液质联用技术比较测定注射用复方荛苳草中黄酮类成分的血浆蛋白结合率[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 91.
- [13] Mikita C P, Padlan E A. Why is there a greater incidence of allergy to the tropomyosin certain animals than to that of other? [J]. Med Hypotheses, 2007, 69(5): 1070.
- [14] Barrett A J, Rawlings N D, WOESSNER J F. Handbook of proteolytic enzymes [M]. 2 ed. London: Elsevier, 2004: 1267.
- [15] 李彬, 郭力城. 鳖甲的化学成分和药理作用研究概况[J]. 中医药信息, 2009, 26(1): 25.
- [16] 凌笑梅, 张娅婕, 张桂英, 等. 鳖甲提取物中氨基酸、微量元素及多糖含量的测定[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(10): 939.
- [17] 缪华蓉, 沈耀明. 鳖甲内氨基酸成分的研究[J]. 中成药, 1995, 17(12): 37.

[责任编辑] 全燕

which could be adopted to extract volatile oil from *A. sinensis* with high yield and good quality.

[Key words] *Angelica sinensis*; supercritical CO₂ fluid extraction; ligustilide

当归主产于甘肃,以岷县产量高、质量最佳,具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效^[1-3]。现代研究表明,当归中主要含有挥发油、酚酸及多糖 3 类成分,均具有抗炎、免疫调节等功能^[4]。挥发油提取多采用有机溶剂法、水蒸气蒸馏法及超临界流体萃取法等。超临界流体萃取法相比水蒸气蒸馏法,具有条件温和,可有效避免挥发油中热敏性物质分解、异构化^[1],提取率高等优点;相比有机溶剂法,具有无试剂残留等优点,近年来在中药挥发油提取中已被广泛应用^[5-6]。当归挥发油密度与水相近,采用水蒸气蒸馏法提取,存在油水无法完全分开、转移率低等缺点。本实验拟采用超临界 CO₂ 流体萃取当归挥发油,通过正交试验对提取工艺进行优选。

1 材料

HA220-50-07 型超临界萃取装置(江苏南通市华安超临界萃取有限公司),LC-20AT 型高效液相色谱仪(SPD-20A 型 UV 型检测器,日本岛津公司),Sartorius BS 110S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),METTLER AE 240 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),YP10002 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司)。

当归(购自甘肃岷县,经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根),藁本内酯对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 A0219),甲醇为色谱纯,水为哇哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

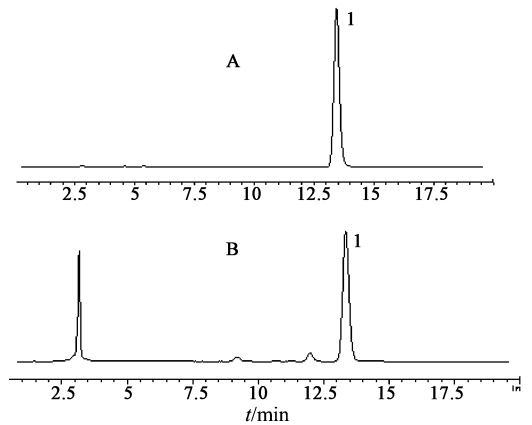
2 方法与结果

2.1 藁本内酯含量测定

2.1.1 色谱条件及系统适用性 Hypersil gold C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(60:40),检测波长 326 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 35 °C。理论塔板数按藁本内酯计算应不低于 5 000,见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取藁本内酯对照品 2.32, 2.30 mg, 分别置 25, 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别得 92.8, 230 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取当归药材粉末(过 40 目筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入甲醇、70% 甲醇、80% 乙醇各 50 mL, 密塞, 摇



A. 对照品; B. 供试品; 1. 藁本内酯

图 1 当归挥发油 HPLC

匀,称定质量,回流提取 0.5 h,放冷,称定质量,用相应溶剂补足减失质量,摇匀,静置,取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 10 μL 进样,结果藁本内酯质量分数分别为 0.588%, 0.578%, 0.587% (n = 2),故选择低毒价廉的 80% 乙醇为提取溶剂,并按上述方法制备供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取藁本内酯对照品溶液(92.8 mg·L⁻¹) 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL 注入高效液相色谱仪,按上述条件进行测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 2.7 \times 10^6 X - 1548.28$ (r = 1),表明藁本内酯在 0.092 8 ~ 0.928 μg 与其峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取藁本内酯对照品溶液(92.8 mg·L⁻¹) 5 μL,重复进样 6 次,结果藁本内酯峰面积的 RSD 0.13%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同批当归药材粉末(40 目) 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,测定,结果藁本内酯平均质量分数 0.563 6%, RSD 0.86%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取供试品溶液按上述色谱条件分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进行测定,结果 12 h 内藁本内酯峰面积的 RSD 0.13%,表明供试品溶液于常温放置 12 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密吸取 6 份供试品溶液,每份 3 ~ 5 mL,置于量瓶中,每份精密加入藁本内酯对照品溶液(230 mg·L⁻¹) 1 mL,摇匀,用 80% 乙醇稀释至刻度,上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液 10 μL 测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 藁本内酯加样回收率试验

No.	样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.171	0.399	99.16	100.14	1.62
2	0.171	0.398	98.81		
3	0.170	0.398	99.31		
4	0.169	0.406	103.06		
5	0.168	0.397	99.50		
6	0.168	0.401	101.02		

2.2 正交试验优选 取当归药材(40目)9份,每份500g,选取萃取压力、温度及时间为考察因素,CO₂流量25L·h⁻¹,分离釜离釜I压力8MPa,温度50℃,分离釜II压力系统尾压,温度35℃,当各项参数达到设定值时开始萃取,在分离釜收集挥发油。按L₉(3⁴)正交表进行试验,以出油率和藁本内酯含量的综合评分(Y)为指标, Y = 50 × 出油率/1.92 + 50 × 藁本内酯含量/49.40。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 当归挥发油的超临界 CO₂ 流体萃取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 萃取压力 /MPa	B 萃取温度 /℃	C 萃取时间 /h	D(空白)
1	25	40	2	1
2	30	45	2.5	2
3	35	50	3	3

表 3 当归挥发油的超临界 CO₂ 流体萃取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D (空白)	出油率 /%	藁本内酯 质量分数 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	1.38	38.28	74.66
2	1	2	2	2	0.76	45.03	65.45
3	1	3	3	3	1.66	45.41	89.06
4	2	1	2	3	1.79	33.62	80.50
5	2	2	3	1	0.85	46.94	69.49
6	2	3	1	2	1.92	37.23	87.68
7	3	1	3	2	0.96	49.40	75.07
8	3	2	1	3	1.46	42.48	80.93
9	3	3	2	1	0.81	35.37	56.74
K ₁	76.39	76.74	81.09	66.96			
K ₂	79.22	71.96	67.56	78.04			
K ₃	70.91	77.83	77.87	83.50			
R	8.31	5.87	13.53	16.54			

由直观分析可知,各因素作用主次顺序为 C > A > B。方差分析表明3个因素的差异均不显著,根据SPSS 17.0 统计分析结果,得出最佳提取工艺

表 4 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	61.19	2	30.60	0.26	>0.05
B	27.00	2	13.50	0.11	>0.05
C	200.14	2	100.10	0.85	>0.05
D(误差)	411.43	2	205.71	1.00	

注: F_{0.05}(2,2) = 19.00。

A₂B₃C₁,即萃取压力30MPa,萃取温度50℃,萃取时间2h。

2.3 验证试验 按优选的萃取工艺进行试验,当各项参数达设定值时开始萃取,在分离釜收集当归挥发油,平行操作3份,结果出油率分别为1.40%,1.35%,1.47%,藁本内酯质量分数依次为42.96%,41.53%,41.86%,表明该工艺稳定可行。

3 讨论

现代研究表明,当归挥发油中含有藁本内酯、正丁基苯酞、正丁烯基苯酞等成分^[7-8],其中藁本内酯含量最高,达50%~75%,因此将其作为评价当归挥发油质量的指标,建立了HPLC测定藁本内酯含量的方法,方法学考察表明该法稳定、准确、简便、可行。

[参考文献]

[1] 李桂生,马成俊,刘志峰,等.超临界CO₂萃取法与水蒸气蒸馏法提取当归挥发油的比较[J].中草药,2001,32(7):581.

[2] 黄宝华,张焜,周晓辉,等.超临界CO₂萃取当归中藁本内酯工艺条件研究[J].中草药,2002,33(6):514.

[3] 刘丹,刘超英,韩建伟.超临界萃取当归挥发油及阿魏酸正交试验研究[J].中国药师,2008,11(12):1438.

[4] 李桂生,马成俊,李香玉,等.藁本内酯的稳定性研究及异构化产物的GC-MS分析[J].中草药,2000,31(6):405.

[5] 陈华,张惠静,毕颖楠.超临界二氧化碳技术在医药领域的应用[J].时珍国医国药,2006,17(5):826.

[6] 李伟东,杨光明,蔡宝昌,等.三种方法提取当归挥发油的气相色谱-质谱比较[J].广州中医药大学学报,2004,21(3):206.

[7] 项好,张贵君,甘德全.HPLC测定CO₂超临界萃取的当归油药效组分[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(8):64.

[8] 王婕,赵建邦,宋平顺.30批当归中阿魏酸、藁本内酯含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):70.

[责任编辑 全燕]