

正交试验法优化 SFE-CO₂ 萃取大黄总蒽醌工艺探讨

肖 飞¹, 李卫民^{2*}, 李其凤¹

(1 广州中医药大学科技产业园有限公司, 广东 广州 510445;

2 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

[摘要] 目的: 优化 SFE-CO₂ 流体萃取大黄总蒽醌工艺。方法: 以大黄蒽醌类成分含量为考察指标, 萃取物收得率为参考指标, 用正交试验法考察影响 SFE-CO₂ 流体萃取大黄最主要的 3 个因素及最佳萃取条件。结果: 实验所得 SFE-CO₂ 流体萃取大黄最佳条件为: 萃取压力 18 MPa, 萃取温度 60 ℃, 95% 乙醇作夹带剂, 用量为 2 倍药材量。结论: SFE 技术具有萃取效率高、速度快、环保等优点, 本试验研究为大黄药材的开发提供有益实验依据。

[关键词] 正交试验法; 大黄总蒽醌; 超临界 CO₂ 萃取

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)04-0034-03

大黄具有泻热通便、凉血解毒、逐瘀通经之功效。大黄中主要成分是蒽醌衍生物, 其主要以两种形式存在, 部分为游离羟基蒽醌, 大部分与葡萄糖结合形成蒽醌苷, 即结合性蒽醌^[1]。大黄的提取工艺报道较多, 而超临界 CO₂ 萃取工艺少见报道, 笔者以大黄蒽醌类成分为主要指标, 结合萃取物得率, 采用

多因素多水平试验, 研究了大黄超临界 CO₂ 萃取工艺, 为大黄的开发提供了有益实验依据。

超临界萃取 (Supercritical fluid extraction, 简称 SFE) 技术产生于二十世纪五十年代, 目前已经广泛应用于食品、能源、医药、化妆品及香料工业。SFE-CO₂ 萃取是以超临界状态 (温度 31.3 ℃, 压力 7.15 MPa) 下的 CO₂ 为溶剂, 利用其高渗透性和高溶解能力来提取分离混合物的过程。SFE-CO₂ 萃取大黄能同时萃取游离羟基蒽醌与结合性蒽醌, 且低温下能尽可能保证药物成分不被破坏。

1 材料、仪器与试剂

[收稿日期] 2008-05-22

[通讯作者] * 李卫民, Tel: 13710543319; E-mail: liweiminw@126.com

1.1 材料 大黄(甘肃岷县二年生,经广州中医药大学中药学院李卫民教授鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.)、大黄素(0756-200110,购自中国药品生物制品检定所)。

1.2 仪器 1L-超临界 CO₂ 萃取装置(广州市轻工所), Agilent8453-E 紫外分光光度计(美国), R-220 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi), SK250H 超声波清洗器(上海科岛超声仪器有限公司), 数显恒温水浴锅(江苏金坛市荣华仪器制造有限公司), BP221S 万分之一电子天平(德国 Sartorius), MC215S 十万分之一电子天平(德国 Sartorius), ACS-6H-B 电子秤(中山市金利电子衡器有限公司)。

1.3 试剂 乙醚、95%乙醇、三氯甲烷、乙酸镁、甲醇、盐酸均为分析纯, CO₂ 纯度为 99.99%, 纯化水。

2 大黄蒽醌类成分含量^[2]

2.1 对照品溶液制备 精密称取大黄素对照品 0.002 01 g, 加乙醚溶解, 并定容至 25 mL 量瓶中, 即得, 大黄素对照品溶液浓度为 80.4 μg·mL⁻¹。

2.2 供试品溶液制备 精密量取供试品 1 mL, 用 95%乙醇稀释, 并定容于 50 mL 量瓶中, 作为储备液; 再精密量取上述储备液 1 mL, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸溶液 10 mL, 超声处理 2 min, 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 冷却, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 水液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 水浴蒸干, 残渣加 1% 乙酸镁甲醇溶液使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 再加 1% 乙酸镁甲醇溶液至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 线性关系的考察

2.3.1 测定波长确定 取大黄素对照品溶液 1 mL, 挥干乙醚, 加 1% 乙酸镁甲醇溶液至 10 mL, 摇匀, 在 200~800 nm 范围内, 用紫外分光光度计扫描, 512 nm 处有最大吸收, 故将测定波长定在 512 nm 处。

2.3.2 标准曲线制备 分别精密量取大黄素标准品溶液 0.3, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 mL, 挥干乙醚, 加 1% 乙酸镁甲醇溶液至 10 mL, 摇匀, 用紫外分光光度计测定 512 nm 处吸收, 结果见表 1。

以吸收度为纵坐标, 大黄素溶液浓度为横坐标绘制标准曲线计算回归方程: $Y = 0.0398X - 0.0072$, 相关系数 $r = 0.9991$, 表明大黄素在 24.1~241 μg 之间呈良好的线性关系。

表 1 大黄素紫外测定标准曲线结果表

取样量(mL)	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	2.4	2.7	3.0
浓度(μg·mL ⁻¹)	2.412	4.842	7.236	9.648	12.060	19.296	21.708	24.120
吸收度(A)	0.1114	0.1910	0.2654	0.3654	0.4607	0.7567	0.8569	0.9703

2.4 精密度试验 取同一对照品溶液 2 mL, 挥干乙醚, 加 1% 乙酸镁甲醇溶液至 10 mL, 摇匀, 重复测定 5 次, 计算吸收度值的相对标准偏差。结果 RSD 为 0.9%, 所建立方法的精密度良好。

2.5 稳定性考察 取同一萃取条件萃取物 1 mL, 分别按照游离蒽醌、总蒽醌供试品制备方法制备成供试品溶液, 在 0, 15, 30, 45, 60 min 测定, 计算吸收度值的相对标准偏差。结果游离蒽醌 RSD 为 2.1%, 总蒽醌 RSD 为 2.3%, 故在 60 min 内质量稳定。

2.6 重复性试验 取同一萃取条件萃取物, 按照供试品溶液的制备方法分别制备 5 份供试液, 测定吸收度并计算相对标准偏差。游离蒽醌 RSD 为 2.2%, 总蒽醌 RSD 为 2.4%, 结果显示所建立的方法重复性良好。

3 萃取物收得率测定

在 50℃下减压回收夹带剂至干(即冷凝管中无夹带剂滴出), 称取此时萃取物重量。计算公式: 萃取物得率(%) = 萃取物重量/萃取药材重量 × 100%

4 大黄 SFE-CO₂ 萃取工艺考察^[3]

4.1 预试验 分别取大黄药材粉 300 g, 设定萃取压力分别为 18, 22, 26, 30 MPa, 萃取温度分别为 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 收集不到萃取物, 故考虑加 95%乙醇作夹带剂萃取。

4.2 正交试验 通过预试验, 影响超临界萃取的主要因素为萃取压力、萃取温度、夹带剂用量。萃取 CO₂ 流量无法控制, 设为定值; 萃取至不再有萃取物出, 时间为 2 h。本试验运用正交试验考察大黄 SFE-CO₂ 萃取工艺, 因素-水平表见表 2。大黄药材过 20 目筛粉碎, 每釜装量 300 g, 用 95%乙醇作夹带剂, 1L-SFE-CO₂ 萃取装置萃取, 收集萃取物, 紫外分光光度法测定萃取物中大黄总蒽醌含量, 并回收乙醇, 计算萃取物收得率, 优选出最佳工艺, 正交试验结果见表 3。按照《中国药典》^[4]方法测定, 大黄药材总蒽醌含量 2.48%。

表 2 正交试验因素-水平表

水平	因素		
	萃取压力(MPa)	萃取温度(℃)	夹带剂用量
1	18	40	0.5 倍
2	22	50	1.0 倍
3	26	60	1.5 倍

表 3 大黄 SFE-CO₂ 流体萃取正交试验结果表

试验号	萃取压力(MPa)	萃取温度(℃)	夹带剂用量(倍)	总蒽醌含量(mg·g ⁻¹ 萃取物)	总蒽醌转移率(%)	萃取物收得率(%)
1	18	40	0.5	2.15	8.67	0.33
2	18	50	1.0	5.53	22.30	2.00
3	18	60	1.5	8.38	33.79	2.67
4	22	40	1.0	5.05	20.36	1.00
5	22	50	1.5	7.75	31.25	2.33
6	22	60	0.5	2.83	11.41	0.67
7	26	40	1.5	6.98	28.14	3.00
8	26	50	0.5	2.57	10.36	1.00
9	26	60	1.0	5.65	22.78	3.33

4.3 正交试验结果分析

4.3.1 直观分析法 以大黄 SFE-CO₂ 萃取物中总蒽醌含量作为考察指标, 结果见表 4。

表 4 大黄 SFE-CO₂ 正交试验萃取物中总蒽醌含量直观分析表

统计指标	萃取压力	萃取温度	夹带剂用量	误差项
均值 1	5.353	4.727	2.517	5.183
均值 2	5.210	5.283	5.410	5.113
均值 3	5.067	5.620	7.703	5.333
R 值	0.286	0.893	5.186	0.220

通过直观分析, 影响大黄 SFE-CO₂ 萃取因素由大到小依次是夹带剂用量、萃取温度、萃取压力, 优选试验方案为 C₃B₃A₁, 即夹带剂用量 1.5 倍, 萃取温度 60℃, 萃取压力 18 MPa。

4.3.2 方差分析法 以大黄 SFE-CO₂ 萃取物中总蒽醌含量作为考察指标, 结果见表 5。

表 5 大黄 SFE-CO₂ 正交试验萃取物中总蒽醌含量方差分析表

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
萃取压力(A)	0.123	2	1.618	—
萃取温度(B)	1.221	2	16.066	有影响
夹带剂用量(C)	40.532	2	533.316	高度显著
误差项(D)	0.08	2		

通过方差分析, 影响大黄 SFE-CO₂ 萃取因素由大到小依次是夹带剂用量、萃取温度、萃取压力, 优选试验方案为 C₃B₃A₁, 即夹带剂用量 1.5 倍, 萃取温度 60℃, 萃取压力 18 MPa, 这与直观分析结果相符。

4.4 优选工艺验证 通过试验, 大黄 SFE-CO₂ 萃取的优选工艺为: 萃取压力 18 MPa, 萃取温度 60℃, 95% 乙醇作夹带剂, 用量为 1.5 倍药材量。按照上述优选工艺进行 3 次验证试验, 检测结果见表 6。

表 6 大黄 SFE-CO₂ 正交优选工艺验证结果表

试验号	总蒽醌含量(mg·g ⁻¹ 萃取物)	总蒽醌转移率(%)	萃取物收得率(%)
1	8.39	33.83	2.65
2	8.28	33.39	2.53
3	8.45	34.07	2.71

5 讨论

萃取物室温放置, 颜色变深, 试验中同时用紫外分光光度法测定萃取物中大黄游离蒽醌含量, 并计算结合蒽醌含量, 发现结果不稳定, 故用大黄总蒽醌含量作为考察指标。

转移率是考察工艺最直观的指标, 故测定大黄药材总蒽醌含量, 药材处理同《中国药典》^[4] 方法, 根据萃取物中总蒽醌含量计算转移率, 通过直观分析及方差分析确定大黄 SFE-CO₂ 正交试验优选工艺。

大黄 SFE-CO₂ 萃取物成分复杂, 且含有夹带剂, 计算萃取物收得率必须除去夹带剂, 本试验采用 50℃ 低温减压回收夹带剂, 并未完全干燥萃取物, 既最大程度保留药物成分不受破坏, 又能得到试验参考指标, 为大黄药材的开发提供了有益的实验依据。

[参考文献]

- [1] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 161-163.
- [2] 蒋孟良. 大黄总蒽醌含量测定方法的研究[J]. 湖南中医学院学报, 1995, 15(3): 44-46.
- [3] 李卫民, 金波, 冯毅凡, 等. 中药现代化与超临界流体萃取技术[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 102-105.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 17-18