

超临界二氧化碳萃取丹酚酸 B 的提取工艺研究

金承怀^{1,2}, 罗杰英², 袁洪¹, 谭鸿毅¹, 刘畅¹, 黄志军¹, 阳国平^{1*}

(1 中南大学湘雅三医院临床药理中心, 湖南长沙 410013

2 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208)

摘要:目的 研究超临界 CO₂ 中加入非离子表面活性剂的多元醇混合体系萃取丹酚酸 B 的新工艺。方法 以丹酚酸 B 的提取率为指标, 采用正交实验法进行丹参提取工艺的优选, 采用 HPLC 法测定其含量。结果 超临界 CO₂ 萃取中加入非离子表面活性剂的多元醇混合体系可大大提高丹酚酸 B 的提取率。在本实验条件下, 丹参的超临界萃取最佳工艺为: 夹带剂选择 10% 乙醇 + 5% 吐温 - 80 用量与药材相等, 萃取温度 55℃, 压力 30 MPa 萃取时间 1.5 h。结论 加入非离子表面活性剂的多元醇混合体系比只用乙醇作夹带剂进行超临界 CO₂ 提取丹酚酸 B 的效率约高 6 倍。

关键词: 超临界 CO₂ 萃取; 丹参; 丹酚酸 B 非离子表面活性剂

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2009)07-1710-02

Extraction Process of Salvianolic Acid B with CO₂ Supercritical FluidJIN Cheng-huai^{1,2}, LUO Jie-ying², YUAN Hong¹, TAN Hong-yi¹, LIU Chang¹, HUANG Zhijun¹, YANG Guo-ping^{1*}

(1 Center of Clinical Pharmacology, The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013 China; 2 Pharmacological Department, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208 China)

Abstract Objective To study the new extraction process of Salvianolic acid B with the polyol mixed extraction system of supercritical CO₂ adding non ionic surfactant. **Methods** Salvianolic acid B was selected as marker component and determined by HPLC to optimize the extract process of *Salvia miltiorrhiza* by orthogonal test. **Results** Supercritical CO₂ adding non ionic surfactant mixed system of the polyol could significantly enhance extraction rate of Salvianolic acid B. The optimum supercritical fluid extraction was 10% ethanol and 5% tween-80 as the entrainer, the pressure 30 MPa, temperature at 55℃, and extracting time 1.5 h. **Conclusion** Adding non ionic surfactant mixed system of the polyol is about six times higher than that just ethanol as entrainment agent for supercritical CO₂ extraction Salvianolic acid B.

Key words Supercritical CO₂ extraction; *Salvia miltiorrhiza*; Salvianolic acid B; Non ionic surfactant

丹参为唇形科鼠尾草属多年生草本植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦的作用^[1]。丹酚酸 B 是丹参水溶性的主要活性成分, 在药材中的含量高达 3% 以上, 具有很强的抗脂质过氧化和清除自由基等作用^[2]。丹酚酸 B 在传统的提取方法中由于长时间加热损失较多, 所以建立一种能减少丹酚酸 B 在提取过程中损失的新方法势在必行。丹酚酸 B 极性比较强, 直接用超临界 CO₂ 萃取效果不好, 用超临界 CO₂ 流体萃取中药时需用到夹带剂, 以提高中药有效成分的提取率, 但对于许多中药有效成分如生物碱类、蛋白质、酚酸类等大分子水溶性物质都较难提取。因此如何增加超临界 CO₂ 流体的溶解度, 扩大其在中药方面的应用成为当务之急。

Johnston 等^[3] 提出加入表面活性剂和水, 在超临界 CO₂ 中形成反相微乳, 使极性物质能溶于其中, 开创了极性物质萃取的新途径。但从产品实际开发的角度, 作为食品添加剂的泊洛沙姆、吐温、司盘类表面活性剂价格低廉, 毒副作用很小, 在夹带剂中加入这些非离子表面活性剂形成的多元醇混合体系来考察丹酚酸 B 的提取率, 以扩大超临界 CO₂ 萃取的应用范围^[4]。本实验以丹酚酸 B 的提取率为指标对新提取工艺进行研究。

1 材料与仪器

1.1 药品和试剂 丹酚酸 B (批号: 02/071218 纯度大于 99%)

收稿日期: 2008-09-23 修订日期: 2008-12-12

基金项目: 湖南省科技厅资助课题 (Na 08FJ4150)

湖南省中医药管理局课题 (Na 2008085)

作者简介: 金承怀 (1982-), 男 (土家族), 湖南怀化人, 现为湖南中医药大学 2006 级在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事生物药剂学、中药新技术的研究工作。

* 通讯作者简介: 阳国平 (1972-), 男 (汉族), 湖南衡阳人, 现任中南大学湘雅三医院副教授, 硕士学位, 主要从事临床药理学和药物研发工作。

购自上海诗丹德生物技术有限公司。丹参药材购于湖南省药材公司, 产地安徽, 本品经干燥后粉碎, 过 20 目筛, 经过超临界 CO₂ 萃取丹参脂溶性成分后的萃取物用于本次实验。甲醇、乙腈 (色谱纯, Tedia 公司), 其余试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水 (自制)。

1.2 仪器 高效液相色谱仪, 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, SPD-20A 紫外检测器, LC solution 工作站; 超临界萃取设备, HA231-50-06 型超临界流体萃取器 (江苏南通华安超临界萃取有限公司); AL204 精密电子天平 (METTLER TOLEDO); 高速离心机。

2 方法与结果

2.1 丹酚酸 B 的测定^[5]

2.1.1 色谱条件 色谱柱 ultimate XB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇: 乙腈: 甲酸: 水 (29: 9: 1: 61), 流速为 1 ml/min, 柱温为室温, 检测波长 286 nm。丹酚酸 B 的保留时间为 14.3 min 不受其它成分的干扰, 理论塔板数以丹酚酸 B 峰计算应不低于 3 000。色谱图见图 1~2。

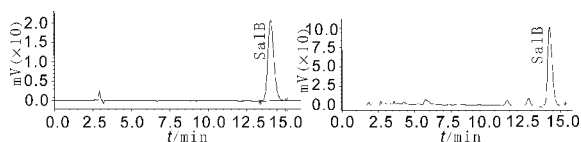


图 1 丹酚酸标准品 HPLC 图

图 2 样品溶液 HPLC 图

2.1.2 线性关系考察 精密称取丹酚酸 B 对照品 4.6 mg 置 10 ml 量瓶中, 加 75% 的甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得 0.46 mg/ml 的丹酚酸 B 对照品溶液。加流动相稀释成一系列溶液, 分别进样 5 μl 记录峰面积, 以峰面积与浓度进行线性回归, 得标准曲

线方程 $Y = 5.827.6X - 1.746.6$ $r = 0.9999$ 。丹酚酸 B 在 $7.2 \sim 460 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时峰面积与其浓度具有良好线性关系。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密吸取正交实验溶液 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中,再用流动相定容至刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液。

2.2 提取工艺考察

2.2.1 夹带剂中加入表面活性剂萃取丹酚酸 B 参考文献 [6],在超临界萃取的夹带剂中加入表面活性剂形成多元醇混合体系来萃取丹酚酸 B。准确称取丹参萃余物 300 g 放入萃取罐中,加入夹带剂 300 mL 并按如下因素水平表 1 进行超临界 CO_2 萃取实验。考察萃取温度、萃取压力、萃取时间、夹带剂种类 4 个因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验 (见表 1)。收集萃取液,滤过并定容至 300 mL 以萃取液中丹酚酸 B 的含量为考察指标,测定结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 因素水平

水平	A 夹带剂	B 萃取压力 V/MPa	C 萃取温度 $T/^\circ\text{C}$	D 萃取时间 t/h
1	10% 乙醇 + 5% 司盘 - 80	20	45	1
2	10% 乙醇 + 5% 吐温 - 80	25	55	1.5
3	10% 乙醇 + 5% 泊洛沙姆 - 118	30	65	2

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	丹酚酸 B/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	1	1	1	1	140
2	1	2	2	2	144
3	1	3	3	3	146
4	2	1	2	3	154
5	2	2	3	1	148
6	2	3	1	2	150
7	3	1	3	2	144
8	3	2	1	3	137
9	3	3	2	1	146
K_1	430.00	438.00	427.00	434.00	
K_2	452.00	429.00	444.00	438.00	
K_3	427.00	442.00	438.00	437.00	
R	8.33	4.33	5.67	1.33	

表 3 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性 P
A	124.22	2	43.00	< 0.05
B	29.56	2	10.23	> 0.05
C	49.56	2	17.15	> 0.05
D	2.89	2	1.00	> 0.05

$F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$

由统计学分析结果表明, A 因素对提取的影响具有显著性意义 ($P < 0.05$), B、C、D 因素的影响无显著性意义。提取率较好的条件是 $A_2B_3C_2D_2$, 即选用 10% 乙醇 + 5% 吐温 - 80 作为夹带剂, 萃取压力为 30 MPa 温度为 55°C , 萃取 1.5 h 。按上面的较佳工艺条件重复 3 次进行验证, 结果丹酚酸 B 平均提取率为 1.51% , $RSD = 3.17\%$ 。

2.2.2 夹带剂中不加入表面活性剂萃取丹酚酸 B 按上述最佳条件, 夹带剂中不加入表面活性剂来萃取丹参。准确称取丹参萃余物 300 g 以 300 mL 的 10% 乙醇为夹带剂, 压力为 30 MPa 温度为 55°C 萃取 1.5 h 减压收集萃取液, 并定容至 300 mL 按“2.1.3”项下方法处理并进样分析, 结果丹酚酸 B 提取率为 0.26% 。对丹参药材进行超临界 CO_2 萃取, 加入非离子表面活性剂的多元醇混合体系比只用乙醇作夹带剂提取丹酚酸 B 的效率约 6 倍。

3 讨论

近年来对丹参水溶性成分提取方面的研究比较多, 涉及的方法主要有水回流法、渗漉法、超声法等 [7]。常规的水回流法使有

效成分在提取过程中由于长时间加热损失比较多, 而渗漉法耗时而且丹酚酸 B 容易在放置过程中分解。此外, 由于超临界萃取后的萃余物颗粒较细, 用水回流提取时很容易堵塞回流管路, 同时药粉容易粘在器壁上而糊化, 一定程度上降低了丹酚酸 B 的提取率。而超临界 CO_2 萃取工艺简单、选择性好、生产周期短, 整个过程中温度较低。根据“相似相溶”原则, 超临界 CO_2 具有选择性溶解能力, 它对低分子、低极性、亲脂性、低沸点的成分如挥发油、烃、酯、内酯、醚和环氧化物等物质表现出优异的溶解性 [8-9]。但对具有极性基团 ($-\text{COOH}$ 和 $-\text{OH}$ 等) 的化合物, 极性基团越多, 就越难萃取, 但是正确使用夹带剂则可以大幅提高超临界 CO_2 对此类物质的萃取效率。本实验在夹带剂中加入非离子表面活性剂而使产品的收率得到很大的提高。通过本次实验得出如下结论: 超临界 CO_2 萃取丹酚酸 B 的最佳工艺为萃取温度 55°C , 压力 30 MPa 夹带剂选择 10% 乙醇 + 5% 吐温 - 80, 用量与药材相等, 萃取时间 1.5 h 。对丹参药材进行超临界 CO_2 萃取, 加入非离子表面活性剂的多元醇混合体系比只用乙醇作夹带剂提取丹酚酸 B 的效率约 6 倍。

对于超临界 CO_2 萃取体系, 由于丹酚酸 B 在超临界 CO_2 中是不能溶解的, 主要靠夹带剂乙醇溶解。一般认为是溶质 (丹酚酸 B) 与夹带剂 (乙醇) 分子间相互作用是夹带剂发挥作用的最主要因素, 尽管丹酚酸 B 在乙醇中有一定的溶解度, 但是由于 CO_2 的分子极性比一些烷烃类还弱, 乙醇对其分子极化率十分低, 使得与乙醇分子之间的作用力十分微弱, 因此虽然使用了一定量的乙醇作夹带剂, 但对极性物质 (丹酚酸 B) 的萃取效果仍很低。另外, 由于表面活性剂可以起到润湿增溶的作用, 使药材与溶剂间的界面张力降低, 可以较好的促进溶媒对药材的润湿渗透 [10]。因此, 在超临界 CO_2 中引入多元醇混合体系能显著提高 CO_2 对极性物质的溶解度, 增大其萃取率, 扩大了超临界 CO_2 萃取对象的范围。

如用水回流法提取丹参萃余物, 由于药渣粉末很细, 而且粘液质很多, 给过滤带来一定的困难, 而超临界 CO_2 萃取液含杂质较少, 很容易过滤, 同时提取完丹参的脂溶性成分后只需要改变夹带剂和相关参数就能对丹参的水溶性成分进行提取, 使整个提取过程连续化, 给工业化生产带来较大方便。此外, 超临界 CO_2 萃取选择性好, 萃取液较常规水回流提取液所含杂质少, 有利于进一步纯化。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典, I 部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 52

[2] Adam Matkowski, Sylwia Zielińska. Activity of extracts from leaves and roots of *Salvia iltis* Bunge, *S. przewalskii* Maxim, and *S. verticillata* L. [J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(16): 7892

[3] Johnston K P, Harrison K L, Clarke M J et al. Water-in-carbon dioxide microemulsion: an environment for hydrophiles including proteins [J]. *Science*, 1996 271(2): 624

[4] 葛发欢, 黄星, 谭晓华, 等. 非离子表面活性剂对超临界 CO_2 从苦参中萃取苦参碱类的影响 [J]. *中药材*, 2003, 26(6): 426

[5] 江莉华, 徐天生, 陈兴兴, 等. 高效液相色谱测定丹参中丹酚酸 B 含量的方法研究 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(6): 1395

[6] 李霞, 唐玉海, 赵新锋, 等. CO_2 超临界流体萃取丹参中的有效成分 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2004 25(6): 614

[7] 刘敏彦, 赵韶华, 盖潇桦, 等. 丹参不同提取方法中水溶性成分含量的比较研究 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(5): 1186

[8] 廖传华. 超临界流体技术及其过程强化 [M]. 北京: 中国石化出版社, 2007: 71

[9] 王志祥, 刘亚娟, 刘芸. 超临界流体萃取技术及其在中药开发中的应用 [J]. *时珍国医国药*, 2006 17(4): 651

[10] 罗登林, 聂英, 刘建学, 等. 超临界 CO_2 反相微乳萃取人参中人参皂苷的研究 [J]. *中草药*, 2007 38(7): 1003