

超临界CO₂萃取干姜的工艺优化^Δ

冯青云^{1,2*},周昌妮¹,陈书慧¹,徐如冰¹,田效志¹,贾永艳^{1,3#}(1.河南中医学院药学院,郑州 450046;2.石家庄医学高等专科学校中药系,石家庄 050000;3.呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心,郑州 450046)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3552-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.29

摘要 目的:优化超临界CO₂萃取干姜的工艺条件。方法:采用均匀设计法,以姜酚类成分6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚的含量和干姜油萃取率的综合评分为指标,考察萃取压力、萃取温度、萃取时间3个因素对萃取效果的影响;同时进行验证试验。结果:优化的萃取工艺为压力25 MPa、温度30 ℃、时间2 h;验证试验中干姜油的平均萃取率为3.2%,综合评分为1.874 2(RSD=0.65%,n=3);实测值与预测值的相对偏差为0.6%。结论:所得最优萃取工艺条件稳定可行,具有温度低、耗时短等优点。

关键词 干姜;超临界CO₂萃取;均匀设计;姜酚类成分;提取率

Technology Optimization of Supercritical CO₂ Extraction from *Zingiberis rhizoma*

FENG Qingyun^{1,2}, ZHOU Changni¹, CHEN Shuhui¹, XU Rubing¹, TIAN Xiaozhi¹, JIA Yongyan^{1,3} (1.College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2.Dept. of TCM, Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050000, China; 3.Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the technology of supercritical CO₂ extraction from *Zingiberis rhizoma*. METHODS: With the comprehensive score of the contents of 6-ginger phenol, 8-ginger phenol and 10-ginger phenol and the extraction rate of the oil from *Z. rhizoma* as the index, uniform design method was adopted to investigate the effects of extraction pressure, extraction temperature and extraction duration on the extraction result; verification tests were conducted. RESULTS: The optimal conditions were as follows as the extraction pressure of 25 MPa, extraction temperature of 30 ℃ and extraction duration of 2 h. In the verification tests, the average extraction rate of the oil from *Z. rhizoma* was 3.2% (n=3), and the comprehensive score was 1.874 2 (RSD=0.65%, n=3), with the relative deviation of 0.6% between the measured value and the predicted value. CONCLUSIONS: The optimal extraction technology is stable and feasible, with the advantages of low temperature, short duration.

KEYWORDS *Zingiberis rhizoma*; Supercritical CO₂ extraction; Uniform design; Ginger phenolic components; Extraction rate

干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc.的干燥根茎,具有温中散寒、燥湿消痰、回阳通脉之功效,主要用于改善脘腹冷痛、呕吐泄泻、肢冷脉微、痰饮喘咳等症状^[1]。干姜含15%姜辣素及少量挥发油,其中姜辣素主要包括6-姜酚及其分解产物姜烯酚、姜酮和姜萜酮等,具有抗氧化、抑制胃黏膜损伤、增加胆汁分泌等作用^[2]。一般来说,超临界萃取得到的萃取物成分的量 and 挥发性成分种类远远多于水蒸气蒸馏法^[3]。因此,本试验以干姜中姜酚类成分6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚的含量和干姜油萃取率的综合评分为指标,采用均匀设计法筛选超临界萃取干姜的最佳工艺。

1 材料

1.1 仪器

DIONEX Summit 系统高效液相色谱(HPLC)仪,包括DI-ONEXP-600 泵、TCC-100 柱温箱、PDA-100 检测器(美国戴安公司);AE 240 十万分之一天平(德国梅特勒公司);KQ-100 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FW-200 高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司);HA221-50-06 超临界萃取装置(江苏南通华安超临界萃取有限公司)。

1.2 药品与试剂

二氧化碳(CO₂,纯度:≥99.5%)购自河南源正科技发展有限公司;6-姜酚对照品(批号:140124,纯度:≥98%)购自四川省维克奇生物科技有限公司;8-姜酚对照品(批号:1508240,

[14] Gala-García A, Carneiro MB, Silva GA, *et al.* In vitro and in vivo evaluation of the biocompatibility of a calcium phosphate/poly (lactic-co-glycolic acid) composite[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23(7): 1 785.

Δ 基金项目:河南省科技攻关计划项目(No.092102310112);呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心基金项目(No.20130012)

* 硕士。研究方向:药物制剂新技术、新剂型及新药。E-mail: 417018951@qq.com

通信作者:教授。研究方向:药物制剂新技术、新剂型及新药。E-mail: hnzyjy@126.com

[15] Ford Versypt AN, Pack DW, Braatz RD. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres: a review[J]. *J Control Release*, 2013, 165(1): 29.

[16] Lin CY, Lin SJ, Yang YC. Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11(3): 6 500.

(收稿日期:2016-03-07 修回日期:2016-04-07)
(编辑:邹丽娟)

纯度:≥98%)、10-姜酚对照品(批号:1508240,纯度:≥98%)均购自成都克洛玛生物科技有限公司;干姜(产地:四川,批号:20150316)购自河南中原正信药材有限责任公司;无水乙醇(批号:20150119)购自天津市致远化学试剂有限公司;乙腈(批号:150907)购自天津四友精细化学品有限公司;其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 3种姜酚类成分含量测定方法学考察

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Venusil XBP C₁₈(L) 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈(A)-0.1%冰醋酸(B), 梯度洗脱(0~20 min, 45% A→65% A; 20~40 min, 60% A→75% A; 40~50 min, 75% A→45% A; 50~75 min, 45% A);流速: 1 ml/min;柱温: 30 ℃;检测波长: 280 nm;进样量: 10 μl。在此色谱条件下, 取“2.1.2”~“2.1.4”项下溶液进样分析, 结果, 待测成分与其他成分均达到基线分离, 理论板数均大于4 000, 分离度均大于1.5。色谱图见图1。

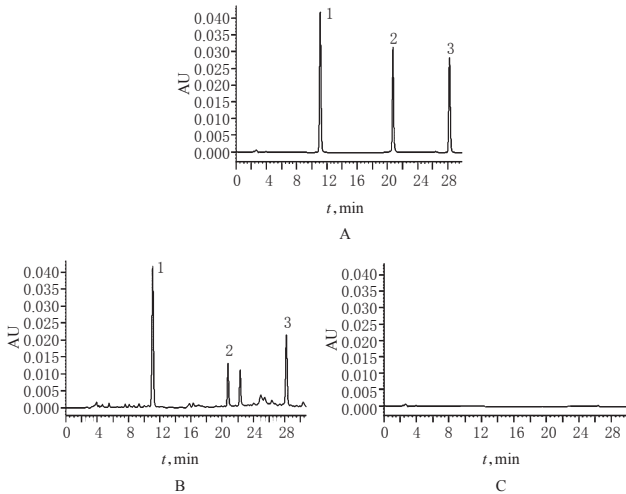


图1 高效液相色谱图

A. 无水乙醇;B. 供试品;C. 干姜阴性样品;1. 6-姜酚;2. 10-姜酚;3. 8-姜酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A. absolute ethyl alcohol; B. test sample; C. negative sample of *Z. rhizoma*; 1. 6-ginger phenol; 2. 10-ginger phenol; 3. 8-ginger phenol

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚对照品适量, 加无水乙醇溶解, 制成每1 ml含6-姜酚105 μg、10-姜酚71 μg、8-姜酚88 μg的混合溶液作为混合对照品母液;再分别精密吸取0.25、3.5、6 ml, 置于10 ml量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取干姜萃取物约10.2 mg, 加无水乙醇溶解并定容于10 ml量瓶中, 超声(功率:1 200 W, 频率: 50 Hz)5 min, 用0.22 μm滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 干姜阴性样品的制备 取无水以醇定容于10 ml量瓶中, 用0.22 μm滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.2”项下混合对照品母液及各稀释液10 μl, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标, 绘制标准曲线。6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚的回归方程和线性范围见表1。

2.1.6 精密度试验 取“2.1.3”项供试品溶液, 重复进样5次, 测定峰面积并记录RSD。结果, 6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚的RSD分别为0.69%、0.83%、0.92% (n=5), 表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.3”项供试品溶液, 分别于放置0、

表1 3种成分的回归方程和线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range of the three kinds of components

成分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
6-姜酚	y=5 466.8x-8 767.7	0.999 4	26.25~105
10-姜酚	y=5 085.2x-6 722.1	0.999 5	17.75~71
8-姜酚	y=4 233.6x+3 487.9	0.999 3	22.05~88

2、4、6、8、10、12 h时进样测定, 记录峰面积。结果, 6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚峰面积的RSD分别为1.09%、0.57%、0.86% (n=7), 表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 称取同一干姜萃取物约8.4 mg, 共6份, 置于10 ml量瓶中, 按“2.1.3”项下制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下方法进样测定, 记录峰面积。结果, 6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚峰面积的RSD分别为1.41%、1.35%、1.19% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 称取同一干姜萃取物约4.2 mg, 共6份, 置于10 ml量瓶中, 分别加入含6-姜酚0.39 mg/L、10-姜酚0.12 mg/L、8-姜酚0.3 mg/L的对照品混合溶液1 ml, 以无水乙醇溶解并定容。按“2.1.3”项下制备供试品溶液, 吸取上述6份供试品溶液10 μl, 按“2.1.1”项下方法进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率。结果, 6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚的平均加样回收率分别为105.7%、104.2%、108.3%, RSD分别为1.25%、1.39%、1.03% (n=3)。

2.1.10 检测限与定量限试验 精密称取6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚对照品各2.5 mg, 置于50 ml量瓶中, 加无水乙醇溶解并定容, 制得质量浓度为0.05 mg/ml的标准溶液。吸取1 ml于10 ml量瓶中, 加无水乙醇定容, 如此逐级稀释, 进样测定。按信噪比为3计算, 6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚的检测限分别为0.1、10、1 ng;按信噪比为10计算, 其定量限分别为0.5、50、5 ng。

2.2 超临界CO₂萃取干姜工艺

2.2.1 超临界CO₂萃取干姜萃取率的计算公式 干姜萃取率=萃取物质量/药材质量×100%。

2.2.2 综合评分指标的确定 在多指标试验中, 各试验因素及其水平对各试验指标的影响往往是不同的。加权系数的大小体现了各项指标的重要程度。因此从多成分的综合整体特征更接近于真实质量的观点出发^[4], 给予3种不同姜酚类成分指标权重各30%, 萃取率指标权重10%。因此, 综合评分=30%×6-姜酚含量+30%×10-姜酚含量+30%×8-姜酚含量+10%×挥发油萃取率。

2.2.3 超临界CO₂萃取干姜工艺的均匀设计试验 为确定最优工艺条件, 通过预试验并参考文献[5-6], 本试验以干姜化合物中6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚的含量和干姜油的萃取率的综合评分为指标, 以萃取压力(A)、萃取温度(B)和萃取时间(C)为考察因素, 选用均匀设计试验优选干姜的萃取条件。将干姜药材粉碎成粗粉, 称取6份, 每份200 g, 按照U₅(5³)表安排试验。因素与水平见表2, 试验安排与结果见表3。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A, MPa	B, ℃	C, h
1	15	30	1
2	20	35	1.5
3	25	40	2
4	30	45	2.5
5	35	50	3

表3 试验安排与结果

Tab 3 Arrangement and results of tests

编号	A	B	C	挥发油萃 取率, %	6-姜酚含 量, mg/g	10-姜酚含 量, mg/g	8-姜酚含 量, mg/g	综合 评分
1	15	35	2.5	3.01	3.13	0.84	1.93	1.076
2	20	45	2	2.21	2.28	0.62	1.50	0.801
3	25	30	1.5	3.21	3.53	0.96	2.30	1.221
4	30	40	1	2.80	1.81	0.50	1.10	0.727
5	35	50	3	1.32	2.38	0.65	1.50	0.678

将表3得到的结果利用均匀设计数据处理软件DPS 9.50(标准版)进行二次多项式逐步回归,得方程 $y=2.618\ 3-0.057\ 1B-0.111C^2+0.012\ 9BC(r=0.994\ 4)$ 。各因素回归系数的 t 检验结果见表4。

表4 各因素回归系数的 t 检验结果

Tab 4 t -test results of regression coefficients of each factor

因素	偏相关系数	t	P
A	-0.356	-0.539	0.644
B	-0.911	-3.843	0.013
C	0.822	2.039	0.178

由表4可知,B项对试验结果有显著影响($P=0.013$),说明萃取温度对姜酚类成分萃取率影响较大。根据回归方程,求出各因素最优值为:A=26.196 5 MPa,B=30 ℃,C=1.764 8 h;在此组合基础上求出最优解: $y=1.743\ 8$ 。

2.2.4 回归方程分析 由回归方程中各因素的系数可见,萃取温度对姜酚类成分萃取量的影响为负效应。由最优方案可知,使用超临界CO₂萃取干姜姜酚类成分,萃取温度为30 ℃。由于因素A、C对方程贡献值较小^[7],因此,综合考虑确定超临界CO₂萃取干姜工艺为:萃取压力25 MPa,萃取温度30 ℃,萃取时间2 h。

2.2.5 萃取工艺验证 按上述筛选的最优萃取工艺取干姜药材粗粉3份,每份200 g,进行验证试验。结果,每1 g生药含6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚3.22、0.93、2.1 mg,RSD值分别为0.95%、0.62%、1%($n=3$);干姜油的平均萃取率为3.2%(RSD=0.57%, $n=3$);综合评分可达1.874 2(RSD=0.65%, $n=3$);实测值与预测值的相对偏差为0.6%。

3 讨论

超临界流体萃取法具有条件温和、可有效避免挥发油中热敏性物质分解与异构化、提取率高等优点^[8]。超临界CO₂低温萃取干姜,不仅可保存干姜中有效成分的完整性,还可保持药材原有的气味。相关研究优化超临界CO₂萃取姜油工艺多以姜油的萃取率和6-姜酚的含量为指标^[9-11],但10-姜酚、8-姜酚也是干姜中的主要特征性成分,含量较高,药理活性显著且与干姜的主治功能相关^[12]。因此本试验将6-姜酚、10-姜酚、8-姜酚的含量纳入研究指标,优化超临界CO₂萃取干姜的工艺,以充分、高效地萃取干姜中的有效成分。前期试验分别考察了甲醇和无水乙醇对干姜中有效成分色谱峰的影响,结果以无水乙醇为溶剂时,干扰的杂质峰少、分离度较好。

预试验结果表明,在一定条件下,萃取压力越高,超临界流体密度越大,其溶解能力越强,溶质溶解度越大,出油率也随之增加。但当萃取压力增加到一定程度时,干姜油在超临界流体的溶解度增加速度趋于缓慢,出油率增幅也很小。因

此萃取压力是影响萃取过程的重要因素之一。而萃取温度不仅影响干姜的出油率,还会影响干姜油的活性成分,且出油率会随温度的升高而下降。萃取温度与萃取压力关系密切,需根据萃取压力确定较佳的萃取温度^[5]。萃取率随着萃取时间的延长而逐渐增加,但超过一定时间后,萃取率增加的幅度明显减少。

近年来,均匀设计用于提取工艺研究的应用较多^[13],其可将试验有关因素的各水平均匀分散在实验范围内,使每一个试验点都有更好的代表性^[14]。试验结果可用计算机处理,并通过回归方程得出理论上最优的试验条件^[15]。

综上所述,本研究建立的干姜萃取工艺条件稳定可行,具有温度低、耗时短等优点。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:14.
- [2] 熊晶晶,张玉琼,周昌妮,等.均匀试验设计优选干姜超临界萃取物微囊制备工艺[J].中国现代中药,2015,17(4):395.
- [3] 陈子勇,朱巍,彤霖,等.干姜的超临界萃取及其萃取物在卷烟中的应用[J].香料香精化妆品,2010,8(4):6.
- [4] 郑伟然,陶永华,苗宏伟,等.炮姜超临界CO₂萃取6-姜酚的工艺研究[J].中草药,2011,42(10):2 023.
- [5] 杨明,余德顺,田弋夫,等.超临界CO₂萃取与水蒸气蒸馏提取姜油的GC-MS分析[J].贵州化工,2011,36(3):34.
- [6] 崔红花,赵英日,王淑美.大黄蒽醌类成分的提取方法筛选及均匀设计优化工艺研究[J].中国药房,2010,21(7):612.
- [7] 贾永艳,周红敏,贾永,等.均匀试验设计法优选产妇康颗粒提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):32.
- [8] 李晓宁,杨银花,赵博琛,等.超临界CO₂流体技术萃取当归挥发油的工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(14):27.
- [9] 李翔,王敏,郭丽红,等.正交设计用于干姜中6-姜酚提取优化的研究[J].华北国防医药,2010,22(6):525.
- [10] 陈艳,何苒,曾明,等.正交设计优化超临界CO₂萃取姜油工艺[J].中国药师,2009,12(9):1 196.
- [11] 韩亮,余楚钦,李勇.干姜超临界CO₂流体萃取工艺研究[J].广东药学院学报,2013,29(4):386.
- [12] 孟江,卢国勇,程轩轩,等.一测多评法同时测定干姜中4种姜酚类成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):77.
- [13] 陈靖,刘建鑫,何其睿,等.黄芪炮制工艺优化及不同炮制品成分比较[J].中国药房,2012,23(39):3 679.
- [14] 赵万晴.均匀设计在药物制剂中的应用[J].安徽医药,2010,14(5):610.
- [15] 殷明阳,刘素香,张铁军,等.复方中药提取工艺研究概况[J].中草药,2015,46(21):3 279.

(收稿日期:2015-12-18 修回日期:2016-07-11)

(编辑:刘明伟)