

超临界 CO₂ 萃取连翘挥发油的正交试验 和 GC- MS 分析

王 鹏¹, 张忠义¹, 吴惠勤²

(1. 第一军医大学 珠江医院, 广东 广州 510282; 2. 中国广州分析测试中心, 广东 广州 510070)

摘 要: 采用正交试验法对超临界 CO₂ 萃取连翘挥发油的条件进行了研究; 结果显示最佳萃取条件为萃取压力 30 MPa, 萃取温度 35 °C, 解析压力 6.7 MPa, 解析温度 50 °C, 粉碎度 0.55 mm; 按对结果的影响大小依次排列为萃取温度, 粉碎度, 萃取压力, 解析压力, 解析温度; 用气相色谱- 质谱联用技术测定了最佳萃取条件所得连翘挥发油的化学成分, 从中鉴定出 21 种成分, 并测定了其相对含量, 主要成分为 α-蒎烯、β-蒎烯、萜品醇₄、α-萜品醇、苯甲醇等。

关键词: 连翘; 超临界萃取; 二氧化碳; 挥发油; 正交试验; 气相色谱- 质谱法

中图分类号: Q949.776.2; R248.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2002)04-0034-03

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。秋季果实初熟尚带绿色时采收, 除去杂质, 蒸熟, 晒干, 习称“青翘”; 果实熟透时采收, 晒干, 除去杂质, 习称“老翘”。其味苦, 性微寒, 归肺、心、小肠经, 具有清热解毒, 消肿散结之功效; 主治痈疽, 瘰疬, 乳痈, 丹毒, 风热感冒, 温病初起, 温热入营, 高热烦渴, 神昏发斑, 热淋尿闭。连翘的主要成分有挥发油、苯乙醇甙类、木脂素类、三萜类、香豆素类等^[1]。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

连翘为市售老翘, 购于广州市药材公司, 经鉴定为木犀科植物连翘的干燥成熟果实。HA_230_50_03 超临界萃取装置(南通华安超临界实业公司生产, 2.5 L 萃取釜), HP 6890/5973 气相色谱- 质谱联用仪(美国)。

1.2 挥发油萃取方法

萃取工艺设计: 选定 5 个因素 3 个水平, 根据正交设计方法按表 L₁₈(3⁵) 安排试验, 以挥发油的量为考察指标, 因素水平安排见表 1。

表 1 因素水平表
Table 1 Factors and levels

Level	Factor				
	A Extraction pressure <i>p_F</i> /MPa	B Extraction temperature <i>t_F</i> /°C	C Separate pressure <i>p_S</i> /MPa	D Separate temperature <i>t_S</i> /°C	E Degrees of crush <i>d</i> /mm
1	20	35	6.3	30	no crush
2	25	40	6.7	40	3.00
3	30	45	7.1	50	0.55

超临界 CO₂ 萃取流程: CO₂ 钢瓶 → 冷冻系统 → 高压泵 → 萃取釜 → 解析釜 I → 解析釜 II → 冷冻系统(循环)。将 300 g 连翘投入超临界萃取釜中, 对萃取釜和 2 个解析釜进行加热, 贮罐进行冷却, 当温度达到预定的温度时, 打开 CO₂ 气瓶送气, 并打开高压泵升压, 压力达到预定压力时, 开始循环萃取, 调节流量为 20 kg/h, 恒温恒压萃取 3 h 出料。

1.3 GC- MS 分离与鉴定

样品处理: 挥发油约 1 g 用 50 mL 乙醚溶解, 振摇 5 min, 加无水硫酸钠(至不结块为止)干燥, 过滤, 挥去乙醚至 5 mL, 即可进样。

收稿日期: 2002-01-06 修回日期: 2002-06-14

基金项目: 广东省科技攻关项目(2KB01202S)

作者简介: 王 鹏(1972-), 男, 江西南昌人, 硕士研究生。

GC 条件: 色谱柱 HP_1 30 m×0.1 mm×0.1 μm, 柱前压 50 kPa, 分流比 10: 1, 进样量 1 μL, 柱温 65~ 260 °C, 程序升温速率 10 °C/min, 进样口温度 260 °C, 载气为 He。

MS 条件: 电离源 EI, 离子源温度 230 °C, 连接线温度 280 °C, 倍增电压 1 800 V, 扫描范围 29~400 u。

2 结果与讨论

2.1 正交试验结果

正交试验结果列于表 2。表 2 中 K_1 、 K_2 、 K_3 为相应水平所得出料量的总和, \bar{K}_1 、 \bar{K}_2 、 \bar{K}_3 分别为 K_1 、 K_2 、 K_3 的平均值, R 为极差即 $\bar{K}_{\max} - \bar{K}_{\min}$ 。从表 2 可以看出: (A) $\bar{K}_3 > \bar{K}_1 > \bar{K}_2$, (B) $\bar{K}_1 > \bar{K}_2 > \bar{K}_3$, (C) $\bar{K}_2 > \bar{K}_3 > \bar{K}_1$, (D) $\bar{K}_3 > \bar{K}_2 > \bar{K}_1$, (E) $\bar{K}_3 > \bar{K}_2 > \bar{K}_1$ 。因此, 挥发油的最佳组合萃取条件为 A₃B₁C₂D₃E₃ 即萃取压力 30 MPa、萃取温度 35 °C、解析釜 I 压力 6.7 MPa、解析 I 温度 50 °C、粉碎度 0.55 mm。

表 3 为正交试验结果的方差分析表。表 3 中 S 为变差平方和, DF 为自由度, MS 为均方。由于 $S_B > S_E > S_A > S_C > S_D$, 各因素对试验结果的影响大小依次为: 萃取温度, 粉碎度, 萃取压力, 解析压力, 解析温度。表 3 的方差分析表明, 在试验范围内萃取温度、粉碎度、萃取压力对挥发油得率有极显著性影响, 解析压力对挥发油得率有显著性影响, 而解析温度影响较小。

2.2 最佳萃取条件的萃取效果

为了进一步考察上述最佳萃取条件的萃取效果, 将 7 kg 连翘用上述最佳条件萃取, 得挥发油 296 g, 收率 4.23%, 高于正交试验中的最高收率 3.93%。

2.3 GC-MS 分析

对按最佳萃取条件萃取所得的挥发油按上述 GC-MS 条件进行分析, 其总离子流图见图 1。经计算机检索(质谱数据库 NIST、NBS)及人工解析质谱并与标准谱图^[2]核对, 共鉴定出 21 个成分, 主要有: α-蒎烯、β-蒎烯、萜品醇₄、α-萜品醇、苯甲醇等, 用峰面积归一化法测出它们的相对含量, 结果见表 4。

2.4 讨论

影响超临界 CO₂ 萃取的因素有: 萃取压力、萃取温度、解析压力、解析温度、萃取物颗粒大小、CO₂ 流量、夹带剂等。在预试验中, CO₂ 流量因不好控制, 所以未将其列入考察因素, 夹带剂的影响已另行试验考察。在预试验中, 萃取压力低于 20 MPa 未得到产物, 而 30 MPa 接近仪器设计的最高压力, 所以萃取压力选择 20、25、30 MPa 3 个水

表 2 正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal experiment

No	Factor					Extractive result m/g
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	0.8
2	1	2	2	2	2	6
3	1	3	3	3	3	4.9
4	2	1	1	2	2	2
5	2	2	2	3	3	2.5
6	2	3	3	1	1	1.4
7	3	1	2	1	3	11.8
8	3	2	3	2	1	3.2
9	3	3	1	3	2	2.1
10	1	1	3	3	2	6.5
11	1	2	1	1	3	4.2
12	1	3	2	2	1	0.7
13	2	1	2	3	1	4.8
14	2	2	3	1	2	1.4
15	2	3	1	2	3	2.3
16	3	1	3	2	3	8.5
17	3	2	1	3	1	4
18	3	3	2	1	2	0.8
K_1	23.1	34.4	15.4	20.4	14.9	
K_2	14.4	21.3	26.6	22.7	18.8	
K_3	30.4	12.2	25.9	24.8	34.2	
\bar{K}_1	3.85	5.73	2.57	3.40	2.48	
\bar{K}_2	2.40	3.55	4.43	3.78	3.13	
\bar{K}_3	5.07	2.03	4.32	4.13	5.70	
R	2.67	3.70	1.86	0.73	3.22	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

	S	DF	MS	F	$F_{1-\alpha}$	P
A	10.72	2	5.36	13.4	13.3 [*]	< 0.01
B	20.75	2	10.38	25.95		< 0.01
C	6.53	2	3.27	8.18	5.79 ^{**}	< 0.05
D	0.80	2	0.40	1		> 0.05
E	17.40	2	8.70	21.75		< 0.01
Emor	17.09	4	4.27			

* $\alpha = 0.01$; ** $\alpha = 0.05$

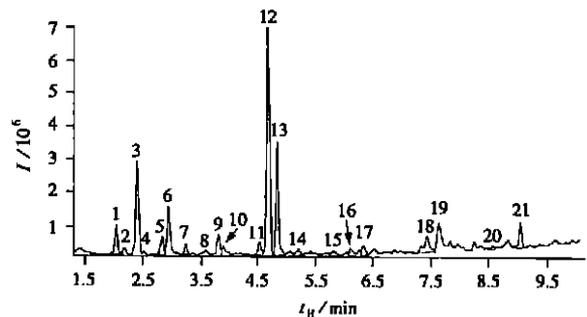


图 1 连翘挥发油的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the essential oil from Fructus Forsythiae

平。萃取温度在 31.1 °C 是临界值, 高于此温度才是超临界状态, 45 °C 是挥发油萃取常用的较高温度, 所以选择 35、40、45 °C 3 个水平。本实验解析釜 I、解析釜 II 均采用相同的压力和温度。当解析釜压力低于 6.3 MPa 时, 设备不能正常运行; 7.32 MPa 是临界点, 低于此压力是非超临界状态, 溶解于 CO₂ 的成分才能解析出来, 所以解析压力选择 6.3、6.7、7.1 MPa 3 个水平。解析温度常用 30、40、50 °C 3 个水平。药材过细的粉碎会严重堵塞筛孔, 所以选择不粉碎、3.00 mm、0.55 mm 3 个水平。

表 4 连翘挥发油化学成分分析结果

Table 4 Analytical results of chemical constituents of the essential oil from Fructus Forsythiae

No	<i>t_R</i> /min	Compound	Molecular	Relative	Relative content	Similarity
			formula	molecular mass	%	%
1	2.03	α-Pinene(α-蒎烯)	136	C ₁₀ H ₁₆	3.41	98
2	2.18	Camphene(莜烯)	136	C ₁₀ H ₁₆	1.19	95
3	2.41	β-Pinene(β-蒎烯)	136	C ₁₀ H ₁₆	11.95	97
4	2.51	Myrcene(月桂烯)	136	C ₁₀ H ₁₆	0.41	90
5	2.85	1-Methyl-2-isopropylbenzene(1-甲基-2-异丙基苯)	134	C ₁₀ H ₁₄	2.84	88
6	2.94	Benzyl alcohol(苯甲醇)	108	C ₇ H ₈ O	7.06	99
7	3.25	γ-Terpinene(γ-萜品烯)	136	C ₁₀ H ₁₆	1.08	93
8	3.59	α-Terpinolene(α-萜品油烯)	136	C ₁₀ H ₁₆	0.62	95
9	3.81	Phenylethyl alcohol(苯乙醇)	122	C ₈ H ₁₀ O	2.94	95
10	3.90	Fenchol(葑醇)	154	C ₁₀ H ₁₈ O	1.27	96
11	4.54	Borneol(冰片)	154	C ₁₀ H ₁₈ O	2.22	90
12	4.68	Terpineol-4(萜品醇-4)	154	C ₁₀ H ₁₈ O	30.95	91
13	4.84	α-Terpineol(α-萜品醇)	154	C ₁₀ H ₁₈ O	13.62	97
14	5.21	2-Hydroxycineole(2-羟基桉树脑)	170	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.96	95
15	5.82	1-Methyl-4-isopropylbenzene(1-甲基-4-异丙基苯)	134	C ₁₀ H ₁₄	0.82	94
16	6.11	p-Isopropylbenzyl alcohol(对-异丙基苯甲醇)	150	C ₁₀ H ₁₄ O	0.74	98
17	6.33	2,4-Decadienal(2,4-癸二烯醛)	152	C ₁₀ H ₁₆ O	1.37	86
18	7.34	α-Copaene(α-蒎烯)	204	C ₁₅ H ₂₄	0.94	99
19	7.44	Vanillin(香草醛)	152	C ₈ H ₈ O ₃	2.69	97
20	8.57	γ-Cadinene(γ-杜松烯)	204	C ₁₅ H ₂₄	0.53	96
21	9.05	δ-Cadinene(δ-杜松烯)	204	C ₁₅ H ₂₄	3.25	97

超临界 CO₂ 萃取具有很多其它提取方法不具备的优点, 特别适合于挥发油等热敏性成分的提取。如采用水蒸气蒸馏法, 因其加热时间长, 提取温度高, 易使对湿热不稳定的挥发成分发生变化, 用超临界 CO₂ 进行萃取, 可以克服上述缺点, 还可以得到用水蒸气蒸馏法得不到的成分。本试验中没有进行超临界 CO₂ 萃取法与连翘挥发油传统提取方法的比较, 有待进一步实验研究。

挥发油类成分因其相对分子质量较小, 亲脂性和低沸点, 采用超临界 CO₂ 萃取易得到。本法共分离出 43 个化合物, 鉴定出其中 21 种成分, 占相对含量 90.86%, α-萜品油烯、香草醛、γ-杜松烯为首次从连翘中分离得到。

本研究通过正交试验确定了最佳萃取条件, 并考察了各因素对萃取结果的影响大小, 为今后科学地选择超临界 CO₂ 萃取条件提供了有益的参考。

参考文献

- [1] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用 I [M]. 北京: 学苑出版社, 1993. 356-357.
- [2] McLafferty F W. The Wiley/NBS registry of mass spectral data [M]. New York: A Wiley Interscience Publication, 1989.
- [3] 刘芸, 唐玉海. 超临界流体技术在医药工业中的应用 [J]. 西北药学杂志, 1999, 14(2): 82-83.

Analysis of Essential Oil from Fructus Forsythiae by GC-MS and Its Orthogonal Experiment of Supercritical Fluid Extraction

WANG Peng¹, ZHANG Zhong_yi¹, WU Hui_qin²

(1. Zhujiang Hospital, 1st Military Medical University, Guangzhou 510282, China;

2. Chinese National Analytical Center, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Orthogonal design of 5 factors at 3 levels was applied for optimization of supercritical CO₂ fluid ex_ © 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

麻黄碱类药物立体异构体的高效毛细管电泳拆分

姜廷福, 陆豪杰, 李菊白, 李 辰, 欧庆瑜

(中国科学院 兰州化学物理研究所 西北天然药物研究发展中心, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 以合成的二甲基- β -环糊精(DM- β -CD)为手性选择剂, 氯化四丁基铵为改性剂, 考察了缓冲液 pH、DM- β -CD 浓度、氯化四丁基铵浓度对 7 种麻黄碱类药物立体异构体的电泳分离影响; 结果表明: 在 pH 2 的 20 mmol/L Tris- H_3PO_4 缓冲液、60 g/L DM- β -CD、5% (v/v) 氯化四丁基铵条件下, 7 种麻黄碱类药物立体异构体 20 min 内得到较为满意的分离。

关键词: 毛细管电泳; 手性拆分; 麻黄碱; 二甲基- β -环糊精

中图分类号: R974; Q949.672 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2002)04-0037-04

麻黄碱类药物具有松弛平滑肌、收缩血管、抗炎及中枢兴奋、发汗解热、抗菌抗病毒、镇咳平喘等作用, 广泛用于治疗哮喘、伤风、过敏等症的制剂中。天然麻黄中主要含有左旋麻黄碱和右旋伪麻黄碱^[1]。合成得到的麻黄碱类药物均为外消旋体。由于药物对映体之间在药理、毒理和临床疗效等方面常存在较大差异, 故拆分麻黄碱类药物对映异构体的工作有重要意义。金晓等^[2]用手性试剂柱前衍生高效液相色谱拆分了 4 对麻黄碱药物对映体; 王志欣等^[3]用脲衍生物固定相液相色谱拆分了去甲麻黄碱对映体。液相色谱方法中的衍生化使实验变得繁琐, 一般情况下手性柱也较为昂贵。同时, 液相色谱平衡时间较长且需消耗大量流动相。Flurer 等^[4]用 HP- β -CD 作添加剂, 用毛细管电泳同时拆分 5 对麻黄碱对映体, 但对去甲麻黄碱无手性分离。SzkL 等^[5]用 DM- β -CD 为手性选择剂, 用毛细管电泳拆分了 3 对麻黄碱对映体, 但 3 对对映体不能同时分离。作者用二甲基- β -环糊精(DM- β -CD)为手性选择剂, 氯化四丁基铵为改性剂, 采用高效毛细管电泳同时拆分了 7 种麻黄碱类药物立体异构体; 优化了实验条件, 测定了线性范围和检出限, 并用该法分离和检测了天然麻黄中麻黄碱类药物异构体。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bio Focus 300 型电泳仪(Bio-Rad 公司, 美国); 石英毛细管柱 35 cm \times 50 μ m(id), 有效长度 30 cm (河北永年光导纤维厂); pH_3C 型精密酸度计(上海电光器件厂); CSF_1A 超声波发生器(上海超声波仪器厂)。

DM- β -CD 按文献[6]提供的方法合成, (±)-麻黄碱((±)-E)、(±)-去甲基麻黄碱((±)-nor-E)、(±)-甲基麻黄碱((±)-MEE)、(+)-伪麻黄碱(+)-PSE, 购自美国 Sigma 公司, 氯化四丁基铵(TBAC)为上海化学试剂总厂产品, 其它试剂均为分析纯, 水为二次去离子水。

收稿日期: 2001-08-16; 修回日期: 2002-03-11

作者简介: 姜廷福(1975-), 男, 内蒙古通辽人, 硕士研究生; 欧庆瑜, 联系人。

(上接 36 页)

traction conditions of essential oil from Fructus Forsythiae. The optimal conditions of extraction pressure 30 MPa, extraction temperature 35 $^{\circ}$ C, separate pressure 6.7 MPa, separate temperature 50 $^{\circ}$ C, and crush degree 0.55 mm were obtained. The sequence according to the effect of the extraction results is as follows: extraction temperature, crush degree, extraction pressure, separate pressure, separate temperature. Constituents of the essential oil were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, and 43 compounds were separated, 21 compounds of them were identified, their relative contents were determined by normalization method of areas. The main constituents were found to be α -pinene, β -pinene, terpineol_4, α -terpineol, benzyl alcohol, etc.

Key words: Fructus Forsythiae; Supercritical fluid extraction; Carbon dioxide; Essential oil; Orthogonal experiment design; GC-MS