草木犀中香豆素的超临界 CO_2 萃取工艺研究

陈娜(天津市儿童医院，天津 300074)

摘要：目的 研究草木犀中香豆素的超临界 CO_2 萃取工艺。**方法** 采用单因素和正交试验的方法，考察萃取压力、萃取温度、萃取时间和物料粒度等因素对黄香草木犀中香豆素超临界 CO_2 萃取物得率的影响。**结果** 超临界 CO_2 萃取草木犀中香豆素的影响因素次序为萃取压力>萃取温度>萃取时间。**结论** 最佳萃取工艺条件为：萃取压力 25 MPa，物料粒度 40~60 目，萃取温度 35 ℃，萃取时间 1.0 h。此条件下草木犀中香豆素萃取率为 0.76%。

关键词：草木犀；香豆素；超临界二氧化碳萃取；正交试验

中图分类号：R284.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-7693(2011)10-0927-04

Study on Extraction Technique of the Coumarin from *Melilotus Officinalis* (L.) Lam by Supercritical CO_2 Extraction

CHEN Na(*Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the supercritical CO_2 extraction technique of coumarin from *Melilotus officinalis* (L.) Lam. **METHODS** The effects of extraction pressure, temperature, time and material granularity on coumarin yield were discussed by single factor and orthogonal experiment. **RESULTS** The influence of the factors was in order of extraction pressure > extraction temperature > extraction time. **CONCLUSION** The optimum extraction conditions are as follows: the extraction pressure is 25 MPa, the medicinal materials granularity is 40–60 mesh, extraction temperature is 35 ℃, extraction time is 1.0 h. In these conditions, the extraction rate of coumarin is 0.76%.

KEY WORDS: *Melilotus officinalis* (L.) Lam; coumarin; supercritical CO_2 extraction; orthogonal experiment

草木犀为豆科(Leguminosae)草木犀属(*Melilotus* Mil1.)一年或两年生草本植物，是一种优良的绿肥作物和牧草。性味苦、凉，具有清热解毒、消炎、消肿等功效。化学成分有香豆素(coumarin)、总多酚和黄酮，其中一般以香豆素为质控目标[1-3]。草木犀在我国《藏药标准》和《上海市药材标准》均有所收载，在日本及欧洲各国已被广为应用。

香豆素类成分多以亲脂性的游离形式存在于植物中。草木犀中简单香豆素在总香豆素中所占比例非常大，而简单香豆素为小分子物质，具有一定挥发性，故多采取醇提、水蒸气蒸馏等方法[4]。醇提过程中的浓缩会造成大量香豆素的挥发损失，水蒸气蒸馏法不仅时间长，而且在提取过程中易造成热不稳定及易氧化成分的破坏与挥发损失，对部分成分有破坏作用。超临界 CO_2 流体萃取技术(supercritical CO_2 fluid extraction，SPE-CO_2)是一项高新型物质分离精制技术，可在接近室温的环境下进行萃取，不会破坏生物活性物质，而且操作方便，能耗低，无污染，分离能力高，无溶剂残留。目前该技术已被广泛应用于医药、食品等方面[5]，但 SFE-CO_2 用于草木犀挥发油的提取尚未见报道。本课题主要研究萃取压力、萃取温度、萃取时间和物料粒度对 SFE-CO_2 萃取草木犀中香豆素的影响，探讨最佳的萃取工艺条件，旨在为草木犀药材在国内的开发利用提供理论依据[6-7]。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)；HA220-50-06 超临界 CO_2 萃取仪(江苏南通市华安超临界萃取有限公司)。

草木犀药材产地四川，由我院中药制剂室主管药师王珏鉴定为豆科植物草木犀 *Melilotus officinalis* (L.) Lam 的干燥地上部分；香豆素对照品(Sigma 公司，纯度为 99%)；CO_2(体积分数为 99.5%)；甲醇为色谱纯；磷酸为分析纯；水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱：Accurasil C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：乙腈-水-冰醋酸(20∶80∶1)；柱温：30 ℃；流速：1.0 mL·min^{-1}。检测波长：273 nm；进样量：20 μL。理论板数按香豆素峰计算应≥4 000。色谱图见图 1。

作者简介：陈娜，女，主管药剂师 Tel: (022)58917109 E-mail: chenna790320@163.com

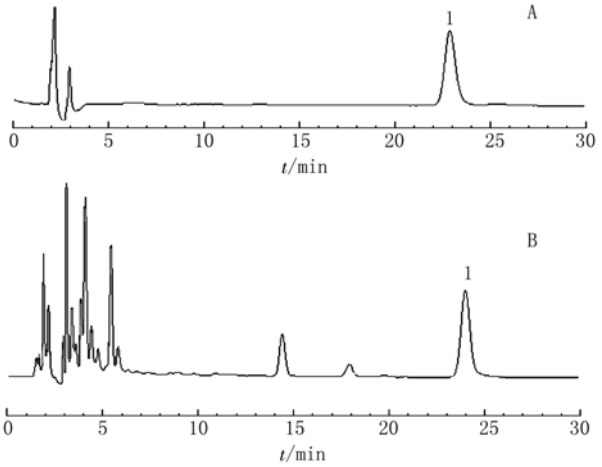


图 1 高效液相色谱图

A–香豆素对照品；B–草木犀药材；1–香豆素

Fig 1 HPLC chromatograms

A–coumarin reference substance; B–*M. officinalis* (L.) Lam; 1–coumarin

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取香豆素对照品 3.24 mg，置于 100 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，作为储备液，精密吸取储备液 2 mL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀得对照品溶液，每 1 mL 含香豆素 0.006 48 mg。

2.1.3 供试品溶液的制备 取各提取工艺项下草木犀超临界萃取产物 10 mg，精密称定，置于 100 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，精密量取 3 mL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，收集续滤液即得。

2.2 超临界 CO_2 萃取草木犀香豆素工艺条件单因素实验

2.2.1 萃取压力对萃取率的影响 草木犀粉碎，过 40 目筛，在萃取温度为 35 ℃，萃取时间为 2 h，萃取压力分别为 15，20，25，30 和 35 MPa 时进行超临界 CO_2 萃取，考察萃取压力对萃取率的影响，结果见图 2。萃取率随着压力的增大而增大，当压力超过 25 MPa 时萃取率反而下降，故在后续的正交试验中采用 20，25 和 30 MPa 来进行考察。

2.2.2 萃取温度对萃取率的影响 草木犀粉碎，过 40 目筛，在萃取压力为 25 MPa，萃取时间为 2 h，萃取温度分别为 25，30，35，40 和 45 ℃时进行超临界 CO_2 萃取，考察萃取温度对萃取率的影响，结果见图 3。随着萃取温度的提高，香豆素萃取率也随之增大，但萃取温度提高到 35 ℃左右时，萃取率迅速降低。故在后续的正交实验中萃取温度选择 30，35 和 40 ℃进行考察。

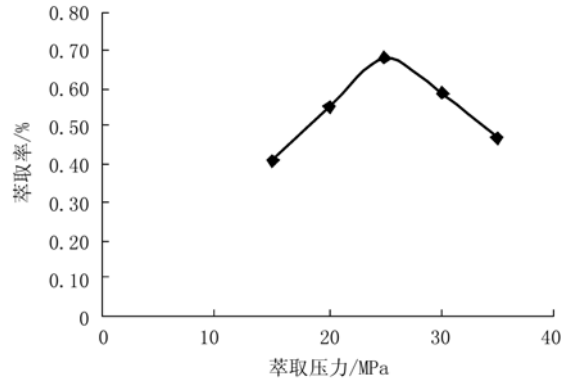


图 2 萃取压力对草木犀香豆素萃取率的影响

Fig 2 Effects of extraction pressure on coumarin yield

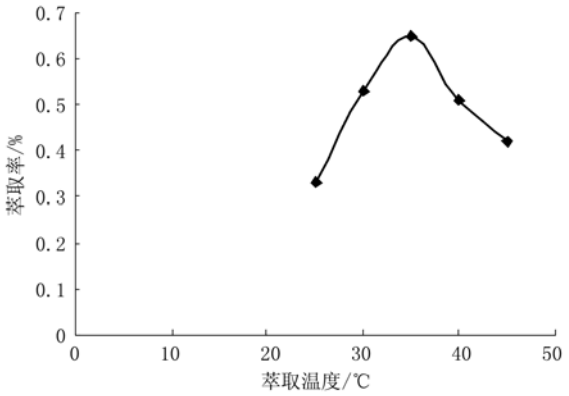


图 3 萃取温度对草木犀香豆素萃取率的影响

Fig 3 Effects of extraction temperature on coumarin yield

2.2.3 萃取时间对萃取率的影响 草木犀粉碎，过 40 目筛，在萃取压力为 25 MPa，萃取温度为 35 ℃，萃取时间分别为 0.5，1.0，1.5，2.0 和 2.5 h 时进行超临界 CO_2 萃取，考察萃取时间对萃取率的影响，结果见图 4。萃取率随着萃取时间的增长而增长，但时间过长萃取率反而下降，可能是由于随着时间的延长，其他成分萃取率增加的缘故。故在后续的正交实验中提取时间选择 0.5，1.0 和 1.5 h。

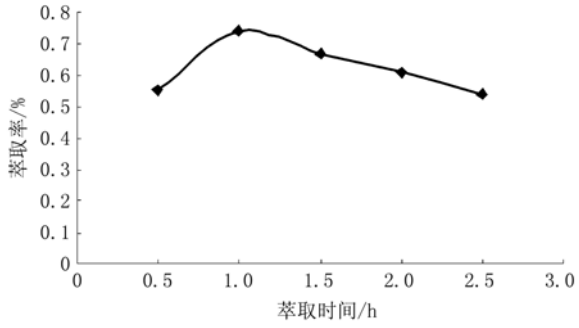


图 4 萃取时间对草木犀香豆素萃取率的影响

Fig 4 Effects of extraction time on coumarin yield

2.2.4 物料粒度对萃取率的影响　草木犀粉碎，分别过 20，40，60 和 80 目筛，在萃取压力为 25 MPa，萃取温度为 35 ℃条件下，萃取时间定为 1 h，考察物料粒度对萃取率的影响，结果见图 5。萃取率随着物料粒度的减小而提高，但粒度过小萃取率反而下降，可能是由于物料过细容易造成通路堵塞和粉碎过程中产生的高温使挥发成分损失，而且物料过细增加了粉碎的难度，因此适宜的粒度应为 40~60 目。

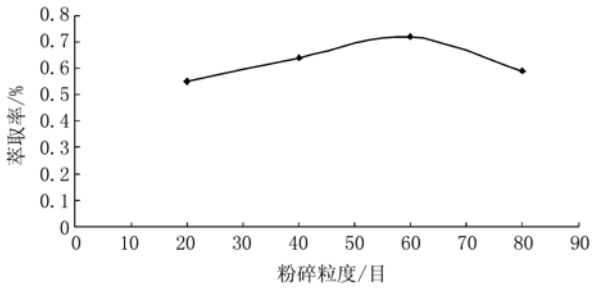


图 5　粉碎粒度对草木犀香豆素萃取率的影响

Fig 5　Effects of material granularity on coumarin yield

2.3　正交试验

综合各因素对草木犀香豆素萃取率影响的研究结果，确定了萃取温度、萃取压力、萃取时间的参数范围。以萃取率为考核指标，采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化萃取工艺条件。各因素及水平值见表 1。

表 1　因素水平表

Tab 1　Factors and levels

水平	A 萃取压力/MPa	B 萃取温度/℃	C 萃取时间/h	D 空白
1	20	30	0.5	
2	25	35	1.0	
3	30	40	1.5	

2.3.1　正交试验结果　各因素对萃取率的影响顺序为：萃取压力>萃取温度>萃取时间，最佳萃取工艺为 $A_2B_2C_2$，即萃取压力 25 MPa，萃取温度 35 ℃，萃取时间 1.0 h。通过方差分析可知，萃取压力对萃取率的影响最为显著，其他因素没有太大的显著性。试验结果见表 2。方差分析结果见表 3。

2.3.2　验证试验　为了进一步验证此结果的准确性，按最佳条件进行 3 次验证实验，草木犀香豆素萃取率分别为 0.75%，0.78%和 0.74%，其均值为 0.76%，表明结果稳定、工艺可行。

表 2　$L_9(3^4)$正交试验结果

Tab 2　The results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A 萃取压力	B 萃取温度	C 萃取时间	D 空白	萃取率/ %
1	1	1	1	1	0.56
2	1	2	2	2	0.61
3	1	3	3	3	0.54
4	2	1	2	3	0.71
5	2	2	3	1	0.77
6	2	3	1	2	0.66
7	3	1	3	2	0.52
8	3	2	1	3	0.55
9	3	3	2	1	0.53
均值 1	0.570	0.597	0.590	0.620	
均值 2	0.713	0.643	0.617	0.597	
均值 3	0.533	0.577	0.610	0.600	
极差	0.180	0.066	0.027	0.023	

表 3　$L_9(3^4)$方差分析结果

Tab 3　The results of the analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	*F* 值	显著性
A 萃取压力	0.054	2	54.000	*
B 萃取温度	0.007	2	7.000	
C 萃取时间	0.001	2	1.000	
D 误差	0.001	2		

注：$F_{0.05(2,2)}$=19.00，P<0.05

Note: $F_{0.05(2,2)}$=19.00，P<0.05

3　讨论

草木犀属植物全世界约有 20~25 种，国内主要有以下 6 种：白花草木犀(*M. albus*)、(黄香)草木犀(*M. officinalis*)、香草木犀(*M. suaveoleus*)、细齿草木犀(*M. dentatus*)、印度草木犀(*M. indica*)、伏尔加草木犀(*M. volgicus*)。中国药典未见收载，欧洲药典(第 5 版)规定本品为豆科植物草木犀[*M. officinalis* (L.) Lam，又称黄香草木犀]的干燥的完整或切段的地上部分，本品(以干燥品计)所含香豆素($C_9H_6O_2$)不得少于 0.3%。本试验所用草木犀符合欧洲药典(第 5 版)标准。

日本生晃荣养药品株式会社生产的草木犀流浸液片，商品名消脱止-M(SETUS-M)，即是以豆科植物草木犀[*M. officinalis* (L.) Lam]的叶和花提取的以流浸液为主要原料制成的纯植物制剂，在日本、欧美已成为外科损伤性肿胀和各型痔疮的常规用药。在我国于 2000 年、2004 年连续被列入《国家基本医疗保险目录》。

调节 CO_2 动态流量对提取率会有影响，但影响不大。因此笔者使用的是仪器常规流量，所有试验控制 CO_2 平均流量为 20 $L\cdot h^{-1}$。目前，采用超

临界提取香豆素类成分的相关报道较少，而且不同药材中香豆素种类、含量、溶解性、挥发性等性质差异较大，因此超临界提取主要影响因素萃取压力、萃取温度、萃取时间、粉碎粒度数值范围差异很大，可比性很小。因此笔者首先通过单因素实验，确定了上述 4 个因素的范围，再通过正交实验设计对其进行优化，得到了最佳提取工艺条件。

本试验表明萃取压力是影响草木犀香豆素提取率的最主要影响因素。一般情况下，萃取压力增加，会增加 CO_2 的密度及溶质和溶剂的传质效率，有利于萃取物的提取。但压力过大，CO_2 密度和黏度增大，传质性能变差，萃取能力减弱，甚至使萃取选择性变差，萃取物纯度降低。

REFERENCES

[1] CHEN H F. Ph Eur (5th ed): Melilot [J]. World Notes Plant Med(国外医药 植物药分册), 2006(4): 184.

[2] ZHU H, FAN J. HPLC determination of coumarin in *Melilotus* [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(12): 2111-2113.

[3] ZHENG G H,TAO J Y,WANG Y Z, et al. Study on the determination method of content of coumarin from *Melilotus suaveolens* Ledeb [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2008, 28(18): 1569-1572.

[4] TAO J Y, FENG Q L, ZHANG B H, et al. Study on the extraction, isolation and purification of coumarin in *Melilotus suaveolens* Ledeb [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2008, 28(14): 1173-1177.

[5] YANG Z L,SHAO Y Y,YAO C. Application of supercritical CO_2 extraction in natural products [J]. Guangdong Chem Ind(广东化工), 2009, 36(3): 26-29.

[6] LIU H M, ZHANG M X, LIU Y P, et al. Study on extraction of coumarins in *Angelica dahurica* by supercritical CO_2 [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2004, 26(2): 6-9.

[7] MI H, QU L L, REN Y L. Study on extraction of coumarins in *Cnidium monieri* by supercritical CO_2 and separation of compositions analysis [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30(14): 1080-1082.

收稿日期：2010-12-08