

提取方式对干姜挥发油的急性毒性及成分影响

韩润 徐光临 胡诚 刘力 徐德生

【摘要】 目的 对比超临界萃取(SFE)和水蒸气蒸馏(SD)两种方法提取的干姜挥发油的急性毒性和化学成分。**方法** 分别用两种方法提取挥发油,采用经典的毒性试验方法进行比较性研究,记录其毒性症状,死亡速率及体重变化,用 Bliss 法分别计算 LD_{50} 及其 95% 可信度,用气相质谱联用仪(GC-MS)对两种工艺提出的挥发油化学成分进行分析比较。**结果** 小鼠主要中毒症状为,腹部刺激,呼吸急促等。死亡时间多集中在 8 小时以内。干姜经超临界萃取提取的挥发油 $LD_{50}=6.7174(4.066 \sim 8.108)$ mL/kg,折算生药为 $LD_{50}=223.9(135.5 \sim 270.3)$ g/kg;经水蒸气蒸馏法提取出的挥发油 $LD_{50}=9.1109(8.133 \sim 10.206)$ mL/kg,折算生药为 $LD_{50}=1012.3(903.7 \sim 1134)$ g/kg。两种方法提取出来的挥发油化学成分不完全一致,SFE 组相较于 SD 组提出的组分更多。**结论** 采用 SD 法提取的干姜挥发油安全性更高,其原因是 SFE 提取的挥发油化学成分复杂。

【关键词】 干姜; 挥发油; 急性毒性; 气相质谱联用仪

【中图分类号】 R284.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.09.002

Effect of different extracting methods on acute toxicity and chemical composition of rhizoma zingiberis volatile oil HAN Run, XU Guanglin, HU Cheng, et al. Cardiovascular Department of Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200021, China
Corresponding author: XU Desheng, E-mail: xudes1953@126.com

【Abstract】 Objective Comparison of supercritical fluid extraction (SFE) and steam distillation (SD) on acute toxicity and chemical composition of ginger volatile oil. **Method** The essential oils were extracted by SFE and SD method respectively. A comparative study was conducted by classical toxicity test. The toxic symptoms, death rate and the change of weight was recorded, LD_{50} and 95% confidence respectively was calculated by Bliss method, chemical constituents of volatile oil were analyzed and compared by gas chromatography mass spectrometry instrument (GC-MS). **Results** Main toxic symptoms of mice were abdominal irritation, shortness of breath and so on. The time of death was concentrated in 8 hours. The LD_{50} of volatile oil extracted by SFE was 6.7174 (4.066 ~ 8.1078) mL/kg while that was 9.1109 (8.1327 ~ 10.206) mL/kg of SD, the conversion of crude drug was 223.9 g/kg and 1012.3 g/kg respectively. The chemical composition of volatile oil extracted by the two methods was not completely consistent, and the chemical composition of SFE group was more than the SD group. **Conclusion** The extraction of volatile oil of rhizoma zingiberis by SD method has higher safety, the reason is that the chemical composition of volatile oil extracted from SFE is complex.

【Key words】 Rhizoma zingiberis; Volatile oil; Acute toxicity; GC-MS

基金项目:上海市科委资助项目(12401901400)

作者单位:200021 上海中医药大学附属曙光医院药剂科[韩润(硕士研究生)、徐光临(博士研究生)、刘力、徐德生];上海中医药大学[胡诚(硕士研究生)]

作者简介:韩润(1990-),女,2014 级在读硕士研究生。研究方向:药物新剂型的研究。E-mail:234123581@qq.com

通信作者:徐德生(1953-),博士,博士生导师,主任药师。研究方向:药物新剂型的研究。E-mail:xudes1953@126.com

干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc 的干燥根茎, 冬季采挖, 除去须根及泥沙, 晒干或低温干燥。趁鲜切片晒干或低温干燥者称为“干姜片”, 具有温中散寒, 回阳通脉, 温肺化饮的功效^[1]。炮制后的干姜片含挥发油 1% 左右, 现代药理研究表明, 干姜挥发油具有抗炎, 抗肿瘤, 促进局部血液循环的作用。挥发油提取工艺中, 常采用传统的水蒸气提取, 随着工艺的发展, 超临界萃取挥发油的应用越来越广泛, 但在工艺的安全性上研究较少, 缺乏相关数据, 本实验主要考察两种提取方法提取干姜挥发油的安全性, 并采用 GC-MS 法初步分析化学成分的差异。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

干姜购自上海虹桥中药饮片公司(批号: 150918)产地: 山东, 经上海虹桥中药饮片有限公司质检科授权人陈燕军鉴定为姜科植物干姜的饮片, 质量符合《中华人民共和国药典》2015 版标准。

健康 ICR 小鼠, SPF 级, 体重 18 ~ 22 g, 雌雄各半, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。动物置于(22±1)℃控温和光暗周期为 12 小时环境下, 给予清洁级普通小鼠饲料饲养(上海中医药大学动物实验中心提供)。

ZDHW 型调温电热套(北京中兴伟业仪器有限公司), HH-SH-4 型单列四孔水浴锅(上海跃进医疗器械厂), DZF-1 型真空干燥箱(上海医用恒温设计厂), HA220-50-06 型超临界萃取仪(海安华阳超临界科技有限公司), ANY220 型电子天平(岛津分析天平), AGILENT 7890B/5977A GC/MSD 型气相质谱联用仪(美国 AGILENT 公司)。

吐温-80(上海凌峰化学试剂有限公司, 批号: 20150121), 无水硫酸钠(上海凌峰化学试剂有限公司, 批号: 20130328), 乙醚(上海凌峰化学试剂有限公司, 批号: 20131102)。

1.2 供试样品的制备

1.2.1 水蒸气蒸馏法(SD)提取挥发油 称取干姜饮片 300 g, 置于 3000 mL 圆底烧瓶中, 参照《中华人民共和国药典》2015 版干姜挥发油提取甲法(干姜挥发油相对密度小于 1), 加蒸馏水 2100 mL, 加热至微沸并回流提取 6 小时, 放冷 0.5 小时, 读取体积。得油率为 0.9%。

1.2.2 超临界萃取法(SFE)提取挥发油 将干姜

饮片打粉过筛, 取其 10 目至 30 目粉末 400 g, 50℃减压真空干燥 3 小时, 置 CO₂ 超临界萃取仪萃取。萃取条件为: 进样压力 25 MPa, 进样温度 55℃, 流量为 25 ~ 35 L/h, 分离 I 温度为 58℃, 分离 II 温度为 36℃, 萃取 2 小时。总得油率为 3.0%。

1.2.3 挥发油的乳化 乳化配比为, 油: 吐温-80: 水=2: 1: 4.2, 乳化温度为 50℃。为了便于调整剂量, 促进小鼠胃部吸收以及保证给药浓度的均一性, 在灌胃前对挥发油进行了乳化, 乳化剂采用吐温-80。吐温-80 小白鼠经口 LD₅₀ 为 25 g/kg(参照美国科学院毒性物质分级属于无毒性)。乳化指标为肉眼观看色泽均一, 无挂壁, 无分层, 在此基础上尽可能减少用量。

1.3 小鼠急性毒性实验

预实验方法: 取 60 只小鼠, 雌雄各半进行预分组。将雄鼠和雌鼠按照体重接近的原则分开放入 6 个组别中, 雄鼠 3 组, 雌鼠 3 组, 并分别做好标记记下体重。在 30 只雄鼠中, 每组随机抽取一只, 组成一个任意组, 共分为 10 组雄鼠。雌鼠同上。最后分出 5 个剂量组, 每组 12 只, 然后每个剂量再分两组, 分别为 SD 组和 SFE 组。每组 6 只, 雌雄各半。由此方法分组可使得每组小鼠体重尽量分布趋于一致。

正式实验方法: 取 110 只小鼠, 雌雄各半。参照预实验的分组办法分出 11 组, 每组 10 只, 雌雄各半。参照预实验的结果得出最大全活剂量和最小全死剂量然后中间增加三个剂量组, 相邻两个剂量组间比值 $r=0.8$, 5 个剂量组平行用于 SD 组和 SFE 组。最后一组空白对照组为乳化剂。根据预实验结果测得, 水蒸气蒸馏组和超临界组的最大全活量及最小全死量不尽相同, 选取最大区间范围后再安插三个剂量组得到最终设置给油量(净油量, 不含乳化剂): 5.83、7.29、9.11、11.39、14.23 mL/kg。SFE 组对应生药剂量: 194.33、243、303.67、379.67、474.33 g/kg; SD 组对应生药剂量: 647.78、810、1012.22、1265.56、1581.11 g/kg。每组 10 只, 雌雄各半。灌胃前禁食不禁水 12 小时。最终稀释后采用等浓度不同体积的给药方式, 不同剂量之间的给药体积差异给予相应的空白乳化剂补齐, 空白组为最高剂量组等体积的乳化剂。灌胃给药后, 0.5、1、2、4、8、12 小时观察一次, 以后每天至少观察一次并称取体重, 共 14 天。

1.4 GC-MS 法分析挥发油化学成分

色谱条件: 色谱柱: Agilent 19091S-433UI, HP-

5MS, (325℃;30 m×250 μm×0.25 μm);进样口温度为 250℃。程序升温:起始温度 60℃,3℃/min 升至 80℃,保持 10 分钟,3℃/min 升至 140℃,保持 15 分钟,6℃/min 升至 270℃,保持 10 分钟。分流比:5:1。载气:高纯氮气。

质谱条件:离子源温度 250℃;进样口温度 280℃;电子能量 70 eV。调谐方式:标准调谐,质量扫描方式:全部扫描范围:10~400 m/z。

挥发油样品的处理:取适量挥发油,加入适量无水硫酸钠,3000 r/min 离心 5 分钟,过滤取上清液,经乙醚稀释 1000 倍后进样,进样体积为 1 μL。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行机率单位加权回归法(Bliss 法)计算半数致死量及 95% 可信区间。各组小鼠体重均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析(ANOVA)考察显著性,组间两两比较采用 LSD 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠给药后总体状况

给药后,多数小鼠均有不同程度的毒性反应,轻度毒性反应有不安,烦躁,但在进水进食后有所改善,自行恢复,明显中毒症状有腹部刺激,运动减少,眼睑下垂。重度毒性反应有抽搐震颤。随着时间的发展,出现明显毒性和重度毒性反应的老鼠大部分在一天之内死亡。第 4、5 剂量组给药后有立即死亡出现。也有部分老鼠的症状在 2~3 天后恢复至正常。空白组中小鼠均表现正常,未见任何异常形态。

2.2 SD 组和 SFE 组小鼠的死亡速率情况对比

两组药物给药后分别于 0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96 小时观察死亡情况。SD 组的小鼠出现毒性症状相对迟缓,温和,并且症状较轻,2 天以后逐渐恢复不再出现死亡。SFE 组小鼠中毒及死亡速率较 SD 组更快、更急,症状更重,3 天以后才逐渐恢复不再出现死亡。由于高剂量死亡数高,而低剂量几

乎无死亡,不能很好地反映死亡速率变化情况,故以两组药物的中间剂量存活情况进行比较,结果见图 1。

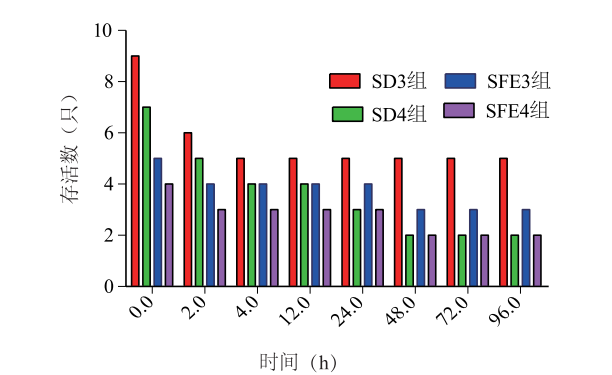


图 1 SD 组和 SFE 组小鼠存活数时间对比图

2.3 SD 组和 SFE 组存活小鼠的体重状况对比

在给药的第一周内,两组小鼠各剂量组的体重相较于空白组影响以及组间影响均有显著性差异($P<0.05$)。对比发现,SFE 组对体重的影响大于 SD 组,高剂量组甚至出现负增长。给药后第二周两组小鼠体重均有不同程度恢复并加速增长,SD 组在一周以后的体重增长状况高于空白组,体重差异与空白组逐渐减小,恢复情况好于 SFE 组。体重均值增长变化分别选取有代表性的两组别进行对比,见表 1。

2.4 两种挥发油 LD₅₀ 结果

两种挥发油的 LD₅₀ 结果见表 2。采用 Bliss 法并根据表 2 计算得:SD 组的回归方程 $y(\text{Probit}) = -5.3045 + 10.739\text{Log}(D)$;半数致死量 $\text{LD}_{50} = 9.1109 \text{ mL/kg}$; LD_{50} (Feiller 校正)95% 的可信限 = $8.133 \sim 10.206 \text{ mL/kg}$;对应生药 $\text{LD}_{50} = 1012.3 (903.7 \sim 1134) \text{ g/kg}$; $\text{LD}_{50} = 6.4031 \text{ mL/kg}$; $\text{LD}_{95} = 12.964 \text{ mL/kg}$ 。SFE 组的回归方程 $y(\text{Probit}) = 0.9569 + 4.8876\text{Log}(D)$;半数致死量 $\text{LD}_{50} = 6.7174 \text{ mL/kg}$; LD_{50} (Feiller 校正)95% 的可信限 = $4.066 \sim 8.1078 \text{ mL/kg}$;对应生药 $\text{LD}_{50} = 223.9 (135.5 \sim 270.3) \text{ g/kg}$; $\text{LD}_{50} = 3.0949 \text{ mL/kg}$; $\text{LD}_{95} = 14.58 \text{ mL/kg}$ 。

表 1 SD 组和 SFE 组小鼠体重对比表

组别	剂量(g/kg)	给药前(g)	给药后 1 天(g)	给药后 7 天(g)	给药后 14 天(g)
空白组	—	19.09±1.13	21.03±1.25	24.89±1.51	28.02±1.76
SD3 组	1012.22	18.87±1.11	19.52±1.38	22.72±1.54	24.66±2.24
SD4 组	1265.56	19.04±0.94	19.06±1.37	21.13±1.70	24.08±2.31
SFE3 组	303.67	19.15±1.00	19.15±1.50	20.76±1.60	24.10±2.03
SFE4 组	379.67	18.97±1.15	17.79±1.47	19.95±2.03	23.83±3.72

表 2 SD 组和 SFE 组的 LD₅₀ 结果

组别	剂量 (mL/kg)	对数剂量 (x)	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡百分率 (%)	实验机率单位 (Y)	回归机率单位 (Y)
SD1 组	5.83	0.76567	10	0	0.00	—	2.9178
SD2 组	7.29	0.86273	10	2	20.00	4.1585	3.9601
SD3 组	9.11	0.95952	10	5	50.00	5	4.9995
SD4 组	11.39	1.0565	10	8	80.00	5.8415	6.0412
SD5 组	14.23	1.1532	10	10	100.00	—	7.0795
SFE1 组	5.83	0.76567	10	4	40.00	4.7471	4.6993
SFE2 组	7.29	0.86273	10	6	60.00	5.2529	5.1736
SFE3 组	9.11	0.95952	10	7	70.00	5.524	5.6467
SFE4 组	11.39	1.0565	10	8	80.00	5.8415	6.1208
SFE5 组	14.23	1.1532	10	10	100.00	—	6.5934

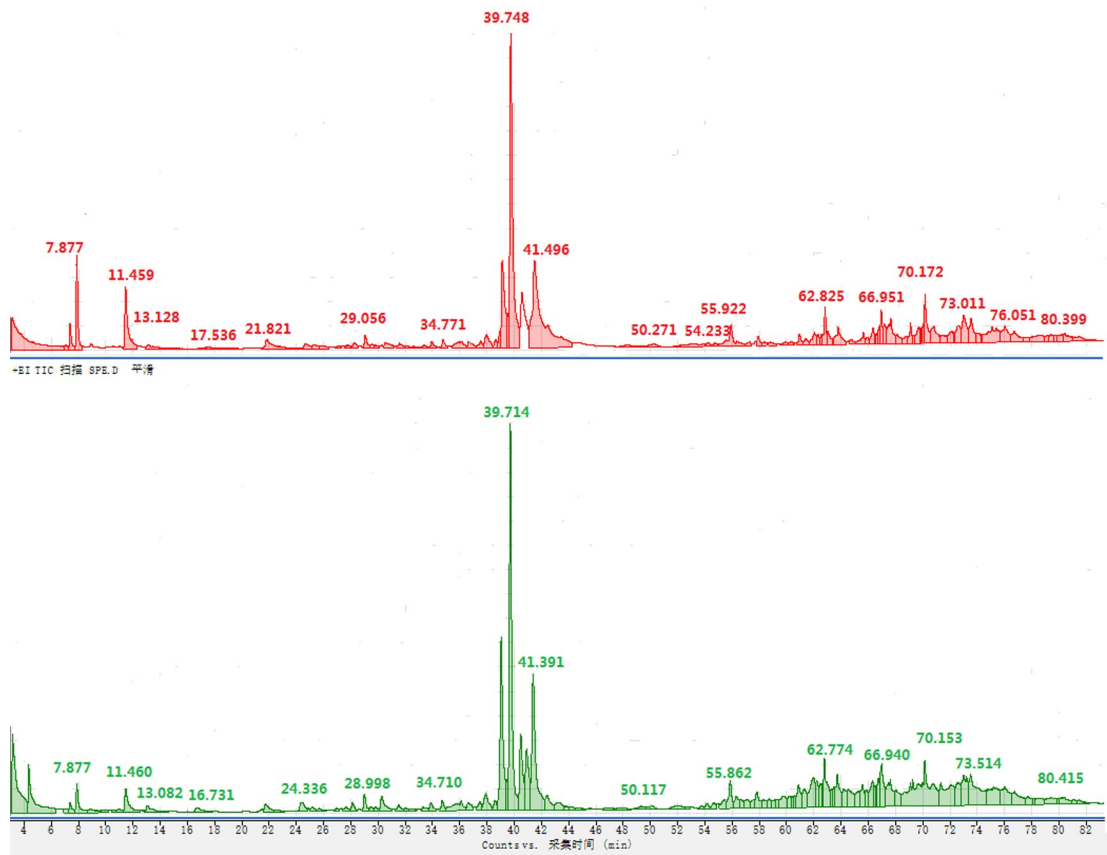


图 2 SD 组和 SFE 组干姜挥发油总离子流图 (红色:SD 组;绿色:SFE 组)

2.5 SD 组与 SFE 组的挥发油化学成分对比

对两组样品平行进样,采用色谱数据处理系统,以面积归一法对比各成分的相对含量。按照前述 GC-MS 条件得出总离子流图及对比图见图 2、图 3。

笔者对总离子图中各峰进行质谱扫描,得到各峰质谱图,经过质谱数据库 NIST 检索,并参考相关文献^[2-5],对干姜挥发油成分进行初步分析。

从提取方法对化学成分产生的影响上看,成分大体一致。SFE 组总体提出的成分多于 SD 组,并且在相同的进样体积条件下平行进样,大部分组分峰面积也大于 SD 组,从这一方面也可以看到 SFE 组比 SD 组成分多而杂。具体来看,SFE 组有利于提取分子量较大和沸点较高的组分,而 SD 组则有利于提取小分子和沸点较低的组分。推测应该是 SD 的溶剂水沸点在 100℃ 左右,在密闭的环境下提

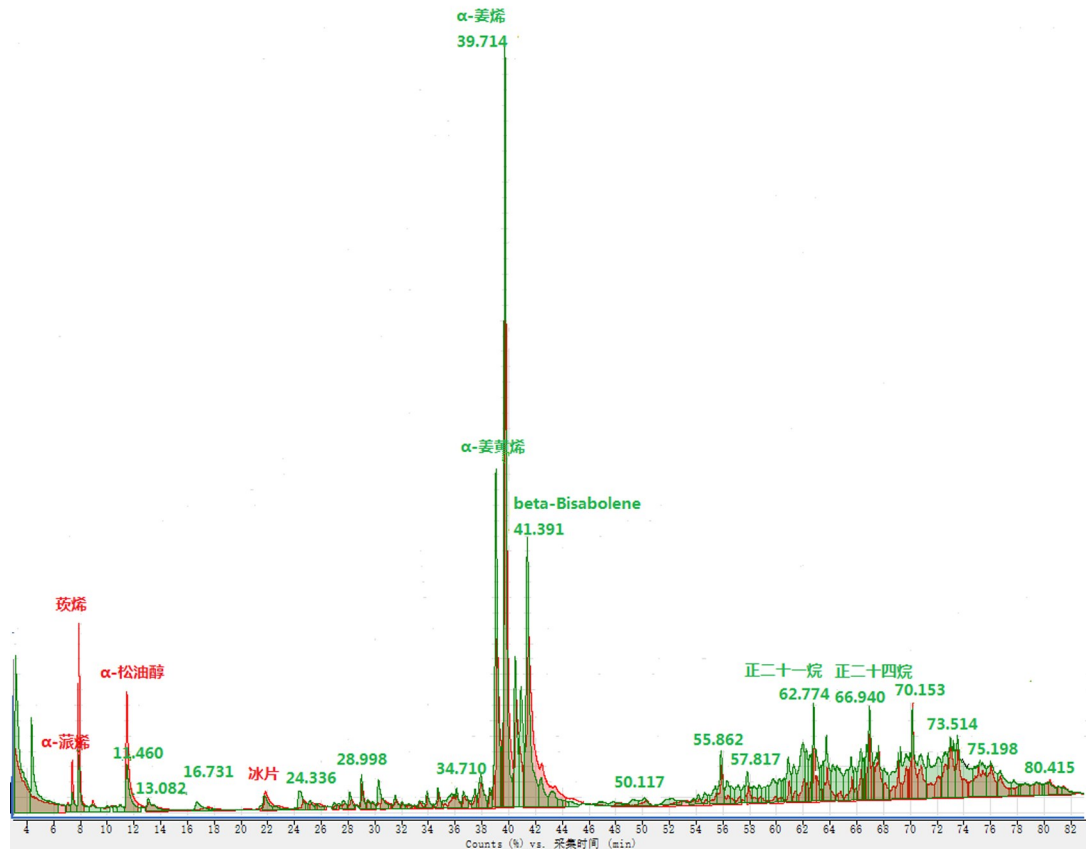


图3 SD组和SFE组干姜挥发油叠加总离子图(红色:SD组;绿色:SFE组)

取过程中对高沸点的成分提取能力有限,并且高温会破坏一些成分的提取,而SFE萃取温度偏低,且压力高,因而在不破坏一些组分的情况下,可以提取更多高沸点的组分。

从化学成分对安全性产生的影响上看,笔者从SD组样品中分离得到了91种成分,鉴定了其中41种。SFE组样品中分离得到了108种成分,鉴定了其中36种。两组中主要成分都集中在单萜烯类、倍半萜烯类以及含氧衍生物,其中两组含量最高的均为 α -姜烯,单品主要应用于调味剂。其次是 α -姜黄烯和1-b-Bisabolene,且SFE组含量明显高于SD组,另外在40.9分钟出峰的成分2,4-二叔丁基苯酚在SD组中未见发现。SD组在20分钟前提出的小分子成分显著高于SFE组,以 α -蒎烯、坎烯以及 α -松油醇最显著,这三种成分都是松节油的主要成分来源,现也被用作杀虫剂^[13],也是目前公认具有肾毒性的成分。SFE组在50分钟后提出的大分子成分显著高于SD组,以正二十一烷,正二十四烷以及2,2-双(甲基溴)-1,1-联苯为代表,这类高沸点的长链烷烃,尤其长链芳香烃对中枢神经有明显的致毒作用,大剂量甚至引起心跳停止。因此可以初步

推断,影响SFE组的 LD_{50} 偏小的原因可能与高沸点的长链烷烃有关。

3 讨论

本次实验从 LD_{50} 数值的角度评价,根据物质的半数致死剂量 LD_{50} 值,美国科学院把毒性物质危险划分为五个等级, LD_{50} 大于15 g/kg属于无毒性,干姜挥发油属于无毒性。

近年来,针对多种提取方法应用于挥发油的提取安全性问题,已进行过部分品种的研究,例如苦豆子^[6]、艾叶^[7]、甘草^[8]、北豆根^[9]、鸦胆子^[10]、吴茱萸^[11]、细辛^[12]。本文首次对于干姜挥发油进行了提取方法的安全性对比,并结合化学成分进行了初步分析。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:118.
- [2] 史琪荣,王莉,闫荟,等. GC-MS法测定干姜超临界 CO_2 萃取物的化学成分及其姜酚类成分的追踪[J]. 解放军药学学报, 2011, (4): 296-298, 302.
- [3] 杨欣,王秋红,王悦,等. 干姜挥发油成分GC-MS分析[J]. 化

- 学工程师,2015,29(8):16-18.
- [4] 李翔,吴豪,朱东亮,等.干姜挥发油提取优化及 GC-MS 图谱研究[J].药学实践杂志,2009,27(1):46-48,50.
- [5] 谢晓林,杨世祥,胡玉松,等.超临界 CO₂ 萃取黔产干姜挥发油的化学成分及抑菌活性研究[J].贵阳学院学报(自然科学版),2013,(3):15-18.
- [6] 赵慧巧,卢年华,景明.不同提取方法对苦豆子急性毒性影响的实验研究[J].甘肃中医药大学学报,2016,(1):14-16.
- [7] 刘红杰,白杨,洪燕龙,等.不同提取方法制备的艾叶挥发油化学成分分析与急性肝毒性比较[J].中国中药杂志,2010,35(11):1439-1446.
- [8] 程艳芹,王英姿,李明春.甘草 5 种方法提取液主要药效学及急性毒性比较[J].中国医院药学杂志,2013,33(6):435-439.
- [9] 罗栋,郑丽娜,孙蓉.提取方式对北豆根“质量-毒性”综合评价模式的影响[J].中国药物警戒,2012,(5):266-269.
- [10] 朱兰兰,孙蓉.提取方式对鸦胆子“质量-毒性”综合评价模式的影响[J].中国药物警戒,2012,(5):269-271.
- [11] 王会,朱兰兰,黄伟,等.提取方式对吴茱萸“质量-毒性”综合评价模式的影响[J].中国药物警戒,2012,(5):279-281.
- [12] 李荣荣,杨勇,丁嘉信,等.细辛不同提取物对小鼠急性毒性实验的比较研究[J].中国药物警戒,2012,9(6):321-324.
- (收稿日期:2016-10-29)
(本文编辑:禹佳)