

复方参芎滴丸中川芎提取纯化工艺

吉国辉, 何伟*, 李勇, 江斌, 林伟鑫
(广东药学院 药物研究所, 广州 510006)

[摘要] **目的:**考察复方参芎滴丸中川芎的提取、纯化工艺条件。**方法:**以阿魏酸、藜本内酯提取量为指标,通过正交试验考察乙醇体积分数、溶剂用量及提取时间对川芎提取工艺的影响,利用单因素试验考察提取液质量浓度、溶剂用量及提取次数对川芎提取液纯化工艺的影响。采用HPLC测定阿魏酸、藜本内酯含量,流动相甲醇-0.05%磷酸水溶液梯度洗脱,检测波长320 nm。**结果:**川芎最佳提取工艺为加10倍量70%乙醇提取2次,每次2 h;阿魏酸、藜本内酯提取量分别为1.46, 13.84 mg·g⁻¹。最佳纯化工艺为加2倍量乙酸乙酯萃取3次;阿魏酸、藜本内酯转移率分别为94.68%, 85.86%。**结论:**优选的提取、纯化工艺条件稳定可行,活性成分提取率高,可为复方参芎滴丸的工业化生产提供参考。

[关键词] 川芎; 阿魏酸; 藜本内酯; 复方参芎滴丸; 溶剂萃取法

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0016-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140016

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150527.1031.007.html>

[网络出版时间] 2015-05-27 10:31

Extraction and Purification Process of Chuanxiong Rhizoma in Compound Shenxiong Dropping Pills

Ji Guo-hui, HE Wei*, LI Yong, JIANG Bin, LIN Wei-xin (Institute of Material Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and purification procedure of Chuanxiong Rhizoma in compound Shenxiong dropping pills. **Method:** Ethonal extraction of Chuanxiong Rhizoma was conducted through orthogonal design with contents of ferulic acid and ligustilide as indexes, solvent extraction method was used to purify Chuanxiong Rhizoma extract on the basis of single factor experiments, effects of different concentration, solvent volume and extraction times were studied. Contents of ferulic acid and ligustilide were determine by HPLC, methanol-0.05% phosphoric acid as mobile phase in a gradient elution, detection wavelength was 320 nm. **Result:** Optimum extraction procedure was that medicinal materials were extracted 2 times with 10 times the amount of 70% ethanol, 2 hours for each time. Contents of ferulic acid and ligustilide in extract were 1.46, 13.84 mg·g⁻¹. Diversion rate of ferulic acid and ligustilide were 94.68% and 85.86%. Purification procedure was carried out by extracted 3 times with 2 times the amount of ethyl acetate for each time. **Conclusion:** Extraction rate of active components is high by optimized extraction and purification procedure, which can provide experimental basis for industrial production of compound Shenxiong dropping pills.

[Key words] Chuanxiong Rhizoma; ferulic acid; ligustilide; compound Shenxiong dropping pills; solvent extraction method

参芎方为临床经验组方,由人参、川芎等3味药组成,功效益气安神、活血化瘀、通络止痛,常用于治疗气虚血瘀、脉络闭阻所致的胸痹心痛。该方临床以汤剂为用,但汤剂服用不方便、由病人自行制备易

造成疗效不稳定,故拟将其制成滴丸剂,但滴丸剂载药量低,为符合现代制剂要求,需对参芎方进行提取、纯化。方中人参的有效成分为皂苷类,川芎有效成分为酚酸类与苯酞类^[1-2],各类有效成分的理化

[收稿日期] 20141014(020)

[基金项目] 广州市科技计划项目(2011J4300059);广东省中医药局建设中医药强省重点科研项目(20123012)

[第一作者] 吉国辉,硕士,从事中药新剂型与新技术研究, Tel:13826478099, E-mail: jghgdpu@163.com

[通讯作者] *何伟,教授,从事中药新剂型与新技术研究, Tel:020-39352503, E-mail: weihe8201@163.com

性质各不相同,故提取、纯化方法各不相同。人参皂苷类成分可采取大孔树脂法纯化,但采用大孔树脂法对川芎进行纯化时,其有效成分藁本内酯损失严重。根据方中各有效成分的理化特性,需分别采用适宜的提取纯化方法获得皂苷类和苯酞类、酚酸类等活性组分。川芎为方中臣药,具有活血行气、祛风止痛的功效^[3-4],其提取、纯化工艺研究多单以阿魏酸含量为考察指标^[5-8]。为了更好地保留川芎中有效成分,本实验以藁本内酯、阿魏酸含量及总固体得率为综合评价指标,通过单因素试验和正交试验优选复方参芎滴丸中川芎的提取、纯化工艺,为该制剂的开发提供参考。

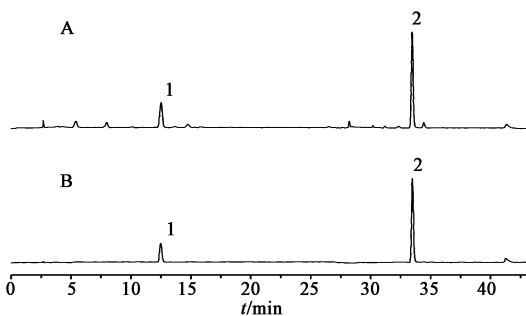
1 材料

Ulti Mate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),CP225D 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。川芎药材购自广州至信药业有限公司,经广东药学院中药学院刘基柱教授鉴定为伞形科川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎;阿魏酸、藁本内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110773-200611,111737-201305),甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸及藁本内酯的含量测定

2.1.1 色谱条件 岛津 Wondersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.05% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 23 min, 35% ~ 50% A; 23 ~ 25 min, 50% ~ 75% A; 25 ~ 38 min, 75% ~ 77% A; 38 ~ 39 min, 77% ~ 35% A; 39 ~ 43 min, 35% A),检测波长 320 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 10 μL。见图 1。



A. 供试品; B. 对照品; 1. 阿魏酸; 2. 藁本内酯

图 1 川芎提取物 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Chuanxiong Rhizoma extract

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取藁本内酯对照品约 40 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容

至刻度,得藁本内酯储备液。精密称取阿魏酸对照品约 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加 70% 甲醇定容至刻度,得阿魏酸储备液。精密吸取上述储备液各 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇定容至刻度,摇匀,得混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取提取液 1 mL 至 25 mL 量瓶中,加 70% 甲醇定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 μL,按 2.1.1 项下条件测定,以进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标,得阿魏酸、藁本内酯回归方程分别为 $Y = 0.0109X + 0.0004$ ($r = 0.9999$), $Y = 0.0221X + 0.0009$ ($r = 0.9999$),线性范围依次为 0.023 02 ~ 0.345 3, 0.169 8 ~ 2.547 μg。

2.2 总固体得率测定 精密量取川芎提取液 10 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后,置 105 °C 烘箱中干燥 3 h,取出置干燥皿内冷却 30 min,称定质量,置 105 °C 烘箱中干燥 1 h 至恒重,称定质量,计算。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 提取次数考察 取川芎粉碎成颗粒状,精密称取 25 g,共 3 份,置 500 mL 圆底烧瓶中,分别加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 1, 2, 3 次,每次 2 h,滤过,按 2.1 项下方法测定,结果阿魏酸提取量分别为 1.330, 1.490, 1.544 mg · g⁻¹,藁本内酯提取量分别为 12.91, 13.83, 14.24 mg · g⁻¹,总固体得率分别为 25.62%, 29.50%, 30.40%,结合生产成本考虑,确定提取数为 2 次。

2.3.2 正交试验设计 提取数固定为 2 次,选择乙醇体积分数、溶剂用量及提取时间为考察因素,阿魏酸、藁本内酯提取量及总固体得率的综合评分为指标,权重系数分别为 0.4, 0.4, 0.2。精密称取川芎药材颗粒 25 g,共 9 份,按 L₉(3⁴) 正交表设计试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 A > B > C。方差分析表明因素 A 具有显著性差异,其他因素则均无显著性差异,故选择最佳提取工艺组合 A₂B₂C₂,即乙醇体积分数 70%,乙醇用量 10 倍,提取时间 2 h,提取数 2 次。

2.4 纯化工艺考察 预试验对不同提取溶剂进行考察,发现阿魏酸及藁本内酯在乙酸乙酯中溶解性较好,故确定以乙酸乙酯为提取溶剂,采用溶剂萃取法纯化川芎提取液。

表 1 复方参芎滴丸中川芎的提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction procedure of Chuanxiang Rhizoma in compound Shexiang dropping pills

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 溶剂用量 /倍	C 提取时间 /h	D(空白)	阿魏酸 /mg·g ⁻¹	藁本内酯 /mg·g ⁻¹	总固体得率 /%	综合评分 /分
1	50	8	1.5	1	1.312	10.28	31.22	85.19
2	50	10	2.0	2	1.375	12.81	30.97	94.20
3	50	12	2.5	3	1.358	11.90	33.12	92.36
4	70	8	2.0	3	1.411	13.19	31.43	96.59
5	70	10	2.5	1	1.451	13.63	31.79	99.20
6	70	12	1.5	2	1.389	12.76	31.30	94.64
7	90	8	2.5	2	1.164	12.01	31.12	86.13
8	90	10	1.5	3	1.228	12.87	31.82	90.84
9	90	12	2.0	1	1.265	13.02	30.11	91.26

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	F	P
A	94.91	20.92	<0.05
B	45.51	10.03	>0.05
C	21.98	4.84	>0.05
D(误差)	4.54		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

2.4.1 样品溶液的制备 取川芎药材适量,置圆底烧瓶中,按优选的工艺条件提取,提取液滤过,合并滤液,定容,按 2.1 项下方法测得阿魏酸、藁本内酯提取量分别为 1.46, 13.84 mg·g⁻¹。

2.4.2 药液质量浓度考察 精密量取样品溶液适量,回收乙醇制成生药质量浓度分别为 0.25, 0.5, 1.0, 1.3 g·mL⁻¹ 的溶液,各取 20 mL,加 2 倍量乙酸乙酯提取 3 次,合并乙酸乙酯层,减压回收溶剂,分别加 70% 甲醇定容至 10, 25, 50, 50 mL,按 2.1 项下方法测定阿魏酸、藁本内酯含量,计算转移率,结果阿魏酸提取量分别为 1.097, 1.244, 1.389, 1.401 mg·g⁻¹,转移率分别为 75.14%, 85.21%, 95.14%, 95.96%;藁本内酯提取量分别为 10.61, 11.05, 11.93, 10.87 mg·g⁻¹,转移率分别为 76.66%, 79.84%, 86.20%, 78.54%。故选择药液质量浓度 1.0 g·mL⁻¹。

2.4.3 提取次数考察 精密量取 1.0 g·mL⁻¹ 样品溶液 10 mL,分别加 2 倍量乙酸乙酯萃取 1, 2, 3, 4 次,合并乙酸乙酯层,减压回收溶剂,加 70% 甲醇定容至 25 mL,结果阿魏酸提取量分别为 1.043, 1.316, 1.368, 1.378 mg·g⁻¹,转移率分别为 71.44%, 90.14%, 93.70%, 94.38%;藁本内酯提取

量分别为 7.86, 11.35, 11.92, 12.14 mg·g⁻¹,转移率分别为 56.79%, 82.01%, 86.13%, 87.72%。故确定提取数为 3 次。

2.4.4 溶剂用量考察 精密量取 1.0 g·mL⁻¹ 样品溶液 10 mL,分别加 1, 2, 3, 4 倍量乙酸乙酯提取 3 次,合并乙酸乙酯层,减压回收溶剂,加 70% 甲醇定容至 25 mL,结果阿魏酸提取量分别为 1.086, 1.378, 1.392, 1.381 mg·g⁻¹,转移率分别为 74.38%, 94.38%, 95.34%, 94.59%;藁本内酯提取量分别为 8.75, 11.78, 11.94, 11.81 mg·g⁻¹,转移率分别为 63.23%, 85.12%, 86.27%, 85.33%。故确定溶剂用量为 2 倍。

2.5 验证试验 准确称取川芎药材 100 g,共 3 份,分别加 10 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,减压回收乙醇,浓缩至药液质量浓度 1.0 g·mL⁻¹,加 2 倍量乙酸乙酯提取 3 次,合并乙酸乙酯液,减压回收溶剂,减压干燥,得棕褐色具特异香气浸膏,浸膏平均得率 3.54%, RSD 1.3%。计算阿魏酸平均转移率 94.68%, RSD 0.9%,藁本内酯平均转移率 85.86%, RSD 1.2%。

3 讨论

川芎提取常采用超临界法、渗漉法和回流法。超临界法提取时,阿魏酸提取率较低^[9],需将川芎粉碎后先进行超临界提取,收集川芎挥发油,药渣再加乙醇回流提取阿魏酸;渗漉法在室温下操作,藁本内酯和阿魏酸提取率均较低;而采用 70% 乙醇回流提取可将川芎中阿魏酸及藁本内酯一起提出,提取率较高,纯化工艺采用溶剂萃取法可同时对川芎提取液中阿魏酸及藁本内酯进行纯化,有效成分转移率高,工艺简便、省时。阿魏酸及藁本内酯均对光、热不

稳定性,在实验过程中,样品溶液需用棕色瓶保存,提取温度应控制 $<80\text{ }^{\circ}\text{C}$,浓缩温度应控制 $<50\text{ }^{\circ}\text{C}$,避免长时间高温加热,以免影响阿魏酸及藁本内酯含量。

预试验分别以乙酸乙酯、水饱和和正丁醇、石油醚为溶剂对川芎提取液进行纯化,结果发现阿魏酸及藁本内酯在乙酸乙酯及水饱和正丁醇中溶解性均较好,且以后者为提取溶剂时,阿魏酸、藁本内酯转移率略高于以乙酸乙酯提取,但正丁醇提取液后期处理温度高、受热时间长,易造成川芎有效成分损失,故选用乙酸乙酯。乙酸乙酯为三类溶剂,根据《中国药典》2010年版二部附录VIII P规定,乙酸乙酯残留量限度应该控制 $<0.5\%$ ^[10]。为了控制乙酸乙酯残留量,本文采用顶空气相色谱法测定了3批川芎提取物中乙酸乙酯残留量,结果表明乙酸乙酯残留量均 $<0.5\%$ 。根据药材有效成分的理化特性,本文进行了复方参芎滴丸中川芎的提取纯化工艺研究,以最大限度地保留有效部位,去除无效成分。为确保制剂疗效,将各药材提取物按处方比例混合后进行药效试验,结果表明经提取、纯化后药效优于原方汤剂,且优选的工艺合理可行。

中药制备成滴丸必须经过精制,富集其有效成分或有效部位,才可使滴丸成分明确,质量易于控制。本文优选的纯化工艺,可大大降低川芎的出膏率,有效富集其有效成分,为复方参芎滴丸的开发奠定良好基础。

[参考文献]

- [1] 张晓琳,徐金娣,朱玲英,等. 中药川芎研究新进展[J]. 中药材,2012,35(10):1706-1711.
- [2] 吕非非,胡昌江,吴珊珊,等. 不同等级川芎饮片中藁本内酯和阿魏酸含量对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(20):52-54.
- [3] 戈继业,张振岭. 川芎药理作用研究及临床应用新进展[J]. 中国中西医结合杂志,1994,14(10):638-640.
- [4] 王永忠,童树洪. 川芎的传统用法与现代药理研究[J]. 中国药业,2012,21(7):95-96.
- [5] 章洪,李振国,张翠英. 川芎中阿魏酸类效应组分的提取纯化工艺研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(17):5410-5412,5415.
- [6] 郑琴,伍振峰,邱玲玲,等. 大川芎方中川芎提取纯化工艺及其镇静镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):6-9.
- [7] 初阳,宋洪涛,李丹,等. 注射用川芎提取物提取纯化方法的优选[J]. 中草药,2009,40(10):1573-1576.
- [8] 洪燕龙,徐德生,冯怡,等. 川芎中含阿魏酸效应组分的提取、纯化工艺研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(17):1740-1743.
- [9] 胡立翠,伍勋,杨学东. 正交试验法优选川芎药效成分的超临界流体萃取工艺[J]. 中国中药杂志,2013,38(20):3484-3488.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录61-65.

[责任编辑 刘德文]