

芎归散提取工艺的优化

宋金春^{1*}, 代 军², 以 盛², 陆 迅²

(1. 武汉大学人民医院药学部, 湖北 武汉 430060; 2. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430072)

[摘要] 目的: 优化芎归散水提醇沉工艺。方法: 以阿魏酸、咖啡酸得率作为评价指标, 采用全概率评分法考察最佳的浸泡时间、加水体积、煎煮时间、煎煮次数以及醇沉浓度、醇沉时间、水煎液密度。结果: 煎煮次数、加水体积、醇沉时间对工艺影响较大, 综合考虑最佳提取工艺为: 适量 95% 乙醇浸泡 0.5 h, 10 倍水, 煮沸 0.5 h, 煎煮 3 次; 醇沉工艺为将水提液浓缩到密度为 1.07, 醇沉浓度为 70%, 时间 12 h。结论: 该工艺可信可靠。

[关键词] 芎归散; 正交设计; 咖啡酸; 阿魏酸

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)03-0025-04

Optimization of Extraction Technique of Prescription of Traditional Chinese Medicine — Xiongui Powder

SONG Jin-chun^{1*}, DAI Jun², YI Sheng², LU Xun²

(1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Wuhan 430060, China;

2. Department of Pharmacy of Wuhan University, Hubei Wuhan 430072, China)

[收稿日期] 2006-06-25

[通讯作者] * 宋金春, Tel: 13971608052; E-mail: songjc1234@tom.com

[**Abstract**] **Objective:** To optimize the conditions of the water extraction and ethanol sedimentation technique for. **Methods:** The factors of affecting extraction of effective including the soak of Med Mat, the added amount of water, the concentration of ethanol, sedimentation time, density of water extraction were studied by orthogonal design with the yield rate of ferric acid and caffeic acid. **Results:** The most significant effective factors were the times of extraction, the amount of water, sedimentation time. The optimum condition for the extraction of Xionggui powder was that doused with 95% ethanol for 30 min, extracted 3 times, 0.5 h for extraction process and 10 times weight of water of material media; the density of water extraction was 1.07, the concentration of ethanol was 70%, the sedimentation time was 12 h. **Conclusion:** The result was reliable.

[**Key words**] Xionggui powder; orthogonal design; caffeic acid; ferric acid

芎归散为川芎、当归以一定比例配伍而成,是传统的活血药物。当归活血补血,川芎行气,两者合用能互制其短展其长。芎归提取物对动物血液流变学有很明显的影响,具有抗血小板聚集、降低血液黏度、活血化瘀的功效^[1]。因此预备将其制成活血化瘀的制剂。为了提高制剂疗效对制剂工艺进行优化。阿魏酸(Ferric acid, FA)是中药当归(*Angelica sinensis*)和川芎(*Ligusticum chuartziong Hort*)中的主要有效成分,具有明显的扩张冠脉血管、增加冠脉流量、改善心肌缺血、抑制胶原和二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚集作用。咖啡酸属于酚酸类化合物,川芎中含有此物质^[2]。咖啡酸结构中含有两个酚羟基,是天然的安全的自由基淬灭剂,具有优异的抗氧化特性^[3]。已有的药理学研究表明,咖啡酸具有活血化瘀、镇咳、祛痰、抗氧化、抗肿瘤等功效^[4,5],用于高血压以及癌症的治疗。因此以咖啡酸及阿魏酸两者作为评价指标优化提取工艺。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配四元梯度泵, DAD 检测器; G137PA 自动脱气机; 标准自动进样器; 柱温箱; 化学工作站。

试剂: 当归为伞形科植物当归[*Angelica sinensis*] 的干燥根, 川芎为伞形科植物 *Ligusticum chuartziong Hort* 的干燥根茎, 阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0773-9910), 咖啡酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 885-200102) 试剂: 甲醇为色谱纯(tedia 公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸、咖啡酸得率的测定 色谱条件 色谱柱: Agilent 公司 zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 甲醇 A: 磷酸盐缓冲液 B(取磷酸二氢钠 1.56 g, 加水使溶解成 1 000 mL, 再加 1% 磷酸溶

液调节 pH 值 3.8~4.0, 即得)^[6] 梯度洗脱, 100% B 保持 2 min; 2 min~3 min 100% B~75% B; 75% B 保持 2 min; 5~7 min 75% B~68% B; 68% B 保持 4 min; 11~16 min 68% B~55% B, 柱温: 30 °C, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 测定波长 313 nm, 进样 15 μL。

标准曲线的制备 精密称取阿魏酸对照品 5 mg 咖啡酸对照品 1.5 mg, 用甲醇定容至 100 mL, 配成每 mL 含阿魏酸 50 μg、咖啡酸 15 μg 的对照品溶液, 进样 5 μL, 10 μL, 15 μL, 20 μL, 25 μL。阿魏酸线性方程为 $Y = 53.69X - 36.62$, $r = 0.9998$, 在 16.7~83.5 μg·mL⁻¹ 范围内线性良好; 咖啡酸线性方程为 $Y = 50.182X - 3.25$, $r = 0.9998$, 在 5.0~25.0 μg·mL⁻¹ 范围内线性良好。阿魏酸、咖啡酸百分含量计算公式 = $C_{测} \times V / \text{药材质量}$ 。

2.2 数据处理 用多指标试验全概率法进行数据处理。设 B_i 为第 i 号试验, A_j 为第 j 个指标, $i = 1, 2 \dots n; j = 1, 2 \dots k$ 且 $A_1, A_2 \dots A_n$ 互不相容, 又设各指标的重要程度之比为 $A_1 : A_2 : \dots : A_k = m_1 : m_2 : \dots : m_k$, 则 $P(A_j) = m_j / N, j = 1, 2 \dots k$, 以 X_{ij} 表示第 j 个指标下的第 i 个测定值, 以 S_j 表示第 j 个指标下各次 (n 次) 试验结果的和, 即:

$$\sum_{i=1}^n X_{ij} = S_j, i = 1, 2 \dots n, j = 1, 2 \dots k, \text{ 则 } P(B_i/A_j) = X_{ij} / S_j \text{ 于是全概率公式为: } P(B_i)_{j=1}^k = \sum P(A_j) P(B_i/A_j) i = 1, 2 \dots n$$

2.3 水提取工艺研究

2.3.1 水提取工艺正交试验 取川芎: 当归 = 14 g: 6 g, 按正交设计分别进行水提, 过滤, 滤液合并, 浓缩, 用水定容, 摇匀, 取适量液体 3 000 r·min⁻¹ 离心, 上清液 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 测定阿魏酸及咖啡酸含量。

正交试验设计: 对方中中药材采用加水煎煮进

行提取,影响水提工艺的因素是:药材浸泡(A),加水量(B),煎煮时间(C),煎煮次数(D),其中加水量指药材重量的倍数。我们比较了不浸泡,加 15 mL 水浸泡 0.5 h,15 mL 95% 乙醇浸泡 0.5 h^[7]对提取效果的影响。以阿魏酸及咖啡酸含量为指标,每个因素 3 水平,应用 $L_9(3)^4$ 正交设计安排试验。因素水平见表 1。

表 1 水提工艺的 $L_9(3)^4$ 因素水平表

水平	因 素			
	A 浸泡时间 (h)	B 加水量 (倍)	C 沸腾时间 (h)	D 煎煮次数 (次)
1	0	6	0.5	1
2	95% 乙醇 0.5	8	1	2
3	水 0.5	10	2	3

2.3.2 水提工艺的结果 水提工艺的 $L_9(3)^4$ 正交实验结果如表 2。结果运用正交设计助手 II v3.1 处理。

表 2 水提工艺的正交实验结果表

实验号	阿魏酸含量 (%)	概率	咖啡酸含量 (%)	概率	总分
1	0.015 43	0.036 10	0.004 338	0.035 07	0.071 17
2	0.035 19	0.082 40	0.011 75	0.095 0	0.177 4
3	0.069 64	0.163 0	0.023 14	0.187 1	0.350 1
4	0.054 29	0.127 0	0.015 70	0.126 9	0.253 9
5	0.039 34	0.092 10	0.011 39	0.092 07	0.184 2
6	0.082 84	0.194 0	0.018 16	0.146 8	0.340 8
7	0.036 66	0.085 80	0.012 48	0.100 9	0.186 7
8	0.056 68	0.132 7	0.016 84	0.136 1	0.268 8
9	0.037 19	0.087 04	0.009 95	0.080 40	0.167 4
	0.200	0.171	0.227	0.141	
\bar{k}	0.260	0.210	0.200	0.235	
	0.208	0.286	0.240	0.291	
极差	0.060	0.115	0.040	0.150	

从表 2 看出,对水提因素的影响依次为:提取次数>加水体积>浸泡>沸腾时间,考虑到煎煮时间对提取效果影响不大,从节省时间的角度考虑,故取每次煎煮 0.5 h,最佳提取工艺为加适量 95% 乙醇浸泡 0.5 h,加 10 倍水,煎煮 0.5 h,煎煮 3 次。

2.4 醇沉工艺的考察

2.4.1 正交试验设计 称取川芎 140 g、当归 60 g,依水提最佳提取工艺进行提取。得水煎液,滤过,滤

液浓缩至相对密度 1.00,为水提浓缩液,分成 9 等份,按照正交表进行处理,最后 50% 乙醇定容至 250 mL,取适量 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样,测阿魏酸及咖啡酸含量。影响醇沉效果的因素为醇沉时间 A,水提液浓缩的相对密度 B,醇沉的浓度 C,选择此 3 者为考察因素,以阿魏酸及咖啡酸含量作为评价指标,应用 $L_9(3)^4$ 正交设计安排试验。因素水平见表 3。阿魏酸及咖啡酸测定方法如水提工艺。

表 3 醇沉工艺的 $L_9(3)^4$ 因素水平表

水平	因 素		
	A 醇沉时间 (h)	B 水提液相对密度 (80 °C)	C 醇沉浓度 (%)
1	12	1.03	60
2	24	1.07	70
3	36	1.11	80

2.4.2 醇沉工艺正交实验的结果 结果见表 4。对醇沉结果进行方差分析,得表 5。

表 4 醇提工艺正交实验结果表

实验号	阿魏酸含量 (%)	概率	咖啡酸含量 (%)	概率	总概率
1	0.080 71	0.130 9	0.010 52	0.127 8	0.258 7
2	0.095 15	0.154 3	0.013 93	0.169 2	0.323 5
3	0.085 07	0.138 0	0.012 60	0.153 0	0.291 0
4	0.081 71	0.132 5	0.011 71	0.142 2	0.274 7
5	0.088 05	0.142 8	0.013 35	0.162 1	0.304 9
6	0.058 19	0.094 38	0.007 015	0.085 24	0.179 6
7	0.043 80	0.071 05	0.004 391	0.053 33	0.124 4
8	0.039 41	0.063 93	0.004 639	0.056 34	0.120 3
9	0.044 42	0.072 05	0.004 189	0.050 87	0.122 9
	0.291	0.219	0.186		
\bar{k}	0.253	0.250	0.240		
	0.123	0.198	0.240		
极差	0.168	0.052	0.054		

表 5 醇提工艺正交实验方差分析表

因素	SS	V	MS	F	P
醇沉时间	0.047	2	0.023 5	47	< 0.05
醇浓度	0.004	2	0.002	4	> 0.05
水提液密度	0.006	2	0.003	6	> 0.05
误差	0.001	2	0.000 5		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ 。

由表 5 可知醇沉时间对结果具有显著影响, 70% 醇沉效果与 80% 醇沉效果相差不大, 故选用 70% 醇沉浓度。最佳醇沉工艺为将水提液浓缩至相对密度为 1.07, 70% 醇沉浓度, 12 h。

2.5 工艺验证 取川芎 140 g, 当归 60 g 3 批, 适量 95% 乙醇浸泡 0.5 h, 加 10 倍水, 煎煮 3 次, 每次 0.5 h, 水煎液合并, 浓缩至相对密度为 1.07(80 ℃), 加 95% 乙醇至乙醇浓度为 70%, 醇沉 12 h, 抽滤, 定容。阿魏酸及咖啡酸百分含量见表 6。

表 6 三批样品含量测定

批次	阿魏酸含量(%)	咖啡酸含量(%)
1	0.098 04	0.014 16
2	0.098 12	0.014 11
3	0.098 16	0.014 06

3 讨论

对表 2 4 中的结果用多指标全概率方法进行数据处理, 具体运算及公式相关符号的意义可参考文献[8]。阿魏酸与咖啡酸均有活血化瘀作用, 故本文权重定为 $m_1:m_2=$ 阿魏酸: 咖啡酸 = 1: 1。二指标的 $P(B_i/A_j) = X_{ij}/S_j$ 值列于表 2 4 各指标的右侧。二指标越大提示工艺越优。

醇沉样后阿魏酸浓度较未醇沉前浓度大, 其原因可能为阿魏酸在乙醇中溶解度大。但是醇沉时间不能过长, 否则沉淀物可能吸附较多的有效成分。

采用单一指标评价工艺代表性较差, 用不同种类的成分作为评判指标其结果才有较广泛的代表性。但由于不同药材中的成分含量有时不在同一数量级, 直接累加则使数量级大的对结果的贡献大, 而小的贡献小。常不符合组方原则及治则。通过概率

转化可使不同量纲及不同数量级的数据整齐化, 且包含了原始数据的可比信息, 可直接累加。

药材提取前用适量乙醇浸泡后阿魏酸等成分的提取效率更高, 其原因可能是少量乙醇可以溶解药材表面脂性成分, 使水分更好的进入药材内部, 促进有效成分溶出。

[参考文献]

- [1] 沈欣, 宗桂珍, 李德凤. 复方芎归散对大鼠在体子宫痉挛及血液流变学的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(8): 22.
- [2] Xueguo C, Liang K, Xingye S. Separation and identification of compounds in Rhizoma chuanxiong by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. J. Chromatogr. A, 2004, 1040 (2): 169-178.
- [3] Saleem M, Kim HJ, Jin C. Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of Parthenocissus tricuspidata[J]. Arch Pharm Res 2004, 27(3): 300-304.
- [4] 徐峰, 宋丹青, 甄永苏, 等. 咖啡酸钠与丝裂霉素抗肿瘤的协同作用[J]. 药学学报, 2002, 37(6): 405-408.
- [5] 赵慧, 雷云霞, 沈冰. 灯盏细辛治疗女性糖尿病患者周围神经病变[J]. 中国临床康复, 2004, 8(21): 4205.
- [6] 赵红旗, 李钦. RP-HPLC 测定复方南板蓝根片咖啡酸的含量[J]. 中成药, 2004, 26(10): 附 11.
- [7] 夏勤. RP-HPLC 测定生化汤中不同溶媒煎煮对阿魏酸含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(4): 306.
- [8] 贺福元, 彭关富, 罗杰英, 等. 多指标全概率评分法对鹤鹑颗粒剂提取工艺的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(4): 251.