

多指标正交试验优选当归提取工艺

陈象青^{*}, 刘圣, 方焱, 张善堂, 汪霞

(安徽医科大学附属省立医院药剂科 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 合肥 230001)

[摘要] 目的: 优选当归的最佳提取工艺。方法: 分别以阿魏酸和当归多糖为指标, 采用正交试验法, 以 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 对提取过程中的加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)和醇沉浓度(D)4个因素进行优选研究。结果: 以阿魏酸和多糖得率为考察指标的最优提取工艺为加10倍量水, 提取时间为1.5 h, 提取3次, 80%乙醇醇沉。结论: 按照筛选最佳提取工艺验证, 提取效率最高, 此提取工艺可行。

[关键词] 当归; 阿魏酸; 当归多糖; 正交设计

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0025-04

当归药用部位为伞形科植物当归 *Aangellica sinensis*(Oliv) Diels. 的根, 具有补血活血、调经止痛的功效。当归药用历史悠久, 历代本草均有记载, 始记于《神农本草经》谓之“当归味温, 主呃逆上气”被列为中品。有补血活血、调经止痛、润肠通便之功, 为医家常用, 素有“十方九归”之称, 主要有效成分为阿魏酸和当归多糖, 当归多糖有补血作用, 增强免疫功能, 促进造血功能, 促进凝血和血小板聚集作用, 还有抗肿瘤、抗辐射损伤、镇痛和抗氧化作用; 阿魏酸有抗氧化和清除自由基作用, 降压、防治冠心病、抗菌和抗病毒、抗突变和防癌作用。

1 仪器与试药

HP8453 紫外-可见分光光度计(美国惠普), LC-6A 高效液相色谱仪(日本岛津), BT124S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

当归(产于甘肃, 批号 08062607), 葡萄糖(分析纯, 批号 080522, 上海化学试剂分装厂), 阿魏酸(中国药品生物制品鉴定所, 批号 08161805A), 甲醇(色谱纯, 分析纯), 乙醚、丙酮、硫酸、苯酚、冰乙酸、无水乙醇、三乙胺均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定阿魏酸的含量

2.1.1 色谱条件 流动相甲醇-水-冰乙酸-三乙胺

(30 70 0.5 0.1); 检测波长 320 nm; 柱温 30 ; 色谱柱 Hypersil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 进样量 20 μL。在该色谱条件下, 样品中阿魏酸与其他峰能够达到基线分离, 保留时间在 11 min 左右。对照品与样品的 HPLC 图见图 1。

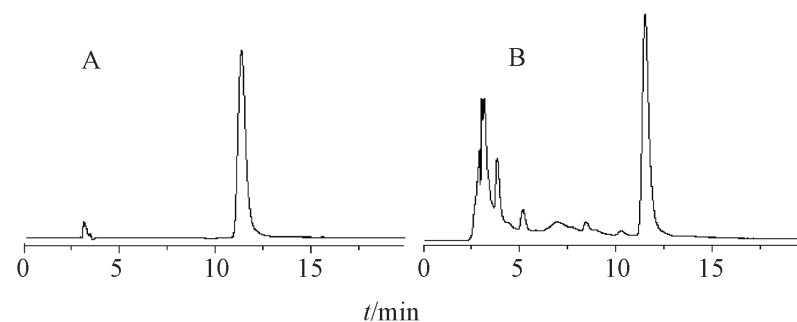


图 1 阿魏酸对照品(A)与样品(B)的 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定阿魏酸对照品 0.0108 g, 加 70% 甲醇溶解, 并稀释定容于 50 mL 棕色量瓶中, 得浓度为 $0.216 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照液。从中精密移取 1.5 mL 至 50 mL 棕色量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 得浓度为 $6.48 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿魏酸对照液。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取当归饮片 20 g, 粉碎, 按正交试验提取后, 水提液浓缩至含生药量 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (即浓缩至 40 mL), 按正交方案醇沉, 静置, 过滤, 滤饼依次用无水乙醇、乙醚、丙酮洗涤, 50 烘干, 称重, 得当归多糖量; 滤液浓缩回收乙醇, 浓缩至 30 mL, 加甲醇定容于 100 mL 棕色量瓶中, 精密移取 1.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 加 70% 稀释并定容, 取少量用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液。

2.1.4 线性关系考察 从 $0.216 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿魏酸对照液中分别精密移取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mL 于 7 个 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释

[收稿日期] 20100306(004)

[通讯作者] 陈象青, 硕士, 安徽省立医院副主任中药师, 主要从事中药制剂和药理研究。Tel: (0551) 2283378-815, E-mail: cxqah@163.com

至刻度,得浓度为 0.864, 1.728, 2.592, 3.456, 4.320, 5.184, 6.048 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿魏酸标准溶液。按上述色谱条件分别进样 20 μL ,测得峰面积。以标准溶液浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,其回归方程为 $Y = 40\,920X + 4\,182.7$, $r = 0.999\,9$ 。结果表明,阿魏酸在 0.864 ~6.048 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.1.5 稳定性考察 精密吸取对照品溶液 20 μL ,分别于 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24 h 进样,相对峰面积 RSD 为 0.72%,表明稳定性良好。

2.1.6 精密度考察 吸取对照品溶液 20 μL ,在所选色谱条件下连续进样 6 次,相对峰面积 RSD 为 0.33%,表明精密度良好。

2.1.7 回收率考察 分别从实验提取的阿魏酸中精密移取 0.5 mL 于 6 个 25 mL 量瓶中,加 0.216 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿魏酸对照液 0.5 mL,加 70% 甲醇稀释至刻度。测定含量,计算回收率,结果表明,平均回收率 99.97%, RSD 0.32%。

2.1.7 样品测定 将供试品溶液,在上述色谱条件下依次进样 20 μL ,每个样品测 2 次,记录峰面积,求平均值,计算阿魏酸的质量浓度,根据样品测定结果,计算阿魏酸的质量分数及得率。

2.2 紫外-可见分光光度法测定当归多糖的含量

2.2.1 葡萄糖对照液的配制 精密称定 105 干燥至恒重的葡萄糖 0.0524 g 置 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 0.524 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖对照液。

2.2.2 当归多糖供试液的制备 精密称取当归多糖约 50 mg,加蒸馏水溶解,并定容于 100 mL 量瓶中;从中精密移取 10 mL 于 50 mL 量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,得样品溶液。

2.2.3 苯酚-硫酸法^[1] 精密移取 2 mL 于 25 mL 量瓶中,分别加入 5% 苯酚试液 1.0 mL,浓硫酸 7.0 mL,混匀。沸水浴 30 min,取出后冰水浴 15 min。

2.2.4 线性关系考察 从 0.524 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖对照液中精密移取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL 溶液于 6 个 50 mL 量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,得浓度为 0.010 48, 0.020 96, 0.031 44, 0.041 92, 0.052 40, 0.062 88 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖标准液。按 3.2.1 项下(3)操作,并用蒸馏水制空白 1 份。在 485 nm 处测其吸光度,绘制标准曲线。得回归方程: $C = 1.688\,7 \times 10^{-2} A - 1.185\,8 \times 10^{-4}$, $R =$

0.999 5,结果表明,葡萄糖在 0.002 096 ~0.012 576 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.5 最大吸收波长的确定 取 0.010 48 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖标准液和当归多糖供试品溶液,按 2.2.3 项下操作,在 200 ~600 nm 处测其吸光度,结果得到葡萄糖标准液的最大吸收波长在 487 nm,而当归多糖样品溶液的最大吸收波长在 482 nm。二者最大吸收波长不一样,但在 485 nm 均有较大吸收,故取 485 nm 为测定波长。

2.2.6 稳定性考察 取 0.041 92 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖标准液和当归多糖供试品溶液,按 2.2.3 项下操作,在 485 nm 处测其吸光度,前 60 min 每隔 10 min 测一次,后 60 min 每隔 20 min 测一次,结果葡萄糖标准液吸光度测定值 RSD 为 0.28%,当归多糖样品液吸光度测定值 RSD 为 0.56%,表明测定值在 120 min 内保持稳定。

2.2.7 精密度考察 取 0.041 92 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖标准液,按 2.2.3 项下操作,共 6 份,在 485 nm 处测其吸光度, RSD 为 1.4%,结果表明精密度良好。

2.2.8 回收率考察 分别精密移取实验 4 提取的当归多糖样品溶液 3.0 mL 于 6 个 25 mL 量瓶中,再精密移取 0.524 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖对照液 2.0 mL 于其中,加蒸馏水稀释并定容,按 2.2.3 项下操作,结果平均回收率 102.2%, RSD 1.6%。

2.2.9 样品测定 取 9 个实验提取的当归多糖样品按 2.2.3 项下操作,485 nm 处测吸光度,根据标准曲线得到浓度,根据样品测定结果计算当归多糖的质量分数(质量分数 = $C \times 5 \times 5 \times 100 / \text{称样量} \times 100\%$)和得率(得率 = 质量分数 $\times$ 沉淀质量 / 生药投量 $\times 100\%$)。

2.3 正交试验 以阿魏酸和当归多糖得率为指标,考察加水量、提取时间、提取次数及醇沉浓度 4 个因素,每份样品 20 g, 9 份,以 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 1,结果见表 2。

表 1 因素水平表

水平	A	B	C	D
	加水量 / 倍	提取时间 / h	提取次数	醇沉浓度 / %
1	6	1	1	60
2	8	1.5	2	70
3	10	2	3	80

表 2 正交试验结果			%
No	阿魏酸	当归多糖	
1	0.021	1.30	
2	0.040	5.58	
3	0.042	8.69	
4	0.049	6.06	
5	0.055	3.77	
6	0.033	2.91	
7	0.060	4.88	
8	0.036	3.27	
9	0.052	3.46	

通过极差分析,因素 *B* 对阿魏酸及多糖提取的影响均最小,故以 *B* 因素为误差项,分别对阿魏酸和当归多糖得率进行方差分析估算,结果见表 3、表 4。

表 3 阿魏酸得率方差分析					
方差来源	<i>SS</i>	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>A</i>	3.67 ×10 ⁻⁴	2	1.83 ×10 ⁻⁴	127.00	<0.01
<i>C</i>	8.16 ×10 ⁻⁴	2	4.08 ×10 ⁻⁴	282.54	<0.01
<i>D</i>	6.9 ×10 ⁻⁶	2	3.4 ×10 ⁻⁶	2.38	
<i>B</i> (误差)	2.9 ×10 ⁻⁶	2	1.4 ×10 ⁻⁶		

注: $F_{1-0.01}(2,2)=99.0$; $F_{1-0.05}(2,2)=19.0$

表 4 当归多糖得率方差分析					
方差来源	<i>SS</i>	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>A</i>	2.77	2	1.39	1.78	
<i>C</i>	17.81	2	8.91	11.41	
<i>D</i>	15.01	2	7.51	9.62	
<i>B</i> (误差)	1.56	2	0.78		

注: $F_{1-0.05}(2,2)=19.0$

由方差分析发现,因素 *A*、*C* 对阿魏酸提取影响大,而因素 *C*、*D* 对当归多糖提取影响大,要使二者提取效率都高,确定最优工艺为 *A*₃*B*₂*C*₃*D*₃,即加 10 倍量的水,提取 1.5 h,提取 3 次,80% 乙醇醇沉。

2.4 工艺验证试验 称取当归药材 20 g 各 5 份,以 *A*₃*B*₂*C*₃*D*₃ 工艺条件进行提取,得阿魏酸和当归多糖并测定其含量。结果提示本正交试验优选的工艺条件稳定、可靠、较理想,见表 5。

4 讨论

到目前为止,已发现当归化学成分有有机酸类、挥发油、多糖、香豆素类、黄酮类、氨基酸等。其中,主要有效成分是当归多糖和有机酸中的阿魏酸。因为阿魏酸在醇中溶解度大,可溶于热水,微溶于冷水,对当归中阿魏酸的提取多为不同浓度的醇

表 5 工艺验证试验结果				
No	阿魏酸		当归多糖	
	含量 /mg	得率 /%	含量 /g	得率 /%
1	11.2862	0.056	1.670	8.35
2	11.5898	0.058	1.710	8.55
3	11.1944	0.056	1.638	8.19
4	11.3981	0.057	1.684	8.42
5	11.0483	0.055	1.674	8.37
聊±s	11.30336	0.0564	1.6752	8.376
	±0.2051	±0.0011	±0.0260	±0.1299
RSD/%	1.8	2.0	1.1	1.6

提^[2-3],也有水提^[4-5],超声提取法^[6]和微波法提取法^[7]等;而当归多糖水溶性好,不溶于醇,目前一般采用沸水回流提取^[8]和恒温水浴提取^[9]的方法。以上研究均以阿魏酸和当归多糖中两者之一为考核指标,然而阿魏酸和当归多糖都是药理活性成分,只提取一种成分,药材利用率低,造成浪费。故本实验采用水提法将阿魏酸和当归多糖一并提取,醇沉法将二者分离,分别以阿魏酸和当归多糖为指标,采用 *L*₉(3⁴) 正交试验设计系统,考察加水量、提取时间、提取次数及醇沉浓度对这 2 种成分得率的影响,优选出最佳提取工艺。

据目前文献报道,阿魏酸多用高效液相色谱法测定含量^[10-12]。由于阿魏酸见光易分解,故用棕色容量瓶避光保存,在流动相中加入冰乙酸以抑制其分解。为了得到良好的分离效果,实验中考察了多种流动相比比例,曾用流动相甲醇-水-冰乙酸(40 60 0.5),甲醇-水-冰乙酸(40 60 0.2),甲醇-水-冰乙酸(40 60 1.0),甲醇-水-冰乙酸(50 50 0.5),均未达到分离目的,而用甲醇-水-冰乙酸(30 70 0.5)分离效果还可以,但是峰拖尾现象严重,故加入少量三乙胺以抑制拖尾。最后采用甲醇-水-冰乙酸-三乙胺(30 70 0.5 0.1)为流动相。

由于目前无当归多糖对照品出售,因而参考文献报道以葡萄糖为对照品,采用紫外-可见分光光度法测定含量,同时考虑到当归多糖提纯精制过程繁琐且损耗大,影响含量测定,故以粗品进行含量测定。

当归具有改善心血管系统、保肝利胆、抗炎镇痛、增强免疫等多种药理作用,其有效成分当归多糖和阿魏酸均有较强的药理作用,优选其有效成分的提取工艺十分有意义,可使当归充分合理应用。

[参考文献]

[1] 刘云. 当归多糖的提取及含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(1) : 49, 53.

[2] 王萍, 赵生俊, 张红, 等. 当归中阿魏酸提取工艺的研究[J]. 新疆中医药, 2006, 24(3) : 49.

[3] 蹇红玉, 吴劲松. 当归渗漉法提取工艺的研究[J]. 湖南中医杂志, 2008, 24(3) : 94.

[4] 支敏倩. 当归饮片中阿魏酸提取工艺研究[J]. 黑龙江中医药, 2006, 4: 56.

[5] 范燕慕. 正交试验优化当归的提取工艺[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(16) : 19.

[6] 金汝城, 李贵文, 马素丽, 等. 当归中阿魏酸提取工艺的优化研究[J]. 中成药, 2008, 30(4) : 516.

[7] 潘媛媛, 廖克俭, 戴跃玲. 微波法提取当归中阿魏酸的工艺研究[J]. 辽宁化工, 2008, 37(10) : 649.

[8] Ye Y N, Liu E S L, Li Y, et al. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury[J]. Life Sciences, 2001, 69: 637.

[9] 孙元琳, 顾小红, 汤坚, 等. 当归水溶性多糖的分离、纯化及结构初步分析[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1) : 1.

[10] 陈超超, 王艳, 梁超. 高效液相色谱法测定当归中阿魏酸的含量[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2008, 27(4) : 284.

[11] 于淼, 于治国, 李昕昊, 等. 高效液相色谱法测定当归中阿魏酸的含量[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2004, 21(2) : 96.

[12] 唐力英, 王祝举, 赫炎, 等. 高效液相色谱法测定当归中阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2) : 14.

[责任编辑 仝燕]

《中国实验方剂学杂志》入编中文核心期刊信息

依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《中国实验方剂学杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版(即第五版) 之中国医学类的核心期刊。该核心期刊按《中国图书馆分类法》的学科体系, 列出了 73 个学科的核心期刊表, 并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括: 题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN 号、CN 号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。该研究成果只是一种参考工具书, 主要是为图书情报部门对中文期刊的评估与订购、为读者导读提供参考。