

两种方法提取川芎挥发油指纹图谱对比

胡春兰^{1,2}, 杨冬丽^{2,3}, 张东阁^{2,3}, 王春民^{2,3*}

(1. 承德医学院 中药研究所, 河北 承德 067000; 2. 颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000;
3. 河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的:建立川芎挥发油的气相(GC)指纹图谱,并且比较蒸馏-萃取耦合法和传统蒸馏法所提川芎挥发油的气相指纹图谱。方法:蒸馏-萃取耦合法提取川芎挥发油,气相色谱法进行指纹图谱研究,采用 AT-5 弹性石英毛细管柱(0.32 mm × 30 m,0.25 μm),进样口和检测器温度 250 ℃,FID 检测器,用“中药指纹图谱计算机辅助相似度评价软件”计算相似度。结果:建立了蒸馏-萃取耦合法提取川芎挥发油的气相(GC)指纹图谱,方法有较好的精密度,重复性,稳定性(RSD < 3%)。蒸馏-萃取耦合法所提川芎挥发油和传统蒸馏法所提川芎挥发油指纹图谱中共有成分 > 98%,共有成分相似度 > 0.998。结论:蒸馏-萃取耦合法所提川芎挥发油中藁本内酯比传统蒸馏法所提挥发油中藁本内酯含量增加 83.46%,该法所提川芎挥发油的气相指纹图谱与传统蒸馏法所提川芎挥发油的气相指纹图谱一致。

[关键词] 气相色谱法; 川芎挥发油; 蒸馏-萃取耦合法; 指纹图谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)05-0088-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015050088

Fingerprints of Volatile Oil from Chuanxiong Rhizoma by Two Methods HU Chun-lan^{1,2}, YANG Dong-li^{2,3}, ZHANG Dong-ge^{2,3}, WANG Chun-min^{2,3*} (1. Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 2. Jingfukang Pharmaceutical Group, Chengde City in Hebei Province, Chengde 067000, China; 3. The New Excipients of TCM Engineering Research Center of Hebei, Chengde 067000, China)

[Abstract] Objective: To establish GC fingerprints of volatile oil from Chuanxiong Rhizoma. To compare the consistency of fingerprints of volatile oil from Chuanxiong Rhizoma by distillation coupling solvent extraction and traditional distillation extraction. Method: The volatile oil was extracted from Chuanxiong Rhizoma by distillation coupling solvent extraction. The chromatography fingerprints was established by AT-5 fused-silica capillary (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm) column, injector temperature of 250 ℃, FID detector with temperature at 250 ℃. The similarity was calculated with “TCM fingerprint aided similarity evaluation software”. Result: Established GC fingerprints of volatile oil from Chuanxiong Rhizoma. The reproducibility, accuracy and stability of the method were very good in the tests (all RSD < 3%). The common components of volatile oil from Ligusticum chuanxiong by distillation coupling solvent extraction and traditional distillation extraction > 98%. The similarity of common components was more than 0.998. Conclusion: The ligustilide from Chuanxiong Rhizoma by distillation coupling solvent extraction is 83.46 percent higher than traditional distillation extraction. The fingerprints of volatile oil from Chuanxiong Rhizoma by distillation coupling solvent extraction and traditional distillation extraction is consistent.

[Key words] gas chromatography; distillation coupling solvent extraction; volatile oil of Chuanxiong Rhizoma; fingerprints

[收稿日期] 20140701(014)
[基金项目] 河北省自主创新重大成果转化项目(11276409Z)
[第一作者] 胡春兰,在读硕士,Tel:15833240677,E-mail:1040138032@qq.com
[通讯作者] *王春民,硕士,主任中药师,从事中药的新技术与新应用研究,Tel:0314-2292103,E-mail:13603140779@139.com

挥发油是川芎主要的有效部位,川芎挥发油中主要有藁本内酯、丁基苯酞、丁烯基苯酞、蛇床内酯等苯酞类化合物^[1-2]。中药质量评价一直是中药研究与应用中的难点与重点问题,而建立在中药成分系统研究基础上的中药指纹图谱分析是一种综合、有效的评价手段,已成为国际公认的控制中药或天然药物质量最有效的方法之一^[3-5]。传统蒸馏法提取的川芎挥发油疗效确切^[6-9],但是提取率较低^[10-11],溶剂萃取法、超临界 CO₂ 萃取法用于提取川芎挥发油时可以提高提取率,但是成分与传统蒸馏法所提川芎挥发油成分相差很大,安全性不能保证^[12-15]。文献对于川芎挥发油指纹图谱研究较少,有报道用 SGE-30QC3/AC225 弹性石英毛细管柱采用二阶程序升温法对超临界 CO₂ 萃取法所得川芎挥发油进行了指纹图谱研究,只分离出 5 个共有峰^[16]。本实验用 AT-5 弹性石英毛细管柱采用四阶程序升温法对川芎挥发油进行指纹图谱研究,并比较蒸馏-萃取耦合法与传统蒸馏法提取川芎挥发油指纹图谱的一致性,为川芎挥发油中成分的研究提供试验依据。

1 材料

7890A 系列气相色谱仪(美国 Agilent),TDL-4013 型离心机(上海安亭科学仪器厂),XL-20B 型密封型摇摆式粉碎机(广州市旭朗机械设备有限公司)。藁本内酯对照品(批号 111737-201305,中国食品药品检定研究院),川芎药材由颈复康药业集团有限公司提供(批号 Y001-131001),其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 AT-5 弹性石英毛细管柱(0.32 mm×30 m,0.25 μm),FID 检测器,载气 N₂,进样口和检测器温度 250℃,采用四阶程序升温(初始温度 90℃,以 1.5℃·min⁻¹程序升温至 100℃;15℃·min⁻¹程序升温至 159℃,保持 1 min;0.5℃·min⁻¹程序升温至 165℃,保持 1 min;30℃·min⁻¹程序升温至 250℃,保持 3 min),进样量 2 μL,分流比 10:1。

2.2 对照品溶液的制备 取藁本内酯对照品适量,精密称定,置 25 mL 棕色量瓶中,三氯甲烷定容,摇匀,精密量取 5 mL,置 10 mL 棕色量瓶中,加乙醇定容至刻度,制成 20.02 g·L⁻¹对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密量取川芎挥发油 0.1 mL,置 10 mL 棕色量瓶中,用乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,再将其用乙醇稀释 10 倍,即得。

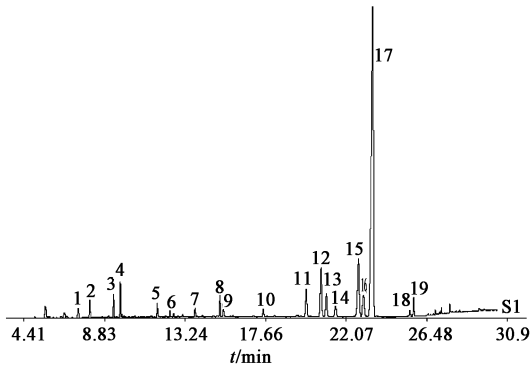
2.4 传统蒸馏法和蒸馏-萃取耦合法提取工艺

2.4.1 传统蒸馏法 通过单因素考察浸泡时间、提取时间、加水量、单位时间回流量(每分钟回流体积)对挥发油得量的影响,确定正交实验因素和水平,通过 L₉(3⁴)正交表安排实验确定川芎挥发油传统蒸馏法最佳提取工艺。最佳提取工艺为取川芎(粉碎成直径<1 cm 的粗粉)200 g,置 3 000 mL 的圆底烧瓶中,加 6 倍量水,摇匀,按回流量 9.5~10.5 mL·min⁻¹,蒸馏提取 6 h,得到川芎挥发油并测量其体积;计算每 100 g 川芎药材所提挥发油中藁本内酯含量。

2.4.2 蒸馏-萃取耦合法 在川芎挥发油传统蒸馏法提取工艺的基础上,确定蒸馏-萃取耦合法提取川芎挥发油提取工艺。采用传统蒸馏和萃取剂萃取耦合的方法,得到混有萃取剂的挥发油,再采用乙醇萃取和 20% 盐水萃取后得到川芎挥发油。以蒸馏-萃取耦合法所提挥发油体积增加量和藁本内酯增加量为指标,通过考察所加萃取剂的种类和所加萃取剂量确定蒸馏-萃取耦合法的提取工艺。提取工艺为取川芎(粉碎成直径<1 cm 的粗粉)200 g,置 3 000 mL 的圆底烧瓶中,加 6 倍量水,摇匀,挥发油提取器中加 1.5 mL 液体石蜡,按回流量 9.5~10.5 mL·min⁻¹,蒸馏提取 6 h,得到混有萃取剂的挥发油,在提取出的混有萃取剂的挥发油中加入乙醇 2.5 mL,轻摇,3 000 r·min⁻¹离心 3 min,将挥发油乙醇液吸出,再加入乙醇 0.5 mL,轻摇,3 000 r·min⁻¹离心 3 min,将挥发油乙醇液吸出,重复 4 次。在挥发油乙醇液中加入等量的质量分数为 20% 的盐水,3 000 r·min⁻¹离心 3 min,将上层挥发油吸出放入带刻度的玻璃管内,再加入 0.5 mL 质量分数为 20% 的盐水,离心 3 000 r·min⁻¹离心 3 min,将上层川芎挥发油吸出放入带刻度的玻璃管内,重复 4 次,得到川芎挥发油并读出体积,计算每 100 g 川芎药材所提挥发油中藁本内酯含量。2 种工艺的结果在挥发油提取量和藁本内酯的提取量进行了对比,蒸馏-萃取耦合法所提川芎挥发油体积比传统蒸馏法增加 123.81%,蒸馏-萃取耦合法所提川芎挥发油中藁本内酯含量比传统蒸馏法增加 83.46%。通过这两项指标得出蒸馏-萃取耦合法在提取川芎挥发油方面优于传统蒸馏法。

2.5 指纹图谱的建立 取 2.3 项制备的供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下进行测定,得到 2 种提取方法各 10 批川芎挥发油 GC 指纹图谱,根据色谱图中各色谱峰的相对保留时间,确定共有峰,并选取其中 19

个共有峰作为特征指纹峰,建立的指纹图谱见图 1。



1~19. 共有峰;17. 蒿本内酯

图 1 川芎挥发油 GC 指纹谱共有峰标识

Fig.1 GC fingerprint common peak identification of volatile oil from Chuanxiong Rhizoma

2.6 共有峰的标定 川芎挥发油 GC 指纹图谱中,共有指纹峰 19 个,以 17 号峰(蒿本内酯)为参照峰(S),其他特征峰依次标号 1,2,3…19,计算相对保留时间和相对保留峰面积。

2.7 方法学考察

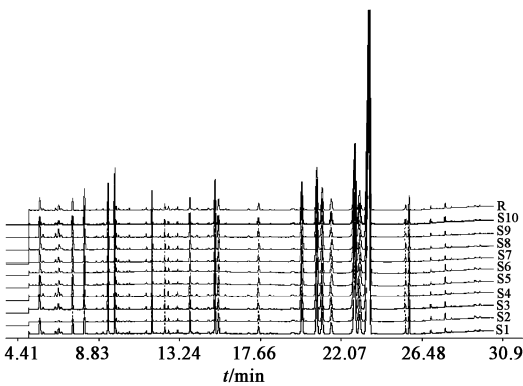
2.7.1 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项色谱条件连续进样 6 次,测定。计算各共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3.0%,结果表明仪器精密度良好。

2.7.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0,1,2,4,6,8 h 按 2.1 项色谱条件进样测定。计算各共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3.0%,结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.7.3 重复性试验 取同一批样品,制得 6 份供试品溶液,按 2.1 项色谱条件进样测定。计算各共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3.0%,结果表明该方法重复性良好。

2.8 两种提取方法所得川芎挥发油指纹图谱相似度评价 将 10 批传统蒸馏法所提川芎挥发油图谱(AIA 格式)依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版软件,进行色谱峰匹配,叠加图见图 2,以 S1 为对照图谱,相似度分别为 1.000,0.998,0.999,0.999,0.999,0.999,0.999,1.000,0.999,0.998。将 10 批蒸馏-萃取耦合合法所提川芎挥发油图谱(AIA 格式)依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版软件,叠加图见图 3,以 S1 为对照图谱,相似度为 1.000,1.000,0.999,0.999,0.999,1.000,1.000,1.000,1.000,0.999,1.000。由相似度结果可知,传统蒸馏法和蒸馏-萃

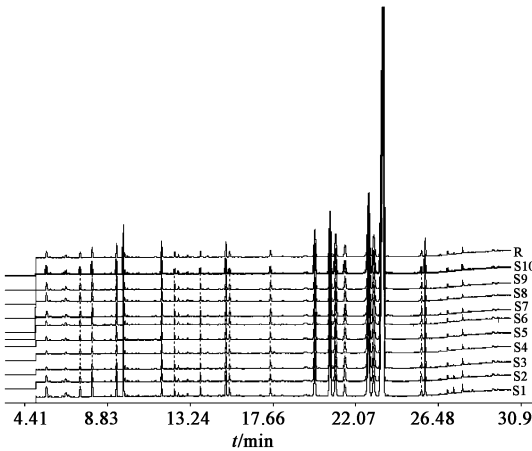
取耦合合法两种提取川芎挥发油的方法稳定,差异性小。



R. 共有模式;S1~S10. 10 批样品

图 2 传统蒸馏法所提川芎挥发油 GC 指纹谱

Fig.2 GC fingerprints of volatile oil from Chuanxiong Rhizoma by traditional distillation extraction

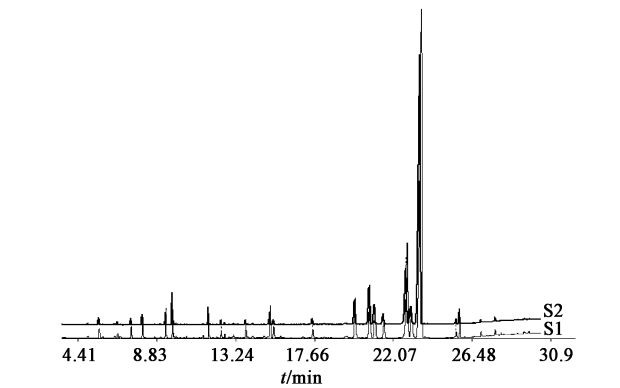


R. 共有模式;S1~S10. 10 批样品

图 3 蒸馏-萃取耦合合法所提川芎挥发油 GC 指纹谱

Fig.3 GC fingerprints of volatile oil from Chuanxiong Rhizoma by distillation coupling solvent extraction

2.9 两种提取方法所得川芎挥发油指纹图谱对比 将 2 种提取方法所提川芎挥发油的指纹图谱生成的共有模式进行指纹匹配,以传统蒸馏法所提川芎挥发油生成的共有模式作为参照谱(S1),叠加图见图 4。相似度分别为 1.000,0.998;计算 2 种提取方法所提川芎挥发油指纹图谱中 19 个共有峰所占峰面积总和的百分比,见表 1。蒸馏-萃取耦合合法所提川芎挥发油指纹图谱与传统蒸馏法所提川芎挥发油指纹图谱确定的 19 个共有峰,占传统蒸馏法所提川芎挥发油的 98%,说明 2 种提取方法所提川芎挥发油指纹图谱一致,成分基本一致,差异较小。初步判定蒸馏-萃取耦合合法可以替代传统蒸馏法提取川芎挥发油。



S1. 传统蒸馏法;S2. 蒸馏-萃取混合法

图 4 两种提取方法所提川芎挥发油 GC 指纹谱比较

Fig.4 GC fingerprints of volatile oil from Chuanxiong Rhizoma by two methods

表 1 两种方法共有峰所占峰面积总和的比较

Table 1 The percentage of common peaks for total peak area					
峰号	方法 1	方法 2	峰号	方法 1	方法 2
1	0.73	0.60	11	4.05	3.53
2	1.20	0.85	12	5.91	5.77
3	1.46	0.90	13	3.33	2.98
4	1.85	2.12	14	1.74	1.57
5	0.78	1.08	15	13.57	10.86
6	0.27	0.26	16	3.39	3.38
7	0.69	0.31	17	56.11	61.64
8	2.08	1.16	18	0.38	0.53
9	0.82	0.54	19	1.01	1.25
10	0.63	0.67			

注:方法 1. 传统蒸馏法;方法 2. 蒸馏-萃取耦合法。

3 讨论

由于川芎挥发油比重与水接近,在提取过程中很容易回流回提取容器中,挥发油提取器中加入萃取剂(脂溶性强,密度比水小),可以使更多的挥发油溶在萃取剂中,不至于回流回提取容器中且更容易收集,增加挥发油的提取率。

考察了 2 种色谱柱,HP-5 石英毛细管柱(0.32 mm×30 m,0.25 μm)和 AT-5 弹性石英毛细管柱(0.32 mm×30 m,0.25 μm)。结果显示 HP-5 柱子在分离藁本内酯峰时分离度不符合要求,故选择了 AT-5 柱子,所有共有峰的分离度都符合要求。

程序升温条件考察结果表明,由于成分种类较多,为了使所有峰分离度都符合要求且使指纹图谱总时间最短,对初始温度、升温速度、保持时间进行了优选,最终确定四阶程序升温。30.433 min 使 19 个共有峰分离度都符合要求。

由于藁本内酯的峰面积超过总峰面积的 60%,进样量既要考虑其他峰的峰面积不能太小,也要考虑藁本内酯峰不能太大,最终选择进样量 2 μL,分

流比 10:1。

传统蒸馏法和蒸馏-萃取耦合法所提挥发油指纹图谱共有峰有 19 个,占传统蒸馏法所提挥发油所有峰面积的 98%,能说明这两种提取方法提出的挥发油在成分种类上基本没变。

[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:中国医药科技出版社, 2010.

[2] 张达雷,李桂生,任召言,等. 气相色谱法测定川芎挥发油中 Z-藁本内酯及川芎内酯 A 的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(7):895-897.

[3] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术(暂行)[J]. 中成药,2000,22(10):671-.

[4] Gong L, Di L Q, Chen L Y. Study on fingerprint of Chuanxiong Rhizome by HPLC [J]. Chin J Inform on TCM,2014,21(4):86-89.

[5] 张丽,邵霞,于生,等. 荆芥穗挥发油的顶空气相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药,2012,43(9):1767-1769.

[6] 王春民,杨冬丽,郑艳春,等. 颈复康颗粒原药材配伍所含挥发油中 Z-藁本内酯和洋川芎内酯 A 的测定[J]. 中草药,2012,43(7):1344-1346.

[7] 冯素香,王淑美,梁生旺,等. 冠心病胶囊中川芎挥发油的提取及 β-环糊精包合物的制备研究[J]. 中成药,2007,29(5):770-772.

[8] 汤建成,章曙丹. 少腹逐瘀片挥发油的提取及 β-环糊精包合工艺的研究[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(1):60-62.

[9] 何宇新,李玲,米之金,等. 川芎挥发油的质量标准研究[J]. 西华大学学报:自然科学版,2009,28(3):72-76.

[10] 巢锋敬,郑显辉,马麟,等. 川芎挥发油的提取工艺研究[J]. 临床医学工程,2009,16(6):66-67.

[11] 王燕燕,王团结,彭敏,等. 川芎挥发油的提取及其 β-环糊精包合物制备工艺研究[J]. 现代中药研究与实践,2012,26(1):45-48.

[12] 叶丽华,张玮,张丽娟,等. 川芎挥发油提取工艺的研究进展[J]. 药学服务与研究,2012,12(3):195-198.

[13] 陈友鸿,莫尚志,李洁仪,等. 川芎挥发油的成分研究[J]. 中药材,2004,27(8):580-582.

[14] 阮琴,张颖,胡燕月,等. 不同制备方法对川芎挥发油化学成分的影响[J]. 中国中药杂志,2003,28(6):572-574.

[15] 梁园,张云波,夏爱军,等. 超临界 CO₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法提取川芎挥发油的比较[J]. 广西医学,2013,25(3):357-358.

[16] 刘洪玲,于良生,纪恒胜,等. 川芎挥发油的 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 中国药房,2012,23(43):4101-4103.

[责任编辑 顾雪竹]