

正交试验优选当归挥发油的超临界 CO₂ 流体萃取工艺

杨茂华^{1,2}, 张涛², 于猛², 邹忠梅^{2*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450008; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 优选当归挥发油的超临界 CO₂ 流体萃取工艺, 为当归挥发油的进一步研发提供参考。方法: 建立 UPLC 同时测定当归挥发油中阿魏酸松柏酯和藁本内酯含量的方法, 流动相乙腈-水 (50:50), 检测波长 320 nm, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 35 ℃, 样品室温度 4 ℃, 进样量 2 μL; 以阿魏酸松柏酯及藁本内酯的提取量为指标, 采用正交试验考察萃取温度、萃取压力、萃取时间对当归挥发油萃取工艺的影响。结果: 阿魏酸松柏酯和藁本内酯的线性范围依次为 0.006 2~0.777 6, 0.017 9~2.238 μg, 加样回收率在 96.67%~102.08%。当归挥发油最佳萃取工艺为萃取温度 40 ℃, 萃取压力 25 MPa, 萃取时间 2 h; 阿魏酸松柏酯和藁本内酯的平均提取量分别为 1.62, 10.28 mg·g⁻¹。结论: 建立的 UPLC 含量测定方法重复性好、简便易行, 可用于当归挥发油的质量控制; 优化的萃取工艺稳定可行, 适用于当归挥发油的提取。

[关键词] 当归; 超临界 CO₂ 流体萃取法; 阿魏酸松柏酯; 藁本内酯
[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0034-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040034
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1445.014.html>
[网络出版时间] 2016-10-27 14:45

Optimization of Supercritical CO₂ Fluid Extraction Process of Volatile Oil from
Angelicae Sinensis Radix by Orthogonal Test

YANG Mao-hua^{1,2}, ZHANG Tao², YU Meng², ZOU Zhong-mei^{2*}

(1. *Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China*;
2. *Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100193, China*)

[Abstract] **Objective:** To optimize supercritical CO₂ fluid extraction process of volatile oil from *Angelicae Sinensis Radix* and provide reference for its further research and development. **Method:** UPLC was adopted to determine the contents of coniferyl ferulate and ligustilide in volatile oil from *Angelicae Sinensis Radix* with mobile phase of acetonitrile-water (50:50), detection wavelength at 320 nm and the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. With extracting amounts of coniferyl ferulate and ligustilide as indexes, extraction parameters including temperature, pressure and time were optimized by orthogonal test. **Result:** Coniferyl ferulate and ligustilide showed good linearity at 0.006 2-0.777 6 μg and 0.017 9-2.238 μg, respectively; their recoveries were between 96.67%-102.08%. Optimum extraction parameters were as follows: extraction temperature at 40 ℃, extraction pressure of 25 MPa and extraction time of 2 h; average extracting amounts of coniferyl ferulate and ligustilide were 1.62, 10.28 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** This UPLC is repeatable and simple, it can be used for quality control of volatile oil from *Angelicae Sinensis Radix*. Optimum extraction process is stable and feasible for extraction of volatile oil from *Angelicae Sinensis Radix*.

[Key words] *Angelicae Sinensis Radix*; supercritical CO₂ fluid extraction; coniferyl ferulate; ligustilide

[收稿日期] 20160326(001)
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-29);北京市自然科学基金项目(7132136)
[第一作者] 杨茂华, 在读硕士, 从事中药化学成分研究, Tel:13391861876, E-mail: mhyangmh@foxmail.com
[通讯作者] * 邹忠梅, 研究员, 博士生导师, 从事中药化学成分研究, Tel:010-57833281, E-mail: zmzou@implad.ac.cn

当归为临床常用中药,素有“十方九归”之称,具有补血活血、调经止痛、润肠通便等作用^[1]。《神农本草经》中记载其主治“咳逆上气,温疟,寒热,洗洗在皮肤中,妇人漏下绝子,诸恶创疡金创”^[2]。现代研究表明当归主要含有挥发油、有机酸、苯酐、多糖等成分,具有抗肿瘤、改善记忆、保护神经保护等药理作用^[3-4]。挥发油是当归的主要活性部位,含有藁本内酯、丁烯基苯酐、正丁基苯内酯等成分,具有双向调节子宫平滑肌、降低血压、改善心肌缺血等药理作用,已用于治疗痛经及月经不调等疾病^[5-8]。当归挥发油的提取方法主要有水蒸气蒸馏法、溶剂提取法及超临界 CO₂ 流体萃取法,其中超临界 CO₂ 流体萃取法具有提取效率高、萃取速度快、无有机溶剂残留等优点,在中药挥发油的提取中应用广泛^[9]。近年来已有较多学者开展了超临界 CO₂ 流体萃取当归挥发油的工艺研究,但多以收油率或单一成分藁本内酯为评价指标^[10-11]。

研究发现阿魏酸松柏酯在当归挥发油中大量存在,该成分具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化及舒张血管等药理活性^[12],可能也是当归挥发油的药效成分之一,但目前尚无当归挥发油中阿魏酸松柏酯含量测定方法的报道。本实验拟建立 UPLC 同时测定当归挥发油中阿魏酸松柏酯和藁本内酯含量的方法,以二者的提取量为综合评价指标,通过正交试验优选当归挥发油的萃取工艺,为该有效部位的开发与利用提供参考。

1 材料

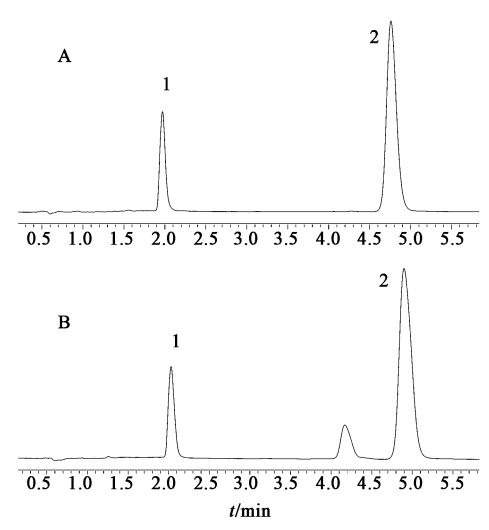
HA220-50-06 型超临界萃取装置(江苏南通市华安超临界萃取有限公司),ACQUITY H-Class 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),AT201 型 1/10 万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],HR-20 型粉碎机(上海哈瑞斯电器有限公司)。阿魏酸松柏酯、藁本内酯(自制,批号分别为 20160222,20160121,纯度均>98%),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈和乙醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。当归药材购自甘肃岷县,经中国医学科学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根,标本现保存于中国医学科学院药用植物研究所国家中药化合物库,编号 20150301DG。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸松柏酯及藁本内酯的含量测定

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),流动相乙腈-水(50:

50),检测波长 320 nm,流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 35℃,样品室温度 4℃,进样量 2 μL,见图 1。



1. 阿魏酸松柏酯;2. 藁本内酯;A. 混合对照品;B. 供试品
图 1 当归挥发油的 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of volatile oil in *Angelicae Sinensis Radix*

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取藁本内酯、阿魏酸松柏酯对照品 22.38,19.44 mg,分别置 10 mL 棕色量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,得储备液。精密吸取该储备液适量,置于 1 mL 棕色量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,得系列混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取当归挥发油约 6 mg,置于 10 mL 量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,吸取上清液,即得。

2.1.4 线性关系考察 将各混合对照品溶液按 2.1.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得阿魏酸松柏酯、藁本内酯回归方程分别为 $Y = 14\,325X - 48\,378$ ($r = 0.999\,5$), $Y = 13\,759X + 98\,030$ ($r = 0.999\,5$),线性范围依次为 0.006 2~0.777 6,0.017 9~2.238 μg。

2.1.5 精密度试验 取 2.1.2 项下高、中、低 3 个质量浓度的混合对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算高、中、低质量浓度阿魏酸松柏酯峰面积的 RSD 分别为 0.7%,0.5%,1.1%,高、中、低质量浓度藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 0.1%,0.2%,0.3%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0,2,4,6,12,24 h 按 2.1.1 项下条件测定,计算阿魏酸松柏酯和藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 1.9%,0.5%,表明 24 h 内供试品溶液的稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取当归挥发油适量,按**2.1.3**项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按**2.1.1**项下条件测定,结果阿魏酸松柏酯和藁本内酯的平均质量分数分别为 7.54% ,27.55% ,RSD 均为 1.9% ,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取当归挥发油约 3 mg,共 6 份,分别按 0.5∶1,1∶1,1.5∶1 加入对照品,按**2.1.3**项下方法制备供试品溶液,按**2.1.1**项下条件测定,计算阿魏酸松柏酯和藁本内酯的平均加样回收率分别为 101.42% ,97.14% ,96.67% 和 101.57% ,102.08% ,97.60% ,RSD 分别为 2.1% ,1.7% ,2.0% 和 0.9% ,1.6% ,1.2% ,结果见表 1。

表 1 阿魏酸松柏酯及藁本内酯的加样回收率试验
Table 1 Recovery tests of coniferyl ferulate and ligustilide

成分	称样量 /mg	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
阿魏酸松柏酯	3.06	0.233	0.117	0.349	99.15	101.42	2.1
	2.96	0.225	0.117	0.344	101.71		
	3.11	0.236	0.117	0.357	103.42		
	3.07	0.233	0.233	0.461	97.85	97.14	1.7
	2.88	0.219	0.233	0.441	95.28		
	3.01	0.229	0.233	0.458	98.28		
	3.08	0.234	0.350	0.580	98.86	96.67	2.0
	2.95	0.224	0.350	0.558	95.43		
	2.95	0.224	0.350	0.559	95.71		
藁本内酯	3.06	0.849	0.425	1.285	102.59	101.57	0.9
	2.96	0.821	0.425	1.251	101.18		
	3.11	0.862	0.425	1.291	100.94		
	3.07	0.851	0.850	1.733	103.76	102.08	1.6
	2.88	0.799	0.850	1.654	100.59		
	3.01	0.835	0.850	1.701	101.88		
	3.08	0.854	1.276	2.082	96.24	97.60	1.2
	2.95	0.818	1.276	2.070	98.12		
	2.95	0.818	1.276	2.074	98.43		

2.2 当归挥发油的提取工艺优选 取适量当归药材,经粉碎机粉碎,过 40 目筛,得当归药材粉末,分成若干份,每份 200 g。选取萃取压力、萃取温度、萃取时间为考察因素,分离釜参数^[10] 设置为分离Ⅰ压力 8 MPa,分离Ⅰ温度 50 ℃,分离Ⅱ压力为系统尾压,分离Ⅱ温度 35 ℃,CO₂ 流量 25 L·h⁻¹,各参数达设定值后,开始萃取,每个条件平行 2 次试验,取平均值。以阿魏酸松柏酯和藁本内酯提取量的综合评分为指标,权重系数均为 0.5。试验安排及结果见

表 2,方差分析见表 3。由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 C>B>A。方差分析表明 3 个因素对提取工艺的影响均不显著,在超临界流体萃取过程中,增加萃取压力会提高设备要求,也会增加能耗,出于节约成本的考虑,选择最优工艺条件为萃取温度 40 ℃,萃取压力 25 MPa,萃取时间 2 h。

表 2 当归挥发油的提取工艺正交试验分析
Table 2 Orthogonal test analysis of extraction process of volatile oil from Angelicae Sinensis Radix

No.	A 萃取 温度 /℃	B 萃取 压力 /MPa	C 萃取 时间 /h	D (空白)	阿魏酸 松柏酯 /mg·g ⁻¹	藁本 内酯 /mg·g ⁻¹	综合 评分
1	40	25	1	1	1.17	9.12	77.76
2	40	30	2	2	1.62	10.62	98.21
3	40	35	3	3	1.56	9.08	89.18
4	50	25	2	3	1.34	9.44	84.33
5	50	30	3	1	1.62	8.60	88.70
6	50	35	1	2	1.41	8.98	84.24
7	60	25	3	2	1.39	9.77	87.37
8	60	30	1	3	1.18	8.60	75.61
9	60	35	2	1	1.68	9.16	93.13

表 3 综合评分方差分析
Table 3 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	F	P
A	16.129	0.226	>0.05
B	53.208	0.745	>0.05
C	257.901	3.611	>0.05
D(误差)	71.420		

注:F_{0.05}(2,2)=19。

2.3 验证试验 称取当归药材粉末(过 40 目筛) 200 g,共 3 份,按最优工艺条件进行验证试验,结果收油率分别为 2.71% ,2.62% ,2.64% ,阿魏酸松柏酯提取量分别为 1.68,1.58,1.59 mg·g⁻¹,藁本内酯提取量依次为 10.13,10.24,10.48 mg·g⁻¹,计算综合评分分别为 97.60,95.25,96.60,RSD 1.2% ,表明该工艺稳定可行。

3 讨论

本实验对当归挥发油在乙腈、甲醇、乙醇等有机溶剂中的溶解性及稳定性进行考察,结果表明供试品在乙醇中溶解性最好,在不同溶剂中稳定性无明显差异,故采用乙醇作为溶剂制备供试品溶液。目前,当归挥发油的质量控制主要以藁本内酯为主,有学者建立了藁本内酯、正丁烯基苯酞、正丁基苯酞的含量测定方法,但前期研究发现阿魏酸松柏酯在超

临界当归挥发油中质量分数约 6% ,远高于正丁烯基苯酞(约 1.15%)及正丁基苯酞(约 0.55%)^[13] ,且研究表明阿魏酸松柏酯具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化及舒张血管等药理活性^[12] ,已有学者对当归药材中阿魏酸松柏酯的含量进行了测定^[14-15] ,但尚未见到当归挥发油中阿魏酸松柏酯含量测定方法的报道,本研究建立了同时测定当归挥发油中阿魏酸松柏酯及藁本内酯含量的 UPLC 检测方法,对当归挥发油的质量控制及药效物质基础研究具有重要意义。

在以往的报道中,收油率或收油率结合藁本内酯通常作为当归挥发油超临界提取工艺的评价指标,本研究采用阿魏酸松柏酯和藁本内酯的提取量来综合评价当归挥发油的质量,可更为科学地指导当归挥发油的工艺优化。本研究建立了当归挥发油的质量控制方法,优化了其超临界提取工艺,但尚未开展中式及大生产规模的试验,研究结果有待于进一步验证。目前已有文献对藁本内酯和阿魏酸松柏酯的不稳定性进行了报道,研究这 2 种化合物的稳定储存条件,延长当归挥发油的保存时间,是下一步需要开展的工作。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:133-134.

[2] 唐慎微. 重修政和经史证类备用本草[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:199.

[3] CHEN X P,LI W,ZHANG L L,et al. Phytochemical and pharmacological studies on Radix *Angelica sinensis*[J]. Chin J Nat Med,2013,11(6):577-587.

[4] MA J P,GUO Z B,JIN L,et al. Phytochemical progress made in investigations of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. Chin J Nat Med,2015,13(4):241-249.

[5] XIE J J,LU J,QIAN Z M,et al. Optimization and comparison of five methods for extraction of coniferyl ferulate from *Angelica sinensis*[J]. Molecules,2009,14(1):555-565.

[6] ZHANG W Q,HUA Y L,ZHANG M,et al. Metabonomic analysis of the anti-inflammatory effects of volatile oils of *Angelica sinensis* on rat model of acute inflammation[J]. Biomed Chromatogr,2015,29(6):902-910.

[7] CHEN S W,MIN L,LI W J,et al. The effects of angelica essential oil in three murine tests of anxiety [J]. Pharmacol Biochem Behav,2004,79(2):377-382.

[8] 杜俊蓉,白波,余彦,等. 当归挥发油研究新进展[J]. 中国中药杂志,2005,30(18):1400-1406.

[9] 张镜澄. 超临界流体萃取[M]. 北京:化学工业出版社,2000:110-112.

[10] 李晓宁,杨银花,赵博琛,等. 超临界 CO₂ 流体技术萃取当归挥发油的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(14):27-29.

[11] 聂诗明,张桂芝,张鹏涛. 超临界 CO₂ 萃取当归油的工艺研究[J]. 中药材,2005,28(3):226-227.

[12] 李韶菁,张迎春,苏培瑜,等. 阿魏酸松柏酯的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):229-231.

[13] 项好,张贵君,甘德全. HPLC 测定 CO₂ 超临界萃取的当归油药效组分[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):64-67.

[14] YU Y,ZHANG Q W,WANG Y T,et al. A rapid HPLC method for determination of coniferyl ferulate in *Angelica sinensis* and *Ligusticum chuanxiong* [J]. J Chin Pharm Sci,2007,16(3):197-201.

[15] 谢京晶,于玥,王一涛,等. HPLC 法同时测定当归药材中 6 种成分的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(9):1314-1317.

[责任编辑 刘德文]