

注射用活血通络中超临界 CO₂ 萃取川芎脂溶性成分的工艺研究*

□徐桂红** 尚 强 王振中 萧 伟**

(江苏康缘药业股份有限公司 连云港 222001)

(中药制药过程新技术国家重点实验室 连云港 222001)

(江苏省企业院士工作站 连云港 222001)

范震宇 (南京中医药大学 南京 210046)

摘 要:目的:优选注射用活血通络中超临界 CO₂ 萃取川芎脂溶性成分的工艺条件。方法:以川芎脂溶性成分得率和藁本内酯、阿魏酸的含量为指标,采用正交试验法优选超临界 CO₂ 萃取川芎脂溶性成分的工艺条件。结果:最佳工艺条件:萃取温度 50℃,压力 35MPa,时间 1h。结论:该提取工艺条件稳定可行。

关键词:川芎 藁本内酯 阿魏酸 超临界 CO₂ 萃取

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.01.023

注射用活血通络由川芎、桃仁两味药材组成,具有活血化瘀、行气通络之功效。用于中风中经络(脑血栓形成)之急性期证属痰瘀阻络者。该品种制剂工艺中采用超临界 CO₂ 萃取技术提取川芎的脂溶性成分。

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,具有行气活血、祛风止痛的功效^[1]。目前常用提取其脂溶性成分的方法有水蒸汽蒸馏法^[2]、有机溶剂提取等^[3]。也有采用超临界 CO₂ 萃取和水蒸气蒸馏提取川芎脂溶性成分的报道^[4],但文献报道^[5-6]

中川芎脂溶性成分主要是以阿魏酸为含量指标。

本文采用正交试验法优选超临界 CO₂ 萃取川芎脂溶性成分的工艺条件,以川芎脂溶性成分中藁本内酯和阿魏酸的转移率和得率为指标,探索最佳工艺条件。

一、仪器与试药

高效液相色谱仪 (Waters2695-2996), HA221-40-13 型超临界萃取装置(南通华安超临界萃取有限公司)等。

藁本内酯对照品(批号:091201,南京中医药大学自制,含量大于 98.0%),阿魏酸对照品(批号:0773-

收稿日期:2010-04-02

修回日期:2010-06-09

* 科学技术部国家重大新药创制项目(2009ZX09313-032):创新中药中试放大研究技术平台,负责人:萧伟。

** 通讯作者:萧伟,本刊编委,研究员级高级工程师,主要研究方向:中药制剂和创新中药的开发与研究,Tel:0518-85521933,E-mail:wzhzh-nj@tom.com。

9910, 中国药品生物制品检定所提供, 含量测定用); 川芎药材(购自安徽亳州药材市场), 经连云港市药品检验所王统康主任药师鉴定为伞形科植物 *Ligusticum chuanxiong Hort.* 的干燥根茎; 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

二、方法与结果

1. 超临界 CO₂ 萃取方法

将川芎药材粉碎(过 20 目筛)后, 称取 1300g 于萃取釜中, 按正交试验设计方案设定萃取温度和压力后开始萃取, 至规定时间后停止萃取。精密称定其重量, 计算提取物得率。

2. 实验预试

超临界流体萃取技术萃取分离过程是利用超临界流体的溶解能力与其密度的关系, 即利用压力和温度对超临界流体溶解能力的影响而进行的, 因此, 鉴于压力与温度对于实验的重要性, 故采取相关预实验考察因素影响。

(1) 萃取压力的影响。

取 1300g 川芎粗粉 4 份, 将萃取温度设定为 50℃ 不变, 分离釜 I 压力 6Mpar, 温度 35℃; 分离釜 II 压力 6Mpar, 温度 35℃ 不变。分别设定萃取釜压力为 25Mpar、30Mpar、35Mpar、40Mpar 进行萃取 1h, 目的是比较不同压力条件下对于提取效果的影响, 见表 1。

结果表明, 随着压力增加, 超临界流体的密度增加, 有利于萃取, 但由于设备有限, 未能考察更高压力值。

(2) 萃取温度的影响。

取 1300g 川芎粗粉 4 份, 将萃取釜压力设为 35Mpar, 分离釜 I 压力 6Mpar, 温度 35℃; 分离釜 II 压力 6Mpar, 温度 35℃ 不变。分别设定萃取温度为 30℃、40℃、50℃、60℃ 进行萃取 1h, 目的是比较不同温度条件下对于提取效果的影响, 见表 2。

结果表明, 温度适当升高有利于提取, 但过高反而降低, 可能是温度过高, 超临界流体的密度下降, 致使萃取能力下降, 另一方面温度升高会使样品挥发加剧, 有利于萃取, 但对热不稳定的样品, 采用低温度较高压力为好。

(3) 萃取时间的影响。

取 1300g 川芎粗粉 5 份, 将萃取釜压力设为 35Mpar, 萃取温度为 50℃, 分离釜 I 压力 6Mpar, 温度 35℃; 分离釜 II 压力 6Mpar, 温度 35℃ 不变。考察不同

萃取时间对提取效果的影响, 见表 3。

3. 正交试验设计

根据预试验结果, 本实验从各影响因素中选择较优的水平, 以脂溶性成分得率、藁本内酯含量、阿魏酸含量为考察指标, 采用 L₉(3⁴) 综合考察萃取压力、温度、时间等因素的影响, 见表 4。

4. 含量测定方法

(1) 藁本内酯的含量测定。

色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(色谱柱: Benethnach C₁₈, 4.6mm×250mm, 5μm); 以甲醇为流动相 A, 以水为流动相 B 进行梯度洗脱, 洗脱顺序, 见表 5。流速为 1mL·min⁻¹; 检测波长为 320nm, 理论塔板数按藁本内酯峰计算应不得低于 3000。

对照品溶液的制备 精密称取藁本内酯对照

表 1 萃取压力的考察结果

萃取压力 (Mpar)	出油率 (%)	藁本内酯转移率 (%)	阿魏酸转移率 (%)
25	4.11	71.97	2.08
30	5.48	80.52	3.18
35	6.08	83.17	3.60
40	5.66	88.90	3.42

表 2 萃取温度的考察结果

萃取温度 (h)	出油率 (%)	藁本内酯转移率 (%)	阿魏酸转移率 (%)
30	5.20	78.87	3.08
40	5.62	80.59	3.27
50	5.79	84.71	3.37
60	5.65	83.60	3.32

表 3 萃取时间的考察结果

萃取时间 (h)	出油率 (%)	藁本内酯转移率 (%)	阿魏酸转移率 (%)
0.5	3.09	57.87	1.18
1.0	5.76	84.28	3.47
1.5	5.82	84.71	3.71
2.0	5.96	85.32	3.99
2.5	5.83	84.77	3.78

表 4 正交试验因素水平表

水平	A/萃取压力 (MPa)	B/萃取温度 (℃)	C/萃取时间 (h)	D/空白
1	30	40	1.0	
2	35	50	1.5	
3	40	60	2.0	

品,加甲醇制成每 1mL 藁本内酯为 124 μ g 的溶液,即得。

样品测定 精密称取川芎脂溶性部位 0.3g,加甲醇定容至 100mL,再取 1mL,加甲醇定容至 10mL,测定。

药材测定 取川芎药材粉末(过 3 号筛)约 0.2g,精密称定,分别精密加入氯仿、乙酸乙酯、甲醇 50mL,放置 1h 后,超声振荡提取 20min,放冷,滤过,精密量取续滤液 5mL,置 25mL 量瓶中,加甲醇稀释定容,摇匀,作为供试品溶液,见图 1。

(2)阿魏酸的含量测定。

色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(色谱柱:Benethnach C₁₈,4.6 \times 250mm,5 μ m);以乙腈-0.1%磷酸 20:80 洗脱;流速为 1mL \cdot min⁻¹;检测波长为 322nm,理论塔板数按阿魏酸峰计算应不得低于 4000。

对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品适量,加甲醇制成每 1mL 阿魏酸 12.98 μ g 的溶液。

(3)样品测定。

精密称取川芎脂溶性部位 0.3g,加甲醇定容至 100mL,测定。

(4)药材测定。

取本品细粉约 0.1g,精密称定,置于 100mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20.0mL,称重,50 $^{\circ}$ C 水浴中温浸 10min,超声(功率 250W,频率 50kHz)提取 30min,称重后,用甲醇补足减失的重量,10000rpm 离心 5min,上清液作为供试品溶液,见图 2。

5. 正交试验结果及方差分析

以脂溶性成分得率和藁本内酯、阿魏酸转移率为考察指标,正交实验结果见表 6,方差分析见表 7。

方差分析表明,因素 A 对于川芎超临界 CO₂ 流体萃取脂溶性成分工艺具有显著影响,因素 B、C 无显著影响;同时根据极差分析发现各因素对于实验结果的影响大小顺序为 A>B>C。K_{2a}>K_{3a}>K_{1a},因素 A 选择水平 2,即 35MPa;K_{2b}>K_{3b}>K_{1b},温度 50 $^{\circ}$ C,提取效果好,因素 B 选择水平 2,即

表 5 梯度洗脱表

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	60	40
20	100	0
20.1	60	40
30	60	40

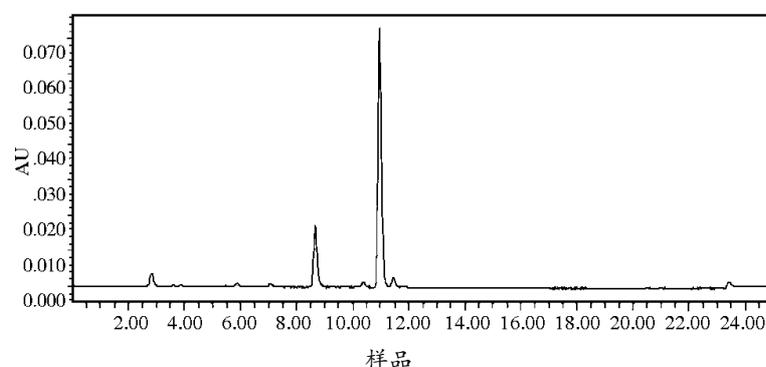
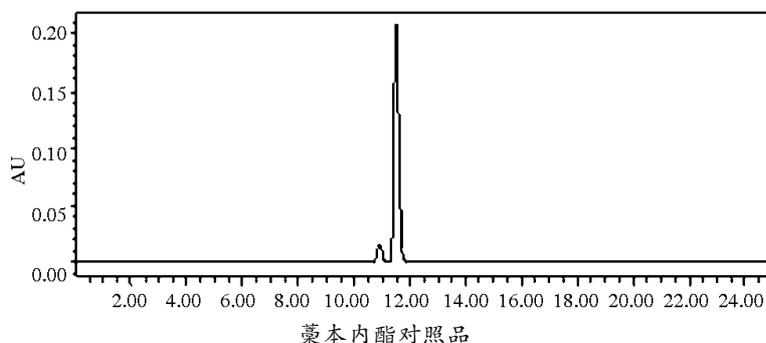


图 1 藁本内酯对照品及样品的高效液相色谱图

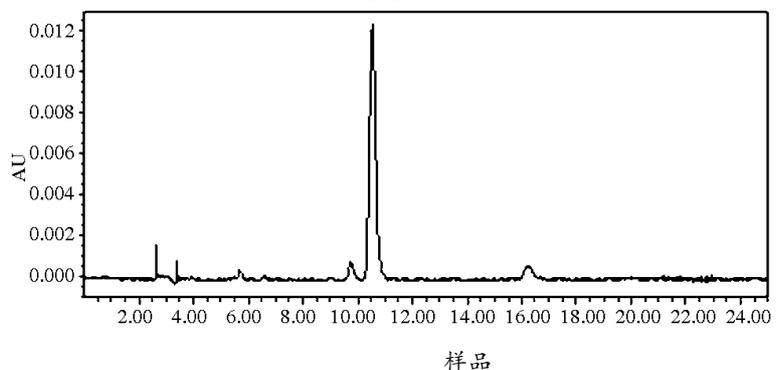
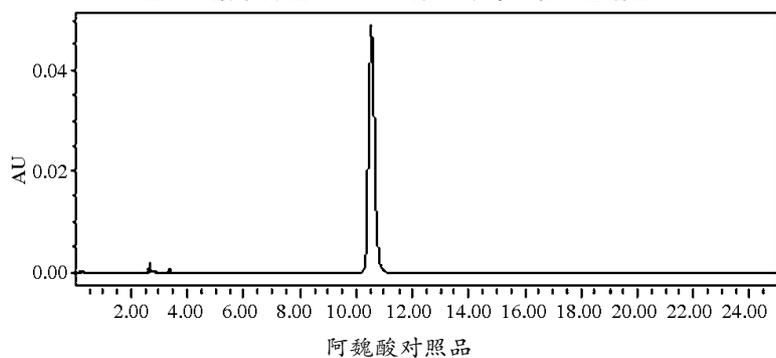


图 2 阿魏酸对照品及样品的高效液相色谱图

表 6 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	藁本内酯转移率(%)	阿魏酸转移率(%)	得率(%)	综合评分
1	1	1	1	1	68.89	2.87	5.37	84.18
2	1	2	2	2	71.46	3.33	5.51	86.64
3	1	3	3	3	73.16	3.03	5.46	85.34
4	2	1	2	3	81.00	3.33	5.83	92.94
5	2	2	3	1	79.34	3.50	5.54	93.78
6	2	3	1	2	85.08	3.47	5.72	94.84
7	3	1	3	2	76.53	3.13	5.51	90.15
8	3	2	1	3	80.54	3.50	6.07	95.28
9	3	3	2	1	76.77	3.37	6.02	92.54
K1	256.16	267.27	274.30	270.50				
K2	281.56	275.70	272.12	271.63				
K3	277.97	272.72	269.27	273.56				
R1	8.47	2.81	1.68	1.02				

注:得率评分=(40/最大得率)×得率;藁本内酯转移率评分=(40/最大藁本内酯转移率)×藁本内酯转移率;阿魏酸转移率评分=(20/最大阿魏酸转移率)×阿魏酸转移率;综合评分=得率评分+藁本内酯转移率评分+阿魏酸转移率评分。

表 7 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
A	125.969	2	62.985	78.928	P<0.05
B	12.183	2	6.092	7.633	
C	4.242	2	2.121	2.656	
误差	1.596	2	0.798		

注: $F_{0.05(2,2)}=19.0$ 。

表 8 验证试验结果

样品	得率(%)	藁本内酯转移率(%)	阿魏酸转移率(%)
1	6.11	84.62	3.45
2	6.02	84.31	3.56
3	6.05	85.02	3.51

50℃; K1c>K2c>K3c, 提取时间延长, 提取物量反而减少, 为节约时间, 提高设备生产率, 因素 C 选择水平 1, 即 1h。川芎超临界 CO₂ 流体脂溶性成分提取最佳工艺: 压力为 35Mpa, 温度为 50℃, 时间为 1h。

6. 验证实验

取 3 份药材各 5000g, 按上述最佳提取工艺条件进行验证试验。操作方法同前, 测定结果见表 8。结果表明该优选工艺稳定可行。

三、讨论

文献报道^[2-3], 川芎脂溶性成分中的主要有效成

分为藁本内酯和阿魏酸等。本文采用提取物得率、藁本内酯含量、阿魏酸含量 3 个指标对提取工艺进行正交设计考察, 筛选得到最佳工艺, 工艺更为合理, 所得提取物质量更佳。

川芎中挥发油类成分可以用水蒸气蒸馏法提取, 有机酸类成分可以用醇或水提取, 用有机溶剂萃取进行精制。CO₂ 超临界法为低温提取, 有效成分保留率好, 提取物的纯度高, 无鞣质等大分子类杂质, 制剂安全性较为理想。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 2005: 28.
- 2 陈友鸿, 莫尚志, 李洁仪. 川芎挥发油成分研究. 中药材, 2004, 27(8): 580-582.
- 3 白海波, 王剑飞, 宋子荣. 川芎提取工艺的优化. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(4): 8-10.
- 4 郁威, 张锋, 苏克曼. 超临界 CO₂ 萃取当归和川芎的研究. 中成药, 2002, 6(24): 411-415.
- 5 Hong Zhanying, Wang Xuezhao, Le Jian, et al. Supercritical fluid extraction of essential oil from dryrhizome of Ligusticum chuanxiong Hort and their characterization by GC/MS. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2002, 11(2): 31-34.
- 6 季芳, 吕雪芳. 川芎中挥发性化学成分的研究. 浙江化工, 2003, 34(2): 19-20.

Studies on Extraction of Fat-soluble Ingredients from Ligusticum Chuanxiong of Injected Huoxue Tongluo by Supercritical Fluid Extraction

Xu Guihong^{1,2,3}, Shang Qiang^{1,2,3}, Wang Zhenzhong^{1,2,3}, Xiao Wei^{1,2,3}, Fan Zhenyu⁴

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 122

- (1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Corporation Ltd., Lianyungang 222001, China;
2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China;
3. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China;
4. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract: The study aimed to optimize the conditions of supercritical fluid extraction for fat-soluble ingredients of *Ligusticum chuanxiong* Hort. The fat-soluble ingredients, content of Ligustilide, and content of ferulic acid were used as the indexes in this study. The extraction technology for fat-soluble ingredient of *Ligusticum chuanxiong* Hort was optimized by the orthogonal design. Results showed that the optimal extraction conditions were at the temperature of 50 °C, and the pressure of 35 Mpa for one hour. The conclusion is that the extraction technology was stable and feasible.

Keywords: *Ligusticum chuanxiong* Hort, Ligustilide, Ferulic acid, Supercritical fluid CO₂ extraction

(责任编辑: 李沙沙 张志华, 责任译审: 王 晶)