

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.22.017

正交试验优选当归药材中阿魏酸提取工艺

陈良胜

(河南省信阳市新县人民医院, 河南 信阳 465550)

摘要:目的 优选当归药材中阿魏酸的提取工艺。方法 以乙醇体积分数、料液比、提取时间为考察因素,以阿魏酸含量为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优选当归药材中阿魏酸的最佳提取工艺。对所得最佳工艺进行验证,并与传统的乙醇加热回流提取法的提取效果进行比较,加热回流提取时保持乙醇体积分数和料液比不变,提取时间延长至 150 min。结果 闪式提取法所得最优工艺为,乙醇体积分数为 70%,料液比为 1:12(g/mL),提取时间为 1.5 min;闪式提取法所得阿魏酸含量为 0.332 4 mg/g,高于加热回流提取法的 0.277 3 mg/g。结论 优选的工艺操作简单、重复性好,可为当归药材中阿魏酸的提取提供参考。闪式提取法较传统加热回流提取法能耗低,提取效率高,操作时程短。

关键词: 闪式提取法;当归;阿魏酸;正交试验;提取工艺

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)22-0071-03

Optimization of Extraction Process of Ferulic Acid from Angelicae Sinensis Radix by the Orthogonal Test

CHEN Liangsheng

(Xin County People's Hospital of Xinyang City, Xinyang, Henan, China 465550)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of ferulic acid from Angelicae Sinensis Radix. **Methods** The optimal extraction process of ferulic acid from Angelicae Sinensis Radix was designed by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with ethanol volume fraction, material-liquid ratio and extraction time as the investigation factors and with ferulic acid content as the evaluation index. The optimal process was verified, and its extraction effect was compared with the traditional ethanol heating reflux extraction method. During heating reflux extraction, the ethanol volume fraction and material-liquid ratio remained unchanged, and the extraction time was prolonged to 150 min.

Results The optimal process of flash extraction was as follows: the ethanol volume fraction was 70%, the material-liquid ratio was 1:12(g/mL), and the extraction time was 1.5 min. The content of ferulic acid obtained by the flash extraction method was 0.332 4 mg/g, which was higher than 0.277 3 mg/g obtained by the traditional ethanol heating reflux extraction. **Conclusion** The optimal process is simple and reproducible, which can provide a reference for the extraction of ferulic acid from Angelicae Sinensis Radix. Compared with the traditional ethanol heating reflux extraction method, the flash extraction method has the advantages of low energy consumption, high extraction efficiency and short operation time.

Key words: flash extraction method; Angelicae Sinensis Radix; ferulic acid; orthogonal test; extraction process

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,临床常与川芎、白芍、地黄等配伍,常用于活血化瘀。药理学研究表明,当归能模拟小剂量阿司匹林的作用,调节血脂^[1]。其有效成分主要为阿魏酸,属酚酸,为桂皮酸的衍生物,一般用其反式体。阿魏酸见光易分解,其水溶液稳定性较差,形成钠盐后稳定性较好,易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,难溶于石油醚^[2]。阿魏酸的抗氧化性很强,具有抗菌消炎、抑制肝功能损伤等作用。从植物中提取分离天然阿魏酸的方法有碱水解法、酶解法、组织培养法等。目前仍以碱水解法为主,虽有成本低、产量高等优点,但其产生的废渣、废液所带来的环境问题不容忽视^[3]。近年来,超临界 CO_2 萃取法、连续回

流提取法、高压法、超声波等方法多有应用,但操作烦琐,价格昂贵。闪式提取法在操作方法、能耗、时程、提取效率及应用范围方面均优于传统方法^[4-5]。本研究基于正交试验对当归药材中阿魏酸的闪式提取法进行了优化。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

JHBE-50T 型闪式提取器(上海钜帆精密设备有限公司);LG16-W 型离心机(北京离心机有限公司);755B 型紫外-可见分光光度计(四川中浪科技有限公司);QKCF 型超纯水器(南京权坤生物科技有限公司);Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);

BT124S 型电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);FS-750T 型超声仪(上海生析超声仪器有限公司)。

1.2 试药

当归饮片,我院中药房用当归药材(采自海拔超过 1 000 m 的山上,经新县人民医院执业药师殷双兴鉴定为正品)自制;阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 20180423,含量为 99%);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸含量测定

2.1.1 色谱条件^[6]

色谱柱:TSK-GEL DDS-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(30:70:0.3, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:315 nm;柱温:40℃;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液制备

取阿魏酸对照品适量,精密称定,用甲醇溶解并稀释成质量浓度为 10 μg/mL 的对照品溶液。取药材样品适量,研磨成细粉,取约 0.5 g,精密称定,置有塞 250 mL 磨口锥形瓶内,加入 90% 甲醇和盐酸(100:1, V/V)混合溶液 10 mL,称定质量,超声(功率 750 W,频率 20 kHz)处理 0.5 h,再次称定质量,用上述混合溶液补足减失的质量,经 0.2 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取 2.1.2 项下对照品溶液、供试品溶液各适量,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置有吸收峰。理论板数按阿魏酸峰计应不低于 3 000,分离度大于 1.5,基线分离良好。详见图 1。

线性关系考察:精密量取对照品溶液 1,5,10,15,20,25 μL,稀释 2 倍,制成系列对照品溶液。按 2.1.1 项

下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 4\,573\,764X - 3\,878.590$, $r = 0.999\,9$ ($n = 6$)。结果表明,阿魏酸进样量在 0.007 0~0.150 0 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.1.2 项下对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积。结果的 RSD 为 0.39% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.1.2 项下供试品溶液适量,室温下分别于 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 1.20% ($n = 6$),表明供试品溶液室温下放置 3.0 h 内稳定性良好。

重复性试验:取药材样品粉末适量,精密称定,共 8 份,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果的 RSD 为 1.10% ($n = 8$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品,共 6 份,加入一定量的阿魏酸对照品溶液,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ($n = 6$)
Tab. 1 Results of the recovery tests ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.040 0	0.036 0	0.074 8	97.24	98.11	1.13
0.039 8	0.036 0	0.075 0	97.98		
0.040 0	0.036 0	0.075 3	98.25		
0.039 7	0.036 0	0.075 5	99.49		
0.040 0	0.036 0	0.075 4	98.50		
0.040 3	0.036 0	0.074 5	97.22		

2.2 闪式提取法正交试验^[7]

以乙醇体积分数(因素 A)、料液比(因素 B)和提取时间(因素 C)为三因素,以阿魏酸含量为评价指标进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。详见表 2 至表 4。由表 3 和表 4 可见,因素 A、因素 C 对提取结果有显著影响,影响强度为 $A > C > B$,最佳工艺为 $A_2B_2C_2$,即以 12 倍量 70% 乙醇,闪式提取 1.5 min。

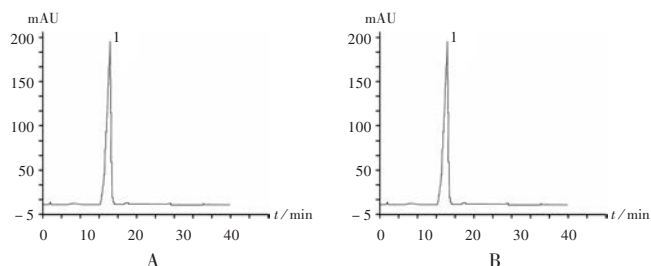
2.3 验证试验

取当归药材粉末 100 g,按最优工艺进行闪式提取,平

表 2 因素水平表

Tab. 2 The factor levels

水平	因素 A(%)	因素 B(g/mL)	因素 C(min)
1	60	1:8	1.0
2	70	1:12	1.5
3	80	1:16	2.0



1. 阿魏酸

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. ferulic acid

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表 3 正交试验设计与结果
Tab. 3 Design and results of the orthogonal test

序号	因素				阿魏酸含量 (mg/g)
	A	B	C	D(误差)	
1	1	1	1	1	0.211 4
2	1	2	2	2	0.224 9
3	1	3	3	3	0.206 9
4	2	1	2	3	0.296 4
5	2	2	3	1	0.287 9
6	2	3	1	2	0.291 2
7	3	1	3	2	0.272 7
8	3	2	1	3	0.282 0
9	3	3	2	1	0.287 0
K_1	0.214 36	0.260 12	0.261 49	0.261 96	
K_2	0.291 87	0.264 90	0.269 43	0.262 97	
K_3	0.280 43	0.261 63	0.255 73	0.261 73	
R	0.077 50	0.004 77	0.013 70	0.012 40	

表 4 方差分析结果
Tab. 4 Results of ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	P
A	104.020	2	52.010	<0.05
B	0.355	2	0.178	
C	2.840	2	1.420	<0.05
D(误差)	0.02	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

行操作 3 次。结果阿魏酸含量分别为 0.292 7, 0.293 0, 0.291 8 mg/g, 平均 0.292 5 mg/g, 与正交设计中的方案 6 的提取得率接近, RSD 为 0.21%, 表明该工艺稳定可行, 具有可操作性和重复性。

2.4 乙醇回流提取法^[8]

我国药厂多采用乙醇加热回流提取法提取当归药材中的阿魏酸, 现将该法与本研究优选出的闪式提取法的提取效果进行比较。乙醇加热回流提取工艺中乙醇体积分数及料液比不变, 提取次数为 3 次, 提取时间为 2.5 h。取 3 批当归药材样品进行试验, 结果闪式提取法和加热回流提取法所得阿魏酸含量分别为 0.332 4 mg/g 和 0.277 3 mg/g。可见, 在各种因素相同的情况下, 闪式法提取时间是传统乙醇回流提取法的 1/100, 且前法所得阿魏酸含量较高。既节省了时间, 又降低了能耗。

3 讨论

国内对阿魏酸的提取现多采用传统工艺, 具有操作不易、能耗大、费时长、有效成分破坏较多等缺点, 导致提取效率低下^[9]。本研究中优选闪式提取法的最优

提取参数, 通过查阅资料及前期的预试验, 选用乙醇体积分数、料液比和提取时间为三因素, 结合 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对阿魏酸的提取方案进行优化, 得最优工艺为乙醇体积分数为 70%, 料液比为 1:12, 闪式提取 1.5 min。与传统提取方法相比, 闪式提取法所需乙醇体积分数较低, 操作简便, 提取时间短, 提取率高。且该型号电机功率为 1 800 W, 完成 1 次提取只需 1.5 min, 与回流提取方法相比, 单位能耗明显降低^[10]。可见, 闪式提取法简单易操作, 可为阿魏酸的开发及研究提供参考^[11-15]。

参考文献

- [1] 张欣, 高增平. 阿魏酸的研究进展[J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 138-147.
- [2] 王婕, 赵建邦, 宋平顺. 30 批当归中阿魏酸、藁本内酯含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 70-72.
- [3] 宁娜, 韩建军, 郁建生, 等. 响应面法优化当归中阿魏酸提取工艺的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(3): 36-38.
- [4] 裴媛, 谭初兵, 徐为人, 等. 当归苯酚类和萜类成分作用的虚拟评价[J]. 中草药, 2010, 41(6): 938-941.
- [5] 胡立翠, 伍勋, 杨学东. 正交试验法优选川芎药效成分的超临界流体萃取工艺[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3484-3488.
- [6] 张秀丽. HPLC 法测定川芎中阿魏酸的含量[J]. 中国药事, 2009, 23(5): 469-471.
- [7] 唐力英, 王祝举, 赫炎. 高效液相色谱法测定当归中有效成分阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 14-15.
- [8] 武亚晓, 李希, 冯建安, 等. 正交试验设计优化川芎阿魏酸的提取工艺[J]. 中药与临床, 2015, 6(3): 15-17.
- [9] 王中华. 当归中阿魏酸含量测定及质量标准的研究[J]. 河北中医, 2012, 34(7): 1058-1063.
- [10] 胡玲玲, 吴佳财. 正交法优化党参多糖提取工艺的研究[J]. 陕西农业科学, 2020, 66(10): 36-38.
- [11] 冯雪, 汪丽, 刘惠东. 正交实验法优选多伞阿魏中阿魏酸提取工艺的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(5): 196-199.
- [12] 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, 2020: 139.
- [13] MA JP, GUO ZB, JIN L, et al. Phytochemical progress made in investigations of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(4): 241-249.
- [14] ZHANG WQ, HUA YL, 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.
- [15] 李晓宁, 杨银花, 赵博琛, 等. 超临界 CO_2 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.

(收稿日期: 2020-08-23; 修回日期: 2021-06-25)