

正交试验优化白芷的水提取工艺研究

李敏, 王晓楠, 张涛, 陈庆*
安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800

摘要: 目的 探究白芷的最佳水提取工艺。方法 以干浸膏得率、欧前胡素转移率、综合评分为评价指标, 采用单因素试验考察浸泡时间、提取时间、提取次数和加水倍数对提取效果的影响; 根据单因素试验结果, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法对浸泡时间、提取时间、提取次数和加水倍数进一步优化, 并对优化工艺进行验证。结果 优化后的提取工艺为加 12 倍水, 提取 3 次, 每次提取 0.5 h。优化后的工艺所得干浸膏的平均得率为 24.25%, 欧前胡素平均转移率为 17.24%。结论 优化的水提取工艺稳定、可行, 可用于白芷的水提取。

关键词: 白芷; 水提取; 单因素试验; 正交试验; 干浸膏得率; 欧前胡素; 综合评分

中图分类号: R977 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2020)09 - 1745 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.09.002

Optimization of water extraction process of *Angelicae Dahuricae Radix* by orthogonal test

LI Min, WANG Xiao-nan, ZHANG Tao, CHEN Qing
Anhui Jiren Pharmaceutical Group Co., Ltd, Bozhou 236800, China

Abstract: Objective To explore the best water extraction process of *Angelicae Dahuricae Radix*. **Methods** Taking dry extract yield, imperatorin transfer rate and the comprehensive score as evaluation indicators, a single factor test was used to investigate the effects of soaking time, extraction time, extraction times, and water addition multiples on the extraction effect. $L_9(3^4)$ orthogonal test method was used to further optimize the soaking time, extraction time, extraction times, and water addition ratio, and to verify the optimization process. **Results** The optimized extraction process was adding 12 times of water, extract 3 times, and each extraction for 0.5 h. The verification test showed that the average yield of the dry extract obtained by the optimized process was 24.25%, and the average transfer rate of imperatorin was 17.24%. **Conclusion** The optimized water extraction process is stable and feasible. It can be used for the water extraction of *Angelicae Dahuricae Radix*.

Key words: *Angelicae Dahuricae Radix*; water extraction process; single factor test; orthogonal test; dry extract yield; imperatorin; comprehensive score

白芷为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch.ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.或杭白芷 *A. dahurica* (Fisch.ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根, 具有解表散寒、祛风止痛、宣通鼻窍、燥湿止带、消肿排脓之功效^[1], 主要含有化学成分为香豆素类和挥发油类。研究报道白芷活性成分多集中于香豆素类^[2-5], 包括欧前胡素、异欧前胡素、白当归素、水合氧化前胡素等^[3, 6-7], 其中欧前胡素占总香豆素的

25.99%~29.42%^[8]。欧前胡素具有良好的止痛、抗炎、抗惊厥、抑制肿瘤活性^[7, 9-12]。本研究以干浸膏得率和欧前胡素的转移率为指标, 通过单因素试验和正交试验综合评价优选出白芷合理的提取工艺条件, 为生产工艺参数的确定提供实验依据。

1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (配置四元泵、DAD 检测器、化学工作站、HP compaq 计算机系统, 安捷伦科技有限公司); XP26 型百万分之一天平 (瑞

收稿日期: 2020-06-19

基金项目: 安徽省科技重大专项 (17030801009)

作者简介: 李敏, 女, 硕士, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 754358509@qq.com

*通信作者 陈庆, 男, 硕士, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 13592542608@163.com

士梅特勒-托利多集团); CP214 型万分之一天平(常州奥豪斯仪器有限公司); YP1002N 型百分之一天平(上海精密科学仪器有限公司); JL-360 型超声提取器(上海吉理仪器有限公司)。HH-6 恒温水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司); XL-300 型多功能摇摆式粉碎机(上海润实电器有限公司)。

白芷由安徽普仁中药饮片有限公司提供,经普仁化验室主任胡秀鉴定为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch.ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根,批号 1910191。欧前胡素(中国食品药品检定研究院提供,批号 110826-201616,质量分数 99.6%); 甲醇(色谱纯); 娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 水提液的制备

称取白芷 30 g,置圆底烧瓶中,加水进行提取,趁热滤过,合并滤液,浓缩至适量,放冷至室温,加水至 250 mL,混匀,备用。

2.2 干浸膏得率的测定

精密量取水提液 50 mL,置已干燥至恒定质量的蒸发皿中,水浴蒸干后,于 105 °C 的烘箱干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算干浸膏得率。

2.3 欧前胡素的 HPLC 法测定

2.3.1 色谱条件 Agilent5 HC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(55:45); 检测波长: 300 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。理论板数按欧前胡素峰计不低于 3 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 取欧前胡素对照品适量,精密称定,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇制成 6.549 6 μg/mL 的对照品溶液,备用。

2.3.3 水提液供试品溶液的制备 精密量取水提液 10 mL,置具塞锥形瓶中,精密加入无水乙醇 10 mL,称定质量,混匀,超声(功率 300 W,频率 50 kHz),取出,放冷,稀乙醇补充质量,摇匀,滤过,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 药材供试品溶液的制备^[1] 取药材粉末(过三号筛)约 0.4 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇 45 mL,超声处理(功率 300 W,频率 50 kHz) 1 h,取出,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.5 专属性试验 精密吸取稀乙醇溶液(阴性对照溶液)、欧前胡素对照品溶液(6.549 6 μg/mL)、

水提液供试品溶液(按正交试验 2 号试验制备)、药材供试品溶液各 10 μL,分别进样,记录色谱图,见图 1。结果显示供试品溶液与对照品溶液相同的保留时间有相应的色谱峰,且阴性对照溶液与各供试品溶液、对照品溶液相同的保留时间处无相应色谱峰,表明专属性较强。

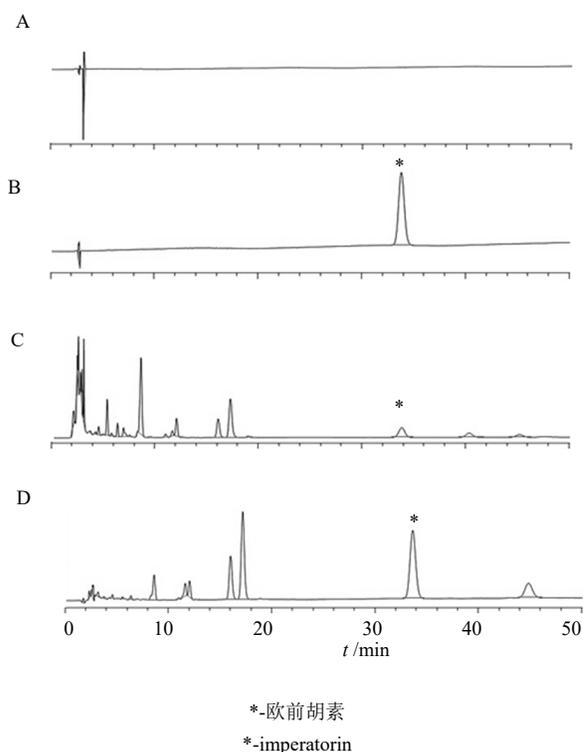


图 1 稀乙醇溶液(A)、对照品溶液(B)、水提液供试品溶液(C)、药材供试品溶液(D)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of ethanol solution (A), reference substance solution (B), water extract solution (C), and medicinal material solution (D)

2.3.6 线性关系考察 分别精密吸取 0.654 96、1.047 9、1.309 9、3.274 8、6.549 6、16.374、32.748 μg/mL 欧前胡素对照品溶液,分别进样 10 μL,测定。以峰面积峰值为纵坐标,质量浓度为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y=25.261 X+1.066 6$, $r^2=0.999 9$,结果表明欧前胡素在 0.654 96~32.748 μg/mL 与峰面积呈现良好的线性关系。

2.3.7 精密度试验 精密吸取 6.549 6 μg/mL 欧前胡素对照品溶液,重复进样 6 次,计算得峰面积 RSD 值为 0.42%。

2.3.8 稳定性试验 精密吸取水提液(按正交试验 2 号试验制备),制备供试品溶液,于处理后 0、2、4、6、8、12、24 h 分别进样测定,结果欧前胡素

峰面积 RSD 值为 0.20%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.9 重复性试验 精密吸取同一批次水提液（按正交试验 2 号试验制备），平行 6 份，处理后进样测定，所得供试品溶液中欧前胡素的平均质量浓度为 12.797 μg/mL，RSD 值为 0.86%。

2.3.10 回收率试验 精密吸取已知含量的水提液（按正交试验 2 号试验制备）5 mL，平行 6 份，精密加入 25.842 μg/mL 欧前胡素对照品溶液 5 mL，制备供试品溶液，在上述色谱条件下进行测定，结果平均回收率为 99.44%，RSD 值为 2.03%。

2.4 水提取工艺的单因素考察

实验所用白芷饮片中欧前胡素的质量分数为 2.226 3 mg/g。参照文献方法并结合预试验结果，以综合评分法进行单因素试验，并计算欧前胡素转移率。设定干浸膏得率权重为 3 分，欧前胡素转移率权重为 7 分，计算综合评分。

欧前胡素转移率 = (水提液中欧前胡素质量浓度 × 稀释倍数) / (药材中欧前胡素质量分数 × 药材质量)

综合评分 = (干浸膏得率 / 干浸膏得率最大值) × 3 + (欧前胡素转移率 / 欧前胡素转移率最大值) × 7

2.4.1 浸泡时间的考察 称取白芷饮片 30 g，置圆底烧瓶中，加 8 倍水，分别浸泡 0、10、30、40、60 min，回流提取 1 h，提取 1 次，各平行 2 份，测定干浸膏得率，计算欧前胡素转移率、综合评分，结果见表 1。可见在浸泡时间为 0~60 min，综合评分没有明显差异。综合考虑，选择浸泡 30 min。

表 1 浸泡时间对提取效率的影响 (n=2)

Table 1 Effect of soaking time on extraction rate (n=2)

| 浸泡时间/min | 干浸膏得率/% | 转移率/% | 综合评分 |
|----------|---------|-------|-------|
| 0 | 15.19 | 4.10 | 9.20 |
| 10 | 15.51 | 4.40 | 9.73 |
| 30 | 15.03 | 4.15 | 9.25 |
| 40 | 15.19 | 4.50 | 9.81 |
| 60 | 15.99 | 4.52 | 10.00 |

2.4.2 加水倍数的考察 称取白芷饮片 30 g，置圆底烧瓶中，分别加 6、8、10、12、15 倍水，浸泡 30 min，回流提取 1 h，提取 1 次，各平行 2 份，测定干浸膏得率，计算欧前胡素转移率、综合评分，结果见表 2。可见综合评分在加水倍数为 12 倍时达到最大，12、15 倍水的综合评分相当。因此选择

10、12、15 倍水进行后续正交试验。

表 2 加水量对提取效率的影响 (n=2)

Table 2 Effect of water volume on extraction rate (n=2)

| 加水量/倍 | 干浸膏得率/% | 转移率/% | 综合评分 |
|-------|---------|-------|-------|
| 6 | 13.10 | 3.87 | 6.10 |
| 8 | 15.24 | 5.57 | 8.20 |
| 10 | 16.70 | 4.81 | 7.65 |
| 12 | 18.87 | 6.75 | 10.00 |
| 15 | 17.51 | 6.71 | 9.74 |

2.4.3 提取时间的考察 称取白芷饮片 30 g，置圆底烧瓶中，加 12 倍水，浸泡 30 min，分别回流提取 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h，提取 1 次，各平行 2 份，测定干浸膏得率，计算欧前胡素的转移率、综合评分，结果见表 3。可见综合评分在提取时间为 0.5 h 时最高，1.5~3.0 h 时呈平缓下降趋势。因此选择 0.5、1.0、1.5 h 进行后续正交试验。

表 3 提取时间对提取效率的影响 (n=2)

Table 3 Effect of extracting time on extraction rate (n=2)

| 提取时间/h | 干浸膏得率/% | 转移率/% | 综合评分 |
|--------|---------|-------|------|
| 0.5 | 13.22 | 5.79 | 9.04 |
| 1.0 | 14.63 | 5.04 | 8.35 |
| 1.5 | 16.91 | 5.00 | 8.65 |
| 2.0 | 18.31 | 4.46 | 8.22 |
| 3.0 | 19.42 | 4.03 | 7.88 |

2.4.4 提取次数的考察 称取白芷饮片 30 g，置圆底烧瓶中，加 12 倍水，浸泡 30 min，回流提取 1 h，分别提取 1、2、3、4 次，各平行 2 份，测定干浸膏得率，计算欧前胡素转移率、综合评分。结果见表 4。可见提取 3 次、提取 4 次，综合评分增幅极小，提取 2 次增幅较大。因此选择 1、2、3 次进行后续正交试验。

表 4 提取次数对提取效率的影响 (n=2)

Table 4 Effect of extraction times on extraction rate (n=2)

| 提取次数 | 干浸膏得率/% | 转移率/% | 综合评分 |
|------|---------|-------|-------|
| 1 | 15.57 | 5.00 | 5.14 |
| 2 | 23.68 | 8.57 | 8.50 |
| 3 | 27.55 | 9.36 | 9.46 |
| 4 | 29.08 | 9.90 | 10.00 |

2.5 水提工艺的正交试验优化

根据单因素试验结果,以加水倍数(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为影响因素,采用L₉(3⁴)正交表进行设计,平行2次试验,测定干浸膏得率、欧前胡素转移率,计算综合评分,并以综合评分作为评价指标。因素水平见表5,正交试验设计和结果见表6,方差分析结果见表7。

表5 因素与水平

Table 5 Factors and levels

| 水平 | 因素 | | |
|----|-----|-----|-----|
| | A/倍 | B/h | C/次 |
| 1 | 10 | 0.5 | 1 |
| 2 | 12 | 1.0 | 2 |
| 3 | 15 | 1.5 | 3 |

表6 L₉(3⁴)正交试验设计和结果

Table 6 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

| 试验号 | A | B | C | D | 干浸膏得率/% | 转移率/% | 综合评分 |
|-------|----|-------|-------|-------|---------|-------|------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 13.94 | 7.33 | 4.60 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 23.61 | 11.66 | 7.47 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 28.58 | 14.32 | 9.13 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 21.77 | 12.94 | 7.82 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 27.80 | 16.36 | 9.92 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 19.94 | 6.58 | 4.91 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 24.84 | 14.78 | 8.93 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 18.20 | 6.44 | 4.67 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 27.30 | 12.60 | 8.26 |
| 干浸膏得率 | K1 | 22.04 | 20.18 | 17.36 | 23.01 | | |
| | K2 | 23.17 | 23.21 | 24.23 | 22.80 | | |
| | K3 | 23.45 | 25.27 | 27.07 | 22.85 | | |
| | R | 1.40 | 5.09 | 9.71 | 0.22 | | |
| 转移率 | K1 | 11.10 | 11.68 | 6.79 | 12.10 | | |
| | K2 | 11.96 | 11.48 | 12.40 | 11.01 | | |
| | K3 | 11.27 | 11.17 | 15.15 | 11.23 | | |
| | R | 0.85 | 0.51 | 8.37 | 1.09 | | |
| 综合评分 | K1 | 7.07 | 7.12 | 4.73 | 7.59 | | |
| | K2 | 7.55 | 7.35 | 7.85 | 7.10 | | |
| | K3 | 7.29 | 7.43 | 9.33 | 7.21 | | |
| | R | 1.45 | 0.94 | 13.80 | 1.47 | | |

表7 方差分析

Table 7 Analysis of variance

| 因素 | 离差平方和 | 自由度 | 方差 | F值 | P值 |
|-------|-------|-----|-------|--------|-------|
| A | 0.35 | 2 | 0.18 | 2.21 | |
| B | 0.16 | 2 | 0.08 | 1.00 | |
| C | 33.10 | 2 | 16.55 | 207.71 | <0.01 |
| D(误差) | 0.40 | 2 | 0.20 | 2.51 | |

可见各因素对提取工艺影响大小依次为 C>A>B, 最优方案为 A₂B₃C₃。只有提取次数对工艺的影响具有统计学意义。综合考虑提取效率和节约能源等因素, 结合单因素考察结果, 最终确定白芷的水提工艺为 A₂B₁C₃, 即加 12 倍水, 提取 0.5 h, 提取 3 次。

2.6 验证试验

称取白芷饮片 30 g, 平行 3 份, 按最佳工艺即加 12 倍水, 提取 0.5 h, 提取 3 次进行提取, 测定干浸膏得率, 计算欧前胡素转移率。结果干浸膏得率平均值为 24.25%, RSD 值为 3.03% (n=3), 欧前胡素转移率平均值为 17.24%, RSD 值为 4.95% (n=3), 结果表明白芷的水提取工艺稳定、合理、可行。

3 讨论

本实验借鉴《中国药典》2015 版一部白芷项下欧前胡素的 HPLC 测定方法。该色谱条件下欧前胡素的专属性强, 测定方法简便、准确、且重复性好, 可作为白芷水提液中欧前胡素的 HPLC 测定方法。

实验通过单因素初步筛选影响因素, 在此基础上采用正交试验进一步优化白芷水提工艺, 确定最佳提取工艺为加 12 倍水, 提取 0.5 h, 提取 3 次, 此条件经验证试验表明, 该提取工艺稳定, 合理、可行。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 105.

[2] 兰志琼. 白芷香豆素类成分与分泌组织的相关性研究

[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[3] 董伟, 汤喜兰, 赵国巍, 等. 白芷香豆素类化合物对乳腺癌细胞的化疗增敏作用研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(2): 140-145.

[4] 秦旭华, 金沈锐, 唐怡, 等. 白芷总香豆素对偏头痛模型大鼠脑和血中一氧化氮和一氧化氮合酶的影响 [J]. 成都中医药大学学报, 2012, 35(4): 5-7.

[5] 王世祥, 马晓毅, 贾璞, 等. 白芷总香豆素抗惊厥作用研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(7): 561-564.

[6] 胡荣. 白芷中欧前胡素提取分离及主要药效学研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.

[7] 曾国钱, 林峰, 王雪松, 等. 欧芹素乙和异欧芹素乙对兔血小板聚集及兔血小板内血栓素 B₂、环腺苷酸水平的影响 [J]. 第二军医大学学报, 1993, 14(4): 369-370.

[8] 金洁, 金传山, 吴德玲, 等. 不同加工工艺对白芷有效成分的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 88-91.

[9] 杜兴旭, 王春梅, 秦晶, 等. 中药白芷香豆素类成分的研究进展 [J]. 井冈山医学学报, 2005, 26(2): 120-122.

[10] Hong J, Shin K H, Lim S S, et al. Lead compounds for anti-inflammatory drugs isolated from the plants of the traditional oriental medicine in Korea [J]. *Inflamm Allergy Drug Targ*, 2008, 7(3): 195-202.

[11] 吴媛媛, 蒋桂华, 马逾英, 等. 白芷的药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 625-627.

[12] 李斌, 黄智豪, 何庆瑜, 等. 欧前胡素在制备抑制食管癌肿瘤的药物中的应用 [P]. 中国专利: CN108042526A, 2018-05-18.