

当归总苯酐的超临界 CO₂ 萃取工艺研究

龚苏晓¹, 刘毅¹, 刘素香¹, 王文燕², 张铁军¹

(1. 天津药物研究院 中药现代研究部, 天津 300193; 2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193)

摘要: **目的** 首次以藁本内酯纯度和转移率为主要考察指标, 探讨应用超临界 CO₂ 萃取法从当归中提取总苯酐的工艺。**方法** 采用单因素和 L₉(3)⁴ 正交设计进行试验, 考察药材粒度、萃取压力、萃取时间、萃取温度等因素对藁本内酯纯度和转移率的影响, 优化最佳提取工艺。采用高效液相色谱法分析, 色谱条件为 Accurasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液, 柱温 30 ℃, 检测波长 320 nm, 体积流量 1.0 mL/min。**结果** 超临界 CO₂ 萃取法的最佳工艺条件为: 萃取压力 10 MPa, 萃取温度 50 ℃, 萃取时间 20 min。**结论** 超临界 CO₂ 流体工艺萃取的当归总苯酐纯度和转移率可达 80%以上。

关键词: 当归; 总苯酐; 藁本内酯; 超临界 CO₂ 萃取; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)06-0448-05

Extraction process of total phthalide from *Angelica sinensis* with supercritical CO₂

GONG Su-xiao¹, LIU Yi¹, LIU Su-xiang¹, WANG Wen-yan², ZHANG Tie-jun¹

(1. The Center for Modernization of Traditional Chinese Medicines, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. The Center for Instrumentation Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective To establish the optimal supercritical CO₂ extraction of total phthalide from *Angelica sinensis*. The ligustilide purity and transfer rate in general phthalide were used as the evaluation indexes. **Methods** The optimum extraction conditions, such as sizes of crush materials, the extraction pressure, extraction temperature, and extraction time were investigated by L₉(3)⁴ orthogonal test. The HPLC was performed on a Accurasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol-0.05% phosphoric acid water. The column temperature was 30 ℃. Examination wavelength was 320 nm. The flow rate was 1.0 mL/min. **Results** The optimal supercritical CO₂ extraction conditions were: extraction pressure, 10 MPa; extraction temperature, 50℃; extraction time, 20 min. **Conclusion** It is feasible that supercritical CO₂ extraction could be used in the extraction of total phthalide from *A. sinensis*, its purity and transfer rate are over 80%.

Key word: *Angelica sinensis* Oliv. Diels; total phthalide; ligustilide; supercritical CO₂ extraction; HPLC

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 是常用活血化瘀中药, 现代药理学研究证明其对心脑血管系统、血液系统具有广泛的药理效应^[1-5]。当归挥发油中的总苯酐(主要为藁本内酯)为其主要活血化瘀成分。藁本内酯具有热不稳定性, 容易异构化^[6]。近年来, 有关当归提取与制剂方面的研究较多^[7-8], 采用超临界萃取工艺提取当归时, 多以当归出油率为考察指标^[9],

极少数以藁本内酯转移率为考察指标, 未见进行高选择性的提取。笔者以甘肃岷县道地药材当归为原料, 采用超临界萃取工艺^[10-11], 首次以藁本内酯纯度[藁本内酯纯度=藁本内酯质量(mg)/取样量(mg)]和转移率{藁本内酯转移率=藁本内酯纯度×提取物总质量(g)/[药材投料量(g)×药材中藁本内酯质量分数]}为主要考察指标, 对总苯酐进行了高选择性的提取, 其纯度达到 80%以上。

基金项目 “十一五”国家科技支撑计划课题“当归、黄芪、大黄等区域特色中药资源利用关键技术及产业化研究”子课题(2007BA137B06)

1 仪器与材料

1.1 仪器

1100 系列安捷伦高效液相色谱仪 (G1310A 四元液相梯度泵、G1313A 自动进样器、G1314A VWD 检测器、CO—201 柱温箱、安捷伦色谱工作站); HA220—50—06 超临界 CO₂ 萃取仪 (江苏南通市华安超临界萃取有限公司)。

1.2 材料

藁本内酯对照品 (自制, 批号 20100201, 质量分数 > 98%); 当归药材购自甘肃岷县, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为伞形科当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Dials。甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Accurasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 相为甲醇, B 相为 0.05% 磷酸水溶液; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min。梯度洗脱程序: 0~15 min A-B (30:70→50:50), 15~20 min A-B (75:25), 20~35 min A-B (75:25); 检测波长 320 nm; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

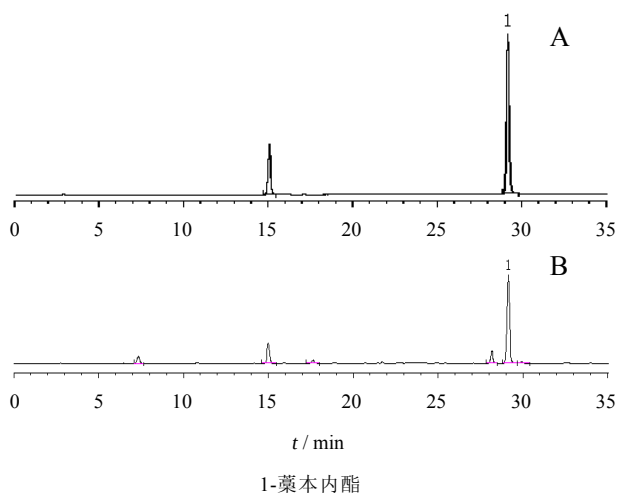


图 1 藁本内酯对照品 (A) 和当归药材 (B) 的 HPLC 图

2.2 方法学考察

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取藁本内酯对照品 24.54 mg, 加甲醇溶解制成质量浓度为 981.6 μg/mL 的藁本内酯对照品储备液。精密吸取藁本内酯对照品储备液 1.0 mL,

置 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取当归药材粉末 (过药典 4 号筛) 约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-甲酸 (95:5) 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (250 W, 50 kHz) 45 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇-甲酸补足减失的质量, 摇匀, 静置, 取上清液 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察

分别精密吸取藁本内酯对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取上述溶液, 按 “2.1” 项下色谱条件测定, 以藁本内酯的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=265.81 X+32.193$, $r=1.000 0$, 表明藁本内酯在 1.963~39.264 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.2.4 精密度试验

精密吸取藁本内酯 3.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按 “2.1” 项下色谱条件测定, 记录峰面积, 结果峰面积积分值的 RSD 为 0.26%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.5 稳定性试验

取当归药材粉末 (批号 090001), 按 “2.2.2” 项下方法制备供试品溶液, 按 “2.1” 项下色谱条件测定, 分别于制备后 0、2、4、6、8 h 进样, 记录峰面积, 结果峰面积积分值的 RSD 为 0.37%, 表明样品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.6 重现性试验

取当归药材粉末 (批号 090001) 6 份, 按 “2.2.2” 项下方法制备供试品溶液, 按 “2.1” 项下色谱条件测定, 以外标法计算藁本内酯的量, 结果药材中含藁本内酯量为 10.79 mg/g, RSD 为 1.46%, 表明该方法的重现性良好。

2.2.7 加样回收率试验

称取当归药材粉末 (批号 090001) 约 0.1 g, 精密称定, 共 9 份, 分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 平均随机分为 3 组; 3 组分别加入藁本内酯对照品储备液 0.8、1.0、1.2 mL, 按 “2.2.2” 项下方法制备供试品溶液, 按 “2.1” 项下色谱条件测定, 计算藁本内酯回收率, 结果平均回收率为 96.19%, RSD 为 0.87%。

2.3 超临界 CO₂ 萃取当归总苯酐工艺条件单因素实验

2.3.1 药材粒度对藁本内酯纯度和转移率的影响

取当归药材(批号 090001), 粉碎, 分别过 20、40、60、80 目筛, 在萃取压力 20 MPa, 萃取温度 40 ℃, 萃取时间 30 min 条件下, 考察药材粒度对纯度和转移率的影响, 结果见图 2。粒度越细藁本内酯纯度和转移率越高, 但物料过细其纯度和转移率反而下降, 这可能是由于物料过细容易造成通路堵塞和粉碎过程中产生的高温使挥发成分损失, 而且物料过细增加了粉碎的难度, 因此适宜的粒度选定为 40~60 目。

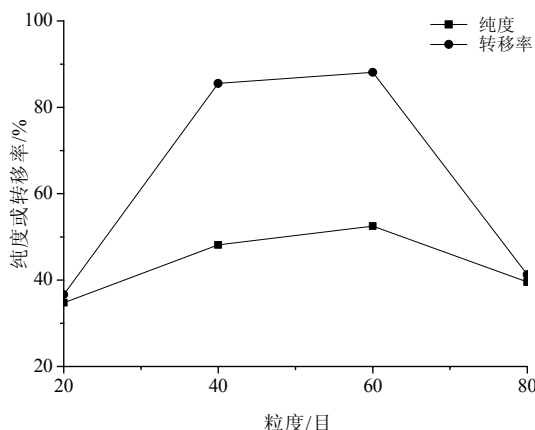


图 2 药材粒度对藁本内酯纯度和转移率的影响

2.3.2 萃取压力对藁本内酯纯度和转移率的影响

取当归药材(批号 090001), 粉碎, 过 40 目筛, 在萃取温度为 40 ℃, 萃取时间为 30 min, 萃取压力分别为 10、15、20、25、30、35 MPa 时进行超临界 CO₂ 萃取, 考察萃取压力对藁本内酯纯度和转移率的影响, 结果见图 3。萃取压力对藁本内酯纯度影响较大, 其纯度随着压力的增大而降低, 即低压时藁本内酯容易萃出; 而随着压力增大, 其他物质则一起萃出, 纯度逐渐降低, 表明藁本内酯对压力很敏感。转移率随着压力的增大而升高, 至 25 MPa 以后则随着压力的增大而降低, 可能是在一定温度下压力过大, 挥发油逸失所致; 故在后续的正交试验中萃取压力选择为 10、15、20 MPa。

2.3.3 萃取温度对藁本内酯纯度和转移率的影响

取当归药材(批号 090001), 粉碎, 过 40 目筛, 在萃取压力为 20 MPa, 萃取时间为 30 min, 萃取温度分别为 30、35、40、45、50、55 ℃ 时进行超临界 CO₂ 萃取, 考察萃取温度对藁本内酯纯度和转移率的影响, 结果见图 4。萃取温度对藁本内酯转移率影响较大, 随着萃取温度的升高, 藁本内酯纯度和

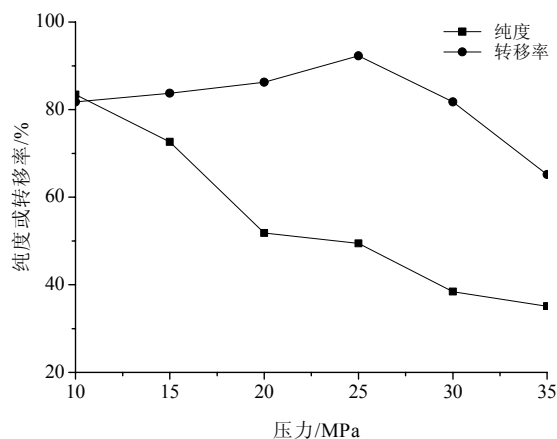


图 3 萃取压力对藁本内酯纯度和转移率的影响

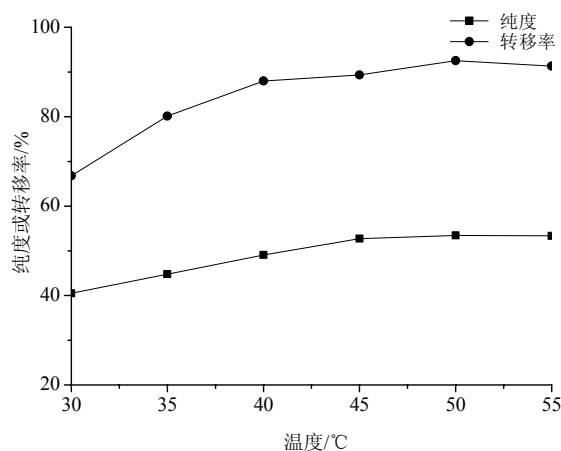


图 4 萃取温度对藁本内酯纯度和转移率的影响

转移率也随之增大, 40~50 ℃ 差异不大, 故在后续的正交试验中萃取温度选择为 40、45、50 ℃。

2.3.4 萃取时间对藁本内酯纯度和转移率的影响

取当归药材(批号 090001), 粉碎, 过 40 目筛, 在萃取压力为 20 MPa, 萃取温度为 40 ℃, 萃取时间分别为 20、30、40、50、60 min 时进行超临界 CO₂ 萃取, 考察萃取时间对藁本内酯纯度和转移率的影响, 结果见图 5。藁本内酯纯度和转移率随着萃取时间的延长不断下降, 可能是随着萃取时间的延长挥发油逸失的缘故, 故在后续的正交试验中提取时间选择 20、30、40 min。

2.4 正交试验

2.4.1 试验设计

综合预实验各因素对当归挥发油中藁本内酯纯度和转移率影响的研究结果, 确定了萃取压力(A)、萃取温度(B)、萃取时间(C)的参数范围。以藁本内酯纯度和转移率为考察指标, 采用 L₉(3)⁴ 正交试验优化萃取工艺。各因素及水平值见表 1。

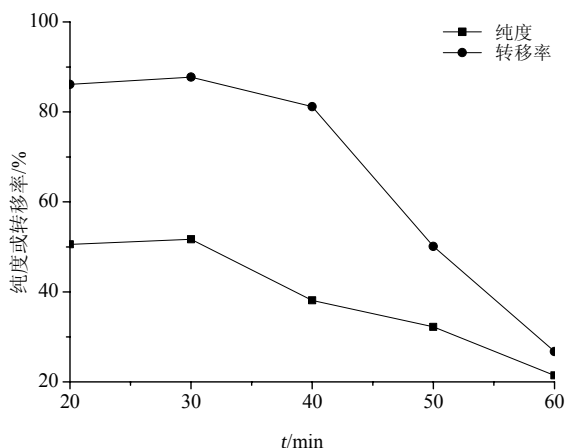


图5 萃取时间对藁本内酯纯度和转移率的影响

表1 超临界萃取当归挥发油中藁本内酯因素水平表

水平	因素		
	A/MPa	B/℃	C/min
1	10	40	20
2	15	45	30
3	20	50	40

表2 $L_9(3)^4$ 正交实验设计表及结果

水 平	因 素				试验结果		综合评分*
	A	B	C	D	藁本内酯纯度/%	藁本内酯转移率/%	
1	1	1	1	1	82.07	79.21	80.64
2	1	2	2	2	81.39	81.79	81.59
3	1	3	3	3	81.55	77.52	79.54
4	2	1	2	3	72.82	83.22	78.02
5	2	2	3	1	74.39	84.33	79.36
6	2	3	1	2	83.80	80.67	82.24
7	3	1	3	2	75.46	81.04	78.25
8	3	2	1	3	77.62	82.91	80.27
9	3	3	2	1	76.08	81.03	78.56
I	80.590	78.970	81.050	79.520			
II	79.873	80.407	79.390	80.693			
III	79.027	80.113	79.050	79.277			
R	1.563	1.437	2.000	1.416			

* 综合评分=藁本内酯纯度 $\times$ 0.5+藁本内酯转移率 $\times$ 0.5

表3 以藁本内酯纯度和转移率综合评分为指标的方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	3.674	2	1.067	无
B	3.457	2	1.004	无
C	6.871	2	1.996	无
D	3.443	2	1.000	

2.4.2 藁本内酯纯度与转移率的测定

准确称取当归药材(批号 090001), 每份 200 g, 根据所设定的因素水平表(表 1), 按 $L_9(3)^4$ 正交表实施试验。精密称取各试验号的提取物约 20 mg, 甲醇溶解并稀释至 25 mL 量瓶中; 精密吸取 1.0 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成提取物溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定藁本内酯的量, 并计算藁本内酯的纯度及转移率。正交试验结果见表 2。

2.4.3 试验直观分析

由表 2 正交试验结果可知, 各因素对当归挥发油中藁本内酯纯度和转移率综合评分的影响顺序为: $C>A>B$, 即: 萃取时间 $>$ 萃取压力 $>$ 萃取温度。最佳萃取工艺为 $A_1B_2C_1$, 即萃取压力 10 MPa, 萃取温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 萃取时间 20 min。

2.4.4 试验方差分析

以藁本内酯纯度和转移率综合评分为指标的方差分析结果见表 3。A、B、C 三因素对藁本内酯纯度和转移率综合评分均无显著影响。

经直观分析和方差分析, 确定当归总苯酐最佳提取工艺为萃取压力 10 MPa, 萃取温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 萃取时间 20 min。

2.5 验证试验

按优选的最佳提取工艺条件, 即萃取压力 10 MPa, 萃取温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 萃取时间 20 min 进行验证试验。结果表明, 藁本内酯纯度平均值为 82.70%, RSD

为 0.44% ($n=3$); 转移率的均值为 81.61%, RSD 为 0.50% ($n=3$); 该工艺稳定可行。

3 讨论

本研究首先通过单因素实验, 确定了药材粒度、萃取压力、萃取时间、萃取温度 4 个因素的范围, 再通过正交实验设计对其进行优化, 得到了最佳提取工艺条件; 此工艺可使当归总苯酐纯度和转移率的平均值均达到 80%以上, 为当归总苯酐的工业化生产提供了科学依据和参考。

当归总苯酐中的主要成分藁本内酯对湿、热、光均敏感。研究表明, 采用具有高选择性提取的超临界萃取法提取当归总苯酐, 可以避免以上问题。

参考文献

- [1] 康 军. 当归化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国医药导报, 2005, 23 (2): 120.
- [2] 王雪梅, 李应东. 当归有效成分及其药理作用的研究进展[J]. 甘肃中医, 2009, 22 (11): 50-51.
- [3] 裴 媛, 谭初兵, 徐为人, 等. 当归苯酐类和萜类成分作用的虚拟评价[J]. 中草药, 2010, 41 (6): 938-941.
- [4] 韦 玮, 龚苏晓, 张铁军, 等. 当归多糖类成分及其药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2009, 32 (2): 130-134.
- [5] 邸倩倩, 杨俊红, 张铁军, 等. 当归微波提取物相对分子质量的分布特征研究[J]. 中草药, 2008, 39 (4): 541-543.
- [6] 张爱君. 藁本内酯对照品提取与稳定性的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10 (5): 162-163.
- [7] Pei Y, Tan C B, Xu W R, et al. Virtual evaluation on the activities of phthalides and terpenoids from *Angelica sinensis* [J]. Chin Herb Med, 2010, 2 (3): 236-241.
- [8] 蓝苑元, 姚小军, 潘 勤. 当归油自乳化释药系统的制备[J]. 现代药物与临床, 2009, 24 (6): 350-353.
- [9] 刘 毅, 刘素香, 龚苏晓, 等. 当归超临界 CO_2 萃取物的 GC-MS 成分分析[J]. 药物评价研究, 2010, 33 (5): 391-392.
- [10] 吴 桢, 秦 勇. 超临界 CO_2 萃取何首乌中二苯乙烯苷的工艺考察[J]. 中国药师, 2010, 13 (2): 251-253.
- [11] 信秀灵, 王志祥, 余祥英, 等. 超临界 CO_2 萃取牛至挥发油的工艺研究[J]. 化工时刊, 2010, 24 (1): 20-22.
- (收稿日期 2010-07-23)
-
- (上接第 421 页)
- [32] Gao Q, Qin W S, Jia Z H, et al. Rhein improves renal lesion and ameliorates dyslipidemia in db/db mice with diabetic nephropathy [J]. Planta Med, 2010, 76 (1): 27-33.
- [33] 黄 娟, 陈文莉, 朱 虹. 大黄酸对输尿管梗阻大鼠肾组织纤维化的保护机制[J]. 中国药师, 2009, 12 (11): 1529-1531.
- [34] 刘颖慧, 周旦阳. 大黄酸对 AGE-BSA 诱导的大鼠系膜细胞 TGF- β 1 和 CTGF 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27 (2): 432-434.
- [35] 余德芊, 高 原, 刘晓红. 大黄酸对大鼠肾小管上皮细胞肥大抑制作用[J]. 中国公共卫生, 2010, 26 (5): 583-584.
- [36] 曾 嵘, 王俭勤, 段书众, 等. 大黄酸对人肾小管上皮细胞血小板反应蛋白 1 和转化生长因子 β 1 表达的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2008, 17 (3): 248-252.
- [37] 吕 敏, 周媛媛, 马向华, 等. 大黄酸对白细胞介素-6 诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9 (16): 3075-3078.
- [38] Heo S K, Yun H J, Park W H, et al. Rhein inhibits TNF-alpha-induced human aortic smooth muscle cell proliferation via mitochondrial-dependent apoptosis [J]. J Vasc Res, 2009, 46 (4): 375-386.
- [39] 居晓伟, 侯晓华, 范桂平, 等. 大黄酸-N- β -羟乙基替加氟酯的合成及其骨亲和性[J]. 武警医学院学报, 2008, 17 (5): 375-377.
- [40] 李灵芝, 倪 宁, 张 丽, 等. 大黄酸-雌酮对骶板 TGF- β 1 及其受体 T β R II 蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30 (18): 1743-1745.
- [41] 迟 钺, 金苗苗, 母义明, 等. 大黄酸上调糖尿病大鼠脂肪组织 PPAR γ 及 GluT-4 表达并改善胰岛素敏感性[J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16 (12): 746-749.
- [42] 杨永青, 杨公社. 大黄酸对大鼠前体脂肪细胞增殖与分化的影响[J]. 中国药理学杂志, 2007, 42 (15): 1148-1151.
- [43] 袁小青, 马向华, 丁亚琴, 等. 大黄酸对人前体脂肪细胞增殖与分化的影响[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009, 29 (2): 161-165.
- [44] 刘庆阳, 于世家. 大黄酸对糖尿病肥胖大鼠脂肪组织抵抗素基因表达及血浆游离脂肪酸水平的影响[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24 (8): 1061-1063.
- [45] Tong S Q, Yan J Z. Large-scale separation of hydroxyl-anthraquinones from *Rheum palmatum* L. by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2007, 1176 (1/2): 163-168.
- [46] Gonnot V, Tisserand S, Nicolas M, et al. Total synthesis of rhein and diacerhein via a directed *ortho* metalation of an aromatic substrate [J]. Tetrahedron Lett, 2007, 48 (40): 7117-7119.
- (收稿日期 2010-08-05)