

## 基于 UPLC 方法的酒当归微波炮制工艺研究

魏文龙, 付娟, 李文涛, 黄林芳\*

中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

**摘要:** 目的 采用 UPLC 及化学计量学方法考察酒炙当归的最优微波炮制工艺, 为从品质角度探讨当归酒炙工艺的规范化提供参考。方法 选取黄酒量、闷润时间、微波功率、微波时间作为考察因素, 采用正交实验法以阿魏酸、洋川芎内酯 A、正丁基苯肽、藁本内酯、丁烯基苯肽为指标, 筛选最优酒炙工艺, 并对当归酒炙前后的成分含量进行主成分分析。结果 酒炙当归最优工艺为每 1 g 当归加黄酒 0.5 g, 闷润时间 5 h、微波功率 750 W、微波时间 3 min。结论 本研究首次采用 UPLC 及化学计量学方法对酒当归的微波炮制工艺进行研究。该炮制工艺加热温度可控, 加热时间确定, 加料量定量, 指标性成分含量高, 操作步骤少, 耗时短, 为当归酒炙工艺提供了一种新方法。

**关键词:** 当归; 微波炮制; UPLC; 主成分分析; 阿魏酸; 洋川芎内酯 A; 正丁基苯肽; 藁本内酯; 丁烯基苯肽

**中图分类号:** R283 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2014) 02 - 0150 - 05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.012

## Studies on microwave processing technology for wine-processed *Angelicae Sinensis Radix* based on UPLC

WEI Wen-long, FU Juan, LI Wen-tao, HUANG Lin-fang

The Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plants Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract: Objective** To investigate the optimum processing condition of wine-processed *Angelicae Sinensis Radix* (ASR) by microwave processing technology and chemometrics and to standardize the wine-processed technology by the quality point of view. **Methods** Selecting the amount of wine, microwave power, microwave time, and moistening time as the investigation factors, orthogonal test was used to determine the best processing technology with the contents of ferulic acid, senkyunolide A, *n*-butylphthalide, ligustilide, and butene benzene peptide as observation targets. Finally, we analyze the contents changes of pre- and post-processing ASR by the principal component analysis (PCA). **Results** The optimal microwave processing procedures for wine-processed ASR were as follows: moistening ASR for 5 h with 0.5 g of yellow rice wine for 1 g of ASR, microwave power with 750 W for 3 min. **Conclusion** This is the first time to investigate the optimal processing technology of wine-processed ASR by UPLC and chemometrics. The controllable temperature, accurate heating time, quantitative ASR amount, higher index components, feasible fewer procedures, and shorter time make this method desirable. This research provides a new method for the processing technology of wine-processed ASR.

**Key words:** *Angelicae Sinensis Radix*; microwave processing; UPLC; PCA; ferulic acid; senkyunolide A; *n*-butylphthalide; ligustilide; butene benzene peptide

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 为伞形科多年生草本植物, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效<sup>[1]</sup>。当归含有多种活性成分阿魏酸、挥发油、多糖等, 可增强免疫系统、抑制肿瘤细胞增长, 并对子宫收缩有较强抑制作用。当归酒制后性味辛温, 取其散性, 可增强活血散瘀之功<sup>[2]</sup>。传统酒炙

方法有加料量不定量、加热温度不可控、耗时长和加热时间不确定等缺点, 因此很有必要规范当归的酒炙工艺。肖焕<sup>[3]</sup>曾以阿魏酸和总挥发油两种成分的含量为指标研究酒当归炮制工艺。本研究同时以阿魏酸、洋川芎内酯 A、正丁基苯肽、藁本内酯、丁烯基苯肽五种成分为指标, 选取黄酒量、微波功

收稿日期: 2013-10-25

基金项目: 国家自然科学基金 (81274013); 国家自然科学基金重点项目 (81130069); 西南民族大学研究生学位点建设项目 (2013XWD-S0703)

作者简介: 付娟 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量控制。Tel: (010)57833197 E-mail: jsfujian@163.com

\*通信作者 黄林芳 Tel: (010)57833197 Fax: (010)62899700 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

率、微波时间、闷润时间作为考察因素,运用超高效液相色谱(UPLC)法分析酒当归属微波炮制前后成分的含量变化,通过正交实验确定最优炮制工艺<sup>[4]</sup>,并采用化学计量学方法-主成分分析,对实验结果进行了分析,为酒炙当归属的质量控制及炮制机制的研究提供参考。

## 1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪-(DAD)二极管阵列检测器(美国 Waters 公司,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、Empower 2 色谱工作站),AB135—S 电子分析天平(瑞士 Mettler 公司),EG720KG4—NA 微波炉(美的集团),DZKW—4 电子恒温水浴锅(北京中兴伟业有限公司),PURELAB Classic-UVF 纯水仪(英国 ELGA)。

乙腈(色谱纯, Fisher),甲酸(色谱纯, Fisher),甲醇(分析纯, 北京化工厂),纯水为实验室自制。对照品阿魏酸(批号 110773-201012)购于中国食品药品检定研究院,藁本内酯(批号 MUST-11072416)、正丁基苯酞(批号 MUST-12020706)、丁烯基苯酞(批号 MUST-12071103)、洋川芎内酯 A(批号 MUST-10102309)均购于成都曼斯特生物科技有限公司,纯度经高效液相色谱分析大于 98%。黄酒(湖州老恒河酿造有限公司,酒精体积分数 12.0%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 当归的炮制

**2.1.1 酒炙当归传统炮制** 见《中国药典》(2010年版)附录 II 炮制通则。

**2.1.2 微波炮制工艺研究<sup>[6]</sup>** 在室温下,将 1 g 当归生品置加水的黄酒中闷润,至黄酒被当归充分吸收,将闷润后的当归用微波加热干燥,即得酒炙当归<sup>[7]</sup>。选取黄酒量、微波功率、微波时间、闷润时间作为考察因素,每个因素设计 3 个水平,按照  $L_9(3^4)$  正交表(表 1)的试验顺序进行操作<sup>[8]</sup>。

### 2.2 含量测定<sup>[9]</sup>

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱: BEH  $C_{18}$  柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m),柱温 35  $^{\circ}$ C,样品室温度 4  $^{\circ}$ C,体积流量 0.3 mL/min,检测波长 261 和 281 nm,流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)。洗脱梯度如下: 0~4 min, 95% (B); 4~7 min, 95%~76% (B); 7~8 min, 76%~72% (B); 8~10 min, 72%~50% (B); 10~12 min, 50%~30% (B); 12~14 min,

表 1  $L_9(3^4)$  正交表

水平	黄酒量 (A)/%	微波功率 (B)/w	微波时间 (C)/min	闷润时间 (D)/h
1	50	660	3	1
2	100	750	4	3
3	200	840	5	5

30%~0% (B); 14~15 min, 0% (B); 15~16 min, 0%~95% (B)。

**2.2.2 对照品溶液制备** 分别精密称取阿魏酸、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞、藁本内酯、丁烯基苯酞各 1 mg,置 10 mL 量瓶中,加 70%甲醇至刻度,振摇使混合均匀,配制成混合对照品储备液,备用。

**2.2.3 供试品溶液制备** 取药材粉末(过三号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇 20 mL,密塞,称定质量,加热回流 30 min,放冷,再称定质量,用 70%甲醇补足减失的质量,摇匀,即得。进液相前用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤,作为供试品溶液。

**2.2.4 检测波长的选择** 对阿魏酸、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞、丁烯基苯酞、藁本内酯的对照品溶液进行了紫外图谱扫描,其中阿魏酸、藁本内酯最大吸收波长为 321 nm,洋川芎内酯 A 最大吸收波长为 281 nm,正丁基苯酞及丁烯基苯酞最大吸收波长为 261 nm,由于阿魏酸、正丁基苯酞、洋川芎内酯 A、藁本内酯在波长 281 nm 下也有很高的响应值,故选择 281 nm 为检测波长。丁烯基苯酞在 281 nm 下响应值仅为 261 nm 下响应值的 1/10,故选取 261 nm 作为丁烯基苯酞的检测波长。

**2.2.5 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品储备液 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000  $\mu$ L 至 2 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,进样量 2  $\mu$ L,按上述色谱条件进行 UPLC-PDA 分析测定,以各对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积值为纵坐标(Y)进行线性回归,得到各线性回归方程。最小检测限(LOD)和最小定量限(LDQ)定义为信噪比分别等于 3 ( $S/N=3$ ) 和 10 ( $S/N=10$ ) 时对应的进样量(表 2)。

**2.2.6 重复性实验** 取同一批次的当归样品 5 份,按供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件测定,各对照品色谱峰的峰面积 RSD 值在 0.61%~2.89%,表明此方法的重复性良好。

表2 阿魏酸及苯酐类成分的标准曲线方程及最低检测限、定量限

Table 2 Standard curve equation of ferulic acid and phthalides component and minimum detection and quantification limits

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(mg·mL <sup>-1</sup> )	检测限/(μg·mL <sup>-1</sup> )	定量限/(μg·mL <sup>-1</sup> )
阿魏酸	$Y=3 \times 10^7 X + 2\ 835.3$	0.999 9	0.03~1.722	4.15	11.06
洋川芎内酯 A	$Y=2 \times 10^7 X + 5\ 256.2$	1	0.03~0.415	4.57	11.78
正丁基苯酐	$Y=7 \times 10^7 X + 295\ 390$	0.999 1	0.15~0.722	5.33	12.56
藁本内酯	$Y=6 \times 10^7 X + 11\ 594$	0.999 9	0.33~6.786	5.74	13.32
丁烯基苯酐	$Y=9 \times 10^7 X + 42\ 077.1$	0.999 1	0.03~2.543	5.12	12.73

**2.2.7 日内精密度和日间精密度** 取当归样品重复进样6次,测得各峰保留时间和峰面积,并计算RSD值,5个主要成分保留时间和峰面积RSD分别在0.24%~0.72%和1.07%~3.43%。

取当归样品,进样3次,连续测定3天,测定5个对照色谱峰的保留时间和峰面积,并计算其RSD值,分别在0.11~0.44%和0.86~3.51%。表明仪器精密度良好。

**2.2.8 稳定性实验** 取上述供试品溶液,分别在0、2、4、8、12、24、36 h,按前述测定方法进行测定,记录峰面积,各对照品色谱峰的峰面积对应的质量浓度的RSD值在0.76%~2.25%,表明样品至少在36 h内稳定。

**2.2.9 加样回收率实验** 取已测知含量的同一批次样品6份,每份约0.2 g,精密称定,分别精密加入一定量(相当于样品中的量)5种对照品,按供试

品溶液的制备方法操作,按上述色谱条件测定。5种成分的回收率在98.33%~102.22%,RSD值在1.16%~4.72%。

### 2.3 正交实验结果及分析<sup>[11]</sup>

在正交实验中,黄酒量(%),微波功率(W),微波时间(min)和闷润时间(h)作为要考察的因素。阿魏酸、洋川芎内酯A、正丁基苯酐、丁烯基苯酐及藁本内酯的含量作为评价指标,以这5种成分的含量对各项实验做综合评分(%),其实验结果见表3。表3显示,实验8获得最高的综合评分。所以,最优炮制工艺为A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,即黄酒量200%、闷润时间5 h、微波功率750 W、微波时间3 min。采用SPSS 13.0软件对以上正交试验数据进行方差分析<sup>[12]</sup>,结果见表4。表4方差分析表明,闷润时间、微波功率对炮制工艺有显著性影响( $P < 0.05$ ),黄酒量与微波时间对炮制工艺无影响。

表3 正交实验结果

Table 3 Results of orthogonal test

序号	黄酒量/%	微波功率/W	微波时间/min	闷润时间/h	综合评分/%	阿魏酸/(mg·g <sup>-1</sup> )	洋川芎内酯A/(mg·g <sup>-1</sup> )	正丁基苯酐/(mg·g <sup>-1</sup> )	丁烯基苯酐/(mg·g <sup>-1</sup> )	藁本内酯/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	58.62	0.839	0.127	0.128	1.005	2.427
2	1	2	2	2	72.76	0.970	0.117	0.131	1.317	3.179
3	1	3	3	3	34.169	0.488	0.132	0.156	0.398	1.238
4	2	1	2	3	52.109	0.804	0.121	0.133	0.873	2.043
5	2	2	3	1	61.94	0.816	0.144	0.137	1.098	2.580
6	2	3	1	2	64.88	0.762	0.135	0.167	1.397	2.379
7	3	1	3	2	49.39	0.668	0.076	0.189	0.814	1.873
8	3	2	1	3	100.00	1.218	0.211	0.152	1.931	4.543
9	3	3	2	1	57.49	0.702	0.127	0.143	1.177	2.109
K1	55.184	74.503	59.353	53.376						
K2	59.648	60.788	62.350	78.237						
K3	68.964	48.504	62.092	52.182						
R	13.780	25.999	2.997	26.055						

表 4 方差分析  
Table 4 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
黄酒量	296.581	2	17.917	19.000	
闷润时间	1 298.285	2	78.432	19.000	*
微波功率	1 014.981	2	61.317	19.000	*
微波时间	16.553	2	1.000	19.000	
误差	16.550	2			

2.4 验证试验及工艺比较

根据上述建立的样品处理及测定方法对生品、传统炮制品和最优炮制品中阿魏酸及苯酐类成分进行了定量检测<sup>[10]</sup>。表 5 为当归生品、传统炮制品和微波最优炮制品中 5 种主要成分的定量测定结果。对最优炮制品和生品进行主成分分析(图 1),主成分 1 和主成分 2 的贡献率分别为 87.8%和 5.7%,主成分分析计算公式如下:

$$F_1=0.964X_1+0.896X_2+0.900X_3-0.975X_4-0.947X_5$$

$$F_2=0.098X_1+0.396X_2-0.305X_3+0.170X_4+0.009X_5$$

式中,  $X_1, X_2, \dots, X_5$  分别阿魏酸、洋川芎内酯 A、正丁基苯酐、藜本内酯及丁烯基苯酐的质量分数。由图 2 可知酒炙品和生品能很好的区分开来,酒炙品集中在坐标轴左侧,生品集中在坐标轴右侧。

这表明当归酒制后主要化学成分含量发生了明显变化。微波炮制品与生品比较,阿魏酸含量降低较少,传统炮制品阿魏酸含量降低较为明显。藜本内酯含量略微升高,且远高于传统炮制品。洋川芎内酯 A、正丁基苯酐和丁烯基苯酐含量变化不明显,有小范围浮动,传统炮制品与生品比较洋川芎内酯 A 和丁烯基苯酐都有一定幅度减少,只有正丁基苯酐含量升高。

该工艺大大缩减了传统酒炙当归的操作步骤。如表 6 所示,新酒炙方法具有加热温度可控,加热时间确定,加料量定量,指标性成分含量高,操作步骤减少,耗时短等优点。采用最优酒炙方法的炮制品外观颜色为金黄色,酒香气浓,质地脆。综上所述,微波炮制是一种新的当归酒炙方法。

表 5 当归生品及酒炙品中主要成分含量

Table 5 Contents of crude and wine-processed ASR (n = 3)

样品	阿魏酸/(mg·g <sup>-1</sup> )	洋川芎内酯 A/(mg·g <sup>-1</sup> )	正丁基苯酐/(mg·g <sup>-1</sup> )	藜本内酯/(mg·g <sup>-1</sup> )	丁烯基苯酐/(mg·g <sup>-1</sup> )
当归生品	1.277	0.299	0.157	4.210	1.814
传统炮制品	0.656	0.171	0.225	1.137	0.285
微波炮制品	1.218	0.225	0.153	4.602	1.95

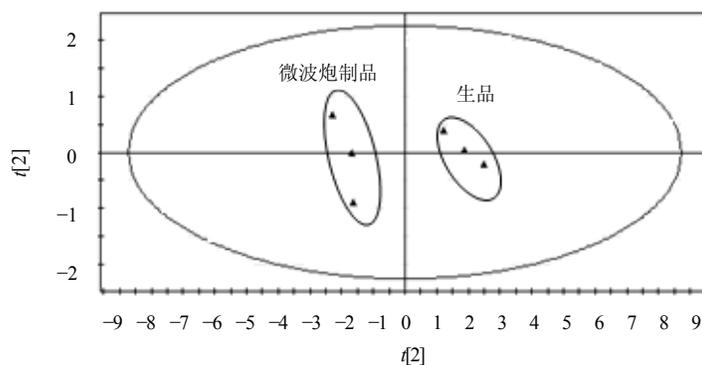


图 1 基于化学含量的当归生品与酒炙品 PCA 分析

Fig. 1 PCA of crude and wine-processed ASR

表6 微波炮制工艺与传统炮制工艺比较  
Table 6 Comparing optimal processing technology with traditional processing technology

考察因素	传统酒炙方法	最优酒炙方法
加热温度	不可控	可控
加热时间	不确定	确定
加热方式	炒干	微波加热
黄酒量	不定量	完全定量
指标性成分含量	低	高
步骤	多(适量沸水稀释, 拌匀, 闷透, 炒至不黏手, 取出晾凉)	少(闷润, 微波加热)
耗时	长	短
炮制品外观	颜色发黑	颜色为金黄色
工业化生产	过多人为因素, 不利于工业化生产	参数可控, 缩短加热时间, 降低成本, 有利于工业化生产
气味	少许酒香气	酒香气浓
质地	酥软	脆

### 3 讨论

常用酒炙法有先拌酒后炒药及先炒药后加酒, 酒水比例、酒炙温度和时间等多种影响因素, 因此规范酒当归的炮制工艺至关重要。本研究采用微波炮制, 以黄酒量、闷润时间、微波频率、微波时间为考察因素, 筛选出最优炮制工艺, 即黄酒量 200%、闷润时间 5 h、微波功率 750 W、微波时间 3 min。此工艺炮制过程中, 所有参数完全定量, 且操作简便, 利于工业化生产。本研究首次采用微波及计量学方法对酒当归的最优工艺研究, 以藁本内酯、洋川芎内酯 A、正丁基苯胺、藁本内酯、丁烯基苯胺为指标, 通过比较传统工艺与最优微波酒炙后药材中 5 个成分的含量变化, 并进行主成分分析, 筛选出最优方法。

当归酒制后性味辛温, 取其散性, 可增强活血散瘀之功。传统炮制后 5 种指标成分除正丁基苯胺外含量均比生品有显著下降(下降 42.8%~84.2%), 正丁基苯胺质量分数炮制后上升 43%; 而微波炮制后 5 种指标性成分的含量改变并不像传统炮制品那样明显。分析其原因, 系由于本文所采用评价指标有关。考虑到 5 种成分均为有效成分, 故选取它们含量最高时的工艺为最优工艺, 从而导致最优工艺的含量降低不明显, 与传统工艺的效果差异较大。此外, 多位学者对当归酒制工艺的研究亦均是以指标成分含量高者为佳<sup>[9, 12-13]</sup>。但从正交实验结果可以看出, 微波炮制也能导致各成分发生明显降低, 这是否提示可以考虑其他的评价方法呢? 是否可以考虑结合药理实验来评价炮制结果呢? 还有待进一步研究。

本文以综合评分法为评价指标, 筛选出最优微波炮制工艺, 传统炮制方法质量难以控制, 阿魏酸和藁本内酯含量损失过大, 对药材饮片质量有一定

影响, 而采取最优炮制工艺, 阿魏酸、藁本内酯含量远高于传统方法, 且藁本内酯含量略高于生品。本研究采用的最优微波炮制工艺, 全程参数可控, 操作简便、有利于当归酒炙饮片的规范化和工业化, 微波酒炙当归可作为一种新的酒炙方法进行推广。

### 参考文献

- [1] 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): 1400-1405.
- [2] Yin Z Z, Zhang L Y, Xu L N. Effect of Danggui (*Angelica sinensis*) and its ingredient ferulic acid on rat platelet aggregation and release 5-HT [J]. *Acta Pharm Sin*, 1980, 15: 321-326.
- [3] 肖焕, 冯倩茹, 林华. 当归微波炮制工艺的研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(4): 447-449.
- [4] 孟同凤, 何莉. 当归炮制研究初探 [J]. 陕西中医学院学报, 2001, 24(5): 52-53.
- [5] Fang L, Xiao X F, Liu C X, et al. Recent advance in studies on *Angelica sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(1): 12-25.
- [6] 潘媛媛, 廖克俭, 戴跃玲. 微波发提取当归中阿魏酸的工艺研究 [J]. 辽宁化工, 2008, 37(10): 650-654.
- [7] 丁毅. 炮制对当归挥发油及多糖的影响 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(8): 496-497.
- [8] 李加林, 刘霞, 刘胜. 微波辅助提取当归多糖的工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(34): 16573-16574.
- [9] 肖焕, 冯倩茹, 区炳雄. 当归不同炮制工艺的比较 [J]. 中药材, 2012, 35(8): 1227-1229.
- [10] Lao S C, Li S P, Kan K K W, et al. Identification and quantification of 13 components in *Angelica sinensis* (Danggui) by gas chromatography-mass spectrometry coupled with pressurized liquid extraction [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 526: 131-137.
- [11] 金汝城, 李贵文, 马素丽. 当归多糖制备工艺的研究 [J]. 中成药, 2007, 29(8): 1146-1150.
- [12] 滕菲, 张学兰, 张坤. 正交试验法优选酒当归的炮制工艺 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(1): 215-217.
- [13] 龙全江, 苏丹. 多指标综合评分法优选当归饮片酒炙工艺 [J]. 甘肃中医学院学报, 2011, 28(4): 64-66.