

川芎中活性成分的提取工艺建立与综合评判

魏玉平¹, 刘俊¹, 王永富¹, 石兴明¹, 陈大军¹, 任天池^{2*}

(1. 北京军医学院, 北京 100071; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

川芎, 历来被誉为治疗头部疾病的圣药, 广泛用于头痛、中风等疾病的治疗, 具有显著疗效。川芎的活性成分有以藁本内酯、川芎内酯为主的苯酞类, 以川芎嗪为代表的生物碱类, 以阿魏酸为代表的有机酸类。其中苯酞类成分与川芎的镇静作用相关, 川芎内酯有明显的强心、增加冠脉流量等作用, 川芎嗪在临床上用于治疗脑血栓、偏头痛及脑外伤综合征, 阿魏酸已作为治疗偏头痛的药物用于临床。因此, 本实验在建立藁本内酯、川芎内酯定量基础上, 本着中药“多靶点多部位有效部位群”理论, 对川芎提取工艺进行了研究。

1 材料与仪器

川芎购于四川都江堰市徐渡乡国家 GAP 示范基地, 经成都中医药大学鉴定教研室严铸云博士鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 符合《中华人民共和国药典》2000 年版一部的要求。藁本内酯、川芎内酯对照品为自制, 纯度分别为 97.0%、99.0%, 并经解放军总后卫生部药品仪器检验所检测, 两者均不稳定, 对光、氧敏感, 封存于充氮容器中避光保存于 -20℃ 冰箱内。阿魏酸(批号: 0773-9607)、川芎嗪(批号: 0817-9502)对照品购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 提取液的制备

2.1.1 水煎法: 将 500 g 川芎粗粉加 6 倍量水煎煮 2 次, 每次 60 min, 提取液减压浓缩至 500 mL。

2.1.2 回馏法: 将 500 g 川芎粗粉加 6 倍量 80% 乙醇回馏 2 次, 每次 60 min, 回馏液减压回收至 500 mL。

2.1.3 渗漉法: 将 500 g 川芎细粉用 6 倍量 80% 乙醇渗漉, 渗漉液减压回收至 500 mL。

2.2 标准曲线的制备

2.2.1 藁本内酯、川芎内酯标准曲线的制备: 分别精密称取藁本内酯、川芎内酯 10.25、9.16 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。分别精密吸取 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 分别吸取 2、

4、6、8、10、12、14 μL 进样。色谱条件为色谱柱 Kromasil KP100-5 C_{18} 分析柱 (150 mm \times 4.6 mm), 甲醇-1.2% 醋酸水溶液 (55:45) 为流动相, 检测波长为 280 nm, 以峰面积 (Y) 对进样量 X (μg) 回归, 得回归方程, 藁本内酯的回归方程: $Y = 848\ 904\ 247 X - 0\ 876\ 862\ 7$, $r = 0\ 999\ 99$; 川芎内酯的回归方程: $Y = 1\ 028\ 547\ 3 X + 2\ 230\ 245\ 5$, $r = 0\ 999\ 99$ 。藁本内酯量在 0.164~1.148 μg 与峰面积呈良好的线性关系。川芎内酯量在 0.146~1.026 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.2 川芎嗪工作曲线的制备: 精密称取川芎嗪对照品 4.9 mg, 溶于 50 mL 甲醇溶液中。分别取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL 溶液于 10 mL 量瓶, 并加甲醇至刻度, 分别取 5 μL 进样。采用反相色谱法, 色谱条件: Shim-Pack CLC-ODS (150 mm \times 6.0 mm) 柱, 甲醇-水-0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) (150:150:50) 为流动相, 检测波长为 292 nm, 以峰面积 (Y) 对进样量 X (μg) 回归得方程: $Y = 7\ 807\ 13 X - 38\ 385\ 38$, $r = 0\ 989\ 8$ 。

2.2.3 阿魏酸工作曲线的制备: 精密称取阿魏酸对照品 2.45 mg, 溶于 100 mL 甲醇溶液中。分别取 2、4、6、8、10、12、14 μL 进样。色谱条件: NaV a C_{18} 色谱柱, 甲醇-5% 醋酸溶液 (25:75) 为流动相, 检测波长为 320 nm, 以峰面积 (Y) 对进样量 X (μg) 回归作图, 得回归方程: $Y = 3\ 018\ 023\ 41 X - 44\ 124\ 43$, $r = 0\ 991\ 8$ 。

2.3 供试品溶液的制备: 分别取 3 种方法的提取液各 50 mL, 分别用 200 mL 石油醚萃取 2 次, 回收石油醚, 残渣置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 并加至刻度, 经 Millipore 样品过滤器滤过, 用于测定藁本内酯、川芎内酯。分别取 3 种方法的提取液各 50 mL, 调 pH 值 1.5~2.0, 分别用 200 mL 石油醚 (80:80:40 mL) 萃取 3 次, 母液用 NaOH 调节 pH 8.5~9.0, 用 200 mL 石油醚 (80:80:40 mL) 萃取 3 次, 向萃取液滴加浓 HCl 至 pH 值为 2, 回收石油醚, 残渣

* 收稿日期: 2004-03-05

作者简介: 魏玉平, 女, 甘肃兰州人, 药剂学讲师, 博士研究生, 主要从事中药速效制剂和静注脂肪乳的开发研究。

Tel: (010) 66937199 E-mail: amylywyp@eyou.com

置 40 mL 量瓶中,用甲醇溶解,并加至刻度,经 Millipore 样品过滤器滤过,用于测定川芎嗪。分别取 3 种方法的提取液各 50 mL,调 pH 值为 2,分别用 200 mL 石油醚萃取 2 次,母液用醋酸乙酯 400 mL 萃取 2 次,回收醋酸乙酯至干,残渣置 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解,并加至刻度,经 Millipore 样品过滤器滤过,用于测定阿魏酸。

2.4 提取方法的比较:将各供试品溶液按照各成分的标准曲线下条件进行测定,结果见表 1。

2.5 综合评判方法的确立:将各成分的权重定为表 1 不同提取方法对提取效果的影响

Table 1 Effect of various methods on extraction

方法	藁本内酯 (mg · g ⁻¹)	川芎内酯 (mg · g ⁻¹)	川芎嗪 (mg · g ⁻¹)	阿魏酸 (mg · g ⁻¹)
水煎法	2 267 1	1 587 6	0 402 8	0 189 3
回馏法	5 478 6	2 785 2	1 145 8	0 212 4
渗漉法	9 987 6	3 988 7	2 128 9	0 318 4

表 2 U₉(9⁶)均匀设计结果 (n= 3)

Table 2 Result of U₉(9⁶) uniform design (n= 3)

试验号	A 乙醇体积分数/%	B 浸泡时间/h	C 溶媒用量/倍	X/(mg · g ⁻¹)	Y/(mg · g ⁻¹)	Z/(mg · g ⁻¹)	W/(mg · g ⁻¹)	G
1	55	24	7.0	9 939 7	3 988 9	0 456 7	0 263 8	0 408 9
2	60	48	6.0	10 297 3	4 132 5	1 542 7	0 222 3	0 560 4
3	65	18	5.0	10 697 6	4 277 0	2 098 6	0 469 2	0 727 2
4	70	42	4.0	7 469 6	2 997 7	3 147 2	0 410 4	0 678 8
5	75	12	7.5	9 127 5	3 663 0	0 638 4	0 560 4	0 600 9
6	80	36	6.5	10 567 2	4 240 8	2 506 4	0 462 5	0 753 9
7	85	6	5.5	15 200 1	6 101 2	2 081 9	0 338 8	0 816 5
8	90	30	4.5	12 523 3	3 338 8	2 354 9	0 439 2	0 725 8
9	95	54	8.0	10 516 8	4 220 6	0 446 3	0 169 5	0 456 9

根据均匀设计本身具有的特性,最优的实验结果离优化结果相差不远,由表 2 可知 7 号试验为优化组合。方程表明乙醇体积分数对提取效果影响最大,体积分数越高提取效果越好,浸泡时间影响不大,溶媒用量在选定范围内越少越好,考虑到生产实际,将最优试验条件定为:用 4 倍量的 90% 乙醇将药粉浸泡 12 h 后渗漉提取,将该试验和 7 号试验平行进行,结果良好,见表 3。

表 3 对比实验 (n= 3)

Table 3 Comparative experiment (n= 3)

组别	A/%	B/h	C/倍	X/(mg · g ⁻¹)	Y/(mg · g ⁻¹)	Z/(mg · g ⁻¹)	W/(mg · g ⁻¹)	G
优化试验	85	6	5.5	14 796 8	6 127 8	2 091 6	0 336 7	0 968 0
最优试验	90	12	4	15 812 4	6 225 4	2 176 9	0 339 6	1

3 讨论

3.1 在不同条件下各类有效成分的提取效果具有较大差异,这就说明以某一指标成分来评价提取工

0.25,确定出综合评判公式。

$$G = 0.25 \times X / X_{\max} + 0.25 \times Y / Y_{\max} + 0.25 \times Z / Z_{\max} + 0.25 \times W / W_{\max}$$

式中 X、Y、Z、W 分别为川芎中藁本内酯、川芎内酯、川芎嗪、阿魏酸的提取率(mg/g)

对表 1 数据进行处理,3 种方法 G 值顺序为:渗漉法> 回馏法> 水煎法,渗漉法提出的各成分量远高于回馏法和水煎法,故确定提取川芎为渗漉法。

2.6 提取条件筛选:以藁本内酯、川芎内酯、川芎嗪、阿魏酸提取率为指标,以乙醇为溶媒,选择影响渗漉的主要因素乙醇体积分数、浸泡时间、溶媒用量,各因素设计 9 个水平,选用 U₉(9⁶)表安排实验(表 2),筛选最佳渗漉条件,测定各实验结果的提取率和 G 值,结果见表 2。将 G 值运用 SAS 软件进行处理,结果 G = 0.887 178 + 0.006 329 A - 0.005 370 B - 0.092 689 C, P = 0.0367 < 0.05,方程有意义。

艺均会失之偏颇,甚至得出错误的结论。如以川芎嗪为指标,4 号工艺较为合理,而按川芎嗪的药理活性折算,人每日需服用川芎 3~ 4 kg,表明该指标不合理。

3.2 藁本内酯、川芎内酯、川芎嗪、阿魏酸在高体积分数乙醇中均有良好的溶解性,藁本内酯对热不稳定,用高体积分数乙醇渗漉的动态溶媒置换提取方法可尽可能多地提出以上 4 种成分,溶媒用量少可减少因回收温度和长时间受热对苯酞类成分的影响。

3.3 藁本内酯、川芎内酯、川芎嗪、阿魏酸是川芎中非常重要的活性成分,其提取率的综合评判方法可用于 GAP 基地药材的质量评价。

3.4 苯酞是川芎最主要的活性部位,具有含量高(2%~ 3%),活性强(人日用量仅 40~ 50 mg)的特点,苯酞中川芎内酯是川芎区别于当归和道地川芎的主要成分,在评价川芎药材方面具有重要意义。