

川芎的超临界 CO₂ 萃取-大孔树脂吸附工艺的研究

张 军¹, 王风云², 詹丽玲¹, 黄秀红², 曾丽云¹, 赖小平¹

(1. 广州中医药大学 新药开发中心, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510405)

川芎含有藁本内酯等挥发油、川芎嗪等生物碱、阿魏酸等酚类成分。由于药材中阿魏酸的热不稳定性, 采用水蒸气蒸馏工艺提取挥发油, 可导致阿魏酸在长时间加热提取过程中的损失; 采用醇提工艺, 不仅提取得膏率高, 影响制剂载药量, 而且在药材提取液回收乙醇过程中, 可导致部分挥发油随溶剂蒸发, 降低了挥发油保留率。超临界 CO₂ 萃取工艺提取低极性、挥发性成分的同时, 又不破坏药渣中的热不稳定性成分。对川芎药材进行超临界 CO₂ 萃取后, 萃取药渣中仍有大量阿魏酸和高极性成分。因此本实验以阿魏酸的保留率和川芎药材的 HPLC 图谱主峰为指标, 考察超临界 CO₂ 萃取工艺所得药渣的醇提-大孔树脂精制工艺, 以达到“去粗存精”, 有效富集有效部位, 提高制剂载药量的目的。

1 仪器与试剂

Dionex Summit 高效液相色谱仪, 5 L—SFE 超临界 CO₂ 萃取装置(广州市轻工研究所); F 型大孔吸附树脂(西安蓝深公司); 阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0773-9910); 川芎药材购于广州市药材公司, 由本校赖小平教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎; 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Phenomenex C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm); 流动相: 乙腈-0.12% 磷酸溶液梯度洗脱, 60 min 内 (10:90)→(90:10); 检测波长: 280 nm; 体积流量: 1.0 mL/min。

2.2 标准曲线的制备: 精密称取阿魏酸对照品 6.08 mg, 用甲醇溶解, 定容于 100 mL 量瓶中。精取 2.0 mL, 以甲醇定容至 5.0 mL, 按照上述色谱条件, 分别进样 1、2、4、8、12、20、30 μL, 记录峰面积。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得回归方程: $Y = 4\,755.8 X - 21.142$, $r = 0.999\,9$, 线性范围为 0.024 32~0.729 6 μg。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 超临界萃取浸膏供试品溶液制备: 取萃取浸膏(超声混匀)样品约 1 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 超临界萃取药渣供试品溶液制备: 取萃取药渣约 1 g, 精密称定, 加 70% 乙醇 50 mL, 称定质量, 50 ℃ 水浴温浸 1 h, 回流提取 1 h, 放冷, 补足质量, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.3 大孔吸附树脂精制物供试品溶液制备: 取川芎超临界萃取药渣精制干燥物约 1.0 g, 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解, 稀释至刻度, 即得。

2.4 超临界 CO₂ 萃取工艺: 取川芎药材细粉 500 g, 装入超临界 CO₂ 萃取罐, 25 MPa、60 ℃ 提取 1.5 h^[1~3], 得浸膏 40.2 g, 制备供试品溶液, HPLC 法测定阿魏酸质量浓度。结果浸膏中阿魏酸质量分数为 0.36%, 折合药材中阿魏酸质量分数为 0.029%, 阿魏酸提取率为 25.0%; 萃取药渣中阿魏酸质量分数为 0.085%, 提取率为 73.9%。提示川芎药材超临界 CO₂ 萃取药渣中仍有 70% 以上的阿魏酸及 HPLC 图谱中高极性成分未被超临界工艺提取。

2.5 药渣的大孔树脂精制工艺

2.5.1 上柱液的制备: 取药渣适量, 以 40% 乙醇 8 倍量回流提取 3 h^[4,5], 滤过, 减压浓缩至无醇味, 以水定容至 (1:5), 即得。

2.5.2 动态吸附的考察: 取已预处理的 F 型大孔树脂 9 g, 湿法装柱 (30 cm×2 cm), 溶液以 1 mL/min 的速度上柱, 试管收集过柱流出液, 每 25 mL 一管, 收集 16 管, 测定其中阿魏酸的质量浓度计算未吸附率, 绘制动态吸附曲线, 见图 1。可见从第 10 管以后, 阿魏酸泄漏量开始显著增大, 说明树脂柱开始不能完全吸附药液中的阿魏酸, 确定 0~250 mL 药液为基本吸附区域。为了阿魏酸保留完全, 250 mL 作为最大上样量, 相当于最大上样量以阿魏酸计为 3.008 mg/g 干树脂, 以阿魏酸在药材中的质量分数为 0.3% 计, 相当于最大上样量以药材计为

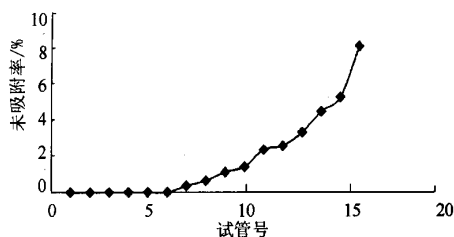


图 1 阿魏酸的动态吸附曲线

Fig. 1 Dynamic adsorption curve of ferulic acid

1.0 g/g 干树脂。

2.5.3 洗脱溶媒种类的考察:按实验确定的最大上样量上柱后,水洗至糖的反应为阴性,分别以 4 倍柱体积 20%、40%、60%、80%、95%乙醇洗脱树脂柱,收集洗脱液,测定其中阿魏酸的质量浓度,并按公式洗脱率=阿魏酸质量浓度×洗脱液体积/上柱液中阿魏酸质量×100%,计算洗脱率,结果见表 1。结果表明,80%乙醇可将 99%以上的阿魏酸洗脱下来,因此确定以 80%乙醇为洗脱溶媒。

表 1 不同溶媒对阿魏酸的洗脱

Table 1 Elution rate of ferulic acid in various solvent

溶 媒	阿魏酸/(mg · mL ⁻¹)	洗脱率/%
20%乙醇	0.033	24.4
40%乙醇	0.052	38.5
60%乙醇	0.043	31.5
80%乙醇	0.007	5.2

2.5.4 洗脱溶媒用量的考察:按实验确定的最大上样量上柱后,水洗至糖的反应为阴性,分别以 8 倍柱体积 80%乙醇洗脱树脂柱,收集洗脱液,每 1 倍柱体积 1 份,测定其中阿魏酸的质量浓度,计算洗脱率,结果见表 2。结果表明,4 倍柱体积 80%乙醇可洗脱 95%以上吸附的阿魏酸,因此确定以 4 倍柱体积 80%乙醇为洗脱溶媒。

表 2 不同用量 80%乙醇对阿魏酸的洗脱率

Table 2 Elution rate of ferulic acid in different volume of 80% alcohol

序 号	阿魏酸/(mg · mL ⁻¹)	洗脱率/%
1	0.058	35.7
2	0.051	31.0
3	0.023	14.1
4	0.013	7.85
5	0.008	4.63
6	0.005	2.81
7	0.003	1.76
8	0.001	1.24

2.6 过柱工艺的重复试验:取川芎药渣 500 g,加 8 倍量 40%乙醇,回流提取 3 h,滤液减压浓缩至无醇味,以水定容至 3 000 mL;药液上大孔吸附树脂柱,水洗至多糖的反应为阴性后,以 4 倍柱体积 80%乙

醇洗脱,合并洗脱液,回收乙醇,减压干燥,称定质量,结果阿魏酸的得率为 0.98%。取精制产物 1.0 g,精密称定,测定其中阿魏酸的质量分数,结果阿魏酸的过程保留率为 98.2%(过程保留率为上柱液中阿魏酸的质量与乙醇洗脱液干膏中阿魏酸的质量比)。

3 讨论

以本实验确定的工艺路线,萃取浸膏与醇提精制物合并后,与川芎药材 HPLC 图谱主峰基本一致(图 2),阿魏酸保留率达 90%以上;同时该联合工艺得膏率为 10%以下,大大低于传统水提或醇提工艺的得膏率(30%以上),从而达到保留药材中有效成分,去除杂质,提高制剂载药量的目的。

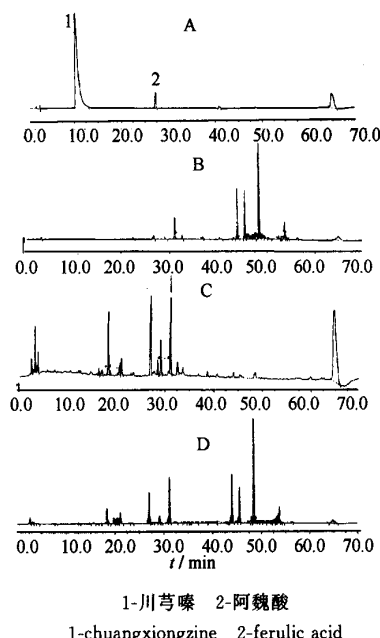


图 2 对照品(A)、萃取浸膏(B)和药渣精制产物(C)、川芎药材(D)的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substance (A), extract (B), residual fined extract (C), and chuanxiong (D)

References:

- [1] Zhang H, Liu Z L, Wang H Q. Studies on extraction of active ingredients from *Ligusticum chuanxiong* by supercritical fluid extraction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (12): 1077-1079.
- [2] Yuan Y F, Zhou J, Zheng X M, et al. Studies on volatile oil in *Ligusticum chuanxiong* by supercritical fluid extraction [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2000, 35 (2): 84.
- [3] Chen X L, Li L. Comparison of volatile oil from 4 kinds of herbs by steam distillation and supercritical fluid extraction [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26 (6): 440-443.
- [4] Yang G D, Liang M J, He L C, et al. Solvent extraction methods of ferulic acid in *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24 (6): 418-420.
- [5] Zhao L L, Xia X H. Study on alcohol extraction process of *Rhizoma Chuanxiong* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24 (3): 173-174.