

注射用川芎提取物提取纯化方法的优选

初 阳^{1,2}, 宋洪涛^{1*}, 李 丹³, 鄢 璐³, 刘 丹³, 陈大为³

(1. 南京军区福州总医院 药学科, 福建 福州 350025; 2. 中国医科大学附属第一医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110001;
3. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 优选注射用川芎提取物的提取纯化方法。方法 以阿魏酸提取率为考察指标, 优选提取工艺; 以阿魏酸的转移率、杂质的清除效果和提取物的复溶性作为考察指标, 应用大孔吸附树脂和聚酰胺吸附法对川芎提取物进行纯化, 优选纯化条件。结果 以 70% 乙醇回流提取 2 次, 阿魏酸提取率较高; 将大孔吸附树脂法和聚酰胺吸附法联合使用纯化川芎提取物, 阿魏酸的转移率可达 90.3%, 杂质清除效果和提取物复溶性良好。结论 以 70% 乙醇进行提取, 大孔吸附树脂和聚酰胺吸附法联用进行纯化, 所得川芎提取物可达到注射用要求。

关键词: 注射用川芎提取物; 提取; 纯化; 阿魏酸

中图分类号: R284.2; R286.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)10-1573-04

Optimization of extraction and purification of *Rhizoma Chuanxiong* extract for injection

CHU Yang^{1,2}, SONG Hong-tao¹, LI Dan³, YAN Lu³, LIU Dan³, CHEN Da-wei³

(1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China;
2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China;
3. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To develop the extraction and purification method for the active fraction of *Rhizoma Chuanxiong* extract for injection. **Methods** The extracting technology was optimized by using the extraction rate of ferulic acid as the estimated targets. The conditions of purification were confirmed through applying the macroporous resin and polyamide with using the transferring rate of ferulic acid, scavenging effect of impurities and reconstitution of extract as the estimated indexes. **Results** The extraction rate of ferulic acid from *Rhizoma Chuanxiong* was higher with 70% alcohol as extracting solvent for twice. After the extract of *Rhizoma Chuanxiong* being purified with macroporous resin and polyamide adsorption, the transferring rate of ferulic acid was up to 90.3%, the scavenging effect of both impurities and reconstitution of extract were good. **Conclusion** The extract of *Rhizoma Chuanxiong* could meet the injection standard by using 70% alcohol as extracting solvent, then applying macroporous resin and adsorption of polyamide as purification methods.

Key words: *Rhizoma Chuanxiong* extract for injection; extraction; purification; ferulic acid

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 具有活血行气, 祛风止痛之功效, 临床上广泛用于经闭腹痛、胸胁刺痛、头痛、风湿痹痛及心脑血管疾病的治疗^[1]。川芎单方及含有川芎的复方中药注射剂已在临床进行应用^[2], 有关川芎的提取纯化工艺研究也多有文献报道^[3,4], 但是注射用川芎或川芎注射液组方药材的提取纯化生产工艺未见报道。当前中药注射剂的安全性问题日益突出, 其主要原因之一就是生产工艺方面尚存

在一些技术瓶颈没有解决。因此本实验以阿魏酸的提取率与转移率, 蛋白质、树脂、鞣质等杂质的清除率, 提取物的复溶性为指标, 对注射用川芎提取物的提取与纯化工艺进行了研究, 取得了较好结果。

1 仪器与试剂

HP 1100 型高效液相色谱系统 (包括四元泵带真空脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器, HP Chemstation 工作站), 美国 Agilent 公司; Orion Model 酸度计, 浙江省象山县石浦海天电子

* 收稿日期: 2009-02-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200363)

作者简介: 初 阳 (1980—), 女, 辽宁沈阳人, 硕士, 药师。Tel: (024) 82025903

* 通讯作者 宋洪涛 Tel: (0591) 2859459 E-mail: sohoto@vip.sohu.com

仪器厂;超声波清洗机,浙江省象山县石浦海天电子仪器厂;HPD300 型大孔树脂,沧州宝恩化工有限公司;聚酰胺,中国医药上海化学试剂公司;阿魏酸对照品(批号 0773-9910),中国药品生物制品检定所;川芎饮片(批号:080105,产地:四川灌县,福建海华药业有限公司);甲醇(色谱纯),天津市康科德科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸的 HPLC 法测定:采用前期报道的高效液相色谱法测定阿魏酸^[5]。色谱柱:Tianhe Kromacil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.5%醋酸溶液(26:74,用三乙胺调节 pH 值为 4.9);体积流量:1.0 mL/min;柱温:室温;检测波长:320 nm;灵敏度:0.01 AUFS;进样量:20 μL。

2.2 指标的规定:纯化后与纯化前的阿魏酸的质量之比即为阿魏酸的转移率。按照《中国药典》2005 年版一部附录 S 项下方法检验鞣质、蛋白质和树脂。复溶性是将提取纯化后干燥的固形物加水溶解后观察其是否澄清。

2.3 提取工艺的考察

2.3.1 川芎饮片中阿魏酸的测定:取粉碎后的川芎药材约 0.50 g,精密称定,加甲醇 20 mL,称定质量,加热回流提取 1 h,放冷,再称定质量,用上述溶液补足减失的质量,摇匀,离心。取上清液,浓缩至干,以 20 mL 50%乙醇溶解,0.45 μm 微孔滤膜滤过,测得川芎饮片中阿魏酸质量分数为 0.13%。

2.3.2 阿魏酸提取率的测定:吸取提取液适量,过 0.22 μm 微孔滤膜,精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪,测定阿魏酸的质量浓度,计算阿魏酸的提取率(提取率 = 各种提取工艺下所得阿魏酸质量分数/0.13% × 100%)。

2.3.3 提取溶剂的考察:取川芎饮片,分别加入 8 倍量水,20%、40%、60%、80%、95%乙醇加热回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,即得川芎提取物溶液。进样测定,结果见表 1。表明用 60%~80%乙醇进行提取,阿魏酸的提取率较高。

2.3.4 溶剂用量的考察:取川芎饮片,分别加入 4、8、12 倍量体积的 70%乙醇,回流提取,并进样测定,结果阿魏酸的提取率分别为 35.3%、81.6%、82.3%。说明 4 倍量体积提取,川芎药材中有效成分浸出不充分,阿魏酸提取率较低,用 8 倍量与 12 倍量体积提取,阿魏酸提取率无明显差别,说明溶剂用量并非越多越好,只要将阿魏酸充分提取即可因此取 8 倍量体积。

2.3.5 提取时间的考察:取川芎饮片,加 8 倍量体积 70%乙醇,加热回流提取,分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 进行取样,测定阿魏酸的质量浓度,计算阿魏酸的提取率,见表 2。结果表明,在回流提取 2 h 时阿魏酸的提取率最高,之后开始有所下降,用 70%乙醇回流提取时间应控制在 2 h 左右。

表 1 提取溶剂对阿魏酸提取率的影响(n=3)

Table 1 Effect of extracting solvent on extraction rate of ferulic acid (n=3)

提取溶剂	阿魏酸提取率/%
水	41.9
20%乙醇	42.7
40%乙醇	59.4
60%乙醇	75.1
80%乙醇	77.1
95%乙醇	66.5

表 2 提取时间对阿魏酸提取率的影响(n=3)

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

提取时间/h	阿魏酸提取率/%
0.5	14.4
1.0	23.9
1.5	29.1
2.0	42.0
2.5	41.4
3.0	41.0

2.3.6 提取次数的考察:取川芎饮片,加 8 倍量体积 70%乙醇,加热回流提取,分别提取 1、2、3 次,每次 2 h,提取后测定,结果提取液中阿魏酸的提取率分别为 49.9%、80.9%、85.3%。说明提取 1 次不够,提取 2 次与 3 次差别不大,从工业化生产和节约能源的角度考虑,以提取 2 次为佳。

2.3.7 正交试验设计与结果:根据预试验结果,固定提取次数为 2 次,选择 L₉(3⁴) 正交设计表安排试验,以提取时间(A)、乙醇体积分数(B)和溶剂用量(C)为考察因素,以阿魏酸提取率为考察指标,对提取工艺进行了优化。考察因素与水平见表 3,试验方案及结果见表 4,方差分析结果见表 5。试验时,先用溶剂浸泡药材 1 h,然后加热至规定温度开始计时,回流提取 2 次,其中,第二次的溶剂用量比第一次减少 2 倍,滤过分离药渣,合并滤液,测定阿魏酸质量浓度,计算阿魏酸的提取率。

表 3 因素和水平

Table 3 Factors and levels

水平	因素		
	A/h	B/%	C/倍
1	1.5	60	8
2	2.0	70	10
3	2.5	80	12

表 4 正交试验设计与结果

Table 4 Design and results of orthogonal test

试验号	因素				阿魏酸提取率/ %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	77.0
2	1	2	2	2	82.9
3	1	3	3	3	80.1
4	2	1	2	3	87.0
5	2	2	3	1	96.9
6	2	3	1	2	91.9
7	3	1	3	2	78.1
8	3	2	1	3	81.9
9	3	3	2	1	81.0
K_1	80.000	80.700	83.600	84.967	
K_2	91.933	87.233	83.633	84.300	
K_3	80.333	84.333	85.033	83.000	
R	11.933	6.533	1.433	1.967	

表 5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	P 值
A	277.076	2	46.164	$P < 0.05$
B	64.296	2	10.712	
C	4.016	2	0.669	
D	6.002	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

以提取率为考察指标,各因素对提取效果的影响程度依次为 $A > B > C$,提取时间有显著性影响。直观来看各因素的最佳水平组合为 $A_2B_2C_3$ 。

2.3.8 提取工艺的确定:根据试验结果,确定川芎提取工艺为川芎饮片用 70%乙醇浸泡 1 h,回流提取 2 h,冷却后抽滤,两次提取溶剂用量分别为 12、10 倍量,即得川芎提取液。

2.4 纯化工艺的考察

2.4.1 大孔吸附树脂纯化法:根据文献报道及前期试验结果,采用大孔吸附树脂法进行纯化^[5]。取川芎提取液减压浓缩至提取液含生药 0.1 g/mL,调节 pH 值为 3.0,上 HPD300 型大孔吸附树脂柱,大孔吸附树脂柱径高比为 1:7,树脂药材质量比为 2:1,上柱吸附流速为 2 BV/h;用 pH 3.0 的水溶液以 8 BV/h 清洗杂质,至 Molish 反应呈阴性为止,约需 3 倍床体积清洗液;然后用 50%乙醇以 8 BV/h 进行解吸附,至 HPLC 法检测不到阿魏酸的色谱峰为止,收集洗脱液,减压浓缩后真空干燥。称定质量,并精密称取适量干燥提取物,测定阿魏酸的质量分数,计算阿魏酸的转移率,同时进行蛋白质、树脂、鞣质的杂质检查,考察复溶性,结果阿魏酸转移率为 91.3% ($n=3$),鞣质呈阳性,蛋白质、树脂均呈阴性,复溶性结果为浑浊。结果表明,应用大孔树脂纯化

后,阿魏酸转移率较高,蛋白质、树脂等杂质清除效果较好,但鞣质没有除净,复溶放置后,很快出现浑浊沉淀,说明还需进一步纯化,以去除鞣质。

2.4.2 聚酰胺除鞣质的考察

聚酰胺的预处理:取聚酰胺粉(30~40目),以 95%乙醇浸泡,不断搅拌,除去气泡后装入色谱柱中,浸泡 24 h 后,蒸馏水洗至洗液透明,并在蒸干后无残渣。再依次用 4% NaOH 水溶液和醋酸水溶液浸泡 24 h,分别用蒸馏水洗至中性,室温下晾干,备用。

聚酰胺用量的考察:取川芎提取液,按大孔吸附树脂纯化法项下操作,得到的洗脱液用 95%乙醇调节乙醇体积分数至 70%。取相同体积的洗脱液,按照聚酰胺与洗脱液中川芎药材的质量比为 1:10、1:20、1:40、1:60、1:80 加入聚酰胺,暗室中摇床振荡 24 h,滤过,减压浓缩挥去乙醇,做鞣质检查。结果表明,聚酰胺与洗脱液中川芎药材的质量比为 1:60、1:80 时,鞣质无法除净,为 1:40 时,即可将鞣质全部清除。

乙醇体积分数的考察:聚酰胺除对鞣质吸附外,对中药有效部位也有一定的吸附作用,且乙醇体积分数不同,其对有效部位和鞣质的吸附能力也各不相同,因此有必要对乙醇体积分数作研究。将大孔吸附树脂纯化后的洗脱液分别用 95%乙醇调节乙醇体积分数分别为 50%、70%、90%,按照聚酰胺与洗脱液中川芎药材的质量比 1:40 加入聚酰胺,暗室中摇床振荡 24 h,滤过,作鞣质检查,并计算阿魏酸损失率,结果见表 6。

表 6 乙醇体积分数对聚酰胺纯化效果的影响 ($n=3$)

Table 6 Effect of ethanol concentration on purification with polyamide ($n=3$)

乙醇体积分数/ %	阿魏酸损失率/ %	鞣质
50	4.8	呈阴性
70	1.0	呈阴性
90	0.7	呈阴性

结果表明,聚酰胺在不同乙醇体积分数下均对鞣质有较好的吸附作用,但是在 50%乙醇条件下,阿魏酸也有部分被聚酰胺吸附,为了防止阿魏酸吸附,确定乙醇体积分数为 70%。

振荡时间的考察:由于阿魏酸稳定性较差,长时间摇床振荡,容易导致阿魏酸的降解,因此有必要对振荡时间进行考察。将大孔吸附树脂纯化后的洗脱液用 95%乙醇调节乙醇体积分数分别为 70%,分为 5 份,以聚酰胺与洗脱液中川芎药材的质量比为 1:40 加入聚酰胺,在暗室中摇床振荡,分别于 6、9、12、

15、24 h 取样,检测鞣质。结果振荡 12 h 就可以完全除净鞣质。

2.4.3 大孔树脂与聚酰胺联用纯化川芎提取物的重现性试验工艺确定:取川芎提取液,按大孔吸附树脂纯化法项下操作,得到的洗脱液用 95%乙醇调节乙醇体积分数至 70%,按照聚酰胺与洗脱液中川芎药材的质量比为 1:40 加入聚酰胺,暗室内摇床振荡 12 h,滤过,减压浓缩后真空干燥,称定质量。精密称取适量干燥提取物,测定阿魏酸的体积分数,结果固体物中阿魏酸的体积分数为 4.7%,阿魏酸的转移率为 90.3% (n=3),鞣质、蛋白质、树脂均呈阴性,复溶性试验结果为澄清。表明大孔吸附树脂法与聚酰胺振荡吸附法联合使用,各项检查指标均能达到中药注射剂的技术要求,可以确定为纯化注射用川芎提取物的最终工艺。

2.5 川芎药材与川芎提取纯化物的指纹图谱比较: Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm), ODS C₁₈ 保护柱(4.0 mm ×3.0 mm); 流动相: 乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B); 线性梯度洗脱: 0~60 min, 5%~100% A; 检测波长: 280 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25; 进样量 10 μL; 色谱记录时间为 60 min。分别记录川芎药材与川芎提取纯化物的指纹图谱,见图 1。可以看出,川芎提取物经纯化后,杂质峰大大减少,阿魏酸的纯度得到了提高。

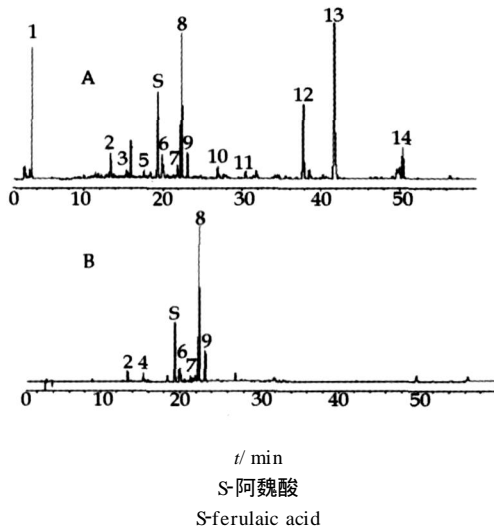


图 1 川芎药材(A)和提取纯化物(B)的指纹图谱特征峰
Fig 1 Characteristic absorption peak of fingerprint of Rhizoma Chuanxiong (A) and purified extract (B)

3 讨论

大孔吸附树脂法是纯化中药材提取物的有效方法,实验结果表明,采用大孔吸附树脂吸附川芎提取物后,用酸水清洗时可将蛋白质、多糖、树脂等杂质一步除净,但鞣质与大孔吸附树脂结合较紧密,不易被清洗下来。当用不同体积分数乙醇作为洗脱溶剂时,发现乙醇体积分数越高,阿魏酸的解吸率和解吸速率越高,但原来吸附在树脂上的鞣质也被一同洗脱下来,降低乙醇体积分数,阿魏酸的解吸率降低,解吸速率显著下降,因此,本实验采用 50%乙醇作为洗脱溶剂,既可保证有效成分较高的解吸率与解吸速率,又可减少鞣质等杂质的洗脱量,但不能完全去除鞣质。文献报道,聚酰胺对鞣质具有极强的吸附能力,可用于注射剂中鞣质的清除^[6],但无法去除蛋白质、多糖等杂质。因此,本实验采用了大孔树脂与聚酰胺吸附联用的方法,对大孔吸附树脂纯化后的川芎提取物,进一步采用聚酰胺吸附的方法去除鞣质,在优化条件下,阿魏酸的损失量极小,而鞣质可被清除。

本实验以 70%乙醇作为提取溶剂,回流提取 2 次,每次 2 h,两次提取溶剂用量分别为 12、10 倍量,可使阿魏酸提取率达到 96% 以上。将大孔吸附树脂法和聚酰胺吸附法联合使用进一步纯化,阿魏酸的转移率可达 90.3%,并清除了蛋白质、多糖、树脂、鞣质等杂质,最终得到的提取物具有良好的复溶性。从而在富集有效成分的同时最大限度去除了杂质,保证了注射用川芎提取物的质量,满足了中药注射剂的技术要求。

参考文献:

- [1] 许 惠. 中药川芎应用与提取工艺的发展研究[J]. 重庆工商大学学报:自然科学版, 2005, 22(3): 233-236.
- [2] 朱永宏,李认书. 心血管类中药注射剂品种分析[J]. 中草药, 2007, 38(10): 附 7-附 8.
- [3] 蔡翠芳,唐 星,李积军. 川芎中阿魏酸的提取纯化工艺[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(1): 70-72, 76.
- [4] 洪燕龙,徐德生,冯 怡,等. 川芎中含阿魏酸效应组分的提取、纯化工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(17): 1740-1743.
- [5] 初 阳,宋洪涛,李 丹,等. 应用大孔吸附树脂纯化川芎有效部位[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(6): 365-370.
- [6] 黄先丽,王晓静. 聚酰胺在药物提取分离中的应用[J]. 齐鲁药事, 2008, 27(6): 359-361.