

## 均匀设计法优选川芎中阿魏酸和总酚酸的提取工艺

李文兰, 范玉奇, 季宇彬, 王艳萍, 赵瑛 (哈尔滨商业大学药物研究所博士后科研工作站, 哈尔滨 150076)

**摘要:**目的 研究川芎中有效部位总酚酸和活性成分阿魏酸的最佳提取工艺。方法 选用  $U_9(9^6)$  进行均匀设计实验对总酚酸和阿魏酸的提取工艺进行优选, 以出膏率及总酚酸和阿魏酸的提取率为指标, 考察乙醇浓度、液固比、提取时间及提取次数对总酚酸和阿魏酸提取的影响。结果 得到最佳的工艺条件为: 加 12 倍量的 90% 乙醇, 提取 2 次, 每次 179 min。结论 均匀设计法是优化多因素与多水平实验的有利工具。

**关键词:** 均匀设计; 阿魏酸; 提取工艺

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)03-0198-04

### Optimization of the Extraction Conditions for Ferulic Acids and the Total Phenolic Acid from Ligusticum Shuanxiong Hort by Using Homogeneous Design

LI Wen-lan, FAN Yu-qi, JI Yu-bin, WANG Yan-ping, ZHAO Ying (Postdoctoral Research of the Institute of Materia Medica of Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the optimizing extraction conditions of the active principles, such as ferulic acids and the total phenolic acid from Ligusticum shuanxiong Hort. **METHODS** The extracting conditions was optimized by using  $U_9(9^6)$  homogeneous design. Employing the leaves the paste rate and the extracting ratio of ferulic acids and the total phenolic acids as indexes, the effects of ethanol content, the leaves the paste rate, and the time and cycles of extracting on the extracting process were investigated. **RESULTS** The most favorable conditions are: Ligusticum shuanxiong Hort was extracted in 12 times amount of 90% ethanol for 2 cycles, and every extracting times was 179 min. **CONCLUSION** Homogeneous design is a very beneficial tool for optimizing multi-factor and multi-level experiment.

**KEY WORDS:** homogeneous design; ferulic acid; extracting process

川芎是伞形科植物川芎 (*Ligusticum shuanxiong Hort.*) 的干燥根茎, 具有活血行气、祛风止痛之功效, 内含生物碱类、酚酸类、内酯类、挥发油类等多种成分<sup>[1-2]</sup>, 现代药理实验证明, 川芎对中枢神经系统、血液及心血管系统、胃功能有一定的作用和影响, 并具有解痉、抑制血小板聚集、抗癌和抗自由基作用<sup>[3]</sup>, 临床主要用于治疗脑血管疾病、肺心病、慢性肾病与肝病、神经性疼痛等。阿魏酸、川芎酚、大黄酚、香草酸、香草醛、瑟丹酸、咖啡酸、原儿茶酸、棕榈酸、对羟基苯甲酸等酚酸类成分具有抗血栓、降血脂、防治冠心病等药理活性<sup>[2]</sup>。其中阿魏酸 (ferulic acid) 具有抗动脉粥样硬化; 抗血小板凝集和血栓; 清除亚硝酸盐、氧自由基、过氧化亚硝基; 抗菌消炎; 抗肿瘤; 抗突变; 增加免疫功能、人体精子活力和运动性功能。因此, 总酚酸类尤其是阿魏酸成分是川芎的重要活性成分<sup>[4]</sup>, 筛选川芎中的总酚酸、阿魏酸的提取工艺具有一

定的药用价值和实际意义。

均匀设计作为一种以少量实验处理多因素多水平的方法, 近年来得到广泛的应用<sup>[5-6]</sup>。本实验采用均匀设计法安排实验, 选取了乙醇浓度、液固比、提取时间、提取次数 4 个因素, 优选出合理的提取工艺, 并对其结论进行了验证, 为生产工艺参数的选择提供实验数据。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 仪器、试剂与材料

Waters 高效液相色谱仪 (W2695 Separations Module, W2996 Photodiode Array Detector); 751 型紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); R-201 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); 恒温水浴锅; 真空干燥箱 (上海一恒仪器有限公司); 电子天平 (美国奥好斯科技有限公司); DPS 统计软件 (北京中农博思科技发展有限公司)。阿魏酸对照品 (中

基金项目: 课题来源: 黑龙江省科技厅攻关项目 (GC03C614-1)

作者简介: 李文兰 (1967-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药化学及药物代谢动力学。地址: 哈尔滨市通达街 138 号。电话: 0451-84800297

国药品生物制品检定所,批号:0773-9910);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为二次蒸馏水,川芎(购于哈药集团世一堂中药饮片厂,经本校鉴定教研室李学甫教授鉴定为伞形科植物 *Ligusticum shuanxiong* Hort的干燥根茎。

## 1.2 提取方法

取干燥并粉碎过60目筛的川芎,精密称定,置圆底烧瓶中,按均匀设计安排的各实验条件加入一定浓度、一定体积的乙醇,回流提取规定的次数及时间,过滤,合并滤液,用旋转蒸发器减压回收乙醇,使滤液成膏,计算得膏率。并采用紫外分光光度法及HPLC测定总酚酸和阿魏酸含量。

## 1.3 HPLC测定阿魏酸的含量<sup>[7]</sup>

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱: Symmetry C<sub>18</sub>柱(3.9 mm × 15 cm, 5 μm); 流动相: 甲醇-1%冰醋酸溶液(30:70); 流速: 1 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 323 nm; 柱温: 25℃。

**1.3.2 标准曲线的制备** 精密称取阿魏酸对照品,加甲醇制成浓度为0.09 mg · mL<sup>-1</sup>阿魏酸对照品溶液。精密吸取对照品溶液1, 2, 4, 6, 8, 10 μL在上述的色谱条件下进样分析进样,以阿魏酸进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,其回归方程为:  $Y = 4 \times 10^6 X - 1744.6$   $r = 0.9999$ 。结果表明:阿魏酸在0.09~0.9 μg范围内呈良好线性关系。色谱图见图1。

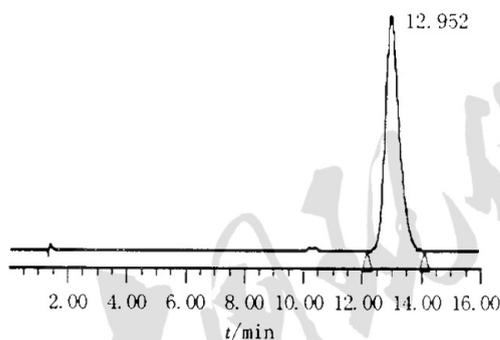


图1 阿魏酸标准品HPLC图

Fig 1 HPLC of Ferulic acid standard

**1.3.3 精密度实验** 精密吸取阿魏酸对照品溶液,连续5次进样10 μL,测定峰面积, RSD为0.17%。

**1.3.4 稳定性试验** 取同一样品溶液,分别于0, 2, 4, 6, 8, 10 h测定,以峰面积计算 RSD为1.98%,结果表明供试品溶液在10 h内稳定。

**1.3.5 回收率实验** 取已测得含量的样品溶液5份,分别与对照品标准溶液等量混合,依法测定,得平均回收率99.63%, RSD为1.10%。

**1.3.6 样品测定** 取提取的浓缩膏体适量,精密称定,用甲醇少许溶解,转移于10 mL量瓶中,定容至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤。取10 μL供HPLC分析。色谱图见图2。

**1.3.7 重复性试验** 分别取同批号样品5份,依照样品制备方法,制成供试品溶液并测定其所含阿魏酸含量,测得RSD为0.19%,结果表明本方法的重复性较好。

## 1.4 UV法测定总酚酸的含量<sup>[8]</sup>

**1.4.1 标准曲线的制备** 精密吸取阿魏酸对照品溶液中国现代应用药学杂志 2007年6月第24卷第3期

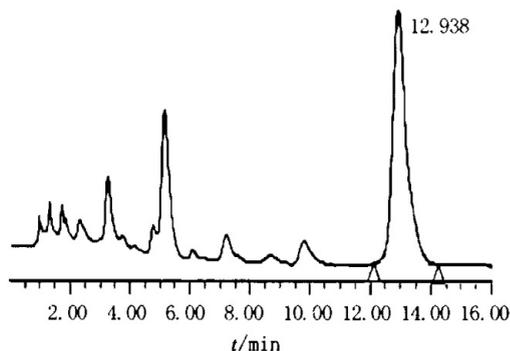


图2 川芎样品HPLC图

Fig 2 HPLC of Ligusticum shuanxiong hort sample

(0.09 mg · mL<sup>-1</sup>) 0, 1, 2, 4, 6, 8, 1.0 mL, 注入10 mL量瓶中,加甲醇至2 mL,加0.3%十二烷基硫酸钠0.8 mL, 0.6%三氯化铁-0.9%铁氰化钾(1:0.9)混合液0.4 mL混匀,在暗处放置5 min,加0.1 mol · L<sup>-1</sup>盐酸溶液至刻度,摇匀,在暗处放置20 min,以显色剂为空白,在720 nm波长下测定吸光度。以阿魏酸的浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得回归方程为  $Y = 0.2388X + 0.0223$   $r = 0.9997$ ,结果表明阿魏酸在0.9~9 μg · mL<sup>-1</sup>范围内呈良好线性关系。

**1.4.2 精密度实验** 精密吸取阿魏酸对照品溶液,按照‘标准曲线的制备’项下操作,连续5次测定相同浓度溶液的吸光度, RSD为2.09%。

**1.4.3 稳定性试验** 取同一样品溶液,分别于0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min测定吸光度,计算以阿魏酸计的总酚酸类成分含量,结果表明:30 min内 RSD为2.57%,30 min以后吸光度随供试品溶液放置时间的延长而逐渐减少,差异较大;因此,供试品溶液在30 min内稳定。

**1.4.4 回收率实验** 取已测得含量的样品溶液5份,分别与对照品标准溶液等量混合,依法测定,得平均回收率99.6%, RSD为1.19%。

**1.4.5 样品测定** 取川芎浓缩膏体适量,精密称定,用20 mL pH 10~11的氨水溶解,盐酸调pH 2~3用乙酸乙酯萃取3次(30, 20, 20 mL),取乙酸乙酯层减压浓缩至干,用少许甲醇溶解,转移于10 mL量瓶中,定容至刻度,摇匀,作为样品溶液。按照‘标准曲线的制备’项下操作,计算以阿魏酸计的总酚酸类成分含量。

**1.4.6 重复性试验** 分别取同批号样品5份,依照样品制备方法,制成供试品溶液并测定其所含总酚酸含量,测得RSD为2.41%,结果表明本方法的重复性较好。

## 2 结果

### 2.1 提取溶剂的选择

阿魏酸是一种羟基肉桂酸的衍生物,化学名称为4-羟基-5-甲氧基苯丙酸,分子式C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>,分子量192.30可溶于水、乙醇及乙酸乙酯,尚易溶于乙醚,微溶于石油醚和苯,本实验考虑实际生产的需要,选择乙醇溶剂进行提取。

**2.2 提取条件对川芎中有效部位总酚酸和活性成分阿魏酸的影响**

根据预实验结果,选择对提取率影响较大的乙醇浓度

( $X_1$ )液固比( $X_2$ )提取时间( $X_3$ )及提取次数( $X_4$ )为因素进行了4因素9水平的均匀设计实验。因素水平见表1。

表1 因素水平表

Tab 1 Factors of the experiment

序号	乙醇浓度 ( $X_1$ )	液固比 ( $X_2$ )	提取时间 ( $X_3$ )/min	提取次数 ( $X_4$ )
1	10%	4:1	60	1
2	20%	5:1	75	2
3	30%	6:1	90	3
4	40%	7:1	105	1
5	50%	8:1	120	2
6	60%	9:1	135	3
7	70%	10:1	150	1
8	80%	11:1	175	2
9	90%	12:1	180	3

### 2.3 均匀设计试验结果及数据处理与分析

采用 $U_9(9^6)$ 均匀设计,以阿魏酸和总酚酸类成分得率作为评价指标,同时参考得膏率,筛选川芎乙醇回流提取的最佳条件。结果见表2。

表2  $U_9(9^6)$ 均匀设计试验结果

Tab 2 The results of  $U_9(9^6)$  Homogeneous design

序号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	得膏率 (%)	阿魏酸含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	总酚酸含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
1	10%	5:1	105	3	36.24	0.845	3.921
2	20%	7:1	165	2	34.98	0.796	4.032
3	30%	9:1	90	1	27.41	0.762	3.747
4	40%	11:1	150	1	24.22	0.812	9.163
5	50%	4:1	75	3	33.79	1.164	9.441
6	60%	6:1	135	2	25.02	0.856	9.118
7	70%	8:1	60	2	37.74	1.012	11.165
8	80%	10:1	120	1	28.19	1.214	11.381
9	90%	12:1	180	3	34.44	1.345	14.994

2.3.1 阿魏酸的工艺筛选 由DPS统计软件处理数据,求得10余个逐步回归方程,根据各回归方程的回归系数、F值及其显著性检验,结合试验原理和经验,选出优化方程为: $Y = 11.014 + 6.102X_1 + 2.226X_2 - 0.56X_3 - 0.56X_4$ ,最高指标时各个因素组合: $X_1 = 0.9; X_2 = 11.99; X_3 = 179.25; X_4 = 1.00$ ,显著水平 $P = 0.005$ ,统计量值 $F = 16.5$ ,相关系数 $R = 0.953$ ,调整后的相关系数 $R = 0.9236$ ,表明方程拟和度良好,因素显著。由上述数据得,以阿魏酸提取率为指标,最佳醇提工艺为:90%乙醇浓度,液固比为12倍量,提取时间179 min,提取1次。

2.3.2 总酚酸类成分的工艺筛选 由DPS统计软件处理数据,求得10余个逐步回归方程,根据各回归方程的回归系数、F值及其显著性检验,结合试验原理和经验,选出优化方程为: $Y = -486.029 + 292.928X_1 + 435.37X_2 + 3.446X_3^2 - 62.807X_4^2 - 17.749X_2X_4$ ,最高指标时各个因素组合: $X_1 = 0.9; X_2 = 12; X_3 = 178.52; X_4 = 1.77$ ,显著水平 $P = 0.0012$ ,统计量值 $F = 122$ ,相关系数 $R = 0.9976$ ,调整后的相关系数 $R = 0.$

9935,表明方程拟和度良好,因素显著。由上述数据得,以总酚酸提取率为指标最佳提取工艺为:90%乙醇浓度,液固比为12倍量,提取时间179 min,提取2次。

2.3.3 综合工艺筛选 以阿魏酸和总酚酸类成分的含量为评价指标,两者工艺在乙醇浓度、液固比、提取时间完全相同,提取次数以多者为计,综合筛选得川芎的最佳提取工艺为:90%乙醇浓度,液固比为12倍量,提取时间179 min,提取2次。

### 2.4 优选工艺条件的验证试验

按上述筛选的川芎最佳提取工艺进行验证实验:取川芎粗粉50 g,以12倍量的90%乙醇回流提取2次,每次179 min。回收乙醇,60℃真空干燥。结果:平均得膏率为33.33%,阿魏酸平均含量 $1.383 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,总酚酸平均含量 $14.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,RSD为1.64% ( $n = 3$ )。较前9次的试验结果都好,验证结果与均匀设计试验预测结果基本接近,验证的本实验筛选的提取工艺稳定、可行。

## 3 结论

3.1 均匀设计法是一种多因素与多水平实验的设计方法,可减少实验次数,定量的预测优化条件和结果,具有方便、适用、预测性好的特点,是优化提取工艺一个非常有利的工具。

3.2 阿魏酸和总酚酸类成分的含量为评价指标,川芎最佳提取工艺条件为:采用12倍量的90%乙醇回流提取2次,每次179 min。在该工艺条件下,川芎的出膏率为33.33%,阿魏酸含量 $1.383 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,总酚酸含量 $14.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

## 4 讨论

4.1 川芎中所含酚酸类成分专属性较强,其中阿魏酸是川芎中具有代表性的活性成分。故以阿魏酸为指标,筛选川芎的提取工艺。

4.2 阿魏酸在80℃以上就会发生分解反应,其总酚酸类成分在高温下也不稳定,因此在提取及减压浓缩的过程中要控制好温度,尽量使其保持在较低温度下操作。

4.3 采用铁氰化钾-三氯化铁等试剂显色后比色法测定,反应时间和放置时间对吸光度的影响较明显,故应严格加以控制,注意空白液、对照品溶液、样品溶液加入各种试剂及测定时间的一致性。还应当对实验室温度加以控制,以20℃为宜,如温度过高,则应当适当缩短显色反应放置的时间。

## 参考文献

- [1] YONG Q, LI Li, YOU X L. Studies on Chemical Constituents of the Rhizome of Ligusticum chuanxiong. China Journal of Chinese Materia Medica, 2002, 27(7): 519-522.
- [2] WANG W X, GU M, JIANG X G, et al. Studies on Chemical Constituents of the Rhizome of Ligusticum chuanxiong. Chinese herb medicine, 2002, 33(1): 4-5.
- [3] BAO X. Advances in the recent study of pharmacological effects of Ligusticum chuanxiong [J]. Sichuan J Physiol Sci (四川生理科学杂志), 2000, 22(2): 15-16.
- [4] OU S Y, BAO H Y, LAN Z D. Progress in pharmacological effects of fonic acid and its derivants [J]. J Chin Med Mater (中药材),

2001, 24(3): 220-221.

- [ 5 ] FANG K T. Uniform design and Uniform design table[ M ]. Beijing: Scientific publisher, 1994. 149.
- [ 6 ] YUAN H L, TAN R, LI X Y, *et al.* Optimum conditions of extraction process of Schizandra by uniform-design [ J ]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2002, 27(5): 355.
- [ 7 ] WANG W X, ZHOU Q X, GU M. Effects of different control samples on content determination of total phenolic acid in Xiong-

shao capsules. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2001, 23(7): 536-537.

- [ 8 ] WANG W X, GU M, XU X Y. Selection of optimum extraction process for phenolic part of Rhizoma Ligustici Chuanxiong by orthogonal design[ J ]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2000, 22(5): 325-327.

收稿日期: 2006-09-25