

川芎总酚酸提取工艺的优化

蒲忠慧^{1,2}, 彭永珍¹, 彭 成^{1*}, 刘 娟¹, 熊 亮^{1*}, 李文兵³
(1. 成都中医药大学药学院, 教育部中药材标准化重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137; 2. 绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川 绵阳 621006; 3. 四川新绿色药业科技发展股份有限公司, 四川 彭州 610031)

摘要: 目的 优化川芎总酚酸提取工艺。方法 以乙醇体积分数、液料比、超声时间为影响因素, 总酚酸含量为评价指标, 星点设计-响应面法优化提取工艺。**结果** 最佳条件为 13 倍量 65% 乙醇超声提取 2 次, 每次 55 min, 总酚酸含量 43.46 mg/g。**结论** 该方法简便可行, 稳定可靠, 可用于提取川芎总酚酸。
关键词: 川芎; 总酚酸; 提取; 星点设计-响应面法
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)07-1506-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.012

Extraction optimization for total phenolic acid from *Ligusticum chuanxiong*

PU Zhong-hui^{1,2}, PENG Yong-zhen¹, PENG Cheng^{1*}, LIU Juan¹, XIONG Liang^{1*}, LI Wen-bing³
(1. State Key Laboratory Breeding Base for Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources Co-founded by Sichuan Province and MOST; Ministry of Education Key Laboratory for Standardization of Chinese Herbal Medicine; College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. College of Life Science and Biotechnology, Mianyang Teachers' College, Mianyang 621006, China; 3. Sichuan Neo-Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Pengzhou 610031, China)

KEY WORDS: *Ligusticum chuanxiong* Hort.; total phenolic acid; extraction; central composite design-response surface method

川芎系伞形科藁本属多年生草本植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,《神农本草经》列为上品,其气香浓,味苦辛,性辛温,归肝、胆、心包经,具有活血行气、祛风止痛、疏肝解郁的功效^[1],应用历史悠久,常用于治疗头痛、经闭痛经、跌扑肿痛,胸胁刺痛等疾病,尤其对心脑血管疾病有明显疗效,并且还具有保健、食用等多种用途^[2-3]。川芎总酚酸作为一个有效成分群,以阿魏酸和绿原酸为主,具有抗血小板凝集、抗血栓、抗氧化、清除自由基、防治冠心病等多种药理活性^[4-7]。

近年来,星点设计-响应面法已被广泛应用于中药提取工艺的优化,但尚未涉及川芎总酚酸。因

此,本实验以乙醇体积分数、液料比、超声时间为影响因素,阿魏酸、绿原酸、总酚酸含量为评价指标,采用该方法优化该成分提取工艺,旨在为川芎及其相关制剂的开发提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);FR2004b 型电子分析天平(上海越平科学仪器有限公司);AUW220D 型电子分析天平(日本岛津公司);HX-200 型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂);SB25-12D 型超声波清洗仪(宁波新艺超声设备有限公司)。

1.2 试药 川芎由四川新绿色药业科技发展股份有限公司提供,经成都中医药大学药学院李敏教授

收稿日期: 2017-06-27
基金项目: 四川省科技支撑计划(2015SZ0031); 科技基础性工作专项计划(2015FY111500-140)
作者简介: 蒲忠慧(1982—),女,博士生,从事中药药效物质基础研究。Tel: (028) 61800231, E-mail: zhonghui.pu@163.com
* 通信作者: 彭 成,男,研究员,博士生导师,从事中药药效与毒理研究。Tel: (028) 61800018, E-mail: pengchengchengdu@126.com
熊 亮,男,研究员,从事中药药效物质基础及开发应用研究。Tel: (028) 61800231, E-mail: xiling0505@126.com

鉴定为正品，标本保存于成都中医药大学中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地（标本号 LC-20150910）。阿魏酸（批号 MUST-1710908，含有量 99.32%）、绿原酸（批号 MUST-17030620，含有量 99.39%）对照品（成都曼斯特生物科技有限公司）。甲醇为色谱纯（美国 Sigma 公司）；其他试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 总酚酸（阿魏酸 + 绿原酸）含有量测定

2.1.1 色谱条件 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm)；阿魏酸流动相甲醇-1% 乙酸(30 : 70)，体积流量 1.0 mL/min，检测波长 323 nm，柱温 25 ℃；绿原酸流动相甲醇-0.1% 磷酸(18 : 82)，体积流量 1.0 mL/min，检测波长 327 nm，柱温 30 ℃^[1]。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取阿魏酸、绿原酸对照品适量，置于 25 mL 棕色量瓶中，分别用 70%、50% 甲醇溶解并定容至刻度，即得(两者质量浓度分别为 0.205 2、0.047 2 mg/mL)。

2.1.3 供试品溶液制备 川芎粉碎并精密称取 10.0 g，置于具塞锥形瓶中，按一定液料比加入一定体积分数乙醇，超声提取一定时间后过滤，滤液浓缩蒸干，残渣加氨水充分溶解，过滤，滤液用浓盐酸调 pH 为 2~3，再用乙酸乙酯萃取 3 次(50、40、30 mL)，合并萃取液，浓缩蒸干，残留物即为总酚酸粗品，精密称取适量置于棕色量瓶中，70%、50% 甲醇溶解并定容至刻度，即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取阿魏酸、绿原酸对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 于 6 个 2 mL 棕色量瓶中，加入对应溶剂定容至刻度，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜过滤，在“2.1.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定。以进样量为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)进行回归，得回归方程分别为阿魏酸 $Y = 5\,490.4X - 88.759$ ($r = 0.999\,8$)，线性范围 0.102 6~1.026 μg；绿原酸 $Y = 1\,330.1X - 2.93$ ($r = 0.999\,5$)，线性范围 0.023 6~0.236 μg。

2.1.5 精密度试验 取同一对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 5 次，每次 10 μL，测得阿魏酸、绿原酸峰面积 RSD 分别为 0.22%、0.16%，表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一样品 2 份，70%、50% 甲醇溶解定容至刻度，于 0、2、4、6、8、10 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定，测得阿魏酸、绿原酸峰面积 RSD 分别为 0.47%、

0.75%，表明溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取同一样品 10 份，70%、50% 甲醇溶解定容至刻度，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 5 次，每次 10 μL，测得阿魏酸、绿原酸峰面积 RSD 分别为 2.93%、2.83%，表明该方法重复性较好。

2.1.8 加样回收率试验 取含有量已知的供试品溶液 5 份，与对照品溶液等量混合，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 5 次，测得阿魏酸平均加样回收率为 99.04%，RSD 为 1.45%；绿原酸平均加样回收率为 100.78%，RSD 为 2.57%。

2.1.9 药材中成分含有量测定

2.1.9.1 阿魏酸 精密称取川芎粉末(过 4 号筛)约 0.5 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 50 mL，密塞，称定质量，加热回流 30 min，放冷，70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，静置，上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，HPLC 法测得含有量为 2.11 mg/g。

2.1.9.2 绿原酸 精密称取川芎粉末(过 4 号筛)约 0.5 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 50 mL，密塞，称定质量，超声(250 W、35 Hz) 30 min，放冷，50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，静置，上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，HPLC 法测得含有量为 1.70 mg/g，即总酚酸含有量为 3.81 mg/g(阿魏酸、绿原酸含有量总和)。

2.1.10 提取物中成分含有量测定 吸取 70%、50% 甲醇溶解的供试品适量，0.45 μm 微孔滤膜过滤，在“2.1.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定。色谱图见图 1。

2.2 星点设计-响应面法

2.2.1 试验设计 在预试验基础上，选择乙醇体积分数(A)、液料比(B)、超声时间(C)作为影响因素(提取次数为非连续变量，回归处理较困难，结合工业实际生产暂定为 2 次)，总酚酸含有量(Y)为评价指标，进行 3 因素 5 水平设计。因素水平见表 1，结果见表 2。

2.2.2 模型拟合 应用 Design Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行多元回归拟合，得回归方程为 $Y = -129.435\,64 + 3.703\,54A + 0.396\,55B + 1.573\,05C + 0.031\,226AB - 0.028\,240AC + 0.010\,612BC - 0.021\,680A^2 - 0.115\,29B^2 + 6.404\,73 \times 10^{-3}C^2$ ($R^2 = 0.946\,2 > 0.9$)，表明模型拟合度良好，误差较小，方差分析见表 3。由表可知，整体模型

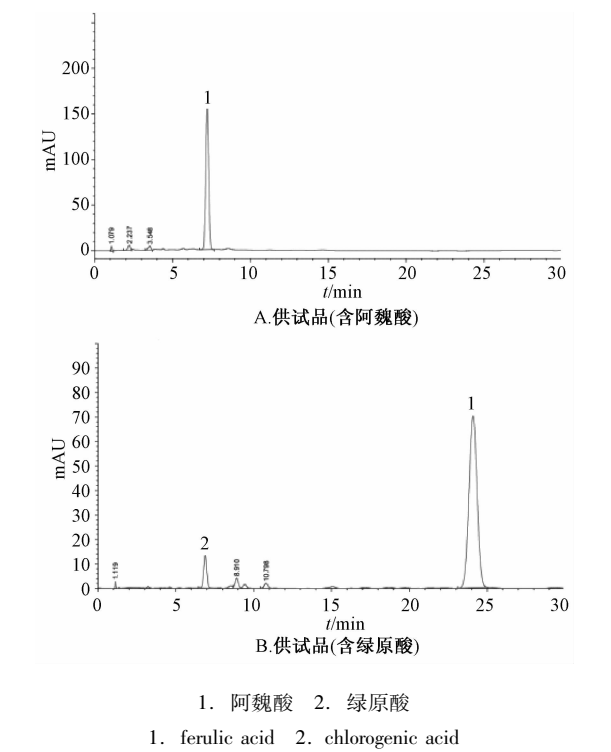


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

表 1 因素水平			
Tab. 1 Factors and levels			
水平	因素		
	A 乙醇/%	B 液料比	C 超声时间/min
-1.682	65	7.51 : 1	30
-1	71.05	8.84 : 1	35.07
0	79.98	10.79 : 1	42.5
1	88.91	12.74 : 1	49.93
1.682	95	14.07 : 1	55

$P < 0.001$ ，有显著性差异；失拟项 $P > 0.05$ ，失拟不显著；因素 A（乙醇体积分数）影响极显著（ $P < 0.0001$ ），B（液料比）较显著（ $P < 0.01$ ），C（超声时间）不显著（ $P > 0.05$ ），影响程度依次为 $A > B > C$ ；交互项 AC 影响显著（ $P < 0.05$ ）、AB、BC 不显著（ $P > 0.05$ ）；二次项 A^2 极显著（ $P < 0.01$ ）， B^2 、 C^2 不显著（ $P > 0.05$ ）。

2.2.3 响应面分析 见图 2。由此可知，最优工艺为乙醇体积分数 65%，液料比 13.05 : 1，超声时间 55 min，总酚酸含量 44.27 mg/g。考虑到实际操作条件，最终将其修正为 13 倍量 65% 乙醇超声提取 2 次，每次 55 min。

2.3 验证试验 精密称取川芎粉末 100 g，按“2.2.3”项下最优工艺进行 3 批验证试验，计算提取物得率和总酚酸转移率（提取物中总酚酸含量/药材中总酚酸含量 $\times 100\%$ ），结果见表 4，

可知回归模型预测性良好。

表 2 试验设计及结果						
Tab. 2 Design and results of tests						
试验号	A 乙醇/%	B 液料比	C 超声时间/min	含量/(mg·g ⁻¹)		
				阿魏酸	绿原酸	总酚酸
1	71.05	8.84 : 1	35.07	31.58	3.18	34.75
2	88.91	8.84 : 1	35.07	24.43	1.60	26.04
3	71.05	12.74 : 1	35.07	33.67	4.16	37.83
4	88.91	12.74 : 1	35.07	27.11	2.72	29.83
5	71.05	8.84 : 1	49.93	33.73	3.13	36.87
6	88.91	8.84 : 1	49.93	17.36	1.84	19.20
7	71.05	12.74 : 1	49.93	34.36	4.74	39.10
8	88.91	12.74 : 1	49.93	23.44	1.63	25.07
9	65.00	10.79 : 1	42.50	29.35	7.73	37.08
10	95.00	10.79 : 1	42.50	18.87	1.48	20.35
11	79.98	7.51 : 1	42.50	25.27	4.76	30.03
12	79.98	14.07 : 1	42.50	29.73	4.98	34.70
13	79.98	10.79 : 1	30.00	28.13	4.84	32.97
14	79.98	10.79 : 1	55.00	26.64	9.60	36.24
15	79.98	10.79 : 1	42.50	27.97	5.57	33.54
16	79.98	10.79 : 1	42.50	28.90	4.78	33.68
17	79.98	10.79 : 1	42.50	31.64	3.71	35.34
18	79.98	10.79 : 1	42.50	27.99	4.65	32.65
19	79.98	10.79 : 1	42.50	28.62	4.26	32.87
20	79.98	10.79 : 1	42.50	24.66	6.27	30.93

表 3 方差分析					
Tab. 3 Analysis of variance					
来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	546.90	9	60.77	19.53	<0.0001
A	429.04	1	429.04	137.87	<0.0001
B	38.14	1	38.14	12.26	0.0057
C	0.54	1	0.54	0.17	0.6864
AB	2.37	1	2.37	0.76	0.4037
AC	28.09	1	28.09	9.03	0.0132
BC	0.19	1	0.19	0.061	0.8103
A ²	43.07	1	43.07	13.84	0.0040
B ²	2.77	1	2.77	0.89	0.3677
C ²	1.80	1	1.80	0.58	0.4643
残差	31.12	10	3.11	—	—
失拟项	20.64	5	4.13	1.97	0.2376
纯误差	10.48	5	2.10	—	—
总差	578.02	19	—	—	—

表 4 验证试验结果 (n=3)						
Tab. 4 Results of verification tests (n=3)						
试验号	含量/(mg·g ⁻¹)			得率/%	转移率/%	
	阿魏酸	绿原酸	总酚酸		阿魏酸	绿原酸
1	40.40	3.21	43.61	4.68	49.63	3.94
2	40.75	2.90	43.65	4.62	49.41	3.52
3	40.25	2.87	43.12	4.58	48.38	3.45
平均值	40.47	2.99	43.46	4.63	49.14	3.63

3 讨论

川芎中含有大量酚酸类成分，阿魏酸和绿原酸为其代表，其中前者含量相对较高，2015 年版

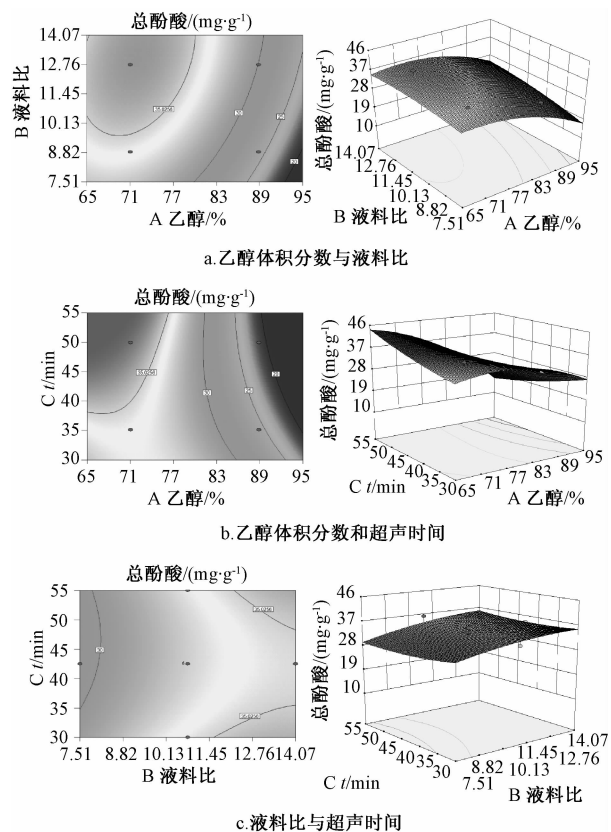


图2 各因素响应面图

Fig. 2 Response surface plots for various factors

《中国药典》将其作为川芎质量控制的指标成分^[1]；后者含有量相对较低，但也是重要指标之一^[8]。另外，该类成分在高温下不稳定，分子结构会遭破坏，故本实验选择超声提取，它具有提取效率高、提取时间短、提取过程无需高温等特点，是较理想的一种方法。

星点设计-响应面法是应用多元二次回归，并将函数作为估计工具，研究因素与响应值之间、因素与因素之间交互作用的方法，通过对拟合后的回归方程进行分析来寻找最优工艺参数，与正交设计、均匀设计相比，可更直观、精确地得到最优组合条件^[9]，已被广泛应用于中药提取工艺优化过程^[10-13]。本实验采用该方法优化川芎总酚酸提取工艺，发现其合理可行，稳定可靠，重复性较好。另外，绿原酸平均转移率仅为3.63%，远低于阿魏酸，可能与该成分不太稳定，在提取、浓缩、干燥过程中易受加热温度和pH影响有关^[14]。

将本实验结果与前期报道的正交设计^[15]和均匀设计^[16]进行比较时发现，星点设计-响应面法优化后川芎总酚酸含有量更高，可为川芎及其相关制剂的开发提供参考依据。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：41.
- [2] Ran X, Ma L, Peng C, et al. *Ligusticum chuanxiong* Hort: a review of chemistry and pharmacology[J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(11): 1180-1189.
- [3] Li W, Tang Y, Chen Y, et al. Advances in the chemical analysis and biological activities of chuanxiong[J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 10614-10651.
- [4] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展[J]. *中成药*, 2006, 28(2): 253-255.
- [5] Hsieh M T, Tsai F H, Lin Y C, et al. Effects of ferulic acid on the impairment of inhibitory avoidance performance in rats[J]. *Planta Med*, 2002, 68(8): 754-756.
- [6] 张鞍灵, 马 琼, 高锦明, 等. 绿原酸及其类似物与生物活性[J]. *中草药*, 2001, 32(2): 173-176.
- [7] Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, et al. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in a rat carcinogenesis model[J]. *Food Chem Toxicol*, 2000, 38(5): 467-471.
- [8] 孙立磊, 包永睿, 孟宪生, 等. 一测多评法同时测定川芎中5种成分[J]. *中成药*, 2016, 38(11): 2503-2505.
- [9] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J]. *中国现代应用药学*, 2007, 24(6): 455-457.
- [10] 张百霞, 郭庆梅, 王真真, 等. 响应曲面法优化金银花总酚酸提取工艺[J]. *中成药*, 2013, 35(10): 2144-2148.
- [11] 赵 亚, 赖小平, 姚海燕, 等. 响应曲面优化超微粉碎参须中人参总皂苷的溶出工艺[J]. *中药材*, 2014, 37(3): 494-498.
- [12] 周秀娟, 陈俊可, 曾 锐. 响应面法优化超声辅助提取粗茎秦艽多糖的工艺研究[J]. *中药材*, 2016, 39(11): 2572-2575.
- [13] 辛明慧, 张荣华, 杨 丽, 等. 响应面法优化辣木中多糖和芦丁的超声提取工艺[J]. *中成药*, 2017, 39(3): 625-628.
- [14] 江 滨, 王风云, 曾元儿, 等. 绵茵陈药材提取液中绿原酸稳定性影响因素考察[J]. *中成药*, 2007, 29(3): 359-362.
- [15] 武亚晓, 李 希, 冯建安, 等. 正交试验设计优化川芎阿魏酸的提取工艺[J]. *中药与临床*, 2015, 6(3): 22-25.
- [16] 李文兰, 范玉奇, 季宇彬, 等. 均匀设计法优选川芎中阿魏酸和总酚酸的提取工艺[J]. *中国现代应用药学*, 2007, 24(3): 198-201.