

正交实验法优化当归中三种有效成分的提取工艺

吴 姣*, 陈迪安, 张 璐, 孙广庭, 边 禹

美霖佳生物医学科技(苏州)有限公司, 苏州 215000

摘要:为优选当归的最佳提取工艺。实验采用先醇提后水提的方法提取当归中有效成分,分别以藁本内酯、阿魏酸和粗多糖为指标,采用正交试验法,对醇提、水提工艺进行优化。其中醇提工艺:以藁本内酯得率、阿魏酸得率为指标,采用正交试验法,以 $L_{16}(4^5)$ 正交表安排试验,对提取过程中的乙醇提取次数、乙醇浓度、提取温度、料液比、提取时间 5 个因素进行优选研究。结果得到,最优醇提工艺为提取次数 2 次,醇浓度为 80%,提取温度 85 °C,料液比为 8:1,每次提取时间为 2 小时。水提工艺:以粗多糖得率为指标,采用正交试验法,以 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,对提取过程中的水提次数、提取温度、料液比、提取时间 4 个因素进行优选研究。结果得到,最优水提工艺为提取次数 3 次,提取温度 100 °C,料液比为 9:1,每次提取时间为 1 小时。通过验证,结果表明最佳醇提、水提工艺重复性好、稳定、可行。

关键词:当归;藁本内酯;阿魏酸;粗多糖;正交试验;提取工艺

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0091-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.016

Optimization of extraction process of angelica by orthogonal test with three active ingredient targets

WU Jiao*, CHEN Di-an, ZHANG Lu, SUN Guang-ting, BIAN Yu

Merrill Biomedical Technology (Suzhou) Co., Ltd., Suzhou 215000, China

Abstract: Orthogonal test was applied to optimize the extraction process of angelica which was extracted by alcohol first and water later, with ligustilide, ferulic acid and polysaccharide as evaluation indexes. The effects of extraction frequency, concentration of ethanol, extraction temperature, solid-liquid ratio and extraction time on ethanol extraction technology were investigated by using orthogonal table $L_{16}(4^5)$ test with ligustilide and ferulic acid as indexes. Optimize ethanol extraction technology was extraction frequency (twice), concentration of ethanol (80%), extraction temperature (85 °C), solid-liquid ratio (8:1) and extraction time (2 hours for each time). The effects of extraction frequency, extraction temperature, solid-liquid ratio and extraction time on water extraction technology were investigated by using orthogonal table $L_9(3^4)$ test with polysaccharide as index. Optimize water extraction technology was extraction frequency (three times), extraction temperature (100 °C), solid-liquid ratio (9:1) and extraction time (1 hour for each time). The optimum ethanol and water extraction process showed good repeatability, stability and feasibility.

Key words: angelica; ligustilide; ferulic acid; polysaccharide; orthogonal test; extraction process

当归是临床使用频率最高的中药之一,素有“十方九归”之称。当归入肝、心、脾经,药性甘、辛、温,具有补气活血、调经止痛、润肠通便的功效^[1,2]。现代药理研究表面,当归的多种有效成分均具有增强免疫力的功效。杨轶虹^[3]等研究表明,当归多糖能增强正常及免疫抑制小鼠的非特异性免疫功能;

高向东^[4]的研究表明当归中的阿魏酸对非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫功能均有较强的促进作用;龙锐^[5]的研究表明当归内酯具有免疫调解作用和抗肿瘤活性。当归有效成分提取方面的最大弊端,是提取产物大都只局限于一种有效成分,提取完的药渣往往直接丢弃,在很大程度上造成了当归资源的浪费。本研究通过醇提、水提分步提取工艺,将当归中的三种增强免疫力功能的有效成分藁本内酯、阿魏酸和粗多糖提取率最优化,最大程度的利用

当归资源。

根据当归藁本内酯、阿魏酸和粗多糖理化性质的差异,采用醇提法先对当归藁本内酯、阿魏酸的提取,并进行工艺优化,后采用水提法对最优条件提取过藁本内酯、阿魏酸的当归药渣进行粗多糖提取,进行工艺优化。如此不仅能实现藁本内酯、阿魏酸和粗多糖的分步提取,提高当归药材的综合利用率,又能提高其各自的提取效率,大大降低能耗。优化的当归藁本内酯、阿魏酸和粗多糖分步提取工艺,可以为当归藁本内酯、阿魏酸和粗多糖的大规模工业化生产提供理论依据,而且为当归作为植物药、保健品、化妆品和食品配料或添加剂的研究与开发提供依据。

1 材料

1.1 材料与试剂

当归(171103,岷县):于2018年02月购自甘肃岷归中药材科技有限公司。

藁本内酯标准品(纯度 $\geq 99.8\%$)、阿魏酸标准品(纯度 $\geq 99.6\%$)、D-无水葡萄糖标准品(纯度 $\geq 99.9\%$)、甲醇、乙腈、磷酸、乙醇、硫酸、苯酚、超纯水。

1.2 仪器与设备

电子天平、中药粉碎机、恒温水浴锅、旋转蒸发器、真空干燥箱、超声波清洗器、漩涡混合器、离心机、紫外分光光度计(Vivian Cary 50)、高效液相色谱仪(岛津 LC-20AT)、色谱柱(Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱 150×4.6 mm, 5 μm)

2 方法

2.1 样品处理

用中药粉碎机将当归粉碎成约1cm左右的粗颗粒。由于藁本内酯和阿魏酸在醇中溶解度大,当归粗多糖在水中溶解度大,故先采用醇提法提取其中的藁本内酯和阿魏酸,再由最优醇提工艺提取后的药渣采用水提法提取其中的粗多糖。

2.2 提取方法

2.2.1 当归醇提工艺优化^[6-8]

以藁本内酯得率、阿魏酸得率为指标,采用正交试验法,以L₁₆(4⁵)正交表安排试验,对提取过程中的A乙醇提取次数(1、2、3、4次)、B乙醇浓度(60、70、80、95%)、C提取温度(55、70、85、100℃)、D料液比(6、8、10、12倍)、E提取时间(0.5、1、2、3h)5个因素进行优选研究。每份当归样品醇提后得到的醇提液合并浓缩至1.25~1.35(60℃),于真空干

燥箱中60℃,2小时烘干,得醇提干膏粉,称重,测定藁本内酯、阿魏酸的含量(检测方法见2.3.1和2.3.2)。

2.2.2 当归水提工艺优化^[9-11]

当归采用最优醇提工艺提取后的药渣,再采用水提法提取其中的粗多糖。以粗多糖得率为指标,采用正交试验法,以L₉(3⁴)正交表安排试验,对提取过程中的a水提次数(1、2、3次)、b提取温度(60、80、100℃)、c料液比(6、9、12倍)、d提取时间(1、2、3h)4个因素进行优选研究。每份药渣水提后得到的水提液合并浓缩至1.25~1.35(60℃),于真空干燥箱中60℃,2小时烘干,得水提干膏粉,称重,测定粗多糖的含量(检测方法见2.3.3)。

2.3 成分检测方法

2.3.1 藁本内酯的测定^[12]

2.3.1.1 色谱条件

流动相:A相:甲醇,B相:超纯水;检测波长:320 nm;柱温:30℃;流速:0.8 mL/min;洗脱方式:梯度洗脱,20 min内A相由40%线性变化为100%;进样量:10 μL;稀释剂:甲醇。

2.3.1.2 对照品溶液的制备

取藁本内酯对照品,精密称定20 mg,置50 mL棕色量瓶中,加甲醇定容,制成每1 mL含400 μg对照品储备液(即400 μg/mL),摇匀,精密量取上述对照品储备液2.5 mL置25 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得40 μg/mL藁本内酯对照品溶液,备用。

2.3.1.3 供试品溶液的制备

称取样品0.5 g,置于50 mL棕色容量瓶中,加入5 mL超纯水,摇匀,使固形物全部溶解呈乳白色溶液,然后加入约40 mL甲醇溶液,超声处理10 min后取出,放置至室温,加入甲醇溶液至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜过滤于棕色试样瓶中,即得。

2.3.1.4 测定

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。

2.3.2 阿魏酸的测定^[1]

2.3.2.1 色谱条件

流动相:乙腈-0.085%磷酸溶液(17:83);检测波长:316 nm;柱温:35℃;流速:0.8 mL/min;洗脱方式:等度洗脱;样量:10 μL;稀释剂:70%甲醇

2.3.2.2 对照品溶液的制备

取阿魏酸对照品,精密称定10 mg,置25 mL棕

色量瓶中,加70%甲醇定容,制成每1 mL含400 μg 对照品母储备液(即400 $\mu\text{g}/\text{mL}$),摇匀,精密量取上述对照品储备液2.5 mL置25 mL量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿魏酸对照品溶液,备用。

2.3.2.3 供试品溶液的制备

称取样品0.4 g,置于25 mL棕色容量瓶中,加入70%甲醇20 mL,超声处理10 min后取出,放置至室温,加入70%甲醇至刻度,摇匀,用0.45 μm 微孔滤膜过滤于棕色试样瓶中,即得。

2.3.2.4 测定

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,测定,即得。

2.3.3 粗多糖的测定^[13]

2.3.3.1 样品提取

称取本品样品1.0 g(m_2),置于100 mL容量瓶中,加水80 mL左右,于沸水浴中加热,至样品全部溶解,冷却,加水至100 mL(V_1),混匀后过滤,弃约1~2 mL初滤液,收集余下滤液供沉淀粗多糖。

2.3.3.2 沉淀粗多糖

准确吸取上滤液5.0 mL(V_2),置于50 mL具塞离心管中,加入无水乙醇20 mL,混匀,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置16 h(过夜),以4 000 rpm离心5 min,弃去上清液,残渣用80%(V/V)乙醇溶液数毫升洗

涤,离心后弃去上清液,反复操作3次。残渣用纯化水溶解并定容至25 mL(V_3)。

2.3.3.3 标准曲线的绘制

准确吸取葡萄糖使用液0、0.25、0.375、0.50、0.625、0.75、1.0 mL(相当于葡萄糖0、0.05、0.075、0.10、0.125、0.15、0.20 mg)置于25 mL比色管中,补加水至2.0 mL,加1.0 mL的5%苯酚溶液混匀。小心加入浓硫酸10 mL,小心混匀,置沸水浴中20 min,冷却至室温,用分光光度计在480 nm波长处试剂空白为参比,1 cm比色皿测定吸光度值。以葡萄糖质量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。

2.3.3.4 样品测定

准确吸取上液适量(V_4)置于25 mL比色管中,补加水至2.0 mL,然后按上述法测定吸光度值。从标准曲线上查出葡萄糖含量,计算样品中粗多糖含量。

$$X = \frac{m_1 \times V_1 \times V_3}{m_2 \times V_2 \times V_4} \times 0.9 \times 100$$

3 结果

3.1 当归醇提工艺优化结果

3.1.1 当归醇提正交试验结果

每份取30 g当归粗颗粒,按照2.2.1当归醇提工艺优化设计方案进行提取,实验结果如下表1。

表1 当归醇提正交试验表及结果

Table 1 Orthogonal test results of angelica ethanol extraction process

$L_{16}(4^5)$	A (times)	B (%)	C ($^{\circ}\text{C}$)	D (times)	E (h)	干膏粉得率 Ethanol extract powder yield (%)	藜本内酯得率 Ligustilide yield (mg/30 g)	阿魏酸得率 Ferulic acid yield (mg/30 g)
1	1	60	55	6	0.5	24.69	90.994	13.023
2	1	70	70	8	1	34.43	152.867	15.111
3	1	80	85	10	2	47.17	169.073	26.596
4	1	95	100	12	3	20.34	131.642	15.748
5	2	60	70	10	3	43.60	153.492	21.129
6	2	70	55	12	2	45.91	171.546	22.476
7	2	80	100	6	1	35.49	141.736	19.031
8	2	95	85	8	0.5	16.03	124.169	14.721
9	3	60	85	12	1	49.04	140.022	23.704
0	3	70	100	10	0.5	33.66	111.219	17.786
11	3	80	55	8	3	44.80	187.568	22.187
12	3	95	70	6	2	30.13	111.339	21.009
13	4	60	100	8	2	49.12	149.986	25.362

续表 1 (Continued Tab. 1)

$L_{16}(4^5)$	A (times)	B (%)	C ($^{\circ}\text{C}$)	D (times)	E (h)	干膏粉得率 Ethanol extract powder yield (%)	藁本内酯得率 Ligustilide yield (mg/30 g)	阿魏酸得率 Ferulic acid yield (mg/30 g)
14	4	70	85	6	3	48.82	172.643	25.071
15	4	80	70	12	0.5	42.33	161.266	20.992
16	4	95	55	10	1	13.93	70.687	12.627

注:A:乙醇提取次数;B:乙醇浓度;C:提取温度;D:料液比;E:提取时间。

Note:A:Extraction frequency;B:Concentration of ethanol;C:Extraction temperature;D:Solid-liquid ratio;E:Extraction time.

3.1.2 醇提工艺对藁本内酯得率的优化结果分析

本内酯得率的影响和方差分析见下表 2。

根据表 1 实验结果,得到醇提工艺各因素对藁

表 2 醇提工艺对藁本内酯得率影响的方差分析

Table 2 Variance analysis of the influence of ligustilide yield in ethanol extraction process

因素 Factor	SS	df	F	$F_{0.05}$	显著性 P value
A:醇提次数 Extraction frequency	330.443	3	1	9.28	
B:醇浓度 Concentration of ethanol	6958.386	3	21.058	9.28	$P < 0.05$
C:提取温度 Extraction temperature	1162.532	3	3.518	9.28	
D:料液比 Solid-liquid ratio	2478.872	3	7.502	9.28	
E:提取时间 Extraction time	4317.16	3	13.065	9.28	$P < 0.05$
误差 Error	330.44	3			

由表 2 可知:醇提步骤对藁本内酯得率影响最大的因素是 B 醇浓度 ($P < 0.05$),其次为 E 醇提时间 ($P < 0.05$);各因素对提取率的影响为: $B > E > D > C > A$,提取率最优的参数为 $A_2B_3C_3D_2E_4$ 。

3.1.3 醇提工艺对阿魏酸得率的优化结果分析

根据表 1 实验结果,得到醇提工艺各因素对阿魏酸得率的影响和方差分析见下表 3。

表 3 醇提工艺对阿魏酸得率影响的方差分析

Table 3 Variance analysis of the influence of ferulic acid yield in ethanol extraction process

因素 Factor	SS	df	F	$F_{0.05}$	显著性 P value
A:醇提次数 Extraction frequency	33.274	3	6.861	9.28	
B:醇浓度 Concentration of ethanol	84.453	3	17.413	9.28	$P < 0.05$
C:提取温度 Extraction temperature	50.035	3	10.316	9.28	$P < 0.05$
D:料液比 Solid-liquid ratio	4.85	3	1.000	9.28	
E:提取时间 Extraction time	131.267	3	27.065	9.28	$P < 0.05$
误差 Error	4.85	3			

由表 3 可知:醇提步骤对阿魏酸得率影响最大的因素是 E 提取时间 ($P < 0.05$),其次是 B 乙醇浓度 ($P < 0.05$) 和 C 提取温度 ($P < 0.05$);各因素对阿魏酸的影响为: $E > B > C > A > D$,最优的参数为 $A_3B_3C_3D_4E_3$ 。

3.1.4 最优醇提工艺参数验证

综合 3.1.2 和 3.1.3 结果,B 乙醇浓度、E 提取

时间、C 提取温度三个因素为醇提的显著影响因素,B 乙醇浓度、C 提取温度最优为 B_3C_3 ,E 提取时间从二者极差分析和节能考虑,最优可定为 E_3 ;A 醇提次数和 D 料液比均为非显著因素,从节能、节时考虑最优定为 A_2D_2 。所以醇提最佳工艺参数为 $A_2B_3C_3D_2E_3$,即:提取次数 2 次,醇浓度为 80%,提取温度 85°C ,料液比为 8:1,每次提取时间为 2 小时。

按照如上最优醇提工艺,分别提取三批,考察最优工艺参数可行性。结果见表4。

表4 最优醇提工艺参数验证

Table 4 Verification of optimal ethanol extraction process parameters

组别 Group	醇提干膏粉得率 Ethanol extract powder yield (%)	藁本内酯得率 Ligustilide yield (mg/30 g)	阿魏酸得率 Ferulic acid yield (mg/30 g)
1	48.53	166.30	24.76
2	46.77	175.80	25.23
3	49.78	178.42	26.55
RSD	3.13	3.68	3.63

由表4得,最优醇提工艺提取的产品中藁本内酯和阿魏酸的得率均较表1中高,且RSD值均 $\leq 5\%$,由此可见醇提最佳工艺参数为 $A_2B_3C_3D_2E_3$,重复性好,稳定、可行。

3.2 当归水提工艺优化结果

3.2.1 当归水提正交试验结果

每份取30g最优醇提工艺提取后的当归药渣,按照2.2.2当归水提工艺优化设计方案进行提取,实验结果如下表5。

表5 当归药渣水提正交试验结果

Table 5 Orthogonal test results of angelica water extraction process

$L_9(3^4)$	a (times)	b ($^{\circ}C$)	c (times)	d (h)	干膏粉得率 Water extract powder yield (%)	粗多糖得率 Polysaccharide yield (mg/30 g)
1	1	60	6	1	1.80	111.00
2	1	80	9	2	1.93	194.53
3	1	100	12	3	4.73	520.97
4	2	60	9	3	3.63	256.79
5	2	80	12	1	3.83	360.70
6	2	100	6	2	4.50	493.46
7	3	60	12	2	4.90	346.91
8	3	80	6	3	4.17	395.03
9	3	100	9	1	5.70	666.71

注:a:水提次数;b:提取温度;c:料液比;d:提取时间。

Note:a:Extraction frequency;b:Extraction temperature;c:Solid-liquid ratio;d:Extraction time.

3.2.2 水提工艺对粗多糖得率的优化结果分析

多糖得率的影响和方差分析见下表6。

根据表5实验结果,得到水提工艺各因素对粗

表6 水提工艺对粗多糖得率影响的方差分析

Table 6 Variance analysis of the influence of polysaccharide yield in water extraction process

因素 Factor	SS	df	F	$F_{0.05}$	显著性 P value
a:水提次数 Extraction frequency	56492.857	2	16.449	19	$P < 0.05$
b:提取温度 Extraction temperature	169297.818	2	49.294	19	$P < 0.05$
c:料液比 Solid-liquid ratio	8750.585	2	2.548	19	
d:提取时间 Extraction time	3434.44	2	1	19	
误差 Error	3434.44	2			

由表 6 可知:水提步骤对粗多糖得率影响最大的因素是提取温度($P < 0.05$),其次是提取次数($P < 0.05$);各因素对阿魏酸的影响为: $b > a > c > d$,最优的参数为 $a_3b_3c_3d_3$ 。

根据从方差结果看,料液比和提取时间并非显著影响因素,且从极差数据分析,水提 c 料液比和 d 提取时间的水平数据相差甚小,所以从节能节约时间成本等情况考虑,选定为 c_2d_1 。水提最佳工艺参数为 $a_3b_3c_2d_1$,即:提取次数 3 次,提取温度 $100\text{ }^\circ\text{C}$,料液比为 9:1,每次提取时间为 1 小时。

3.2.3 最优水提工艺参数验证

按照如上最优水提工艺,分别提取三批,考察最优工艺参数可行性。结果见表 7。

表 7 最优水提工艺参数验证

Table 7 Verification of optimal water extraction process parameters

组别 Group	水提干膏粉得率 Water extract powder yield (%)	粗多糖得率 Polysaccharide yield (mg/30 g)
1	5.53	678.77
2	5.29	645.59
3	5.34	683.52
RSD	2.37	3.09

由表 7 得,最优水提工艺提取的产品中粗多糖的得率较表 5 中高,且 RSD 值均 $\leq 5\%$,由此可见水提最佳工艺参数为 $a_3b_3c_2d_1$,重复性好,稳定、可行。

4 结论

本研究以藁本内酯、阿魏酸、粗多糖得率为考察指标,得出最优醇提工艺为:提取次数 2 次,醇浓度为 80%,提取温度 $85\text{ }^\circ\text{C}$,料液比为 8:1,每次提取时间为 2 小时;最优水提工艺为:提取次数 3 次,提取温度 $100\text{ }^\circ\text{C}$,料液比为 9:1,每次提取时间为 1 小时。经验证可见,得到的最佳醇提、水提工艺重复性好,稳定、可行。

文中在实验室小试条件下得出当归的最佳提取工艺参数,为实际放大生产,提供理论基础,实际放大生产考虑到人力、溶剂、时间、能耗等的成本可能还需进行微调,故生产中试有待进一步跟进。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the

- People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 133-134.
- 2 Luo D, Liu ZH, Pan CG, et al. High performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of radix angelica sinensis [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med (江西中医学院学报), 2012, 24(1): 34-36.
- 3 Yang TH, Lu BH, Jia M, et al. Immunoregulation effect of angelica polysaccharide isolated from angelica sinensis [J]. Chin Pharm Bull (中国药理学通报), 2003, 19: 448-451.
- 4 Gao XD, Wu WT. The effect of angelica sinensis and ferulic acid on mice immune system [J]. Chin J Biochemical Pharm (中国生化药物杂志), 1994, 15: 107-110.
- 5 Long R. Studies immunomodulation and antitumor activity of angelica sinensis diels lactones [D]. Chengdu: Sichuan University (四川大学), 2006.
- 6 Wang P, Zhao HS, Long PJ, et al. Optimization investigation of ethanol extraction technology of moutan cortex by orthogonal test with multi-targets [J]. Chin Med J Res Prac (现代中药研究与实践), 2018, 32(1): 53-56.
- 7 Lin ZH, Shan L. Optimization investigation of ethanol extraction technology of danggua prescription by orthogonal test [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2018, 30(6): 19-22.
- 8 Yang YQ, Cao QY, Li Q, et al. Optimization investigation of ethanol extraction technology of folium sennae by orthogonal test [J]. Hebei J TCM (河北中医), 2017, 39: 770-773.
- 9 Shen L, Xu FC, Lan YC, et al. Study on optimum water extraction conditions of angelica sinensis by orthogonal test [J]. Chin JMAP (中国现代应用药学杂志), 2004, 21(7): 35-37.
- 10 Li WM, Ma CJ. Orthogonal design angelica essential oil extraction process [J]. Ginseng Res (人参研究), 2009, 4: 28-30.
- 11 Gu JH, Yang XQ, Shi ZR, et al. Optimization investigation of extraction technology of huabian oral liquid by orthogonal test with multi-targets [J]. J Liaoning Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2018, 45: 788-790.
- 12 WM/T 4-2004 Dong Quai Extra [S]. Trade and economic standards of the People's Republic of China, 2005.
- 13 Bai H. Health food efficacy component detection method (保健食品功效成分检测方法) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2011: 73-76.