

正交试验设计优选丹参半仿生集成提取工艺

杨光义, 叶方*, 雷震, 王刚, 郝新才
(湖北医药学院附属太和医院, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的: 优选丹参中水溶性和脂溶性成分半仿生集成提取的最佳工艺条件。方法: 以丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸 B 含量、总酚酸得率、干浸膏收率为指标, 采用 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验, 优选半仿生-乙醇集成提取丹参有效成分最佳条件。结果: 提取溶剂为不同 pH 的 70% 乙醇(pH 分别为 2.0, 7.5, 8.3), 料液比 1:18, 提取时间 1.5 h, 综合评价指标最优。结论: 所得半仿生-70% 乙醇集成提取丹参有效成分工艺科学、合理。

[关键词] 正交试验设计; 丹参; 半仿生; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0040-04

Study on Optimum Integration Technique of Semi-bionic Extraction for *Salvia miltiorrhiza* by Orthogonal Test

YANG Guang-yi, YE Fang*, LEI Zheng, WANG Gang, HAO Xin-cai
(Taihe Hospital Affiliated with Hubei Medical University, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the best semi-bionic extraction condition of liposoluble and water-solubility ingredients from *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Method:** The semi-bionic extraction condition was optimized by making the extraction ratios of tanshinone II_A, salvianolic acid B, total phenolic acid and dried extract weight as indices. The experiment was designed by a orthogonal test. **Result:** Optimum extraction condition was: alcohol 70%, time 2 h, stock ratio 1:18 (g·mL⁻¹, mass: volume). **Conclusion:** The method of semi-bionic extraction-70% ethanol extractions is scientific and rational.

[Key words] orthogonal test; *Salvia miltiorrhiza* Bge.; semi-bionic; extraction method

丹参是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。有祛瘀止痛、活血通经之功效。丹参的主要有效成分包括脂溶性的二萜醌类及水溶性的酚酸类成分。《中国药典》2010 年版以丹参酮Ⅱ_A 和丹酚酸 B 为指标, 对丹参药材进行质量控制^[1]。为了能同时提取丹参脂溶性成分和水溶性成

分, 本试验在半仿生条件下, 采用正交设计法, 以丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸 B 含量、总酚酸得率、干浸膏收率为指标, 对丹参有效成分集成提取工艺进行优选, 为后续研究奠定基础。

1 材料

戴安 UltiMate™3000 型(美国戴安公司)高效液相色谱仪, 包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器和 Chromeleon 软件数据处理系统; TU-1901 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); AUW120D 电子天平(岛津公司); CQX25-06 型超声波震荡器(上海必能信超声有限公司); TDL-5A 离心机(菲恰尔公司)。

丹参酮Ⅱ_A 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110766-200518); 丹酚酸 B 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111562-200807); 绿原酸对照

[收稿日期] 20100729(001)
[基金项目] 湖北省教育厅产学研基金项目(CXY2009B040)
[作者简介] 杨光义, 讲师, 中药学博士, 研究方向: 中药资源开发和 新药研究, E-mail: ygy996@163.com, Tel: 139 71908298
[通讯作者] * 叶方, 副主任药师, 从事医院药学, E-mail: yxwen8801129@sina.com, Tel: 0719-8801393, 139 86888020

品(中国药品生物制品检定所,批号 110753-200413);丹参药材采于湖北神农本草中药饮片有限公司房陵丹参基地,由湖北医药学院药学系生药学教研室主任陈吉炎教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,样品打粉,过 3 号筛备用。甲醇、乙腈为色谱纯,水为纯化水。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹参酮Ⅱ_A 的含量测定^[1]

2.1.1 色谱条件 Diamonsil™ C₁₈柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm),前加预柱(4.6 mm ×10 mm);检测波长

270 nm;柱温 30 °C;流动相甲醇-水(75 :25),流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 5 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮Ⅱ_A对照品适量,加甲醇制成 16 mg·L⁻¹的丹参酮Ⅱ_A对照品溶液,以 0.45 μm 滤膜滤过备用。

2.1.3 样品液的制备 按表 1 各试验条件,称取丹参药材 6 g,浸泡 30 min,回流提取 3 次(每次提取时间按总提取时间 2 :1 :1分配),提取液用 4 层纱布加 100 目筛分别滤过,3 000 r·min⁻¹离心 25 min,合并上清液并浓缩定容至 100 mL,制得 1 ~9 号样品液(每 1 mL 相当于原饮片 0.06 g)。

表 1 L₉(3⁴) 试验设计

No.	乙醇体积 分数 /%	总提取时间 /h	料液比 /g·mL ⁻¹	空白	丹参酮Ⅱ _A /%	丹酚酸 B /%	总酚酸 /%	干浸膏 /%	综合评价 值 Y
1	60	1.5	1 :14	1	0.063 6 (- 0.404 5)	3.045 8 (1.497 9)	7.670 0 (1.479 2)	40.033 3 (1.480 8)	9.198 6
2	70	2.0	1 :14	2	0.061 5 (- 0.858 8)	2.876 0 (0.145 7)	7.274 0 (0.655 3)	38.040 0 (0.613 2)	0.439 8
3	80	2.5	1 :14	3	0.062 0 (- 0.764 4)	2.667 3 (- 1.516 1)	6.252 7 (- 1.469 4)	36.893 3 (0.114 1)	- 11.135 6
4	80	2.0	1 :18	1	0.065 9 (0.102 9)	2.885 9 (0.224 2)	7.284 4 (0.677 0)	38.066 7 (0.624 8)	3.637 1
5	60	2.5	1 :18	2	0.063 3 (- 0.463 9)	2.807 2 (- 0.402 0)	7.128 1 (0.351 8)	37.193 3 (0.244 7)	- 1.297 6
6	70	1.5	1 :18	3	0.074 7 (2.065 9)	2.990 7 (1.058 6)	6.950 9 (- 0.016 8)	33.766 7 (- 1.246 7)	8.076 4
7	70	2.5	1 :22	1	0.070 5 (1.125 8)	2.939 9 (- 0.654 7)	6.982 2 (0.048 3)	34.913 3 (- 0.747 6)	0.810 6
8	80	1.5	1 :22	2	0.061 6 (- 0.853 8)	2.801 2 (- 0.449 5)	6.909 3 (- 0.103 5)	37.833 3 (0.523 3)	- 3.697 1
9	60	2.0	1 :22	3	0.066 1 (0.149 9)	2.705 2 (- 1.214 3)	6.179 8 (- 1.621 2)	32.940 0 (- 1.606 5)	- 9.663 3
K ₁	- 1.762 3	13.577 9	- 1.497 21	3.646 3					
K ₂	9.326 8	- 5.586 4	10.415 9	- 4.554 9					
K ₃	- 11.195 6	- 11.622 6	- 12.549 9	- 12.722 5					
R	20.522 4	25.200 5	22.965 8	26.368 8					

注:3 次提取时间比为 2 :1 :1;表格中括号中数字为标准化后的值。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密量取样品液 5 mL 置蒸发皿中蒸干,移置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇溶液 50 mL 密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 Hz) 30 min,放冷,加 75% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试液 A₁ ~A₉(每 1 mL 相当于原饮片 0.006 g)。

2.1.5 丹参酮Ⅱ_A 的含量 取 1 ~9 号供试品溶液及对照品溶液,分别进样 5 μL,记录丹参酮Ⅱ_A 色谱峰面积,以外标一点法计算含量,结果见表 1。

2.2 丹酚酸 B 含量测定^[1]

2.2.1 色谱条件 Diamonsil™ C₁₈柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm),前加预柱(4.6 mm ×10 mm);检测波长 286 nm;柱温 30 °C;流动相甲醇-乙腈-甲酸-水(30 :10 :1 :59),流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹酚酸 B 对照品适量,加 75% 甲醇制成 140 mg·L⁻¹的丹酚酸 B 溶液,以 0.45 μm 滤膜滤过,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 同 2.1.4 项下供试品

溶液。

2.2.4 丹酚酸 B 含量的测定 取 1~9 号供试品溶液及对照品溶液,分别进样 10 μL,记录丹酚酸 B 色谱峰面积,以外标一点法计算,结果见表 1。

2.3 比色法测样品中总酚酸含量^[2-3]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 20.0 mg 用 75% 甲醇定容至 50 mL 量瓶中得 0.4 g·L⁻¹对照品溶液。

2.3.2 供试液的制备 精密量取 2.1.4 项下溶液 5 mL,加 75% 甲醇定容至 10 mL 即得供试液。

2.3.3 测定波长的选择 分别精密吸取绿原酸对照品及供试品溶液 2 mL 于 25 mL 量瓶中,加入 0.5% 亚硝酸钠溶液 5.0 mL,混匀后加入 10% 硝酸铝溶液 0.5 mL,混匀,再加入 1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 5.0 mL,以 75% 甲醇稀释至刻度,摇匀,随行试剂空白,反应 10 min 后,在 300~900 nm 扫描,测定其吸收曲线。结果表明,对照品和供试品吸收光谱基本一致,在 519 nm 处有最大吸收波长。

2.3.4 线性关系考察 精密量取 0.4 g·L⁻¹的对照品溶液 0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加 75% 甲醇定容。分别各取 2 mL 置于 25 mL 量瓶中,按 2.3.3 中络合显色剂的加入法显色后分别于 519 nm 波长处测吸光度。以对照品含量 C (mg·L⁻¹) 为横坐标,吸光度值 A 为纵坐标,绘制标准曲线,求得其回归方程为 $A = 3.07C + 0.0295$, $r = 0.9995$ 。结果表明,绿原酸在 0.08~0.40 g·L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 取上述对照品溶液,以溶剂为空白,于 519 nm 处测定吸光度,重复 6 次,RSD 0.15%。结果表明,仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 取同一供试品溶液分别于 0,1,2,4,6 h 测定吸光度,RSD 0.58%。说明供试液在 6 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 按供试品测定方法操作,对同一样品重复测定 6 次,平均含量 70.02 mg·g⁻¹,RSD 0.79%。

2.3.8 加样回收试验 精密称取已测含量的药材,以加入法进行试验,结果平均回收率为 95.47%,RSD 1.56%,表明本方法回收率良好。

2.3.9 样品中总酚酸的含量测定 取各供试品溶液及对照品溶液,按 2.3.3 中络合显色剂的加入法显色后分别于 519 nm 波长处测吸光度 A 值,计算其

含量,结果见表 1。

2.4 干浸膏得率的测定 精密量取 1~9 号样品溶液各 25 mL 置已烘干恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 烘 3 h,置干燥器内 30 min 后称重并计算干浸膏得率,结果见表 1。

2.5 正交试验设计 为保证试验的可比性和可重复性,以半仿生提取法(3 次提取溶剂的 pH 分别为 2.0,7.5,8.3)为基础,在药材规格、提取温度、滤过、浓缩等条件相同的前提下,选择乙醇体积分数、提取时间和溶媒用量 3 个因素,每个因素各取 3 个水平:乙醇体积分数(60%,70%,80%),提取时间(1.5,2.0,2.5 h),料液比(1:14,1:18,1:22 g·mL⁻¹)进行 L₉(3⁴) 正交设计,确定各因素不同水平对丹参有效成分提取量的影响,安排布点试验,结果见表 1。

2.6 结果 以丹参酮 II_A、丹酚酸 B、总酚酸得率和干浸膏收率作为考察指标。为消除各指标单位和量纲的不同,以及各指标变量范围相差悬殊所造成的影响,将各指标数据按公式 $X'_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}_j) / S_j$ 进行标准化处理(式中 X'_{ij} 为标准化的值, X_{ij} 为样品液 i 中成分 j 的含量, $\bar{X}_j$ 为各种样品液 i 中成分 j 的平均值, S_j 为成分的标准偏差),再根据各指标在工艺选择中的主次,给予不同的加权系数,标准化后的值加权后求和即得综合评价 Y 值 [$Y = (\text{丹参酮 II}_A + \text{丹酚酸 B}) / 2 \times 6 + \text{总酚酸} \times 3 + \text{干浸膏得率} \times 1$],根据 Y 值确定丹参提取方法的影响因素,这样更科学合理,结果见表 1。

由表 1 极差 R 直观分析可知,提取时间对丹参水溶性成分及脂溶性成分提取的影响最大,各因素影响大小次序为 B>C>A。从表 2 看出,提取时间对丹参有效成分的提取有统计学意义(P<0.05)。结合实际得出最佳的提取工艺条件是 A₂B₁C₂,即乙醇浓度为 70%,提取时间 1.5 h,料液比 1:18。

表 2 方差分析结果

方差来源	自由度	离差平方和	均方	F	P
乙醇体积分数	2	70.347	35.173	2.313	<0.05
总提取时间	2	115.519	57.760	3.798	>0.05
料液比	2	87.945	43.972	2.892	<0.05

注: $F_{0.05(2,18)} = 3.55$ 。

2.7 优化条件的验证 按照优化的工艺条件,做 3 份验证性试验,依 2.1,2.2,2.3 项下方法进行测定,结果测得丹参酮 II_A、丹酚酸 B、总酚酸含量分别为 0.762 0,29.747 1,69.312 4 mg·g⁻¹,干浸膏得率为

0.390 8 mg·g⁻¹。结果与正交试验法优选结果基本一致,说明半仿生集成提取丹参有效成分优选工艺合理,具有可行性。

3 讨论

半仿生提取法(SBE 法)是在常压、相对温度较高的条件下,以不同 pH 的水为溶剂进行连续提取得到含指标成分较高“活性混合物”的一种新提取方法^[4];丹参主要有效成分包括脂溶性的丹参酮类和水溶性的丹酚酸类。本试验在半仿生提取法基础上改用一定浓度的、不同 pH 乙醇溶液同时提取这 2 种成分^[5],并采用正交试验优选提取工艺。试验结果表明,采用优选后的提取工艺对丹参有效成分的综合提取率效果较好,操作简便,可以作为丹参或以丹参为主要成分的中药制剂以及中药免煎剂的有效成分提取方法。

丹参水溶性成分酚酸类化合物具有邻酚二羟基结构,可以与亚硝酸钠-硝酸铝络合显色,生成的络合物在可见光区有特征吸收,其吸收度与总酚酸含量成正比,且形成的络合物稳定,数小时内测定的吸收度无明显变化,因此以比色法测定总酚酸含量是可行的^[2-3]。

试验中曾以丹酚酸 B 为对照品,采用紫外光谱法测总酚酸含量,以及分别以丹酚酸 B、绿原酸为对照品,采用亚硝酸钠-硝酸铝络合法测总酚酸含量,结果几种方法测定结果相近,且呈线性相关,说明几种方法均为有效方法,但以绿原酸为对照品方便、经济,因此最终确定采用以绿原酸为对照品测定丹参中总酚酸的含量。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:70.
[2] 王文祥,周巧霞,蒋木岗,等.比色法测定丹参及提取物水溶性总酚的改进[J].中草药,2001,32(8):711.
[3] 甄攀,肖金鱼.吴茱萸及其炮制品中总酚酸含量测定[J].河北北方学院学报,2009,26(6):13.
[4] 杨光义,叶方,王刚,等.半仿生提取法在中药新药中的应用[J].中国药师,2010,13(8):1188.
[5] 任志会,苏会霞,柏艳柳,等.丹参脂溶性及水溶性成分集成提取工艺研究[J].中国中医药信息杂志,2009,16(3):54.

[责任编辑 顾雪竹]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 www.syfjxzz.com 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。(见本刊稿约 7 投稿及缴费)