

益气养心颗粒中丹参提取工艺的研究

闵建华, 孟亚会, 陈明民, 章振鹏, 孙 亮, 向飞军*

广东康美药物研究院有限公司, 广东 广州 510006

摘要:目的 优选益气养心颗粒中丹参提取工艺。方法 以丹参酮II_A、丹酚酸B的提取量和提取液浸膏得率为考察指标, 采用正交设计, 考察溶剂用量、提取次数、提取时间等对提取效果的影响。结果 最佳提取工艺为用10倍量的50%乙醇提取3次, 每次1h。结论 优选的纯化工艺简单易行, 适用于实际生产。

关键词: 益气养心颗粒; 丹参; 丹参酮II_A; 丹酚酸B; 正交试验

中图分类号: R944.27 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)04-0281-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.04.011

Extraction process of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in Yiqi Yangxin Granule

MIN Jian-hua, MENG Ya-hui, CHEN Ming-min, ZHANG Zhen-peng, SUN Liang, XIANG Fei-jun

Guangdong Kangmei Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To optimize the extraction technology of *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in Yiqi Yangxin Granule. **Methods** Using orthogonal test design, the effects of solvent amount, extracting times and extracting time on extraction were investigated using the amounts and extract yields of tanshinone II_A and salvianolic acid B as indexes. **Results** The optimum extraction parameters were as follow: 10 times of 50% ethanol, extracting for 3 times and 1 h each time. **Conclusion** The purification process is simple and suitable for practical production.

Key words: Yiqi Yangxin Granule; *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; tanshinone II_A; salvianolic acid B; orthogonal test

益气养心颗粒具有益气养血、宁心安神、化痰消痰的功能, 用于气血两虚、痰淤气滞所致心悸气短、失眠健忘、体虚自汗。主要含有黄芪、红参、当归、丹参等7味中药。其中丹参所含的心血管活性成分为以丹参酮II_A为代表的二萜醌类和以丹酚酸B为代表的酚酸类成分^[1], 丹参二萜醌类成分脂溶性很强, 丹酚酸类成分水溶性很强^[2], 而且此二类成分对光、热均不稳定, 故丹参宜选用合适的提取溶剂及工艺进行单独提取^[3], 以使此二类成分的提取尽量少受破坏。为此, 本实验拟采用正交设计方案, 以丹参酮II_A、丹酚酸B的提取量和干膏得率为考察指标, 优选出丹参的提取工艺参数, 以期为宜气养心颗粒的工业化生产和新药开发提供依据。

1 仪器与试剂

安捷伦 LC 1100 液相色谱仪 (G1354A 四元泵, 自动进样器, DAD 检测器, VWD 检测器, 安捷伦高效液相化学工作站), TC-15 套式恒温器 (海宁

市新华医疗器械厂), FA2104 分析天平 (上海精密科学仪器有限公司), RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

丹参酮II_A对照品 (购自中国食品药品检定研究院, 质量分数为100%, 批号为110766-200609), 丹酚酸B对照品 (购自中国食品药品检定研究院, 质量分数为98.5%, 批号为11562-200402), 流动相中的甲醇、乙腈为色谱纯, 乙醇、甲醇均为分析纯。丹参药材购于广东省清平中药材市场, 经广东药学院生药学教研室李书渊教授鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

丹参二萜醌类及酚酸类成分溶解性的差异较大^[4], 须选择合适浓度的乙醇方可将此二类成分提取出来, 故在溶剂用量、提取时间及提取次数不变的条件下, 针对乙醇浓度作单因素考察试验, 以确定丹参合理的提取溶剂^[5]。

收稿日期: 2013-05-09

作者简介: 闵建华 (1983—), 男, 硕士, 研究方向为中药及其制剂的物质基础研究。Tel: (020)39389769 E-mail: minjianhua_008@163.com

*通信作者 向飞军 Tel: (020)39389769 E-mail: kmyfzx@126.com

2.1 考察指标及方法

考察测定指标为丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸 B 的提取量和干浸膏得率。

2.1.1 丹参酮Ⅱ_A 提取量的测定 照《中国药典》2010年版一部附录VID 高效液相色谱法测定供试品溶液中丹参酮Ⅱ_A的量。

色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 甲醇-水(75:25)为流动相, 检测波长为 270 nm。理论板数按丹参酮Ⅱ_A峰计算应不低于 2 000。

对照品溶液的制备 精密称取丹参酮Ⅱ_A对照品 10 mg 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 精密量取 2 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得(含丹参酮Ⅱ_A 16 μg/mL)。

供试品溶液的制备 精密量取“3.1.1”项下浓缩液 2 mL 至 25 mL 棕色量瓶中, 用相应体积分数的乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 按下式计算丹参酮Ⅱ_A提取量。

丹参酮Ⅱ_A提取量 = (供试品溶液峰面积 × 对照品溶液质量浓度) / (对照品溶液峰面积) × 12.5

2.1.2 丹酚酸 B 提取量的测定 按《中国药典》2010年版一部附录VID 高效液相色谱法测定供试品溶液中丹酚酸 B 的量。

色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59)为流动相, 检测波长为 286 nm。理论板数按丹酚酸 B 峰计算应不低于 2 000。

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 0.14 mg/mL 溶液, 即得。

供试品溶液的制备 精密量取“3.1.1”项下浓缩液 2 mL 至 25 mL 棕色量瓶中, 用相应体积分数的乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 按下式计算丹酚酸 B 的提取率。

丹酚酸 B 提取量 = (供试品溶液峰面积 × 对照品溶液质量浓度) / (对照品溶液峰面积) × 12.5

2.1.3 干浸膏得率的测定 按《中国药典》2010年版一部附录XA 浸出物测定法项下水溶性浸出物测定法测定。

将提取液浓缩定容至 1 000 mL, 精密量取 25 mL (相当于原生药 2.5 g), 至已干燥至恒质量的蒸

发皿中, 在水浴上蒸干后, 105 °C 干燥 3 h, 移至干燥器中, 冷却 30 min, 迅速称定质量, 以干燥品计算干浸膏得率。

2.2 单因素考察乙醇浓度

分别取丹参(丹参酮Ⅱ_A的质量分数为 0.27%, 丹酚酸 B 的质量分数为 4.32%) 6 份, 每份 100 g, 分别加入体积分数为 30%、40%、50%、60%、70% 的乙醇溶液 1 000 mL, 浸泡 30 min 后回流提取 3 次, 每次 60 min, 滤过, 合并滤液, 浓缩至 1 000 mL, 检测其中丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸 B 的量, 并计算提取量和干膏得率, 结果见表 1。

表 1 不同体积分数的乙醇回流提取对考察指标的影响

Table 1 Effect of ethanol reflux extraction at different concentration on indexes

乙醇	丹参酮Ⅱ _A 提取量/g	丹酚酸 B 提取量/g	干浸膏得率/%
30%	0.173 7	1.824 3	36.31
40%	0.201 0	2.269 3	34.32
50%	0.216 9	3.257 3	28.32
60%	0.241 7	2.455 1	26.32
70%	0.246 5	1.781 1	21.23

由表 1 可知, 50%乙醇为溶剂时丹酚酸 B 提取量最高, 丹参酮Ⅱ_A的提取量与 60%乙醇做溶剂时的提取量相差不大, 综合考虑干膏得率, 选择 50%乙醇为丹参回流提取的溶剂。

2.3 正交试验法优化丹参提取工艺

2.3.1 因素水平表

确定了乙醇体积分数后, 为了得到合理的提取工艺, 选用 L₉(3⁴) 正交表, 对乙醇用量、提取时间、提取次数作优化研究^[6]。因素水平表见表 2。

表 2 因素水平表

Table 2 Factors and levels

水平	乙醇用量(A)	提取次数(B)	提取时间(C)
1	6 倍	1	20 min
2	10 倍	2	40 min
3	14 倍	3	60 min

2.3.2 方法与结果

称取丹参药材 100 g, 按表 2 中相应的条件试验, 将提取液浓缩定容至 1 000 mL, 精密量取 25 mL 供干浸膏得率测定用。另精密量取 2 mL 置 25 mL 棕色量瓶中, 用相应体积分数的乙醇稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液, 测定丹参酮Ⅱ_A和丹酚酸 B 的量。结果见表 3。

表3 L₉(3⁴) 正交试验结果
Table 3 Results of L₉(3⁴) orthogonal tests

序号	A	B	C	D	丹参酮 II _A 的提取量/g	丹酚酸 B 的提取量/g	干浸膏得率/%
1	1	1	1	1	0.169 8	1.19	10.79
2	1	2	2	2	0.187 1	2.74	20.07
3	1	3	3	3	0.212 0	3.60	26.01
4	2	1	2	3	0.154 5	1.69	12.68
5	2	2	3	1	0.203 6	2.22	17.05
6	2	3	1	2	0.200 7	3.23	25.19
7	3	1	3	2	0.173 2	2.02	15.77
8	3	2	1	3	0.241 3	3.44	22.43
9	3	3	2	1	0.255 6	3.28	23.75
丹参酮 II _A 的提取量							
K ₁	0.189 6	0.165 8	0.203 9	0.209 7			
K ₂	0.186 3	0.210 7	0.199 1	0.187 0			
K ₃	0.223 4	0.222 8	0.196 3	0.202 6			
R	0.037 1	0.057 0	0.007 6	0.022 7			
丹酚酸 B 的提取量							
K ₁	2.51	1.61	2.62	2.23			
K ₂	2.38	2.80	2.57	2.26			
K ₃	2.91	3.37	2.61	2.91			
R	0.53	1.74	0.05	0.68			
干浸膏得率							
K ₁	18.96	13.08	19.47	17.2			
K ₂	18.31	19.85	18.84	20.34			
K ₃	20.65	24.98	19.61	20.38			
R	2.35	11.90	0.78	3.18			

以丹参酮 II_A 的提取量为考察指标的结果分析比较各因素极差的大小, 可知各因素对丹参酮 II_A 的提取量影响的顺序为 B>A>C。方差分析见表 4, 由方差分析可知, 乙醇用量 (A) 和提取次数 (B) 有显著性差异, 说明此二因素对丹参酮 II_A 的提取量影响较大, 提取时间 (C) 无显著性差异, 说明其对丹参酮 II_A 的提取量影响较小。综合以上分析, 确定益气养心颗粒丹参乙醇回流提取以丹参酮 II_A 的提取量为考察指标合理工艺为 A₃B₃C₁。

以丹酚酸 B 的提取量为考察指标的结果分析比较各因素极差的大小, 可知各因素对丹酚酸 B 的提取量的影响的顺序为 B>A>C。方差分析见表 5, 由方差分析可知, 乙醇用量 (A)、提取次数 (B) 和提取时间 (C) 有极显著性差异, 说明此三因素对丹酚酸 B 的提取量影响较大。综合以上分析可知, 益气养心颗粒丹参乙醇回流提取工艺以丹酚酸 B 的提取量为考察指标合理工艺为 A₃B₃C₃。

以干浸膏得率为考察指标的结果分析比较各因素极差的大小, 可知各因素对干浸膏得率的影响顺

表4 以丹参酮 II_A 的提取量为考察指标的方差分析

Table 4 Variance analysis using extract amount of tanshinone II_A as index

方差来源	SS	自由度	MS	F	P
A	2.52×10 ⁻³	2	1.52×10 ⁻³	27.93	<0.05*
B	5.39×10 ⁻³	2	2.70×10 ⁻³	59.67	<0.05*
C	8.04×10 ⁻⁴	2	4.02×10 ⁻⁴	8.90	
误差项 (D)	9.04×10 ⁻⁵	2	4.52×10 ⁻⁵		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.0$$

表5 以丹酚酸 B 的提取量为考察指标的方差分析

Table 5 Variance analysis using extract amount of salvianolic acid B as index

方差来源	SS	自由度	MS	F	P
A	0.464	2	0.232	116	<0.01
B	4.702	2	2.351	1 175	<0.01
C	0.711	2	0.355	177.75	<0.01
误差项 (D)	0.004	2	0.002		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.0$$

序为 $B > A > C$ 。方差分析见表 6, 由方差分析可知, 提取次数 (B) 有极显著性差异, 提取时间 (C) 有显著性差异, 说明此二因素对干浸膏得率有较大影响, 乙醇用量 (A) 无显著性差异, 说明此因素对干浸膏得率的影响较小。综合以上分析可知, 益气养心颗粒丹参乙醇回流提取工艺以干浸膏得率为考察指标的合理工艺为 $A_3B_3C_3$ 。

表 6 以干浸膏得率为考察指标的方差分析

Table 6 Variance analysis using yield
of dry extract as index

方差来源	SS	自由度 ν	MS	F	P
A	17.905	2	8.953	8.547	>0.05
B	436.222	2	218.111	208.221	<0.01
C	40.744	2	20.372	19.448	<0.05
误差项 (D)	2.095	2	1.048		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.0$$

综合以上分析, 可知益气养心颗粒丹参乙醇回流提取的合理工艺条件为 $A_3B_3C_3$, 即用 14 倍量的 50%乙醇提取 3 次, 每次 1 h。虽然在以丹参酮 II_A 的提取量为考察指标时, 选择的合理工艺为 $A_3B_3C_1$, 但由于提取时间 (C) 在选择 40 min 和 60 min 时丹参酮 II_A 的提取量很相近, 故选择本工艺的合理工艺条件为 $A_3B_3C_3$ 。

2.3.3 验证实验

取丹参 100 g, 共 3 份, 以上述优化的合理工艺条件 $A_3B_3D_3$, 即用 10 倍量的 50%乙醇提取 3 次, 每次 1 h, 重复 3 批试验, 结果丹参酮 II_A 的提取量分别为 0.266 5、0.258 9、0.267 7 g, 平均提取量 0.264 4 g, 平均提取率为 80.32%; 丹酚酸 B 的提取量分别为 3.58、3.65、3.68 g, 平均提取量 3.64 g, 平均提

取率为 72.40%; 干浸膏得率分别为 26.60%、24.86%、27.12%, 平均得率 26.19%。验证实验表明该工艺稳定可行。

3 讨论

在研究丹参提取工艺的正交试验中, 采用了丹参酮 II_A、丹酚酸 B 的提取量和干浸膏得率来对工艺的合理性进行考察, 得到的最佳工艺虽然不尽相同, 但是由于提取时间 (C) 在选择 40 min 和 60 min 时丹参酮 II_A 的提取量很相近, 最终选择了 $A_3B_3C_3$, 即用 10 倍量的 50%乙醇提取 3 次, 每次 1 h 作为益气养心颗粒中丹参的最佳提取工艺, 此工艺应用于大生产也是合理可行的。

参考文献

- [1] 池晓霞, 高心宇. 丹参调节血管新生及其机制研究进展 [J]. 海峡药学, 2010, 22(2): 3-6.
- [2] 杭 亮. 丹参地上部分化学成分研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [3] King J W. Fundamentals and applications of supercritical fluid extraction in chromatographic science [J]. *J Chromatogr Sci*, 2009, 27(7): 355.
- [4] Kong D Y. The chemical composition of Danshen [J]. *Chin J Pharm*, 2009, 20(6): 279.
- [5] 王 玥, 杜守颖, 马 勇. 丹参药材提取工艺的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(8): 562-566.
- [6] 高 岚, 邹中旺. 丹参提取工艺研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2009, 3 (3): 57-58.
- [7] 王新春, 于志庚, 陈卫军, 等. RP-HPLC 法测定复方当归妇康胶囊中丹参酮 II_A 的含量 [J]. 中成药, 2005, 27(4): 56-58.
- [8] 李向军, 刘敏彦, 赵兴茹, 等. 丹参水溶性成分提取工艺研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(12): 49-50.