

正交试验优选芪丹颗粒提取工艺

袁天荣^{1,2}, 赵雪梅^{1*}, 赵蕾², 董琼²

(1. 山东大学附属省立医院, 济南 250021; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:** 优选芪丹颗粒的提取工艺。**方法:** 以丹酚酸 B、丹参酮 II_A 质量分数和干膏率为评价指标, 通过正交试验考察乙醇体积分数、提取次数、乙醇用量对醇提工艺的影响; 以黄芪甲苷提取量和出膏率为指标, 通过正交试验考察煎煮时间、煎煮次数、加水量对水提取工艺的影响。采用 HPLC 测定黄芪甲苷、丹酚酸 B 及丹参酮 II_A 含量。**结果:** 最佳醇提工艺为加 6 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次, 提取时间分别为 2, 1 h; 丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 质量分数分别为 1.215%, 0.599%, 干膏率 41.04%。最佳水提工艺为加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 1.5 h; 黄芪甲苷提取量 3.408 mg·g⁻¹, 出膏率 43.37%。**结论:** 优选的提取工艺稳定可行, 为芪丹颗粒的合理开发提供参考。

[关键词] 芪丹颗粒; 正交试验; 醇提工艺; 水提工艺; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; 干膏率

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0004-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014070004

Optimization of Extraction Process of Qidan Granules by Orthogonal Test

YUAN Tian-rong^{1,2}, ZHAO Xue-mei^{1*}, ZHAO Lei², DONG Qiong²

(1. Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Ji'nan 250021, China;

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Qidan granules. **Method:** Taking tanshinone II_A content, salvianolic acid B content and dry extract rate as indexes, orthogonal test was adopted to optimize alcohol extraction process with extraction times, the concentration and consumption of ethanol as factors; With dry extract rate and extracting amount of astragaloside as indexes, orthogonal test was adopted to investigate effects of the amount of water, boiling time and decocting times on water extraction process. Contents of astragaloside, salvianolic acid B and tanshinone II_A were determined by HPLC. **Result:** Optimum alcohol extraction conditions were as follows: extracted twice with six times the amount of 60% ethanol, extraction time of 2, 1 h; Dry extract rate was 41.04%, mass fraction of salvianolic acid B and tanshinone II_A were 1.215% and 0.599%, respectively. Optimum water extraction conditions were as follows: decocted twice with ten times the volume of water, 1.5 h per time; Extracting amount of astragaloside was 3.408 mg·g⁻¹, dry extract rate was 43.37%. **Conclusion:** Optimized extraction process was stable and feasible, which could provide a reference for rational development of Qidan granules.

[Key words] Qidan granules; orthogonal test; alcohol extraction process; water extraction process; salvianolic acid B; tanshinone II_A; dry extract rate

芪丹汤为我院协定处方, 由黄芪、丹参、当归、淫羊藿、墨旱莲、金樱子等 12 味药组成, 具有补气益血、活血化瘀、止痛及升阳等功效, 主要用于治疗气血与肾精不足而引起的心悸、气短乏力、失眠多梦等

[收稿日期] 20130726(018)

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(2009-148)

[第一作者] 袁天荣, 在读硕士, 从事中药新制剂与临床药学研究, Tel:13864054827, E-mail: ytrshandong@163.com

[通讯作者] * 赵雪梅, 硕士生导师, 主任药师, 从事临床药学研究, Tel:0531-68776465, E-mail: zxm_vip@126.com

症,临床疗效确切。但汤剂存在使用和携带不便、剂量大、不易保存、药材利用率低等不足,本实验拟将其研制成颗粒剂,以提高患者的服药顺应性,扩大适宜人群且便于携带和贮存^[1-4]。为保证芪丹颗粒中各有效成分充分溶出,根据各药味的理化性质及药理作用,确定方中丹参等药味醇提,黄芪等药味水提^[5-7],采用正交试验优选提取工艺。

1 材料

510型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),BS224S型电子分析天平(德国赛多利斯集团),201型电热恒温干燥箱(山东省龙口市先科仪器公司),DF-101S型集热式恒温磁力搅拌器(巩义市英峪仪器厂)。黄芪甲苷、丹酚酸 B 及丹参酮 II_A 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110781-200613,11562-200605,110766-200619),黄芪、丹参药材均购自山东省立医院药剂科中草药房,经本院药剂科主任赵雪梅鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求;甲醇、乙腈、乙酸、甲酸均为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 出膏率的测定 精密吸取浓缩液 50 mL,转移至已称重的干燥蒸发皿中,水浴蒸至近干,置烘箱中干燥至恒重,计算出膏率。

2.2 丹参酮 II_A 的含量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2%乙酸(B)梯度洗脱(0~15 min, 55%~70% A; 15~30 min, 70%~85% A; 30~35 min, 85%~90% A),检测波长 270 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 20 ℃,进样量 20 μL。理论塔板数以丹参酮 II_A 峰计算不低于 2 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮 II_A 对照品适量,加甲醇溶解,制成 120 mg·L⁻¹ 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取醇提液 50 mL,干燥后研细,精密称定,置棕色具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(250 W, 33 kHz)20 min,取出,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,置棕色瓶中,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9 mL, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得系列对照品溶液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,

峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 46\ 858X + 8\ 592.9$ ($R^2 = 0.999\ 8$),线性范围 12.0~108 mg·L⁻¹。

2.3 丹酚酸 B 的含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-2%甲酸(30:10:60),检测波长 286 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,进样量 10 μL。理论塔板数以丹酚酸 B 峰计算不低于 2 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取丹酚酸 B 对照品适量,加 75% 甲醇溶解,制成 7.04 g·L⁻¹ 的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 取醇提液 50 mL,干燥后研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,加热回流 1 h,放冷,称定质量,用 75% 甲醇补足减失的质量,摇匀,即得。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加 75% 甲醇定容,摇匀,得系列对照品溶液,分别按 2.3.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 11\ 056X + 12\ 235$ ($R^2 = 0.999\ 7$),线性范围 70.4~422.4 mg·L⁻¹。

2.4 黄芪甲苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-水(5:35:60),检测波长 203 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,进样量 20 μL。理论塔板数以黄芪甲苷峰计算不低于 4 000。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇溶解,制成每 1 mL 含 1.25 mg 的溶液,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 取水提液 100 mL,干燥得干膏,研细,精密称定,加水 40 mL,微热使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次,每次 30 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 2 次,每次 30 mL,用水洗涤 2 次,每次 30 mL,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 2.5 mL 使溶解,即得。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9 mL, 分别加甲醇定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,得系列对照品溶液,分别按 2.4.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 5\ 847.6X + 28\ 215$ ($R^2 = 0.999\ 4$),线性范围内 0.125~1.125 g·L⁻¹。

2.5 正交试验优选

2.5.1 醇提工艺 在预试验基础上,选择乙醇体积

分数、提取次数、乙醇用量为考察因素,以丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 质量分数、出膏率为评价指标,称取 1/10 处方量的丹参等药味 9 份,每份 5.5 g,加入一定体积分数乙醇浸泡 30 min,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,因素水平见表 1,得提取液,浓缩至 100 mL,备用,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3~5。

表 1 芪丹颗粒中丹参等药味醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取数/次	C 乙醇用量/倍
1	90	1(2 h)	6
2	75	2(2,1 h)	8
3	60	3(2,1,1 h)	10

表 2 芪丹颗粒中丹参等药味醇提工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	丹参酮 II _A	丹酚酸 B	出膏率
1	1	1	1	1	0.335 2	0.216 4	20.89
2	1	2	2	2	0.370 2	0.355 6	21.15
3	1	3	3	3	0.371 5	0.462 6	25.69
4	2	1	2	3	0.480 7	0.728 5	20.69
5	2	2	3	1	0.370 2	0.796 1	31.93
6	2	3	1	2	0.490 3	0.896 0	39.95
7	3	1	3	2	0.529 4	1.038 4	33.76
8	3	2	1	3	0.535 4	1.357 1	38.71
9	3	3	2	1	0.448 5	1.060 4	40.44
丹参酮 II _A	K ₁	0.359	0.448	0.454	0.385		
	K ₂	0.447	0.425	0.433	0.463		
	K ₃	0.504	0.437	0.424	0.463		
	R	0.145	0.023	0.030	0.078		
丹酚酸 B	K ₁	0.345	0.661	0.823	0.691		
	K ₂	0.807	0.836	0.715	0.763		
	K ₃	1.152	0.806	0.766	0.849		
	R	0.807	0.175	0.108	0.158		
干膏率	K ₁	22.58	25.11	33.18	31.09		
	K ₂	30.86	30.60	27.43	31.62		
	K ₃	37.64	35.36	30.46	28.363		
	R	15.06	10.25	5.76	3.257		

表 3 丹参酮 II_A 质量分数方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.032	2	0.016	32.000	<0.05
B	0.001	2	0.000 5	1.000	>0.05
C	0.001	2	0.000 5	1.000	>0.05
D(误差)	0.00	2			

注: F_{0.05}(2,2) = 19.0(表 4,5,8,9 同)。

表 4 丹酚酸 B 质量分数方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.984	2	0.492	25.895	<0.05
B	0.053	2	0.026 5	1.395	>0.05
C	0.018	2	0.09	0.474	>0.05
D(误差)	0.040	2			

表 5 干膏率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	341.330	2	170.665	18.645	>0.05
B	157.750	2	78.875	8.617	>0.05
C	49.757	2	24.878	2.718	>0.05
D(误差)	18.31	2	9.153		

由直观分析,以丹参酮 II_A 质量分数为评价指标,各因素影响醇提工艺的顺序为 A > C > B; 以丹酚酸 B 质量分数和干膏率为指标,各因素影响醇提工艺的顺序则为 A > B > C。方差分析表明 A 因素对丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 质量分数影响显著,其他因素则对醇提工艺无显著影响,结合生产实际考虑,确定最佳醇提工艺为 A₃B₂C₁,即加 6 倍量 60% 乙醇

回流提取 2 次,提取时间分别为 2,1 h。

2.5.2 水提工艺 称取 1/10 处方量的黄芪等药味各 9 份,每份 14.7 g,加水浸泡 30 min,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,提取液浓缩至 100 mL,备用。选择煎煮时间、煎煮次数、加水量为考察因素,以黄芪甲苷提取量和出膏率为评价指标,因素水平见表 6,试

表 6 芪丹颗粒中黄芪等药味水提工艺正交试验因素水平

水平	A 煎煮时间/h	B 煎煮数/次	C 加水量/倍
1	1.0	1	8
2	1.5	2	10
3	2.0	3	12

验安排及结果见表 7,方差分析见表 8,9。

表 7 芪丹颗粒中黄芪等药味水提工艺正交试验安排及直观分析

No.		A	B	C	D(空白)	黄芪甲苷/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	出膏率/%
1		1	1	1	1	1.997	30.24
2		1	2	2	2	2.555	37.65
3		1	3	3	3	3.489	45.24
4		2	1	2	3	2.109	30.34
5		2	2	3	1	2.553	38.98
6		2	3	1	2	3.413	44.97
7		3	1	3	2	2.014	33.48
8		3	2	1	3	2.563	39.46
9		3	3	2	1	3.526	46.24
黄芪甲苷	K_1	2.680	2.040	2.658	2.692		
	K_2	2.692	2.557	2.730	2.661		
	K_3	2.701	3.476	2.685	2.720		
	R	0.021	1.436	0.072	0.059		
出膏率	K_1	37.710	31.353	38.223	38.487		
	K_2	38.097	38.697	39.233	38.700		
	K_3	39.727	45.483	38.077	38.347		
	R	2.017	14.130	1.156	0.353		

表 8 黄芪甲苷提取量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.001	2	0.000 5	0.20	>0.05
B	3.174	2	1.586 5	634.80	<0.05
C	0.008	2	0.004	1.60	>0.05
D(误差)	0.010	2			

表 9 出膏率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	6.873	2	3.437	36.174	>0.05
B	299.640	2	149.82	1 577.053	<0.05
C	2.379	2	1.190	12.521	>0.05
D(误差)	0.19	2			

由直观分析可知,各因素对黄芪甲苷提取量的影响顺序为 $B > C > A$,对出膏率的影响顺序则为 $B > A > C$ 。方差分析表明因素 B 对水提取工艺的影响显著,其他因素则无显著影响,选择提取条件组合

为 $A_3B_3C_2$,但结合生产实际考虑,确定最佳水提取工艺为 $A_3B_2C_2$,即加 10 倍量水煎煮 2 次,每次 1.5 h。

2.6 验证试验 分别称取醇提组、水提组药味共 3 份,分别按优选的工艺条件提取,结果醇提工艺中丹参酮 II_A 质量分数分别为 0.598%,0.592%,0.606%,丹酚酸 B 质量分数分别为 1.207%,1.233%,1.205%,干膏率分别为 40.83%,41.56%,40.74%;水提工艺中黄芪甲苷提取量分别为 3.460,3.394,3.369 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,出膏率分别为 43.02%,43.28%,43.81%,说明优选的工艺条件稳定可行。

3 讨论

丹参酮 II_A 含量测定的流动相开始采用文献中甲醇-水系统^[8-9],但分离效果不佳,色谱峰前沿变形导致分离度降低。通过预试验考察,最后确定流动相为乙腈-0.2%乙酸梯度洗脱,峰形得以明显改善。

响应面法优化雷公藤中雷公藤甲素的超声提取工艺

朱锡龙, 王兵, 杨光毅, 魏梨霞, 纪晓玲, 蔡慧真, 褚克丹*

(福建中医药大学, 福州 350108)

[摘要] 目的: 优选雷公藤中雷公藤甲素的超声提取工艺。方法: 以雷公藤甲素得率为指标, 采用响应面设计考察料液比、乙醇体积分数、超声时间及超声温度对雷公藤甲素提取工艺的影响。采用 HPLC 测定雷公藤甲素含量, 流动相乙腈-水 (33:67), 检测波长 218 nm。结果: 最佳提取工艺为料液比 1:12, 乙醇体积分数 70%, 提取温度 35 ℃, 提取时间 30 min; 雷公藤甲素得率达 0.037 9 mg·g⁻¹, 与模型预测值 (0.038 6 mg·g⁻¹) 较为接近。结论: 优选的超声提取工艺稳定可靠, 与常规回流提取法相比优势明显。

[关键词] 雷公藤; 雷公藤甲素; 超声提取工艺; 响应面设计

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0008-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070008

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000013.html>

[网络出版时间] 2014-01-21 9:10

Optimization of Ultrasonic Extraction Process for Triptolide from *Tripterygium wilfordii* by Response Surface Methodology

ZHU Xi-long, WANG Bing, YANG Guang-yi, WEI Li-xia, JI Xiao-ling, CAI Hui-zhen, CHU Ke-dan*
(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[收稿日期] 20131107(019)

[基金项目] “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAI01B05);福建省科技厅重大专项(2009YZ0001-1-1);国家级大学生创新创业训练计划项目(201310393018)

[第一作者] 朱锡龙,在读硕士,从事中药炮制及质量控制研究, Tel:13799395036, E-mail:121767305@qq.com

[通讯作者] *褚克丹,主任中医师,教授,博士生导师,从事中药制剂及质量控制研究, Tel:0591-22861661, E-mail:chukd5917@163.com

考察丹酚酸 B 的含量测定时^[10], 流动相条件均采用 2010 年版《中国药典》“丹参”项下方法中甲醇-乙腈-甲酸-水 (30:10:59:1), 但为方便起见, 将流动相调为甲醇-乙腈-2% 甲酸 (30:10:60), 显示色谱峰分离效果较好。

[参考文献]

[1] 林渊, 周良良, 吴水生. 对中药汤剂剂型改革研究的思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 264.
[2] 罗彩莲. 传统中药汤剂与免煎中药饮片的对比[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(1): 24.
[3] 文荣学, 秦德明. 中药汤剂改革刍议[J]. 中国保健营养, 2013, 23(2): 943.
[4] 王东青, 张亚丽. 浅议中药汤剂制备过程中存在的问题[J]. 国医论坛, 2013, 28(2): 57.

[5] 徐忠坤, 郭传宝, 殷洪梅, 等. 正交试验优化羌黄祛痹颗粒处方药材醇提工艺[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1764.
[6] 欧阳春华. 芪丹颗粒提取最佳工艺的研究[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(16): 23.
[7] 唐安福, 崔恩忠, 汤湜. 气血双补口服液的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 51.
[8] 于百青, 杨敏, 孙鹏云. 高效液相色谱法测定心舒丸中丹参酮 II_A 含量[J]. 中国药业, 2012, 21(13): 36.
[9] 侯广杰. HPLC 法测定丹参舒心胶囊中丹参酮 II_A 的含量[J]. 安徽医药, 2012, 16(4): 469.
[10] 程月发, 蓝建芳, 张珺, 等. 参胶囊中丹参酮 II_A 及丹酚酸 B 含量测定方法研究[J]. 齐鲁药事, 2012, 31(7): 397.

[责任编辑 仝燕]