

## 补心软脉颗粒的提取纯化工艺优选

范玲<sup>1</sup>, 李爽<sup>1</sup>, 马兴苗<sup>1</sup>, 钱玉良<sup>2</sup>, 刘志辉<sup>2</sup>, 严冬<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

**[摘要]** **目的:** 优选补心软脉颗粒的提取纯化工艺。**方法:** 以红景天苷转移率和浸膏得率为综合评价指标, 选取加水量、提取时间和提取次数为考察因素, 采用正交试验法优选补心软脉颗粒中红景天等 5 味药材饮片的水提取工艺; 以总黄酮醇苷转移率为指标, 采用单因素试验考察银杏叶的醇提工艺; 以红景天苷的转移率和除杂率为指标, 采用单因素试验考察补心软脉颗粒水提液的醇沉工艺。**结果:** 优选的水提工艺为红景天等 5 味加 8 倍量水提取 3 次, 每次 0.5 h; 优选的醇提工艺为银杏叶加 10 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1 h; 优选的醇沉工艺为水提液浓缩至相对密度 1.10~1.15, 缓缓加入 95% 乙醇至含醇量 70%, 边加边搅拌, 冷处静置 24 h。**结论:** 该优选的提取纯化工艺简便易行, 为补心软脉颗粒的大生产提供实验依据。

**[关键词]** 补心软脉颗粒; 正交试验; 单因素试验; 红景天; 银杏叶

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0032-04

## Optimization of Extraction and Purification Technology for Buxin Ruanmai Granule

FAN Ling<sup>1</sup>, LI Shuang<sup>1</sup>, MA Xing-miao<sup>1</sup>, QIAN Yu-liang<sup>2</sup>, LIU Zhi-hui<sup>2</sup>, YAN Dong<sup>1\*</sup>

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction and purification technology of Buxin Ruanmai granule. **Method:** With transfer rate of salidroside and yield of extract as comprehensive evaluation indexes, the amount of water, extraction time and extraction times were chosen as investigated factors, orthogonal design was used to optimize water extraction process of *Rhodiola crenulata* and four other Chinese herbal pieces from Buxin Ruanmai granule; With transfer rate of total flavonol glycoside as index, ethanol extraction technology of *Ginkgo biloba* piece was investigated by single factor test; With transfer rate and cleaning rate of salidroside as indexes, alcohol precipitation technology of water extraction liquid from Buxin Ruanmai granule was optimized by single factor test. **Result:** Optimized water extraction technology of *R. crenulata* and four other Chinese herbal pieces was: extracted 3 times with 8 times the amount of water, 0.5 h each time; Optimized alcohol extraction technology was: extracted 2 times with 10 times the amount of 70% ethanol, 1 h per time; Optimal alcohol precipitation conditions were as follows: water extraction liquid concentrated to its relative density of 1.10-1.15, slowly added 95% ethanol until the concentration of ethanol of 70%, stirring at the same time, precipitated 24 h in cold. **Conclusion:** This optimized technology was simple, it could provide experimental basis for large-scale production of Buxin Ruanmai granule.

**[Key words]** Buxin Ruanmai granule; orthogonal test; single factor test; *Rhodiola crenulata*; *Ginkgo biloba*

**[收稿日期]** 20120615(010)

**[基金项目]** 江苏省科技支撑计划-社会发展项目(BE2011816)

**[第一作者]** 范玲, 在读硕士, Tel:13770596786, E-mail:fl861031@126.com

**[通讯作者]** \* 严冬, 硕士生导师, 从事中医临床及中药新药开发研究, Tel:025-86529291, E-mail:y12d12@163.com

补心软脉颗粒来源于江苏省中医院临床经验方,由红景天、麦冬、山萸肉、银杏叶等6味中药组成,具有补益心肾、化痰通络之功效,临床上用于治疗冠心病气阴两虚夹有瘀血者。方中红景天为君药,其主要有效成分为红景天苷<sup>[1]</sup>。本研究以红景天苷转移率、浸膏得率和除杂率为指标,分别采用正交试验和单因素试验考察红景天、麦冬、山茱萸、虎杖、水蛭5味饮片的水提工艺和醇沉工艺条件;同时以总黄酮醇苷转移率为指标,采用单因素试验研究银杏叶的醇提工艺条件。

## 1 材料

Agilent1100型高效液相色谱仪(美国安捷伦),BP-211D型电子分析天平(德国赛多利斯公司),101-1A型数显电热鼓风干燥箱(上海沪南科学仪器联营厂)。

红景天等饮片均购于安徽协和成药业饮片有限公司,经江苏省中医院刘志辉主任中药师检验均符合2010年版《中国药典》一部相关项下要求和规定;槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号0081-9304),山奈素、异鼠李素、红景天苷的对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为100812,110724,100826),甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法和结果

### 2.1 水提工艺优选

**2.1.1 浸膏得率的测定** 精密吸取水提取液10 mL,置于蒸发皿中,水浴蒸干,105℃干燥3 h,置干燥器中冷却30 min,迅速称定质量,计算浸膏得率。

$$\text{浸膏得率} = [W \times V / (M \times 10)] \times 100\%$$

$W$ 为浸膏质量; $V$ 为样品液体积; $M$ 为饮片质量)。

### 2.1.2 红景天苷含量测定

**2.1.2.1 色谱条件与系统适应性试验** HEDERA-ODS-2 C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(15:85),流速1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,检测波长275 nm。

**2.1.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取红景天苷对照品9.07 mg,置于25 mL量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

**2.1.2.3 标准曲线绘制** 取上述红景天苷对照品贮备液,分别加甲醇稀释成362.80, 181.40, 145.12, 72.56, 36.28 mg·L<sup>-1</sup>的对照品溶液,进样10 μL,测定峰面积值,以峰面积值对红景天苷的进样量进行线性回归,得回归方程  $Y = 2.777X + 5.224$

( $r = 1.000$ ),结果表明在0.3628 ~ 3.628 μg与峰面积值呈良好线性关系。

**2.1.2.4 供试品溶液的制备** 精密吸取已定容的水提取液5 mL置25 mL量瓶中,甲醇定容,摇匀,0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.1.2.5 含量测定** 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定水提液中红景天苷含量,计算其转移率。

转移率 = 供试品溶液中红景天苷含量/红景天饮片中红景天苷含量 × 100%。

**2.1.3 正交试验设计** 采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验法,选定加水量、提取时间、提取次数为考察因素,每个因素各设3个水平,因素水平见表1。按处方比例称取红景天等5味饮片,根据表2安排进行提取,滤过,滤液加水稀释至500 mL,摇匀,备用。取水提液适量,分别测定红景天苷含量及浸膏得率。方差分析见表3。

表1 红景天等5味饮片水提工艺优选正交试验因素水平

水平	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取数/次
1	8	0.5	1
2	10	1	2
3	12	1.5	3

表2 红景天等5味饮片水提工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	红景天 苷转移 率/%	浸膏得 率/%	综合 评分
1	1	1	1	1	48.84	16.53	69.52
2	1	2	2	2	64.37	32.46	75.88
3	1	3	3	3	92.39	43.65	91.86
4	2	1	2	3	72.36	29.43	82.11
5	2	2	3	1	90.19	42.44	90.69
6	2	3	1	2	70.36	28.68	80.93
7	3	1	3	2	88.28	37.95	90.70
8	3	2	1	3	60.17	25.10	74.88
9	3	3	2	1	74.87	39.29	80.91
K <sub>1</sub>	237.26	242.33	225.33	241.12			
K <sub>2</sub>	253.73	241.45	238.90	247.51			
K <sub>3</sub>	246.49	253.70	273.25	248.85			
R	5.49	4.08	15.97	2.58			

注:综合评分 = 浸膏得率评分 + 转移率评分;浸膏得率评分 = 权重系数(0.3) × (100 + 最小浸膏得率 - 浸膏得率);转移率评分 = 权重系数(0.7) × (100 - 最大红景天苷转移率 + 红景天苷转移率)。

由直观分析可知,三因素的主次顺序为C > A > B,初步确定最佳提取工艺条件为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>;由表3可知,B因素对红景天苷转移率有显著性影响,A,C因素对红景天苷转移率无显著性影响,结合成本考虑,

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	45.43	2	22.72	3.99	
B	31.12	2	15.56	2.74	
C	406.71	2	203.36	35.75	<0.05
D(误差)	11.38	2	5.69		

注： $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99。$

最终优选的水提取工艺为  $A_1B_1C_3$ ，即 8 倍量水提取 3 次，每次 0.5 h。

**2.1.4 验证试验** 按处方比例称取红景天等饮片 3 份，按优选的水提工艺条件进行 3 次重复试验，测定提取液中红景天苷转移率分别为 88.02%，84.23%，87.86%；浸膏得率分别为 37.98%，36.67%，38.29%。表明优选的工艺稳定性良好。

## 2.2 银杏叶醇提工艺优选

### 2.2.1 总黄酮醇苷含量测定

**2.2.1.1 色谱条件与系统适应性试验** HEDERA-ODS-2  $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)，流动相 甲醇-0.4% 磷酸水 (50:50)，流速 1 mL·min<sup>-1</sup>，柱温 30 ℃，检测波长 360 nm。

**2.2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取对照品槲皮素 5.64 mg，山奈素 6.85 mg，异鼠李素 3.27 mg 置于 50 mL 量瓶中，用甲醇定容，即得混标母液。分别精密吸取 2, 3, 4, 5 mL 混标母液于 10 mL 量瓶中，加甲醇定容，即得一系列质量浓度的混合对照品稀释液。

**2.2.1.3 标准曲线的绘制** 精密吸取混合对照品稀释液 5 μL，以峰面积为纵坐标，槲皮素、山奈素、异鼠李素进样量为横坐标，得槲皮素回归方程  $Y = 3737.5X + 10.5 (r = 0.9994)$ ，结果表明在 0.0845 ~ 0.5636 μg 与峰面积值呈良好线性关系；山奈素回归方程  $Y = 4153.7X - 8.8859 (r = 0.9996)$ ，结果表明在 0.1027 ~ 0.6848 μg 与峰面积值呈良好线性关系；异鼠李素回归方程  $Y = 3375.1X + 4.6 (r = 0.9994)$ ，结果表明在 0.049 ~ 0.327 μg 与峰面积值呈良好线性关系。

**2.2.1.4 供试品溶液的制备** 精密吸取 25 mL 醇提液，加入 5 mL 25% HCl 水解 60 min，水解液冷却，甲醇定容至 50 mL，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

**2.2.1.5 样品测定** 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 μL，注入液相色谱仪，测定醇提液中总黄酮醇苷含量，计算其转移率。

### 2.2.2 单因素试验考察

**2.2.2.1 粉碎度考察** 精密称取银杏叶饮片、粗粉、细粉各 10 g，用 10 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次，每次 1 h，合并提取液，按 2.2.1.4 项下方法制备供试品，按 2.2.1.1 项下方法测定总黄酮醇苷含量。结果总黄酮醇苷转移率分别为 55.89%，57.45%，58.89%，说明饮片粉碎度对总黄酮醇苷的转移率影响不大，故选择银杏叶饮片进行提取。

**2.2.2.2 乙醇体积分数考察** 取银杏叶 10 g，分别用 10 倍量水，30% 乙醇，50% 乙醇，70% 乙醇，95% 乙醇回流提取 2 次，每次 1 h，合并提取液，按 2.2.1.4 项下方法制备供试品，按 2.2.1.1 项下方法测定总黄酮醇苷含量。结果总黄酮醇苷转移率分别为 50.45%，67.80%，78.46%，88.45%，53.71%，说明总黄酮醇苷的转移率随乙醇体积分数增加而先增加后减少，当乙醇体积分数为 70% 时，转移率达到最大。

**2.2.2.3 加醇量考察** 取银杏叶 10 g，分别用 8, 10, 12, 15, 20 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次，每次 1 h，合并提取液，按 2.2.1.4 项下方法制备供试品，按 2.2.1.1 项下方法测定总黄酮醇苷含量。结果总黄酮醇苷转移率分别为 80.54%，87.10%，88.79%，89.01%，89.86%。说明总黄酮醇苷的转移率随乙醇用量的增加而增加，当乙醇用量 > 10 倍时，转移率变化不大。

**2.2.2.4 提取时间考察** 取银杏叶 10 g，分别用 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次，每次提取时间分别为 0.5, 1, 1.5, 2 h，合并提取液，按 2.2.1.4 项下方法制备供试品，按 2.2.1.1 项下方法测定总黄酮醇苷含量。结果总黄酮醇苷转移率分别为 70.10%，89.34%，90.65%，90.97%。说明总黄酮醇苷转移率随提取时间增加而增加，但当提取时间 > 1 h 时，增加提取时间，总黄酮醇苷的转移率变化不大。

**2.2.2.5 提取次数考察** 取银杏叶 10 g，分别用 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次，每次 1 h，提取液分次收集，按 2.2.1.4 项下方法制备供试品，按 2.2.1.1 项下方法测定总黄酮醇苷含量。结果总黄酮醇苷的转移率分别为 50.81%，37.36%，5.98%。故选择提取 2 次。

**2.2.2.6 验证试验** 取银杏叶 10 g，加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次，每次 1 h，合并提取液，按 2.2.1.4 项下方法制备供试品，按 2.2.1.1 项下方法测定总黄酮醇苷含量。结果总黄酮醇苷转移率分别为 89.52%，88.76%，85.69%，表明优选的工艺稳定性良好。

## 2.3 水提液醇沉工艺考察

**2.3.1 除杂率测定** 精密吸取水提取液 10 mL,置于蒸发皿中,水浴蒸干,105 ℃干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速称定质量,计算除杂率。

除杂率 = 醇沉前药液浸膏得率 - 醇沉后药液浸膏得率。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 精密量取一定体积的醇沉液,水浴挥去乙醇,残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL,微孔滤膜滤过,即得。

### 2.3.3 水提液醇沉条件的考察

**2.3.3.1 醇沉体积分数考察** 取水提液适量,浓缩至相对密度 1.10 左右的浸膏,分别加入 95% 乙醇至乙醇体积分数为 50%,60%,70%,80%,冷处静置 24 h,滤过。按 2.1.2.4 项下方法制备供试品,按 2.1.2.1 项下方法测定红景天苷含量,结果红景天苷转移率分别为 70.51%,81.26%,88.94%,85.34%;干浸膏得率依次为 30.5%,29.58%,23.63%,19.24%;除杂率分别为 7.15%,8.07%,14.02%,18.41%。说明随醇沉体积分数增加,除杂率逐渐增高,70% 乙醇沉淀时,红景天苷的转移率最高,除杂率亦较高。

**2.3.3.2 浸膏相对密度考察** 精密量取一定体积水提液,分别浓缩至相对密度 1.08,1.14,1.19(60 ℃),缓缓加入 95% 乙醇,边加边搅拌至含醇量 70%,冷处静置 24 h,滤过。按 2.1.2.4 项下方法制备供试品,按 2.1.2.1 项下方法测定红景天苷含量,结果红景天苷转移率分别为 90.06%,85.36%,83.74%;干浸膏得率分别为 32.7%,23.98%,22.27%;除杂率分别为 4.95%,13.67%,15.38%。说明随浸膏相对密度增大,红景天苷转移率依次降低,除杂率逐渐升高。结合实际生产条件和成本,确定浸膏浓缩至相对密度为 1.10~1.15。

**2.3.4 验证试验** 将水提液浓缩至相对密度 1.10~1.15,缓缓加入 95% 乙醇至含醇量 70%,边加边搅拌,冷处静置 24 h。按 2.1.2.4 项下方法制备供试品,按 2.1.2.1 项下方法测定红景天苷含量。结果红景天苷转移率分别为 87.35%,85.98%,83.73%;除杂率分别为 13.85%,13.09%,13.53%。表明优选的工艺稳定性良好。

## 3 讨论

方中红景天主要有效成分是红景天苷,其对心肌缺血再灌注损伤有一定的保护作用,具有增强心肌收缩力、加速心肌的收缩速度、降低平均动脉压的作用<sup>[3]</sup>。对异丙基肾上腺素引起的大鼠心肌缺血具有显著的保护作用、减轻心肌细胞的损伤、改善心

脏之功能<sup>[4]</sup>。麦冬的主要有效成分为麦冬多糖和麦冬皂苷,具有抗心肌缺血和心肌梗死作用;山茱萸主要有效成分为山茱萸总苷,是强心的有效成分;水蛭的主要有效成分是水蛭素,具有抗凝血作用;虎杖的主要有效成分是虎杖苷,对动物的冠状动脉、肺动脉和脑血管等都有扩张作用。以上各种成分的水溶性均很好,故红景天等 5 味采用水提。

红景天等 5 味水提取次数对红景天苷的转移率有显著性影响。在优选水提工艺中其他参数不变的情况下,提取 3,4 次的红景天苷转移率分别为 86.70%,88.51%,结果差异不大,故从生产成本考虑,将水提次数定为 3 次。

红景天浸膏得率是评价水提取效率的传统手段,兼顾上述 2 个关键指标,权重系数定位 0.7,0.3,具有较高的合理性和准确度。

中药醇沉的影响因素主要有醇沉体积分数、浸膏密度、乙醇用量和所用乙醇体积分数、药液温度、加醇方式、醇沉时间等<sup>[5]</sup>。实际生产中醇沉体积分数和浸膏密度对醇沉效果影响较大,故选择二者作为水提液醇沉工艺的工艺参数,采用单因素试验法进行优选。切记在加入乙醇时要注意快速搅动药液,缓缓加入乙醇,以避免局部醇浓度过高造成有效成分被包裹损失;沉淀用乙醇(与药液中乙醇体积分数相同)洗涤,可减少有效成分在沉淀中包裹损失;沉淀液要密闭冷藏,可防止乙醇挥发,促进析出沉淀的沉降,便于滤过操作;醇沉时要等待浓缩液冷却后方可加入乙醇,以免乙醇受热挥发损失<sup>[6]</sup>。

## [参考文献]

- [1] 刘孟华,李沛波,苏薇薇.红景天化学成分及其药理作用研究进展[J].中南药学,2006,4(6):463.
- [2] 陈小明,徐超群.红景天中红景天苷提取工艺的研究[J].华西药理学杂志,2010,25(3):329.
- [3] Mo S R, Lu B, Liang F. Effect of *Rhodiola sacra* SH Fu on hear, hemodynamics and myocardial contractility [J]. Chin J Clin Rehabilitation, 2005, 9 (1):204.
- [4] 姜敏辉,吴翔,曹卫军.红景天对心肌缺血损伤保护作用的实验研及临床应用[J].江苏医药,2005,31(5):369.
- [5] 肖琼,沈平孀.中药醇沉工艺的关键影响因素[J].中成药,2005,27(2):143.
- [6] 侯林中,张熙洁.正交试验优选宽心口服液醇沉工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):32.

[责任编辑 全燕]