

白花丹参提取工艺优选

董美虹^{1,2}, 王锦玉¹, 仝燕^{1*}, 李艳玲^{1,2}, 杨德斌^{1,2}, 马振山¹, 王琳¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 天津中医药大学, 天津 300073)

[摘要] 目的: 优选白花丹参提取工艺。方法: 以丹酚酸 B、总丹酚酸、丹参酮 II_A 及总丹参酮含量为指标, 采用高效液相色谱法、紫外-可见分光光度法及比色法测定指标成分含量, 选取乙醇体积分数、提取时间、加醇量、药材粒度和提取次数等为考察因素, 采用正交试验法优选白花丹参乙醇回流提取工艺。结果: 最佳提取工艺为白花丹参切段后用 10 倍量 60% 乙醇提取 3 次, 每次 2 h。结论: 优选工艺对白花丹参药材中的脂溶性成分和水溶性成分均有较高提取率, 且稳定、节能。

[关键词] 白花丹参; 丹参酮 II_A; 丹酚酸 B; 丹参酮; 总丹酚酸; 提取工艺; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0018-04

Optimization of Extraction Technology of *Salvia miltiorrhiza*

DONG Mei-hong^{1,2}, WANG Jin-yu¹, TONG Yan^{1*}, LI Yan-ling^{1,2},
YANG De-bin^{1,2}, MA Zhen-shan¹, WANG Lin¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300073, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of *Salvia miltiorrhiza*. **Method:** With the content of salvianolic acid B, total salvianolic acid, tanshinone II_A, total tanshinone as indexes, the content of index ingredients were determined by HPLC, UV spectrophotometry and colorimetry, ethanol refluxing extraction technology was optimized by orthogonal test with taking the concentration of ethanol, extraction time, the amount of ethanol, size of material and extraction times as factors. **Result:** Optimum extraction technology was: *S. miltiorrhiza* was cut into sections, extracted 3 times with 10 folds the amount of 60% ethanol, 2 hours each time. **Conclusion:** Extraction rate of water-soluble and fat-soluble constituents from *S. miltiorrhiza* was high by optimized technology, and it was stable and energy-saving.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; tanshinone II_A; salvianolic acid B; tanshinone; total salvianolic acid; extraction technology; orthogonal test

白花丹参是唇形科植物丹参的变种^[1], 为山东特有的药用植物, 与普通丹参相比, 其丹参素含量更高, 并对治疗血栓闭塞性脉管炎具有独特疗效。药理学研究表明^[2], 丹参的有效成分主要为脂溶性的菲醌类衍生物和水溶性的酚酸类成分, 前者以丹参

酮 II_A 为代表, 具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等作用; 后者以丹酚酸 B 为代表, 主要作用有抗氧化、抗肝损伤、保护心肌等。为兼顾白花丹参脂溶性及水溶性两类有效成分, 本试验运用比色法和高效液相色谱法, 以丹参酮 II_A、总丹参酮、丹酚酸 B 及总酚酸的含量为指标, 对白花丹参的提取工艺进行优选。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦), UV-2000 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), JA1003 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。

白花丹参药材购于山东, 经中国中医科学院中

[收稿日期] 20120302(005)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-005)

[第一作者] 董美虹, 硕士生, 从事中药制剂研究, Tel: 010-84027721, E-mail: dongmei_hong@126.com

[通讯作者] *仝燕, 研究员, 硕士生导师, 从事中药制剂及新药开发研究, Tel: 010-84027721, E-mail: tongyan1012@sohu.com

药研究所何希荣主管药师鉴定为白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* f. *alba*, 丹酚酸 B (批号 111562-201110)、丹参酮 II_A (批号 110766-200619) 对照品均购于中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法及结果

2.1 含量测定

2.1.1 丹酚酸 B^[3] 按 2010 年版《中国药典》丹参药材项下的方法, HPLC 测定丹参药材及各样品中丹酚酸 B 的含量。流动相甲醇-乙腈-甲酸-水 (30:10:1:59), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 286 nm, 柱温室温。

2.1.2 水溶性酚酸类成分^[4] 采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 显色剂显色法测定, 此法适合于含邻二酚羟基的酚酸化合物含量测定。精密称定丹酚酸 B 对照品 2.84 mg, 用水定容至 10 mL, 制成 0.284 g·L⁻¹ 的丹酚酸 B 对照品溶液。分别吸取对照品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.4, 1.6, 1.8 mL 置于 10 mL 量瓶中, 分别加入 1% NaNO₂ 溶液 2.5 mL, 摇匀, 暗处静置 5 min; 加入 20% Al(NO₃)₃ 溶液 0.25 mL, 摇匀, 暗处静置 5 min; 加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 4.0 mL 并加水至刻度, 摇匀, 暗处静置 15 min。以空白溶液作参比, 于 496 nm 处测定吸光度, 以质量浓度 (C) 为横坐标, 吸光度 (A) 为纵坐标, 得回归方程为 $A = 0.03999C + 0.01551$ ($r = 0.9997$), 丹酚酸 B 在 2.84 ~ 51.12 mg·L⁻¹ 与吸光度呈良好线性关系。

2.1.3 丹参酮 II_A^[3] 按照《中国药典》丹参药材项下 HPLC 测定丹参药材及各样品中丹参酮 II_A 的含量。流动相甲醇-水 (87:13), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm, 柱温室温。

2.1.4 脂溶性丹参酮类成分 丹参酮 II_A 为橘红色粉末, 经全波长扫描, 可见光区最大吸收波长为 461 nm。精密称定丹参酮 II_A 对照品 6.55 mg, 用三氯甲烷定容至 10 mL, 制成 0.655 g·L⁻¹ 的丹参酮 II_A 对照品储备液。分别吸取储备液 0, 0.2, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 摇匀。以空白溶液作参比, 于 461 nm 处测定 A, 以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $A = 0.00904C + 0.0015$ ($r = 0.9997$), 丹参酮 II_A 在 6.55 ~ 117.90 mg·L⁻¹ 与吸光度呈良好线性关系。

2.2 提取工艺优选 根据白花丹参中主要活性成分的化学性质并参考文献[5-7], 选用乙醇回流法提取白花丹参中脂溶性成分和水溶性成分。

2.2.1 提取溶剂及时间考察 准确称取白花丹参

药材 9 份, 每份为 50.0 g, 选取乙醇体积分数、提取时间、加醇量等为考察因素, 按 L₉(3⁴) 正交表设计试验, 固定提取次数为 2 次, 合并提取液, 滤过, 冷却至室温。取 9 份提取液适量至分液漏斗中, 用三氯甲烷萃取后分离出水层、三氯甲烷层, 分别用水、三氯甲烷定容, 备用。取制备好的样品液适量, 按 2.1 项下方法分别测定 4 个指标成分的含量。因素水平见表 1, 试验安排见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 白花丹参乙醇回流提取溶剂及时间
优选正交试验因素水平

水平	A	B	C
	乙醇体积分数/%	提取时间/h	加醇量/倍
1	60	1	6
2	70	1.5	8
3	80	2	10

表 2 白花丹参乙醇回流提取溶剂
及时间优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	提出量/g				综合评分
					丹酚酸 B	总酚酸	丹参酮 II _A	总丹参酮	
1	1	1	1	1	1.41	1.27	0.12	0.31	0.80
2	1	2	2	2	1.47	1.47	0.11	0.37	0.86
3	1	3	3	3	1.77	1.75	0.12	0.43	1.00
4	2	1	2	3	1.11	1.12	0.11	0.38	0.74
5	2	2	3	1	1.35	1.29	0.12	0.43	0.85
6	2	3	1	2	1.36	1.38	0.10	0.36	0.80
7	3	1	3	2	0.61	0.68	0.10	0.32	0.54
8	3	2	1	3	0.64	0.68	0.09	0.34	0.53
9	3	3	2	1	0.83	0.84	0.12	0.37	0.66
K ₁	0.887	0.693	0.710	0.770					
K ₂	0.797	0.747	0.753	0.733					
K ₃	0.577	0.820	0.797	0.757					
R	0.310	0.127	0.087	0.037					

为综合考量提取工艺对 4 个指标的影响, 本试验对测得的丹酚酸 B、总丹酚酸、丹参酮 II_A 及总丹参酮等指标成分含量用权重法进行评分。将 4 个指标中测得的最大值定为 100 分, 其他数据与最大值的比值计算得分。丹酚酸 B、总丹酚酸、丹参酮 II_A、总丹参酮的权重系数分别为 0.3, 0.3, 0.2, 0.2。综合评分 = (丹酚酸 B 提出量 × 0.3) / 1.77 + (总丹酚酸提出量 × 0.3) / 1.75 + (丹参酮 II_A 提出量 × 0.2) / 0.12 + (总丹参酮提出量 × 0.2) / 0.43。

表 3 提取溶剂及时间综合评分方差分析

因素	SS	f	F	P
A	0.153	2	76.500	<0.05
B	0.024	2	12.000	
C	0.011	2	5.500	
D(误差)	0.00	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由表 2,3 可知,3 个因素对提取工艺的影响顺序为 $A > B > C$ 。方差分析结果表明 A 因素对提取工艺结果有显著性影响。综合考虑确定最佳提取工艺为 $A_1B_3C_3$,即用 10 倍量 60% 乙醇提取,每次 2 h。

2.2.2 药材粒度及提取次数考察 为完善提取工艺的优选设计,对提取次数和药材粒度做进一步考察。选择药材粒度、提取次数 2 个影响因素,每个因素设计 2 个水平。准确称取白花丹参药材 4 份,每份 50.0 g,提取液处理同 2.2.1 项下方法,按 2.1 项下方法测定各指标含量。因素水平见表 4,试验安排见表 5,方差分析见表 6。

表 4 白花丹参乙醇回流提取药材粒度及提取次数优选正交试验因素水平

水平	E	F
	药材粒度	提取数/次
1	药材段	2
2	药材粗粉	3

表 5 白花丹参乙醇回流提取时药材粒度及提取次数优选正交试验安排

No.	E	F	G (空白)	提出量/g			综合评分	
				丹酚酸 B	总丹酚酸	丹参酮 II _A		
1	1	1	1	1.82	2.03	0.11	0.41	0.77
2	1	2	2	2.15	2.58	0.12	0.45	0.92
3	2	1	2	2.30	2.44	0.09	0.36	0.83
4	2	2	1	2.50	3.00	0.09	0.40	0.93
K_1	0.845	0.800	0.850					
K_2	0.880	0.925	0.875					
R	0.035	0.125	0.025					

表 6 药材粒度及提取次数综合评分方差分析

因素	SS	f	F	P
E	0.001 2	1	1.96	
F	0.015 6	1	25.00	
G(误差)	0.000 6	1		

注: $F_{0.05}(1,1) = 161.00$ 。

方差分析结果表明 E, F 因素对提取工艺均无显著性影响,结合大生产实际考虑,采用药材切段为宜。提取 2 次与 3 次无显著性影响,但 2 个水平 K 值相差较大,故选择提取 3 次。

综上所述,最终确定白花丹参乙醇回流最佳提取工艺为药材切段,加 10 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次 2 h。

2.3 验证试验 准确称取白花丹参药材 3 份,每份 500.0 g,按上述优选提取工艺进行 3 次验证试验,结果丹酚酸 B 平均提出量为 22.13 g (RSD 2.32%),丹参酮 II_A 平均提出量为 1.23 g (RSD 1.32%),总丹酚酸平均提出量为 24.25 g (RSD 1.38%),总丹参酮平均提出量为 4.42 g (RSD 1.54%)。说明优选工艺稳定、可行。

3 讨论

测定总丹酚酸类成分时,多以原儿茶醛为对照品进行比色法测定。由于白花丹参中原儿茶醛的含量较低,以其为指标不能有效反映样品质量。故本试验选用含量较多的丹酚酸 B 为指标,可更准确地反映总酚酸的变化。

总丹酚酸类成分的测定方法通常有铁氰化钾-三氯化铁显色剂显色法和亚硝酸钠-硝酸铝显色剂显色法^[4,8]。经试验证明,铁氰化钾-三氯化铁显色法显色后溶液稳定性较差,易形成络合物,从而影响测定结果。故本试验选用亚硝酸钠-硝酸铝显色法。由于白花丹参提取液本身颜色与显色后溶液颜色相近,故在显色之前应对药材提取液进行预处理。

丹参酮溶液颜色随成分质量浓度不同而变化,本试验直接在可见光区对其吸光度进行测定,此方法较常用方法(于 270 nm 处测定其吸光度)更加直观、简便、快速,且结果可靠。

由试验结果可知,白花丹参粉碎度越高总丹酚酸的提取效率越高,而总丹参酮的提取效率越低。文献[9-10]研究表明总丹参酮类成分主要集中在根周皮、韧皮部,白花丹参药材在粉碎过程中易对根皮有效成分造成损耗,且粉碎过程在工业大生产中费时费力,经济成本较高。

比色法适用于一类化合物总量的测定,高效液相法则对单一组分的测定精确性较高。本试验既需要考虑单一成分的含量,同时需兼顾两类成分的总含量。故采用 2 种方法各自的优点对白花丹参提取工艺进行考察,可使提取工艺更为合理。

野菊花超声辅助提取工艺优选

张建海¹, 徐晓玉², 冯彬彬^{1*}

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; 2. 西南大学, 重庆 400716)

[摘要] 目的: 优选野菊花提取工艺。方法: 以总黄酮、绿原酸和蒙花苷含量为指标, 采用超声辅助及正交试验优选野菊花水提和醇提工艺, 并与常规回流提取进行比较; 采用 UV 测定总黄酮含量, RP-HPLC 测定绿原酸和蒙花苷含量。结果: 综合 3 个指标, 最佳水提工艺为加 15 倍量水提取 2 次, 每次 30 min, 提取温度 75 ℃; 最佳醇提工艺为 15 倍量 80% 乙醇提取 30 min, 提取温度 70 ℃。结论: 采用醇提工艺提取野菊花时, 总黄酮、绿原酸和蒙花苷得率均较高, 可为野菊花综合开发提供实验依据。

[关键词] 超声辅助提取; 野菊花; 总黄酮; 绿原酸; 蒙花苷; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0021-04

Optimization of Ultrasound-assisted Extraction Technology for *Chrysanthemum indicum*

ZHANG Jian-hai¹, XU Xiao-yu², FENG Bin-bin^{1*}

(1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China;

2. Southwest University, Chongqing 400716, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of *Chrysanthemum indicum*. **Method:** With the content of total flavonoids, chlorogenic acid and linarin as indexes, water extraction and ethanol extraction technology were optimized by ultrasound-assisted and orthogonal test, and compared with conventional reflux extraction; The content of total flavonoids was determined by UV, the content of chlorogenic acid and linarin were

[收稿日期] 20120104(017)

[基金项目] 重庆市“十一五”规划项目(104290-41000307)

[第一作者] 张建海, 硕士, 高级讲师, 从事药用植物种植及有效成分分析研究, Tel:023-58567075, E-mail: zhjh200596@126.com

[通讯作者] * 冯彬彬, 博士, 副教授, 从事中药药理与新药开发研究, Tel:023-58567075, E-mail: fbb200596@126.com

[参考文献]

- [1] 王秀玲. 泰山珍稀濒危植物资源及保护[J]. 国土与自然资源研究, 2001(1): 79.
- [2] 李文喆, 王勇. 丹参药用成分研究进展[J]. 人民军医, 2008, 51(3): 180.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 70.
- [4] 王文祥, 周巧霞, 蒋木岗, 等. 比色法测定丹参及其提取物水溶性总酚的改进[J]. 中草药, 2001, 32(8): 711.
- [5] 杨光义, 叶方, 雷震, 等. 正交试验设计优选丹参仿生集成提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 40.
- [6] 李绍林, 张建军. 丹参提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 45.
- [7] 黄元红, 卫天喜, 张发生, 等. 星点设计-效应面法优选丹参提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 28.
- [8] 李广胜, 王光新, 赵牛和. 丹参口服液中总酚酸性成分的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(8): 683.
- [9] 徐翠红, 舒志明, 王研, 等. 紫花丹参和白花丹参不同器官主要药用成分积累规律研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2129.
- [10] 汪月珍, 聂万松. 丹参皮质部与木质部有效成分含量比较[J]. 儿科药科学杂志, 2004, 10(4): 18.

[责任编辑 全燕]