

## 正交试验优选水提后丹参药渣中丹参酮 II<sub>A</sub> 的提取工艺

刘常青<sup>1</sup>, 何百寅<sup>1</sup>, 冯峰<sup>1</sup>, 谢友良<sup>1,2\*</sup>, 蒋东旭<sup>1,2</sup>, 赖小平<sup>1,2</sup>

(1. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学 中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

**[摘要]** 目的: 探讨水提后丹参药渣中丹参酮 II<sub>A</sub> 的最佳提取工艺条件。方法: 以丹参酮 II<sub>A</sub> 提取率为定量考察指标, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验, 考察了提取时间、提取次数、乙醇倍量及乙醇体积分数对丹参酮 II<sub>A</sub> 提取率的影响。结果: 丹参药渣中丹参酮 II<sub>A</sub> 的最佳提取工艺条件为: 8 倍量 90% 乙醇浸泡 30 min, 回流提取 2 次(85 ℃), 每次 0.5 h, 高效液相色谱法检测, 水提后丹参药渣中丹参酮 II<sub>A</sub> 的提取率约为 91%。结论: 优化的提取条件效率高, 水提后丹参药渣中丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量较高, 提示其可以作为一种丹参酮资源, 具有开发利用的价值。

**[关键词]** 提取率; 丹参酮 II<sub>A</sub>; 水提后丹参药渣; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0032-03

## Study on Extract Process of Tanshinone II<sub>A</sub> in *Salvia miltiorrhiza*

LIU Chang-qing<sup>1</sup>, HE Bai-yin<sup>1</sup>, FENG Feng<sup>1</sup>, XIE You-liang<sup>1,2\*</sup>, JIANG Dong-xu<sup>1,2</sup>, LAI Xiao-ping<sup>1,2</sup>

(1. Research & Development Center of New Drugs, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the best condition to extract tanshinone II<sub>A</sub> in *Salvia miltiorrhiza* by ethanol. **Method:** The optimum condition was determined with L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experiment to arrange experiments with extract rate of tanshinone II<sub>A</sub> as quantitative index. **Result:** The best extraction process condition was: 8 times of 90 percent alcohol immersed for 30 minutes, reflux extraction was two times with each time of 0.5 hour at 85 ℃. The HPLC result showed that the extraction rate of tanshinone II<sub>A</sub> was about 91%. **Conclusion:** Optimized extraction process design is reasonable, reproducible and can increase the reuse of herbs. *Salvia miltiorrhiza* can be served as a kind of tanshinone resource, which has great value of development and utilization.

**[Key words]** extract rate; tanshinone II<sub>A</sub>; *Salvia miltiorrhiza*; orthogonal design

丹参为唇形科丹参植物 *Salvia miltiorrhiza* Bge.

的干燥根及根茎, 有活血化瘀、通经止痛、凉血消肿、清心除烦等功效<sup>[1]</sup>。丹参的主要有效成分为脂溶性丹参酮类和水溶性丹酚酸类。脂溶性丹参酮类主要包括丹参酮 II<sub>A</sub>、丹参酮 I、隐丹参酮、次甲丹参酮等; 水溶性丹酚酸类以丹酚酸 B 为主, 还有丹酚酸 A, C, D, E, F, G, 原儿茶醛、原儿茶酸等<sup>[2-3]</sup>。其中脂溶性成分丹参酮具有天然抗氧化、抗动脉粥样硬化、降低心肌耗氧量及抗菌、抑菌、消炎等作用, 更为重要的是具有明显的抗肿瘤作用<sup>[4-6]</sup>。含丹参的中成药制备常采用水提物, 用于治疗冠心病、心绞痛, 也用于

**[收稿日期]** 20101209(004)

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2009A030901001)

**[第一作者]** 刘常青, 硕士, 从事中药及其新产品研发, Tel: 020-39358183, E-mail: 474420675@qq.com

**[通讯作者]** \* 谢友良, 博士, 助理研究员, 从事中药新药开发研究, Tel: 020-39358183, E-mail: xieyl@gzhtcm.edu.cn

脑血管病、糖尿病、视网膜病、皮肤病的治疗等<sup>[7]</sup>。但是水提取后中药的药渣中还含有丹参脂溶性成分丹参酮等。本试验采用回流提取法,运用正交试验,并通过高效液相测定水提后丹参药渣中丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>的含量,以丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>提取率为考察指标,对丹参药渣中丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>的提取工艺进行优选,旨在为充分利用药渣中的丹参酮类成分提供理论依据。

## 1 仪器与试剂

LC-20A(UV/Vis)高效液相色谱仪( SPD-20A prominence UV/Vis detector,日本岛津公司);HH-4数显电热恒温水浴锅(上海悦丰仪器仪表有限公司),CP225D 1/10万电子天平(sartorius),LE-500型电子天平(佛山市华天力电子天平厂)。

丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>对照品(中国药品生物制品检定所,批号110766-200518),丹参药材购自广州致信药业有限公司,经广州中医药大学新药开发研究中心赖小平研究员鉴定为唇形科植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,甲醇(色谱纯,Merck公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 丹参药渣的制备** 丹参药材加10倍量水回流提取2次,每次1h,药渣滤过后阴干即得丹参药渣。

**2.2 水提后丹参药渣中丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>的含量测定** 取丹参水提后药渣,按《中国药典》2010年版丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>含量测定项下方法测定,得水提后丹参药渣中丹参酮的Ⅱ<sub>A</sub>的含量为0.186%。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 色谱条件** ECOSIL-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(75:25),柱温30℃,检测波长270 nm,流速1.0 min·mL<sup>-1</sup>。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>约5 mg,精密称定(0.005 16 g),置25 mL棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品储备液。

精密吸取对照品储备液2.0 mL置25 mL棕色量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,得丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>对照品溶液(每1 mL含丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 0.016512 mg)。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取水提后丹参药渣约50 g,精密称定,按正交各试验条件回流提取,分别定容至一定体积,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

**2.3.4 线性关系考察** 精密吸取丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>对照品溶液2,4,6,8,10,15,20 μL,注入高效液相色谱

仪,按2.3.1项下色谱测定条件,以峰面积积分值(Y)对进样量(X)进行线性回归,计算得回归方程为 $Y = 6\ 268\ 885.602X + 678.923$ 。丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>进样量线性范围为0.033~0.33 μg。

**2.3.5 精密度试验** 取同一对照品溶液各10 μL,照上述色谱条件,连续重复进样5次,测定峰面积值,得RSD 0.82%,表明仪器精密度良好。

**2.3.6 稳定性试验** 同一份供试品溶液分别隔2 h进样1次,在12 h内测定结果RSD 1.03%(n=6),表明供试品溶液在12 h内稳定。

**2.3.7 重复性试验** 取水提后丹参药渣6份,按正交试验优选的提取条件平行制备6份供试品溶液,各精密吸取5 μL,按2.3.1项下色谱条件测定含量,得丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>的平均提取率为90.9%,RSD 3.27%,表明该方法重复性良好。

**2.3.7 回收率试验** 取已知含量的水提后丹参药渣样品6份,为节约成本,减少标准品的加入量,每份药渣取样约为1 g,精密称定,分别精密加入丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>适量,按正交试验优选的提取条件制备供试品溶液,分别定容至25 mL后,依法进样2 μL,按2.3.1项下色谱条件测定含量,并计算回收率。结果见表1。

表1 水提后丹参药渣中丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>的加样回收率

称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.000 2	1.86	1.79	3.59	96.69	96.70	2.11
1.000 1	1.86	1.93	3.71	95.87		
1.001 0	1.86	1.84	3.68	98.83		
1.000 5	1.86	1.75	3.51	94.23		
1.000 9	1.86	1.92	3.77	99.39		
1.000 6	1.86	1.87	3.64	95.22		

### 2.4 提取工艺条件考察

**2.4.1 正交试验** 根据预试单因素实验结果及参考相关文献[7-9],对影响丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>提取量较大的几个因素:乙醇倍量、乙醇体积分数、提取次数、提取时间进行正交试验设计,每个因素取3个水平设计因素水平表,以水提后丹参药渣中丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>的提取率为评价指标筛选最佳提取工艺。

采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验表安排试验。因素水平表见表2,试验结果见表3,方差分析见表4。

**2.4.2 结果分析** 从直观分析可以看出影响工艺因素大小的次序依次是C>B>D>A,C因素为主

表 2 乙醇提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇用量 /倍	B 乙醇体积 分数/%	C 提取次数 /次	D 提取时间 /h
1	6	70	1	0.5
2	8	80	2	1
3	10	90	3	1.5

表 3 乙醇提取工艺正交试验设计及结果 (n=3)

No	A	B	C	D	丹参酮 II <sub>A</sub> 提取率/%
1	1	1	1	1	35.34
2	1	2	2	2	74.00
3	1	3	3	3	85.96
4	2	1	2	3	75.40
5	2	2	3	1	78.44
6	2	3	1	2	62.49
7	3	1	3	2	52.48
8	3	2	1	3	56.15
9	3	3	2	1	103.34
K <sub>1</sub>	195.30	163.23	153.98	217.12	
K <sub>2</sub>	216.33	208.60	252.75	188.97	
K <sub>3</sub>	211.98	251.79	216.88	217.52	
R	21.03	88.56	98.77	28.54	

表 4 丹参酮 II<sub>A</sub> 提取率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
B	1307.47	2	653.74	15.92	
C	1666.42	2	833.21	20.29	<0.05
D	178.55	2	89.27	2.17	
A(误差)	82.15	2	41.07	1.00	

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

要影响因素, B, D, A 因素次之, 因素最优水平组合为  $A_2B_3C_2D_3$ 。以 A 为误差项的方差分析结果可以看出 C 因素影响具有显著性差异, B, D 因素无显著性影响。从缩短生产周期及节约能源方面考虑, 最优组合为  $A_2B_3C_2D_1$ , 即水提后丹参药渣用 8 倍量 90% 的乙醇浸渍 30 min 后回流提取 2 次 (85 °C), 每次 30 min。

**2.4.3 验证放大试验** 取试药约 500.0 g, 精密称定, 按照正交试验优选的最佳组合  $A_2B_3C_2D_1$  进行验

证, 其结果丹参酮 II<sub>A</sub> 提取率为 90.89%, 与试验结果基本一致。

### 3 讨论

本实验丹参药材中丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量为 0.201%, 水提后丹参药渣中丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量为 0.186%, 水提过程丹参酮 II<sub>A</sub> 转移率约为 7.5%, 提示水提后丹参药渣可作为丹参中脂溶性成分的一种有效资源加以利用; 优选的水提后丹参药渣中丹参酮 II<sub>A</sub> 的提取率约为 91%, 为水提后丹参药渣中脂溶性成分的合理利用提供科学依据, 并为工业生产提供参考, 具有良好的现实意义。

文献[4]表明丹参酮是丹参中具有橙黄色和橙红色特征的脂溶性二萜类化合物, 其中丹参酮 II<sub>A</sub> 是丹参中脂溶性成分的代表, 在预试中发现, 在一定范围内, 随乙醇浓度增加, 丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量随之增加, 并且提取液的颜色由淡黄色逐渐变为橙红色至血红色, 当乙醇浓度达到 90% 时, 颜色变化不再明显。本实验也证实了这一观点。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:70.
- [2] GUO Z J, SU J L, WANG K, et al. Study on extraction Radix Salviae Miltiorrhizae [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2002, 17(2):62.
- [3] 徐丽君, 黄光英. 丹参的化学成分及其药理作用研究概述[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(1):45.
- [4] 蔡丽萍, 习志刚, 杨红. 丹参酮的药理作用和临床研究进展[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(3):321.
- [5] 王冬, 田亚平, 姜英雁, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 抑制 HeLa 细胞生长及诱导凋亡的体外实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(6):676.
- [6] 孙学刚, 贾玉华. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对大鼠缺氧及正常心肌细胞内钙、膜电位和线粒体膜电位的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(9):21.
- [7] 石岭, 鱼红闪, 金凤燮. 丹参药渣中丹参酮的提取研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(9):4539.
- [8] 李伟, 陈兴. 丹参中丹参酮 II<sub>A</sub> 醇提取工艺研究[J]. 中国实用医药, 2010, 5(6):37.
- [9] 陈红霞, 陈芳芳, 颜新宇. 丹参中丹参酮 II<sub>A</sub> 三种提取方法的比较研究[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(4):167.

[责任编辑 全燕]