

正交试验优选丹蒲颗粒的醇提取工艺

崔翰明*, 夏丕芳, 程慧平

(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 优选丹蒲颗粒中丹参和赤芍的醇提取方法及工艺条件。方法: 采用正交试验设计考察不同影响因素和水平对芍药苷和丹参酮 II_A 提取率的影响。结果: 乙醇回流法芍药苷和丹参酮 II_A 的提取率高于渗漉法和超声法, 正交试验筛选出最佳工艺为: 8 倍量的 80% 乙醇, 回流提取 1.5 h, 共提取 3 次。经 3 批试验验证, 对芍药苷和丹参酮 II_A 的提取率分别达到 91.2% ± 4.6%, 89.6% ± 5.2%。结论: 优选的醇提工艺简单、高效, 对芍药苷和丹参酮 II_A 的提取率高。

[关键词] 丹蒲颗粒; 芍药苷; 丹参酮 II_A; 正交试验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)10-0023-03

Study on Extract Technology of Alcohol in Danpu Keli with Orthogonal Design

CUI Han-ming*, XIA Pi-fang, CHENG Hui-ping

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extract technology of Danshen and Chishao in DanPu Keli with orthogonal design. **Method:** The different factors for the extracting rate of paeoniflorin and tanshinone II_A were researched with orthogonal design. **Result:** The reflux method is best one in all methods. The major influencing factors were the followings alcohol quantity, alcohol concentration, extraction time and extraction number. The best extracting technology was that adding eight times alcohol(80%), to reflux 1.5 hour and totally to extract 3 times. Three batches tests showed that the extracting rate of paeoniflorin and tanshinone II_A were 91.2% ± 4.6% and 89.6% ± 5.2%, respectively. **Conclusion:** The optimum extracting condition was simple with a high efficiency.

[Key words] Danpu Keli; paeoniflorin; tanshinone II_A; orthogonal design

丹蒲颗粒处方源于广安门医院泌尿科刘猷枋主任的经验方(原名前列腺汤), 具有活血化瘀、解毒利湿作用。处方中丹参、赤芍为君药。丹参主要脂溶性有效成分为丹参酮类, 如丹参酮 II_A (tanshinone II_A) 等。赤芍药理活性成分主要为单萜苷类, 如芍药苷(paeoniflorin)、氧化芍药苷和芍药新苷等。两类成分均具有较强的脂溶性。因此我们以 HPLC 法测定芍药苷和丹参酮 II_A 的含量, 采用单因素和正交试验设计考察不同工艺、不同影响因素和水平对芍

药苷和丹参酮 II_A 提取率的影响, 筛选丹蒲颗粒中丹参和赤芍脂溶性成分的提取工艺。

1 仪器与材料

LC-10A 液相色谱仪和 SPD-10A 紫外检测器(日本岛津公司); XW-80A 涡旋混合器; ME215P 型分析天平(Sartorius); Agilent TC C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)(安捷伦公司)。丹参药材(产地山东临沂); 赤芍药材(产地内蒙赤峰); 丹参酮 II_A (110766-200417)、芍药苷(110736-200628)对照品购自中国药品生物制品检定所; 药用乙醇, 色谱级甲醇, 高纯水。

2 方法与结果

2.1 芍药苷和丹参酮 II_A 含量测定方法

2.1.1 HPLC 测定条件^[1] 芍药苷的 HPLC 含量测

[收稿日期] 2008-02-13

[通讯作者] * 崔翰明, Tel: (010) 88001470; E-mail: cuiyaoshi@

163.com

定方法: Agilent TC C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(40: 65) 为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm。

丹参酮 II_A 的 HPLC 含量测定方法: Agilent TC

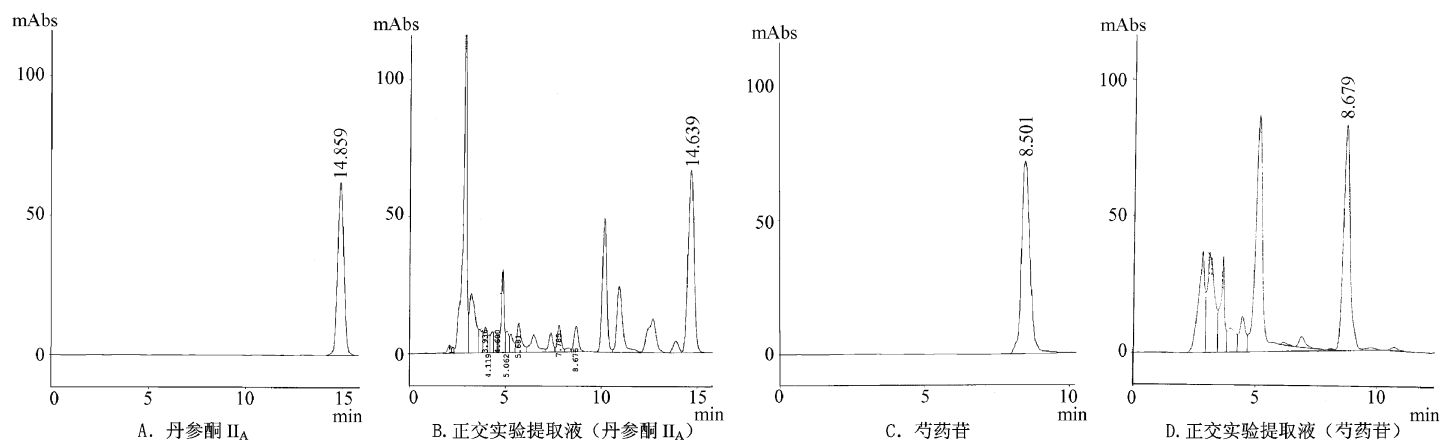


图 1 对照品、供试品中丹参酮 II_A 和芍药苷的色谱图

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥器干燥 36 h 的芍药苷对照品 11.3 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇制成浓度为 1 130 μg·mL⁻¹ 的溶液, 分别精密移取一定量加甲醇稀释, 制成浓度分别为: 565, 226, 113, 56.5, 28.25, 11.3 μg·mL⁻¹ 的芍药苷标准曲线系列溶液。

精密称取丹参酮 II_A 对照品 6.3 mg, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇制成浓度为 630 μg·mL⁻¹ 的溶液, 分别精密移取一定量加甲醇稀释, 制成浓度分别为: 315, 126, 50.4, 25.2, 10.08, 5.04 μg·mL⁻¹ 的丹参酮 II_A 标准曲线系列溶液。

分别按 2.1.1 的 HPLC 色谱条件测定, 进样 5 μL, 记录峰面积。以各自的峰面积 A 和浓度 C 作图, 进行线性回归, 得标准曲线方程, 分别为芍药苷: $A = 1.2 \times 10^4 C + 1.1 \times 10^5$, $R^2 = 0.9993$, 线性范围 (11.3~565) μg·mL⁻¹; 丹参酮 II_A: $A = 2.7 \times 10^4 C + 3.3 \times 10^4$, $R^2 = 0.9995$, 线性范围 (5.04~315) μg·mL⁻¹。

2.1.3 方法精密度考察 分别取浓度为 113, 56.5 μg·mL⁻¹ 的芍药苷和 25.2, 10.08 μg·mL⁻¹ 的丹参酮 II_A, 按 2.1.1 的 HPLC 色谱条件进样 5 μL, 记录峰面积, 根据线性方程计算, 芍药苷浓度分别为 (112.54 ± 2.01) μg·mL⁻¹, (55.54 ± 1.55) μg·mL⁻¹; 丹参酮 II_A 浓度分别为 (23.74 ± 0.54) μg·mL⁻¹, (10.73 ± 0.51) μg·mL⁻¹; n = 3。与配制浓度比较, 芍药苷精密度 (RSD) 分别为 1.78% 和 2.74%, 丹参酮 II_A 精密度

C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-水(75: 25) 为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm。

分别按照 2.1.1 的色谱方法测定对照品、供试品中芍药苷和丹参酮 II_A, 色谱图见图 1。

(RSD) 分别为 2.14% 和 5.06%。

2.1.4 供试液的制备方法 赤芍药材供试品溶液的制备: 精密称取赤芍药材 2.005 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 100 mL, 密塞, 称定重量, 浸泡 4 h 后, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 20 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取滤液作为赤芍药材供试品溶液。

丹参药材供试品溶液的制备: 精密称取丹参药材 0.604 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 100 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为丹参药材供试品溶液。

提取工艺供试品的制备: 取各工艺提取液 2 mL, 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液作为考察提取工艺的供试品溶液。

分别精密吸取上述供试品溶液各 5 μL, 注入 HPLC, 测定峰面积, 代入标准曲线方程计算样品含量, 分别除以药材中的芍药苷和丹参酮 II_A 的含量计算提取百分率。

2.2 正交试验优化提取工艺

2.2.1 正交实验设计 单因素实验结果证明, 回流提取法对芍药苷和丹参酮 II_A 的提取率高于渗漉法和超声法。而影响回流提取芍药苷和丹参酮 II_A 的主要影响因素是乙醇浓度和用量、回流次数和回流时间, 故选择 L₉(3⁴) 正交表设计正交实验, 实验以芍药苷和丹参酮 II_A 的提取率(提取液中芍药苷或丹

参酮 II_A 的总量与投料量中芍药苷或丹参酮 II_A 的总量的比值) 为评价指标, 实验设计见表 1。

表 1 回流提取工艺正交设计的因素和水平表

水平	因素			
	乙醇浓度(%)	提取次数	提取时间(h)	溶剂用量(倍)
1	70	1	1	8
2	80	2	1.5	10
3	95	3	2	12

2.2.2 正交实验结果 按正交试验设计方案进行实验, 合并各次提取液, 测量体积, 取各工艺提取液 2 mL, 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液各 5 μL, 注入 HPLC, 测定峰面积, 代入标准曲线方程计算样品含量, 分别除以总投料药材中的芍药苷和丹参酮 II_A 的含量计算提取百分率, 分别以此为评价指标考察正交提取工艺, 其分析结果分别见表 2。

表 2 正交试验结果直观分析表

实验号	醇浓度 (%)	提取次数	回流时间 (h)	溶剂用量 (倍)	丹参酮 II _A 提取率(A)%	芍药苷提取率(B)%
1	70	1	1	8	56.53	73.07
2	70	2	1.5	10	87.84	72.89
3	70	3	2	12	67.91	72.91
4	80	1	1.5	12	68.89	68.33
5	80	2	2	8	91.19	83.87
6	80	3	1	10	102.76	97.16
7	95	1	2	10	54.61	57.46
8	95	2	1	12	46.92	69.69
9	95	3	1.5	8	93.69	97.29
I _A	70.760	60.010	68.737	80.470		
II _A	87.613	75.317	83.473	81.737		
III _A	65.073	88.120	71.237	61.240		
R _A	22.540	28.110	14.736	20.497		
I _B	72.957	66.287	79.973	84.743		
II _B	83.120	75.483	79.503	75.837		
III _B	74.813	89.120	71.413	70.310		
R _B	10.163	22.833	8.560	14.433		

由直观分析表可见, 提取次数影响最大, 提取时间影响最小, 醇浓度对于丹参酮 II_A 提取率影响较大, 对芍药苷提取率影响较小; 以芍药苷提取率考虑, 最佳工艺是 A₂B₃C₁D₁, 即 8 倍量 80% 乙醇回流提取 3 次, 每次回流 1 h, 其中 1 h(C₁) 与 1.5 h(C₂) 差别很小; 以丹参酮 II_A 提取率考虑, 最佳工艺是 A₂B₃C₂D₂, 即 10 倍量 80% 乙醇回流提取 3 次, 每次回流 1.5 h, 其中 8 倍量(D₁) 与 10 倍量(D₂) 差别很小; 而综合考虑二者, 将工艺定为 A₂B₃C₂D₁; 即 8 倍量 80% 乙醇, 回流提取 1.5 h, 共提取 3 次。

2.3 验证实验 根据正交实验优化后的最佳工艺, 即药材 8 倍量的 80% 乙醇, 回流提取 1.5 h, 共提取 3 次, 进行 3 批验证试验, 测定芍药苷和丹参酮 II_A 的提取率分别为 91.2% ±4.6%, 89.6% ±5.2%, 证明上述工艺合理、可行。

3 讨论

丹参的主要药理活性成分分为两大类, 即脂溶性成分: 丹参酮类, 如丹参酮 II_A (tanshinone II_A)、隐丹参酮(cryptotanshinone) 等; 水溶性成分: 丹酚酸 A, B, C(salvianolic acid A, B, C)、丹参素(danshensu) 等。因此将提取工艺路线设计为先用乙醇提取脂溶性的芍药苷和丹参酮 II_A, 然后水煎煮提取水溶性酚酸类有效成分。固定其他实验条件不变, 采用单因素实验考察回流、渗漉和超声 3 种不同提取方法, 结果证明, 回流提取对芍药苷和丹参酮 II_A 的提取率最高。正交实验证明提取次数对芍药苷和丹参酮 II_A 的提取率影响最大, 提取时间影响最小, 醇浓度对于丹参酮 II_A 提取率影响较大, 对芍药苷提取率影响较小; 综合考虑二者, 最佳工艺为 A₂B₃C₂D₁; 即 8 倍量 80% 乙醇, 回流提取 1.5 h, 共提取 3 次。经 3 批实验验证工艺合理、可行, 其中芍药苷和丹参酮 II_A 的提取率分别为 91.2% ±4.6%, 89.6% ±5.2%。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 52, 108.