

正交试验法优选滇丹参中水溶性成分提取工艺

柳丽娟¹, 马云淑², 黄金娥², 马 莎³

(1. 德阳广播电视大学, 四川德阳 618000; 2. 云南中医学院中药学院, 云南昆明 650500;

3. 曲靖医学高等专科学校, 云南曲靖 655000)

摘要: **目的** 用正交试验法优选滇丹参水溶性有效成分丹酚酸 B 的最佳提取工艺。**方法** 以高效液相色谱法测得的丹酚酸 B 的含量和提取物出膏率为指标, 采用以乙醇浓度、加醇量、提取时间、提取次数为影响因素的正交试验法, 对滇丹参中丹酚酸 B 的提取工艺进行优选。**结果** 滇丹参中水溶性成分丹酚酸 B 的最优提取工艺为 8 倍量 20% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1h。**结论** 此工艺稳定可行, 可为滇丹参水溶性有效成分的提取提供实验依据。

关键词: 滇丹参; 丹酚酸 B; 高效液相色谱; 正交试验; 滇丹参出膏率

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2013)01-0012-03

滇丹参为唇形科植物滇丹参(*Salvia yunnanensis*C.H.Wright)的干燥根和根茎。滇丹参是云南楚雄彝族自治州常用药, 也称紫丹参。滇丹参与传统用药丹参功用和主治相同, 都具有祛瘀止痛, 活血通经, 清心除烦之功效。临床上常用来治疗月经不调, 经闭痛经, 癥瘕积聚, 胸腹刺痛, 热痹疼痛, 疮疡肿痛, 心烦不眠; 肝脾肿大, 心绞痛等^[1]。

现代科学研究表明, 丹参主要有效成分包括脂溶性成分和水溶性成分两大类^[2]。水溶性成分中丹酚酸(salvianolic acids)为活性成分, 具有抗动脉粥样硬化、保护心肌细胞、防心脑血管缺血损伤、抗血小板凝聚、抗肝纤维化、改善记忆、抗肿瘤等作用^[3-4]。以丹酚酸 B 为有效成分的药物已成为研究开发的热点。滇丹参与丹参具有相同的活性成分, 相关文献中关于云南用滇丹参的研究报告甚少, 特别是关于滇丹参中水溶性丹酚酸类成分。本研究同时以出膏率和以 HPLC 测定丹酚酸 B 含量为指标, 采用正交试验对滇丹参提取工艺进行多因素优选。实验结果为含滇丹参的中药制剂中丹酚酸 B 的提取提供实验依据与参考。现将结果报道如下。

1 仪器与试药

1.1 试药

实验用滇丹参(*Salvia yunnanensis*C.H.Wright)为楚雄老拔云堂药业有限责任公司提供。丹酚酸 B

对照品(批号: 111562-200812), 购于中国生物药品鉴定所。甲醇为色谱纯, 娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

TYS-500A 型高速多功能粉碎机(浙江省永康市红太阳机电有限公司), TDA 温度控制仪(北京永光明医疗仪器厂), 高效液相色谱仪(四元泵, 美国 Agilent 1100 series, 二极管阵列检测器), 电子分析天平, ZK-82A 电热真空干燥器(上海实验仪器厂), DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司), 超声仪(上海科导超声仪器有限公司), 20mL 移液管。

2 药材的提取

2.1 提取正交设计^[5-7]

选用 $L_9(3^4)$ 正交设计表, 4 因素为: 醇浓度、加醇量、提取时间、提取次数, 每因素设 3 水平。试验因素与水平见表 1。

表 1 试验因素与水平表

水平	因素			
	A 乙醇浓度/%	B 加醇量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数
1	10	6	0.5	1
2	20	8	1	2
3	30	10	1.5	3

收稿日期: 2012-03-27 修回日期: 2013-01-04

作者简介: 柳丽娟(1984~), 女, 陕西延安人, 助教, 主要从事药学教育和研究工作。

2.2 丹酚酸 B 的提取工艺

经过查阅文献,丹酚酸 B 在稀醇溶液中溶解性好,故以稀醇提取为佳。取滇丹参药材粉末 9 份(5g/份),按表 1 设计提取。实验平行 3 组,提取液过滤后减压浓缩得滇丹参浸膏,以出膏率及其丹酚酸 B 含量为指标,考察滇丹参药材提取最佳条件参数。

3 测定方法与结果

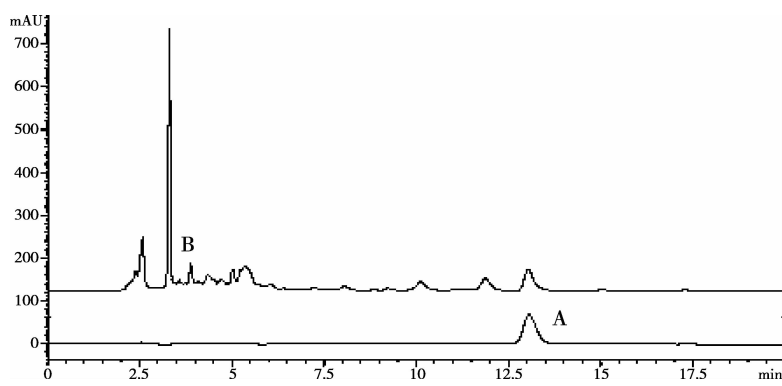
3.1 色谱条件^[8]

采用高效液相色谱法,色谱柱 Lichrospher 1C18254F RP, 250mm×4.6mm, 5μm。流动相:甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59),柱温 20℃,进样量

10μL,流速 1mL/min,检测波长 286nm,运行时间 20min。

3.2 标准曲线

精密称定丹酚酸 B 对照品 1mg,加 75%的甲醇定容至 10mL。制成浓度为 0.1mg/mL 标准品液,分别精密吸取 2μL、5μL、10μL、15μL、20μL、25μL 注入高效液相色谱仪,按上述条件测定,丹酚酸 B 的保留时间约为 13min,见图 1。以进样量 $x(\mu\text{g})$ 为横坐标,峰面积 $y(\text{mAU})$ 为纵坐标,得回归直线方程 $y=908.2x, r^2=1$ 。表明丹酚酸 B 在 0~2.5μg 范围内具有良好的线性关系。



A. 丹酚酸 B 标准品 B. 样品

图 1 丹酚酸 B 高效液相色谱图

3.3 精密度实验

分别精密量取丹酚酸 B 对照品溶液($C=0.1\text{mg/mL}$)10μL,注入色谱仪,平行进样 5 次,以峰面积值计算,其 RSD=0.73%。

3.4 重复性实验

精密吸取样品的溶液,取样 10μL,连续进样 6 次,记录色谱峰面积,峰面积基本保持不变,表明此色谱条件重复性良好, RSD=0.76%。

3.5 稳定性实验

精密吸取样品溶液,在室温下放置,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24h 取样 10μL,记录色谱峰面积,峰面积基本保持不变,表明样品溶液在 24h 内保持稳定, RSD=0.94%。

3.6 加样回收率实验

取已知含量的样品 10mg,加入与样品具有相同量的丹酚酸 B 对照品,加 75%的甲醇定容至 20mL 超声溶解,过滤,取续滤液过 0.45μm 微孔滤膜,进高效液相色谱仪检测。平均回收率为 96.89%, RSD=0.98%。

3.7 样品的测定

取滇丹参粗粉 5g/份,按正交表中所列条件煎煮,合并煎液。以 3 000r/min 转速离心 20 min 除杂,澄清液减压浓缩,浓缩液转移至蒸发皿中水浴浓缩至干,再置 40℃烘箱中干燥至恒重,取出,置干燥器中,冷却至室温,称重,计算干膏收率,即出膏率,结果见表 2。

精密称取提取干燥物 20mg,加 75%的甲醇定容至 20mL 超声溶解,过滤,取续滤液过 0.45μm 微孔滤膜,进样高效液相色谱仪,按标准曲线项下方法测定峰面积,计算滇丹参原生药材中丹酚酸 B 的提取量,结果见表 2。

3.8 结果

试验重复 3 次后,结果见表 2 与表 3。直观分析可知影响出膏率的因素大小顺序为:提取次数>加醇量>乙醇浓度>提取时间,其最佳提取参数为 $A_2B_3C_1D_3$;影响丹酚酸 B 含量的因素大小顺序为:提取次数>加醇量>提取时间>乙醇浓度,其最佳提取参数为 $A_2B_3C_1D_3$ 。方差分析结果表明,对于出膏率,

表 2 滇丹参中丹酚酸 B 正交实验结果($n=3$)

实验号	A	B	C	D	出膏率 /%	原生药材中丹酚酸 B 的提取量/mg/g
1	1	1	1	1	7.5780	7.5801
2	1	2	2	2	20.7750	19.1478
3	1	3	3	3	24.4880	20.7032
4	2	1	2	3	21.6810	21.6807
5	2	2	3	1	10.620	10.7488
6	2	3	1	2	25.8560	26.7814
7	3	1	3	2	15.4620	15.6744
8	3	2	1	3	23.2420	23.9347
9	3	3	3	1	10.820	11.2233
K_1	53.24/47.43*	44.72/44.94	56.68/58.3	29.02/29.55		
K_2	58.16/59.21	54.64/53.83	53.28/52.05	62.09/61.60	$\Sigma Y=160.99$	$\Sigma Y=157.47$
K_3	49.52/50.83	61.56/58.71	50.97/47.13	69.81/66.32		
R	2.88/3.39	5.61/4.59	1.90/3.72	13.60/12.26		

注: *:出膏率/原生药材中丹酚酸 B 提取量

表 3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方 (MS)	F 值
A	12.50/24.5*	2	6.25/12.25	2.28/1.19
B	47.78/32.51	2	23.89/16.26	8.70/1.56
C	5.49/20.89	2	2.75/10.45	1/1
D	313.07/266.81	2	156.53/133.41	56.99*/12.77
误差	5.49/20.89	2	2.75/10.25	

注:出膏率/原生药材中丹酚酸 B 提取量, F 临界值 $F_{0.01}(1,2)=99$; $F_{0.05}(1,2)=19$, $P^*<0.05$ 。

提取次数影响有显著性意义;对丹酚酸 B 提取率,各因素影响均没有显著性意义。综合直观分析和方差分析,选择最终条件为 $A_2B_2C_1D_3$ 。以此条件提取滇丹参粗粉 3 批,每批 5g,提取出膏率平均为 25.25%,RSD=2.86%($n=3$),丹酚酸 B 含量平均为 25.53mg/g,RSD=2.49%($n=3$)。可见丹酚酸 B 含量较高,说明提取条件稳定可行。

4 讨论

滇丹参中丹酚酸类成分为其主要有效成分及活性成分,但其长时间受热或溶于溶剂中具有不稳定性,含量会降低。在滇丹参的提取过程中,应综合考虑这两方面的因素。本实验最终选择 8 倍量 20% 乙醇提取 3 次,每次 1h。

在测定滇丹参出膏率时,考虑到丹酚酸 B 成分遇热不稳定,为尽量减少干燥时丹酚酸 B 成分的损耗导致含量测定中的其提取量降低,故将样品置 40℃烘箱中干燥至恒重。

目前,对滇丹参中丹酚酸 B 的提取条件考察方面的文献报道为数尚少,多数报道是考察丹参中丹酚酸 B 的提取工艺^[5-6]。且相关报道仅认为低浓度的乙醇对丹参中丹酚酸 B 的提取条件较优,尚未见具体考察比较低醇(10%,20%,30%乙醇)对丹酚酸 B 提取的影响。

参考文献

- [1] 雷载权. 中药学[M]. 上海:科学技术出版社,1995:205.
- [2] 李振海,韩树欣. 丹参的药理及临床新用[J]. 山东医药工业,1997,16(6):38.
- [3] 高学敏,许占民,李钟文,等. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:1087.
- [4] 柳丽,张洪泉. 丹参活性成分的现代中药药理研究进展[J]. 中国野生植物资源,2003,22(6):1.
- [5] 张荣泉,王德仁,张蓉. 丹参水溶性成分提取工艺研究[J]. 中药材,2001,24(11):818.
- [6] 叶勇,谭汉梯,江帅. 正交试验法优选丹参中丹酚酸 B 的

(下转第 21 页)

现代研究也证实活血化瘀对肺胀的重要性,如廖小明、钟小兰^[4]通过测定 76 例 COPD 患者以及 20 例健康人的血液流变学、血气分析,并观察活血化瘀治疗后 COPD 患者各项指标改善情况,得出 COPD 患者在血液流变学、动脉血气分析等检查结果上存在明显异常,经活血化瘀法治疗后血液粘度降低,血氧上升,二氧化碳下降。并进一步探究了活血化瘀法改善肺微循环和预防肺小动脉血栓的机制,主要是通过保护肺血管内皮细胞、降低血液粘度及红细胞聚集这几个方面实现的。

综上所述,由于肺胀经常反复发作,迁延不愈,把握其病机对于辨证施治也显得尤为重要。血瘀不仅是肺胀病程中的必然产物和病理归宿,同时血瘀也是在肺胀的早期就出现的病机改变,也是导致肺胀经久不愈的重要原因。因此在临床上,对于肺胀早

期的患者,或是还没有发展为肺胀的其他肺系疾病的患者,如果早期就应用活血化瘀的方法,根据病情配合祛痰、健脾、纳肾等治法,就可以阻断血瘀证的形成,畅通肺络,不仅可以治疗相应的症状,还可以减缓肺胀等疾病的进展,可取得较好的临床疗效。

参考文献

- [1] 王景明,张振勇. 对“肺朝百脉”的再认识[J]. 云南中医学院学报,2000,23(2):7
- [2] 关秋红,武维屏,田秀英,等. 益气活血化瘀贴防治慢性阻塞性肺疾病临床观察[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(11):60-61.
- [3] 刘青,伍春珠,刘世明,等. “肺朝百脉”与肺血病证的辨证施治[J]. 实用中医药杂志,1994,1(2):31
- [4] 廖小明,钟小兰. 活血化瘀法在慢性阻塞性肺疾病中的运用[J]. 中国民族民间医药,2009,07:119-120.

(编辑:岳胜难)

Analysis of “Lung Connecting all Vessels” and Lung Distention

ZHANG Wei¹, GU Ming-ming²

(1. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan Shandong 250011;

2. Shandong University of TCM, Jinan Shandong 250014)

ABSTRACT: Based on the physiological function of lung in linking all vessels; lung's regulating action towards blood circulation, blood fluid and blood sport, this paper is to discuss the pathological mechanism of pulmonary distension caused by dysfunction of lung in linking all the vessels through combining with clinics.

KEY WORDS: convergence of vessels in the lung; lung distension; stasis of blood

(上接第 14 页)

- 提取工艺[J]. 湖南中医药大学学报,2006,26(6):22.
- [7] 赵琦,张军武. 正交试验法优选黄芪中总黄酮提取工艺

[J]. 云南中医学院学报,2012,35(1):27-29.

- [8] 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,2010:22.

(编辑:徐建平)

Study on Extracting Process of Water Soluble Component of *Salvia yunnanensis* C. H. Wright

LIU Li-juan¹, MA Yun-shu², HUANG jin-e², MA Sha³

(1. Deyang Radio and Television University, Deyang Sichuan 618000; 2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine,

Kunming Yunnan 650500; 3. Journal of Qujing Medicine College, Qujing Yunnan 655000)

ABSTRACT: Objective To optimize the extracting process of the water-soluble active component of *Salvia yunnanensis* C. H. Wright by orthogonal design. **Methods** The extracting process was studied by orthogonal design, which includes ethanol concentration and alcohol amount and extracting hours and extracting times, with the content of salvianolic acid B by RP-HPLC and the yield of extraction of the *Salvia yunnanensis* C. H. Wright. as the indexes for screening the extracting condition. **Results** The best extraction condition of salvianolic acid B from *Salvia yunnanensis* C. H. Wright. was: adding eight times 20% ethyl alcohol, extracting for 3 times, each time 1hr. **Conclusion** The optimized extracting process for salvianolic acid B from *Salvia yunnanensis* C. H. Wright was satable and feasible with operability, and can provide experimental evidence for the extraction of the water-soluble active component of *Salvia yunnanensis* C. H. Wright.

KEY WORDS: *Salvia yunnanensis* C. H. Wright; salvianolic acid B; RP-HPLC; orthogonal design; yield of extraction of the *Salvia yunnanensis* C. H. Wright;