

正交试验设计优化超声煎煮法提取丹参中丹参素的研究

杨炳火 夏崇才 周芙琼 胡新

【摘要】 目的 探讨超声煎煮对丹参提取效果的影响,并筛选出最佳工艺。方法 以丹参素含量为指标,对丹参进行超声煎煮正交实验,筛选出最佳提取工艺条件,并与煎煮提取法进行比较研究。结果 超声时间和煎煮次数对试验结果有显著影响,而煎煮时间对结果无显著影响。最佳提取工艺为超声 10 分钟,煎煮 20 分钟,煎煮 3 次。结论 所筛选出的最佳提取工艺合理、可行,在提取丹参中丹参素时,超声煎煮法优于煎煮法。

【关键词】 超声煎煮法; 丹参; 丹参素

【中图分类号】 R284.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.12.006

Optimization on extract technology of tanshinol natrium in *Salvia Miltiorrhiza* Bge with supersonic-decoct extraction method by orthogonal experimental design YANG Bing-huo, XIA Chong-cai, ZHOU Fu-qiong, et al. Department of Pharmacy, Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, China
Corresponding author: HU Xin, E-mail: xiacc888@sina.com

【Abstract】 Objective To study the effect of supersonic-decoct extraction method on the process of extracting *Salvia miltiorrhiza* Bge and get the optimum extracting condition. **Methods** With the content of tanshinol natrium as the parameters, gain better extracting method, then. take the way as using decoct extraction method to compare. **Results** Supersonic time and decoction frequency had the most notable effect on experimental results, while the decocting time had no notable effects. The optimum conditions are presented as: the extraction time is 45 mins, the decocting time is 20 mins, and the decoction frequency is three. **Conclusion** The result from supersonic extraction is stable and reliable. It can be concluded that supersonic-decoct extraction method has evident effect on the extract technology of tanshinol natrium in *Salvia miltiorrhiza* Bge.

【Key words】 Supersonic-decoct extraction method; *Salvia miltiorrhiza* Bge; Tanshinol natrium

丹参是唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎^[1],是临床心血管疾病最常用中药之一。具有活血祛瘀,调经止痛,清心除烦的功效^[2-3]。丹参素是丹参水溶性成分中的主要活性成分,现代药理研究表明,丹参素具有心肌保护、神经细胞保护、抗氧化、抗炎和增强免疫力、抗肿瘤、改善微循环等作用^[4-5]。超声技术提取中药具有提取效率高、省工、省时等优点^[6],本文将超声与煎煮相结合对丹参素进行提取,并采用正交实验

法筛选最佳提取工艺,同时与煎煮法比较,考察提取效果。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1290 Infinity 超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Agilent VWD 型检测器(美国安捷伦公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FA1104 电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司);1612-1 离心机(上海医疗器械有限公司)。

1.2 试药

丹参药材(安徽沪春堂中药饮片有限公司);丹参素钠对照品(中国药品生物制品检定所,批号

基金项目:南京市卫生局科技发展项目(201108005)

作者单位:210001 南京市中医院药剂科

作者简介:杨炳火(1966 -),本科,副主任中药师。研究方向:中药制剂及质量标准研究。E-mail: qiong860612@163.com

通讯作者:胡新(1966 -),女,本科,副主任中药师。研究方向:中药制剂。E-mail: xiacc888@sina.com

111366-201305); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其它试剂为分析纯。

1.3 丹参药材提取方法

煎煮提取法^[7]: 取丹参药材约 50 g, 精密称定, 加水 500 ml 煎煮, 提取 3 次, 每次 40 分钟, 合并提取液浓缩至 200 ml, 作为煎煮法供试品溶液。

超声煎煮提取法: 取丹参药材约 50 g, 精密称定, 加入 500 ml 水, 分别先进行超声处理 10、20、30 分钟, 超声功率 300 W, 频率 40 KHz, 然后采用煎煮方式, 在煎煮 20、40、60 分钟以及煎煮次数 1、2、3 次的不同情况下进行提取, 所得提取液浓缩至 200 ml, 离心, 过滤, 续滤液作为超声煎煮法供试品溶液。

1.4 色谱条件

色谱柱: Kromasil C18 柱(4.6 × 250 mm); 流动相: 甲醇—0.5% 醋酸水溶液 = 5:95; 流速 1 ml/min; 检测波长 281 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μl。

1.5 对照品溶液的制备

精密称取丹参素钠 2.0 mg, 置 10 ml 容量瓶中, 加入 50% 甲醇, 定容, 得 0.20 mg/ml 丹参素钠对照品溶液。

1.6 统计方法

采用 Excel 软件进行线性回归、正交实验设计的统计分析。

2 结果

2.1 线性关系考察

精密吸取丹参素钠对照品溶液 2、4、8、12、16 μl 注入超高效液相色谱仪, 测定峰面积, 以峰面积的积分值(Y)对对照品的进样量(X)制备标准曲线方程, 得到标准曲线方程为 $Y = 175.27X - 22.942$, $r = 1.0000$ 。结果表明, 丹参素钠在 0.40 ~ 3.2 μg 范围内线性关系良好。

2.2 精密度试验

精密吸取 0.20 mg/ml 丹参素钠对照品溶液 10 μl 注入超高效液相色谱仪, 连续进样 6 次, 结果显示, 丹参素峰面积 RSD 为 1.28%, 表明精密度良好。

2.3 重复性试验

精密称取同一样品 6 份, 按 1.3 项下“煎煮提取法”制备供试品溶液, 并按上述色谱条件对丹参素含量进行测定, 其 RSD 为 0.99%, 表明重复性良好。

2.4 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12 小时进样, 测得丹参素含量的 RSD 为 1.05%, 表

明供试品溶液在 12 小时内稳定。

2.5 加样回收率试验

取已知含量的供试品 6 份, 精密称定, 分别精密加入一定量的对照品, 按 1.3 项下“煎煮提取法”处理, 并按上述色谱条件对丹参素含量进行测定, 计算回收率, 其平均值为 98.12%, RSD 为 3.08%。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

样品号	样品量(mg)	对照品量(mg)	测定值(mg)	回收率(%)
1	0.0837	0.1000	0.1855	101.80
2	0.0841	0.1000	0.1823	98.20
3	0.0835	0.1000	0.1851	101.60
4	0.0852	0.1000	0.1818	96.30
5	0.0818	0.1000	0.1782	96.40
6	0.0858	0.1000	0.1802	94.40

2.6 超声煎煮提取工艺最佳提取条件的考察

以丹参素提取率为考察指标, 选择影响丹参素提取的主要因素超声时间(A)、煎煮时间(B)、煎煮次数(C)为考察因素, 按 $L_9(3^4)$ 正交实验设计进行试验, 因素水平表见表 2, 正交实验结果见表 3, 方差分析见表 4。

由方差分析结果显示, A、C 有显著性差异($P < 0.05$), 极差 $R_C > R_A$ 各因素对丹参素总量的影响依次为: $C > A > B$; 同一因素的 3 个水平比较得知: $A_3 > A_1 > A_2$, $B_3 > B_2 > B_1$, $C_3 > C_2 > C_1$ 。考虑到节能经济因素, 故确定最优组合为 $A_3B_1C_3$, 即超声 10 分钟, 煎煮 20 分钟, 煎煮 3 次。

表 2 正交实验因素水平

因素水平	A 超声时间(min)	B 煎煮时间(min)	C 煎煮次数
1	10	20	1
2	20	40	2
3	30	60	3

2.7 样品测定

取 3 份样品各 50 g, 按 2.5 项下所得超声煎煮最佳工艺提取丹参素, 计算其总量, 并与煎煮法供试品溶液中丹参素总量比较, 结果见表 5。

表 3 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

试验号	A	B	C	D	丹参素总量(μg)
1	1	1	1	1	17.67
2	1	2	2	2	32.04
3	1	3	3	3	42.10
4	2	1	2	3	21.38
5	2	2	3	1	31.12
6	2	3	1	2	12.32
7	3	1	3	2	35.32
8	3	2	1	3	24.96
9	3	3	2	1	34.89
K_1	91.81	74.3700	54.95	83.68	
K_2	64.82	88.1200	88.31	79.68	
K_3	95.17	89.31	108.54	88.44	

表 4 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值
A	184.54	2	92.27	28.79
B	45.96	2	22.98	7.17
C	488.23	2	244.11	76.16
D	12.82	2	6.41	

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

表 5 样品含量测定结果($n=3$)

提取方法	丹参素总量(μg)	RSD(%)
煎煮法	22.47	1.29
超声煎煮法	35.83	1.37

3 讨论

流动相的选择方面, 实验中作者曾考察了甲醇—水系统、乙腈—水系统和甲醇—醋酸水溶液系统作为丹参素含量测定的流动相, 结果发现当以甲醇—水和乙腈—水做流动相时, 各色谱峰拖尾严重, 且各峰之间分离效果较差, 而以甲醇—醋酸水溶液系统做流动相后, 各色谱峰峰形良好且能得到良好的区分。为了改善峰形、提高分离度, 调整流动相比例, 最后确定使用甲醇—0.5% 醋酸水溶液(5:95)作为本实验的流动相, 所得丹参素峰形较好, 分离度大于 1.5, 理论塔板数大于 1500。

提取溶剂的选择方面, 参照《中华人民共和国药典》(一部)(2010 年版)及相关文献^[7-8]中丹参素的提取方法, 分别考察了 30% 甲醇、50% 甲醇、100% 甲醇等溶

剂对丹参素进行提取。结果表明, 用 50% 甲醇的提取效果较好, 故本试验采用 50% 甲醇为提取溶剂。

样品测定结果显示, 采用超声煎煮法所得丹参素的量明显多于传统煎煮法。主要原因是超声波能产生强烈振动、高加速度、强烈的空化效应和搅拌作用, 可加速有效成分进入溶剂, 从而有利于丹参素的提取。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版(一部)[S]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 70.
- [2] 罗彩莲. 丹参的药理作用与临床应用[J]. 中国当代医药, 2012, 19(12): 11-12.
- [3] 毕跃峰, 贾陆, 张小娟, 等. 同提取方法对丹参中丹参酮 II A 和丹酚酸 B 含量测定的影响[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1209-1212.
- [4] 樊永庆, 杨济昆, 刘建平, 等. 丹参素缓释微丸的制备及家兔体内药动学研究[J]. 药学与临床研究, 2013, 21(2): 105-108.
- [5] 岳喜典, 王丽, 曲桂武, 等. 非水滴定法测定丹参素钠原料药的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 137-139.
- [6] 徐飞, 尹蓉莉, 钟玲, 等. 超声提取六味地黄丸复方的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1432-1434.
- [7] 路毅. 丹参水煎煮工艺及最佳粒径研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [8] 魏惠珍, 王跃生, 吴有根, 等. HPLC 同时测定冠心丹参胶囊中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 和丹参酮 II A 的含量[J]. 中成药, 2009, 31(1): 64-68.
- [9] 张筱芳, 王莉. HPLC 法测定养心活血片中丹参素的含量[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(5): 409-411.

(收稿日期: 2014-08-14)

(本文编辑: 黄凡)