

正交试验法优选丹参配方颗粒的提取工艺^①

葛媛¹, 李争光¹, 马露¹, 王向乾², 王成永^{1,3}, 何宁^{1,3}②, 谢若男⁴

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012 E-mail: 570287356@qq.com;

2. 安徽源和堂药业股份有限公司, 安徽 亳州 233600;

3. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽 合肥 230012;

4. 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥 230012)

摘要: **目的** 优化丹参配方颗粒的提取工艺。**方法** 运用正交试验法, 以丹酚酸 B 提取率和出膏率为评价指标, 观察提取时间、加水量、提取次数 3 个因素对提取工艺的影响, 并通过综合评分法筛选出丹参的最佳提取工艺。**结果** 提取次数对提取工艺有极显著影响, 加水量和提取时间对提取工艺有显著影响, 通过正交试验法筛选出丹参饮片的最佳水提工艺为加入 12 倍量水, 煎煮提取 3 次, 每次 1.5 h。**结论** 通过正交试验法优选的丹参饮片的水提工艺简便易行, 稳定可靠, 重现性好, 可为丹参配方颗粒的标准化、规范化生产提供参考依据。

关键词: 丹参; 配方颗粒; 提取工艺; 正交试验法; 丹酚酸 B

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)01-0022-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.01.006

Optimization the extract process of *Salvia miltiorrhiza* formula granules by orthogonal design

Ge Yuan¹, Li Zhengguang¹, Ma Lu¹, Wang Xiangqian², Wang Chengyong^{1,3}, He Ning^{1,3}, Xie Ruonan⁴

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012 Anhui, China

E-mail: 570287356@qq.com; 2. Anhui Yuanhe Tang Pharmaceutical Corporation Co., Ltd.,

Bozhou 233600, Anhui, China; 3. Institute of Pharmaceuticals, Anhui Academy of Chinese

Medicine, Hefei 230012, Anhui, China; 4. The Second Affiliated Hospital of Anhui University

of Chinese Medicine, Hefei 230012, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of *Salvia Miltiorrhiza* Formula Granules. **Meth-**

ods Three methodological factors (extraction duration, number of extractions, and the amount of solvents added) were studied using a $L_9(3^4)$ orthogonal design on the basis of the extract rate of salvianolic acid B and the yield of solids extracted. The optimized extraction process of *Salvia miltiorrhiza* Bge. (Lamiaceae) was selected by using comprehensive evaluation. **Results** The extraction process was extremely significantly influenced by the number of extractions, and was significantly influenced by added water volume and extraction times. The orthogonal design test results showed that the optimized water extraction process for *Salvia Miltiorrhiza* Formula Granules was adding 12 times amount of water, extracting three times and lasting 1.5 h each times. **Conclusion** The optimized extract process by orthogonal design test is simple, stable and reliable, and has good repeatability, which can provide scientific evidences for standardized and normalized production of *Salvia Miltiorrhiza* Formula Granules.

Key words: *salvia miltiorrhiza*; formula granule; extraction technology; orthogonal design; salvianolic acid B

中药配方颗粒是由单味中药饮片经水提、浓缩、干燥、制粒而成, 在中医临床配方后, 供患者冲服使用。

中药配方颗粒是对传统中药饮片的补充, 是中药现代化的重要研究内容之一。大量实验和临床应用表明,

① 基金项目: 安徽省科技攻关项目(15011d04002); 安徽省第二批“特支计划”创新领军人才项目

② 通信作者, E-mail: hening826@163.com

中药配方颗粒和传统中药汤剂具有基本相同的疗效,且具有不需要煎煮、直接冲服、携带保存方便、质量稳定可控、适合工业化生产等优点^[1]。

丹参为唇形科鼠尾草植物丹参[*Salvia miltiorrhiza* Bge. (Lamiaceae)]的干燥根及根茎,是最常用的活血化瘀中药之一,首载于《神农本草经》,被列为上品,称其“主心腹邪气,破散除瘕,止烦满。”丹参味苦,性微寒,入心、肝经,具有活血化瘀、养血安神、调经止痛、凉血消痈的功效。丹参的水溶性成分主要是酚酸类化合物,包括丹参酸A、丹酚酸B、丹酚酸C等^[2-4]。

将丹参制成配方颗粒,取代丹参饮片,可以提高患者服药的依从性,有效地去除植物中的无效成分,增加稳定性。随着中药配方颗粒逐步被市场接受,对丹参配方颗粒制备工艺和质量标准的研究显得尤为重要^[5-10],目前有关丹参配方颗粒的水提工艺研究报道较少。本实验采用正交试验法,以丹酚酸B提取率并结合出膏率作为综合评价指标,优选丹参配方颗粒的提取工艺条件,为丹参配方颗粒的生产工艺提供依据。

1 材料

1.1 仪器 SPD-16 高效液相色谱仪(岛津仪器有限公司,紫外-可见检测器);DF-101B 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);DZF-6050 真空干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);SC-3610 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);HX-200 型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂);旋转蒸发器(常州普天仪器制造有限公司)。

1.2 试药 丹参饮片(安徽源和堂药业股份有限公司,批号:151011),丹酚酸B对照品(合肥博美生物科技有限责任公司,批号:201521),甲醇(Sigma公司,批号:WXBB7269V,色谱纯),乙腈(Sigma公司,批号:WXBC2335V,色谱纯),磷酸(上海苏懿化学试剂有限公司,批号:20130320,分析纯),水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 出膏率测定 精密称取一定量的丹参饮片,按规定条件进行提取,提取时保持微沸,对提取的药液滤过,然后使用旋转蒸发器对其进行减压浓缩,置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,残渣放在60℃的真空干燥箱中干燥至恒重,取出,置于干燥器中冷却约30 min,待残渣至室温后,迅速精密称定质量,计算出膏率。

2.2 丹酚酸B含量的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥的丹酚酸B对照品10.00 mg,置25 ml容量瓶中,用甲醇-水(8:2)混合溶液溶解并稀释至刻度,分别量取上述对照品溶液适量,于5 ml容量瓶中定容,配成浓度依次为12.5 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml、140 μg/ml、400 μg/ml

ml对照品溶液,经0.45 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取丹参水提物的干浸膏约0.03 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-水(8:2)混合溶液25 ml,密塞,称定重量,超声处理(功率100 W,频率40 kHz)20 min,放冷,再称定重量,用甲醇-水(8:2)混合溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,用0.45 μm微孔滤膜过滤,所得溶液,作为供试品。

2.2.3 色谱条件及适用性 色谱柱为Luna-C18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78)为流动相;柱温为30℃;流速为1.0 ml/min;检测波长为286 nm。在此色谱条件下,丹酚酸B的保留时间约为21 min,其他色谱峰对丹酚酸B色谱峰无干扰,峰形尖锐,基线平稳。色谱图见图1、图2和图3。

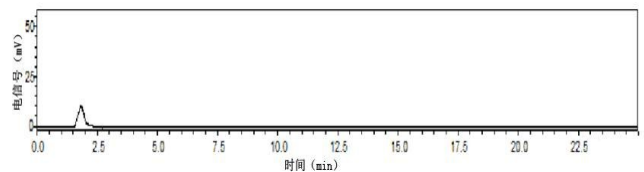


图1 80%甲醇溶剂的HPLC色谱图

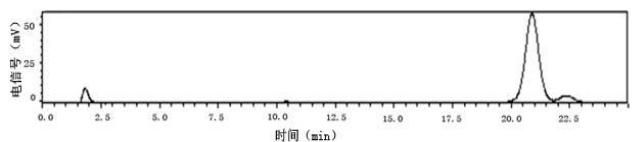


图2 丹酚酸B对照品的HPLC色谱图

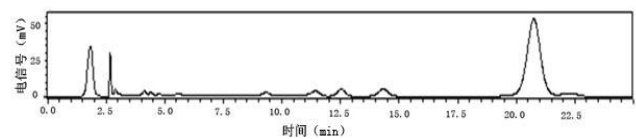


图3 供试品的HPLC色谱图

2.2.4 线性关系与范围的试验 精密吸取适量贮备液,加甲醇配制成含丹酚酸B浓度分别为12.5 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml、140 μg/ml及400 μg/ml的5组标准系列溶液。分别精密吸取各浓度标准溶液10 μL,按上述色谱条件进行测定。分别进样,每种浓度重复3次,分别测得峰面积A1、A2和A3,计算平均峰面积及RSD值(见表1),以计算得的平均峰面积为纵坐标(Y),以标准溶液浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得丹酚酸B的回归方程为 $Y=17804X+138815$ ($r=0.99995$)(见图4)。结果表明,丹酚酸B在12.5~400 μg/ml范围内线性关系良好。

表 1 丹酚酸 B 线性范围的检测结果

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	峰面积			峰面积 平均值	RSD (%)
	A1	A2	A3		
12.5	420545	402339	397239	406708	3.01
25	573210	548836	570167	564071	2.35
50	1036471	1018526	976748	1010582	3.03
140	2661639	2600175	2590164	2617326	1.48
400	7124889	7519489	7158486	7267621	3.01

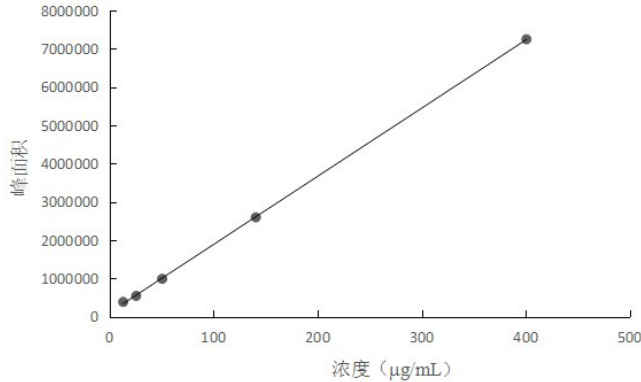


图 4 丹酚酸 B 对照品标准曲线图

2.2.5 精密度试验 取“2.2.1”项下溶液,在上述色谱条件下,连续进样 6 次,结果 $RSD = 1.60\%$ ($n = 6$) (见表 2),表明仪器精密度良好。

表 2 丹酚酸 B 提取率测定的精密度实验结果

实验序号	峰面积值	峰面积平均值	RSD (%)
1	2414363	2452601	1.60
2	2401284		
3	2462973		
4	2457753		
5	2509299		
6	2469933		

2.2.6 重复性试验 取同一批样品,共 6 份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,计算丹酚酸 B 的峰面积 RSD 为 1.26% ($n = 6$) (见表 3),表明方法重复性良好。

表 3 丹酚酸 B 提取率测定的重复性实验结果

实验序号	峰面积值	峰面积平均值	RSD (%)
1	2168487	2130847	1.22
2	2139040		
3	2125238		
4	2092155		
5	2143221		
6	2116942		

2.2.7 加样回收率试验 取已知含量的丹参干浸膏 6 份,每份约 0.03 g,精密称定,精密加入丹酚酸 B 对照品适量,加重蒸馏水定容至 25 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,并计算加样回收率。丹酚酸 B 的平均回收率为 101.28% ($RSD = 2.38\%$),见表 4。

表 4 丹酚酸 B 含量测定的加样回收实验结果

样品中丹酚酸 B 的含量(μg)	加入丹酚酸 B 的量(μg)	实测量(μg)	回收率 (%)	RSD (%)
22.22	33.33	55.96	101.23	2.38
21.94	32.91	54.64	99.36	
22.47	22.47	45.43	102.18	
22.31	22.31	45.13	102.29	
22.80	11.40	34.74	104.74	
22.52	11.26	33.54	97.87	

2.3 正交试验设计 试验中采取水作为提取溶剂,根据预试验的结果,以加水量、提取次数和提取时间为考察因素,选取丹酚酸 B 提取率、出膏率为评价指标,设计正交试验,采用 $L_9(3^4)$ 正交表优选丹参的最佳提取工艺条件,正交试验因素水平见表 5。

表 5 正交试验因素水平表

序号	因素			
	A	B	C	D
1	8	1	1	-
2	10	1.5	2	-
3	12	2	3	-

注:表中 A 为加水量(倍);B 为提取时间(h);C 为提取次数(次);D 为空白

2.4 正交试验方法及结果 分别精密称取 20 g 丹参饮片,共 27 份(每组 3 份),采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,微沸回流提取,制得丹参水提取液,然后按“2.2”和“2.1”项下方法测定丹酚酸 B 提取率及出膏率,并使用综合评分法进行评价(见表 6、表 7)。综合评分法的计算方法为:以每组评价指标值最大者为 100,将其它组别结果换算为最高值的百分比,再以丹酚酸 B 提取率、出膏率权重分别占 50% 、 50% 的比例进行相加后所得的值作为综合得分^[11]。

通过表 6 的极差分析结果表明,3 个因素的影响大小依次为:提取次数>加水量>提取时间;通过表 7 的方差结果分析表明,提取次数为主要影响因素,加水量、提取时间为次要影响因素,由此得出最佳工艺组合为 $A_3B_2C_3$,所以丹参饮片水提的最优工艺条件为:加入 12 倍量水,每次 1.5 h,提取 3 次。

表6 正交试验结果

试验号	因素				出膏率 (%)	丹酚酸 B (mg/g)	综合 评分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	38.36	40.15	83.08
2	1	2	2	2	48.18	40.78	93.23
3	1	3	3	3	49.05	36.97	89.68
4	2	1	2	3	48.11	41.07	93.50
5	2	2	3	1	52.06	41.24	97.49
6	2	3	1	2	39.03	43.04	87.05
7	3	1	3	2	49.81	42.12	96.34
8	3	2	1	3	43.06	43.42	91.36
9	3	3	2	1	51.76	38.58	94.14
K ₁	88.663	90.973	87.163	91.570			
K ₂	92.680	94.027	93.623	92.207			
K ₃	93.947	90.290	94.503	91.513			
R	5.284	3.737	7.340	0.694			

注:表中 A 为加水量(倍);B 为提取时间(h);C 为提取次数(次);D 为空白

表7 正交试验结果方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
加水量	45.652	2	51.352	19.000	0.05
提取时间	23.752	2	26.718	19.000	0.05
提取次数	96.382	2	108.416	99.000	0.01
误差	0.89	2			

注: $F_{0.01}(2,2)=99.000$; $F_{0.05}(2,2)=19.000$

2.5 验证试验 为确定优选工艺的优劣和稳定性,以 A₃B₂C₃ 组合进行了 3 批验证试验,由表 8 结果可见,此工艺稳定可靠,合理可行。

表8 最优水提工艺验证实验结果

试验号	出膏率%	丹酚酸 B 含量(mg/g)	综合评分
1	52.01	41.86	98.16
2	51.99	42.74	99.14
3	52.03	42.57	98.99

3 讨论

本试验是在中医药理论指导下,依据现行版《中国药典》^[12]和国家药典委员会起草的《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》^[13],并参考相关文献^[14-16],采用正交试验法,以丹酚酸 B 提取率并结合出膏率作为综合评价指标,优选丹参配方颗粒的提取工艺条件,为丹参配方颗粒的生产工艺提供依据。征求意见稿中明确规定:中药配方颗粒提取用溶媒为制药用水,不得使用酸碱和有机溶媒,因此试验中我们选取丹参中的主要水溶性成分丹酚酸 B 的提取率作为评价指标。丹酚酸 B 提取率和出膏率在水提工艺优化中起着同等重要的作用,同时两者相辅相成,因此为保证分析指标的全面性,分析结果的科学性以及提取工艺的合理性,我们在综合评分法中设定两

者的权重系数均为 0.5。

通过极差分析可看出提取时间、加水量、提取次数 3 个因素对提取工艺的影响,优选出丹参配方颗粒的各因素影响大小依次为:提取次数>加水量>提取时间;通过方差分析可看出,提取次数为主要影响因素,加水量、提取时间为次要影响因素。综合得到,丹参提取工艺的最优工艺条件为:丹参饮片加入 12 倍的水提取,每次 1.5 h,共提取 3 次,是制备丹参配方颗粒的最佳提取方案。

参考文献:

- [1] 鹿岩,李妮,段梦雅,等. 2010-2013 年 357 种中药配方颗粒的临床使用分析[J]. 现代药物与临床, 2014, 24(9): 1050-1053.
- [2] 马丙祥,董宠凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国药房, 2014, 25(7): 663-665.
- [3] 王炜辰,吴学辉,郑芳. 丹参药理学研究进展[J]. 海峡药学, 2013, 25(10): 24-25.
- [4] 赵永跃,褚扬,阿基业,等. 丹参主要水溶性成分的代谢产物研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(10): 1560-1563.
- [5] 董红丽. 中药配方颗粒和中药汤剂的比较[J]. 现代诊断与治疗, 2012, 23(7): 911-912.
- [6] 杜远东. 正交试验法优选葛根配方颗粒的提取工艺[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(15): 15-16.
- [7] 周滢,周萍. 正交试验法优化威灵仙配方颗粒提取工艺及定性鉴别研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2014, 16(10): 2274-2277.
- [8] 庄俊嵘,徐德生,刘力,等. 中药配方颗粒的优势与劣势分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(7): 8-10.
- [9] 连红兵. 中药配方颗粒在临床上的利弊分析[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(2): 101-102.
- [10] 陈昭,毕晓黎,邱宏聪,等. 中药配方颗粒剂质量控制研究现状及展望[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(20): 11-13, 15.
- [11] 黄永毅,王彩冰,黄彦峰,等. 核桃叶提取液对离体小肠收缩功能的实验研究[J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(6): 789-790, 795.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 76.
- [13] 国家药典委员会. 中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)[S/OL]. [2016-08-05]. <http://www.chp.org.cn>.
- [14] 徐浩,李倩,蒋静涵,等. 葛根素对急性百草枯中毒患者氧化应激的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(6): 824-825.
- [15] 黎淑芳,黎为能,邓敏,等. 茶水提液对早期牙釉质龋再矿化作用的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(3): 331-332.
- [16] 李云雁,胡传荣. 实验设计与数据处理[M]. 2 版. 北京:化学工业出版社, 2008: 134-136.

收稿日期: 2016-12-28; 修回日期: 2017-02-22