

· 工艺研究 ·

化学指标结合药效学指标优选丹参饮提取工艺

王硕辉, 林 辉, 刘方敏, 王振华, 徐大量, 吴德跃(广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 用化学指标结合药效学指标优选丹参饮的提取工艺。**方法** 分别采用水提、超临界 CO₂ 提取、超临界 CO₂ 提取结合药渣水提、超临界 CO₂ 提取结合药渣乙醇提取 4 种提取工艺制备丹参饮提取物, 以指标化学成分提取率为考察对象, 采用均匀设计安排实验, 优选各提取工艺参数, 并观察丹参饮各提取物对急性心肌缺血小鼠心电图(ECG)和血清中肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)活性的影响。**结果** 丹参饮各提取物对异丙肾上腺素(ISO)诱导的小鼠缺血性 ECG 改变有明显的拮抗作用, 能显著降低心肌缺血损伤时血清 CK、LDH 活性, 对缺血心肌具有良好的保护作用, 且以超临界 CO₂ 提取结合药渣乙醇提取制得的提取物的药效最佳。**结论** 超临界 CO₂ 提取结合药渣乙醇提取法丹参饮的最佳工艺, 所得丹参饮提取物的药效作用最佳。

关键词: 丹参饮; 提取工艺; 心肌缺血

中图分类号: R284.2; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)07-0110-0

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2017. 01. 023

替换为: 为最佳提取工艺

Optimization of extraction technology of Danshen Yin by chemical index with pharmacodynamic index

Abstract: **Objective** To optimize the extraction technology of Danshen Yin by combining the chemical index with pharmacodynamics index. **Methods** The four extraction technologies of water extraction, supercritical CO₂ extraction, supercritical CO₂ extraction combined with water extraction and supercritical CO₂ extraction combined with ethanol extraction were adopted separately to make Danshen Yin extracts. The extraction yield of chemical index was considered as investigation object to arrange the test by uniform design and optimize the technological parameters. The mice with acute myocardial ischemia were given Danshen Yin extracts made by the four extraction technology with optimized parameters and the influence on electrocardiogram (ECG), creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) of mice were observed. **Results** Danshen Yin extracts suppressed the changes of ECG induced by the isoprenaline (ISO), significantly reduced the activity of CK and LDH in serum of myocardial ischemia injury and provided good protection for ischemic myocardium. The supercritical CO₂ extracts combined with ethanol extracts was optimized by comparing the pharmacodynamics. **Conclusion** According to the results, the extraction technology of supercritical CO₂ extracts combined with ethanol extracts confirmed to be optimized.

Keywords: Danshen Yin; extraction technology; myocardial ischemic

替换为: The extraction technology of supercritical CO₂ extracts combined with ethanol extracts is confirmed to be optimized, and the extracts of Danshen Yin made by this extraction technology has the best pharmacological action.

丹参饮源于陈修园《时方歌括》, 由丹参、檀香、砂仁组成。现代药理研究证实, 丹参饮能有效抑制心肌细胞坏死及凋亡, 减轻心肌细胞损伤, 对缺血心肌具有良好的保护作用^[1], 同时, 丹参饮可改善血液流变性, 调节微循环。因此被广泛应用于心血管病的防治^[2]。丹参饮君药丹参所含的脂溶性成分及檀

收期日期: 2016-04-18

作者简介: 王硕辉, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药有效部位及相关研究。Email: wangsh0901@163.com。通信作者: 林辉, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药有效部位及相关研究。Email: Linhuijwc@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广州市科技计划项目(12A402032071)。

香、砂仁中的挥发油类成分对于心血管疾病的治疗也发挥着一定的作用^[3-5],然而该类成分在传统的汤剂中保留很少。因此,本实验在传统水提法的基础上引入近年发展起来的超临界 CO₂ 提取法,先以指标化学成分的提取率为考察对象,采用均匀设计优选各提取工艺参数,然后再对丹参饮各提取物进行药效学评价,以确定丹参饮合理的提取工艺。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量(18±2)g,购自广州中医药大学试验动物中心,动物许可证号:SCXK(粤)20130034。

1.2 仪器 LC-20AT 岛津高效液相色谱仪(日本岛津公司);BL-420E+ 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),ELX800UV 酶标仪(美国 BIO-TEC 公司)。

1.3 药品与试剂 丹参、檀香、砂仁(均购于广州采芝林连锁药业有限公司,经鉴定,符合《中国药典》)2010 版一部项下的规定);丹酚酸 B(中国食品药品检定研究院,批号:111562-201212);肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20141209);盐酸异丙肾上腺素注射液(ISO,上海禾丰制药有限责任公司,批号:41141102);酒石酸美托洛尔片(珠海经济特区生物化学制药厂,批号:20140701);异戊巴比妥钠(北京索莱宝科技有限公司,批号:XD-09873)。

2 方法

2.1 基于化学指标优选各提取工艺参数

2.1.1 丹参饮水提工艺优选 按比例(丹参:檀香:砂仁=6:1:1)称取丹参饮药材 40 g,以混合水平均匀设计表 U₉(9×3²)安排实验,均匀设计因素-水平见表 1,实验安排见表 2。加水提取、过滤、合并滤液。测定时,精密量取水提液 2 mL 置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀、过滤,取续滤液采用 HPLC 法测定丹酚酸 B 的含量并计算转移率。

丹酚酸 B 的含量测定:YMC-Pack-ODS-A 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:0.5%甲酸溶液(A),甲醇(B),梯度洗脱:0~8 min(A:85%),8~15 min(A:85%~65%),15~50 min(A:65%);检测波长:270 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:35℃,进样量:10 μL。

精密称取丹酚酸 B 对照品适量,加甲醇配制成

浓度为 0.98, 0.63, 0.35, 0.17, 0.07, 0.04 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液,按上述色谱条件测定,得线性回归方程 $Y=9627.9X-12972.8$ ($r=0.9998$),线性范围:0.4~9.8 μg;精密度试验 RSD 为 1.53%;重复性试验 RSD 为 0.63%;稳定性试验 RSD 为 1.09%;经加样回收试验平均回收率为 103.13%,RSD 1.91%。

表 1 丹参饮水提均匀设计因素-水平表

Table 1 Uniform design factor-level table of water extraction of *DanShen Yin*

因素	水平								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
溶剂用量/倍	7	8	9	10	11	12	13	14	15
提取时间/h	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1.5	1.5	1.5
提取次数/次	1	1	1	2	2	2	3	3	3

表 2 丹参饮水提均匀设计实验安排及结果

Table 2 Arrangements and results by uniform design of water extraction of *DanShen Yin*

试验号	水平			丹酚酸 B
	溶剂用量/倍	提取时间/h	提取次数/次 转移率/%	
1	9	1.5	3	57.40
2	12	1.0	3	75.29
3	15	0.5	3	92.46
4	8	1.5	2	68.53
5	11	1.0	2	72.06
6	14	0.5	2	81.80
7	7	1.5	1	50.44
8	10	1.0	1	56.83
9	13	0.5	1	60.16

利用 SPSS17.0 软件,通过多元线性回归,建立关于 Y(丹酚酸 B 的含量)与 X₁(溶剂用量)、X₂(提取时间)、X₃(提取次数)之间的方程关系:

$$Y=3.635X_1X_3+11.706X_2X_3-12.335X_3^2+20.090 \quad (r=0.9849)$$

结合实际工艺中的省时、节能因素,在各因素设计的水平范围内对上述拟合的方程进行规划求解,最终确定丹参饮水提最佳工艺为:加水 12 倍量,提取 2 次,每次 1.5 h,此时丹酚酸 B 理论转移率为:94.90%。在该工艺参数条件下重复实验 3 次,结果丹酚酸 B 转移率为:92.34%,与理论值接近,说明本实验优化的提取工艺合理、可行。

2.1.2 丹参饮超临界 CO₂ 提取工艺优选 参考本课题组的前期研究^[6],确定丹参饮超临界 CO₂ 提取的优选工艺为:提取压力 30 MPa,提取温度 45℃,提取时间 2.5 h。

2.1.3 丹参饮超临 CO₂ 提取后药渣水提工艺优选 按 2.1.1 项下方法进行研究, 确定药渣水提最佳工艺为: 加水 10 倍量, 提取 2 次, 每次 0.5 h, 该条件下丹酚酸 B 的转移率为: 79.54 %, 出膏率为: 40.12 %。

2.1.4 丹参饮超临 CO₂ 提取后药渣醇提工艺优选 称取经超临界 CO₂ 提取后的丹参饮药渣 16 g, 以混合水平均匀设计表 U₁₂(4³×2)安排实验, 均匀设计因素-水平见表 3, 实验安排见表 4。加乙醇溶液提取、过滤、合并滤液。测定时, 精密量取 15 mL 提取液至蒸发皿中蒸干、恒重, 计算出膏率; 精密量取醇提液 1 mL 置 100 mL 容量瓶中, 加乙醇定容至刻度, 摇匀、过滤, 取续滤液采用 HPLC 法测定丹酚酸 B 的含量并计算转移率。

丹酚酸 B 的含量测定: 色谱条件同 2.1.1 项下。方法学考察结果: 线性回归方程 $Y=9670X-35995$ ($r=0.9999$), 线性范围: 0.4 ~ 9.8 μg; 精密度试验 RSD 为 1.12 %; 重复性试验 RSD 为 1.02 %; 稳定性试验 RSD 为 1.39 %; 经加样回收试验平均回收率为 101.07 %, RSD 1.45 %。

表 3 药渣醇提均匀设计因素-水平表

Table 3 Arrangements and results by uniform design of ethanol extraction of *DanShen Yin*

水平	因素			
	乙醇浓度 / %	加醇倍量 / 倍	提取次数 / 次	提取时间 / h
1	65	6	1	0.5
2	75	8	1	1
3	85	10	2	1.5
4	95	12	2	2

表 4 药渣醇提均匀设计实验安排及结果

Table 4 Arrangements and results by uniform design of ethanol extraction of *DanShen Yin*

试验号	因素				出膏率	丹酚酸 B
	乙醇浓度 / %	加醇倍量 / 倍	提取次数 / 次	提取时间 / h	/%	提取率 / %
1	85	10	2	1.5	31.52	97.22
2	95	12	2	1	26.90	89.20
3	75	12	1	0.5	27.23	88.21
4	95	10	1	2	8.74	36.27
5	75	6	2	2	32.06	70.52
6	85	8	2	1	25.31	87.32
7	85	8	1	1.5	18.58	75.64
8	95	6	1	0.5	5.09	26.86
9	65	12	2	2	32.12	87.23
10	75	10	1	1	28.11	80.80
11	65	8	2	0.5	29.42	95.98
12	65	6	1	1.5	23.00	60.12

利用 SPSS17.0 软件, 通过多元线性回归, 建立关于 Y_1 (出膏率)、 Y_2 (丹酚酸 B 转移率)与 X_1 (乙醇浓度)、 X_2 (加醇倍量)、 X_3 (提取次数)、 X_4 (提取时间)之间的方程关系:

$$Y_1=5.27X_1-5.836X_2-0.040X_1^2+0.070X_1X_2+0.939X_2X_3-0.203X_4^2-149.051(r=0.9859);$$

$$Y_2=14.983X_1-14.515X_2-10.675X_4-0.109X_1^2+0.190X_1X_2+2.463X_2X_3-436.686(r=0.9757);$$

从提高丹酚酸 B 转移率同时降低出膏率的角度, 结合实际工艺中的省时、节能因素, 在各因素设计的水平范围内对上述拟合的方程进行规划求解, 最终确定丹参饮水提最佳工艺为: 加 10 倍量浓度为 95 % 的乙醇溶液, 提取 2 次, 每次 0.5 h, 此时出膏率理论值为 17.47 %, 丹酚酸 B 理论转移率为 82.24 %。在该工艺参数条件下重复实验 3 次, 结果出膏率为 12.41 %, 丹酚酸 B 转移率为 80.56 %, 与理论值接近, 说明本实验优化的提取工艺合理、可行。

2.2 基于药效学指标优选提取工艺

2.2.1 供试品制备 分别按上述 4 种优化后的提取工艺, 制备成丹参饮水提物、丹参饮超临界 CO₂ 提取物(给药时加等量吐温 80 乳化)、丹参饮超临界 CO₂ 提取物结合药渣水提物、丹参饮超临界 CO₂ 提取物结合药渣醇提物(超临界提取物加吐温乳化后与水/醇提物按比例混合)。

2.2.2 分组 实验前各组小鼠先做心电图检查, 弃去 ST 段、T 波异常和心律失常者, 取小鼠 70 只, 随机分成 7 组: 正常组、模型组、阳性药对照组(美托洛尔组)、丹参饮水提物组(水提物组)、丹参饮超临界 CO₂ 提取物组(超临界提取物组)、丹参饮超临界 CO₂ 提取物结合药渣水提物组(超临界 + 药渣水提组)、丹参饮超临界 CO₂ 提取物结合药渣醇提物组(超临界 + 药渣醇提组)。

2.2.3 给药及造模 各药物组按小鼠 0.2 mL·10 g⁻¹ 的容积灌胃给药, 美托洛尔组给药剂量为 30 mg·kg⁻¹, 丹参饮各提取物组给药剂量为 12.08 g·kg⁻¹, 正常组和模型组给予等量蒸馏水, 以上各组均连续给药 14 d。除正常组外, 各组动物在第 12, 13, 14 天分别腹腔注射 ISO 3 mg·kg⁻¹, 正常组注射等量的生理盐水。

2.2.4 指标检测 第 10 天灌胃给药 2 h 后用 3.5 % 戊巴比妥钠(3 mg·kg⁻¹)麻醉小鼠, 连接生物机能实验系统, 30 min 后腹腔注射 ISO, 记录 20 min 内小鼠 II 导联心电图, 2 h 后眼球采血, 血样室温静置 4 h,

替换为: 第14天注射ISO半小时后, 小鼠称重, 腹腔注射戊巴比妥钠(35 mg · kg⁻¹)麻醉各组小鼠

3000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上层血清, 严格按试剂盒操作说明书进行 LDH、CK 的含量测定。

2.2.5 统计学处理 实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS17.0 统计软件, 多组比较采用单因素方差分析方法, 两组间比较采用 Bonferroni 法。P < 0.05 为有统计学意义。

2.2.6 丹参饮各提取物对心肌缺血小鼠心电图 J 点的影响 模型组在第 3 次注射 ISO 后小鼠 II 导联心电图 J 点明显下压, 各时间点 J 点偏移程度与正常组比较均有统计学意义 (P < 0.01); 4 种丹参饮提取物对 ISO 诱导的小鼠缺血性 ECG 改变均有一定的拮抗作用, 与模型组比较差异均有统计学意义 (P < 0.01, P < 0.05), 其中以超临界 + 药渣醇提组药效作用最明显, 见表 5。

表5 丹参饮各提取物对心肌缺血小鼠 ECG J 点的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 5 The influence on J point of ECG in mice with acute myocardial ischemia from DanShen Yin extracts

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	J 点偏移值 /mv		
		5 min	10 min	20 min
正常组	-	0.044 ± 0.022	0.045 ± 0.016	0.051 ± 0.024
模型组	-	0.269 ± 0.093 ^{##}	0.333 ± 0.102 ^{##}	0.235 ± 0.084 ^{##}
美托洛尔组	0.03	0.103 ± 0.032 ^{**}	0.113 ± 0.048 ^{**}	0.095 ± 0.028 ^{**}
水提物组	12.08	0.177 ± 0.061 ^{**}	0.194 ± 0.055 ^{**}	0.171 ± 0.056 [*]
超临界提取物组	12.08	0.182 ± 0.056 [*]	0.173 ± 0.048 ^{**}	0.187 ± 0.053
超临界 + 药渣水提组	12.08	0.171 ± 0.053 [*]	0.181 ± 0.043 [*]	0.156 ± 0.031 [*]
超临界 + 药渣醇提组	12.08	0.135 ± 0.030 ^{**}	0.144 ± 0.041 ^{**}	0.126 ± 0.033 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{##}P < 0.01; 与模型组比较, ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01。

2.2.7 丹参饮各提取物对心肌缺血小鼠血清 CK、LDH 活性的影响 见表 6。与正常组比较, 模型组 CK、LDH 活性明显升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 丹参饮各提取物组 CK、LDH 活性均显著降低 (P < 0.01), 说明以上 4 种丹参饮提取物均能有效降低 ISO 致心肌缺血小鼠心脏组织中 CK、LDH 的活性, 对缺血心肌具有良好的保护作用, 其中超临界 + 药渣醇提组 CK 活性下降幅度最明显, LDH 活性下降幅度也比较大。

4 讨论

4.1 提取工艺参数指标的选择 丹酚酸 B 及丹参酮类成分常被作为方中君药丹参的质控指标^[7], 这两类成分对于心血管疾病的治疗已被药理研究所证实^[8-9]。砂仁质控指标主要为乙酸龙脑酯, 檀香的质控指标则与其总挥发油有关^[7]。因此在进行工艺参数优选时, 超临界 CO₂ 提取部分则以隐丹参酮、丹参酮

表6 丹参饮各提取物对心肌缺血小鼠血清 CK、LDH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 6 The influence on CK and LDH level in serum of mice with acute myocardial ischemia from DanShen Yin extracts

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	CK 活性 /U·mL ⁻¹	LDH 活性 /U·L ⁻¹
正常组	-	0.275 ± 0.071	384.440 ± 25.083
模型组	-	1.811 ± 0.285 ^{##}	522.550 ± 36.216 ^{##}
美托洛尔组	0.03	0.309 ± 0.066 ^{**}	391.534 ± 42.205 ^{**}
水提物组	12.08	1.264 ± 0.297 ^{**}	447.313 ± 37.802 ^{**}
超临界 CO ₂ 提取物组	12.08	1.217 ± 0.154 ^{**}	439.113 ± 31.422 ^{**}
超临界 + 药渣水提组	12.08	1.187 ± 0.294 ^{**}	417.138 ± 19.490 ^{**}
超临界 + 药渣醇提组	12.08	0.568 ± 0.131 ^{**}	418.225 ± 26.869 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{##}P < 0.01; 与模型组比较, ^{**}P < 0.01。

IIA、乙酸龙脑酯的综合含量作为考察指标^[6]; 药渣提取部分以丹酚酸 B 的含量作为考察指标。

4.2 实验动物模型的选择 ISO 是一个很强的 β 受体激动剂, 大剂量 ISO 可增加心肌收缩力和耗氧量, 引起心肌缺血坏死, 连续使用可造成心肌损伤^[10]。采用腹腔注射 ISO 3 mg·kg⁻¹, 连续 3 d, 即可复制出小鼠的急性心肌缺血模型, 方法简便、模型稳定^[11]。

4.3 药效指标的选择 心肌持续缺血将导致心肌组织损害, 并出现 ST 段缺血性改变, 由于小鼠心电图 ST 段变化并不明显、测量易带有主观性, 所以多数研究者采用 J 点 (QRS 波群的终点与 ST 段交接处) 作为评价动物模型的主要指标^[12]。检测该模型动物肢体 II 导联心电图 J 点的改变, 方法简便、可靠, 能清晰地记录和测量 J 点的偏移值, 作为 ISO 所致心肌缺血的明显标志^[13]。心肌缺血除心电图改变外, 血清心肌酶也是重要的检测指标, CK、LDH 在心肌细胞中的含量较高, 心肌细胞受损、细胞膜完整性被破坏时, 细胞内 CK 和 LDH 被释放出来并扩散入血浆, 血清中 CK 和 LDH 活性明显升高, CK 活性的增加被认为是心肌细胞损伤最敏感的指标之一, 与心肌坏死程度呈正相关^[14]。

本研究运用化学 - 药理相结合的研究思路, 对丹参饮提取工艺进行了研究。结果表明, 丹参饮超临界 CO₂ 提取结合药渣乙醇提取物对 ISO 诱导的小鼠缺血性 ECG 改变有明显对抗作用, 能显著降低心肌缺血损伤时血清中 CK、LDH 的活性, 因而对 ISO 诱导的小鼠缺血心肌具有良好的保护作用, 且效果明显强于传统的水提法, 同时大大降低了出膏率, 为丹参饮提取工艺改进提供了科学依据。

参考文献:

[1] 王大安, 李建文. 丹参饮干预急性心肌缺血心肌细胞凋亡与 Bcl-2