

ZnCl₂ 沉淀法纯化丹酚酸 B 的工艺优选

段文强, 万鹏, 高鹏, 代龙*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 优选 Zn²⁺ 沉淀法纯化丹酚酸 B 的工艺条件。方法: 采用 HPLC 测定丹酚酸 B 含量, 色谱条件为流动相乙腈-0.05% 磷酸溶液梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 检测波长 286 nm, 进样量 10 μL。以丹酚酸 B 提取率为指标, 通过单因素试验优选提取工艺; 以丹酚酸 B 转移率为指标, 通过单因素试验考察碱液种类、ZnCl₂ 用量、盐酸摩尔浓度及 pH 对 Zn²⁺ 沉淀法纯化工艺的影响。结果: 优选的丹酚酸 B 提取、纯化工艺为加 6 倍量 pH 2~3 盐酸溶液温浸 3 次, 每次 1 h, 加 1% Na₂CO₃ 溶液调 pH 6.0~6.5, 加 30% 药材质量的 ZnCl₂, 用 2 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解, 调 pH 2~3, 加等倍量乙酸乙酯萃取 2 次, 减压低温干燥, 丹酚酸 B 得率 3.47%, 纯度达 80%。结论: 优选的纯化工艺稳定可行, 可避免长时间高温和 pH 对丹酚酸 B 的破坏。

[关键词] 丹酚酸 B; Zn²⁺; 沉淀法; 纯化; 高效液相色谱; 单因素试验

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0012-03

[doi] 10.11653/syfy2013190012

Optimization of Purification Technology of Salvianolic Acid B by ZnCl₂ Precipitation Method

DUAN Wen-qiang, WAN Peng, GAO Peng, DAI Long*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of salvianolic acid B by Zn²⁺ precipitation method. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of salvianolic acid B, chromatographic conditions were as follows: mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid gradient elution, column temperature 30 ℃,

[收稿日期] 20130306(017)

[基金项目] 国家“十二五”重大新药创制专项(2013ZX09103002-021)

[第一作者] 段文强, 硕士, 从事中药制剂工艺及质量标准研究, Tel: 13793102075, E-mail: duanwenqiang1227@163.com

[通讯作者] * 代龙, 教授, 从事中药新药开发及新剂型研究, Tel: 0531-82960689, E-mail: dailongdailong@263.net

- [4] 茹炜炜, 梁幼生, 戴建荣, 等. 青蒿琥酯对日本血吸虫作用的研究 I 小鼠体内不同发育阶段虫体对青蒿琥酯的敏感性[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(3): 161.
- [5] 林芳, 钱之玉, 薛红卫, 等. 青蒿素和青蒿琥酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抑制作用比较研究[J]. 中草药, 2003, 34(4): 347.
- [6] 陈欢欢, 周慧君. 青蒿琥酯的抗血管生成作用[J]. 药学学报, 2004, 39(1): 29.
- [7] 熊耀坤, 梁爽, 杜焰, 等. HPLC 法测定洋川芎内酯 I 的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1644.
- [8] 刘冰, 吕佳. HPLC 测定苦参碱平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 43.
- [9] 熊璐琪, 李国锋, 苏碧雅, 等. 醋酸地塞米松和地塞米松磷酸钠的油水分分配系数与其经皮渗透行为之间的相关性研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(6): 439.
- [10] 孙启文, 陈军, 陈明磊, 等. 高车前甘油水分分配系数的测定及大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 193.
- [11] 陆慧, 贾晓斌, 韦英杰, 等. 灵芝三萜表观油水分配系数的测定及其在体肠吸收[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 12.
- [12] 姚媛, 廖琼峰, 曾丽英, 等. 新穿心莲内酯表观油水分配系数的测定及 pH 值对其的影响[J]. 今日药学, 2009, 19(10): 8.

[责任编辑 仝燕]

detection wavelength 286 nm, injection volume 10 μ L. With yield of salvianolic acid B as index, extraction technology was optimized by single factor tests; With transfer rate of salvianolic acid B as index, single factor tests were adopted to optimize purification technology by taking alkali liquor species, dosage of ZnCl₂, the molar concentration of HCl and pH as factors. **Result:** Optimized purification technology of salvianolic acid B was as following: soaked 3 times with 6-fold the amount of pH 2-3 HCl, 1 h each time, adjusted pH to 6.0-6.5 by 1% Na₂CO₃, dosage of ZnCl₂ 30% as quality of medicinal materials, dissolved precipitate with 2 mol·L⁻¹ HCl, adjusted pH to 2-3, extracted 2 times with the same times the amount of ethyl acetate, dried it with vacuum and low temperature, yield of salvianolic acid B 3.47%, purity of 80%. **Conclusion:** Optimized technology was stable and feasible, it could avoid damage of salvianolic acid B under prolonged high temperature and pH conditions.

[**Key words**] salvianolic acid B; Zn²⁺; precipitation; purification; HPLC; single factor test

丹参中水溶性有效成分为酚酸类^[1-2],具有抗血小板聚集^[3]、抗凝血和抗血栓形成^[4]、抑制细胞内源性胆固醇合成、防止脂质沉积及动脉粥样硬化斑块的形成^[5]等作用,其中丹酚酸B含量较高,占丹参药材的2%~8%^[6]。丹酚酸B主要降解途径为酯水解和苯并呋喃开环,其中水解产物为丹参素、紫草酸,氧化产物为原儿茶醛,苯并呋喃开环产物为丹酚酸E。在传统水提醇沉工艺过程中,丹酚酸B受热时间长,损失较大^[7],现多采用大孔树脂法进行纯化,但存在上样液体积大、树脂用量大、成本高等缺点。本实验以丹酚酸B提取率和转移率为指标,采用锌离子络合沉淀法纯化丹酚酸B^[8],通过单因素试验优选提取、纯化工艺。

1 材料

Centrifuge-5804型高速离心机(德国Eppendorf公司),LC-2010A型高效液相色谱仪(日本岛津公司),PHS-3C型精密pH计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂),DZF-6051型真空干燥箱(上海精宏试验设备有限公司),PL6001-S型电子天平(梅特勒-托利多仪器公司),DK-S22型电热恒温水浴锅(上海精宏试验设备有限公司)。

丹参(购自济南建联中药店,经本校药学院生药系鉴定教研室周凤琴教授鉴定为唇形科植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根和根茎),丹酚酸B对照品(中国药品生物制品检定所,批号111562-200302),乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹酚酸B的含量测定

2.1.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~15 min,10%~20% A;15~30 min,20%~

25% A;30~35 min,25%~10% A;35~40 min,10% A),柱温30℃,检测波长286 nm,进样量10 μ L。理论板数按丹酚酸B峰计算应不低于2 000。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取丹酚酸B对照品12.26 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为对照品储备液。精密量取储备液2,4,6,8,10 mL分别置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液,按**2.1.1**项下方法测定,以进样量为横坐标,峰面积的积分值为纵坐标,得回归方程 $Y=1.085 \times 10^6 X - 2\,990.6$ ($r=0.999\,9$),表明丹酚酸B进样量在0.490 4~2.452 μ g线性关系良好。

2.1.3 样品测定 称取提取干燥物0.01 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声处理(250 W,50 kHz)30 min,放冷,称定质量,用75%甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,进样,计算丹酚酸B含量。

2.2 提取工艺优选

2.2.1 提取方式的筛选^[7] 称取丹参药材3份,每份50 g,固定溶剂用量6倍,提取时间1 h,分别用水加热、pH 2~3盐酸溶液50℃温浸、50%乙醇回流提取,结果测得丹酚酸B提取率分别为60.3%,65.8%,66.9%,表明丹酚酸B在水液中受热最易破坏,结合成本考虑,故选择pH 2~3盐酸溶液70℃温浸提取。

2.2.2 提取次数考察 取丹参药材100 g,粉碎成最粗粉,加6倍量pH 2~3盐酸溶液70℃温浸4次,每次1 h,分次收集提取液,滤过,按**2.1.1**项下方法测定,测得丹酚酸B质量分数分别为2.06%,0.87%,0.17%,0.06%,计算丹酚酸B累计提取率分别为53.57%,76.10%,80.52%,82.08%,故选

择温浸提取 3 次。

2.3 锌离子络合沉淀工艺优选

2.3.1 pH 考察 等量量取丹参温浸液(相当于丹参药材 50 g,下同)4 份,分别用 1% Na_2CO_3 调 pH 5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,加 ZnCl_2 固体至沉淀完全,4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃去上清液,沉淀用 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液超声使溶解,得酸转溶液,留样测定,结果丹酚酸 B 转移率(以温浸液含丹酚酸 B 为 100% 计)依次为 64.3%,79.8%,93.9%,95.1%,53.7%,故选择 pH 6.0~6.5。

2.3.2 碱液种类筛选 等量量取丹参温浸液 3 份,分别用 1% Na_2CO_3 ,1% NaHCO_3 ,0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调 pH 6.0~6.5,加 ZnCl_2 固体至沉淀完全,其余操作同 2.3.1 项,结果丹酚酸 B 转移率分别为 92.46%,88.02%,69.21%,表明 1% Na_2CO_3 和 1% NaHCO_3 对丹酚酸 B 转移率大致相同,但用 1% NaHCO_3 溶液过程中会产生大量气泡,故选用 1% Na_2CO_3 溶液。

2.3.3 ZnCl_2 用量选择 等量量取丹参温浸液 4 份,调 pH 6.0~6.5,分别加入相当于药材质量 10%,20%,30%,40% 的 ZnCl_2 固体,搅匀,其余操作同 2.3.1 项,结果丹酚酸 B 转移率分别为 23.2%,68.9%,94.5%,94.8%,故选择 ZnCl_2 加入量为生药量 30%。

2.3.4 盐酸摩尔浓度考察 等量量取丹参温浸液 3 份,调 pH 6.0~6.5,加 ZnCl_2 17 g 充分沉淀,4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃去上清液,沉淀分别用 1,2,4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 50 mL 超声使溶解,留样测定,结果丹酚酸 B 转移率分别为 88.4%,98.8%,96.2%,故选择 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液。

2.4 丹酚酸 B 得率的测定 称取丹参药材适量,粉碎成最粗粉,按上述提取、纯化工艺进行试验,得酸转溶液,调 pH 2~3,用等倍量乙酸乙酯萃取 2 次,减压低温干燥,得干膏,计算丹酚酸 B 得率 3.47%,纯度达 80%。

3 讨论

Zn 作为一种人体所必需的微量元素,对人体有重要作用^[9],本文借鉴离子络合沉淀提取分离茶多酚的方法^[8],采用锌离子络合沉淀法提取分离丹酚酸 B,相较于传统提取纯化工工艺(水提醇沉法、大孔树脂法),可节省大量有机溶剂,且操作简单。选取 70 °C 酸水温浸提取丹酚酸 B,避免了长时间高温煎煮对丹酚酸 B 的破坏。提取纯化过程中,温浸液、酸转溶液保持 pH 2~3,是保存丹酚酸 B 的最适 pH^[10]。减压干燥挥去乙酸乙酯,可避免高温对丹酚酸 B 的破坏。

[参考文献]

- [1] 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,2010:70.
- [2] 庄燕黎,晁若冰. 高效液相色谱法测定大鼠血浆中丹参素和原儿茶醛[J]. 药学学报,1999,34(8):613.
- [3] 邹正午,徐理纳. 迷迭香酸抗血栓和抗血小板聚集作用[J]. 药学学报,1993,28(4):241.
- [4] 陈可冀. 活血化瘀药化学药理与临床[M]. 济南:山东科学技术出版社,1995:17.
- [5] 孙锡铭,蔡海江,宋素云,等. 丹参素的新药理作用[J]. 中草药,1991,22(1):20.
- [6] 叶勇. 丹参有效成分分离的研究进展[J]. 药品评价,2005,2(2):146.
- [7] 郭永学. 丹酚酸 B 的降解机理及纯化工艺研究[D]. 大连:大连理工大学,2007.
- [8] 杨晓萍,钟梅,周帅祥,等. Zn^{2+} 沉淀法提取茶多酚工艺研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(4):122.
- [9] Bettger W J, O' Dell B L. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells[J]. J Nutr Biochem,1993,14:194.
- [10] 张春光,崔翰明,张秋燕,等. 丹参提取物中的丹酚酸 B 在不同 pH 条件下的稳定性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(1):3.

[责任编辑 全燕]