

## 丹参总酚酸大孔树脂纯化工艺

魏冬青<sup>1</sup>, 陈绍民<sup>2</sup>, 苗建武<sup>1</sup>, 丁嘉信<sup>1</sup>, 陈智<sup>3</sup>, 田景振<sup>1\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省食品药品监督管理局,  
济南 250013; 3. 济南市第二人民医院, 济南 250001)

[摘要] 目的:研究大孔树脂分离纯化丹参总酚酸的工艺条件及参数。方法:以丹参总酚酸的含量和转移率为指标,确定提取液中总酚酸的最佳分离纯化条件。结果:HPD100 型大孔吸附树脂纯化丹参酚酸的最佳工艺条件为上样液质量浓度 48 g·L<sup>-1</sup>,树脂-药液比 3:2,树脂柱径高比 1:3,20% 乙醇洗脱,用量 8 BV。丹参总酚酸纯度可达 60% 以上,转移率约 45%。结论:该工艺具有操作简单、节省溶剂等优点,具有较好的推广应用前景。

[关键词] 丹参总酚酸;大孔树脂;分离纯化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)03-0042-03

## Purification Technology of Total Phenolic Acids from *Salvia miltiorrhiza* by Macroporous Resin

WEI Dong-qing<sup>1</sup>, CHEN Shao-min<sup>2</sup>, MIAO Jian-wu<sup>1</sup>, DING Jia-xin<sup>1</sup>, CHEN Zhi<sup>3</sup>, TIAN Jing-zhen<sup>1\*</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;  
2. Food and Drug Administration, Shandong Province, Ji'nan 250013, China;  
3. Second People's Hospital of Ji'nan, Ji'nan 250001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize technology conditions and parameters of separation and purification for total phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* by macroporous resin. **Method:** Based on the content and transfer rate of total phenolic acids from *S. miltiorrhiza* as indexes, determined optimum separation and purification conditions of total phenolic acids from extract. **Result:** Optimum purification conditions were as follows: HPD100 macroporous resin was used by 20% ethanol as elution agent with ratio of resin to material drug 3:2, ratio of diameter to height of

[收稿日期] 20110515(006)

[第一作者] 魏冬青, 硕士研究生, 从事中药制剂研究, Tel:0531-89628597, E-mail: weidongqing\_ngu@126.com

[通讯作者] \* 田景振, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型、新技术研究, Tel:0531-89628597, E-mail: tianjingzhen@163.com

### [参考文献]

- [1] Takahashi Y, Miyassaka N, Tasaka S H, et al. Constitution of two coloring matters in the flower petals of *carthamus tinctorius* L [J]. *Tetrahedron Lett*, 1982, 23 (49):5163.
- [2] 施峰, 刘焱文. 红花的化学成分及药理研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(9):1666.
- [3] 中国药典. 一部 [S]. 2010:141.
- [4] 曹群华, 瞿伟菁, 李家贵. 大孔树脂吸附纯化沙棘籽渣总黄酮的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2004, 29 (3):225.
- [5] 彭亮, 李知敏. 大孔吸附树脂分离紫葳中总黄酮的工

- 艺研究 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(2):352.
- [6] 袁崇均, 王筋, 陈帅. 大孔树脂对槐角总黄酮分离纯化工艺研究 [J]. *四川中医*, 2008, 26(3):40.
- [7] 花蕾, 张文清, 夏玮. 桑叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺 [J]. *中成药*, 2007, 29(12):1758.
- [8] 刘斌, 石任兵, 余超. 影响大孔吸附树脂吸附分离中草药化学成分的因素 [J]. *中草药*, 2002, 33(5):475.
- [9] 于智峰, 王敏. 大孔树脂精制苦荞总黄酮工艺 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(7):585.
- [10] 盛华刚, 朱立俏, 张超, 等. 金荞麦提取液的大孔树脂分离纯化工艺研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 32 (15):1832.

[责任编辑 仝燕]

resin column 1:3, volume of elution agent was 8 BV, and concentration of sample was  $48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . In these conditions, purity of total phenolic acid from *S. miltiorrhiza* could reach above 60%, and transfer rate was about 45%. **Conclusion:** Macroporous resin method was easy to operate and solvent-saving with good promotion prospects.

[**Key words**] total phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza*; macroporous resin; separation and purification

丹参水溶性成分主要为酚酸类,是治疗冠心病<sup>[1]</sup>的主要有效成分,其中丹酚酸 B 约 70%。丹参水溶性成分的提取方法多采用水提醇沉法<sup>[2-4]</sup>,此方法溶剂消耗大,有效成分有明显损失。本研究采用目前用于对许多有效成分有良好分离效果的大孔树脂分离技术,对丹参总酚酸进行分离纯化研究。

## 1 材料

UV3010 紫外-可见分光光度计(日本日立),1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦),BS110S 型分析天平(北京赛多利斯天平公司),H1850R 型台式高速冷冻离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)。

丹参(购于建联中药店,经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的根),丹酸 B 对照品(批号 11562-200504,中国药品生物制品检定所),各种型号大孔吸附树脂(河北沧州宝恩吸附材料科技有限公司),甲醇、乙腈为色谱醇,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定

#### 2.1.1 丹参总酚酸的测定(硝酸铝络合比色法)<sup>[5]</sup>

精密称取丹酚酸 B 对照品 3.20 mg,蒸馏水溶解,定容于 10 mL 量瓶中,得  $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照溶液。分别精密吸取对照液 0.25, 0.5, 0.75, 1.00, 1.50, 1.75 mL 至 25 mL 量瓶中,各加水至 6 mL;加 5% 的亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀放置 6 min;加 10% 的硝酸铝溶液 1 mL,摇匀放置 6 min;加 4.3% 氢氧化钠溶液 10 mL,再加水定容至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂为空白,于 490 nm 处测其吸光度值,以吸光度( $Y$ )对丹酚酸 B 质量( $X$ )进行线性回归,得回归方程为  $Y = 1.2887X + 0.0071$  ( $r = 0.9997$ ),并按下式进行校正。

$$\text{丹参总酚酸含量} = F(A - B) + B$$

$A$  为分光光度法测定的总酚酸含量; $B$  为 HPLC 测定的丹酚酸 B 含量; $F$  为校正因子 0.626。

结果表明总酚酸在 0.08 ~ 0.56 mg 线性关系良好,且方法学考察符合要求。

#### 2.1.2 丹酚酸 B 的测定方法

按 2010 年版《中国

药典》中的丹酚酸 B 的含量测定方法<sup>[6]</sup>。以峰面积( $Y$ )对质量( $X$ )进行线性回归,得回归方程  $Y = 452.22X + 19.958$  ( $r = 0.9995$ )。丹酚酸 B 在  $1.24 \sim 4.96 \mu\text{g}$  线性关系良好。

### 2.2 大孔吸附树脂的筛选<sup>[7-9]</sup>

**2.2.1 提取液的制备** 取适量丹参药材每次加 8 倍量 60% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 1.5 h,抽滤除杂,定容。

**2.2.2 树脂上样液的处理** 丹参提取液在  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  下旋转至无醇味, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  高速离心 15 min,倾出上清液,定容即得。

**2.2.3 大孔吸附树脂静态吸附考察** 分别称取已处理的 DM301, D101, AB-8, HPD100 4 种型号的树脂 0.65 g,各加提取液 75 mL, $25 \text{ }^\circ\text{C}$  下恒温震荡 24 h,抽滤,滤液用水定容;滤渣加入 95% 的乙醇适量, $25 \text{ }^\circ\text{C}$  下恒温震荡 24 h,抽滤,解析液用 95% 的乙醇定容,按照 2.1.1 项下建立的含量测定方法测定总酚酸含量,结果总酚酸吸附量分别为 98.7, 121.2, 127.1, 132.5  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , D101, HPD100 大孔树脂对丹参总酚酸静态吸附量较大、解析率较好,故选择这两种树脂进一步进行动态吸附洗脱考察。

**2.2.4 大孔吸附树脂动态吸附考察** 分别称取已处理的 D101 及 HPD100 型号的树脂 2 g 上柱,各上样 175 mL,用水洗至  $\text{FeCl}_3$  反应呈阴性,95% 的乙醇洗脱至  $\text{FeCl}_3$  反应呈阴性,将水洗液及 95% 的乙醇洗脱液,分别浓缩定容,测定总酚酸含量,结果总酚酸的吸附量分别为 71.0, 75.1  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,解析率均大于 90%。HPD100 比 D101 大孔吸附树脂的吸附量大,因此选用 HPD100 大孔吸附树脂对丹参水溶性成分进行纯化。

**2.3 最佳上样浓度考察** 取一系列不同质量浓度(60, 48, 40, 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 相同生药量的上柱药液上柱,进行吸附洗脱,以洗脱物中总酚酸纯度、丹酚酸 B 纯度为考察指标,选择合适的上柱质量浓度。结果可知上药液浓度为  $48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,总酚酸、丹酚酸 B 纯度最高,分别为 58.4%, 39.4%, 因此选择大孔树脂上样液质量浓度为  $48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.4 泄漏曲线考察** 样品液通过 2 g 树脂柱,分段

收集残留液(每份 8 mL),测定残留液中指标成分并绘制泄漏曲线,结果见图 1。由图 1 可知,在第 3 份样品处有一突跃,即流出物为 24 mL 时有明显泄漏,从而说明样品液的最大上样量为 16 mL。

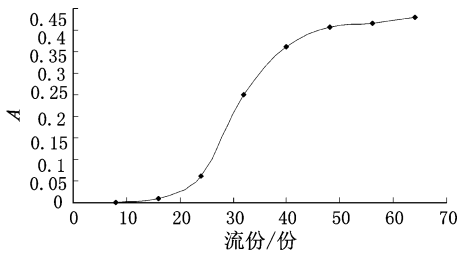


图 1 丹参总酚酸大孔树脂泄漏曲线

**2.5 洗脱溶剂考察** 按上述确定的工艺条件上样,先用水洗脱,再分别用 20% 乙醇,40% 乙醇,60% 乙醇,80% 乙醇洗脱,收集洗脱液,分别以无  $\text{FeCl}_3$  反应为洗脱终点,检测指标成分含量,结果见图 2。试验结果表明,丹参总酚酸主要集中在体积分数为 20% 的乙醇处,因此确定洗脱溶剂为 20% 乙醇。

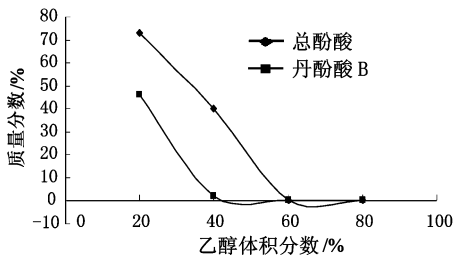


图 2 丹参总酚酸大孔树脂洗脱曲线

**2.6 洗脱溶剂用量考察** 按照上述吸附条件,精密量取处理后样品溶液通过树脂柱,水洗至无  $\text{FeCl}_3$  反应为洗脱终点,量取 20% 乙醇洗脱,分段收集洗脱液,制备供试品溶液,测定总酚酸的含量。结果 8 BV 的 20% 乙醇可达到 94.35% 的洗脱率,确定 20% 乙醇用量为 8 BV。

**2.7 径高比考察** 按上述工艺条件,分别取 3 份 HPD100 型树脂 3 g、上样液 16 mL,加入径高比为 1:3,1:6,1:12 的树脂柱中,测定洗脱液中指标成分,结果发现径高比为 1:3 时,总酚酸、丹酚酸 B 得量分别为 42.8,24.7 mg,总酚酸纯度 61.0%,故确定树

脂径高比为 1:3。

**2.8 大孔吸附树脂分离富集工艺验证试验** 按上述确定的 HPD100 大孔吸附树脂及其分离富集工艺,以丹参总酚酸纯度、转移率为指标进行 3 次重复试验,结果丹参总酚酸平均纯度为 62.9%,RSD 4.87%,说明该工艺合理、稳定、可行。

### 3 讨论

本文通过建立紫外-可见分光光度法和高效液相色谱法相结合的含量测定方法对丹参总酚酸和丹酚酸 B 进行含量测定,能够更准确的测定有效成分的含量。

本文通过对不同型号大孔树脂进行考察,然后以丹参总酚酸的含量和转移率为指标,确定了总酚酸的最佳分离纯化条件。本工艺方法简便,成本低,丹参总酚酸的含量和转移率比较高,具有较好的推广应用前景。

### [参考文献]

- [1] 邓惠英. 丹参及其有效成分的药理研究概况[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(12): 1812.
- [2] 高霞, 王著明, 温守俭. 不同水提醇沉法纯化丹参总酚酸工艺的比较[J]. 吉林医学, 2009, 30(7): 614
- [3] 李向军, 刘敏彦, 赵兴茹, 等. 丹参水溶性成分提取工艺研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(12): 49.
- [4] 李绍林, 张建军. 丹参提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 45.
- [5] 陈焕娜, 刘洋, 赵晓霞, 等. 分光光度法测定丹参总酚酸含量方法的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 6(8): 19.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2005: 52.
- [7] 罗朵生, 何伟, 郭姣. 大孔吸附树脂纯化丹参酚酸的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 14.
- [8] 李朝霞, 李云谷. 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3): 30.
- [9] 李燕燕, 王宏洁, 杨健, 等. 大孔树脂纯化葛根丹参药对水溶性有效成分工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(1): 20.

[责任编辑 全燕]