

丹参中总丹参酮的提取与纯化

高媛¹, 闫艳^{1,2}, 杜晨晖^{1,2}, 朱丹妮^{1*}

(1. 中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198; 2. 山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] 目的: 优选丹参中总丹参酮的提取纯化工艺条件。方法: 采用正交设计法, 以总丹参酮为含量测定指标, 优选总丹参酮提取纯化工艺条件。以静态吸附及解析试验筛选最佳纯化树脂; 通过动态吸附相关指标考察最佳洗脱条件。结果: 最佳提取工艺为加 8 倍量 90% 乙醇, 80 ℃ 水浴回流提取 2 次, 每次 1 h。最佳纯化工艺为采用 D101 型大孔吸附树脂, 浓度 40% 样品以 3 BV·h⁻¹ 的流速吸附, 用水 5 BV 去糖, 以流速 5 BV·h⁻¹, 90% 乙醇洗脱 6 BV。结论: 优选工艺得到的总丹参酮含量较高, 工艺简单, 适宜工业化生产。

[关键词] 总丹参酮; 正交设计; 大孔树脂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0032-03

Study on Extraction and Purification Process of Total Tanshinone from *Salvia miltiorrhiza*

GAO Yuan¹, YAN Yan^{1,2}, DU Chen-hui^{1,2}, ZHU Dan-ni^{1*}

(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine,
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize a technique for extracting and purifying total tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. **Method:** Total tanshinones were selected as marker components and determined to optimize extraction and purification process of *Salvia miltiorrhiza* by orthogonal test. **Result:** The optimum extraction process was as follows: *Salvia miltiorrhiza* was added with 8 times alcohol of 90% and extracted 1 hour for 2 times. The optimum extraction purification was as follows: D101 macro porous resin was adopted in the experiment. The concentration of sample was 40%, the adsorptive speed of flow was 3 BV·h⁻¹. The adsorbing column was eluted with 5 BV water to remove the sugar. Finally the adsorbing column was eluted with 6 BV 90% ethanol and the flow rate was 5 BV/h. **Conclusion:** The content of the total tanshinones obtained was high by the optimum purification conditions. The technique is simple and suitable for the modern production.

[Key words] total tanshinone; orthogonal design; macro porous resin

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 主要含有二萜醌类脂溶性及酚酸类水溶性成分。目前对于丹参脂溶性部分研究中, 大多数是以丹参酮 II_A、丹参酮 I 等脂溶性成分作为量测定的指标^[1], 且总丹参酮的含量较低。本试验

以总丹参酮的提取量作为提取工艺的考察指标, 采用正交实验法优选提取工艺; 以大孔树脂对丹参脂溶性提取部位进行纯化, 考察了大孔树脂纯化总丹参酮的工艺参数, 以期获得符合新药申报规定要求的总丹参酮提取物, 为丹参的相关制剂的生产提供可靠的依据。

1 仪器与试剂

BECKMAN DU640 分光光度计, METTLER AE240 电子分析天平, Waters 600E-996 高效液相色谱仪(996PDA 检测器, Millennium32 工作站)。丹参

[收稿日期] 20101221(003)

[第一作者] 高媛, 硕士研究生, 从事中药物质基础及质量控制研究, E-mail: gaoyuan_0501@163.com

[通讯作者] * 朱丹妮, 教授, 从事中药复方物质基础研究, Tel: 025-86185158, E-mail: Danizhu@163.com

酮 II_A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110766-200417),丹参由厦门金日集团提供(经中国药科大学余伯阳教授鉴定)。大孔树脂:D101 型(天津农药厂),AB-8 型,D-4020 型(天津南开大学化工厂),HPD-100 型(河北沧州宝恩化工有限公司)。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。水为乐百氏纯净水。

2 正交试验优选提取工艺

2.1 紫外分光光度法测定总丹参酮的含量 精密称取丹参酮 II_A 对照品适量,至棕色量瓶中,加三氯甲烷制成 1 g·L⁻¹ 的丹参酮 II_A 对照品溶液。取正交试验各次试验样品适量,用等量三氯甲烷萃取 3 次,合并萃取液,回收三氯甲烷至干,残渣加三氯甲烷定容至一定体积,即得供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液适量置具塞比色管中,在 270 nm 处测定吸光度,依回归方程计算含量。

2.2 正交试验设计方案 采用正交试验方法,以对影响提取效果的主要因素乙醇体积分数、提取时间、加醇倍数、提取次数进行考察,应用 L₉(3⁴) 正交表安排试验,因素及水平安排见表 1。

表 1 丹参乙醇提取因素水平

水平	因素			
	A 乙醇体积分 数/%	B 回流时间/h	C 提取次数	D 加醇倍数/g
1	90	1	1	6
2	80	2	2	8
3	70	3	3	10

2.3 正交试验与结果分析 平行称取丹参药材 9 份,每份 50 g。按 L₉(3⁴) 正交表试验条件进行提取,每组试验平行重复 2 次。结果见表 2,3。

以总丹参酮的提取量为指标,方差分析可知,因素 B,C,D 对提取效果影响非常显著,因素 A 也有显著影响,借助表 2,选取显著因素的最高水平,得到最佳提取工艺条件为 A₁B₁C₂D₂。所以,丹参的最佳提取工艺为,加 8 倍量的 90% 乙醇,80 °C 水浴回流提取 2 次,每次 1 h。

2.4 最佳工艺验证 按处方量称取药材平行 2 份,按选定的最佳提取工艺 A₁B₁C₂D₂ 提取。结果表明总丹参酮平均提取量为 0.817 4 g,说明最佳提取工艺是可行的。

3 纯化工艺条件的筛选

3.1 上柱药液的制备及浓度 称取丹参粉末 100

表 2 丹参乙醇提取工艺正交试验

No	A	B	C	D	浸膏得率 /%	总丹参酮 含量/%	总丹参酮 提取量/g
1	1	1	1	1	6.54	3.56	0.464 4
2	1	2	2	2	10.53	7.49	1.575 9
3	1	3	3	3	5.87	8.24	0.958 3
4	2	1	2	3	43.76	1.66	1.452 2
5	2	2	3	1	43.96	0.82	0.715 6
6	2	3	1	2	24.75	1.21	0.597 5
7	3	1	3	2	52.31	1.08	1.126 9
8	3	2	1	3	41.71	0.81	0.675 9
9	3	3	2	1	46.46	0.58	0.540 8
K ₁	2.998 6	3.043 5	1.737 8	1.720 8			
K ₂	2.765 3	2.967 4	3.568 9	3.378 7			
K ₃	2.343 5	2.096 5	2.800 7	3.086 4			
R	22.130 8	22.464 0	23.601 3	23.902 4			

g,按正交优选出条件提取,提取液用加水稀释的方法加水至含醇量为 40% 作为上柱药液。

表 3 总丹参酮方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.036 75	2	0.018 38	34.687 6	<0.01
B	0.092 29	2	0.046 14	87.102 4	<0.01
C	0.281 8	2	0.140 9	266.005 5	<0.01
D	0.332 0	2	0.166 07	313.373 1	<0.01
SSE ₂	0.004 768	9	0.000 53		

注: F_{0.01}(2,9) = 8.02, F_{0.05}(2,9) = 4.26。

3.2 静态吸附及解析 取已处理好 4 种树脂各 6 份,每份 5.0 mL,置于具塞锥形瓶中,加样品液 20.0 mL,置于恒温振荡器中振摇 24 h (25 °C, 60 r·min⁻¹),将药液吸出,分别用三氯甲烷等体积萃取 3 次,合并三氯甲烷层,回收三氯甲烷,残余物用三氯甲烷定容。按照 2.1 项下的方法测定并计算大孔树脂对总丹参酮的吸附量。将吸附饱和的树脂滤除多余溶液,加入 30.0 mL 蒸馏水,置恒温振荡器中振摇 2 h,滤除水分后,加入 90% 乙醇 20 mL 振摇 24 h。滤出解吸液,分别用等体积三氯甲烷萃取 3 次,合并三氯甲烷层,回收三氯甲烷,残余物用三氯甲烷定容。按照 2.1 项下的方法测定并计算大孔树脂对总丹参酮的洗脱率,结果见表 4。

结果表明,D-101 型大孔树脂对总丹参酮的洗脱率最高,吸附率次之;HPD-100 型树脂的吸附率最高,但洗脱率较低。综合考虑吸附率和洗脱率,最终选用 D-101 型大孔树脂。

表 4 大孔树脂对总丹参酮的静态吸附与解析性能 %

树脂类型	吸附率	洗脱率
D-101	90.62	50.01
D-4020	87.41	41.42
HPD-100	93.16	39.18
AB-8	90.14	35.35

3.3 动态吸附及解析参数的考察

3.3.1 吸附流速的确定 取含醇量为 40% 丹参醇提取液, 分别以 1, 2, 3 $BV \cdot h^{-1}$ 的流速通过 5 mL D-101 型大孔树脂柱, 进行动态吸附。流出液按照 2.1 项下的方法测定并计算总丹参酮的饱和吸附量, 结果见表 5。不同流速的吸附量相差不大, 为节约时间故选 3 $BV \cdot h^{-1}$ 的吸附流速。

表 5 吸附流速的测定

流速/ $BV \cdot h^{-1}$	初始量/mg	吸附量/mg	饱和吸附量/ $g \cdot L^{-1}$
1	52.003	49.01	9.80
2	52.003	48.82	9.76
3	52.003	48.73	9.74

3.3.2 上样量的考察 取 D-101 型大孔树脂 5 mL 湿法装入色谱柱中, 加入丹参提取液适量, 以 3 $BV \cdot h^{-1}$ 流速通过。每 30 mL 收集 1 瓶, 测定总丹参酮的含量, 结果见图 1。当收集到 10 瓶时, 总丹参酮的泄漏率超过了 10%, 所以确定含醇 40% 的药液上样体积为 300 mL。

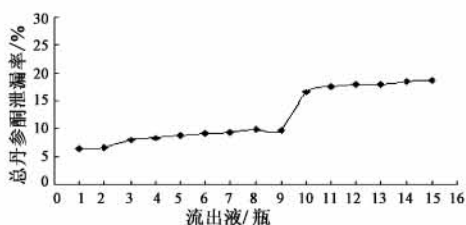


图 1 总丹参酮泄漏曲线

3.3.3 洗脱溶剂的选择 取 D-101 树脂 3 份, 每份 5 mL, 分别上柱, 按上述条件进行吸附。5 BV 水洗脱后, 分别以适量 50% 乙醇, 70% 乙醇, 90% 乙醇洗脱, 结果见表 6, 90% 乙醇对总丹参酮的洗脱效果最好。

表 6 不同体积分数乙醇洗脱总丹参酮含量

洗脱部位乙醇 /%	总丹参酮量 /mg	固形物重 /mg	纯度 /%
50	16.47	70.4	23.40
70	19.70	52.7	37.39
90	7.64	14	54.56

3.3.4 洗脱流速的确定 按上述条件进行动态吸附, 5 BV 水洗脱后, 先用 70% 乙醇洗脱, 再用 90% 乙醇以 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 $BV \cdot h^{-1}$ 的速度洗脱, 测定洗

脱液中总丹参酮的含量, 结果见图 2。洗脱速率为 5 $BV \cdot h^{-1}$ 时洗脱率最高。

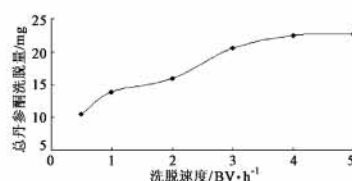


图 2 不同洗脱速度对总丹参酮洗脱量的影响

3.3.5 乙醇洗脱量考察 按上述色谱条件进行动态吸附, 用蒸馏水洗脱 5 BV, 70% 乙醇, 90% 乙醇洗脱量按照表 7 条件 1-4 进行洗脱, 并测定总丹参酮的含量, 结果表明, 先用 70% 乙醇 300 mL 洗脱除杂后, 再用 90% 乙醇 250 mL 洗脱效果最好, 90% 乙醇洗脱部位的总丹参酮的质量分数超过了 50%。

表 7 不同乙醇洗脱条件下总丹参酮的含量

洗脱方法	70% 乙醇用量/mL	70% 乙醇洗脱物重 /mg	90% 乙醇用量/mL	90% 乙醇洗脱物重 /mg	90% 乙醇洗脱物中总丹参酮纯度/%
条件 1	200	59.7	150	7.06	48.3
条件 2	250	62.1	200	7.13	49.8
条件 3	300	64.0	250	6.93	54.11
条件 4	350	65.2	300	3.58	30.61

3.4 验证试验 称取丹参粉末 100 g, 按照正交试验优选的最佳工艺 $A_1 B_1 C_2 D_2$ 平行做 2 次试验, 按照以上纯化工艺进行试验, 结果, 浸膏得率 10.8%, 其中丹参酮质量分数 7.6%, 提取物得率 0.82%, 得到提取物总丹参酮的质量分数 52.0%, 表明纯化工艺稳定可行。

4 结论

文献报道^[2]丹参酮类遇热易分解, 因此提取温度宜控制在 80 $^{\circ}C$ 左右, 醇提取液中乙醇的回收应在较低温度 (60 $^{\circ}C$) 和减压条件下操作。

丹参酮在光照下易分解, 因此在提取纯化过程应采取适当措施避光操作。此外提取液用加水稀释的方法加水至含醇量为 40% 作为上柱药液, 可以避免提取液浓缩后产生大量的沉淀, 影响进行下一步的纯化工作。

[参考文献]

- [1] 严红, 高扬, 郭伟, 等. 不同产地丹参药材中丹参酮 II_A 及丹参素的含量比较[J]. 天津药学, 2003, 15(3): 10.
- [2] 苏子仁, 曾惠芳, 曾元儿, 等. 丹参醇提工艺丹参酮 II_A 降解动力学研究[J]. 中成药, 1997, 19(12): 1.

[责任编辑 全燕]