

## 聚酰胺树脂分离纯化丹参总酚酸的研究

苗建武<sup>1</sup>, 陈绍民<sup>2</sup>, 王超<sup>1</sup>, 王莹<sup>1</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)

[摘要] 目的: 研究聚酰胺树脂分离纯化丹参总酚酸的工艺条件及参数。方法: 以丹参总酚酸的吸附量和洗脱率为指标, 确定丹参总酚酸最佳分离纯化条件。结果: 聚酰胺(60~100目)树脂分离纯化丹参总酚酸的最佳工艺条件为: 上样质量浓度为 $3.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 洗脱溶剂为40%乙醇。纯化后丹参总酚酸含量为98.41%。结论: 聚酰胺(60~100目)树脂分离纯化丹参总酚酸是可行的。

[关键词] 丹参; 总酚酸; 聚酰胺树脂; 分离纯化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0028-03

## Studies on Separation and Purification of Total Phenolic Acids from Salvia by Polyamide Resins

MIAO Jian-wu<sup>1</sup>, CHEN Shao-min<sup>2</sup>, WANG Chao<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, TIAN Jing-zhen<sup>1\*</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. Food and Drug Administration, Shandong Province, Jinan 250013, China)

**[Abstract] Objective:** To optimize the separation and purification of total phenolic acids from salvia by polyamide resins. **Method:** Based on absorptive capacity and elution efficiency of total phenolic acids in salvia, the conditions to separate and purify total phenolic acids in salvia were determined. **Result:** The polyamide resin (60-100 meshes) was chosen, washed with 40% ethanol, and the optimal concentration was  $3.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The purity of total phenolic acids obtained was 98.41%. **Conclusion:** Using polyamide resin (60-100 meshes) to separate and purify total phenolic acids from salvia is feasible.

**[Key words]** salvia; total phenolic acids; polyamide resins; separation and purification

[收稿日期] 20100413(005)

[第一作者] 苗建武, 硕士研究生, 从事中药新剂型研究, Tel: 0531-89628597, E-mail: miaojianwu123456@163.com

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

延胡索及不同酸制品对热板致痛小鼠有镇痛作用, 与生理盐水组比均有极显著性差异。与传统醋制品组比, 除乙酸制品(60 min)测得值较差( $P < 0.05$ ), 其他组均无显著性差异; 与生药组比, 各种酸制品除乙酸制品(60min)痛阈提高率有所降低外, 其他制品均有提高, 其中传统醋制品(60 min)与盐酸制品(60 min)及酒石酸制品有显著性差异, 柠檬酸制品有极显著差异, 与哌替组比, 各样品组痛阈提高率均不同程度降低, 但柠檬酸、酒石酸制品组及盐酸制品(60 min)无显著性差异。

综合分析, 乙酸制品延胡索乙素煎出量及镇痛作用均属最差, 苹果酸、盐酸制品与传统醋制品相比不具特色, 柠檬酸、酒石酸制品在延胡索乙素煎出量及镇痛作用提高方面均有一定优势。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 94.
- [2] 中华人民共和国药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 61.

[责任编辑 全燕]

丹参总酚酸是中药材丹参中的水溶性成分, 主要成分为: 丹酚酸、原儿茶醛、原儿茶酸、丹参素、咖啡酸、迷迭香酸等。丹参总酚酸具有显著的抗心肌缺血作用, 可降低心脏耗氧量, 并能对抗诱导的血小板聚集和抑制血栓的形成。临床试验研究表明, 丹参总酚酸对于冠心病、心绞痛疗效, 确切使用安全<sup>[1]</sup>。

## 1 材料

紫外-可见分光光度计 (UV 3010); Agilent 1100 高效液相色谱仪; BS 110S 分析天平 (北京赛多利斯天平公司)。

丹参酚酸粗品 (西安鸿生生物技术有限公司, 批号 090908, 丹酚酸 B 纯度 45.15%, 总酚酸纯度 69.6%); 丹酚酸 B 对照品 (批号 11562-200504, 中国药品生物制品检定所); 聚酰胺 (60~100 目) 树脂 (浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂出品); 甲醇为色谱醇, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定方法的建立

**2.1.1 丹参总酚酸的测定方法 (硝酸铝络合比色法)** 精密称取丹酚酸 B 标准品 3.20 mg, 用蒸馏水完全溶解后, 定容于 10 mL 量瓶中, 得  $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准溶液。分别精密吸取标准液 0.25, 0.5, 0.75, 1.00, 1.25, 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 的质量 ( $X$ ) 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。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 2005 年版《中国药典》中丹酚酸 B 的含量测定方法<sup>[2]</sup>。以峰面积 ( $Y$ ) 对进样量 ( $X$ ) 进行线性回归, 得回归方程  $Y = 452.22X + 19.958$  ( $r = 0.9997$ )。丹酚酸 B 在 1.24~4.96  $\mu\text{g}$  呈良好线性关系, 方法学考察均符合要求。

**2.1.3 丹参总酚酸 (校正)<sup>[3]</sup> 总酚酸** 除了丹酚酸 B (相对分子质量 718) 外, 还含有原儿茶醛 (相对分子质量 138), 丹酚酸 E (相对分子质量 718), 迷迭香酸 (相对分子质量 360), 紫草酸 (相对分子质量 538), 丹酚酸 A (相对分子质量 494) 等酚酸类化合物, 它

们之间的相对分子质量相差较大。以丹酚酸 B 为对照用分光光度法测定的总酚酸含量结果偏高, 主要是由于其他酚酸类化合物相对分子质量低于丹酚酸 B 所致。因此, 用 5 个酚酸类化合物平均相对分子质量与丹酚酸 B 相对分子质量的比值作为校正因子。

$$\text{丹参总酚酸含量} = F(A - B) + B$$

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

### 2.2 树脂考察

**2.2.1 聚酰胺静态吸附考察** 分别取聚酰胺 (14~30 目)、(30~60 目) 和 (60~100 目) 各 2 g, 加入丹参粗品水溶液  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  于 250 mL 锥形瓶中, 置恒温 (25 ) 振荡器中振荡 24 h 后, 过滤, 滤渣用水洗至  $\text{FeCl}_3$  反应为阴性, 合并滤液, 按 2.1.1 项下建立的含量测定方法测定其总酚酸含量, 结果总酚酸吸附量分别为 272.3, 350.6, 477.5 mg, 聚酰胺 (60~100 目) 对丹参酚酸的静态吸附量较大, 因此确定聚酰胺 (60~100 目) 为最佳吸附树脂型号。

### 2.2.2 聚酰胺动态吸附考察

**2.2.2.1 动态吸附量考察** 准确称取已处理好的聚酰胺 (60~100 目) 2 g, 湿法装柱 (径高比 1:5), 取一定量上样液 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 测其总酚酸含量 ( $m_1$ ), 以  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  流速过柱, 水洗至  $\text{FeCl}_3$  反应为阴性, 收集流出液, 测定其总酚酸含量 ( $m_2$ ), 结果吸附量为  $60.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  [吸附量 =  $(m_1 - m_2) / 2$ ], 表明该树脂动态吸附良好。

**2.2.2.2 动态解析量考察** 已达饱和吸附量的树脂再用 95% 醇洗脱, 以  $\text{FeCl}_3$  反应为阴性为洗脱终点, 检测洗脱液中总酚酸含量 ( $m_3$ ), 洗脱量 126 mg, 洗脱率 103.49% [洗脱率 =  $m_3 / (m_1 - m_2)$ ], 表明该树脂动态洗脱良好。

**2.3 最佳上样质量浓度考察** 取一系列不同质量浓度相同体积的上柱药液上柱 (径高比 1:5), 进行吸附洗脱, 测定洗脱物中总酚酸纯度 (校正) 及丹酚酸 B 纯度, 结果见表 1。由表 1 可知, 上样液为  $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时总酚酸纯度最高, 因此确定上样液质量浓度为  $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.4 最佳上样量考察 (泄漏曲线)** 将选择好质量浓度的样品液通过树脂柱, 分段收集流出液 (每份 8 mL), 测定流出液中指标成分, 结果见图 1, 由图 1 可知, 在第 17 份样品处有一突跃, 即流出物为 136

mL 时有明显泄漏, 从而说明样品液 ( $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的最大上样量为  $136 \text{ mL} - 11 \text{ mL}$  (死体积) 为  $125 \text{ mL}$ 。

表 1 丹参提取液最佳上样质量浓度考察结果

药液质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	洗脱酚酸量 / mg	总酚酸纯度 / %	丹酚酸纯度 / %	总酚酸纯度 (校正) / %
1.5	37.82	70.1	13.4	48.87
2.5	104.16	93.1	36.8	72.02
3.5	142.74	92.8	64.4	82.18

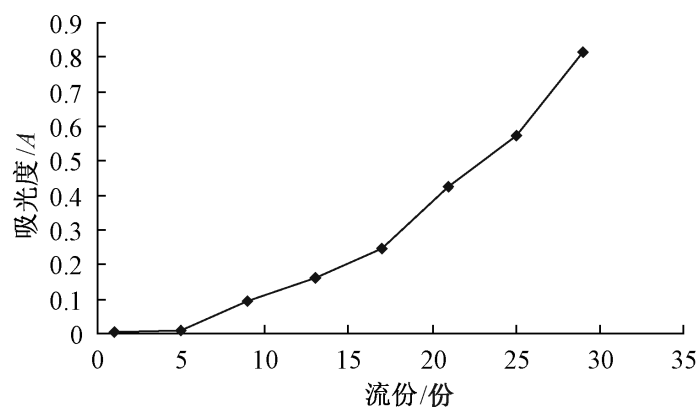


图 1 总酚酸泄漏曲线

**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 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90% 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, 绘制洗脱曲线。结果见图 2, 丹参总酚酸主要集中在 40% 乙醇处, 因此确定洗脱溶剂为 40% 乙醇。

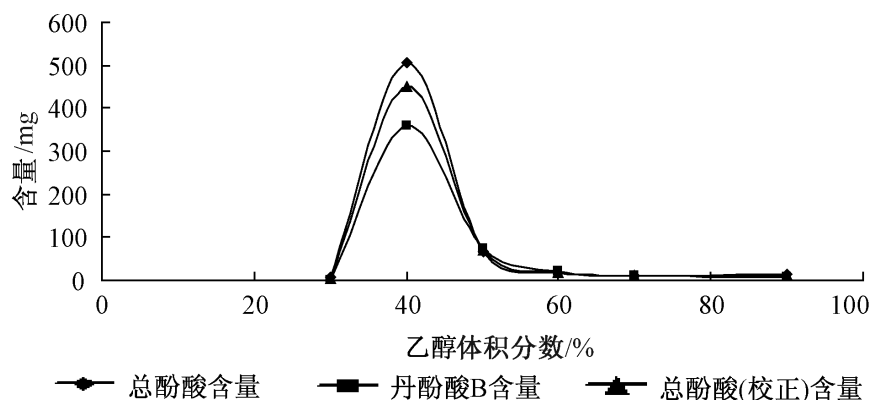


图 2 总酚酸洗脱曲线

**2.6 验证实验** 按已确定的工艺条件进行 3 次重复试验, 并计算丹参总酚酸的转移率、总得率及纯度, 结果见表 3。表明工艺合理、可行、稳定。

表 3 丹参酚酸纯化富集工艺验证试验结果 %

No.	纯度 (校正)	转移率	得率
1	99.77	59.68	43.74
2	100	57.78	42.05
3	95.47	61.97	45.64
RSD	2.59	3.50	4.10

### 3 讨论

聚酰胺为优质聚己内酰胺 (尼龙), 主要用于分离富含酚羟基一类的小分子化合物。以上样浓度、上样量、洗脱溶剂等为主要的考察项目, 逐一进行单因素考察, 最后比较全面的制定了一套比较实用的树脂工艺考察方案。纯化后丹参总酚酸 (校正) 含量为 98.41%, 验证实验结果表明, 所选工艺稳定、可行。

目前丹参总酚酸的含量测定方法主要有紫外分光光度法和比色法。本试验采用比色法, 以丹酚酸 B 作为对照品进行含量测定, 虽然不能全面反映总酚酸的质量, 但也是中药有效部位含量测定方法的一种探索, 并且实验中结合丹酚酸 B 的含量对总酚酸含量进行了校正, 最终证明该方法可行、可靠。

### [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] 中国药典. 一部 [S]. 2005: 52.
- [3] 黎莲娘, 张均田, 陶忠华, 等. 丹参总酚酸的提取方法及其制剂的制法与用途: 中国, 01142288. 2 [P]. 2002-12-11.

[责任编辑 仝燕]