

丹参酮 II_A 的分离纯化

孟召全*, 陈鸿楠, 钱捷

(北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

[摘要] 目的:用大孔吸附树脂层析技术分离丹参酮 II_A。方法:通过 HPD-100 树脂对丹参酮 II_A 的吸附穿透曲线与静态实验所得饱和吸附量来确定上样量,进行乙醇梯度洗脱,用高效液相色谱检测丹参酮 II_A,初步确定树脂的洗脱条件进而分析出分离的优化方案。结果:丹参酮 II_A 的分离纯化提取工艺为:丹参酮提取液,用 HPD-100 大孔吸附树脂,80% 乙醇洗脱。结论:该工艺可以将丹参酮 II_A 的浓度由提取液中的 17% 左右富集到 42% 左右,浓度提高了 2.5 倍左右。

[关键词] 丹参;丹参酮 II_A;微波辅助提取;大孔树脂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0006-02

丹参是我国传统中药,具有活血化瘀、理气止痛之功效。本研究探讨了丹参中有效成分丹参酮 II_A 的分离纯化工艺,使用 HPD-100 大孔吸附树脂,实现常压条件下树脂柱层析法分离纯化丹参酮 II_A。通过 HPD-100 树脂穿透曲线的测定,获得 HPD-100 树脂对丹参酮 II_A 的吸附泄露曲线,与静态实验所得饱和吸附量进行对比,确定丹参酮提取液的上样量,即树脂的动态最大吸附量。然后进行树脂的动态洗脱实验,确定树脂的洗脱条件,包括洗脱剂,洗脱剂用量,洗脱终点的判定等,通过洗脱曲线确定乙醇浓度达到 80% 时可以洗脱丹参酮 II_A。基本条件确定后便进行树脂动态洗脱分离丹参酮实验,收集 80% 5~10BV 的洗脱液进行液相分析,应用大孔树脂法可以较好的除去丹参酮提取液中的某些极性较大的物质,可以将丹参酮 II_A 的浓度由提取液中的 17% 左右富集到 42% 左右,浓度提高了 2.5 倍左右。

1 仪器与试剂

HWC3L-A 型微波萃取设备(天水华圆制药设备有限责任公司),Pine-tree 纯水机(北京湘顺源科技有限公司),SHA-B 水浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司),SK3300HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),中压玻璃色谱柱(上海华美实验仪器厂),TDL-5-A 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津)。冰醋酸、乙醇分析纯(北京化工厂),甲醇色谱醇(天津西

华特种试剂厂),HPD-100 大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司)。丹参饮片购自北京同仁堂股份有限公司,丹参酮 II_A 标准品购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 丹参酮提取液制备 称取一定量丹参,置于微波萃取罐中,按 20:1(mL·g⁻¹)的液固比加入 70% 乙醇,设定微波功率 450 W,提取温度 75℃,提取时间 6 min 进行提取;提取液离心过滤;残渣再加入 70% 乙醇进行二次提取,提取液离心过滤,合并滤液,60℃ 减压浓缩,回收乙醇;浓缩液 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,所得沉淀用 70% 乙醇溶解,即为丹参酮样液,4℃ 冷藏备用。

2.2 树脂分离丹参酮的动态法工艺 称取一定质量 HPD-100 树脂,湿法装入玻璃色谱柱中,倒入去离子水平衡柱子 30 min 左右,测定柱床高度,计算树脂柱体积。然后以 0.5 mL·min⁻¹ 的流速将“2.1”制得的丹参酮提取液泵入树脂柱中,收集流出液,同时用高效液相色谱仪检测。上样结束后,用不同浓度的乙醇进行丹参酮的解吸,分别收集洗脱液,用高效液相色谱仪测定丹参酮 II_A 的浓度。色谱条件:色谱柱:ODS C₁₈ 反相柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-1% 醋酸(85:15);流速:1 mL·min⁻¹;检测波长:260 nm;进样量:20 μL。

2.3 HPD-100 树脂吸附穿透曲线的测定 称取湿树脂约 16 g,湿法装柱,柱高 17 cm,柱体积约 23 mL,去离子水平衡后上样(上样浓度约 0.81 mg·mL⁻¹,上样流速 0.5 mL·min⁻¹),流出液用 HPLC

[收稿日期] 2009-12-27

[通讯作者] * 孟召全, Tel:13521719930

液相检测,直至流出液浓度与上样液浓度基本相等。结果见图 1。

实验结果表明,随着上样体积的增加,流出液中丹参酮 II_A 的浓度逐渐增加,当上样体积达到 150 mL 时流出液浓度迅速增加,基本与上样液浓度相等,说明树脂吸附已经达到过饱和,开始出现严重泄露,此时应停止上样。一般认为流出液浓度为上样浓度的 5% 左右即为树脂的泄露点,树脂吸附达到饱和,经分析可知在上样体积为 120 mL 时,流出液浓度为 0.05 mg · mL⁻¹ 左右,说明吸附基本达到饱和,因此上样体积约为 120 mL 左右。

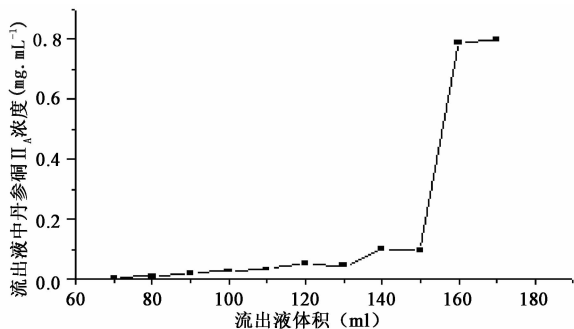


图 1 HPD-100 树脂的泄露曲线

2.4 乙醇梯度洗脱条件的确定 分别采用 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 乙醇进行洗脱,结果见表 1。

表 1 乙醇 5 BV 洗脱体积条件下乙醇浓度与丹参酮 II_A 含量的关系

乙醇浓度 (%)	丹参酮 II _A 的浓度 (mg · mL ⁻¹)	丹参酮 II _A 的含量 (mg)
10	—	—
20	—	—
30	—	—
40	0.0041	0.5355
50	0.0188	2.4496
60	0.0974	12.6576
70	0.2156	28.0216
80	0.2044	26.5678
90	0.0531	6.8966
100	0.0032	0.413

实验结果表明,乙醇浓度 60% 时有部分丹参酮 II_A 被洗脱下来,乙醇浓度 70% 与 80% 时洗脱液中丹参酮 II_A 的含量最高,基本上被完全洗脱下来,经计算树脂的洗脱收率为 80% 左右。

2.5 乙醇梯度洗脱条件的优化 上样结束后,先用 60% 乙醇洗脱 7 BV,除去未吸附样液与部分杂质,

然后用 80% 乙醇洗脱 26 BV。实验结果表明,80% 乙醇可以洗出大部分丹参酮 II_A。当洗脱达到 2 BV 时丹参酮 II_A 开始被洗脱下来,在洗脱体积达到 12 BV 时,丹参酮 II_A 的含量达到最高,浓度为 0.019131068 mg · mL⁻¹。洗脱达 26 BV 时,丹参酮 II_A 的浓度为 0.00564172 mg · mL⁻¹。结果见图 2。

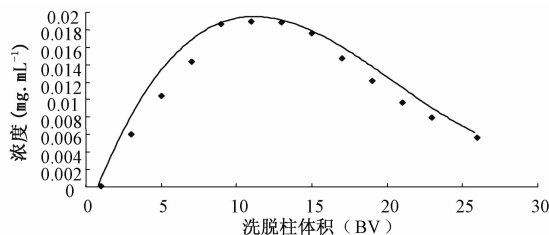


图 2 用 80% 乙醇洗脱丹参酮 II_A 的洗脱曲线

2.6 树脂动态洗脱分离丹参酮 装柱:称取湿树脂 12 g,用 20% 乙醇浸泡搅拌装柱,内径:1.1 cm,柱高:17 cm,柱体积(BV) ≈ 16 mL,装柱后用 20% 乙醇平衡 30 min,流速 1 mL · min⁻¹。上样:量取丹参酮提取液 310 mL 上样,调节流速 0.5 mL · min⁻¹,约 2 BV/h,收集上样流出液,HPLC 测定流出液中丹参酮 II_A 的浓度。解吸:根据前阶段的实验结果,50% 以下不能洗脱出有效杂质物质,因此上样结束后,先用 60% 乙醇洗脱 10 BV,然后逐步提高乙醇浓度,进行梯度洗脱。收集各部分洗脱液,进行 HPLC 检测。实验结果表明,80% 乙醇可以洗出大部分丹参酮 II_A。结果见下表 2。

表 2 各部分洗脱液中丹参酮 II_A 检测

组别 (乙醇洗脱)	体积 (mL)	丹参酮 II _A 的浓度 (mg · mL ⁻¹)	丹参酮 II _A 的含量 (mg)
上样液	310	0.0446	13.826
上样流出液	310	0.0007	0.217
60%	160	0.0019	0.304
70%	160	0.0067	1.072
80%	160	0.0629	10.064
90%	160	0.0075	1.2

3 讨论

本研究结果表明,应用大孔树脂法可以较好的除去丹参酮提取液中的某些极性较大的物质,可以将丹参酮 II_A 的浓度由提取液中的 17% 左右富集到 42% 左右,浓度提高了 2.5 倍左右。虽然实验结果中丹参酮 II_A 的纯度有一定提高,但效果还不是很明显,若更有针对性地选择树脂,对大孔树脂的种类再次优选,或许会有更佳的分选效果,纯度也会有相应大幅度提高。