

大孔吸附树脂纯化丹参酚酸的研究

罗朵生¹, 何伟², 郭姣^{1*}

(1. 国家中医药管理局“高脂血症调肝降脂”重点研究室, 北京 100026;
2. 广东药学院药物研究所, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选大孔吸附树脂纯化丹参酚酸的工艺条件。方法: 以丹酚酸 B 的含量为指标, 对大孔吸附树脂型号、吸附条件、洗脱条件进行了考察。结果: 最佳工艺条件为采用 HPD-300 大孔吸附树脂, 最大上样量以丹酚酸 B 计为 172.40 mg·g⁻¹ 干树脂, pH 3.5, 以 70% 乙醇 3 倍柱体积洗脱, 吸附-洗脱过程中丹酚酸 B 的平均保留率可达 88.11%, 纯化后丹酚酸 B 含量为 72.80%。结论: 该工艺可用于纯化富集丹酚酸类成分。

[关键词] 丹酚酸 B; 大孔吸附树脂

[中图分类号] R 283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0014-03

Purification of Salvianolic Acid by Macroporous Resins

LUO Duo-sheng¹, HE Wei², GUO Jiao^{1*}

(1. Key Unit of Modulating Liver to Treat Hyperlipemia SATCM, Beijing 100026, China;
2. Institute of Medica of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the optimum conditions for the purification of salvianolic acid by macroporous resins. **Method:** The macroporous resin was selected and the purification process was evaluated by measuring the content of salvianolic acid B. **Result:** The HPD-300 macroporous resin was the most effective one among the resins. The optimum conditions were screened, the adsorption capacity of HPD-300 macroporous resin was 172.4 mg/g, pH was 3.5; and the volume of 70% ethanol as eluent was 3 BV. By this method, the yield of salvianolic acid B was 88.11%; and the purity was 72.80%. **Conclusion:** The method is effective for purification of salvianolic acid.

[Key words] salvianolic acid B; macroporous resins

丹参具有祛瘀止痛, 活血通经, 清心除烦等功效。丹参中水溶性酚酸类主要有丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛等。研究表明丹参酚酸类具有抗脂质过氧化、清除自由基、改善微循环、抗血栓、抗动脉粥样硬化等药理作用, 其中丹酚酸 B 是含量最高的活性成分^[1]。本实验以丹酚酸 B 为指标, 优选大孔吸附树脂纯化丹参酚酸的工艺条件, 为生产提供依据。

1 仪器与试剂

Dionex ultimate 3000 高效液相色谱仪(在线脱气、自动进样、光电二极管阵列检测器、Chromleon 色谱工作站, 德国戴安公司); 丹酚酸 B 对照品(批号 111562-200706, 供含量测定用, 购于中国药品生物制品检定所); 丹参系唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎(购于广州致信药业有限公司); HPD-100, HPD-600, HPD-300 大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司), AB-8、XDA-5 大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 树脂吸附洗脱性能的特性参数

$$M_{\text{吸附}} = M_{\text{上}} - M_{\text{残}} - M_{\text{水洗}}$$
$$\text{吸附率} = M_{\text{吸附}} / M_{\text{上}}$$

[收稿日期] 2010-01-18

[基金项目] 国家科技重大专项(2009zx09103-407)

[作者简介] 罗朵生, 助教, 硕士, 主要从事中药化学研究, Tel: (020)39352609, E-mail: lds0901@163.com

[通讯作者] 郭姣, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合防治代谢性疾病的研究工作, Tel: (020)69352107

$$\text{洗脱率} = M_{\text{洗脱}} / M_{\text{吸附}}$$

2.2 丹酚酸 B 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-乙腈-1.7% 甲酸 (30: 7: 63); 检测波长 286 nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取丹酚酸 B 对照品 11.590 mg, 加 75% 甲醇溶解制成每 1 mL 含 0.231 8 mg 的溶液, 作为对照品溶液。精密吸取对照品溶液 5, 10, 20, 30, 40, 60 μL 注入液相色谱仪, 测定丹酚酸 B 色谱峰面积, 以丹酚酸 B 进样量为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 绘制标准曲线。丹酚酸 B 的回归方程为 $Y = 8.793 2 X - 0.188 1$, $r = 0.999 9$ 。表明丹酚酸 B 进样量在 0.464 ~ 13.908 μg 与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.3 大孔吸附树脂的优选^[2-3] 称取丹参粗粉 1 200 g, 按照《中国药典》2005 年版一部附录 IO 渗漉法项下操作, 以 30% 乙醇 15 倍量为溶剂渗漉, 收集渗漉液, 减压回收乙醇, 定容至 4 000 mL, 作为样品溶液备用。分别称取预处理好的 HPD-100, HPD-600, HPD-300, AB-8 和 XDA-5 大孔吸附树脂各 10 g, 平行 2 份, 装柱 (内径 2 cm, 长 16 cm)。分别精密量取 100 mL 样品溶液通过树脂柱, 以水洗至流出液无 Molish 反应, 收集流出液, 定容至 250 mL 量瓶中, 作为供试品溶液 I; 继以 70% 乙醇洗脱至洗脱液近无色, 收集洗脱液, 定容至 100 mL 量瓶中, 作为供试品溶液 II, 分别测定供试品溶液 I, II 中丹酚酸 B 的质量浓度, 计算吸附率、洗脱率, 见图 1。HPD-300 型大孔吸附树脂吸附率和洗脱率较高, 故选择 HPD-300 型大孔吸附树脂。

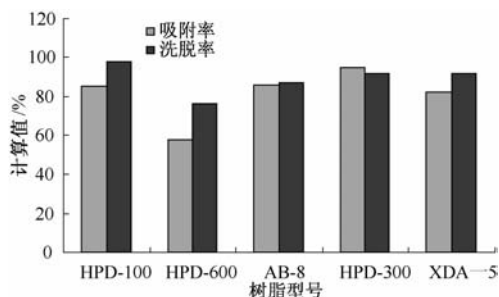


图 1 大孔吸附树脂优选结果

2.4 大孔树脂纯化条件考察

2.4.1 吸附条件考察

2.4.1.1 泄漏曲线考察 精密量取样品溶液 200

mL 通过 10 g HPD-300 树脂柱, 控制流速 1 mL · min⁻¹, 每 25 mL 收集一流份, 测定每一流份丹酚酸 B 的质量浓度, 以流出液流份为横坐标, 丹酚酸 B 质量浓度为纵坐标, 绘制泄露曲线。如图 2 可知, 从 100 mL 以后, 丹酚酸 B 泄漏量开始显著增大, 说明树脂柱开始不能完全吸附药液中的丹酚酸 B。为了丹酚酸 B 保留完全, 100 mL 作为最大上样量, 以丹酚酸 B 计为 172.4 mg · g⁻¹ 干树脂。

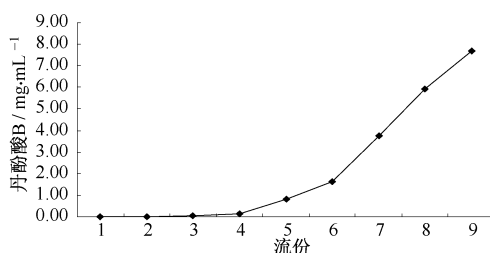


图 2 泄露曲线

2.4.1.2 药液 pH 考察 精密量取样品溶液 100 mL, 平行 3 份, 用稀 HCl 溶液调节溶液 pH 分别为 3.5, 4.0, 4.5, 通过树脂柱, 按照 2.2 项下操作, 制备供试品溶液, 测定丹酚酸 B 的质量浓度, 见图 3。结果显示不同 pH 药液的吸附率没有明显差别, 洗脱率以药液 pH 3.5 时最高。

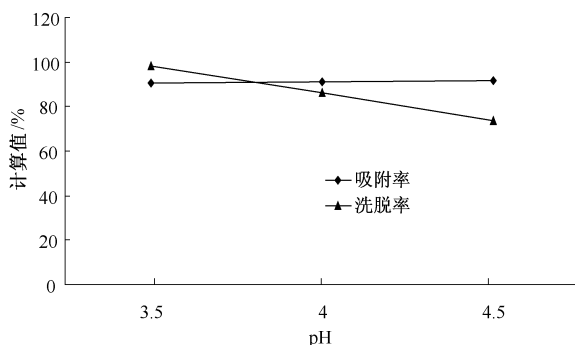


图 3 药液 pH 考察结果

2.4.1.3 药液盐浓度考察 精密量取样品溶液 100 mL, 平行, 份, 用稀 HCl 溶液调节 pH 为 3.5, 加 NaCl 调节盐质量浓度分别为 0%, 2%, 4%, 分别通过 10 g HPD-300 树脂柱, 按照 2.2 项下操作, 制备供试品溶液, 测定丹酚酸 B 的质量浓度, 见图 4。结果显示, 大孔吸附树脂的吸附率随盐质量浓度的增加而减少, 所以样品溶液不加入无机盐。

2.4.2 洗脱条件考察

2.4.2.1 洗脱溶剂考察 按照上述吸附条件, 精密量取处理后样品溶液通过 10 g HPD-300 树脂柱, 以

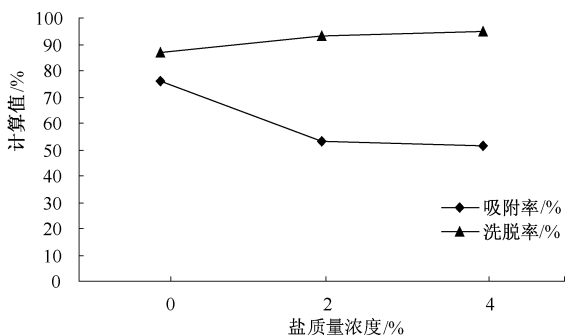


图 4 药液盐浓度考察

水洗至流出液无 Molish 反应, 然后依次用 30%, 50%, 70%, 90% 乙醇各 25 mL 洗脱, 分别收集洗脱液, 测定丹酚酸 B 的质量浓度, 绘制洗脱曲线。结果显示, 70% 乙醇累计洗脱率为 95.22%, 故确定洗脱溶剂为 70% 乙醇(图 5)。

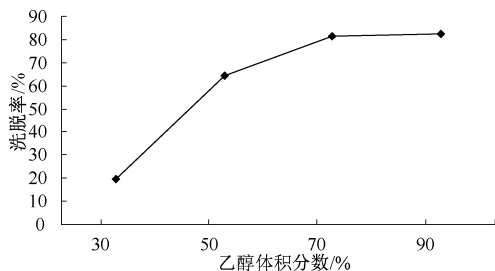


图 5 洗脱溶剂考察

2.4.2.2 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, 以水洗至流出液无 Molish 反应, 量取 70% 乙醇 100 mL 洗脱, 分段收集洗脱液, 制备供试品溶液, 测定丹酚酸 B 的质量浓度, 见图 6。结果显示 3 倍量树脂体积的 70% 乙醇可达到 95.76% 的洗脱率, 确定 70% 乙醇用量为 3 倍树脂体积。

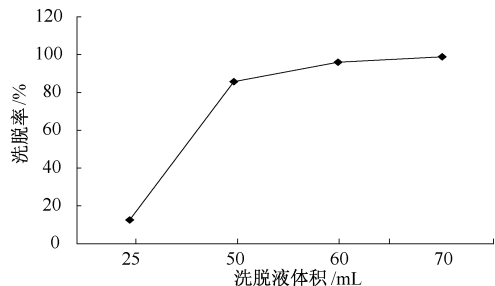


图 6 洗脱溶剂用量考察

2.5 验证试验 丹参粗粉 4 800 g, 按照《中国药典》2005 年版一部附录 IO 渗漉法项下操作, 以 30% 乙醇 15 倍量为溶剂渗漉, 收集渗漉液, 减压回收乙醇, 定容至 16 000 mL, 作为样品溶液备用。按上述确定的工艺条件上 1 600 gHPD-300 大孔树脂柱, 以水洗至流出液无 Molish 反应后, 以 3 倍柱体积的 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 留样, 测定其中丹酚酸 B 含量。另回收乙醇, 减压干燥, 称重, 计算得膏率。取干燥物适量, 测定其中丹酚酸 B 质量分数。计算保留率, 结果见表 1。

表 1 工艺验证实验

No.	总固形物得率		丹酚酸 B 质量分数		丹酚酸 B 平均保留率
	过柱前	过柱后	过柱前	过柱后	
1	36.35	6.76	15.70	73.35	88.11
2	36.16	6.74	15.13	72.52	

3 讨论

在前期丹参酚酸提取工艺的研究中, 证实丹参水提液在长时间受热浓缩过程中, 丹酚酸 B 的含量大量降低, 乙醇体系有利于丹酚酸 B 浓缩工艺的稳定性。因此, 本研究中采用 30% 乙醇渗漉法提取丹参酚酸类成分, 既可避免长时间加热提取造成丹酚酸 B 的损失, 又可使其存在于乙醇相中, 降低浓缩温度, 保证丹参酚酸类成分有更高的保留率。

本实验结果显示, 丹参渗漉液经大孔吸附树脂精制后, 总固形物得率由过柱前的 36.2% 以上降低到过柱后的 6.7%, 丹酚酸 B 的质量分数约为 73%, 平均保留达 88% 以上, 说明该工艺可以有效的降低出膏率, 去除杂质, 富集有效成分。

[参考文献]

- [1] 李朝霞, 王地. 丹参水溶性成分的研究进展[J]. 北京中医, 2004, 23 (3): 176.
- [2] 吴小东, 王红蕾, 齐崑, 等. 大孔树脂分离纯化丹酚酸的研究[J]. 离子交换与吸附, 2009, 25(3): 241.
- [3] 何伟, 李勇, 沈雪梅, 等. 大孔吸附树脂纯化丹参水溶性有效成分的研究[J]. 中药材, 2007, 30(10): 1308.

[责任编辑 全燕]