

大孔吸附树脂富集丹参中水溶性成分的研究

王志平,刘玉强,范晋勇,元英进*

(天津大学 制药工程系,天津 300072)

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎。味苦,性微寒,具有活血祛瘀、通经止痛、清热安神的功效,广泛应用于治疗冠心病、中风、微循环障碍等疾病,取得良好的临床疗效。丹参水提取液中,成分复杂,丹参素、原儿茶醛为其水溶性有效成分^[1]。丹参水提取液除杂工艺多为水提醇沉法,亦有采用树脂的相关报道^[2,3]。本实验以丹参提取液中丹参素和原儿茶醛作为指标,采用 HPLC 检测,考察大孔吸附树脂富集丹参中水溶性成分。结果表明 D301 树脂的吸附分离效果较好。

1 仪器与材料

HPLC 检测系统,包括 WatersTM 600 四元梯度泵、800 色谱工作站、WaterTM 486 紫外检测器、Mettler AE-240 天平(瑞士),Orion Model 酸度计(美国)。玻璃树脂柱为自制带阀门玻璃柱,近阀门端内置砂片。

D-101,改进型 D-101, H107, D301, D17 大孔吸附树脂均为南开大学化工厂产品。

丹参饮片(天津中药饮片厂),丹参素(上海医科大学植化室提供,纯度在 98% 以上),原儿茶醛(中国药品生物制品检定所)。甲醇为色谱纯,冰醋酸为分析纯,超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱: Nova-pak C₁₈ 不锈钢柱(3.9 mm×150 mm, 5 μm);检测波长: 280 nm;灵敏度: 0.02 AUFS;柱温: 室温;流动相: 甲醇-水-冰醋酸(5:95:1);流速: 1.0 mL/min;进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液的配制:精密称取丹参素对照品 0.0104 g 于 100 mL 容量瓶中,以流动相溶解。精密称取原儿茶醛对照品 0.0220 g 于 100 mL 容量瓶中,以流动相溶解。精密吸取 9.5 mL 丹参素对照品溶液于 10 mL 容量瓶中,再加入精密吸取的 0.5 mL 原儿茶醛对照品溶液,得混合对照品溶液。

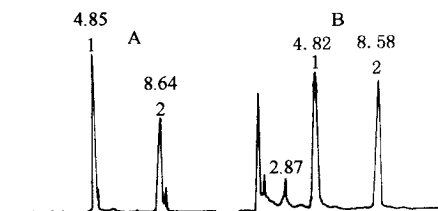
2.3 供试品溶液的制备:取丹参饮片 50 g,加 13 倍

量水煎煮 2.5 h,提取 3 次,得丹参水提液。精密吸取丹参水提液上清液 2 mL 于 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,以 0.2 μm 微孔滤膜滤过,进样 10 μL,检测丹参素和原儿茶醛的含量。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准工作曲线的制备:在上述色谱条件下,分别吸取丹参素、原儿茶醛的混合对照品溶液进样,进样体积依次为 2, 5, 7.5, 10, 15, 20 μL,测其峰面积。分别将其峰面积对丹参素和原儿茶醛的质量进行线性回归,计算得回归方程。丹参素: $Y = 1.32 \times 10^5 X + 1.46 \times 10^5$, $r = 0.9994$,线性范围: 0.197~19.7 μg。原儿茶醛: $Y = 1.29 \times 10^5 X + 1.04 \times 10^5$, $r = 0.9998$,线性范围: 0.22~22 μg。

2.4.2 专属性试验:在本色谱条件下丹参素和原儿茶醛保留时间分别约为 5 和 8 min。供试品溶液中,丹参素和原儿茶醛与其他峰达到基线分离。见图 1。



1-丹参素 2-原儿茶醛

1-danshensu 2-protocatechuic aldehyde

图 1 混合对照品(A)和供试品溶液(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

2.4.3 精密度考察:精密吸取混合对照品溶液 10 μL,重复进样 5 次,记录峰面积,计算得丹参素峰面积的 RSD 为 0.5% ($n = 5$),原儿茶醛峰面积的 RSD 为 0.9% ($n = 5$)。

2.4.4 稳定性试验:混合对照品溶液配制后分别在 0, 1, 2, 4, 8 h 进样测定,其峰面积的 RSD 均在 1.0% 内,表明丹参素和原儿茶醛在 8 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验:精确吸取丹参水提液上清

* 收稿日期: 2003-01-14

作者简介:王志平(1974-),男,黑龙江人,天津大学博士研究生,主要从事天然产物的提取分离研究。

Tel (022) 27401149 E-mail gregorywang@eyou.com

液 1 mL 于 5 mL 容量瓶中,精密加入混合对照品溶液 1, 2 mL,以甲醇定容。在上述色谱条件下,进样 $10\mu\text{L}$,测定,计算回收率。结果丹参素的回收率为 97.6%, RSD 为 1.27% ($n=5$);原儿茶醛的回收率为 104.8%, RSD 为 1.09% ($n=5$)。

2.5 最大有效吸附量及泄露曲线:取经过预处理的树脂 60 mL,湿法装柱,定量吸取丹参水提取液上清液,3 BV/h 速度,定时收集流出液 1 mL 于容量瓶中,甲醇定容,微孔滤膜滤过,检测流出液中丹参素和原儿茶醛的含量变化,在接近最大有效吸附浓度时密集取样(取流出液浓度达到进料浓度的 95% 为最大有效吸附量),各树脂吸附结果见表 1 D301 大孔吸附树脂的泄露曲线见图 2

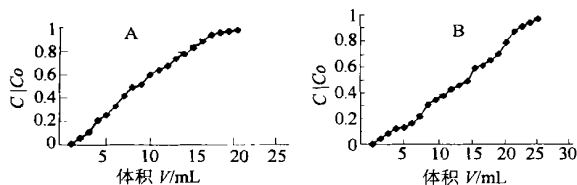


图 2 丹参素 (A) 和原儿茶醛 (B) 在 D301 大孔吸附树脂上的泄露曲线

Fig. 2 Leakage curves of danshensu (A) and protocatechuic aldehyde (B) in D301 macroporous resin

由于所应用的各种型号树脂量均相同,供试品溶液中丹参素和原儿茶醛浓度均相同,故以树脂对丹参素和原儿茶醛的吸附率为指标,选取对丹参素和原儿茶醛具有最大吸附容量的树脂型号。由表 1 可见, D301 大孔吸附树脂对丹参素和原儿茶醛的吸附量及吸附率均明显高于其他型号的树脂。

表 1 各种树脂吸附丹参素和原儿茶醛的结果

Table 1 Adsorption result of danshensu and protocatechuic aldehyde with D-101, D-101+, H107, D301, D17

树脂型号	丹参素			原儿茶醛		
	供试液 体积 /	吸附 量 /mg	吸附 率 %	供试液 积 /mL	吸附 量 /mg	吸附 率 %
D-101	200	152.1	91	800	882.9	94
D-101+	140	106.5	91	1 240	128.5	93
H107	480	365.1	93	1 500	155.4	93
D301	2 020	1 536.2	96	1 620	167.8	95
D17	300	228.2	93	1 000	103.6	95

2.6 解吸曲线的绘制:达到最大有效吸附量后,用 5 BV 蒸馏水快速置换掉树脂柱内树脂之间的丹参上清液,用 80% 乙醇液,以 3 BV/h 的流速解吸,定

时收集流出液 1 mL,甲醇定容,微孔滤膜滤过,进样 $10\mu\text{L}$,检测丹参素和原儿茶醛的含量变化,直至最低检测限,根据浓度的变化作出解吸曲线。见图 3

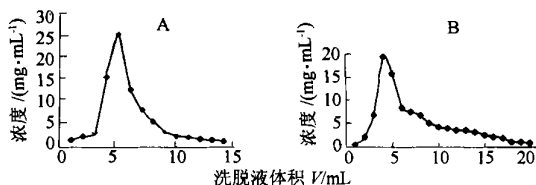


图 3 丹参素 (A) 和原儿茶醛 (B) 的洗脱曲线

Fig. 3 Eluting curves of danshensu (A) and protocatechuic aldehyde (B) in D301 macroporous resin

2.7 有效成分含量及变化:取适量丹参药材,13 倍量水提取 2.5 h,离心,经 HPLC 检测含量,丹参素为 0.760 5 mg/mL,原儿茶醛为 0.103 6 mg/mL。精密吸取上清液,计算出膏率为 54.31%。HPLC 检测干膏中各成分的含量:其中丹参素为 1.201%,原儿茶醛为 0.218%,二者共占 1.419%。

经 D301 树脂吸附,80% 乙醇洗脱处理,精密吸取,计算出膏率为 5.068%。HPLC 检测干膏中各成分的含量:其中丹参素为 9.53%,原儿茶醛为 1.723%,二者共占 11.27%。

3 讨论

本实验选取的 5 种大孔树脂中, D301 能够选择性富集丹参提取液中丹参素和原儿茶醛,使经树脂处理的丹参水提取液出膏率较未经树脂处理的水提取液降低 10 倍;固体膏中有效成分的量提高 8 倍。但实验中丹参素和原儿茶醛的泄露曲线与理论泄露曲线不十分的符合,而常规的吸附曲线理论难以解释,可能是由于 D301 对丹参提取液中丹参素和原儿茶醛的吸附方式以及吸附动力学与常见的树脂吸附行为不尽相同,其具体吸附特性及吸附行为有待进一步研究。

致谢:天津中新药业集团股份有限公司技术中心章臣桂教授、凌宁生高级工程师的大力帮助。

References

- [1] Zhang B J, Liu L. T Development of pharmacologic research of Danshen soluble compounds [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27, (10): 634-636.
- [2] Yin Y, Li Y, Li W C, et al. The effects on Danshen soluble compounds by different kinds of adsorption resins [J]. *J Mudanjiang Med Coll* (牡丹江医学院学报), 2002, 23(4): 44-46.
- [3] Chen Y Q. Study on purification of Lemai Capsule with seven kind macro porous adsorption resins [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(8): 553-555.