

2.7 提取工艺的验证:用选定正交试验的优化工艺作了 3 次平行验证,结果平均浸膏率为 12.86%, IC_{50} 为 5.23 mg/mL 薯蓣皂苷元的质量分数为 1.29%,表明该工艺稳定、可行、重现性好。

3 讨论

本实验以 IC_{50} 作为提取工艺考察的指标之一,从药理学方面考察工艺的合理性,更直观、更全面地反映结果的可靠性。

近些年来已有许多学者报道薯蓣皂苷元有抗肿瘤活性^[2,3,4],本课题研究已证明白英中含有薯蓣皂苷元,因此本实验选用薯蓣皂苷元为另一指标,从质量控制方面考察提取工艺的合理性。

从实验结果可以看出,在 6 号试验中, IC_{50} 为 5.84 mg/mL,薯蓣皂苷元质量分数为 1.77% 均为

各列之首,提示 IC_{50} 与薯蓣皂苷元可能是有相关性的,即薯蓣皂苷元质量分数越高, IC_{50} 的值越小,体外细胞增殖抑制作用越强。

References:

- [1] Shi Y P, Wang H. Study on the process for extracting flavonoids from *Hypericum perforatum* L. by orthogonal test [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17(3): 325-327.
- [2] Hong Z Q, Lin J H. Antitumor activity of diosgenin *in vitro* [J]. *J Fujian Coll Tradit Chin Med* (福建中医学院学报), 2005, 15(4): 37-39.
- [3] Wang L J, Wang Y, Chen S W, et al. The antitumor activity of diosgenin *in vivo* and *in vitro* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(10): 60-62.
- [4] Chen S W, Wang Y, Sun C J, et al. Effect of diosgenin on tumor growth of nude mice bearing human gastric cancer [J]. *J Jilin Univ: Med Sci* (吉林大学学报:医学版), 2003, 29(2): 26-27.

大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺研究

房信胜¹, 谭晓梅², 王建华¹

(1. 山东农业大学农学院, 山东 泰安 271018; 2. 南方医科大学 中药新药研究重点实验室, 广东 广州 510515)

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎,活血调经、凉血消痈、安神,在临床得到了广泛应用,并且是许多制剂的原料。其中的酚酸类成分是水溶性主要有效部位,具有明显的抑制血小板聚集、抗凝、溶纤及抗脂质过氧化的作用^[1],是丹参活血化瘀的主要活性成分。该类化合物主要有原儿茶醛、原儿茶酸、丹参素、丹酚酸 A, B, C、迷迭香酸等^[2~4]。以往的精制主要采用水提醇沉法,总酚酸的量低;也有报道用大孔树脂分离丹参中的水溶性成分^[5],但只是用原儿茶醛和丹参素为指标,缺乏对总成分和分离条件的系统研究。本实验采用大孔吸附树脂纯化该有效部位,并研究分离的工艺条件和参数。

1 仪器、材料和试剂

HP-8453 紫外-可见分光光度计(美国惠普公司);HP-1100 高效液相色谱仪(美国惠普公司),G1315A 紫外-可见光二级管阵列检测器。

丹参药材购自广东省药材公司,产地四川中江,由本系刘传明讲师鉴定为唇形科植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bunge 的根;原儿茶醛对照品(中国药品生

物制品检定所,批号 110810-200205);大孔吸附树脂(南开大学和成树脂厂,均为药用型)。

无水乙醇、乙醚、冰醋酸、95%乙醇均为分析纯,甲醇(分析纯,色谱纯),蒸馏水(超纯水)。

2 方法与结果

2.1 丹参总酚酸的测定

2.1.1 标准曲线的绘制:精密称取干燥至恒重的原儿茶醛对照品 16.08 mg,用无水乙醇配成 128.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。分别吸取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 10 mL 量瓶中,无水乙醇定容,随行溶剂做空白,用紫外-可见分光光度计于 281 nm 依次测定吸光度,以质量浓度(C)为纵坐标,吸光度(A)为横坐标绘制标准曲线。结果标准曲线 $C=0.26842+13.855A$, $r=0.9995$,线性范围为 2.6~15 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.2 样品测定:吸取样品液适量,用乙醚萃取 4 次,萃取液水浴挥干乙醚,加无水乙醇溶解,滤过,定容,作为待测液,取待测液适量,用无水乙醇稀释至合适质量浓度后按标准曲线的绘制项下方法测定,计算总酚酸的量。

收稿日期:2005-12-14

作者简介:房信胜(1974—),男,山东莱芜市人,硕士,主要从事中药药剂学教学及中药制剂开发和质量控制研究。
Tel: (0538) 8248073 E-mail: xinshf@126.com

2.2 树脂类型的选择

2.2.1 树脂预处理:根据树脂性能初步选择了 3 种树脂,分别称取 3 种干树脂各 1 g,加 95%乙醇溶胀,再用蒸馏水洗净树脂间乙醇备用。

2.2.2 上样液的制备:称取干燥后的丹参粗粉,加水浸泡 6 h,回流提取 2 次,均为 8 倍量水,每次 1.5 h。合并提取液,减压浓缩,浓缩液加 95%乙醇使含醇量达 80%,冰箱中冷藏 10 h,离心,上清液减压回收乙醇,加 1%盐酸调 pH 值至 2,离心,上清液用蒸馏水定量为 12 mg/mL(以总酚酸计)作为上柱液。

2.2.3 吸附量与解吸率比较:吸取上样液 10 mL,加入盛有树脂的具塞三角瓶中,于室温下振荡,进行静态吸附。吸附完成后分离出上清液,树脂再用 10 mL 水洗涤 1 次,合并入上清液,作为剩余液。各树脂再依次用 30%、50%、70%、95%乙醇浸泡洗脱 2 次,每次 10 mL。吸取剩余液和各洗脱液适量,乙醚萃取后,以原儿茶醛做对照品,用紫外分光光度法测定酚酸剩余量和解吸量,计算吸附量和解吸率(吸附量=上样液中总酚酸量-剩余液中总酚酸量;比吸附量=吸附量/干树脂质量;解吸率=总酚酸洗脱量/总酚酸吸附量),结果见表 1。结果表明,ADF8 树脂的吸附量与解吸率均好,因此选择该树脂。

表 1 各种树脂的吸附与解吸情况

Table 1 Adsorption capacity and desorption rate of various resins

型号	吸附量/mg	30%部 分/mg	50%部 分/mg	70%部 分/mg	95%部 分/mg	解吸量/mg	解吸率/%
ADS17	38.0	20.6	5.7	—	—	26.3	69.2
ADF8	32.7	23.5	7.6	—	—	31.1	95.0
ADS21	63.5	13.0	14.0	3.6	1.8	32.4	51.0

2.3 上样质量浓度对吸附量的影响:取含总酚酸 4、6、8、10、12 mg/mL 的上样液 10 mL,加入处理好的 ADF-8 树脂中,静态吸附,其余操作同 2.2.3 项下方法,计算吸附量,结果见表 2。结果表明,含总酚酸为 10 mg/mL 时,吸附量较大。

表 2 上样质量浓度对吸附量的影响

Table 2 Effect of liquor concentration on adsorption capacity

上样质量浓度/(mg · mL ⁻¹)	比吸附量/(mg · g ⁻¹)
4.0	28.3
6.0	32.7
8.0	34.2
10.0	36.5
12.0	34.6

2.4 盐效应对吸附量的影响^[6]:取含总酚酸 10 mg/mL 的上样液 10 mL,加入氯化钠使其在药液中

的质量浓度分别为 2%、3%、4%、5%,上样,静态吸附。其余操作与测定同 2.2.3 项下方法,计算吸附量,结果见表 3。结果表明,加入氯化钠后吸附量增加,综合考虑,加入氯化钠质量浓度为 2%较好。

表 3 盐效应对吸附量的影响

Table 3 Effect of salt effect on adsorption capacity

氯化钠的质量浓度/(mg · mL ⁻¹)	吸附量/mg
2%	41.8
3%	42.0
4%	42.5
5%	39.6

2.5 洗脱曲线的绘制和洗脱溶媒用量的确定:2.2 项下结果表明,丹参总酚酸主要集中在 30%乙醇洗脱液中,50%洗脱液中虽然有一定量,但经过测定,酚酸的量明显偏低,因此选择 30%乙醇为洗脱剂。

树脂上样(柱高 12 cm)、动态吸附后,依次用水和 30%乙醇洗脱。水洗液每 20 mL 收集一份共 8 份,依次编号为 1~8 号,测定每份洗下的总固体量,以每份洗下的固体量为纵坐标,以编号为横坐标绘制水洗脱杂质曲线,见图 1。30%乙醇洗脱液共收集 9 份,前 3 份每份 40 mL,后 6 份每份 20 mL,依次编号为 1'~9'号,测定每份中总酚酸的量,以每份洗下的总酚酸量为纵坐标,以编号为横坐标绘制洗脱曲线,见图 2。

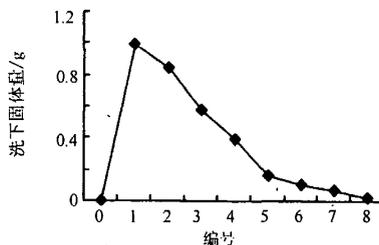


图 1 ADF-8 树脂水洗脱杂质曲线

Fig. 1 Water elution curve of impurity by ADF-8 resin

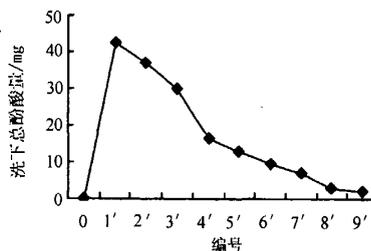


图 2 ADF-8 树脂 30%乙醇洗脱酚酸曲线

Fig. 2 30% Acohol elution curve of phenolic acid by ADF8 resin

由洗脱曲线可知,水用量为 150 mL(约 2.5 BV)时,基本达到最大杂质洗脱量,而只洗下极少的

酚酸;30%乙醇用量为 240 mL (约 4 BV)时,基本达到最大酚酸洗脱量。因此水的用量选择 2.5 BV, 30%乙醇用量选择 4 BV。

2.6 试验验证:根据确定的树脂类型和最佳工艺,用 3 根树脂柱(柱高 26 cm,内径 5 cm)同时进行酚酸纯化试验,结果树脂纯化后总酚酸的平均质量分数为 53.8%,收率为 1.9%。

2.7 工艺过程的 HPLC 图谱分析^[7]:为指导工艺研究,本研究分析了工艺研究过程中纯化前后的样品中酚酸类成分的 HPLC 图谱,见图 3。色谱条件为:色谱柱 Zorbax ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-1%醋酸水溶液(40:60);进样量 10 μL;柱温:室温;检测波长:281 nm。

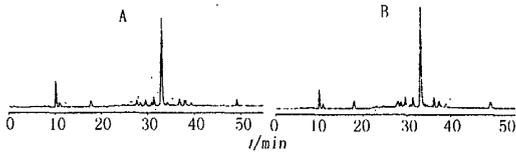


图 3 上样液(A)和树脂纯化后总酚酸(B)的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC Chromatograms of sample (A) and purified phenolic acid (B)

3 讨论

大孔吸附树脂是吸附和筛选原理相结合的分 离材料,它的吸附性能是由于范德华引力或生成氢键的结果,筛选作用是由其本身多孔性结构所决定。由于其良好的分离效果,目前在中药成分的分离纯化中得到了广泛应用。根据树脂的结构、性能以及待分离成分的性质,可以选择合适的树脂类型。作为酚酸类成分,用大孔吸附树脂进行分离纯化的报道较少,本实验选择的 3 种树脂均为氢键型极性吸附树脂,对多元酚有较高的选择吸附性,因此本实验重点考

察了这 3 种树脂对丹参酚酸的纯化效果。从实验结果看,某些树脂虽然吸附量大,但洗脱困难。

本实验通过工艺研究,有效提高了总酚酸的纯度,纯化前酚酸在总固体物中的质量分数为 7.2%,纯化后质量分数达 53.8%。本实验给出了水洗脱杂质的曲线,目的是确定洗脱杂质时水的用量,而在其他有关大孔吸附树脂的文献中,很少有说明水的用量。另外丹参酚酸类成分性质不稳定,在工艺过程中会存在某些成分的损失或量的变化,本实验结合 HPLC 图谱进行了工艺过程的定性分析,结果表明,在工艺过程中某些成分有量的变化,即各成分的比例发生了变化,但总酚酸的成分组成(即成分谱)基本没有变化,结果有利于指导谱-效关系分析。

References:

- [1] Yokozawa T, Chung H Y, Oura H. Effect of extract from *Radix Salvia Miltiorrhizae* on the urinary urea, creatine and elec-trolyte excretion in uremic rats [J]. *J Med Pharm Soc*, 1986, (3): 10.
- [2] Miao M S. *Modern Practicable Technology of Chinese Materia Medica Quality Control* (现代实用中药质量控制技术) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [3] Li Z X, Gu W H, Huang H Z. Study on the water-soluble phenolic of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Pharm J* (中国药 学杂志), 1981, 16 (9): 24-26.
- [4] Zhou C X, Luo H W, Danyu Z W. Study on the water-soluble compounds of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33 (2): 127-130.
- [5] Wang Z P, Liu Y Q, Fan J Y, et al. Studies on purification of water-soluble compounds of *Salvia miltiorrhiza* with macroporous resin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (10): 908-909.
- [6] Dong F Y. *New Technology and Method of Chinese Materia Medica Preparation* (中药制剂新工艺新方法) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
- [7] Liu Y H, Zhao L H, Huang J. Study on the HPLC fingerprint of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33 (2): 127-129.

欢迎订阅《中草药》杂志 2005 年增刊

2005 年 11 月 25 日~30 日,由天津药物研究院和中国药学会主办的“第五届中药新药研究与开发信息交流会暨《中草药》杂志第九届编委会”在海南省海口市召开,为了配合会议的召开,本刊编辑部编辑、出版了《中草药》杂志 2005 年第 36 卷增刊。本增刊共收载论文 150 余篇,特邀中国科学院院士、中国工程院院士和国内十余位知名专家和中青年学科带头人,就中药现代化和中药走向国际等热点问题撰写综述性文章,另外还有反映国内近年来中药植化、药理、分析、制剂、药材资源和临床等新成就的科研论文和综述性文章。

增刊为大 16 开本,350 页(约 70 万字),天津市报刊增刊特准印证(2005)第 063 号,定价 60 元,另加 5.00 元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅,款到寄刊。

编辑部地址:天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编:300193 网址:www.tjipr.com

电话:(022)27474913 23006821 传真:(022) 23006821 E-mail: zcyzbbj@tjipr.com