

3 讨论

本实验通过对甲醇-水、甲醇-0.2 mol/L 磷酸二氢钠、乙腈-水不同比例的流动相系统进行比较,发现乙腈-水(60:40)系统分离效果较好,峰形对称,故选择此系统为流动相。在该条件下,臭灵丹酸峰分离良好,峰形对称,理论板数按臭灵丹酸峰计算不低于6 000,臭灵丹酸与相邻色谱峰的分度大于2.0,且阴性样品无干扰。

References:

- [1] Zhang X M, Jiang L D, Zhou P A, et al. The clinical observation Lingdancao Granules therapy upper respiratory infection [J]. *J Emerg Tradit Chin Med* (中国中医急症), 2001, 10(5): 258.
- [2] Mei Z N, Li Y F, Yu X, et al. Pterodontic acid [J]. *Acta Crystallographica* (Section E), 2006, E62, 1841-1843.
- [3] Li S L, Ding J K. Four new sesquiterpenoids from *Laggera pterodonta* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1996, 18(3): 349.
- [4] Li S L, Ding J K, Jiang B, et al. Sesquiterpenoids glucosides from *Laggera pterodonta* [J] *Phytochemistry*, 1998, 49(7): 2035.

丹参中总酚酸的分离纯化工艺研究

杨小宁,唐 星,柳玉石

(沈阳药科大学药学院,辽宁,沈阳 110016)

摘要:目的 考察不同分离纯化工艺对丹参中酚酸类成分提取效率的影响。方法 以丹参提取液中丹酚酸B和总酚酸转移率为指标,考察不同分离纯化工艺,并采用HPLC法测定各成分的量。结果 纯化工艺确定为60%、80%乙醇醇沉两次,相应乙醇体积分数洗涤沉淀;醋酸乙酯和10%碳酸钠溶液交替萃取。结论 水提醇沉和醋酸乙酯萃取法适合于丹参总酚酸的分离纯化。

关键词:丹参;丹酚酸B;丹参总酚酸;醇沉

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)06-0843-03

Separation and purification of salvianolic acids from *Salvia miltiorrhiza*

YANG Xiao-ning, TANG Xing, LIU Yu-shi

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; salvianolic acids; salvianolic acid B; alcohol sedimentation

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根茎,其有效成分包括水溶性成分和脂溶性成分。脂溶性成分是以丹参酮为代表的醌类化合物,具有良好的抗炎作用;水溶性成分主要有丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、咖啡酸、丹酚酸A、B等,总称为总酚酸。丹参总酚酸具有明显的抗血栓形成、溶纤和抗脂质过氧化的作用,是治疗心肌缺血、心绞痛、心肌梗死等心血管疾病的有效成分,其中丹酚酸B的量最高,而且是主要的活性成分^[1]。丹参水溶性成分的提取方法多采用水提醇沉法,醇沉效率低,损失大^[2],且所得产物的质量分数低。本实验在原有方法的基础上,对总酚酸的分离纯化工艺进行了新的研究,并以药材中有效成分转移的程度(转移率)为考察指标,对各个工艺步骤及终产物的总酚酸与丹酚酸B的提取效率进行了测定。

1 仪器与材料

Hitachi 高效液相色谱仪, HSM 色谱工作站; Jspes2012-5-10000、Jspes2012-5-100000 聚醚砜膜组件(50 mm×300 mm)由吉林市金赛科技开发公司提供。

丹酚酸B、原儿茶醛、丹参素钠对照品均购于中国药品生物制品检定所,迷迭香酸对照品由北京百灵威化学品有限公司提供,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,去离子水。丹参饮片产自安徽,经鉴定为丹参 *S. miltiorrhiza* Bunge 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 总酚酸的HPLC法测定^[3]: 配制适宜质量浓度的对照品溶液,采用外标两点法分别测定丹酚酸B、迷迭香酸、原儿茶醛和丹参素(以丹参素钠计)的量,以4种成分的量之和作为总酚酸的量。

2.2 丹参中总酚酸的测定: 取丹参饮片,粉碎至40

目细粉,取 0.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇溶液 50 mL,称定质量,超声处理 15 min 后,加热回流 3 h,取出,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。取续滤液稀释至适宜质量浓度,采用 HPLC 法测定^[3],结果丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 的质量分数分别为 0.069 3、0.062 3、7.92、40.5 mg/g,总酚酸的质量分数为 48.5 mg/g。

2.3 水提工艺的选择^[4]:对水提的时间、所用溶剂量和提取次数进行了正交试验考察,确定最佳提取条件为水提取 3 次,第 1 次加 8 倍量的水,煎煮 2 h,第 2 次加 6 倍量水,煎煮 1.5 h,第 3 次加 5 倍量水,煎煮 1.5 h。合并煎煮液,浓缩至含生药约 1 g/mL。测定浓缩液中丹酚酸 B 的质量浓度,计算得转移率为 90.01%;以丹酚酸 B、迷迭香酸、原儿茶醛和丹参素(以丹参素钠计)的转移率之和计算得总酚酸的转移率为 88.60%。

2.4 醇沉工艺的选择:采用 60%、80% 乙醇二次醇沉,但是两次醇沉的总损失率很高,约为 30%,这会影响到后续步骤的转移效率和终产品的质量,因此尝试对醇沉所得沉淀进行洗涤,以减少有效成分的损失。将 60%、80% 乙醇醇沉液滤过,滤液另置。所得两份沉淀分别用相应体积分数的乙醇洗涤,充分搅拌,静置 2 h,滤过。乙醇用量分别为药材量的 2、4、6、8 倍。以沉淀洗涤液中总酚酸和丹酚酸 B 的量占原药材质量的比例(即洗涤液中的转移率)为指标进行考察,结果见表 1。60% 乙醇醇沉沉淀中有效成分的转移在溶剂为 6 倍量时达到最高,但 4、6、8 倍量所得结果差别无显著性,为节约溶剂,采用 2 倍量溶剂洗涤沉淀 2 次。80% 乙醇醇沉沉淀中有效成分的转移虽然随溶剂用量的增加而增加,但考虑投入与产出的比值,80% 乙醇醇沉所得沉淀不再进行洗涤。将两次醇沉所得滤液与 60% 乙醇醇沉沉淀的洗涤液合并,回收乙醇并浓缩至含生药约 1 g/mL。结果显示,丹酚酸 B 的转移率为 75.56%,总酚酸的转移率为 78.14%,损失显著降低。表明醇沉工艺采用二次醇沉,乙醇体积分数分别为 60%、80%。60% 乙醇醇沉沉淀用 2 倍量 60% 乙醇洗涤 2 次,洗涤液并入二次醇沉滤过液,回收乙醇,浓缩至含生药约 1 g/mL。

2.5 大孔树脂吸附洗脱^[2]:综合药物和树脂的性质,D-101 树脂是使用最多的树脂,而 D301 树脂的洗脱效果最好,因此,本实验仅对 D-101 和 D301 树脂进行考察。将丹参水提醇沉后所得浓缩液加入树脂柱中,控制流量以 3 BV/h 流过,定时收集流出液,

表 1 不同溶剂量洗涤沉淀结果

Table 1 Results of alcohol sedimentation eluted by different amounts of solutions

溶剂 用量	丹酚酸 B/%		总酚酸/%	
	60% 醇沉液 洗涤液	80% 醇沉 洗涤液	60% 沉淀 洗涤液	80% 沉淀 洗涤液
2 倍	6.501	1.26	5.430	1.07
4 倍	13.31	1.69	10.97	1.40
6 倍	15.61	2.17	13.37	1.89
8 倍	13.38	3.06	11.37	2.39

取样,甲醇定容,HPLC 法测定总酚酸的变化。在接近上清液中有效成分质量浓度时密集取样,取流出液中有有效成分质量浓度达到上清液的质量浓度的 95% 为最大有效吸附量。达到最大有效吸附量后,用 5 BV 去离子水洗,置换掉树脂柱内的原液,再用 80% 乙醇以 3 BV/h 洗脱,定时收集流出液,取样,甲醇定容,HPLC 法测定总酚酸的变化,至流出液中有有效成分的量在所加料液的 5% 为洗脱完全。回收乙醇并浓缩至含生药约 1 g/mL,结果 D-101 和 D301 树脂对丹酚酸 B 转移率分别为 30.14%、25.55%,对总酚酸转移率分别为 35.29%、31.27%。由所得结果分析,两种型号的树脂对丹参总酚酸的转移率都较低,与文献报道有较大差异,故不采用此方法进行除杂纯化。其他型号树脂对丹参总酚酸的洗脱效果尚有待考察。

2.6 分子筛分离纯化:采用聚醚砜膜对丹参水提浓缩液进行进一步分离纯化。丹参酚酸的各成分相对分子质量均在 1 000 以下,而杂质多为大分子物质,因此得以分离。取适量丹参药材,进行水煎煮、浓缩至含生药约 1 g/mL。浓缩液第一次通过相对分子质量为 10 万的分子筛,分别接收相对分子质量在 10 万以上和以下的流出液,采用 HPLC 法进行测定,比较转移率和损失率。将相对分子质量在 10 万以下的接收液再次浓缩至含生药约 1 g/mL,按照 2.4 项下确定的醇沉工艺进行两次醇沉和沉淀洗涤,减压回收乙醇,浓缩至含生药约 1 g/mL。将浓缩液通过相对分子质量为 1 万的分子筛,分别接收相对分子质量在 1 万以上和以下的流出液,采用 HPLC 法进行测定,结果见表 2。结果显示:分子筛转移丹参总酚酸的效率高,损失小,但除杂的能力较差,尚不能达到制备质量分数较高的丹参提取物的要求。

2.7 溶剂萃取法纯化工艺

2.7.1 溶剂类型的考察:溶剂萃取多采用正丁醇和醋酸乙酯进行,为了考察两者对丹参酚酸的选择性,实验将正丁醇与醋酸乙酯按不同比例混合后萃取,

表 2 分子筛分离纯化丹参总酚酸

Table 2 Separation and purification of salianolic acids by molecular screen

处理方法	丹酚酸 B 转移率/%	总酚酸转移率/%
第一次过分子筛		
10 万以下	89.24	85.78
10 万以上	3.70	11.00
二次醇沉及沉淀洗涤	75.56	78.14
第二次过分子筛		
1 万以下	72.22	75.46
1 万以上	3.34	2.68

根据总酚酸的转移率确定溶剂的种类和比例。将含生药约 1 g/mL 的浓缩液用等量的混合液萃取,分别测定有机层和水层中总酚酸的量,两者之比即为分配系数。结果见表 3。可以看出,单独用醋酸乙酯萃取时分配系数最大,萃取效果最好。

表 3 正丁醇与醋酸乙酯不同比例混合液的萃取结果

Table 3 Extraction by *n*-butanol and ethyl acetate in different proportions

正丁醇与醋酸乙酯比例	分配系数	
	丹酚酸 B	总酚酸
1 : 0	0.330	0.387
0.5 : 1	0.138	0.204
1 : 1	0.222	0.311
2 : 1	0.221	0.356
3 : 1	0.253	0.374
0 : 1	0.481	0.597

2.7.2 溶剂用量的考察:用等量的醋酸乙酯萃取浓缩液 5 次,分别计算转移率,确定醋酸乙酯萃取的次数,结果见表 4。可见有效成分的转移率随着萃取次数的增加而增加,但是萃取 4 次后转移率基本不再变化。因此确定用醋酸乙酯萃取 4 次,首次加倍,每次用量分别为 2、1、1、1 倍。

表 4 醋酸乙酯萃取结果

Table 4 Extraction by ethyl acetate

萃取次数	丹酚酸 B 转移率/%	总酚酸转移率/%
1	25.07	30.25
2	38.12	40.10
3	51.55	51.32
4	59.42	56.11
5	60.18	60.06

2.7.3 10%碳酸钠溶液萃取体积的选择:丹参总酚酸为酸性物质,采用碳酸钠溶液与醋酸乙酯交替萃取可使终产品总固体量减少,有效成分的量提高。因此将萃取液有机层合并,回收醋酸乙酯并将其浓缩至原体积的 1/20,用不同量的 10%碳酸钠溶液萃取,考察丹参总酚酸的转移率,结果见表 5。可见碳酸钠溶液与醋酸乙酯交替萃取浓缩时,有效成分的

转移率最高。综合考虑,确定用 10%碳酸钠溶液萃取 4 次,每次用量分别为 1、1/2、1/4、1/4 倍。

表 5 10%碳酸钠溶液萃取结果

Table 5 Extraction by sodium carbonate solution

10%碳酸钠溶液用量	丹酚酸 B 转移率/%	总酚酸转移率/%
1/4 倍	25.21	26.01
1/2 倍	46.36	45.48
1 倍	55.91	60.12

2.7.4 最佳结果:按水提醇沉工艺所得的浓缩液中加入盐酸酸化至 pH 值约为 2,用醋酸乙酯萃取 4 次,每次用量分别为 2、1、1、1 倍。合并萃取液有机层,回收醋酸乙酯并浓缩至原体积的 1/20,用 10%碳酸钠溶液萃取 4 次,每次用量分别为 1、1/2、1/4、1/4 倍。分离并合并碱液,立即加适量盐酸酸化至 pH 值约为 2,继用醋酸乙酯萃取酸化液 4 次,每次用量分别为 2、1、1、1 倍。合并萃取液,回收醋酸乙酯至成流浸膏。流浸膏中加适量氢氧化钠调节 pH 值至 6.8,减压干燥,即得。结果流浸膏中丹酚酸 B 的转移率为 45.27%,总酚酸的转移率为 58.56%;干燥品中丹酚酸 B 的质量分数为 30.97%,总酚酸的质量分数为 51.62%。

3 讨论

丹酚酸 B 为丹参总酚酸中量最高的成分,也是主要的药理活性成分,性质不稳定。随着煎煮时间的延长丹酚酸 B 的量呈下降趋势,但是延长煎煮时间也有利于丹参总酚酸各有效成分的析出。因此在确定水提时间时要考虑这两方面因素的影响。提高煎煮温度可提高有效成分的转移率,煎煮溶剂的用量对提取率影响不大。

醇沉时乙醇的体积分数越高,丹参总酚酸的损失越大^[2]。由本实验所测的数据来看,醇沉时乙醇的体积分数的提高确实使转移率有一定程度的降低,但同时也使杂质去除得更彻底,因此确定采用 60%、80%乙醇醇沉两次,而洗涤醇沉沉淀明显降低了醇沉所造成的损失,弥补了二次醇沉的不足。

本实验采用 3 种分离纯化方法平行进行。大孔树脂吸附洗脱工艺的效率较低,损失了大部分有效成分,可能与其离子相互作用有关。分子筛分离工艺虽然损失小,但是杂质去除不彻底,不能得到高质量分数的总酚酸。醋酸乙酯与碳酸钠溶液交替萃取的工艺损失小,分离效率高,且同时具有脱色作用,适合产业化。

References:

[1] Ge S R, Yu Y X, Xie G. Development of pharmacological effect of salianolic acid [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2002, 25(9): 683-686.

- [2] Wang Z P, Fan J Y, Liu Y Q, et al. Study on the comparison of resins adsorption and alcohol deposition of danshen extracted liquid [J]. *Ion Exchange Adsorpt* (离子交换与吸附), 2003, 19(6): 554-560.
- [3] Pan Y N, Yuan D, Fu W W, et al. Simultaneous determination of 4 water-soluble component in danshen-containing in-

jections by HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2004, 21(3): 196-200.

- [4] Li Q L, Jiang X M, Hong X J. Study on extracting technics of *Salvia miltiorrhiza* Bge. in Compound Danshen Injection [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(7): 617-618.

复方抗病毒喷雾剂的质量标准研究

黄亚东¹, 项 琪¹, 赵 文², 王林川³, 张 卉¹, 姚崇舜¹

(1. 暨南大学 医药生物技术研究开发中心, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 3. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510632)

笔者通过体外抗病毒实验筛选出了以贯叶连翘提取物和莪术油为主要成分并辅以其他中药的处方制备成复方抗病毒喷雾剂, 用于禽流感病毒的预防和治疗。为明确本复方喷雾剂的化学物质基础, 本实验对其中的莪术油和贯叶连翘提取物的主要药效成分进行了定性鉴别和定量测定。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-2010C 高效液相色谱仪、SPD-M10Avp 检测器(日本岛津公司), TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂), HH-2 数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司), ZF 型紫外透射反射仪(上海嘉鹏科技有限公司)。

复方抗病毒喷雾剂和空白对照样品(自制, 25 mL/瓶), 莪术醇对照品(批号 100185-200405)、牻牛儿酮对照品(批号 111665-200401)购于中国药品生物制品检定所, 金丝桃素对照品购于中山大学药学院, 甲醇、乙腈(色谱纯), 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄(上海谊恒工贸有限公司精良精细化工厂)。

2 薄层色谱鉴别

2.1 对照品溶液的制备: 分别取莪术醇、牻牛儿酮和金丝桃素对照品各约 5 mg, 精密称定, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得。

2.2 供试品溶液的制备: 取本品 50 mL, 置分液漏斗中, 加石油醚(30~60 °C) 25 mL, 振摇, 静置, 分取石油醚层, 浓缩至约 1 mL, 作为供试品溶液 I。

取上述石油醚提取后的溶液 30 mL, 70 °C 水浴加热浓缩至约 2 mL, 加乙醇-醋酸乙酯(1:1) 4 mL

搅匀, 滤过, 取滤液, 作为供试品溶液 II。

2.3 莪术醇和牻牛儿酮的鉴别: 吸取供试品溶液 I、莪术醇对照品溶液和牻牛儿酮对照品溶液各 10 μL, 分别点于硅胶 GF₂₅₄ 板上, 以石油醚(30~60 °C)-醋酸乙酯(9:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(254 nm)下检视, 显相同颜色的荧光斑点(图 1-A); 再喷以 1% 的香草醛硫酸试液, 在供试品色谱中分别在与对照品相应的位置上, 显相同颜色的斑点(图 1-B)。

2.4 金丝桃素的鉴别: 吸取供试品溶液 II 和金丝桃素对照品溶液各 10 μL, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 板上, 以甲苯-甲酸乙酯-甲酸(7:4:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(254 nm)下检视, 结果供试品色谱中分别在与对照品相应的位置上显相同颜色的荧光斑点(图 1-C)。

3 金丝桃素、莪术醇和牻牛儿酮的测定

3.1 色谱条件: 色谱柱: Shimadzu Shim-pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm), Shimadzu Shim-pack GVP-ODS (10 mm × 4.6 mm) 保护柱; 莪术醇和牻牛儿酮: 流动相: 乙腈-H₂O (60:40), 柱温: 25 °C, 检测波长: 210 nm, 体积流量: 1.0 mL/min, 色谱图见图 2。金丝桃素: 流动相为乙腈-0.3% 正磷酸-三乙胺 (pH 6.0)-甲醇 (80:9:11), 柱温: 25 °C, 检测波长: 590 nm, 体积流量: 1.2 mL/min, 色谱图见图 3。

3.2 标准曲线的制备: 精密吸取各对照品溶液 0.25、0.40、0.50、0.60、0.80 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度。0.45 μm 滤膜滤过, 吸取滤液 20 μm 注入

收稿日期: 2006-09-03

基金项目: 广东省科技计划攻关项目(20042080068); 广州市科技计划攻关项目(2006Z3-E0501)

作者简介: 黄亚东(1971—), 男, 湖北人, 副研究员, 博士, 研究方向为微生物与生化药学。

Tel: (020)85564387 E-mail: ydhuang2004@126.com

丹参中总酚酸的分离纯化工艺研究

作者: 杨小宁, 唐星, 柳玉石, [YANG Xiao-ning](#), [TANG Xing](#), [LIU Yu-shi](#)
作者单位: [沈阳药科大学药学院, 辽宁, 沈阳, 110016](#)
刊名: [中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2007, 38(6)
被引用次数: 4次

参考文献(4条)

1. [Ge S R;Yu Y X;Xie G](#) Development of pharmacological effect of salviaolic acid[期刊论文]-[中药材](#) 2002(09)
2. [Wang Z P;Fan J Y;Liu Y Q](#) Study on the comparison of resins adsorption and alcohol deposition of danshen extracted liquid[期刊论文]-[离子交换与吸附](#) 2003(06)
3. [Pan Y N;Yuan D;Fu W W](#) Simultaneous determination of 4 water-soluble component in danshen-containing injections by HPLC[期刊论文]-[沈阳药科大学学报](#) 2004(03)
4. [Li Q L;Jiang X M;Hong X J](#) Study on extracting technics of Salvia miltiorrhiza Bge.in Compound Danshen Injection[期刊论文]-[中草药](#) 2002(07)

本文读者也读过(7条)

1. [陈贤春. 吴清. 李冀湘. CHEN Xian-chun. WU Qing. Li Ji-xiang](#) 大孔吸附树脂富集丹参总酚酸的工艺研究[期刊论文]-[中国中药杂志](#)2007, 32(12)
2. [王小平. 刘峰. 韩翠. 张勤. WANG Xiao-ping. LIU Feng. HAN Cui. ZHANG Qin](#) 丹参总酚酸提取工艺的优化[期刊论文]-[云南中医学院学报](#)2010, 33(2)
3. [李兵](#) 酶法提取丹酚酸B及丹参总酚酸[学位论文]2006
4. [房信胜. 谭晓梅. FANG Xin-sheng. TAN Xiao-mei](#) 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的定性定量分析[期刊论文]-[中国中药杂志](#)2005, 30(17)
5. [高声传. 张怀. 马宏达. GAO Sheng-Chuan. ZHANG Huai. MA Hong-Da](#) 丹参中丹酚酸B纯化工艺研究[期刊论文]-[解放军药学学报](#)2008, 24(4)
6. [韩伟. 孙金兰. 刘志平. 胡坪. HAN Wei. SUN Jin-lan. LIU Zhi-ping. HU Ping](#) 丹酚酸B的大孔树脂纯化工艺[期刊论文]-[南京工业大学学报\(自然科学版\)](#) 2008, 30(3)
7. [张秋燕. 崔翰明. 张春光. 王阶](#) 丹参水溶性成分的纯化工艺和质量研究[会议论文]-2009

引证文献(4条)

1. [赵惠茹. 杨黎彬. 赵筠](#) 大孔树脂富集纯化丹参地上部分丹酚酸B的工艺研究[期刊论文]-[中药材](#) 2013(8)
2. [赵惠茹. 杨黎彬. 曲伟龙. 靖会. 刘少静](#) 丹参地上部分总丹参酮提取工艺和吸附树脂优选[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2011(10)
3. [费雅君. 寇自农. 王妍妍. 孙洁. 朱靖博](#) 丹参有效成分综合提取技术[期刊论文]-[大连工业大学学报](#) 2009(6)
4. [张立国. 毕艳玖. 倪力军. 方聪颖](#) 加热与常温渗漉-层析提取工艺对丹参水提物的影响[期刊论文]-[华东理工大学学报: 自然科学版](#) 2011(6)