

超顺磁性吸附剂 1 步高效提取和纯化丹参中丹参酮

徐秋生², 李文松^{1*}

1. 湘潭大学化工学院, 湖南 湘潭 411105

2. 平湖市食品药品检测中心, 浙江 嘉兴 314200

摘要: **目的** 建立超顺磁性吸附剂 1 步高效提取和纯化丹参中药效成分丹参酮的方法。**方法** 首先采用分散聚合法制备超顺磁性聚羟乙基丙烯酸甲酯(PHEMA)微球, 考察其对丹参酮的吸附性能, 然后将该微球耦合到丹参酮的提取过程中, 考察其 1 步提取和纯化丹参酮的可行性和分离效率。**结果** 所制备的超顺磁性 PHEMA 微球平均粒径为 1.2 μm , 具有超顺磁性, 对丹参酮有着较好的吸附性能; 与先提取后纯化的 2 步法相比, 这种 1 步法不仅能显著增加提取过程的提取效率, 对隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的提取率从 5 h 的 0.179、0.093、0.452 mg/g 分别提高到 0.5 h 的 0.279、0.176、0.575 mg/g, 分离工序少, 而且纯化效果好, 分离时间也从 5.5 h 缩短为 0.5 h。**结论** 所提出的 1 步提取纯化法可行且具有提取效率高、工序少、纯化效果好和分离快速等优点。

关键词: 超顺磁性微球; 1 步提取纯化; 丹参酮; 隐丹参酮; 丹参酮 I; 丹参酮 II_A; 丹参

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)24-3670-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.010

Superparamagnetic adsorbent for one-step efficient extraction and purification of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*

XU Qiu-sheng², LI Wen-song¹

1. College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China

2. Pinghu Center for Food and Drug Testing, Jiaxing 314200, China

Abstract: Objective A novel one-step extraction and purification method by using superparamagnetic adsorbents was established for separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. **Methods** Firstly, superparamagnetic poly hydroxyethyl methacrylate (PHEMA) microspheres were prepared by dispersion polymerization method, and their adsorptive performances of tanshinones were investigated, then these microspheres for purification of tanshinones were coupled into extraction process of tanshinones. The feasibility and separation efficiency of this one-step method were further studied. **Results** The prepared PHEMA microspheres with the average diameters of 1.2 μm had superparamagnetic property and good adsorption performance for tanshinones. In comparison with two steps method including extraction and purification, one-step method showed significantly higher extraction efficiency of three tanshinones from 0.179, 0.093, and 0.452 mg/g in 5 h to 0.279, 0.176, and 0.575 mg/g in 0.5 h, with less separation process, greatly shorter time consumption from 5.5 h to 0.5 h, and good purification results. **Conclusion** One-step method proposed is demonstrated feasible and has the merits of high extraction efficiency, less separation process, good purification, and rapid separation speed.

Key words: superparamagnetic microspheres; one-step extraction and purification; tanshinones; cryptotanshinone; tanshinone I; tanshinone II_A; *Salvia miltiorrhiza* Bge.

丹参 *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* 为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 是一种传统的中药, 所含有的主要药效成分是脂溶性成分丹参酮, 主要包括丹参酮

I、丹参酮 II_A 和隐丹参酮 3 种, 这些丹参酮具有抗肿瘤、抗菌消炎和抗氧化作用, 对心血管系统和神经系统有较强的药理活性。丹参中成分非常复杂, 其药效成分丹参酮的利用通常需要一个复杂的分离

收稿日期: 2015-07-23

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2015M572259); 湘潭大学博士科研启动项目(14QDZ34)

作者简介: 徐秋生, 男, 在读硕士, 研究方向为天然药物分离纯化及分析。Tel: (0573)85026036 E-mail: xuqsh@163.com

*通信作者 李文松, 男, 博士, 硕士生导师, 主要从事天然产物和中草药的分离纯化研究。Tel: (0731)58298171 E-mail: wsl@xtu.edu.cn

过程。首先是提取过程,所采用的提取方法主要有传统的溶剂萃取、微波辅助萃取^[1]、超声波辅助萃取^[2]和超临界流体萃取^[3]等;其次是纯化过程,去除一些干扰杂质以达到药用标准所要求的纯度。通常所采用的纯化方法有大孔吸附树脂法^[4]、高速逆流色谱法^[5]和柱色谱法^[6]等。

磁分离技术指以超顺磁性颗粒作为吸附剂,在外加磁场作用下,实现复杂混合液中目标分子高效分离的技术。其突出优点是能高选择性地快速分离复杂混合物,近年来已引起人们的广泛关注。少量报道^[7-8]表明,该技术对复杂中药的药效成分表现出较好的纯化效果。基于磁场对磁性颗粒的高识别性分离,提出将药效成分的磁性吸附剂纯化过程耦合到其提取过程中,使提取和纯化过程1步同时进行,以简化分离工序、提高分离效率。为了验证该法的可行性,以超顺磁性聚羟乙基丙烯酸甲酯(PHEMA)微球为模型吸附剂,丹参中3种丹参酮为分离对象,首先对制备出的超顺磁性微球进行了表征,进一步考察了其对于丹参酮的吸附性能,然后从分离纯度和提取率2方面考察了1步提取和纯化的分离效率。

1 仪器与材料

扫描隧道电子显微镜(SEM)、JSM-6700F, JEOL, 日本; 振动样品磁强计(VSM), Model 4 HF VSM, ADE Technologies, 美国; Agilent1100 高效液相色谱仪。

甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)分析纯,购自 Alfa Aesar 公司; 二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA), 分析纯,购自 Aldrich 公司; 偶氮二异丁腈(AIBN)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP-K30, 40 000)、聚乙二醇(PEG) 6000、六水合氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、四水合氯化亚铁($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25%), 均为分析纯,购自上海西陇化工有限公司; 丹参酮 I(质量分数为 98%)、丹参酮 II_A(质量分数为 98%)和隐丹参酮(质量分数为 97%)对照品购自天津麦迪瑞康有限公司。

丹参饮片购自同仁堂药店,经吉林省中医药科学院牛志多研究员鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根茎,使用前被磨成粉末。

2 方法与结果

2.1 磁性 PHEMA 微球的制备

磁性 PHEMA 微球的制备参照文献方法^[9],略有修改,合成过程:首先通过共沉淀法合成 PEG 修

饰的超顺磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒, 11.8 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 4.30 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于 200 mL 去离子水中形成混合溶液,通氮气去氧,当溶液被加热到 80 °C 时,在剧烈搅拌下快速添加 25 mL 25% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 于溶液中。大约 2 min 后,在 Fe_3O_4 颗粒上包覆 PEG,添加 50 mL PEG 6000 水溶液(15 g PEG 溶于 50 mL 去离子水中配制)。2 h 后停止反应,通过磁倾析用去离子水洗涤 2 次以去除游离的 PEG,备用。

磁性 PHEMA 微球以 HEMA 为聚合单体, AIBN 为引发剂, PVP-K30 为稳定剂和 EGDMA 为交联剂在乙醇水溶液中通过分散聚合法制备,聚合过程在一个配备搅拌桨的 250 mL 三口烧瓶中进行,具体如下: 2.5 g PVP 溶于乙醇水混合溶剂中(乙醇 80 mL, 水 9 mL),加入 2 g PEG 6000- Fe_3O_4 颗粒,超声 20 min 以充分分散在溶液中。随后依次加入单体相物质: 20 mL HEMA、1 mL EGDMA 和 300 mg AIBN 同上述溶液混合均匀。混合液通氮去氧 30 min,然后密封三口烧瓶,聚合反应在 70 °C 连续搅拌下反应 24 h。所获得的磁性 PHEMA 微球混合溶液用热的乙醇和水交替洗涤数次,干燥备用。

2.2 所制备超顺磁性微球的表征

通过分散聚合法所制备的 PHEMA 磁性微球的形貌通过 SEM 进行了表征,如图 1 所示,所制备的磁性微球呈球形,经粒径统计得到其平均粒径为 1.2 μm 。磁性微球的超顺磁性能通过振动样品磁强计进行表征,其磁滞回线如图 2 所示,磁性微球的比饱和磁化强度为 4.94 emu/g,无剩磁,结果表明这些磁性微球具有超顺磁性和较强的磁响应性。

2.3 丹参酮的 HPLC 分析条件

色谱柱为 Zorbax-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-四氢呋喃-水-醋酸(16:37.5:45.5:1, 体积比),体积流量为 1 mL/min,紫外检测器波长设置为 254 nm^[1]。分别精密称取丹参酮

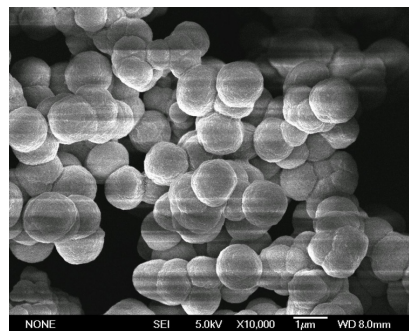


图1 磁性微球的 SEM 图

Fig. 1 SEM pictures of magnetic microspheres

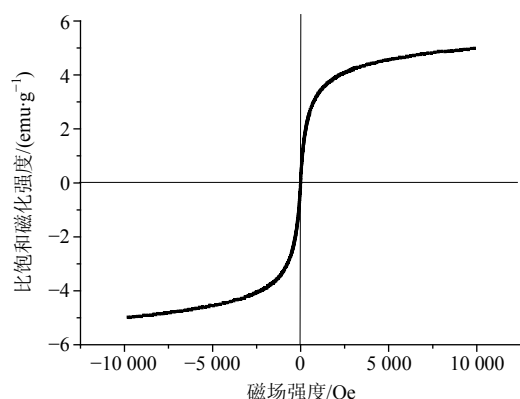


图2 磁性 PHEMA 微球的磁滞曲线

Fig. 2 Magnetic hysteresis loops of magnetic microspheres

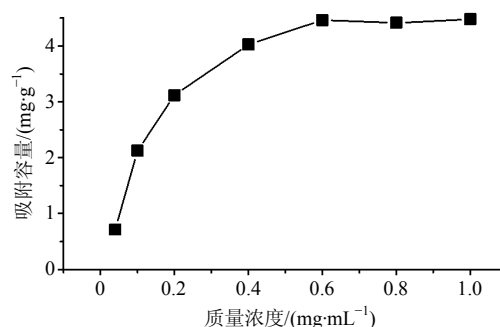
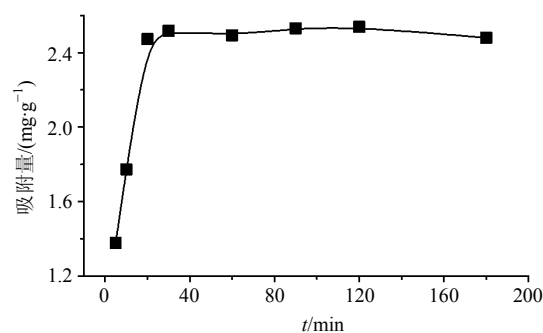
II_A、丹参酮 I 和隐丹参酮对照品适量，加无水乙醇溶液配制成质量浓度均为 100 μg/mL 的对照品混合溶液，分别精密吸取该对照品溶液 0.4、1.0、3.0、6.0、10 mL 置 10 mL 量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，摇匀，即得系列对照品混合溶液。分别吸取 10 μL 按上述色谱条件进行分析，记录峰面积，以对照品的质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，并进行回归计算，得 3 中丹参酮的回归方程、相关系数和线性范围分别为丹参酮 II_A $Y=3\,516\,X+3.722$, $r^2=0.999$, 4~100 μg/mL; 丹参酮 I $Y=6\,960\,X+24.72$, $r^2=0.999$, 4~100 μg/mL; 隐丹参酮 $Y=3\,848\,X-10.83$, $r^2=0.999$, 4~100 μg/mL。样品的定量测定过程如下：取少量待测样品液，经微孔滤膜滤过后，精密量取质量浓度在上述标准曲线线性范围内的样品 10 μL，对样品进行 HPLC 分析，记录 3 种丹参酮的峰面积，将峰面积各自代入其线性方程即可求得样品中 3 种丹参酮的质量浓度。

2.4 磁性 PHEMA 微球对丹参酮的吸附性能

为了获得磁性微球对丹参酮的吸附性能，以丹参酮 II_A 为代表，考察了该吸附剂对丹参酮的吸附容量和吸附速率。吸附容量测定方法如下：取 20 mg 磁性微球加入 5 mL 含不同质量浓度丹参酮 II_A 的无水乙醇溶液中，于摇床中室温振荡吸附 1 h，溶液经磁分离后，上清液用液相色谱分析。磁性微球对丹参酮 II_A 的饱和吸附曲线如图 3 所示，从图中可以看出磁性微球对丹参酮 II_A 的吸附容量随其质量浓度的增加而增加，当到达一定高质量浓度时吸附容量几乎不变，此时的饱和吸附容量约为 4.51 mg/g，结果表明磁性微球能成功用于吸附丹参酮。

吸附动力学测定如下：将 40 mg 磁性微球加入

20 mL 含 0.1 mg/mL 丹参酮 II_A 的乙醇溶液中，于摇床中室温振荡吸附，每隔一定时间在外加磁场作用下取上清液进行浓度测定。其吸附动力学曲线如图 4 所示，结果表明，磁性微球对丹参酮有着较快的吸附速率，在 20 min 内可以达到吸附平衡。

图3 磁性 PHEMA 微球对丹参酮 II_A 的饱和吸附量曲线Fig. 3 Saturated adsorption curve of tanshinone II_A on magnetic microspheres图4 磁性 PHEMA 微球吸附丹参酮 II_A 的动力学曲线Fig. 4 Adsorption kinetic curve of tanshinone II_A on magnetic microspheres

2.5 磁性 PHEMA 微球用于 1 步提取纯化丹参粉末中丹参酮

磁性吸附剂 1 步提取纯化丹参粉末中丹参酮主要步骤如下：将适量磁性微球和 1 g 丹参粉末加入含 10 mL 无水乙醇溶剂带塞玻璃瓶中，在恒温振荡器中于室温、200 r/min 转速下 1 步提取纯化 1 h，磁性微球与丹参粉末和无水乙醇的分离则通过一填充有条形磁铁的试管经磁分离实现，剩余溶液经滤过去掉丹参粉末得滤液，磁性微球于 10 mL 甲醇-乙酸 (9:1, 体积比) 在超声作用下脱附 10 min，滤液和脱附液经液相色谱分析，计算得到丹参酮提取率 (提取率 = 提取出的某种丹参酮质量/丹参粉末质量)。

2.5.1 磁性 PHEMA 微球用量的确定 通过添加不同量的磁性 PHEMA 微球到含 1 g 丹参粉末的 10

mL 乙醇样品溶液中,于室温、250 r/min 下振荡 1 h,考察磁性微球用量对 1 步提取纯化过程丹参酮提取率的影响,结果如图 5 所示,3 种丹参酮的提取率随吸附剂用量的增加而增加,当用量达 200 mg 时 3 种丹参酮的提取率基本上保持不变,故微球的用量选择为 200 mg。

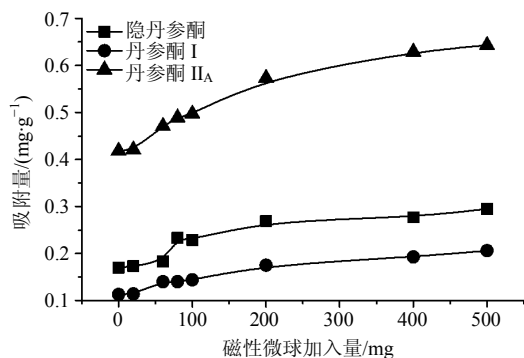


图 5 磁性微球加入量对 3 种丹参酮提取率的影响

Fig. 5 Effect of mass of magnetic microspheres on extraction yields of three tanshinones

2.5.2 提取效率与分离时间 为了考察磁性微球 1 步提取纯化法对丹参酮的分离效率,从提取效率和分离时间 2 方面与溶剂萃取提取和磁性微球纯化 2 步法进行了对比。

比较提取效率,采用溶剂萃取丹参酮(1 g 丹参粉末加入 10 mL 无水乙醇溶液中于室温、250 r/min 下振荡)需要 5 h 才能达到萃取平衡,而添加 200 mg 磁性微球的 1 步法只需 0.5 h 即可达提取平衡,各自的提取率如表 1 所示。显然,1 步法对 3 种丹参酮的提取率均明显高于溶剂萃取法,表明 1 步法的提取效率显著高于溶剂萃取。磁性微球的加入对丹参酮溶剂萃取过程的强化作用可以从平衡分配的角度进行解释:对于单纯溶剂萃取,丹参酮在丹参粉末基质和萃取溶液二者间进行平衡分配,而磁性微球加入后,丹参酮则在丹参粉末基质、萃取溶液和磁性微球三者间进行平衡分配,新增的平衡(磁性微球和萃取溶液间的平衡)势必会持续降低萃取溶液中丹参酮的量,使萃取平衡朝增加丹参酮提取率的方向移动,从而强化了溶剂萃取过程的提取效率。

比较分离时间,2 步法所需时间为 5.5 h,即溶剂萃取时间(5.0 h)与磁性微球纯化时间(0.5 h)之和,而磁性微球 1 步法所需时间仅为磁性微球的纯化时间约 0.5 h(因提取纯化过程同时进行),显然在分离时间上,1 步法显著短于 2 步法。

2.5.3 纯化效果 为了进一步考察磁性 PHEMA 微

表 1 溶剂萃取与磁性微球 1 步提取纯化方法对丹参酮提取效率的对比

Table 1 Comparison on extraction efficiency of one-step separation method and solvent extraction method

方法	提取率/(mg·g ⁻¹)			提取时间/h
	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A	
1 步法	0.279	0.176	0.575	0.5
溶剂萃取	0.179	0.093	0.452	5.0

球 1 步提取纯化法对丹参酮的纯化效果,对比了单纯溶剂萃取和磁性微球 1 步提取纯化法(磁性微球脱附液)所获得丹参酮料液的 HPLC 图,如图 6 所示,从二者谱图所含杂质峰的多少可以明显看出,磁性微球 1 步法有着良好的纯化效果,结果也表明磁性微球在丹参粉末基质存在的条件下对 3 种丹参酮仍表现出良好的纯化作用,这更进一步证明了所提出的磁性微球 1 步提取纯化法是可行的。

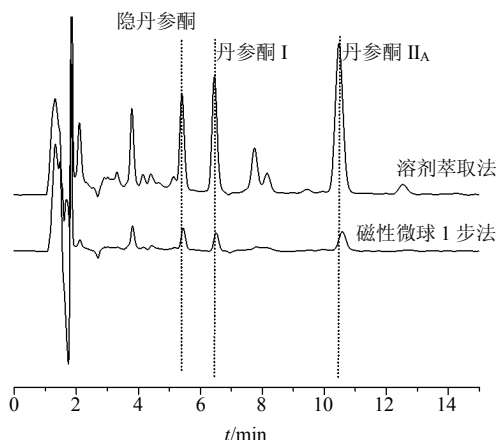


图 6 磁性微球 1 步法和溶剂萃取法的 HPLC 图对比

Fig. 6 Comparison on HPLC obtained by one-step method and solvent extraction method

3 讨论

采用分散聚合法成功制备出平均粒径为 1.2 μm 的超顺磁性 PHEMA 微球,该微球对丹参酮有 4.51 mg/g 的饱和吸附容量和较快的吸附速率。

通过将超顺磁性吸附剂纯化过程耦合到提取过程,这种 1 步提取纯化法不仅使提取过程提取效率显著增加,对 3 种丹参酮的提取率从 5 h 的 0.179%、0.093%、0.452%分别提高到 0.5 h 的 0.279%、0.176%、0.575%,分离工序少,而且纯化效果好,分离时间也从 5.5 h 缩短为 0.5 h,这些结果表明所提出的 1 步提取纯化法是高效的,在中药中有效成分的高效分离有着较好的应用前景。

参考文献

- [1] Pan X J, Niu G G, Liu H Z. Microwave-assisted extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge with analysis by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 922(1/2): 371-375.
- [2] Wu K, Zhang Q, Liu Q, *et al.* Ionic liquid surfactant-mediated ultrasonic-assisted extraction coupled to HPLC: Application to analysis of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(23/24): 4220-4226.
- [3] Wang L, Song Y, Cheng Y, *et al.* Orthogonal array design for the optimization of supercritical fluid extraction of tanshinones from Danshen [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(2): 321-328.
- [4] 姜喜成, 秦培勇, 谭天伟. 大孔树脂对丹参酮 II_A 的静态吸附研究 [J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2009, 36(3): 79-82.
- [5] Tian G, Zhang T, Zhang Y, *et al.* Separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by multidimensional counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 945(1/2): 281-285.
- [6] 姜喜成. 微波辅助提取中药有效成分及丹参酮的分离纯化 [D]. 北京: 北京化工大学, 2009.
- [7] Guo B Z, Ji S L, Zhang F F, *et al.* Preparation of C₁₈-functionalized Fe₃O₄@SiO₂ core-shell magnetic nanoparticles for extraction and determination of phthalic acid esters in Chinese herb preparations [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 100: 365-368.
- [8] Zhang B, Xing J, Lang Y, *et al.* Synthesis of amino-silane modified magnetic silica adsorbents and application for adsorption of flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *Sci Chin Ser B-Chem*, 2008, 51(2): 145-151.
- [9] Horák D, Benedyk N. Magnetic poly (glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids [J]. *J Polym Sci Pol Chem*, 2004, 42(22): 5827-5837.