

丹参茎叶酚酮有效部位的提取纯化工艺研究

项 想, 孙成静, 宿树兰*, 顾俊菲, 郭 盛, 尚尔鑫, 严 辉, 钱大玮, 段金廛*

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程中心
国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室, 江苏 南京 210023

摘 要: **目的** 对丹参茎叶酚酮有效部位提取纯化工艺进行优选。**方法** 采用超高效液相色谱仪检测, 以丹参茎叶中酚酸类(丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 B、迷迭香酸、紫草酸)及黄酮类成分(芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷)二者提取量、总提取量及浸膏得率为评价指标, 通过单因素及正交试验考察提取方法、提取溶剂、料液比、提取时间及提取次数对丹参茎叶提取工艺的影响; 采用大孔吸附树脂纯化丹参茎叶提取物并对纯化工艺参数进行考察, 确定最佳纯化工艺。**结果** 以 50%乙醇 8 倍量回流提取 3 次, 每次提取 1.0 h 为最佳提取工艺; 以 AB-8 型大孔吸附树脂纯化, 1.0 g/mL 药液上样, 上样量为每 10 克干树脂上样 1.5 g 干燥提取物, 40%乙醇洗脱, 洗脱用量 3 BV 为最佳纯化工艺, 酚酸类及黄酮类成分总纯度可达到 41.83%。**结论** 优选的提取工艺稳定可行, 适用于丹参茎叶酚酮有效部位的提取纯化, 可为丹参茎叶的进一步开发提供参考。

关键词: 丹参; 酚酸类成分; 黄酮类成分; 丹参素; 原儿茶酸; 原儿茶醛; 咖啡酸; 芦丁; 异槲皮苷; 丹酚酸 B; 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; 紫云英苷; 迷迭香酸; 紫草酸

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)01-0120-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.017

Optimization of extraction and purification technology for phenolic acids and flavonoids in stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza*

XIANG Xiang, SUN Cheng-jing, SU Shu-lan, GU Jun-fei, GUO Sheng, SHANG Er-xin, YAN Hui, QIAN Da-wei, DUAN Jin-ao

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To study the optimum condition for the extraction and purification of phenolic acids and flavonoids in the stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza*. **Methods** The contents of phenolic acids and flavonoids were determined by ultra performance liquid chromatography (UPLC). The extraction process was evaluated by single factor test and orthogonal design with yield of dry extract and the content of phenolic acids (including danshensu, protocatechuic acid, protocatechualdehyde, caffeic acid, salvianolic acid B, rosmarinic acid, and lithospermic acid) and flavonoids (including rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, and astragalin) as index. The effects of extraction method, extraction solvent, ratio of material to liquid, extracting time, and extracting times on the extraction of stems and leaves of *S. miltiorrhiza* were investigated. Macroporous adsorption resin was used to purify the sample, and the purification process parameters were investigated to determine the optimum purification process. **Results** The optimum condition for the extraction of the stems and leaves of *S. miltiorrhiza* is that eight times of 50% ethanol for three times reflux extraction and 1 h for each time and AB-8 macroreticular resin was selected for the purification. Optimum process was as following:

收稿日期: 2017-09-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81673533); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心重点项目(ZDXM-02-05)

作者简介: 项 想(1990—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药化学。Tel/Fax: (025)85811916 E-mail: xx5326@126.com

*通信作者 宿树兰(1974—), 女, 教授, 研究方向为中药资源化学与方药功效物质基础研究。

Tel/Fax: (025) 85811916 E-mail: sushulan1974@163.com

段金廛(1956—), 教授, 博士生导师, 中国自然资源学会中药及天然药物资源专业委员会主任委员, 国家“973”计划首席科学家。
Tel/Fax: (025)85811116 E-mail: dja@njutcm.edu.cn

The concentration of sample solution was 1.0 g/mL; The loading quantity of the sample was 0.15 g dried extract of per gram; The resin column chromatography was eluted with 3 BV of 40% ethanol. Under these conditions, the total purity of phenolic acids and flavonoids could reach 40.83%. **Conclusion** The optimum technology is stable and feasible for the extraction and purification of phenolic acids and flavonoids in the stems and leaves of *S. miltiorrhiza*, and can provide reference for further development and utilization.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; phenolic acids; flavonoids; danshensu; protocatechuic acid; protocatechualdehyde; caffeic acid; rutin; isoquercitrin; salvianolic acid B; kaempferol-3-*O*-rutinoside; astragaln; rosmarinic acid; lithospermic acid

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 其味苦, 性微寒, 具有活血调经、祛瘀止痛、除烦安神、凉血消痈等功效^[1], 用于胸痹心痛、热痹疼痛、痛经经闭、疮疡肿痛^[2]。以丹参为主药的复方制剂如复方丹参滴丸、复方丹参片、丹参注射液等在临床上广泛应用于心脑血管疾病的治疗^[3-4]。随着临床药用范围的扩大, 丹参药材需求量的不断增长, 采收其药用部位的同时也产生了大量的丹参茎叶等非药用部位, 对其进行开发利用可减少资源浪费, 提高丹参资源利用效率。

丹参茎叶中主要含有酚酸类、黄酮类、三萜皂苷类及香豆素类成分^[5], 其中酚酸类成分是丹参茎叶与丹参药用部位相似的成分。丹酚酸类成分是一类含有酚羟基的有机酸类化合物。多数丹酚酸类成分抗氧化作用强度高于维生素 C、维生素 E、甘露醇。其中丹酚酸 B 是目前已知的抗氧化作用最强的天然产物之一^[6], 具有抗血栓、改善微循环、保肝等药理活性^[7-8], 对心脑血管疾病具有良好的治疗作用。黄酮类成分如异槲皮苷、芦丁等具有降血糖、调血脂、抗氧化、抗菌和抗肿瘤等药理作用^[9]。

本实验在前期研究^[1,10-12]基础上, 以丹参茎叶中酚酸类及黄酮类成分为研究对象, 采用单因素实验及正交试验优选丹参茎叶酚酮有效部位的最佳提取工艺, 同时利用大孔吸附树脂对其进行纯化富集, 以期对丹参茎叶资源合理开发利用提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC 系统, 包括四元泵溶剂系统, 自动进样器, 二极管阵列检测器; Waters 公司; Sartorius BT125D 电子分析天平, 德国塞利多斯公司; EPED 超纯水系统, 南京易普达易科技发展有限公司; KQ-250E 型超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; AnkeGL-16 GII 型离心机, 上海安亭科学仪器厂; 戴生高速万能粉碎机, 永康市九顺莹商贸有限公司。

1.2 试剂与材料

超纯水经 Milli-Q 超纯水制备系统自制; 甲酸、

乙腈均为色谱纯, 购自德国默克公司; D101、HDP-100、X-5、AB-8、HDP-450、S-8、NKA-9 型大孔吸附树脂均购自上海摩速科学仪器有限公司; 其他化学试剂均为分析纯, 购自南京化学试剂有限公司。

1.3 药品

对照品原儿茶酸 (批号 110809-201205)、原儿茶醛 (批号 110810-201007)、咖啡酸 (批号 110885-200102)、芦丁 (批号 100080-201409)、迷迭香酸 (批号 111871-201203) 均购自中国食品药品检定研究院; 对照品丹参素 (批号 MUST-13030108)、异槲皮苷 (批号 MUST-15070211)、紫云英苷 (批号 MUST-13092006)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 (批号 MUST-16041507)、紫草酸 (批号 MUST-15022407)、丹酚酸 B (批号 MUST-13030203)、丹酚酸 A (批号 MUST-13030701)、丹酚酸 C (批号 MUST-15011305) 均购自北京普天同创生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%。

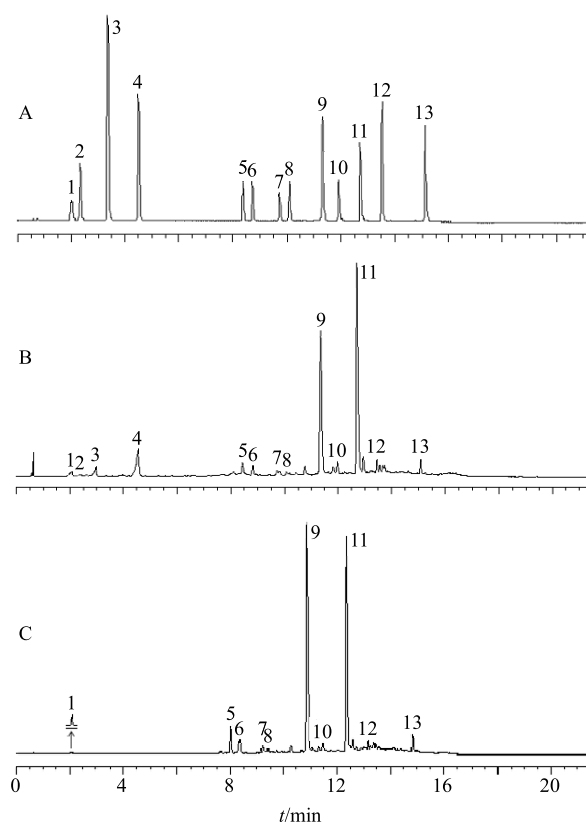
丹参茎叶药材于 2016 年 7 月采自山东省济南市长清区马山镇, 植物基原经南京中医药大学段金廛教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的地上茎叶。样品于 50 °C 热风烘干, 干燥后粉碎过 40 目筛, 常温密封干燥保存备用。

2 方法与结果

2.1 丹参茎叶酚酮类成分定量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 35 °C; 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~1 min, 5% 乙腈; 1~3 min, 5%~10% 乙腈; 3~7 min, 10%~15% 乙腈; 7~11 min, 15%~21% 乙腈; 11~15 min, 21%~33% 乙腈; 15~17 min, 33%~70% 乙腈; 17~18 min, 70%~80% 乙腈; 18~20 min, 80% 乙腈; 20~21 min, 80%~5% 乙腈; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 2 μL; 检测波长 280 nm (丹酚酸类成分) 和 254 nm (黄酮类成分)。对照品及样品色谱图 (280 nm) 见图 1。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-



1-丹参素 2-原儿茶酸 3-原儿茶醛 4-咖啡酸 5-芦丁 6-异槲皮苷 7-山柰酚-3-O-芸香糖苷 8-紫云英苷 9-迷迭香酸 10-紫草酸 11-丹酚酸 B 12-丹酚酸 A 13-丹酚酸 C
1-danshensu 2-protocatechuic acid 3-protocatechualdehyde 4-caffèic acid 5-rutin 6-isoquercitrin 7-kaempferol-3-O-rutinoside 8-astragalin 9-rosmarinic acid 10-iithospermic acid 11-salvianolic acid B 12-salvianolic acid A 13-salvianolic acid C

图 1 混合对照品溶液 (A)、丹参茎叶样品 (B) 与丹参茎叶纯化后样品 (C) 的 UPLC 图谱

Fig. 1 UPLC of reference standard solution (A), sample of *S. miltiorrhiza* (B), and sample after purified (C)

3-O-芸香糖苷、紫云英苷、迷迭香酸、紫草酸及丹酚酸 B、A、C 对照品适量，置于棕色量瓶中，加 90% 甲醇制成含丹参素 0.155 mg/mL、原儿茶酸 0.115 mg/mL、原儿茶醛 0.111 mg/mL、咖啡酸 0.135 mg/mL、芦丁 0.123 mg/mL、异槲皮苷 0.122 mg/mL、山柰酚-3-O-芸香糖苷 0.112 mg/mL、紫云英苷 0.152 mg/mL、迷迭香酸 0.123 mg/mL、紫草酸 0.178 mg/mL、丹酚酸 B 0.109 mg/mL、丹酚酸 A 0.179 mg/mL、丹酚酸 C 0.098 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 取提取液适量，定容至相应体积，混匀，滤过，13 000 r/min 离心 10 min，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.1.4 线性关系考察 取混合对照品溶液，分别稀

释 2、10、20、100、200 倍，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按“2.1.1”项下色谱条件依次进样分析，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，进行线性回归，计算回归方程。以各化合物的信噪比 (S/N) 等于 3 时相应的质量浓度确定最低检测限 (LOD)，以各化合物的 S/N 等于 10 时相应的质量浓度确定最低定量限 (LOQ)。结果分别为丹参素 $Y=3\,343.5X-401.43$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.775~155.000 μg/mL, LOD 3.08 μg/mL, LOQ 10.26 μg/mL; 原儿茶酸 $Y=7\,311.4X+2\,259$, $r=1.000\,0$, 线性范围 0.575~115.000 μg/mL, LOD 1.30 μg/mL, LOQ 4.34 μg/mL; 原儿茶醛 $Y=23\,129X+1\,934.7$, $r=1.000\,0$, 线性范围 0.555~111.000 μg/mL, LOD 0.39 μg/mL, LOQ 1.28 μg/mL; 咖啡酸 $Y=14\,635X-600.47$, $r=1.000\,0$, 线性范围 0.675~135.000 μg/mL, LOD 0.59 μg/mL, LOQ 1.98 μg/mL; 芦丁 $Y=9\,316.4X+1\,769.1$, $r=1.000\,0$, 线性范围 0.615~123.000 μg/mL, LOD 2.25 μg/mL, LOQ 7.49 μg/mL; 异槲皮苷 $Y=12\,745X+1\,425.9$, $r=1.000\,0$, 线性范围 0.61~122.00 μg/mL, LOD 1.76 μg/mL, LOQ 5.87 μg/mL; 山柰酚-3-O-芸香糖苷 $Y=6\,513.9X-2\,071.6$, $r=0.999\,8$, 线性范围 0.56~112.00 μg/mL, LOD 3.36 μg/mL, LOQ 11.21 μg/mL; 紫云英苷 $Y=9\,617.6X+1\,136.3$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.615~123.000 μg/mL, LOD 2.30 μg/mL, LOQ 7.66 μg/mL; 迷迭香酸 $Y=9\,060.4X-907.77$, $r=1.000\,0$, 线性范围 0.615~123.000 μg/mL, LOD 1.07 μg/mL, LOQ 3.58 μg/mL; 紫草酸 $Y=5\,744X-2\,599.6$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.89~178.00 μg/mL, LOD 1.48 μg/mL, LOQ 4.94 μg/mL; 丹酚酸 B $Y=5\,287.7X-1\,162.7$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.545~109.000 μg/mL, LOD 1.25 μg/mL, LOQ 4.17 μg/mL; 丹酚酸 A $Y=13\,188X-2\,514$, $r=1.000\,0$, 线性范围 0.895~179.000 μg/mL, LOD 0.53 μg/mL, LOQ 1.78 μg/mL; 丹酚酸 C $Y=10\,563X-1\,290.8$, $r=1.000\,0$, 线性范围 0.49~98.00 μg/mL, LOD 0.71 μg/mL, LOQ 2.36 μg/mL。

2.1.5 精密度试验 取混合对照品溶液连续进样 6 次，记录各对照品色谱峰峰面积。各对照品色谱峰峰面积的 RSD 均小于 1.33%，表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取最优提取工艺所得供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录各色谱峰峰面积。各主要色谱峰峰面积的 RSD 均小

于 1.79%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 依据最优提取工艺，按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，依次进样测定，记录样品中各色谱峰峰面积。各主要色谱峰峰面积的 RSD 均小于 1.57%，表明方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知各指标成分量的样品溶液 6 份，精密加入一定量的对照品溶液，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，测定并记录各对照品的回收率。各指标成分的平均加样回收率为 98.05%~104.00%，RSD 为 0.19%~2.35%。

2.1.9 样品测定方法 分别取丹参茎叶粉末，每份约 5 g，按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件测定各指标成分量。

2.2 丹参茎叶提取工艺研究

2.2.1 提取方法考察

(1) 超声提取法：取丹参茎叶药材，粉碎后过 40 目筛，精密称取药材粉末 5 g，以料液比为 1:8，乙醇超声（300 W，50 kHz）提取 2 次，提取时间为每次 0.5 h，测定指标成分的量。

(2) 乙醇回流法：取丹参茎叶药材，粉碎后过 40 目筛，精密称取药材粉末 5 g，以料液比为 1:8，乙醇回流提取 2 次，提取时间为每次 1 h，测定指标成分的量。

(3) 乙醇回流+水煎煮法：取丹参茎叶药材，粉碎后过 40 目筛，精密称取药材粉末 5 g，以料液比为 1:8，乙醇回流提取 1 次，提取 1 h；醇提后药渣以料液比为 1:8，水煎煮提取 1 次，提取 1 h，合并 2 次药液，测定指标成分的量。

结果表明，乙醇回流法对指标成分的提取率最高，故选择乙醇回流法进行单因素及正交试验考察。见表 1。

2.2.2 提取溶剂考察 取丹参茎叶药材，粉碎后过 40 目筛，精密称取药材粉末 5 g，以料液比为 1:8，提取次数为 2 次，提取时间为每次 1 h，考察水及不

Table 1 Effects of extraction method on phenolic acids, flavonoid, and their total content

提取方法	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	黄酮类成分	酚酸类成分	总量
超声提取法	3.46	31.07	34.53
乙醇回流法	4.55	43.97	48.52
乙醇回流+水煎煮法	4.06	40.37	44.43

同乙醇体积分数（30%、50%、60%、70%、90%）提取对丹参茎叶中酚酸类成分及黄酮类成分量的影响。结果表明，丹参茎叶中酚酸类及黄酮类成分量随乙醇体积分数的升高而增加，在乙醇为 60%时达到峰值，后随乙醇体积分数的升高而下降。见表 2。

表 2 提取溶剂对丹参茎叶黄酮类成分、酚酸类成分及其总量的影响

Table 2 Effects of extraction solvent on phenolic acids, flavonoid, and their total content

提取溶剂	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	黄酮类成分	酚酸类成分	总量
水	2.68	35.56	38.24
30%乙醇	3.52	37.61	41.13
50%乙醇	3.95	37.07	41.02
60%乙醇	4.55	4.97	48.51
70%乙醇	4.53	36.79	41.32
90%乙醇	3.92	31.94	35.86

2.2.3 料液比考察 取丹参茎叶药材，粉碎后过 40 目筛，精密称取药材粉末 5 g，以 60%乙醇，提取次数为 2 次，提取时间为每次 1 h，考察不同料液比 1:8、1:10、1:12、1:15、1:20 对提取成分总量的影响。结果表明，当料液比为 1:15 时，总量达到峰值，各组间含量无明显差异。见表 3。

2.2.4 提取时间考察 取丹参茎叶药材，粉碎后过 40 目筛，精密称取药材粉末 5 g，以 60%乙醇，料液比 1:8，提取次数 1 次，考察不同的提取时间（1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h）对提取成分总量的影响。结果表明，丹参茎叶中酚酸类及黄酮类成分量随时间的增加而升高，在 2.0 h 时达到峰值，后随时间的增加而下降。见表 4。由于丹酚酸 B 稳定性较差，不宜长时间加热，故选择 1.0、1.5、2.0 h 进行正交

表 3 料液比对丹参茎叶黄酮类成分、酚酸类成分及其总量的影响

Table 3 Effects of ratio of material to liquid on phenolic acids, flavonoid, and their total content

料液比	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	黄酮类成分	酚酸类成分	总量
1:8	4.33	44.52	48.85
1:10	4.75	42.80	47.54
1:12	4.88	43.81	48.69
1:15	5.03	45.42	50.45
1:20	5.14	45.21	50.35

表 4 提取时间对丹参茎叶黄酮类成分、酚酸类成分及其总量的影响

Table 4 Effects of extraction time on phenolic acids, flavonoid and their total content

提取时间/h	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	黄酮类成分	酚酸类成分	总量
1.0	3.96	36.48	40.45
1.5	4.05	36.84	40.89
2.0	3.97	39.59	43.56
2.5	3.83	37.77	41.60
3.0	3.92	38.38	42.30

试验考察。

2.2.5 提取次数考察 取丹参茎叶药材, 粉碎后过 40 目筛, 精密称取药材粉末 5 g, 以 60%乙醇, 料液比 1:8, 提取时间为每次 1.0 h, 考察提取次数 1、2、3、4 对提取成分总量的影响。结果表明随着提取次数的增加, 丹参茎叶中酚酸类及黄酮类成分量的总量呈上升的趋势, 提取 3 次后总量不再上升。见表 5。

2.2.6 正交试验 取丹参茎叶药材, 粉碎后过 40 目筛, 精密称取 9 份药材粉末, 每份 5 g, 按 L₉(3⁴) 正交试验表进行试验。根据单因素试验结果, 选取乙醇体积分数 (A)、料液比 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 为考察因素, 各选取 3 个水平, 考察提取最优工艺条件。

本实验以丹参茎叶中酚酸类及黄酮类成分总量

表 5 提取次数对丹参茎叶黄酮类成分、酚酸类成分及其总量的影响

Table 5 Effect of extraction times on phenolic acids, flavonoid, and their total content

提取次数	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	黄酮类成分	酚酸类成分	总量
1	4.36	41.56	45.92
2	5.11	49.68	54.79
3	5.90	53.67	59.57
4	5.50	51.74	57.24

及浸膏得率为评价指标, 运用综合加权评分法进行数据处理。设定满分为 100 分, 其中指标成分总量权重系数 0.9, 浸膏得率权重系数 0.1, 在此基础上进行总加权评分, 以综合评分值对正交试验结果进行方差分析。综合评分 = 总量/总量最大值 × 0.9 × 100 + 浸膏得率/浸膏得率最大值 × 0.1 × 100。因素水平及试验结果见表 6, 方差分析见表 7。

正交试验结果表明以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析, 各因素作用主次为 D > C > A > B, 影响指标成分提取的主要因素为提取次数 ($P < 0.01$)、乙醇体积分数 ($P < 0.05$)、提取时间 ($P < 0.05$)。极差分析结果显示, 料液比对提取率的影响最小且各水平间无明显差异。结合各因素的 K 值并考虑生产成本问题, 确定丹参茎叶中酚酸类及黄酮类成分最佳提取工艺为 A₁B₁C₁D₃, 即乙醇体积分数 50%, 料液比为 1:8, 提取 1.0 h, 提取 3 次。

表 6 L₉(3⁴) 正交试验设计及直观分析Table 6 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A/%	B	C/h	D	总量/(mg·g ⁻¹)	浸膏得率/%	综合评分
1	50 (1)	1:8 (1)	1.0 (1)	1 (1)	50.23	28.57	74.82
2	50 (1)	1:10 (2)	1.5 (2)	2 (2)	63.22	32.40	93.16
3	50 (1)	1:12 (3)	2.0 (3)	3 (3)	67.70	35.54	100.00
4	60 (2)	1:8 (1)	1.5 (2)	3 (3)	64.38	32.53	94.74
5	60 (2)	1:10 (2)	2.0 (3)	1 (1)	47.36	28.00	70.84
6	60 (2)	1:12 (3)	1.0 (1)	2 (2)	64.24	29.03	93.57
7	70 (3)	1:8 (1)	2.0 (3)	2 (2)	62.78	33.83	92.98
8	70 (3)	1:10 (2)	1.0 (1)	3 (3)	67.09	31.51	98.06
9	70 (3)	1:12 (3)	1.5 (2)	1 (1)	47.27	23.51	69.45
K ₁	267.98	262.53	266.45	215.11			
K ₂	259.15	262.06	257.35	279.71			
K ₃	260.49	263.02	263.82	292.80			
R	8.83	0.96	9.10	77.69			

表 7 方差分析

Table 7 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	15.096 1	2	98.281 7	$P<0.05$
B (误差)	0.153 6	2		
C	14.620 9	2	95.187 9	$P<0.05$
D	1 153.360 5	2	7 508.857 2	$P<0.01$

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

2.2.7 验证试验 以上述优化的最佳工艺条件, 平行制备 3 份供试品溶液进行测定, 其黄酮类及酚酸类总量均值为 62.88 mg/g, RSD 值为 3.04%。验证试验结果表明该优选工艺稳定可靠。

2.3 丹参茎叶纯化工艺研究

2.3.1 树脂的预处理 取不同极性的 7 种型号大孔吸附树脂适量, 用 2 倍体积的 95%乙醇浸泡 24 h, 使其充分溶胀, 湿法装柱, 用约 5 倍体积的去离子水清洗至无醇味, 备用。

2.3.2 大孔树脂型号筛选 采用静态吸附法, 筛选丹参茎叶纯化最适树脂。精密称取 D101、HDP-100、X-5、AB-8、HDP-450、S-8、NKA-9 湿树脂各 1.0 g (抽滤至不滴水时质量), 置于 50 mL 具塞磨口三角烧瓶中, 分别加入最佳工艺丹参茎叶浓缩提取液 10 mL, 置水平摇床振摇 24 h (140 r/min), 使目标成分充分被吸附, 滤过, 测定滤液中黄酮类和酚酸类成分量, 计算各树脂在室温下的饱和和吸附量。将经静态饱和吸附的树脂滤出, 精密加入 50%乙醇 10 mL, 再次置于摇床同法振摇 24 h 后, 测定解吸液中黄酮类和酚酸类成分量, 计算各树脂的解吸率, 结果见表 8。结果表明, 静态吸附及解吸效果较好的 3 种树脂为 HDP-100、X-5 和 AB-8, 三者间无明显

表 8 不同型号树脂的静态吸附量和解吸率测定结果

Table 8 Dynamic adsorption and desorption capacities of different resins

树脂型号	极性	吸附量/(mg·g ⁻¹)		洗脱率/%	
		酚酸类	黄酮类	酚酸类	黄酮类
D101	非极性	8.769	3.479	54.15	60.60
HDP-100	非极性	9.338	3.640	71.05	66.20
X-5	非极性	9.646	3.556	71.00	72.94
AB-8	弱极性	8.912	3.638	70.30	67.24
HDP-450	中极性	4.004	2.317	62.58	57.18
S-8	中极性	1.437	3.801	11.09	51.85
NKA-9	强极性	7.992	3.212	61.57	60.09

差异; 且 AB-8 是比较常见的市售药用级大孔吸附树脂, 成本较低, 故选择 AB-8 型大孔吸附树脂作为本实验纯化丹参茎叶提取液的树脂型号。

饱和和吸附量=(吸附前溶液成分含量-吸附后溶液成分含量)/干树脂量

洗脱率=洗脱液总黄酮质量浓度×吸附液体积/饱和和吸附量

2.3.3 洗脱剂乙醇体积分数考察 取预处理好的 AB-8 型大孔树脂 1 g, 共 9 份, 分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 各精密加入最佳工艺丹参茎叶浓缩提取液 10 mL, 按“2.3.2”项下方法震荡 24 h, 使其达到饱和吸附, 分离树脂, 吸干表面水分。对应加入体积分数为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的乙醇溶液各 10 mL, 同法震荡洗脱 24 h 后滤过, 测定洗脱液中黄酮类和酚酸类成分量, 结果见图 2。结果表明, 以酚酸类及黄酮类成分为指标时, 40%、50%、60%乙醇解吸率均较高, 且结合生产成本考虑, 故选择 40%乙醇为洗脱剂。

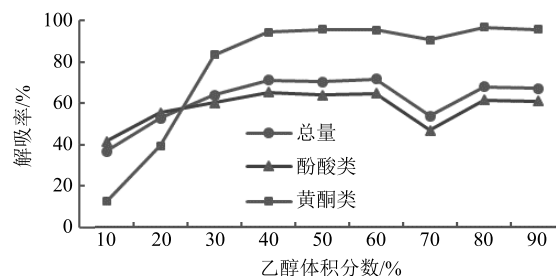


图 2 洗脱溶媒考察

Fig. 2 Results of ethanol concentration investigation

2.3.4 上样液质量浓度考察 称取 3 份处理好的 AB-8 型树脂 10 g, 湿法装柱, 分别加入 1.0 g/mL 药液 5 mL、0.5 g/mL 药液 10 mL、0.25 g/mL 药液 20 mL 上柱, 每份药液折合生药量均为 5 g 生药, 即 1.5 g 干燥提取物, 黄酮类和酚酸类含有量均为 308.52 mg。待完全吸附后以 3 BV 水除杂, 40%乙醇 100 mL 以 1 mL/min 进行洗脱, 收集洗脱液, 分别测定洗脱液中黄酮类和酚酸类成分的量。计算结果表明, 不同质量浓度药液上样洗脱后转移率分别为 90.51%、74.95%、66.50%。故选择 1.0 g/mL 药液上样。

2.3.5 泄漏曲线绘制 取预处理好的 AB-8 型大孔树脂约 10 g (抽滤至不滴水的质量), 湿法装柱。量取上样液 (0.25 g/mL) 70 mL 上样, 以 1 mL/min 体积流量进行动态吸附, 收集过柱液, 每 10 毫升接 1 管, 共收集 7 管, 测定各过柱液中黄酮及酚酸的

泄漏量。以 5% 为界限, 计算泄漏率, 确定最大上样量并绘制泄漏曲线, 见图 3。结果表明, 第 4 份流出液时开始大量泄漏, 同时第 1 份多为树脂间水分, 扣去树脂间水分 10 mL, 故确定每克树脂上样量应小于等于 0.15 g 干燥提取物。

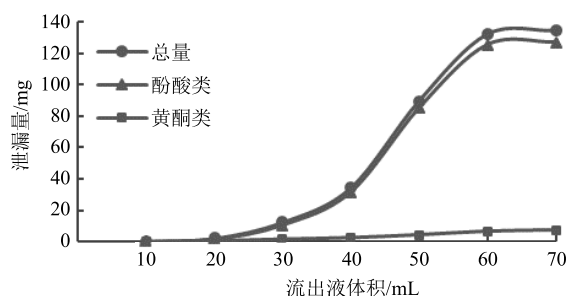


图 3 泄漏曲线考察

Fig. 3 Leakage curve of phenolic acids and flavonoids

2.3.6 洗脱剂用量考察 取预处理好的 AB-8 型大孔树脂 10 g, 湿法装柱, 量取 1.0 g/mL 样品液 5 mL 上柱, 用 3 BV 水除杂, 加 40% 乙醇, 以 1 mL/min 体积流量进行洗脱, 收集洗脱液, 每 1 个 BV 为 1 份, 测定各洗脱液中黄酮及酚酸的量, 计算其累积洗脱量, 洗脱曲线见图 4。结果表明, 3 BV 后洗脱液中酚酸类及黄酮类成分量均基本不再增加, 故选择以 3 BV 40% 乙醇洗脱。

2.3.7 验证实验 称取已处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂 130 g, 湿法装柱, 取 1.0 g/mL 丹参茎叶样品液 50 mL 上柱, 用 3 BV 水洗除杂, 3 BV 40% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 浓缩干燥至恒定质量, 计算得率并测定。纯化后样品中酚酸类和黄酮类成分质量分数可达到 41.83%, 得率 9.07%; 其中酚酸类成分质量分数为 36.00%, 迷迭香酸、丹酚酸 B 分别占比 12.68%、21.13%; 黄酮类成分质量分数为 5.83%, 其中芦丁、异槲皮苷分别占比 3.62%、1.32%。验证实验结果表明该优选纯化工艺稳定可行。

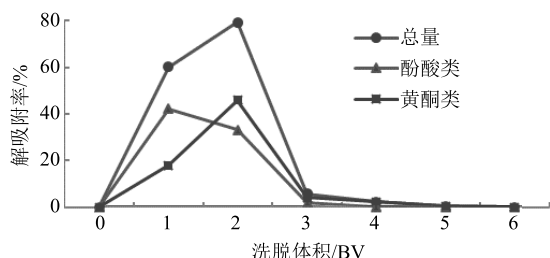


图 4 丹参茎叶中酚酸及黄酮的洗脱曲线

Fig. 4 Curve of elution of total phenolic acids and flavonoids

3 讨论

本实验对丹参茎叶中酚酮有效部位的提取纯化工艺进行了系统研究。丹参茎叶中酚酸类成分如丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B 对心血管系统均具有保护作用^[8,13-14], 黄酮类成分如芦丁、异槲皮苷均具有良好的抗氧化活性^[15], 且浸膏得率的变化会影响有效成分的量, 并最终影响药物的临床疗效^[16]。因此, 本实验选取丹参茎叶中 9 种酚酸类成分、4 种黄酮类成分及浸膏得率为指标, 对其提取纯化工艺进行综合评价, 能较全面反映丹参茎叶提取物中有效成分的信息。

本实验通过单因素实验确定丹参茎叶提取方法及正交试验的因素水平, 通过正交试验考察提取溶剂、料液比、提取时间及提取次数对丹参茎叶提取工艺的影响, 筛选最佳提取工艺。结果表明乙醇回流法提取率较高, 且易于操作与大规模试验, 故选择乙醇回流法进行单因素考察与正交试验。丹酚酸 B 是丹参茎叶中酚酸类成分量最高的活性成分, 但稳定性较差, 受温度影响较大, 故在提取过程中温度不超过 85 °C 为宜^[16-18]。经正交试验与验证实验最终确定提取工艺为 50% 乙醇 8 倍量回流提取 3 次, 每次提取 1 h。

采用大孔吸附树脂对提取物中酚酸类及黄酮类成分进行纯化, 考察树脂类型、洗脱剂乙醇体积分数、上样液质量浓度、上样量及洗脱剂用量对指标成分纯化的影响, 确定最佳纯化工艺。实验结果表明 AB-8 型大孔吸附树脂对丹参茎叶中总成分具有较好的吸附、富集作用, 适用于其分离纯化。经验证试验最终确定纯化工艺为 1.0 g/mL 药液上样, 上样量为每 10 克干树脂上样 1.5 g 干燥提取物, 40% 乙醇洗脱, 洗脱用量 3 BV 为最佳纯化工艺。该提取及纯化工艺稳定可行, 可为未来丹参茎叶的综合利用与工业化生产提供依据。

参考文献

- [1] 沙秀秀, 宿树兰, 沈 飞, 等. 不同生长期丹参茎叶及花序中丹酚酸类化学成分的分布与积累动态分析评价 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3414-3419.
- [2] Wang L, Yu J, Fordjour P A, et al. Danshen injection prevents heart failure by attenuating post-infarct remodeling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 205: 22-32.
- [3] Pang H Q, Wu L, Tang Y P, et al. Chemical analysis of the herbal medicine *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma* (Danshen) [J]. *Molecules*, 2016, 21(1): 51-67.
- [4] 樊 玲, 谭成波, 殷 慧. 复方丹参滴丸联合马来酸桂

- 哌齐特治疗不稳定型心绞痛的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(9): 1079-1082.
- [5] 周凤琴, 黄尚荣, 王 婷, 等. 丹参叶化学成分的初步研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31(6): 504-506.
- [6] 刘 梅, 夏鑫华, 张志敏, 等. 丹参素、原儿茶醛、咖啡酸和丹酚酸 B 体外抗氧化活性比较研究 [J]. 中药材, 2009, 32(2): 265-267.
- [7] Chang P N, Mao J C, Huang S H, *et al.* Analysis of cardioprotective effects using purified *Salvia miltiorrhiza* extract on isolated rat hearts [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 101(3): 245-249.
- [8] 高元峰, 陈 虎, 王银辉, 等. 丹酚酸 B 对大鼠心肌缺血保护作用及其机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2771-2772.
- [9] 邸 学, 谷丽艳, 王海波, 等. HPLC 同时测定桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15): 92-95.
- [10] 曾慧婷, 沙秀秀, 宿树兰, 等. 不同产地丹参茎叶 UPLC 指纹图谱与化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 767-772.
- [11] 沙秀秀, 戴新新, 宿树兰, 等. 丹参茎叶药材的质量标准研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1094-1100.
- [12] 曾慧婷, 宿树兰, 朱 悦, 等. 丹参酚酸类成分生物合成途径及调控机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3324-3331.
- [13] 王雨华, 周学谦, 李德坤, 等. 丹参多酚酸类分析方法及制备工艺的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(7): 1013-1018.
- [14] 李雪丽, 刘建勋, 李 澎, 等. 迷迭香酸对心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1897-1901.
- [15] 金 越, 吕 勇, 韩国柱, 等. 槲皮素及异槲皮素、芦丁抗自由基活性的比较研究 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 408-412.
- [16] 李 耿, 于长安, 李振坤, 等. 丹参煎煮化学成分溶出规律研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 46-50.
- [17] 张 军, 王凤云, 詹丽玲, 等. 丹参药材提取液中丹酚酸 B 稳定性影响因素的考察 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 789-790.
- [18] 朱 静, 陈慧清, 白 鹏, 等. 丹酚酸 B 水溶液分解反应的动力学研究 [J]. 中成药, 2009, 31(4): 541-544.