

不同纯化方法对丹参水提取液中丹酚酸 B 的含量影响

王萍¹ 王宇鹤² 贺新怀¹ 辛爱洁¹ 刘亚倩¹

(1 陕西国际商贸学院, 咸阳, 712046; 2 西藏民族大学, 咸阳, 712082)

摘要 目的:考察不同纯化方法对丹参水提取液中丹酚酸 B 含量的影响,以优选出丹参水提取液的最佳纯化方法。方法:以丹酚酸 B 含量和浸膏得率为考察指标,对乙醇沉淀法、高速离心法和大孔树脂吸附法 3 种纯化方法进行了比较。结果:大孔树脂吸附法处理后所得到的丹酚酸 B 的含量最高,浸膏得率最低;乙醇沉淀法处理后丹酚酸 B 的含量最低,浸膏得率居中;高速离心法处理后丹酚酸 B 的含量居中,但浸膏得率最高。结论:大孔树脂吸附法为丹参水提取液的最佳纯化方法。

关键词 丹参;丹酚酸 B;乙醇沉淀法;高速离心法;大孔树脂吸附法

Effects of Different Purification Methods on Content of Salvianolic Acid B in Water Extract from Salvia Miltiorrhiza Bge

Wang Ping¹, Wang Yuhe², He Xinhui¹, Xin Aijie¹, Liu Yaqian¹

(1 Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China;

2 Tibet University for Nationalities, Xianyang 712082, China)

Abstract Objective: To explore the best purification method by observing effects of different purification ways on the extractive rate of salvianolic acid B in Salvia Miltiorrhiza Bge water-extraction. **Methods:** Salvianolic acid B content and dry extract yield rate were used as indexes for assessing the best purification method among ethanol precipitation, high speed centrifugation and macroporous resin absorption. **Results:** Among all three methods, salvianolic acid B content by macroporous absorption resin was the highest, with dry extract yield rate being the lowest; salvianolic acid B content by ethanol precipitation was the lowest, with dry extract yield rate being the medium level; and salvianolic acid B content by high speed centrifugation was at the medium level, with dry extract yield rate being the highest. **Conclusion:** Water extraction of Salvia miltiorrhiza Bge by macroporous absorption resin is considered as the best purification method.

Key Words Salvia Miltiorrhiza Bge; Salvianolic Acid B; Ethanol precipitation; High speed centrifugation; Macroporous absorption resin

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.06.039

丹参为唇形科植物鼠尾草属植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根及根茎,味苦、性微寒,具有祛瘀止痛、活血调经、清心除烦之效^[1],为临床上治疗“血瘀”症的常用药物。丹参水提液中有有效成分主要是酚酸类物质,包括丹酚酸 A、B、C 以及原儿茶醛等,其中丹酚酸 B 是丹参水溶性代表成分之一,且其含量最高^[2-5],故其含量的高低直接影响着丹参水提液质量的好坏,从而影响着丹参制剂的质量。本文以丹参水提液中丹酚酸 B 含量和浸膏得率为指标,比较了乙醇沉淀法、高速离心法和大孔树脂吸附法三种方法对水提液中丹酚酸 B 成分的纯化效果,为丹参水提液的纯化工艺提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 Alliance e2695 型高效液相色谱仪(美国 waters 公司,Empower 色谱工作站);电子天平(MSA125P-1CE-DU,德国赛多利斯);高速台式离心机(TGL-10C,上海安亭);旋转蒸发器(RE-52AA,上海亚荣生化仪器厂);真空干燥箱(DZF-6050,常州市衡正电子仪器有限公司)。

1.2 试剂 丹参药材(购自陕西康胜堂药业有限公司,批号:094Q140301);丹酚酸 B 对照品(购自中国食品药品检定研究院,批号:111562-201212);AB-8 大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯

基金项目:陕西省中医药管理局科研项目(编号:13-zy024);陕西省教育厅科研项目(编号:14JK2017)

作者简介:王萍(1977.12—),女,硕士研究生,讲师,主要研究方向:中药药物制剂研究,E-mail:964908494@qq.com

通信作者:刘亚倩(1984.12—),女,硕士研究生,实验师,主要研究方向:药剂学,E-mail:492860562@qq.com

(购自南京化学试剂股份有限公司)。

2 方法

2.1 提取与纯化

2.1.1 提取工艺 取丹参 700 g,加水浸泡 30 min,煎煮 2 次,第 1 次 1.5 h,第 2 次 1 h,滤过,合并滤液,浓缩至每毫升含 1 g 原生药的药液,备用。

2.1.2 纯化工艺 为了保证实验数据的准确性,每个试验方法平行制备 4 份样品溶液。

2.1.2.1 乙醇沉淀法 取水提液 200 mL,平均分成 4 份,每份 50 mL,加乙醇至药液醇浓度为 65%,静置,冷藏过夜,抽滤,回收乙醇并真空干燥成干浸膏,粉碎后备用。

2.1.2.2 高速离心法 取水提液 200 mL,平均分成 4 份,每份 50 mL,置高速离心机中,10000 r/min 离心 15 min,滤过,滤液浓缩并真空干燥成干浸膏,粉碎后备用。

2.1.2.3 大孔树脂吸附法 取水提液 200 mL,平均分成 4 份,每份 50 mL,加 1% 盐酸溶液调 pH 值至 3,静置,离心,取离心液上树脂柱(生药量:树脂量 = 2:1)。待药液流完后,加入 1 倍生药量超纯水冲洗树脂柱,待超纯水流净后,用 4 倍量 60% 乙醇,以 1BV/h 流速进行洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,浓缩并真空干燥成干浸膏,粉碎后备用。

2.2 丹酚酸 B 的含量测定

2.2.1 色谱条件 根据 2010 版《中华人民共和国药典》及有关文献^[6-9] 确定丹酚酸 B 含量测定的色谱条件:色谱柱为 SinoChrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 286 nm,柱温为室温,进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹酚酸 B 对照品 4.0 mg,加适量 75% 甲醇溶解并定容至 25 mL 容量瓶中,摇匀,作为对照品溶液(0.16 mg/mL)。

2.2.3 供试品溶液的制备 本品粉末(过三号筛)约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 50 mL,称定重量,加热回流 1 h,放冷,再称定重量,用 75% 甲醇补足减失的重量,摇匀,微孔滤膜(0.2 μm)滤过,取续滤液,即得。各色谱图见图 1。

2.2.4 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液 2 μL、6 μL、10 μL、14 μL、18 μL、20 μL 进样,记录色谱图,测定峰面积。以进样量为横坐标,以峰面积的积分值为纵坐标绘制标准曲线并计算回归方程。结果丹酚酸 B 在 0.32 ~ 3.2 (μg) 范围内线性关系良好,回归方程为 $Y = 844519X - 28250$, $R^2 = 0.9999$ (n

= 6)。

2.2.5 精密度试验 精密吸取丹酚酸 B 对照品溶液 10 μL,连续重复进样 6 次,测定丹酚酸 B 的峰面积值,结果 RSD 为 0.34%,说明仪器的精密性良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取对照品溶液于 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 各进样 10 μL,对照品溶液中丹酚酸 B 的峰面积值的 RSD 为 0.65%,表明在 10 h 内对照品溶液稳定。

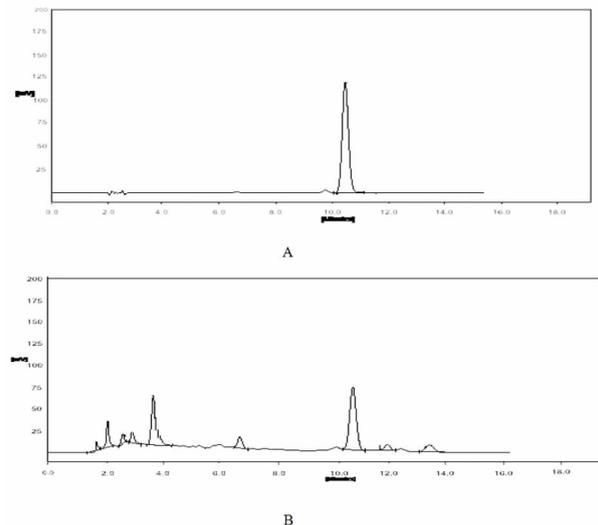


图 1 丹参对照品、样品 HPLC 色谱图

注:A. 对照品溶液,B. 样品。

2.2.7 加样回收率试验 称取浸膏细粉(过三号筛)共 6 份,每份约 0.1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入一定量已知浓度的丹酚酸 B 对照品溶液,按照 2.3.3 方法制备供试品溶液,照上述高效液相色谱条件测定。见表 1。

表 1 丹酚酸 B 加样回收率

序号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	8.1526	6.7275	14.7862	98.60		
2	8.2187	6.7275	14.9763	100.45		
3	8.5243	8.28	16.6991	98.73	100.30	1.13
4	8.3509	8.28	16.7081	100.93		
5	8.4582	10.35	18.9764	101.62		
6	8.3178	10.35	18.8198	101.47		

2.2.8 样品的测定 精密吸取各供试品溶液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加 75% 甲醇溶液至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.2 μm)滤过,取续滤液 10 μL 进样,测定丹酚酸 B 含量。

2.3 浸膏得率的测定 精密吸取提取液 20 mL,置干燥值恒重的蒸发皿中,蒸干,于 105 °C 干燥 3 h,取出,置干燥器中冷却 30 min,迅速称定重量,计算浸膏得率。结果见表 2。计算公式如下:(W_1 为浸膏

重量, V 为样品溶液的体积, W_2 为药材重量)。

$$\text{浸膏得率} = \frac{W_1 \times V}{20 \times W_2} \times 100\%$$

3 结果

对丹参水提液不同纯化方法处理所得丹酚酸 B 含量和浸膏得率进行了测定。见表 2。

表 2 不同纯化方法的丹酚酸 B 含量和浸膏得率 ($\bar{x} \pm s$)

方法	丹酚酸 B 含量 (mg/g)	浸膏得率%
乙醇沉淀法(1)	16.57 ± 0.79	18.70 ± 0.49
高速离心法(2)	17.52 ± 0.52	20.84 ± 0.31
大孔树脂吸附法(3)	28.02 ± 1.43	4.48 ± 0.22

由表 2 可知大孔树脂吸附法处理后所得到的丹酚酸 B 的含量最高, 浸膏得率最低; 乙醇沉淀法处理后丹酚酸 B 的含量最低, 浸膏得率居中; 高速离心法处理后丹酚酸 B 的含量居中, 但浸膏得率最高。对以上 3 组丹酚酸 B 含量数据进行方差分析, 用以说明各组之间是否有统计学意义。见表 3。

表 3 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方差	F	P
水平间	323.46	3	107.82	97.83	<0.01
水平内	8.82	8	1.10		
总和	332.28	11			

注: $F_{(3,8)} 0.05 = 4.07$, $F_{(3,8)} 0.01 = 7.59$ 。

从方差分析的结果可知, 3 种纯化方法丹酚酸 B 含量的差异有统计学意义, 但表 3 尚未表明 3 种纯化方法两两方法之间的差异是否有统计学意义, 因此, 我们采取两两间多重比较 (q 检验法) 对丹酚酸 B 含量测定结果进行了统计学处理。见表 4。

表 4 三种纯化方法两两比较表

对比各组	2 组均数差	组数 a	q 值	q 界值 $q_{0.05}$	P
1 与 2	0.95	2	1.81	3.11	>0.05
2 与 3	10.50	2	20.00	3.11	<0.05
1 与 3	11.45	3	21.81	3.82	<0.05

由表 4 可知, 水提醇沉法与高速离心法的差异无统计学意义, 高速离心法与大孔树脂吸附法差异有统计学意义, 水提醇沉法与大孔树脂吸附法差异有统计学意义, 其中以大孔树脂吸附法纯化丹参水提液所得到的丹酚酸 B 含量最高, 与其他方法差异有统计学意义。

4 讨论

中药水提液中往往所含的化学成分较多, 采用单一指标对中药制剂的制备工艺与质量进行评价具有较大的局限, 故本次实验中采用双指标进行考察, 确保优选的纯化工艺条件的合理性。

在实验过程中, 我们查阅文献, 发现在近 5 年的文献资料中采用高速离心法对丹酚酸 B 进行纯化工艺的文献报道较少, 选择大孔树脂吸附法对丹酚酸 B 进行纯化工艺的文献报道较多, 故而在纯化方法选择时, 将传统的乙醇沉淀法、高速离心法和大孔树脂吸附法作为本次实验纯化方法, 并对结合参考文献^[10-14], 对乙醇沉淀法和高速离心法采用正交试验确定了各自工艺的最佳参数, 同时次对大孔树脂吸附法进行考察, 筛选了纯化丹酚酸 B 的大孔吸附树脂, 优选了大孔吸附树脂纯化丹酚酸 B 的工艺条件, 确定该法的工艺参数。

乙醇沉淀法虽为水提液中常用的纯化方法之一, 醇沉后有效成分含量最低, 可能是醇沉时选用的醇沉浓度较高, 造成溶液的极性变小, 有效成分的溶解度变小而沉淀, 影响丹参的药效; 高速离心法对丹参水提液的处理操作较为简单, 有效成分的损失也不大, 但浸膏得率最高, 可能是因为离心机的转速不够, 没有将水提取液中的大分子杂质去除完全; 大孔树脂吸附法虽操作过于麻烦, 工艺复杂, 但有效成分保留率较高, 且出膏率大幅度降低, 为降低服用量的较好方法。

丹参是常用活血化瘀中药之一, 水溶性成分主要为酚酸类成分, 本次实验仅仅是通过对比实验, 考察了纯化方法对丹酚酸 B 含量的影响, 而对丹参水溶性其余成分含量变化的影响还需进一步研究。

参考文献

- [1] 肖禾, 宋民宪, 赖娟. 国家药品标准中丹参的质量控制情况[J]. 中国药事, 2006, 20(1): 57-59.
- [2] 李巧玉, 刘杨, 包华音, 等. 近 5 年丹参化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2014, 16(2): 145-146.
- [3] 唐旭利, 刘静, 李国强, 等. 丹参药材水溶性成分 HPLC 化学指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(3): 313-317.
- [4] 杨小孟. 中药丹参化学成分和临床应用的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(9): 54-55.
- [5] 唐娜, 杭太俊, 叶正良, 等. 丹参提取物中酚酸类成分稳定性及讲解动力学研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1631-1633.
- [6] 戴支凯, 黄大林, 石京山, 等. 丹参酮 II A 诱导人鼻咽癌 CNE 细胞凋亡[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2129.
- [7] 陈妹, 张静, 吴艳峰, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠的临床应用研究进展[J]. 中国医药, 2012, 7(2): 253-245.
- [8] 厉娜, 胡荣, 张小梅, 等. HPLC 法测定丹参提取物中丹酚酸 B 的含量[J]. 重庆中草药研究, 2012(2): 3-5.
- [9] HPLC 法测定痛经停膏中丹酚酸 B 的含量[J]. 药学研究, 2014, 33(12): 689-690.

(下接第 1087 页)

2.8 加样回收率试验 精密量取已知含量(0.1430 mg/mL)的炒酸枣仁样品溶液 0.9 mL,加入 0.1 mL 对照品溶液(1 mg/mL),摇匀,进样 10 μ L 进行测定,平行测定 6 份。计算平均回收率,结果平均回收率为 99.74%, $RSD = 1.46\%$ 。见表 5。

表 5 斯皮诺素加样回收率

编号	样品量 (mg)	加入标准品量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.1258	0.1	0.2241	98.31	99.74	1.46
2	0.1258	0.1	0.2251	100.40		
3	0.1258	0.1	0.2211	95.31		
4	0.1258	0.1	0.2257	99.94		
5	0.1258	0.1	0.2296	103.80		
6	0.1258	0.1	0.2265	100.67		

2.9 样品含量测定 样品按上述供试品溶液的制备方法制备样品溶液,精密吸取样品溶液 10 μ L,依照上述色谱条件进行测定。见表 6。

表 6 样品斯皮诺素含量测定结果

样品	峰面积	含量(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	32.02	0.075		
2	31.98	0.074	0.075	0.14
3	32.60	0.076		

3 讨论

本实验以斯皮诺素为标准品,用 HPLC 法测定了福州特色饮片蜜炙酸枣仁中该成分的含量,实验结果显示,该方法准确、重现性好,可为蜜炙酸枣仁的炮制工艺研究及质量控制提供检测标准。

目前,蜜枣仁生产多依赖传统经验,缺乏客观化、数字化、可推广的工艺参数。如此条件下,很难保证饮片质量,进而会影响临床疗效。因此,斯皮诺素含量可作为质控指标,开展蜜枣仁炮制工艺规范化和质量标准研究。

实验过程中,尝试分析生枣仁中斯皮诺素的含

量,发现酸枣仁蜜炙后斯皮诺素含量稍有升高,可能与炮制过程辅料和加热有关,尤其是加热可在一定程度上促进药效成分的溶出。如需进一步研究酸枣仁蜜炙过程中的变化,需结合多个化学成分指标和药效学分析进行深入研究。

参考文献

- [1]王茜,张艳强,杨艳婷,等.酸枣仁的化学成分及应用研究进展[J].黑龙江中医药,2015,28(2):259-261.
- [2]曾碧映,李嘉滢,李新才,等.中药酸枣仁研究现状[J].湖南中医药大学学报,2012,32(12):74-75.
- [3]福建省卫生厅.福建省中药炮制规范[S].福州:福建科学技术出版社,1988:498.
- [4]王金泉,梁贞杰.3种酸枣仁的炮制体会[J].海峡药学,2008,20(9):72-73.
- [5]国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2015:366-367.
- [6]娄燕,贾英,何博赛,等.RP-I-PLC 双波长法同时测定酸枣仁汤中 5 种成分的含量[J].沈阳药科大学学报,2013,30(7):537-540.
- [7]常广璐,李国辉,李天祥,等.天津产与市售野生酸枣仁的质量比较研究[J].中草药,2015,11(5):751-755.
- [8]崔思娇,罗洁,马天成,等.酸枣仁的超高效液相色谱指纹图谱[J].中国药学杂志,2013,48(7):509-511.
- [9]杨军宣,张毅,蒲晓东,等.超临界-CO₂萃取酸枣仁皂苷类成分的研究[J].中成药,2015,37(4):899-902.
- [10]林海成,祝洪艳,张连学,等.正交试验优选酸枣仁总皂苷提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(5):42-45.
- [11]毕福钧,林彤,江英桥,等.酸枣仁提取物定性定量分析方法的研究[J].中药新药与临床药理,2015,26(3):365-369.
- [12]王勇,魏娜,徐爽,等.多指标正交试验法优选酸枣仁药材水提取工艺[J].海南医学院学报,2011,17(11):1452-1456.
- [13]路娟,王维宁,赵娟,等.灰关联度法评价中药酸枣仁的质量[J].沈阳药科大学学报,2011,28(7):549-555.
- [14]毕福钧,林彤,江英桥.酸枣仁提取物定性定量分析方法的研究[J].中药新药与临床药理,2015,26(3):365-369.

(2015-10-20 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 1084 页)

- [10]袁佳,李页瑞,陈勇,等.多指标正交设计优选丹参水提液醇沉工艺[J].中国医药工业杂志,2010,41(11):826-829.
- [11]玄律,倪健.多指标优选醒目颗粒水提醇沉制备工艺[J].中成药,2010,32(7):1238-1240.
- [12]蒲维维,杨万政,王捷.高速离心法对清喉颗粒除杂效果的研究[J].内蒙古石油化工,2011,37(23):3-5.

- [13]常桂娟,白雪媛,孙立霞,等.参精口服液的澄清工艺考察[J].中华中医药杂志,2014,29(9):2792-2796.
- [14]周琳,吴清,刘晓帆.大孔树脂富集丹参水溶性有效成分的工艺研究[J].北京中医药大学学报,2011,34(4):266-270.
- [15]张翠英,章洪,王阶.大孔吸附树脂脂化丹酚酸 B 的工艺研究[J].安徽农业科学,2014,42(23):7752-7753,7768.

(2015-10-11 收稿 责任编辑:张文婷)