

丹酚酸 A 的分离纯化工艺及其抗氧化活性的研究

张 愉, 季 梅, 孙隆儒*

山东大学药学院, 济南 250012

摘要: 研究优化聚酰胺树脂分离纯化白花丹参丹酚酸 A 的最佳工艺, 并测试其提取物的抗氧化活性。以吸附量和解吸量为指标, 利用静态吸附和动态吸附的方法, 确定丹酚酸 A 的最佳分离纯化条件。结果表明聚酰胺树脂的最佳纯化工艺条件为: 上样液丹酚酸 A 质量浓度为 11 g/L, 上样液体积流量为 1.0 mL/min, 上样量为 150 mL, 洗脱溶剂为 50% 乙醇, 洗脱体积流量为 1.0 mL/min, 洗脱体积为 10 BV, 纯化后丹酚酸 A 量可达 40.36%。通过清除 DPPH 自由基和还原能力测定初步评判该工艺下的提取物的抗氧化活性, 结果表明, 该提取物具有良好的抗氧化活性。

关键词: 白花丹参; 丹酚酸 A; 聚酰胺树脂; 工艺优化; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.025

Separation, Purification and Antioxidant Activity of Salvianolic Acid A from *Salvia miltiorrhiza* var. *alba*

ZHANG Yu, Ji Mei, SUN Long-ru*

School of Pharmaceutical Science, Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract: To optimize the separation and purification technology of salvianolic acid A from *Salvia miltiorrhiza* var. *alba* with polyamide resin. The antioxidant activity of the purified salvianolic acid A were studied *in vitro*. With adsorption capacity and desorption rate as index, static and dynamic adsorption-desorption were used to determine the optimal separation and purification conditions of salvianolic acid A. The optimal conditions of polyamide resin were as follows: sample injection concentration was 11 g/L, sample flow rate was 1.0 mL/min, quantity of adsorption was 150 mL, desorption rate was 1.0 mL/min, and elution volume was 10 BV of 50% ethanol. After the purification, the purity of obtained salvianolic acid A was 40.36%. Moreover, the antioxidant activity of the extract were evaluated by DPPH scavenging assay and reducing power. The results showed that the obtained salvianolic acid A had good antioxidant activity.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* var. *alba*; salvianolic acid A; polyamide resin; optimal process; antioxidant activity

白花丹参 (*Salvia miltiorrhiza* var. *alba* Wu and Li, mss.) 为唇形科植物丹参 (*S. miltiorrhiza* Bunge) 的白花变型, 主要分布在山东境内。其根和根茎中主要含有丹参酮类和酚酸类成分, 其中酚酸类成分主要有丹酚酸 B、丹酚酸 A、迷迭香酸、紫草酸、丹参素等^[1]。药理研究发现, 丹酚酸 A 具有抗氧化^[2]、心肌缺血保护^[3]、抗血栓^[4,5]、抗肝纤维化^[6]、抗肿瘤^[7]、防治糖尿病及并发症^[8] 等广泛的药理活性, 且丹酚酸 A 的生物活性优于丹酚酸 B^[9-11], 具有很好的应用前景。但是在白花丹参原药材中, 丹酚酸 A 的含量非常低, 丹酚酸 B 的含量很高。本课题组

前期研究了丹酚酸 B 在植物组织中转化为丹酚酸 A 的工艺, 获得了丹酚酸 A 高含量的白花丹参药材^[12], 并对丹酚酸 A 的提取工艺进行了研究。本实验主要对该处理后白花丹参药材的粗提物利用聚酰胺树脂柱色谱分离纯化工艺进行研究, 以便获得纯度较高的丹酚酸 A, 并对得到的丹酚酸 A 提取物进行抗氧化活性的研究, 为丹酚酸 A 的进一步开发利用奠定实验基础。

1 仪器与材料

Agilent 1260 HPLC, 包括: G1311C 高压输液泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1314B 紫外检测器; 美国安捷伦; 超声仪: KO-250B, 昆山市超声仪器有限公司; pH 计: 梅特勒 FE20K, FiveEasy pH 主机, LE438 电极; 粉碎机: GF-150, 中南制药机械

收稿日期: 2016-09-21 接受日期: 2016-11-30

基金项目: 国家自然科学基金 (81274031); 山东省科技发展计划 (2014GSF119026)

* 通信作者 Tel: 86-531-88382012; E-mail: sunlr@sdu.edu.cn

厂;高温高压灭菌锅:LDZX-50KB,上海申安;冻干机:ALPHA1-4 LSC,德国 Christ;旋转蒸发仪:EYELA,上海爱朗仪器有限公司;恒温摇床:I26R, New Brunswick Scientific;电子天平:梅特勒托利多;UV-2550 紫外可见分光光度计:日本岛津公司。实验所用药材白花丹参根和根茎采自于山东省章丘市;聚酰胺树脂(60~100目):上海摩速科学器材有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼):西亚试剂;维生素 C(抗坏血酸):国药集团化学试剂有限公司;去离子水:Milli-Q 超纯水净化系统;甲醇、乙腈(色谱纯);磷酸:德国默克;95%乙醇。

2 实验方法

2.1 丹酚酸 A 的测定方法

2.1.1 色谱条件

采用高效液相色谱法(HPLC)测定丹酚酸 A 的含量。色谱柱:Agilent TC-C₁₈(4.6×250 mm,5 μm);流速:1.00 mL/min;检测波长:286 nm;柱温:25℃;流动相 A:0.05%的磷酸水溶液;流动相 B:乙腈;梯度洗脱条件:0~15 min,90%~80% A;15~35 min,80%~75% A;35~45 min,75%~70% A;45~55 min,70%~10% A;55~70 min,10% A。

2.1.2 标准品溶液制备

精密称取丹酚酸 A 对照品适量于 2 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解定容至刻度,摇匀,经 0.22 μm 滤膜过滤,得 0.513 mg/mL 对照品溶液,避光保存。

2.1.3 标准曲线建立

分别精密吸取丹酚酸 A 对照品溶液 2、4、6、8、10、14 μL 注入高效液相色谱仪,按照“2.1.1”项下的色谱条件进行测定,以丹酚酸 A 的峰面积积分值(Y)对进样量(X)进行线性回归,得回归方程 $y = 1009.7x - 15.931$, $R^2 = 0.9999$ 。结果表明丹酚酸 A 在 1.026~7.182 μg 范围内具有良好的线性关系。

2.2 样品溶液的制备

取白花丹参药材粉末 500 g,采用本课题组报道处理方法^[12],用 1000 mL pH = 1 的盐酸水溶液浸湿均匀,置于高温高压灭菌器内,在 120℃下加热 6 h,取出,低温放置,作为提取丹酚酸 A 的原料药,加入 12 倍量 75%乙醇 30℃条件下超声提取 3 次,每次 40 min,合并滤液,减压浓缩,得丹参浸膏,加入 1000 mL 水混匀,再加入等体积的二氯甲烷萃取脱脂,萃取 6 次至二氯甲烷层呈淡红色,弃去二氯甲烷层,水层用盐酸调 pH = 1,再加入等体积的乙酸乙酯

萃取,萃取 6 次至乙酸乙酯层显淡黄色,合并乙酸乙酯层,减压浓缩,冷冻干燥,得含丹酚酸 A 的样品粉末,按照“2.1.1”的色谱条件进行 HPLC 测定,根据标准曲线得样品中丹酚酸 A 的含量 4.08% (40.763 mg/g),实验前以 10%乙醇溶解,配成相应浓度的丹酚酸 A 样品溶液(新配制)。

2.3 聚酰胺树脂静态吸附考察

2.3.1 静态吸附考察

取 3.200 g 样品粉末加入 320 mL 10%乙醇水溶液溶解配成 10 g/L 的样品溶液,加入聚酰胺树脂 1.0 g,置于恒温摇床(25℃,120 rpm)上恒温恒速振摇 4 h,取出过滤,10%乙醇洗涤至滤液遇三氯化铁溶液显阴性反应,合并滤液,按照“2.1.1”项下的色谱条件进行测定丹酚酸 A 的含量,计算丹酚酸 A 的静态吸附量。

2.3.2 静态解吸考察

将上述过滤后的吸附饱和的聚酰胺树脂加入等量 320 mL 95%乙醇置于恒温摇床(25℃,120 rpm)上恒温恒速振摇 4 h,取出过滤,95%乙醇洗涤至滤液与三氯化铁溶液呈阴性反应,合并滤液,按照“2.1.1”项下的色谱条件进行测定丹酚酸 A 的含量,计算丹酚酸 A 的解吸率。

解吸率 = (解吸液丹酚酸 A 浓度 × 解吸液总体积) / 饱和吸附丹酚酸 A 总量 × 100%

饱和吸附丹酚酸 A 总量 = 初始丹酚酸 A 浓度 × 上样液体积 - 吸附后丹酚酸 A 浓度 × 流出液体积

2.4 聚酰胺树脂动态吸附考察

2.4.1 动态吸附考察

取 2.800 g 样品粉末加入 400 mL 10%乙醇水溶液,配成 7 g/L 的样品溶液,聚酰胺树脂 1.0 g,装柱,将配制好的样品溶液上样,收集流出液,上样完成后用 10%的乙醇水溶液洗脱,至流出液遇三氯化铁溶液呈阴性反应,合并流出液,按照“2.1.1”项下的色谱条件进行测定丹酚酸 A 含量,计算丹酚酸 A 的动态吸附量。

2.4.2 动态解吸考察

已达饱和吸附的聚酰胺树脂柱再用 95%的乙醇水洗脱,至流出液遇三氯化铁溶液呈阴性反应,测定 95%乙醇洗脱液中丹酚酸 A 的含量,计算丹酚酸 A 的解吸率。

2.5 最佳上样质量浓度考察

精密称取处理好的聚酰胺树脂 1.0 g,5 份,装柱,其保留体积(BV)为 6 mL。将质量浓度为 8、9、

10、11、12 g/L 的丹酚酸 A 样品溶液各 350 mL 分别上柱(径高比 1:4),以相同流量 1.0 mL/min 通过树脂柱,完全吸附后,先用 10% 乙醇洗脱,至流出液遇三氯化铁溶液呈阴性反应,HPLC 测定各流出液中丹酚酸 A 的含量。已达饱和吸附的聚酰胺树脂柱再用 95% 乙醇洗脱,至洗脱液遇三氯化铁溶液反应为阴性,HPLC 测定各洗脱液中丹酚酸 A 的含量。计算各个质量浓度的丹酚酸 A 的吸附量、解吸率以及洗脱下来的丹酚酸 A 的纯度,确定最佳上样液质量浓度。

2.6 泄漏曲线(最佳上样量)考察

精密称取处理好的聚酰胺树脂 1.0 g 装柱,其保留体积(BV)为 6 mL,取已确定最佳上样质量浓度的样品溶液上样,流速 1.0 mL/min,分段收集流出液,每 6 mL 收集一份,HPLC 跟踪检测,以收集的流出液份数为横坐标,丹酚酸 A 峰面积值为纵坐标,绘制泄漏曲线。

2.7 洗脱溶剂浓度的考察

精密称取处理好的聚酰胺树脂 1.0 g,装柱(BV 为 6 mL),取已确定最佳上样质量浓度的样品液上样,上样量为已确定的最佳上样量,吸附完全后,先用 10% 乙醇洗脱 100 mL 至流出液与三氯化铁溶液呈阴性反应,再依次用 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 乙醇各洗脱 4 BV(24 mL),测定各乙醇浓度洗脱液中丹酚酸 A 的量,以乙醇浓度为横坐标,丹酚酸 A 的峰面积值为纵坐标,绘制洗脱曲线。

2.8 验证实验

采用聚酰胺树脂对丹酚酸 A 的样品溶液按照上述最优条件进行纯化,测定丹酚酸 A 的含量。

2.9 丹酚酸 A 纯化后的抗氧化活性研究

2.9.1 清除 DPPH 自由基活性的测定方法^[13]

取适量 DPPH 粉末以 95% 乙醇为溶剂,配制成浓度为 0.05 mg/mL 的溶液,纯化后的样品粉末以 95% 乙醇作为溶剂,配制成浓度为 0.5、1、3、5、10、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液,取样品溶液各 2 mL 分别加入 2 mL 的 DPPH 溶液,摇匀后,室温放置 30 min 后,用紫外分光光度计于 517 nm 处测定其吸光度值(A_x);取 2 mL DPPH 溶液加入 2 mL 95% 乙醇,测其吸光度值(A_0);各取 2 mL 样品溶液分别加入 2 mL 95% 乙醇,测其吸光度值(A_s)。每份样品平行测定 3 次,取平均值。以维生素 C 作为阳性对照,按

照下列公式计算样品溶液对 DPPH 自由基的清除率(K):

$$\text{清除率}(K) = [1 - (A_x - A_s) / A_0] \times 100\%$$

2.9.2 还原能力的测定^[14]

取适量样品粉末,加入适量甲醇配成浓度分别为 0.025、0.05、0.15、0.20、0.25 mg/mL 的样品溶液。分别取 1 mL 样品溶液,各加入 2.5 mL 磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L, pH = 6.6)和 2.5 mL 铁氰化钾溶液 [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (质量分数为 1%),于 50 $^\circ\text{C}$ 水浴中保温 20 min 后,再加入 2.5 mL 三氯乙酸溶液(质量分数为 10%),混合后 4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min (3000 rpm),取上清液 2.5 mL,加入 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL 的三氯化铁溶液(质量分数为 0.1%),充分混合后,静置 10 min,于 700 nm 波长处分别测定其吸光度值(以蒸馏水作参比溶液),阳性对照为维生素 C,吸光度值越高还原力越高。

3 实验结果

3.1 聚酰胺树脂静态吸附考察

3.1.1 静态吸附考察

测得丹酚酸 A 的量为 19.896 mg,计算得 1.0 g 聚酰胺树脂对丹酚酸 A 的静态吸附量为 110.545 mg。

3.1.2 静态解吸考察

测得丹酚酸 A 的量为 101.859 mg,纯度为 36.04%,计算丹酚酸 A 的解吸率为 92.14%。

3.2 聚酰胺树脂动态吸附考察

3.2.1 动态吸附考察

测得丹酚酸 A 的含量为 17.530 mg,计算得 1.0 g 聚酰胺树脂柱对丹酚酸 A 的动态吸附量为 96.606 mg。

3.2.2 动态解吸考察

测得丹酚酸 A 的含量为 87.846 mg,纯度为 39.05%,计算丹酚酸 A 的解吸率为 90.93%。

3.3 最佳上样质量浓度考察

测得丹酚酸 A 的吸附量分别为 92.107、94.998、105.888、107.037、92.860 mg,解吸率分别为 88.56%、87.93%、88.24%、87.69%、84.11%,洗脱下来的丹酚酸 A 的纯度分别为 38.75%、39.84%、43.61%、44.62%、42.29%,综合分析,确定最佳上样液质量浓度为 11 g/L。

3.4 泄漏曲线(最佳上样量)考察

结果如图 1 所示,当流出液收集到第 15 BV 时,

丹酚酸 A 开始泄露,当收集到第 25 BV 时,流出液丹酚酸 A 峰面积值基本达到峰值,不再改变,因此最佳上样量为 150 mL。

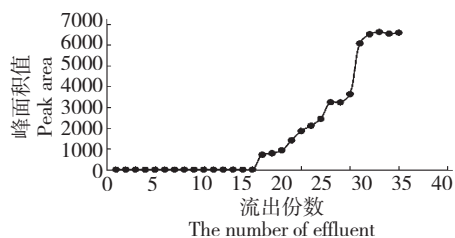


图 1 丹酚酸 A 的泄漏曲线

Fig. 1 Leakage curve of salvianolic acid A

3.5 洗脱溶剂浓度的考察

结果如图 2 所示,由图 2 可知,20% 乙醇没有丹酚酸 A 洗脱下来,40% 乙醇洗脱的丹酚酸 A 最多,50% 乙醇也含有较多的丹酚酸 A,60% 乙醇基本洗脱不下丹酚酸 A,为获得丹酚酸 A 洗脱效率和洗脱率都比较高的洗脱条件,故将 40% 乙醇与 50% 乙醇对丹酚酸 A 的洗脱情况进行了比较。

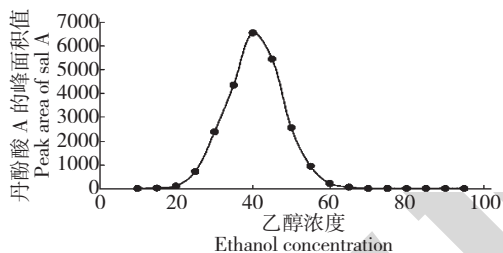


图 2 丹酚酸 A 的梯度洗脱曲线

Fig. 2 Gradient elution curve of salvianolic acid A

精密称取 2 份处理好的聚酰胺树脂 1.0 g,分别装柱(BV 为 6 mL),各取质量浓度为 11 g/L 的样品液 150 mL 上样,吸附完全后,先用 10% 乙醇溶液洗脱 100 mL 至流出液与三氯化铁溶液呈阴性反应,再用 20% 乙醇洗脱 5 BV(即 30 mL),再分别用 40% 乙醇和 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液,每 6 mL 收集液为 1 份,测定其中丹酚酸 A 含量,以丹酚酸 A 的峰面积值为纵坐标,洗脱份数为横坐标,分别绘制洗脱量曲线,如图 3、图 4 分别为 40% 乙醇、50% 乙醇的洗脱曲线。

由图 3、4 可知,40% 乙醇洗脱 16 BV 后,基本洗脱不下来丹酚酸 A;而 50% 乙醇洗脱 10 BV 后,基本洗脱不下来丹酚酸 A,表明 50% 乙醇的洗脱效率比较高。将洗脱物冻干,测定其固形物质量后,再测定其丹酚酸 A 含量,40% 乙醇洗脱物中丹酚酸 A 纯度为 26.51%,洗脱率为 62.35%,而 50% 乙醇洗脱

物中丹酚酸 A 纯度达 40.57%,洗脱率达 84.92%,表明 50% 乙醇的洗脱率比较高,洗脱物中丹酚酸 A 的含量较高。综上所述,50% 乙醇为聚酰胺树脂柱的最佳洗脱溶剂,洗脱量为 10 BV。

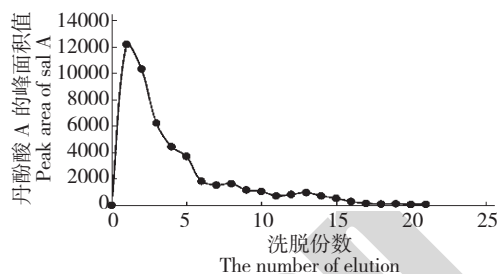


图 3 丹酚酸 A 的 40% 乙醇洗脱考察

Fig. 3 Investigation on 40% ethanol elution of salvianolic acid A

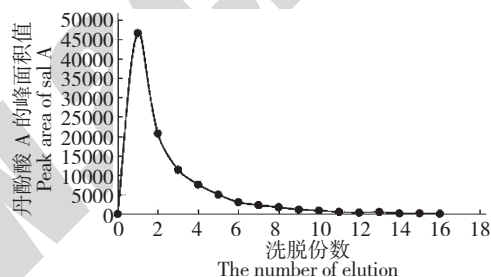


图 4 丹酚酸 A 的 50% 乙醇洗脱考察

Fig. 4 Investigation on 50% ethanol elution of salvianolic acid A

3.6 验证实验

精密称取处理好的聚酰胺树脂 3 份,每份为 1.0 g,分别装柱(BV 为 6 mL),按照各项下优选后的丹酚酸 A 样品质量浓度 11 g/L 的丹参粗品溶液 150 mL 上样,按上述纯化工艺进行 3 次验证试验,10% 乙醇洗脱 100 mL,流出液遇三氯化铁溶液阴性反应,再用 20% 乙醇洗脱 5 个保留体积,再用 50% 乙醇洗脱 10 BV,收集洗脱液,测丹酚酸 A 含量,经纯化后丹酚酸 A 的含量可达 40.36%。

3.7 丹酚酸 A 纯化后的抗氧化活性研究

3.7.1 清除 DPPH 自由基活性测定结果

结果见图 5,由聚酰胺树脂分离纯化的丹酚酸 A 提取物与维生素 C 对 DPPH 自由基都具有较强的清除作用,且随浓度的增大其清除能力也逐渐增强。在样品溶液的浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其清除率达 82.4%,而维生素 C 的清除率为 79.7%,由图可知,样品溶液的 IC_{50} 为 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而维生素 C 的 IC_{50} 为 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可见样品溶液的抗氧化活性稍高于

维生素 C,但是当浓度大于 6.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,维生素 C 的活性要略高于样品。

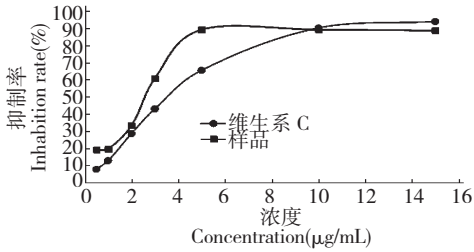


图5 丹酚酸 A 样品的清除 DPPH 自由基作用

Fig. 5 DPPH free radical scavenging activity of salvianolic acid A

3.7.2 还原能力的测定结果

抗氧化剂的抗氧化能力与其还原力有关,还原力越大,抗氧化能力越强。丹酚酸 A 样品的还原能力的测定结果如图 6,由图 6 可以看出,丹酚酸 A 的纯化物与维生素 C 在实验浓度范围内均呈现出良好的量-效关系,即随着浓度的增加,还原能力也逐渐增加,但其作用微弱于维生素 C,当浓度达到 0.25 mg/mL 时,其还原能力与维生素 C 基本相同。

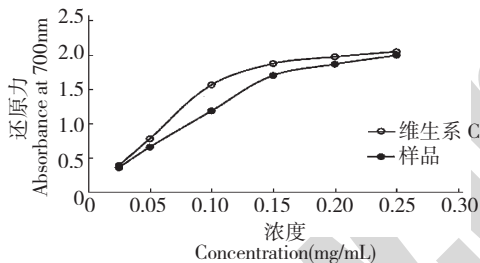


图6 丹酚酸 A 样品和维生素 C 的还原能力测定

Fig. 6 Reducing power of salvianolic acid A and Vc

4 讨论与结论

有文献^[15]报道利用大孔吸附树脂分离纯化丹酚酸 A,其大孔吸附树脂的 40%、60% 乙醇洗脱部分 HPLC 显示均含有丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸等成分,表明大孔吸附树脂在分离纯化丹酚酸 A 时有一定的局限性。因此,本研究采用了聚酰胺树脂纯化分离丹酚酸 A 的方法,利用聚酰胺树脂中酰胺羰基与酚酸类成分的酚羟基形成氢键而吸附的原理,实现酚羟基数目与位置有差异的酚类成分及其与无酚羟基成分的分离纯化。

在实验过程中,发现游离态丹酚酸 A 在水中溶解度较小,含量为 4.08% 丹酚酸 A 提取物在质量浓度为 10 g/L 的水中溶解较差,有沉淀存在;而在质

量浓度为 10 g/L 的 10% 乙醇水溶液中则无沉淀,因此,本研究采用 10% 的乙醇溶解样品以增大样品的溶解度,以利于聚酰胺对样品的吸附。洗脱溶剂的选择,既要保证最大限度的去除杂质,又要减少丹酚酸 A 的损失,所以先用低浓度的乙醇除去吸附性比丹酚酸 A 弱的杂质,再用适当浓度的乙醇洗脱丹酚酸 A,以便获得丹酚酸 A 纯度较高的洗脱物,达到较高的洗脱率。

清除 DPPH 自由基实验和还原能力测定结果表明,该工艺条件下分离纯化的丹酚酸 A 提取物具有较强的抗氧化活性,为进一步丹酚酸 A 的开发奠定了基础。

参考文献

- 1 Wang WT(王维婷),Shan CG(单成钢),Ni DP(倪大鹏), *et al.* Research progress on metabolism and molecular biology of effective components in *Salvia miltorrhiza*. *Chin Med Mat* (中药材),2009,32:1472-1476.
- 2 Bao GH(鲍光宏),Yu DJ(于德洁),Qu JH(屈金河), *et al.* Inhibitory effect of oxygen free radical on the activity of potassium channel in myocardium cell membrane and the effect of salvianolic acid A. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院报),1993,15:320-324.
- 3 Du GH(杜冠华),Qiu Y(裘月),Zhang JT(张均田). Protective effect of salvianolic acid A on ischemia reperfusion induced injury in isolated rat heart. *Acta Pharm Sin* (药理学学报),1995,30:731-736.
- 4 Fan HY,Fu FH,Yang MY, *et al.* Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A. *Thromb Res*,2010,126(1):e17-e22.
- 5 Huang ZS,Zeng CL,Zhu LJ, *et al.* Salvianolic acid A inhibits platelet activation and arterial thrombosis via inhibition of phosphoinositide 3-kinase. *J Thromb Haemost*,2010,8:1383-1393.
- 6 Song YP(宋延平),Kong LS(孔令姗),Wu J(吴静), *et al.* Comparison of the effect of salvianolic acid A and B on acute myocardial ischemia of rats. *Chin J Inform Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志),2007,14(9):36-38.
- 7 Zhang SH(张胜华),Su J(粟俭),Zhen YS(甄永苏). Salvianolic acid A inhibits nucleoside transport and potentiates the antitumor activity of chemotherapeutic drug. *Acta Pharm Sin* (药理学学报),2004,39:496-499.
- 8 Wang SB,Yang XY,Tian S, *et al.* Effect of salvianolic acid A on vascular reactivity of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*,2009,85(13-14):499-504.