

文章编号:1001-6880(2017)8-1396-08

丹参中丹参酮 II A 和丹酚酸 B 的提取与纯化工艺研究

熊加伟,葛松兰,马 磊*

华东理工大学药学院上海市新药设计重点实验室,上海 200237

摘要:建立了同时提取丹参中丹参酮 II A 与丹酚酸 B 两种主要活性成分的方法及丹酚酸 B 的纯化工艺。以丹参酮 II A 与丹酚酸 B 的含量为评价指标,采用正交实验优化提取工艺,所得最优提取工艺为:用 8 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h。丹参酮 II A 的提取率在 90% 以上,丹酚酸 B 的提取率在 80% 以上。提取物浸膏用热水溶解,过滤,滤液浓缩为 1 mL 含约 0.5 g 生药的溶液,取 150 mL 以 2 BV/h 的速度上 D101 大孔树脂柱;然后用 6 BV 的水洗脱,再以 4 BV/h 的流速用 8 BV 的 30% 乙醇洗脱除杂,以 2 BV/h 的流速 10 BV/60% 乙醇富集,得到纯度大于 75% 丹酚酸 B,验证实验表明该工艺稳定可行;最后经过洗涤和甲醇重结晶,得到纯度大于 99% 的丹酚酸 B,总得率为 2.86% (以干燥根茎计算)。

关键词:丹参酮 II A;丹酚酸 B;提取;大孔树脂;纯化**中图分类号:**R284.2**文献标识码:**A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.023

Extraction and Purification of Tanshinone II A and Salvianolic Acid B from *Salvia Miltiorrhiza* Bunge

XIONG Jia-wei, GE Song-lan, MA Lei *

Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, School of Pharmacy, East China

University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: A method for simultaneous extraction of tanshinone II A and salvianolic acid B from the *Salvia miltiorrhiza* Bunge and the purification of salvianolic acid B was developed. The extraction process was optimized by orthogonal design with the content of tanshinone II A and salvianolic acid B as evaluation indexes. The optimal extraction process was as follows: *S. miltiorrhiza* powder was extracted by 8 times of 70% ethanol with at 85 °C (reflux) for three times in 1 h. The extraction rate of tanshinone II A was higher than 90%, and the extraction rate of salvianolic acid B was higher than 80%. The extract was dissolved in hot water and filtered, the filtrate was concentrated to 1 mL of a solution containing about 0.5 g of crude drug with the volume of 100 mL was loaded on the D101 macroporous resin column with the sample flow rate of 2 BV/h, and then column was washed by 6 BV of water, 8 BV of 30% ethanol with the flow rate of 4 BV/h for removing impurities, 10 BV of 60% ethanol with 2 BV/h flow rate for purifying, to obtain more than 75% purity of salvianolic acid B, verification experiments showed that the process was stable and feasible; Finally, after washing and methanol recrystallization, more than 99% purity salvianolic acid B was obtained, the total yield of about 2.86% (based on the dried rhizomes).

Key words:tanshinone II A; salvianolic acid B; extraction; macroporous resin; purification

丹参源于唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根茎,为多年生草本植物,具有祛瘀止痛、活血通经及清心除烦等功效^[1]。丹参酮 II A 是丹参脂溶性成分中的主要成分,研究表明其具有增加冠脉流量,改善心肌功能,降低血小板聚集

功能,临幊上对治疗冠心病,心肌梗死有效,此外还具有保护红细胞不被破坏等多种药理作用^[2,3];丹酚酸 B 是丹参水溶性成分中含量最高、活性最强的化合物,具有抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、抗肝纤维化等多种生理活性^[4,5]。传统对丹参酮 II A 和丹酚酸 B 多分开提取纯化,导致丹参的利用率低,浪费严重。丹参酮 II A 的提取方法主要是乙醇或乙醚回流提取,该法的特点是耗费大量的溶剂,提取速度慢,选择性能差,杂质多,而且使用的有机溶剂有毒,极

收稿日期:2017-03-01 接受日期:2017-04-19

基金项目:上海自然科学基金(15ZR1408800);上海浦江人才计划
(15PJD012)

* 通信作者 Tel:86-21-64253691;E-mail: malei@ecust.edu.cn

易造成污染^[6,7]。丹酚酸 B 的提取主要为水回流提取,得到的水溶性杂质多,不利于后续纯化;且纯化工艺步骤繁琐,操作复杂,成本高,难以满足工业化的大规模生产^[8]。本实验以丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含量作为评价指标,系统全面探索同时提取这两种有效成分的最佳工艺,丹参酮 IIA 的提取率高达 90%以上,丹酚酸 B 的提取率高达 80%以上;并进一步用大孔树脂优选出丹酚酸 B 的最佳纯化工艺,得到纯度大于 99% 的丹酚酸 B,收率高达 2.86%,且该工艺简单稳定,可行性好,便于丹参资源的充分利用,并为工业化大量生产提供借鉴。

1 仪器与材料

Waters 600 型高效液相色谱仪(美国 waters 公司生产);FA₂004 万分之一分析天平(上海精科仪器公司生产);R1010 旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司生产)。

丹参酮 IIA 对照品(中国食品药品检定研究院,纯度≥98%,批号 110766-201520),丹酚酸 B 对照品(中国食品药品检定研究院,纯度≥99%,批号 111562-201615);丹参药材(购至安徽阜阳中药材市场,经华东理工大学药学院马磊副教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根茎),粉碎过 50 目筛备用。AB-8、HP20 和 D101 型大孔树脂(上海劲凯树脂有限公司),硅胶粉(青岛海洋化工厂,200~300 目);乙腈、甲酸为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 含量的测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱 Waters C₁₈ 色谱柱(3.9 mm×150 mm,5 μm);流动相为:乙腈(A)-0.3% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱程序如下:0~10 min,20%~28%(A);10~18 min,28%~35%(A);18~22 min,35%~65%(A);22~30 min,65%(A),流速 1 mL/min,柱温:25 °C,进样量 20 μL,丹参酮 IIA 检测波长为 270 nm,丹酚酸 B 检测波长为 286 nm。

2.1.2 溶液配制

对照品溶液的配制:精密称取丹参酮 IIA 标准品 5 mg,用甲醇溶解,置 25 mL 容量瓶中定容,摇匀,得到 0.2 mg/mL 的丹参酮 IIA 对照品溶液;精密称取丹酚酸 B 标准品 5 mg,用甲醇溶解,置 10 mL

容量瓶定容,摇匀,得到 0.5 mg/mL 的丹酚酸 B 对照品溶液。

供试品溶液的配置:精密称取丹参粉末 0.3 g,置于圆底烧瓶中,精密加入 75% 甲醇 50 mL,称重,85 °C 加热回流 1 h,放冷称重,用 75% 的甲醇补足减少的重量,过滤,取续滤液,用 75% 的甲醇稀释即得。

2.1.3 标准曲线的绘制

精密吸取丹参酮 IIA 对照品溶液 5.0、2.5、2.0、1.5、1.0、0.5 mL,分别置于 10 mL 的容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,得到不同浓度的丹参酮 IIA 对照品溶液;精密吸取丹酚酸 B 对照品溶液 6.0、3.0、2.5、2.0、1.5、1.0 mL,分别置于 10 mL 的容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,得到不同浓度的丹酚酸 B 对照品溶液。分别精密称取 2 种不同浓度的对照品溶液 20 μL,按照“2.1.1”的色谱条件进样测定,以峰面积 Y 为纵坐标,进样量 X 为横坐标,进行线性回归分析。

2.1.4 丹参酮 IIA 与丹酚酸 B 的含量测定

将“2.1.2”中配制的供试品溶液按照“2.1.1”的色谱条件进行分析,仪器通过面积归一法根据色谱峰中丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的峰面积自动给出这两种物质的百分含量。

2 提取工艺研究

2.2.1 温度对丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 提取的影响

考虑到化合物丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的极性以及对温度的敏感性,首先选择 90% 乙醇作为提取溶剂,并设置温度梯度。精密称取丹参粉末 50 g,以 90% 的乙醇为提取溶剂、液固比为 6:1,分别于 50、60、70 和 85 °C(回流)提取 3 次,每次 1 h。提取液合并,旋干,计算不同温度提取得到的浸膏重量,并在“2.1.1”色谱条件下,根据峰面积的百分比,计算丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含量,从而确定最佳的提取温度。

丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含量(mg/g)=对应峰面积的百分比(%)×浸膏重量(g)/丹参原料重量

2.2.2 正交试验进一步优化提取工艺

继续考察乙醇浓度(A)、料液比(B)和提取时间(C)这 3 个因素对提取的影响,提取次数都为 3 次,各因素水平表见表 1。精密称取丹参粉末 50 g,按 L₉(3³)正交表进行试验,以丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含量为指标进行优化,按“2.2.1”下的计算方法,计算这两种成分的含量,从而确定最佳提取工

艺。在此基础上,分别取 50、100 和 1000 g 的丹参粉末,各 3 份,进行提取工艺的验证试验。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and Levels for orthogonal experiments

水平 Levels	因素 Factor		
	A(%)	B	C(h)
1	50%	1:6	0.5
2	70%	1:8	1
3	90%	1:10	1.5

2.3 丹酚酸 B 的分离与纯化

精密称取一定量丹参粉末,按“2.2”得到的最佳工艺提取,得到的浸膏用热水溶解过滤,滤液浓缩为每 1 mL 含生药量约 0.5 g 的药液,作为大孔树脂上样药液备用。

2.3.1 大孔吸附树脂的静态筛选

从丹酚酸 B 的结构分析,用于纯化的树脂应选用非极性的或弱极性的树脂,本实验分别选择药用级的 D101、AB-8 和 HP20 型大孔树脂各 1.0 g 作吸附剂,每种 3 份,各置于带磨口锥形瓶中,精密加入上样药液 10 mL,在室温下振荡 (60 rpm),分别在 15、30 和 45 min 时取出 3 份,过滤后测定滤液(吸附余液)体积;用 90% 乙醇溶液 20 mL 对吸附饱和的树脂进行解吸后过滤,测定解吸液体积。按“2.1.1”项下的条件进行色谱分析,并计算吸附余液和解吸液中丹酚酸 B 的含量。

2.3.2 大孔树脂富集纯化条件的优化

将筛选出来的一种合适的大孔树脂,湿法装入

玻璃的层析柱中,分别考察上样流速、上样量、洗脱剂的选择、洗脱剂的流速及倍量和径高比,确定最佳纯化工艺,并进行验证试验。

2.3.3 丹酚酸 B 的进一步优化

将用大孔树脂富集纯化后的丹酚酸 B,进一步用石油醚与乙酸乙酯的混合溶剂洗涤,并用甲醇重结晶,得到高纯度的丹酚酸 B,并计算其得率。

3 结果与讨论

3.1 丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的标准曲线与回归方程

本实验过程中,丹参酮 IIA 的分析浓度范围是 0.01 ~ 0.10 mg/mL,丹酚酸 B 的分析浓度范围是 0.05 ~ 0.3 mg/mL,按“2.1.3”项的方法,绘制标准取线,得到丹参酮 IIA 的回归方程为: $Y = 45745X - 7.1428 (R^2 = 0.9992)$; 丹酚酸 B 的回归方程为: $Y = 4450.7X - 5.856 (R^2 = 0.9996)$ 。

3.2 丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含量

按照“2.1.4”的方法,测定供试品中丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含量时,供试品的 HPLC 谱图(图 1A)中这两种物质与对照品谱图(图 1B 和 1C)中这两种物质的保留时间相同,丹参酮 IIA 的保留时间为 28.55 min,丹酚酸 B 的保留时间为 9.22 min。以面积归一法自动给出这两种物质的含量,取 3 次实验平均值,得出供试品中丹参酮 IIA 的含量为 0.43%,丹酚酸 B 的含量为 4.51%。

3.3 温度对丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 提取的影响

按照“2.2.1”的方法,在 50、60、70 和 85 °C 时得

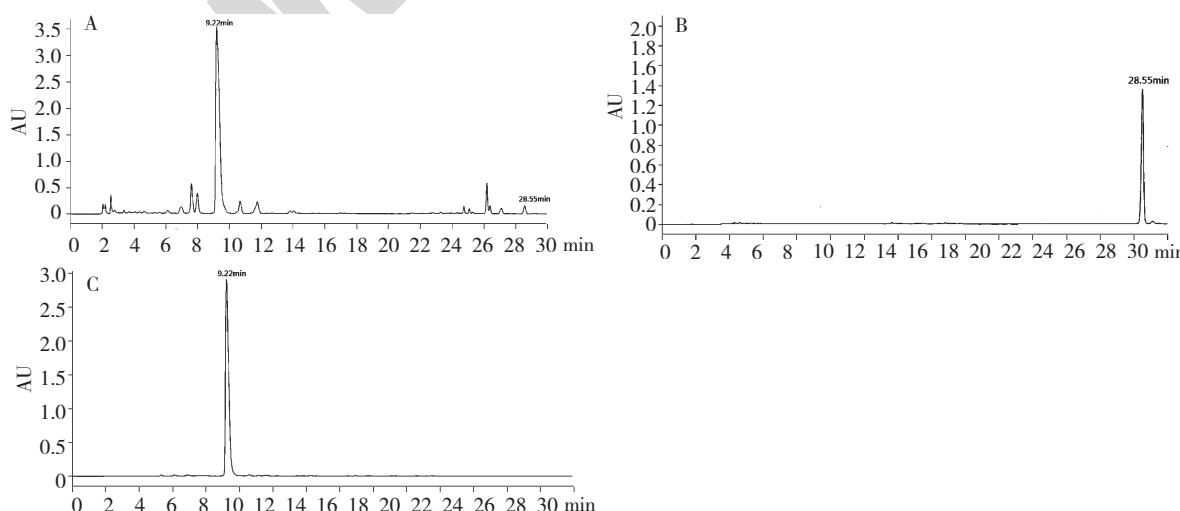


图 1 丹参供试品(A)、丹参酮 IIA(B)对照品和丹酚酸 B 对照品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of testing sample (A), tanshinone IIA standard (B) and salvianolic acid B standard (C)

到的丹参酮 IIA 的含量为 3.21、3.58、3.95、4.01 mg/g;丹酚酸 B 的含量为 30.11、32.25、35.34、36.13 mg/g,结果表明在 85 °C(回流)的条件下,提取液中丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 含量最高,因此采用 85 °C(回流)进行提取。

3.4 正交提取实验的结果及分析

按照“2.2.2”所述的方法进行正交实验,结果见表2。直观分析表明:各种因素对丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 提取量的影响程度为 A > C > B,可以看出在乙醇浓度相同的情况下,丹参酮 IIA 的含量在提取

0.5 h 后基本不变,丹酚酸 B 的含量在 1 h 后也基本稳定;当乙醇浓度减少到 50% 时,丹参酮 IIA 的含量明显减少,乙醇浓度减少到 70% 时,丹酚酸 B 的含量随乙醇浓度的减少含量基本不变,但从 HPLC 的谱图中可以看出水溶性杂质明显变多;乙醇浓度相同条件下,料液比为 1:8 时,丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含量都相对较高,因此综合考虑,最佳的提取工艺为 A₂B₂C₂,即用 8 倍量的 70% 的乙醇加热回流提取 3 次,每次 1 h。

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiments

设计序号 No.	方案 Programs	丹参酮 IIA 的含量 Content of tanshinone IIA (mg/g)	丹酚酸 B 的含量 Content of salvianolic acid B (mg/g)
1	A ₁ B ₁ C ₁	3.85	33.13
2	A ₁ B ₁ C ₂	3.96	38.35
3	A ₁ B ₁ C ₃	3.99	38.38
4	A ₁ B ₂ C ₁	3.95	33.45
5	A ₁ B ₂ C ₂	3.99	39.43
6	A ₁ B ₂ C ₃	4.05	39.47
7	A ₁ B ₃ C ₁	3.78	32.95
8	A ₁ B ₃ C ₂	3.81	38.87
9	A ₁ B ₃ C ₃	3.82	39.01
10	A ₂ B ₁ C ₁	3.99	32.11
11	A ₂ B ₁ C ₂	4.07	38.32
12	A ₂ B ₁ C ₃	4.08	38.66
13	A ₂ B ₂ C ₁	4.03	35.33
14	A ₂ B ₂ C ₂	4.15	39.41
15	A ₂ B ₂ C ₃	4.15	39.45
16	A ₂ B ₃ C ₁	3.48	33.15
17	A ₂ B ₃ C ₂	3.98	37.72
18	A ₂ B ₃ C ₃	3.99	37.74
19	A ₃ B ₁ C ₁	3.99	28.77
20	A ₃ B ₁ C ₂	4.01	36.13
21	A ₃ B ₁ C ₃	4.02	36.15
22	A ₃ B ₂ C ₁	4.14	30.58
23	A ₃ B ₂ C ₂	4.17	37.66
24	A ₃ B ₂ C ₃	4.18	37.98
25	A ₃ B ₃ C ₁	4.07	29.98
26	A ₃ B ₃ C ₂	4.12	35.58
27	A ₃ B ₃ C ₃	4.13	35.89

3.5 提取工艺验证试验

分别称取丹参粉末 50、100 g 和 1000 g, 各 3 份, 用 8 倍量的 70% 乙醇, 加热回流 3 次, 每次 1 h。按“2.2.1”项下方法测定丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含

量, 结果见表 3。通过对 50、100 g 和 1000 g 丹参粉末提取工艺的放大实验研究, 表明该提取工艺稳定, 重现性好。

表 3 正交提取验证试验中丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含量测定结果

Table 3 Validation test results of orthogonal experiments

投料量 Raw material (g)	得膏量 Yield (g)	丹参酮 IIA 的含量 Content of tanshinone IIA (mg/g)	丹参酮 IIA 的提取率 Extraction rate of tanshinone IIA (%)	丹酚酸 B 的含量 Content of salvianolic acid B (mg/g)	丹酚酸 B 的提取率 Extraction rate of salvianolic acid B (%)
50	10.21	4.13	96.5	39.43	87.53
100	20.13	4.03	93.2	39.39	87.31
1000	199.84	3.99	92.7	38.90	86.27

提取率(%) = 最佳提取条件下样品的提取量 (mg/g)/供试品中样品的含量(mg/g)

3.6 丹酚酸 B 分离与纯化的结果与分析

3.6.1 大孔树脂的筛选

按“2.3.1”项下的方法, 得出 3 中大孔树脂吸

附和解吸附的结果, 见表 4。结果表明: 3 种大孔树脂中以 D101 型树脂的效果最好, 且在 30 和 45 min 时吸附量相差不大, 因此选择 D101 树脂作为丹参提取液中丹酚酸 B 的纯化树脂, 吸附时间为 30 min。

表 4 大孔树脂静态吸附与解吸结果

Table 4 Results of static adsorption and desorption of macroporous resin

树脂型号 Resin types	极性 Polarity	吸附时间 Time (min)	吸附量 Adsorption amount (mg/g)	解吸量 Desorption amount (mg/g)
D101	非极性	15	30.59	30.23
AB-8	弱极性	15	26.57	25.97
HP-20	非极性	15	18.33	17.58
D101	非极性	30	39.76	39.17
AB-8	弱极性	30	31.28	30.09
HP-20	非极性	30	24.77	24.18
D101	非极性	45	39.88	39.29
AB-8	弱极性	45	31.01	29.95
HP-20	非极性	45	24.33	22.88

3.6.2 上样流速及上样量的考察

取 D101 大孔树脂 50 g, 共 3 份, 用水湿法装柱 (径高比设为 1:10)。取上样药液 150 mL, 分别以 2、4、6 和 8 BV/h (1 BV = 50 mL) 上样。取过柱液 (余液) 测定体积; 树脂柱再用 90% 乙醇 200 mL 洗脱解吸, 得到的解吸液过滤并测定体积。测定余液和解吸液滤液中丹酚酸 B 的吸附量及解吸量。结果见表 5。

结果表明, 在 2 或 4 BV/h 时, D101 大孔树脂对丹酚酸 B 的吸附量及解吸量较佳, 为了使样品液能够充分地能够与树脂充分地吸收, 选择 2 BV/h (100 mL/h) 上样。比较动态和静态的吸附结果发现, 动

表 5 样流速的影响

Table 5 Effect of sample flow rate

流速 Flow rate (BV/g)	吸附量 Adsorption amount (mg/g)	解吸量 Desorption amount (mg/g)
2	50.27	50.01
4	50.19	49.28
6	45.38	43.97
8	38.27	34.25

态吸附时树脂的吸附量更大。根据下式可计算出上样量约为 3 g/g(生药/树脂)。

上样量 = 丹酚酸 B 的吸附量/(药材中丹酚酸 B

的含量 × 树脂重量)

3.6.3 洗脱剂的选择

取 D101 树脂 50 g, 上样药液 150 mL, 根据“3.6.2”的结果, 以 2 BV/h 的流速上样, 分别以水和 20%、40%、60%、80% 乙醇各 8 BV 并以 4 BV/h 流速洗脱树脂柱, 收集洗脱液, 每 2 BV 为一份, 分别测定每份的得膏量、丹酚酸 B 的含量和累积量, 结果见图 2。

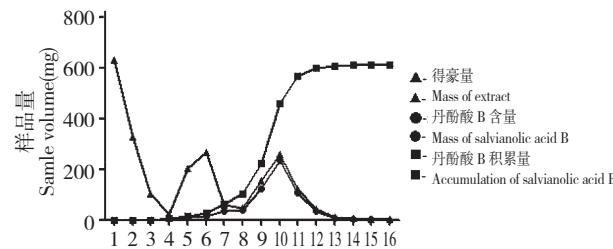


图 2 洗脱剂的选择曲线

Fig. 2 Selection curves of eluent

结果表明, 用水洗脱时, 测定主要为不含丹酚酸 B 的杂质, 且主要集中在前 6 BV 中, 从图中丹酚酸 B 的积累量和含量数据来看, 20% 乙醇洗脱液中丹酚酸 B 的含量很小, 40% 乙醇中丹酚酸 B 开始有少量积累, 但在前两份收集的 40% 乙醇洗脱液中, 可以看出得膏量较大, 丹酚酸 B 的纯度较低, 说明 20% 乙醇除杂较弱, 杂质会在 40% 乙醇洗脱液中积累, 因此选择 30% 乙醇作为除杂溶剂继续考察。在 60% 乙醇洗脱液中丹酚酸 B 的积累量最多, 在 80% 乙醇洗脱液中丹酚酸 B 还是有少量积累, 说明 60% 乙醇的洗脱能力较强, 可以作为丹酚酸 B 的富集溶剂。

3.6.4 洗脱曲线的验证及洗脱倍量的考察

根据“3.6.3”的结果, 重新确定的纯化方法为: 取 D101 树脂 50 g, 上样药液 150 mL, 以 2 BV/h 的速度上柱, 先用 6 BV 的水洗脱后, 再用 10 BV 30% 乙醇除杂, 10 BV 60% 乙醇富集丹酚酸 B。收集洗脱液, 每 2 BV 为一份, 测定每份洗脱液中浸膏的重量和丹酚酸 B 的含量和积累量。结果见图 3。结果表明, 最终选择的纯化工艺为: 上样后, 先用 6 BV 的水洗脱掉糖类等杂质, 再用 8 BV 的 30% 乙醇除杂, 最后用 10 BV 60% 乙醇洗脱富集, 浸膏中丹酚酸 B 的纯度为 77.37%。

3.6.5 正交法选择径高比与洗脱剂的流速

取 D101 打孔树脂 50 g, 共 3 份, 采用不同径高

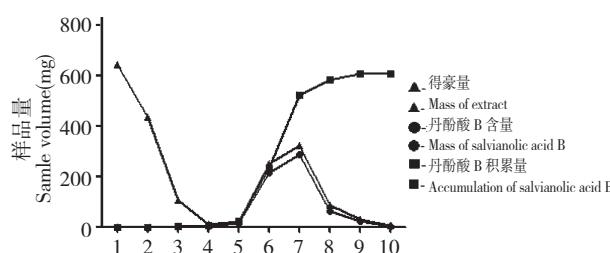


图 3 洗脱剂倍量选择与验证曲线

Fig. 3 Elution factor selection and validation curves

比的玻璃柱, 分别上样 150 mL 的药液。以丹酚酸 B 的纯度和转移率(丹酚酸 B 累积量与上样前含量之比)为指标, 采用正交表 L₉(3³) 选择除杂溶剂流速(A)、富集溶剂流速(B)和径高比(C)3 因素水平, 来确定最佳纯化工艺, 见表 6。结果表明, 最佳工艺组合为径高比 1:10, 除杂流速 4 BV/h, 富集流速为 2 BV/h, 径高比 1:10。结果见表 7。

表 6 因素水平表

Table 6 Factors and levels for orthogonal experiments

水平 Levels	因素 Factors		
	A (BV/h)	B (BV/h)	C
1	2	2	1:5
2	4	4	1:10
3	6	6	1:15

表 7 正交选择流速与径高比的结果

Table 7 Results of orthogonal experiment for the optimization of flow rate and diameter ratio

实验设计序号 No.	设计方案 Program	转移率 Transfer rate (%)	纯度 Purity (%)
1	A ₁ B ₁ C ₁	73.51	63.23
2	A ₁ B ₁ C ₂	88.94	75.87
3	A ₁ B ₁ C ₃	85.32	77.11
4	A ₁ B ₂ C ₁	71.71	59.88
5	A ₁ B ₂ C ₂	86.55	72.17
6	A ₁ B ₂ C ₃	84.69	74.79
7	A ₁ B ₃ C ₁	67.47	58.91
8	A ₁ B ₃ C ₂	87.31	75.22
9	A ₁ B ₃ C ₃	79.47	74.89
10	A ₂ B ₁ C ₁	78.45	63.64
11	A ₂ B ₁ C ₂	90.33	77.35
12	A ₂ B ₁ C ₃	83.92	78.09
13	A ₂ B ₂ C ₁	70.23	69.66

实验设计序号 No.	设计方案 Program	转移率 Transfer rate (%)	纯度 Purity (%)
14	A ₂ B ₂ C ₂	86.76	76.17
15	A ₂ B ₂ C ₃	79.81	72.31
16	A ₂ B ₃ C ₁	67.27	61.85
17	A ₂ B ₃ C ₂	87.73	76.42
18	A ₂ B ₃ C ₃	85.37	75.43
19	A ₃ B ₁ C ₁	66.19	65.01
20	A ₃ B ₁ C ₂	82.51	71.78
21	A ₃ B ₁ C ₃	88.22	77.99
22	A ₃ B ₂ C ₁	65.39	59.47
23	A ₃ B ₂ C ₂	88.77	73.11
24	A ₃ B ₂ C ₃	84.69	77.47
25	A ₃ B ₃ C ₁	67.21	61.67
26	A ₃ B ₃ C ₂	87.16	76.20
27	A ₃ B ₃ C ₃	81.48	76.53

3.6.6 纯化工艺的验证

取D101大孔树脂50 g装柱(径高比1:10),以2 BV/h的流速上样150 mL。先用6 BV的水洗脱,然后用6 BV30%乙醇以4 BV/h流速除杂,8 BV60%乙醇以2 BV/h流速富集,计算洗脱液中丹酚酸B的总质量为913.42 mg,含量为78.37%,转移率为80.29%。结果表明,该工艺稳定性好,可行性强。

3.6.7 丹酚酸B的进一步纯化

按照“3.6”中得到的最佳纯化方法进行多次实验,收集到纯度为78.37%的样品2.77 g,共3份,进行进一步优化,对“3.6”中样品检测可以看出杂质主要为极性比丹酚酸B小的化合物,本实验采用乙酸乙酯和石油醚的混合溶剂进行洗涤。将样品溶于50 mL水中,用乙酸乙酯与石油醚的混合溶剂洗涤(50 mL×3),收集水层,减压干燥称重,然后溶于甲醇,用HPLC检测丹酚酸B的含量。结果表明随着乙酸乙酯与石油醚的比例的减小,洗涤过程中丹酚酸B的损失越小,减小到4:1时,损失率基本不变,纯度在溶剂比例为4:1~3:1时最高,达到95%以上,因此本试验采用乙酸乙酯:石油醚(4:1~3:1)进行洗涤,丹酚酸B的回收率高,纯度高。结果见表8。

最后将上述得到的丹酚酸B纯度大于95%的样品1.61 g,进一步用甲醇进行重结晶,最终得到灰白色结晶1.43 g,经色谱测定纯度达到99.23%,总

表8 洗涤纯化结果

Table 8 Results of purification

溶剂比例 Solvent ratio	含量 Content (g)	回收率 Recovery rate (%)	纯度 Purity (%)
6:1	1.23	74.3	73.5
5:1	1.38	83.5	74.6
4:1	1.53	92.1	95.2
3:1	1.55	93.3	95.5
2:1	1.56	93.9	85.6
1:1	1.59	95.7	81.3

收率为2.86%(以干燥根茎计算)。

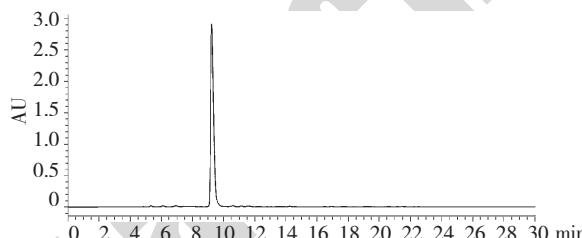


图4 丹酚酸B最终产品的HPLC色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of purified salvianolic acid B

4 讨论与结论

本实验以丹参中两种有效成分丹参酮IIA和丹酚酸B的含量为综合评价指标,从提取温度、溶剂、倍量和时间方面,全面的考察并确定这两种成分的最佳提取工艺。在该工艺条件下,提取过程中得到的水溶性杂质少,便于纯化,提取溶剂绿色环保,对环境无污染,丹参药材的利用率高,有效成分的提取率高。

在此基础上,对水溶性成分丹酚酸B,本实验从树脂的选择、上样流速、径高比等方面全面考察并得到其最佳的纯化工艺参数,通过验证表明其纯化效果较好,所得化合物丹酚酸B的产量稳定,纯度较高,且进行简单的后处理可以得到高纯度的丹酚酸B,可行性强,适合工业放大生产。

参考文献

- Gao L(高岚), Zou ZW(邹中旺). Study on extracting process of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践), 2009, 23(3):57-58.
- Liang Y(梁勇), Yang M(杨明), Yuan SL(袁淑兰). Advances in pharmacological effect and clinical use of tanshinone. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2000, 31:304-306.

(下转第1379页)