

◇ 制剂与炮制 ◇

高纯度丹酚酸 B 的制备工艺研究

王凤美¹, 陈军辉², 李 磊³, 王小如^{1,3}, 黎先春³

(1. 厦门大学化学化工学院 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2 南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047;

3 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要: 目的: 建立高纯度丹酚酸 B 的最佳制备工艺流程。方法: 通过比较几种不同大孔吸附树脂对丹酚酸 B 的吸附及洗脱性能, 筛选出最佳树脂并对该树脂分离纯化丹酚酸 B 的工艺参数进行优化。结果: 在本文所确定的最佳工艺条件下, 丹酚酸 B 回收率为 90.6%, 纯度高达 91.8%, 稳定性良好, 可作为丹参制剂的原料药应用。结论: 该工艺操作简便, 适用于工业化生产, 有利于促进丹酚酸 B 的开发利用。

关键词: 大孔吸附树脂; 丹酚酸 B; 制备工艺

中图分类号: R 283; R 284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805 (2005) 06-0476-02

Study on the Preparation of Salvianolic Acid B of High Purity

WANG Feng-mei¹, CHEN Jun-hui², LI Lei³, WANG Xiao-ru^{1,3}, LI Xian-chun³

(1. The Key Laboratory of Science of Ministry of Education of China, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 2 The Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China; 3 First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, Shandong 266061, China)

Abstract Objective: The best technology of the preparation of salvianolic acid B was established. **Methods** A series of macroporous adsorption resins were compared on their adsorption and desorption properties for salvianolic acid B and the optimal type resin had been selected. The technical parameters for purification of salvianolic acid B with the selected type resin were studied. **Results** Under this condition, the recovery is 90.6% and the purity of salvianolic acid B is 91.8%. The product has a good stability and could be used for preparation directly. **Conclusion:** This method is simple and could be used for industrial production, promoting the exploitation and utilization of salvianolic acid B.

Key words Macroporous adsorption resin; Salvianolic acid B; Preparation technology

丹参为我国传统中药常用的著名理血类中药材, 具有活血化瘀、理气止痛、清心除烦之功效^[1]。水溶性丹酚酸类是丹参主要有效成分, 具有抗脂质过氧化、抗血栓、改善血液循环等作用, 是丹参复方制剂治疗冠心病、心脑血管疾病的主要功能因子^[2]。其中丹酚酸 B 含量最高, 约占总丹酚酸的 70%, 且活性最强, 具有强烈的清除自由基和抗氧化作用^[3], 因此高纯度丹酚酸 B 的制备在中药制剂及保健品的开发上具有重要意义。丹参有效成分的提取, 传统的水提-醇沉法酚酸类成分损失较大, 文献^[4]报道采用适宜的大孔树脂精制, 可在保留提取液中酚酸类成分的同时, 大大降低总固形物得率, 从而提高制剂载药量。文献^[5]中采用大孔树脂吸附法纯化丹酚酸 B, 其纯度仅达到 85%, 无法作为丹参制剂的原料药应用。基于以上文献报道, 本文探讨了高纯度丹酚酸 B 的制备工艺, 并对工艺参数进行优化筛选, 旨在寻找一种产品纯度高、稳定性好、适用于工业化生产的制备工艺。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 SBXZ-1A 恒温水浴锅, 上海申玻仪器公司; SENCO R-201 旋转蒸发仪, 上海申胜生物技术有限公司; FD-1 冷冻干燥机, 北京博医康技术公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪; 752 型紫外分光光度计; 上海光谱仪器有限公司。

1.2 试剂 盐酸、醋酸乙酯、乙醇、三氟乙酸、苯酚、葡萄糖、浓硫酸均为分析纯; 乙腈为色谱纯; 试验用水为去离子水。大孔吸附树脂 D101、LSA-20: 西安蓝深公司; D301: 南开大学化工厂;

SP1905: 上海医药工业研究所; 丹参: 四川中江丹参基地提供; 丹酚酸 B 对照品: 昆明同持医药研究有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 丹酚酸 B 纯化工艺 丹参切片 10 g, 加 8 倍量水于 90℃ 水浴加热条件下提取两次, 1 h/次。合并提取液, 高速离心, 上清液减压浓缩, 定容至 25 mL; 醋酸乙酯萃取, 萃取液减压蒸干, 用水溶解定容至 10 mL。上述定容液以 4 mL/min 的流速上大孔吸附树脂柱, 静止吸附 2 h。水洗除去上样液中未吸附成分, 乙醇洗脱, 洗脱液减压浓缩除去乙醇, 冷冻干燥得丹酚酸 B 纯化物。

2.2 高效液相色谱法测定丹酚酸 B 的含量

2.2.1 色谱条件 色谱柱为依利特 C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (0.05% 三氟乙酸) = 25:75; 流速 0.8 mL/min; 检测波长为 290 nm。

2.2.2 标准曲线的绘制 准确称取丹酚酸 B 对照品 6.8 mg, 用水溶解定容至 10 mL 棕色容量瓶中。取丹酚酸 B 标准品溶液分别以 1, 3, 5, 10, 15 μL 体积进样。以峰面积为纵坐标, 进样量 (μg) 为横坐标, 得丹酚酸 B 的线性回归方程: $Y = 1.2771X - 8.2093$, ($r = 1$); 丹酚酸 B 在 0.68~10.2 μg 范围内线性关系良好。

2.2.3 丹酚酸 B 含量测定 取各待测样品液, 按 2.2.1 色谱条件, 分别进样 5 μL, 测得各样品液中丹酚酸 B 的峰面积, 按峰面积值用外标两点法计算其含量。色谱图见图 1。

2.3 比色法测定丹酚酸 B 纯化过程中总糖的含量

2.3.1 标准溶液的配制 葡萄糖标准溶液: 准确称取经 105℃ 烘干 2 h 至恒重的葡萄糖 0.1 g, 加水溶解后加入 5 mL 盐酸, 并加水稀释定容至 100 mL; 吸取上述溶液 10 mL, 加水稀释至 100 mL 配成 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准贮备液。6% 苯酚: 取 6 mL 苯酚溶于水, 加水定容至 100 mL, 临用配制。

2.3.2 标准曲线的绘制 准确吸取上述葡萄糖贮备液 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mL, 分别置于 10 mL 具塞比色管中, 加入苯酚

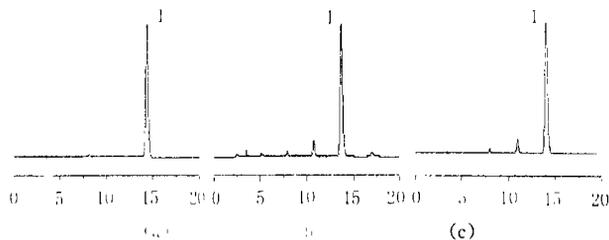
收稿日期: 2004-11-23; 修订日期: 2005-03-11

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (No. 20235020);

青岛市重点实验室建设项目 (No. 04-2-JS-135)

作者简介: 王凤美 (1979-), 女 (汉族), 山东济宁人, 现为厦门大学 2002 级在读硕士研究生, 主要从事中药有效成分的提取纯化及结构表征研究工作。

液 1.0 ml, 混匀且快速加入 5.0 ml 浓硫酸, 在沸水浴中放置 15 min, 采用流水冷却后于 490 nm 处比色法测定吸光度。以吸光值为纵坐标, 葡萄糖浓度为横坐标, 得葡萄糖的线性回归方程: $Y = 7.0102X + 0.0546$, ($r = 0.9998$)。



a. 丹酚酸 B 对照品 b. 丹参提取原液
c. 丹酚酸 B 纯化物 1. 丹酚酸 B

图 1 几种样品的色谱图

2.3.3 纯化过程中总糖含量测定结果 分别取待测样品液按 2.3.1 中所述方法测定各样品液总糖含量。结果见表 1。

表 1 纯化过程中总糖含量的变化 mg

样品液	总糖量	样品液	总糖量
提取原液	3740.3	洗脱液	14.5
上样液	32.6		

2.3.4 最佳工艺流程的选择 本实验以所得固形物的稳定性及丹酚酸 B 的含量为评价指标, 考察了四种制备工艺流程, 结果见表 2。

表 2 丹酚酸 B 的不同制备工艺比较 %

制备工艺	固形物常温放置	丹酚酸 B 含量
1. 丹参提取液直接冷冻干燥	吸潮, 粘手, 且变为棕色	12.1
2. 丹参提取液用醋酸乙酯萃取, 萃取液蒸干, 用水溶解, 冷冻干燥	吸潮, 粘手, 且变为棕色	73.4
3. 丹参提取液直接上大孔吸附树脂, 用乙醇水洗脱, 洗脱液蒸去乙醇, 冷冻干燥	吸潮, 粘手, 且变为棕色	70.2
4. 丹参提取液用醋酸乙酯萃取, 萃取液蒸干用水溶解, 上大孔树脂柱吸附, 乙醇水洗脱, 洗脱液蒸去乙醇, 冷冻干燥	稳定, 粉末性良好	87.6

由表 2 可知, 工艺 4 所得固形物常温放置稳定, 且丹酚酸 B 含量较高, 为最佳工艺流程。

2.5 最佳工艺流程参数优化

2.5.1 醋酸乙酯萃取次数的选择 醋酸乙酯萃取次数的选择, 首先要保证丹酚酸 B 有较高的萃取效率, 其次要考虑到萃取剂的相对用量。按 2.1 方法制得丹参提取液 25 ml, 用 25 ml 醋酸乙酯萃取 4 次, 总萃取率分别为 84.6%, 94.9%, 98.2%, 99.2%, 可见萃取次数越多萃取效率也就越高。综合考虑丹酚酸 B 的生产成本、经济效益及工艺步骤, 选择用醋酸乙酯萃取 2 次最佳。

2.5.2 大孔吸附树脂类型的选择 目前树脂的筛选多用静态吸附法, 事实上静态吸附法以比表面积为主要影响因素, 动态吸附法以孔径大小为主要影响因素, 故两者很可能出现不一致的结果^[6]。由此看来静态吸附法筛选树脂有一定的不合理性, 本实验采用动态吸附法比较 4 种大孔吸附树脂 D101, D301, LSA-20, SIP1905 对丹酚酸 B 的吸附及解吸情况。

$$\text{吸附率公式: } v_a = \frac{M_{上} - M_{水洗}}{M_{上}} \times 100\%$$

其中 v_a 为吸附率, $M_{上}$ 为上样液中丹酚酸 B 的总量, $M_{水洗}$ 为水洗液中丹酚酸 B 的质量解吸率公式: $v_d = \frac{M_{洗脱}}{M_{吸附}} \times 100\%$

其中 v_d 为解吸率, $M_{洗脱}$ 为洗脱液中丹酚酸 B 的质量, $M_{吸附}$ 为被吸附的丹酚酸 B 的质量, 通过比较各树脂对丹酚酸 B

的吸附及解吸情况, 选择最佳树脂。

称取 4 份等量丹参切片, 按照 2.1 方法提取, 提取液离心减压浓缩, 定容。分别加到装有上述 4 种不同树脂的层析柱上, 先用水洗去上样液中未吸附成分, 再用乙醇洗脱, 收集各自乙醇洗脱液, 减压浓缩除去乙醇, 用水定容, HPLC 法测定丹酚酸 B 的含量, 结果见表 3。

表 3 不同树脂吸附性能的比较

树脂类型	上样量 m/mg	吸附率 (%)	洗脱率 (%)
D101	537.1	99.7	96.1
D301	537.1	92.6	34.5
LSA-20	537.1	75.6	80.9
SIP1905	537.1	99.9	95.9

由上表可知, 相同上样量条件下 D101, SIP1905 两种树脂对丹酚酸 B 均有较理想的吸附及解吸性能。D101 为中药及天然产物分离纯化的常用树脂, 价格低廉, 且易于再生, 而后者成本相对较高, 故本实验选用 D101 型大孔吸附树脂分离纯化丹参药材中的丹酚酸 B。

2.5.3 洗脱溶剂的选择 实验考察了 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% (v/v) 乙醇-水几种不同洗脱溶剂 5 倍柱体积洗脱条件下, 对丹酚酸 B 的等度洗脱情况, 对洗脱液进行 HPLC 法测定分析。结果 10%, 20% 乙醇洗脱液中几乎不含丹酚酸 B; 其他洗脱液分别减压浓缩除去乙醇, 冷冻干燥, 称重, 称取定容, 测定丹酚酸 B 的含量, 计算丹酚酸 B 洗脱率, 比较结果见图 2。

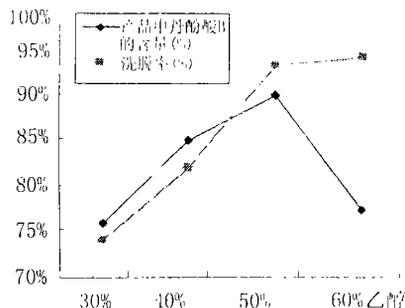


图 2 不同洗脱液对丹酚酸 B 的洗脱比较

由图 2 可知, 用 50% 乙醇洗脱树脂柱, 洗脱固形物中丹酚酸 B 含量最高, 且丹酚酸 B 回收率也相对较高, 故确定 50% 乙醇为最佳洗脱溶剂。由于 20% 乙醇对丹酚酸 B 几乎无洗脱能力, 本实验考察先用 20% 乙醇洗去部分杂质成分, 再用 50% 乙醇洗脱。结果丹酚酸 B 的洗脱率增加到 95.8%, 且产品中丹酚酸 B 的含量可达 91.8%。

2.5.4 洗脱体积的确定 按上述所确定的最佳洗脱条件, 先用 5BV 水洗去上样液中未吸附成分, 再用 5BV 20% 乙醇洗去部分杂质成分, 最后用 50% 乙醇进行洗脱。HPLC 法分别测定 50% 乙醇洗脱液用量为 1, 2, 3, 4, 5, 6 BV 时丹酚酸 B 的含量, 计算各自洗脱率。结果见图 3。

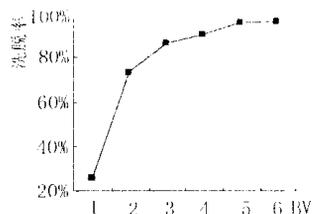


图 3 不同洗脱体积对丹酚酸 B 的洗脱效果

本实验选用 5 倍柱体积洗脱, 即可达到要求。

2.6 最佳工艺条件放大实验 称取 200 g 丹参切片, 以上述确定的最佳工艺条件, 即醋酸乙酯萃取 2 次, D101 大孔树脂吸附, 先后用 5BV 柱体积水, 20% 乙醇, 50% 乙醇洗脱, 按照 2.1 方法纯化。最终得丹酚酸 B 产品 11.18 g, 其纯度为 91.3%, 回收率可达

90.2%，与预测结果 91.8%、90.6% 基本接近。
 2.7 丹酚酸 B 的稳定性考察 丹酚酸 B 的最终产品为淡黄色固体，粉末性良好。本试验对所得产品的稳定性作了进一步考察，取适量丹酚酸 B 纯化物 3 份，分别于空气中常温放置、密封干燥器中常温放置、60℃ 烘箱中放置；HPLC 法测定空气中放置 1, 3, 7 d, 干燥器中放置 15, 30, 60 d, 烘箱中放置 3, 8, 24 h 情况下丹酚酸 B 的含量。结果见表 4。

表 4 丹酚酸 B 的含量比较 %

空气中常温放置			密封常温放置			60℃ 烘箱中放置		
1 d	3 d	7 d	15 d	30 d	60 d	3 h	8 h	24 h
91.8	91.6	91.5	91.7	91.5	91.2	91.5	91.3	90.9

分析上表可知，丹酚酸 B 稳定性较好，纯度无明显变化，含量测定其 RSD 均小于 1%，且所得固形物均可保持良好的粉末性。

3 讨论

3.1 D101 树脂吸附容量 本实验选择 D101 树脂分离纯化丹酚酸 B，上柱样品（以干药材重量计）与树脂量之比为 1:1 (W/W)，树脂尚未达到吸附饱和，其对丹酚酸 B 的最大吸附容量尚有待于进一步考察。

3.2 糖分测定 本文主要研究丹酚酸 B 的制备工艺，由于糖类易吸潮，含量过高，必然影响最终产品的纯度及稳定性。本实验采用苯酚-硫酸法^[7,8]测定纯化过程中总糖含量，作为丹酚酸 B 纯度及稳定性的考察参数。丹参中含糖量较高，醋酸乙酯萃取可去除 99.12% 的糖分，但工艺 2 所得产物仍不稳定。由此可见，要得到丹酚酸 B 含量较高且常温放置稳定的丹酚酸 B 产品，其糖分

含量必须低于一定极限值。树脂纯化后糖分去除率为 99.61%，最终产品中含糖量仅为 2.83%，可保证丹酚酸 B 产品保持良好的粉末性。

3.3 最终工艺可行性 本工艺最终产品稳定性较好，丹酚酸 B 含量大于 90%，可作为丹参制剂的原料药应用。且工艺流程简单，稳定可行，丹酚酸 B 回收率较高，可用于产业化制备。

致谢：本研究得到厦门倍尔思生化科技有限公司及青岛市现代分析技术及标准化重点实验室经费资助，特此感谢！

参考文献：

[1] 国家药典委员会 中国药典，I 部[S] 北京：化学工业出版社，2000：57-57。
 [2] 富志军，林以宁，康俊伟 浓缩、精制及干燥对复方丹参提取液中水溶性成份的影响[J] 安徽中医学院学报，2002，22(2)：52-52
 [3] 杜冠华，张均田 丹参水溶性有效成分—丹酚酸研究进展[J] 基础医学与临床，2000，20(5)：394-394
 [4] 张军，刘璐，赖小平，等 丹参制剂的研究现状及其开发的几点思考[J] 中草药，2001，32(10)：954-954
 [5] 周永刚，李翔，赵亮，等 大孔吸附树脂法提取丹酚酸 B 的应用研究[J] 药学实践杂志，2003，21(6)：399-399
 [6] 刘友平，鄢丹，秦春梅 大孔吸附树脂纯化中药有效成分的影响因素[J] 中药新药与临床药理，2003，14(3)：212-212
 [7] 乔华，张晓云，李养民 参芪胶囊及其原药材中多糖的含量测定[J] 中国生化药物杂志，2004，25(2)：104-104
 [8] 关昕路，阎玉凝，任子和，等 翼首草中糖的含量测定[J] 北京中医药大学学报，2003，26(4)：66-66

◇ 国药鉴别 ◇

蒺藜商品药材组织构造的研究

张勉，谢帆，王胜勇

(中国药科大学，江苏南京 210038)

摘要：目的：对来自全国 11 个地区的蒺藜类商品药材进行鉴定，了解该类药材的市场情况。方法：在性状鉴别的基础上，采用显微数码成像技术，对蒺藜商品药材进行了显微鉴定研究。结果：11 份商品药材样品中均为正品，但是组织构造研究结果与前人研究不尽相同。结论：蒺藜的中果皮分为薄壁和厚壁两部分，厚壁部分内、外两侧均有含草酸钙结晶细胞形成的结晶层。本文提供了蒺藜药材的横切面简图、组织特征图和粉末图，以供参考。

关键词：蒺藜；组织构造；商品药材

中图分类号：R286.0 **文献标识码：**A **文章编号：**1008-0805(2005)06-0478-02

Microscopic Structure of Commercial Drug of Fructus Tribuli

ZHANG Mian, XIE Fan, WANG Sheng-yong

(Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract Objective: To identify the commercial drugs of *Fructus Tribuli* (Jili) collected from 11 different areas. **Methods** Macro- and Microscopic identification with digital imaging technology. **Results** The original plants of the commercial drugs were *Tribulus terrestris* L., but the microscopic structure of the drugs are different from that of the previous studies. **Conclusion:** The mesocarp of Jili is composed of parenchymatous and sclerenchymatous parts, and the sclerenchymatous part surrounded by a layer of calcium oxalate crystals

Key words: *Fructus Tribuli*; Microscopic structure; Commercial drugs

蒺藜为蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥成熟果实，具有平肝解郁、活血祛风、明目、止痒之功效，常用于头痛眩晕、胸胁胀痛、乳闭乳痛、目赤翳障、风疹瘙痒等症^[1]。由于蒺藜的

药材性状比较特征，药源充足，市场上价格不高，所以一般混伪现象较少，而有关蒺藜显微鉴定的文献报道也很少^[2,3]。我们于 2002~2003 年从江西樟树、广东广州、上海、广西南宁、北京、安徽亳州、河南郑州、陕西西安、河北安国、四川成都和香港收集了该类药材的商品样品，其鉴定结果也均为正品蒺藜。但是我们在对蒺藜果实的组织构造进行研究时，其结果与前人的研究不尽吻合。现将我们的研究结果报道如下，以供参考与商榷。

收稿日期：2004-12-06； 修订日期：2005-02-19

基金项目：国家中医药管理局资助专项课题 (No. 2001 ZDZX005)

作者简介：张勉 (1962-)，女 (汉族)，上海人，现任中国药科大学副教授，博士学位，主要从事中药 (生药) 鉴定与质量标准研究工作