

# ADS-7多功能吸附树脂制备高纯度丹酚酸B的应用研究

陶华明<sup>1</sup>, 朱全红<sup>1</sup>, 徐满才<sup>2</sup>(1.南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2.湖南师范大学化学化工学院, 长沙 410081)

**摘要:**目的 探讨 ADS-7 多功能吸附树脂对丹参中丹酚酸 B 的分离纯化方法。方法 以丹酚酸 B 的含量及洗脱率为指标, 通过动态吸附试验考察 ADS-7 树脂的吸附性能。结果 ADS-7 树脂对丹参中丹酚酸 B 具有较高的吸附选择性, 吸附量为  $95.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (干树脂), 甲酸/50%乙醇(10:90)作为洗脱剂, 丹酚酸 B 的纯度高达 87.2%。结论 ADS-7 树脂用于丹参中丹酚酸 B 的分离纯化简单高效。

**关键词:** 丹参; 丹酚酸 B; ADS-7 树脂; 纯化

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)02-0113-04

## Preparation of High-purity Salvianolic Acid B from *Salvia Miltiorrhiza* with Multifunctional Resin ADS-7

TAO Huaming<sup>1</sup>, ZHU Quanhong<sup>1</sup>, XU Mancai<sup>2</sup>(1.School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2.College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the method for separating and purifying the salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* with multifunctional resin ADS-7. **METHODS** By using the content and elution rate of salvianolic acid B as indexes, the dynamic adsorption tests were employed to investigate adsorption capability of ADS-7 resin. **RESULTS** ADS-7 resin could be used to produce the salvianolic acid B with high quality. The dynamic adsorption capacity was  $95.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry resin), the purity of the salvianolic acid B was 87.2% when eluted with formic acid/50% ethanol (10:90). **CONCLUSION** It is a simple and efficient method to separate the salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* with ADS-7 resin.

**KEY WORDS:** *Salvia miltiorrhiza*; salvianolic acid B; ADS-7 resin; purification

丹参(*Salviae Miltiorrhizae Radix*)为双子叶植物唇形科鼠尾草属植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)的干燥根及根茎,是我国传统医药学中应用最早而且最广泛的活血化瘀药之一。水溶性丹酚酸类化合物是丹参中的主要活性成分,其单体成分主要包括丹酚酸(salvianolic acid)A、B、C、D、E、F、G、H、I、J,迷迭香酸、紫草酸、咖啡酸、四甲基丹酚酸F、异丹酚酸C等<sup>[1]</sup>,其中丹酚酸B的含量最高,且是主要活性成分,具有显著的抗脂质过氧化、清除自由基和抗血栓作用。以丹酚酸B为有效成分的药物开发已成为研究热点<sup>[2]</sup>,如何简单、高效制备高纯度丹酚酸B在药物的开发上具有重要意义。

丹酚酸B的纯化方法包括水提-醇沉法、溶剂萃取法、柱色谱分离法等<sup>[3-5]</sup>。这些方法成本较高且过程繁琐、周期长,常会引起有效成分的损失。近年来,随着吸附分离技术广泛用于中药的分离纯化,也有有关用大孔树脂分离纯化丹酚酸B的相关报道<sup>[6-8]</sup>,但较多地局限于利用丹酚酸B与杂质的极性

差异进行物理吸附分离,对于其他与丹酚酸B极性相近的杂质则无法实现选择性分离。本实验根据丹酚酸B分子结构特点,选用ADS-7多功能吸附树脂对丹参水提取物进行吸附和解吸,发现该树脂对丹酚酸B吸附量大、选择性高、易于洗脱,利用不同酸度的乙醇溶液即可实现对丹酚酸B与其他丹酚酸及中性化合物的分离,确定了通过“吸附-脱附”即可获得高纯度的丹酚酸B的生产工艺。

### 1 仪器、材料和试剂

Agilent 1100液相色谱仪, DAD检测器(美国Agilent公司); 色谱柱Thermo C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 丹参药材(吉林省宏检药材公司),经吉林省中医药科学院严仲铠教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根及根茎; ADS-7树脂(南开大学化工厂, 粒径: 0.3~1.25 mm; 平均孔径: 25~30 nm); 丹酚酸B对照品(中国药品生物制品检定所中药室, 批号: 200201, 纯度>98%); 乙腈(色谱纯), 其它试剂均为分析纯。

作者简介: 陶华明, 男, 博士, 讲师 Tel: (020)61648770 E-mail: taohm929@yahoo.com.cn

## 2 方法与结果

### 2.1 树脂预处理

取一定量的ADS-7树脂,在95%乙醇中溶胀12 h,湿法装柱后用95%乙醇洗至加水不浑浊,然后用蒸馏水洗至无醇味,再依次用3~4 BV(1 BV=15 mL)5%的盐酸和5%碳酸氢钠处理,水洗至中性,备用。

### 2.2 丹参提取液的制备

取丹参50 g,加10倍量水浸泡1 h,回流提取2次,每次1 h,合并2次水提液,滤过,减压浓缩至每毫升溶液约含0.1 g生药。

### 2.3 丹酚酸B的HPLC测定<sup>[9]</sup>

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱为Thermo C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.5%磷酸(25:75);体积流量:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长:281 nm;柱温:30 ℃。

**2.3.2 线性关系考察** 精密称取丹酚酸B对照品7.8 mg,置于50 mL棕色量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,得到浓度为0.156 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液,精密吸取0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL对照品溶液,分别置于10 mL棕色量瓶中,加流动相至刻度,分别吸取10 μL注入高效液相色谱仪中,按“2.3.1”项下色谱条件进行分析,记录色谱峰面积。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。得方程 $Y=840.17X+38.069$ ,  $r=0.9991$ ,线性范围为0.156~3.12 μg。

**2.3.3 仪器精密度试验** 取丹酚酸B对照品溶液,连续进样5次,每次10 μL,测定其精密度,RSD为0.84%,表明仪器精密度良好。

**2.3.4 稳定性试验** 取样品溶液用0.45 μm滤膜过滤后,避光保存,于室温下放置,每隔2 h进样10 μL,RSD为1.58%( $n=6$ )。说明样品溶液在避光条件下,8 h内稳定。

**2.3.5 加样回收率试验** 精密称取已知含量的同一样品6份,分别精密加入一定量的丹酚酸B对照品,按“2.2”项下方法制备样品溶液,取10 μL进样。根据峰面积,计算含量,结果平均回收率为98.1%,RSD为2.55%( $n=6$ )。

### 2.4 ADS-7树脂对丹酚酸B的吸附性能研究

**2.4.1 动态吸附曲线测定** 取5 g经过预处理的ADS-7树脂(分别经醇、酸、碱处理)蒸馏水湿法装柱(30 cm×1 cm),取质量浓度为3.19 mg·mL<sup>-1</sup>的丹参上清液,控制流速2 mL·min<sup>-1</sup>流过树脂柱,流出

液每10 mL收集1份,检测流出液中丹酚酸B的含量变化,采用HPLC测定流出液中丹酚酸B的含量,绘制动态吸附曲线,结果见图1。树脂对丹酚酸B的吸附量(mg·g<sup>-1</sup>)按下式计算:吸附量=(吸附前丹酚酸B含量-流出液丹酚酸B含量)/干树脂质量。

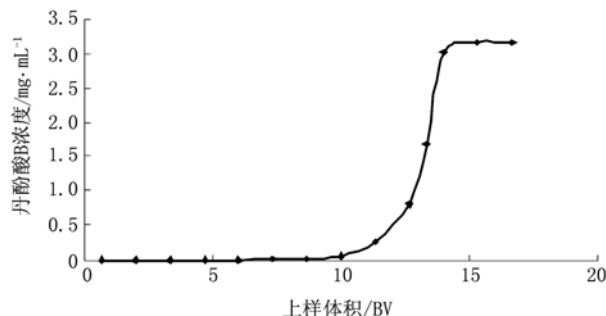


图1 ADS-7树脂动态吸附曲线

Fig 1 Dynamic adsorption curve of ADS-7 multifunctional resin

由图1可知,当上样量达到10 BV时,原料液开始发生泄漏,吸附量为95.7 mg·g<sup>-1</sup>(干树脂),上样量15 BV时流出液丹酚酸B的浓度等于上样液。

**2.4.2 洗脱液的选择** 取5支吸附饱和后的树脂柱,先用蒸馏水洗至流出液近无色,再分别用50%乙醇、70%乙醇、乙酸/50%乙醇(5:95)、乙酸/50%乙醇(10:90)、甲酸/50%乙醇(10:90)溶液(各5 BV)以流速2 mL·min<sup>-1</sup>洗脱,收集洗脱液,减压干燥,称重,采用HPLC测定丹酚酸B的含量,计算丹酚酸B的洗脱率。结果表明,50%乙醇、70%乙醇、乙酸/50%乙醇(5:95)3种洗脱液中均未检出丹酚酸B,丹酚酸B集中在甲酸/50%乙醇(10:90)洗脱液中,洗脱率高达93.5%,而乙酸/50%乙醇(10:90)洗脱液中虽然含有丹酚酸B,但洗脱率仅为47.0%,故确定甲酸/50%乙醇(10:90)为洗脱液。由于乙酸/50%乙醇(5:95)洗脱液对丹酚酸B无洗脱能力,本实验先用5 BV乙酸/50%乙醇(5:95)洗脱液洗去杂质成分,再用甲酸/50%乙醇(10:90)洗脱液进行洗脱,结果产品丹酚酸B的纯度高达88.5%。

**2.4.3 动态解吸曲线测定** 取吸附饱和后的树脂柱,依次用蒸馏水、乙酸/50%乙醇(5:95)混合液洗至流出液近无色(各5 BV),再用甲酸/50%乙醇(10:90)洗脱液以流速2 mL·min<sup>-1</sup>等度洗脱,分部收集洗脱液,采用HPLC测定洗脱液中丹酚酸B的含量,绘制动态解吸曲线,结果见图2。可以看出,

当洗脱液体积达到5 BV时,基本可以把吸附的丹酚酸B洗脱下来。

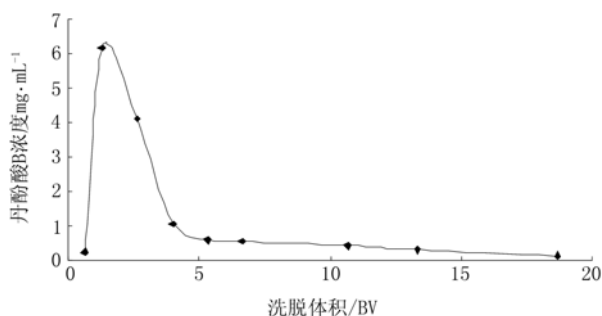


图2 ADS-7树脂动态解吸曲线

Fig 2 Dynamic desorption curve of ADS-7 multifunctional resin

**2.4.4 纯化丹酚酸B验证试验** 将饱和吸附的树脂柱按“2.4.3”项下条件进行3次平行实验,收集洗脱液,减压干燥得浅黄色粉末,HPLC测定丹酚酸B纯度,3批产品纯度分别为87.5%,85.9%,88.3%,平均纯度为87.2%,收率为5.1%,结果见图3。

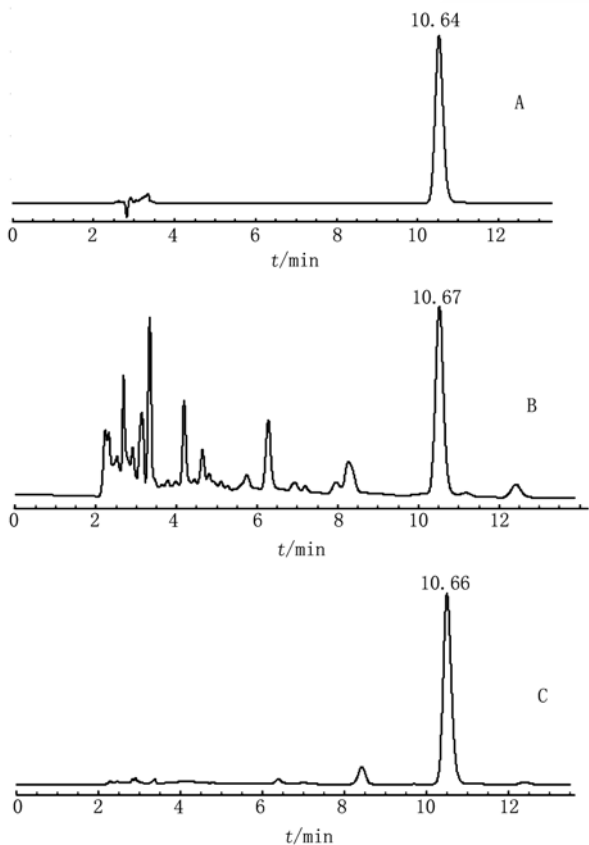


图3 丹酚酸B高效液相色谱图

A-对照品; B-丹参提取液; C-丹酚酸B

Fig 3 HPLC chromatogram of salvianolic acid B

A-reference substance; B-sample extracted by water; C-salvianolic acid B

### 3 讨论

研究表明,ADS-7树脂对丹参中丹酚酸B具有良好的分离纯化效果。原因主要有以下几点:①ADS-7树脂是在AB-8树脂的基础通过引入部分季铵基团改性而成,为强极性树脂,兼具表面吸附与基团交换功能<sup>[10]</sup>,经过碳酸氢钠活化的ADS-7树脂具有一定碱性,对中药酸性成分有较强的选择性吸附作用,而丹酚酸B是由三分子丹参素( $\beta$ -3,4-二羟苯乳酸)和一分子咖啡酸缩合而成,其分子结构中羧基及酚羟基具有一定的酸性,可以与树脂中碱性季铵盐形成专一性很强的离子键,同时,羧基及酚羟基的存在,使其具有较强的极性和亲水性,可以与该树脂形成较强的表面吸附作用,正是因为这种多点协同作用导致了丹酚酸B的纯度得到大大的提高。②合适洗脱剂的选择是另外一个重要原因,文献[9]报道50%乙醇溶液就能使丹酚酸B从普通的树脂中洗脱出来,本实验考察了70%乙醇溶液未能将丹酚酸B从ADS-7树脂洗脱下来,而甲酸/50%乙醇(10:90)混合溶液能很好的将丹酚酸B洗脱下来,从而进一步验证了ADS-7树脂对丹酚酸B的吸附力除了表面吸附力外还形成了作用力更强的离子键。虽然从酸性较弱的乙酸/50%乙醇(5:95)洗脱液中未能检出丹酚酸B,从图3可以看出,该洗脱剂可将酸性比丹酚酸B弱的其它丹酚酸及中性化合物先洗脱出来,起到了很好的选择性除杂作用。

从ADS-7树脂对丹参丹酚酸B的吸附性能研究可以看出,该树脂对丹酚酸B吸附量大,选择性高,甲酸/50%乙醇(10:90)作为洗脱液,5倍床体积基本可以把丹酚酸B洗脱下来,产品纯度高达87.2%。采用ADS-7树脂通过“吸附-脱附”即可获得高纯度的丹酚酸B,工艺简单,操作简便,成本低,收率高,为中草药中丹酚酸B的提取分离提供了实验依据,具有一定应用前景。

### REFERENCES

- [1] WU Y Y, SUN Y, WANG Y. The diversified pharmacological functions of salvianolate in promoting blood circulation to resolve stasis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(11): 975-979.
- [2] XU L J, HUANG G Y. Review of the study on the constituents and pharmacology of *Salviae miltiorrhizae* [J]. Res Integr Tradit Chin West Med(中西医结合研究) 2009, 1(1): 45-47.
- [3] HE G Y, ZHOU M D, TONG S Q, et al. Optimizing process of Radix Salvia Miltiorrhiza ethanol precipitation by response

- surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(2): 118-122.
- [4] GUO Y, LIANG X Y, NIAN W L. Preliminary studies on extracting aqueous depsides from *Salvia Yunnanensis* with water-alcohol methods [J]. J Yunnan Coll Tradit Chin Med(云南中医学院学报), 2001, 24(4): 6-8.
- [5] YE F, YANG G Y, HUANG L Y, et al. Optimizing the extration condition of semi-bionic extraction for *Salvia miltiorrhiza* Bge. of Fangling by uniform design [J]. Her Med (医药导报), 2010, 29(11): 1469-1472.
- [6] LUO D S, HE W, GUO J. Purification of salvianolic acid by macroporous resins [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(6): 14-16.
- [7] YE Y, SHI M R. Optimization of salvianolic acid B separation by macro-reticular resin D 101 [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2006, 41(20): 1557-1560.
- [8] ZHOU Y G, LI X, ZHAO L, et al. Studies on extraction and purification of salvianolic acid B with macroporous resin [J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2003, 21(6): 339-341.
- [9] LI X Y. Determination of salvianolic acid B and ferulic acid by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(13): 1355-1357.
- [10] SHI R F, XU M C, SHI Z Q, et al. Synthesis of bifunctional polymeric adsorbent and its application in purification of stevia glycosides [J]. React Func Polym, 2002, 50(2): 107-116.

收稿日期: 2011-05-12