

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.04.005

丹参弥罗松酚的提取及总酚含量测定^{*}

付英杰 王建安

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘要 **目的** 寻找从丹参中提取弥罗松酚的方法, 并进行总酚含量测定方法学的研究。**方法** 首先根据酚类的性质, 尝试采用 pH 梯度提取方法。然后以芸香叶苷为对照品绘制标准曲线, 并进行了方法学考察。**结果** 先用氯仿提取, 后用 5% Na_2CO_3 萃取。所得黄色胶状物 1.402g。标准曲线为 $Y=0.0334X+1.0413$, $R^2=0.9984$ 。取 0.00832g 样品溶于 100ml 蒸馏水中, 测定其浓度为 $79.6\mu\text{g/ml}$ 。**结论** 提取方法简便可行; 总酚含量测定方法学考察表明在当标准品浓度为 $0.638\sim 3.828\mu\text{g/ml}$ 时线性关系良好。

关键词 丹参; 弥罗松酚; 总酚; 含量测定

中图分类号: R284.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2014)08-248-03

The study of ferruginol extraction from *Salviae Miltiorrhiza* bge and the content determination method of the total phenolic

FU Ying-jie, WANG Jian-an

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To study the extraction method of ferruginol and determination methodology of total phenols in *Salviae Miltiorrhiza* Bge. **Methods** Based on the property of phenol, pH gradient extraction was applied, and then rutin was used as the reference to draw the standard curve. Finally the methodology was investigated. **Results** The method was: extracted by CHCl_3 and abstracted by 5% Na_2CO_3 . 1.042g yellow colloidal material was obtained. The standard curve was $Y=0.0334X+1.0413$, $R^2=0.9984$. The sample 0.00832g was taken and dissolved in 100ml distilled water. The concentration was $79.6\mu\text{g/ml}$. **Conclusion** The method is feasible. The linearity is fine when the concentration of standard sample between 0.638 and $3.828\mu\text{g/ml}$.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae* Bge; Ferruginol; Total phenols; Content determination

弥罗松酚 (Ferruginol, $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$) 是从松柏纲或唇形科的新鲜植株或粗提物中进行分馏提取获得^[1], 具有抗氧化、抗菌、保护心脏、抗疟原虫^[2-3]、抗肿瘤^[4]、抗溃疡、保护乙醇诱导的胃损害^[5]等药理作用。弥罗松酚治疗胃溃疡毒性小, 可改善胃的抗氧化特性, 可作为胃保护剂刺激胃前列腺系 E2 合成, 减少胃酸分泌, 改善胃黏液的抗氧化特性。因此可显著改善因酒精所致的胃粘膜损伤。本文拟从来源之一唇形科鼠尾草属植物丹参中进行提取, 并研究其提取及含量测定方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ZF7C 型三用紫外分析仪 (上海康华生化仪器制造厂); LD4-2A 型低速离心机 (北京医用离心机厂); HWSY11-K2 型电热恒温水浴锅 (北京市长风仪器仪表公司); YBDX23D 型电动吸引器 (上海医疗器械工业公司医用吸引器厂); TP311 型台式 pH 计 (北京时代新维测控有限公司)。

1.2 试剂

槲皮素 (批号: 20110127, 上海远慕生物科技)、芸香叶苷 (批号: 20100402, 上海纯优生物科技)。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取方法的选择

根据丹参中酚酸的性质, 拟选用 pH 梯度萃取

^{*} [基金项目] 2011 年济宁医学院青年基金项目 (编号: JYQ2011K M026)

法进行粗提,取丹参药材 30g,分为 3 等份,各加入 H₂O、1% NaOH 溶液、5% NaOH 溶液 100ml,加热回流提取,过滤,滤液加氯仿萃取,氯仿层各取 1ml 作为样品 1#、2#、3#。分别对各水层进行酸化:使用 HCl 调节 5% NaOH 水溶液 pH 至 13.4(约 1% NaOH 浓度)后用氯仿萃取,氯仿层作为样品 4#;通 CO₂ 调节 1% NaOH 水溶液 pH 至 12.0(约 5% Na₂CO₃ 浓度)后用氯仿萃取,氯仿层作为样品 5#;上述萃取后的水液继续通 CO₂ 调节 pH 至 8.5(约 5% NaHCO₃ 浓度)后用氯仿萃取,氯仿层作为样品 6#。将各样品减压回收溶剂,并用甲醇反复清洗蒸馏瓶,定容至 5ml。采用 2% FeCl₃ 溶液对酚类进行直接定性鉴别。溶液显蓝色为阳性(+),不变色为阴性(-)。结果见表 1。

表 1 pH 梯度萃取法定性鉴别结果

样品	1#	2#	3#	4#	5#	6#
反应	—	—	—	±	+	—

注:4#弱阳性为浅绿色(±),因蓝色与淡黄色药液叠加所致。

结果表明,丹参中酚类成分酸性较弱,不能溶于 5% NaHCO₃,但基本可溶于 1% NaOH。丹参中存在的羧酸类成分由于酸性较强、极性较大可直接被 5% NaHCO₃ 或氯仿去除。普通酚类可直接溶于 5% Na₂CO₃,而弥罗松酚仅有的一个酚羟基连接在结构巨大的菲环内侧,极性较小,酸性更弱,仅可溶于 1% NaOH,因此可采用氯仿提取,然后用 5% Na₂CO₃ 萃取去除其他酚的方法进行提取。最终提取方法如下:取丹参 100g 粉碎,加入至索氏提取器中,用氯仿回流提取至回流液无颜色,放冷,加入 5% Na₂CO₃ 萃取,弃去碱水层,氯仿层减压回收溶剂后获得粗品 1.402g,为黄色胶状物质 A。

2.2 对照品溶液的选择

参考相关文献^[6],首先配制显色液,为 0.1 mol/L FeCl₃ 和 0.008 mol/L K₃[Fe(CN)₆]混合液(1:1),现用现配。然后精密称取样品 A、槲皮素对照品、芸香叶苷对照品各 10mg,加蒸馏水定容至 1L。精密量取上述 3 种溶液各 1 ml,置 10 ml 容量瓶中,加入显色液 0.8 ml,暗处放置 5 min,再加 0.1 mol/L 的 HCl 至刻度,暗处放置 30 min。以蒸馏水为空白,于 200~800 nm 扫描,结果见表 2,最大吸收波长分别为 755、728、750nm,芸香叶苷与样品更相似,故选其为标准品。

表 2 各溶液最大吸收波长与吸光度值

	最大吸收波长(λ _{max})	吸光度(A)
样品 A	755	1.094
槲皮素	728	1.227
芸香叶苷	750	0.989

2.3 标准曲线的绘制

取已配制的芸香叶苷 6.38μg/ml 的对照品水溶液。精密吸取对照品溶液 1,2,3,4,5,6ml 置 10ml 量瓶中,分别加入显色液 0.8 ml,暗处放置 5min,再加 0.1 mol/L 的 HCl 至刻度,暗处放置 30min。以蒸馏水为空白,在 755 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,质量浓度(μg/ml)为横坐标,结果见表 3,绘制标准曲线,计算回归方程。结果 A=0.0334C+1.0413,R=0.9992,对照品浓度为 0.638~3.828μg/ml 时线性关系良好。

表 3 标准品浓度与吸光度值

对照品序号	浓度 C(μg/ml)	吸光度(A)
1	0.638	1.076
2	1.276	1.110
3	1.914	1.138
4	2.552	1.172
5	3.190	1.121
6	3.828	1.243

2.4 稳定性试验

精密吸取 1ml 对照品溶液于 10ml 容量瓶中,加显色液后在 755 nm 波长处测定其吸光值。结果见表 4。

表 4 稳定性试验结果表

序号	实验时间 (min)	吸光度 (A)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
1	0	1.105		
2	5	1.099		
3	10	1.097		
4	15	1.091	1.0914±0.0093	0.85
5	20	1.085		
6	25	1.084		
7	30	1.079		

RSD=0.85%,对照品溶液显色后在 30min 内稳定性良好。

2.5 精密度试验

精密吸取 1ml 样品 A 溶液,显色后重复测定 6

次,结果吸光度 $RSD=0.41\%$,表明精密符合要求。结果见表 5。

表 5 精密性试验

编号	吸光度(A)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
1	1.089	1.0823 $\pm$ 0.0044	0.41
2	1.078		
3	1.078		
4	1.080		
5	1.084		
6	1.085		

2.6 回收率实验

取同一样品 A 水溶液 5 份,精密量取 0.50ml (80%~120%), (据总酚含量测定结果算其浓度) 准确加入芸香叶苷标准品(63.8 μ g/ml)0.40ml,显色后依标准曲线进行含量测定,结果见表 6。

表 6 加样回收率试验结果

样品号	样品量(ml)	样品中酚含量(g)	加入量(g)	测得量(g)	回收率(%)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
1	0.40	31.84	31.9	64.20	100.72	99.64 $\pm$ 0.96	0.96
2	0.45	35.82	31.9	67.32	99.41		
3	0.50	39.80	31.9	72.03	100.46		
4	0.55	43.78	31.9	75.12	99.26		
5	0.60	47.76	31.9	78.35	98.35		

2.7 总酚含量测定

精密称取样品 A 8.3mg,定容至 100ml 容量瓶,再取 1ml 溶于 10ml 容量瓶中,取 1ml 加显色剂后,于 755nm 测吸光度,得吸光度为 1.083。据标准曲线计算待测的 10ml 容量瓶中样品浓度为 0.796 μ g/ml。根据稀释度换算原样品浓度为 79.6 μ g/ml。纯度为 95.7%(7.96/8.3),结果见表 7。

表 7 验证性试验结果

批次	吸光度(A)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
1	1.082	1.0833 $\pm$ 0.0015	0.14
2	1.083		
3	1.085		

3 讨论

预实验中曾采用如下方法:用 5%碳酸钠溶液

加热回流提取丹参,过滤。用氯仿萃取。氯仿层再用 1%氢氧化钠溶液萃取。把上层溶液调 pH 为 6~8。把氢氧化钠层倒入蒸发皿,加热至蒸干,后用乙醇溶解,过滤,除去不溶物。乙醇溶液用蒸馏装置蒸干,用水溶解后放蒸发皿中,水浴锅蒸干,5%碳酸钠直接提取可除去提取物中含羧基的酚酸类,再用 NaOH 萃取,是为了把所需酚类中的酚转化为酚盐,经调 pH 值萃取后,除去水溶性的非酚类。至此,所得酚类大部分为弥罗松酚。但步骤繁杂,且需要去除 NaCl,导致成分损失。经后续研究,发现弥罗松酚极性较小,碱水提取效果较差,采用低极性的氯仿提取,可直接避免极性较大的酚酸类物质被提取到,收率也有较大提升。

在对弥罗松酚含量测定方法的选择上,文献^[7]采用 GC-MS 法过于繁琐,考虑到后续制剂工艺试验需要多次进行含量测定,故采用更为简单快速的可见分光光度法,以总酚含量测定方法来代替。后续实验拟采用 GC 或 LC 来进一步测定纯度。

参考文献:

- [1] Inoue N. Purification of ferruginol [P]. Japan Patent: JP 3294632,1993-11-09.
- [2] De Jesusa MB, Zambuzia WF, De Sousaa RR, et al. Ferruginol suppresses survival signaling pathways in androgen-independent human prostate cancer cells[J]. Biochimie, 2008, 90(6):843-854.
- [3] Flores C, Alarcón J, Becerra J, et al. Bark of Prumnopitys andina (Podocarpaceae) and Austrocedrus chilensis (Cupressaceae). [J]. Bol Soc Chil Quim, 2001, 46(1):61-64.
- [4] Son KH, Oh HM, Choi SK, et al. Anti-tumor abietane diterpenes from the cones of Sequoia sempervirens. [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15(8):2019-2021.
- [5] Areche C, Theoduloz C, Yáñez T, et al. Gastroprotective activity of ferruginol in mice and rats: effects on gastric secretion, endogenous prostaglandins and non-protein sulfhydryls. [J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(2):245-251.
- [6] 翟小玲,倪健,谷雨龙.地稔总酚胃内漂浮片制备工艺的研究[J]. 中国中药杂志 2008, 33(1):31-34.
- [7] Adams RP, Nguyen S. Infra-specific variation in Juniperus deppeana and fsperryi in the Davis Mountains of Texas: Variation in leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs)[J]. Phytologia, 2005, 87(2):96-108.

(收稿日期 2014-04-21)