

丹参中丹参酮 II A 的提取分离研究

王秀丽^{1*}, 刘永刚¹, 孙茂¹, 李光贻²

(1. 北京中医药大学 中药学院 北京 100102; 2. 沈阳双鼎制药有限公司 辽宁 沈阳 110179)

摘要:目的 研究丹参中丹参酮 II A 的提取纯化工艺。方法 以 HPLC 法为检测手段,对丹参酮 II A 的提取工艺, D101 型大孔树脂分离纯化丹参酮 II A 的树脂柱径高比、药液质量浓度、上柱吸附体积流量、洗脱体积流量、生药吸附量、解吸溶媒及其最佳用量等因素进行考察。结果 丹参中丹参酮 II A 的最佳提取分离工艺为: 避光条件下,丹参药材用 6 倍量($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 95% (体积分数)乙醇搅拌提取 4 h,回收乙醇后用无水乙醇:石油醚(体积比 15:85)萃取 3 次,旋转蒸发除去萃取溶剂,所得浸膏用与药材量比值为 1:1($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 60% (体积分数)乙醇溶解上柱,依次用 27 BV 68% (体积分数)乙醇洗去杂质,8 BV 80% (体积分数)乙醇洗脱,丹参酮 II A 富集在 80% (体积分数)乙醇洗脱部分。结论 建立了丹参酮 II A 的最佳提取纯化工艺,所得浸膏中丹参酮 II A 质量分数为 53.65%。

关键词:丹参酮 II A; 大孔树脂; 纯化; 提取

中图分类号: R284.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.009

文章编号: 1006-8783(2011)01-0034-05

Study on the extraction and purification of tanshinon II A from *Salvia miltiorrhiza* Bge.

WANG Xiu-li^{1*}, LIU Yong-gang¹, SUN Mao¹, LI Guang-ze²

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Shenyang Shuangding Pharmaceutical Company Limited, Shenyang Liaoning 110179)

Abstract: Objective To establish the optimum process for purifying tanshinon II A from *Salvia miltiorrhiza* Bge. . **Methods** HPLC was employed to determine tanshinon IIA, and the diameter-length ratio of the column with the macroporous resin D101, the concentrations of the column-loading solutions, adsorbing volume, eluting volume, adsorptive capacity of crude drugs, desorbing solvents and the optimal amounts were investigated to obtain the optimum process of purification on macroporous resin. **Results** The optimum process of extraction and purification were as follows: in darkroom, *Salvia miltiorrhiza* Bge. was extracted through 95% ethanol for 4 h, and the product was condensed and extracted with ethanol and ether(15:85) for 3 times, then condensed again and purified through macroporous resin, adsorbing with 1g herb in 1 mL 60% ethanol, then eluting with 68% ethanol of 27 BV and 80% ethanol of 8 BV respectively. Tanshinon II A was enriched in the elution of 80% ethanol. **Conclusion** This method could be used to purify tanshinon II A from *Salvia miltiorrhiza* Bge. The content of tanshinone II A was 53.65%.

Key words: Macroporous Resin; tanshinons II A; purification; extraction

收稿日期: 2010-09-06

作者简介: 王秀丽(1978-) ,女,讲师,博士,主要从事中药复方及新药开发研究,电话: 010-84738658, Email: lnwangxiuli@163.com; * 为通讯作者。

网络出版时间: 2011-01-21 16:17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1617.000.html>

丹参是唇形科鼠尾草植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根和根茎, 是临床最常用的活血化瘀中药。丹参的脂溶性成分丹参酮具有抑菌、抗炎、抗凝血等功效, 其中丹参酮 II A 是脂溶性成分的代表, 在《中国药典》中, 丹参酮 II A 的含量是丹参药材的质量控制指标, 其对于治疗冠心病、心绞痛、心律过速均有显著疗效^[1-4]。因为丹参酮 II A 的功效已经得到认可并广泛应用, 合理的提取工艺显得尤为重要。丹参酮 II A 对光、热、氧不稳定, 这增加了提取纯化的难度。传统的醇提法, 在其浓缩、干燥过程中, 由于发生化学变化, 丹参酮 II A 的损失可达 40% 以上^[5]。除传统醇提法外, 还有超临界 CO₂ 萃取^[6]、微波提取^[7]、切割硅胶柱色谱^[8]等方法用于提取丹参酮 II A 的报道。以上方法都有其自身优点, 但大孔吸附树脂因为具有成本低、吸附性强、吸附容量大、容易解吸、易于操作、可反复使用及实验条件易实现工业化放大等优点^[9], 更具有其优势。目前关于大孔树脂法吸附富集丹参酮 II A 的报道寥寥^[10-11] 相关提取工艺参数及纯度还有待进一步完善。而 D101 型大孔吸附树脂是苯乙烯型非极性共聚体, 适用范围较广, 对于不带极性的有机化合物, 吸附能力普遍强。因此本文探讨了以 D101 型大孔吸附树脂纯化丹参酮 II A 的方法, 为其纯化及应用提供实验依据。

1 仪器与试剂

Varian series ProStar 高效液相色谱仪(美国瓦里安); R-201 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); D40-2F 电动搅拌机(杭州仪表电机厂); LD4-2 低速离心机(北京医用离心机厂); AG-285 分析天平(瑞士); BS-3200 超声波清洗器(上海新芝生物技术有限公司, 频率 60 kHz, 功率 500 W)。

丹参药材, 由四川中江丹参基地提供, 经北京中医药大学刘永刚讲师鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的根; 丹参酮 II A 对照品(批号: 110766 - 200416, 中国药品生物制品检定所)。

D101 型大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司); 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹参酮 II A 含量的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: shim-pack vp-ODS C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相为水-乙腈(体积比

80:20); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 272 nm; 进样量: 20 μL。色谱图如图 1 所示。

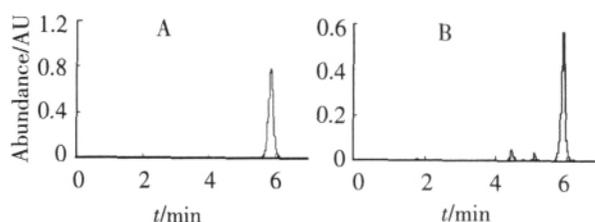


图 1 丹参酮 II A 对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of control solution(A) and sample solution(B)

2.1.2 对照品贮备液的制备 精密称取经 P₂O₅ 减压干燥 24 h 的丹参酮 II A 对照品 12.40 mg, 置 10 mL 棕色容量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得丹参酮 II A 质量浓度为 1.24 mg · mL⁻¹ 的对照品贮备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 对于提取和纯化过程中的各种丹参乙醇溶液, 视其对应的质量浓度范围不同, 或直接取原液(原液质量浓度 < 6.20 mg · mL⁻¹ 时) 或将原液稀释至 0.13 ~ 6.20 mg · mL⁻¹ 范围内(原液质量浓度 > 6.20 mg · mL⁻¹ 时) 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 标准曲线的制备 精密量取对照品贮备液 1 mL, 置 5 mL 棕色容量瓶中, 加流动相溶解定容, 摇匀, 即得丹参酮 II A 质量浓度为 0.248 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 5、15、25、35、50 μL 以及对对照品贮备液 20、35、50 μL 注入高效液相色谱仪中, 依法测定。以峰面积(Y)为纵坐标, 进样量(X)为横坐标作标准曲线, 得回归方程 $Y = 5.0003 \times 10^4 X + 1.8795 \times 10^4$, $r = 0.9998$ ($n = 5$) 线性范围为 1.24 ~ 62.00 μg。

2.1.5 样品测定 精密吸取供试品溶液 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 依法测定。

2.2 丹参酮 II A 的提取

在避光条件下, 以 95% (体积分数) 乙醇为提取溶剂, 以 60 r · min⁻¹ 速度搅拌。以丹参酮 II A 为测定指标, 按 L₉(3⁴) 正交试验设计表, 对提取次数、提取时间、溶剂用量进行考察。因素水平设计见表 1, 结果见表 2、3。

由表 2 可知, 3 个因素的极差大小顺序为 B > A > C, 提取时间对提取工艺的影响最大, 其次为提取次数, 溶剂用量影响最小。由表 3 可知, 提取时间对

丹参酮 II A 的提取具有统计学意义,因素提取次数、溶剂用量影响无统计学意义。从节约成本角度出发,确定最佳提取方案为 $A_1B_2C_1$,即 6 倍量 95% (体积分数) 乙醇提取 4 h。按上述优化条件进行 3 次重复性验证试验。结果,丹参酮 II A 提取率分别为 63.79%、62.98%、63.47%,平均提取率为 63.41%,丹参酮 II A 的质量分数为 16.73%,验证结果表明工艺基本稳定可行。

表 1 提取正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in extraction experiment

水平	因素		
	A	B	C
	提取次数/次	提取时间/h	溶剂用量/倍
1	1	2	6
2	2	4	8
3	3	6	10

表 2 提取正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test of extraction ($n=3$)

试验号	A	B	C	D(空白)	丹参酮 II A 提取率/%
1	1	1	1	1	45.14
2	1	2	2	2	67.83
3	1	3	3	3	67.32
4	2	1	2	3	46.75
5	2	2	3	1	70.48
6	2	3	1	2	68.03
7	3	1	3	2	59.35
8	3	2	1	3	71.81
9	3	3	2	1	66.91
K_1	180.29	151.24	184.98	182.53	
K_2	185.26	210.12	181.49	195.21	
K_3	198.07	202.25	197.15	185.88	
R	17.78	58.88	15.66	12.68	

表 3 提取工艺方差分析表

Table 3 Variance analysis(ANOVA) table of extraction

因素	偏差平方和	自由度	F	P
A	56.103	2	1.949	
B	681.297	2	23.669	<0.05
C	45.058	2	1.565	
D	28.78	2		

2.3 大孔吸附树脂纯化丹参酮 II A 的工艺考察^[12-13]

2.3.1 大孔吸附树脂的预处理 将 D101 型大孔吸附树脂用无水乙醇浸泡 24 h 后湿法装柱,待树脂装好后,用乙醇洗脱树脂柱至流出液与蒸馏水(体积比 1:1)混合不产生白色浑浊,再用蒸馏水冲洗至无乙醇味;然后用 2 倍体积 5% (体积分数) HCl 以 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速通过树脂层,并浸泡 2~4 h,用蒸馏水以同样的流速洗至流出液 pH 值呈中性;最后用 2 倍体积 2% (体积分数) NaOH 溶液以 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速通过树脂柱,并浸泡 2~4 h 后,用蒸馏水以同样流速洗至流出液 pH 值呈中性。

2.3.2 上柱样品液的制备 取“2.2”项下提取液回收乙醇至无醇味后用无水乙醇-石油醚(体积比 15:85)萃取 3 次,丹参酮 II A 的质量分数可提高至 37.54%。浸膏用与药材量比值为 1:1 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 60% (体积分数) 乙醇溶解,作为上柱样品液。

2.3.3 树脂柱径高比、药液质量浓度及上柱吸附体积分量的优选 按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表的设计进行柱径比、药液质量浓度及吸附体积分量的考察,因素水平设计见表 4,结果见表 5、6。

表 4 吸附正交试验因素水平表

Table 4 Factors and levels in adsorption experiment

水平	因素		
	A	B	C
	$\rho_{\text{药液(按生药计)}} / (\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	树脂柱径高比	上柱吸附体积分量/ ($\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$)
1	1:2	1:3	0.20
2	1:1	1:6	0.16
3	2:1	1:9	0.12

由表 5 可知,3 个因素的极差大小顺序为 $A > C > B$ 。由表 6 可知,因素 A、B、C 均无统计学意义。确定最优方案为 $A_2B_2C_3$,即按生药计算的药液质量浓度为 1:1 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),上柱吸附体积分量为 $0.12 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,树脂柱径高比为 6:1。按上述优化条件进行 3 次重复性验证试验。结果显示,以丹参酮 II A 计,吸附率分别为 99.02%、99.36%、98.87%,验证结果表明工艺稳定可行。

2.3.4 生药吸附量考察 取上柱样品液 100 mL,加入含 75 mL D101 型大孔吸附树脂的色谱柱中,分段收集吸附流出液,每段收集 2.5 mL。分别测定每

个流份中丹参酮 II A 的质量浓度。流份 11 中丹参酮 II A 的质量浓度为流份 10 的 11.43 倍,表现出明显的泄漏现象。按每段流份体积为 2.5 mL 计算,总上样体积为 25 mL,相当于 25 g 生药。提示 0.75 mL D101 型大孔吸附树脂的最佳吸附量为 0.25 g 生药。

表 5 吸附正交试验结果

Table 5 Results of orthogonal design of adsorption($n=3$)

试验号	A	B	C	D(空白)	吸附率/%
1	1	1	1	1	73.3±2.8
2	1	2	2	2	81.9±3.4
3	1	3	3	3	83.8±2.2
4	2	1	2	3	98.7±1.5
5	2	2	3	1	99.3±1.2
6	2	3	1	2	89.1±2.3
7	3	1	3	2	94.2±0.9
8	3	2	1	3	94.6±1.3
9	3	3	2	1	93.1±0.9
K_1	239.0	266.2	257.0	265.7	
K_2	287.1	275.8	273.7	265.2	
K_3	281.9	266.0	277.3	277.1	
R	48.1	9.8	20.3	11.9	

注:吸附率=(吸附前药液中丹参酮 II A 的质量-吸附后药液中丹参酮 II A 的质量)/吸附前药液中丹参酮 II A 的质量×100%

表 6 吸附工艺方差分析表

Table 6 Variance analysis(ANOVA) table of adsorption

因素	偏差平方和	自由度	F
A	464.562	2	15.382
B	20.916	2	0.693
C	78.216	2	2.590
误差	30.20	2	

2.3.5 解吸溶媒考察 按上述优化条件,取上柱样品液 100 mL 进行试验。吸附完毕后,依次用 60%、68%、75%、80%、85%、90%(以上均为体积分数)乙醇洗脱,洗脱体积流量为 $0.18 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,至洗脱液中无法检测到丹参酮 II A 为止。分别测定各部分的丹参酮 II A 含量,计算出累积解吸率分别为 1.45%、3.87%、8.03%、64.12%、87.64% 和 95.86%。结果提示,80%(体积分数)乙醇可以将绝大部分丹参酮 II A 从 D101 大孔吸附树脂上解吸下来。

2.3.6 洗脱体积流量考察 取上柱样品液 100 mL 共 3 份,吸附完毕后,用体积流量分别为 0.12、0.18、0.24 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的 80%(体积分数)乙醇洗脱,至洗脱液中无法检测到丹参酮 II A 为止。结果,洗脱体积流量 0.12、0.18、0.24 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 对应的溶媒用量分别为 6.8、8.1、10.8 BV。从节约成本和时间的角度考虑,将洗脱体积流量确定为 $0.18 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.3.7 解吸溶媒用量考察 取上柱样品液 100 mL,吸附完毕后,用 80%(体积分数)乙醇洗脱,分段收集洗脱液,每段 60 mL,共收集 50 份,测定每段流分中丹参酮 II A 含量。结果,流份 40 的丹参酮 II A 质量浓度为流份 41 的 32.75 倍,表明在第 40 段流份时基本解吸完全。即溶媒用量为 2400 mL,相当于 8 倍树脂容积。

2.4 验证试验

按优选的最佳纯化工艺,即取丹参药材 100 g,按“2.2”项下方法提取后所得浸膏,用与药材量比值为 1:1($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 60%(体积分数)乙醇溶解。采用树脂柱径高比为 1:6,300 mL 的 D101 大孔吸附树脂,以按生药量计算 1:1($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的药液质量浓度,以 $0.12 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度动态吸附。静置 2 h 后,以 $0.18 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的洗脱体积流量,依次用 27 BV 68%(体积分数)乙醇、8 BV 80%(体积分数)乙醇洗脱,回收 80%乙醇至无醇味。平行制备 3 份,所得浸膏分别用流动相定容至 100 mL,取 0.5 mL 定容至 10 mL,按“2.1.1”项下条件进行测定。结果表明,优选得到的工艺条件能较好地提取纯化丹参酮 II A,浸膏中丹参酮 II A 的质量分数分别为 53.10%、54.39%、53.46%,平均质量分数为 53.65%,重现性较好。

3 讨论

因为丹参酮 II A 对光、热均不稳定,所以全部操作过程均采取了避光、低温的措施(在 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 的空调暗室内进行)。提取正交试验中,提取次数和溶剂用量对提取率的影响无统计学意义,考虑到生产成本以及回收乙醇时间延长丹参酮 II A 易损失的问题,最终确定了采用 6 倍量的提取溶剂提取 1 次。提取时间为 6 h 时丹参酮 II A 提取率比提取 4 h 时略有降低,推测是因为丹参酮 II A 对光、热、湿、氧等多种因素均不稳定,随着搅拌时间的延长而增加了降解^[5,14],造成丹参酮 II A 的损失。

本研究采用大孔吸附树脂法对丹参酮 II A 的纯化工艺进行考察,结果表明,D101 型大孔树脂能够有效地对丹参酮进行富集,使指标成分丹参酮 II A 的质量分数达到 53.65%,明显高于大孔树脂纯化丹参酮 II A 的同类文献^[11]中所述的 42%。本工艺简便、稳定、可行性高,为含丹参酮 II A 制剂的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] TAKAHASHI K, OUYANG X, KOMATSU K *et al.* Sodium tanshinone II A sulfonate derived from danshen (salvia miltiorrhiza) attenuates hypertrophy induced by angiotensin II in cultured neonatal rat cardiac cells [J]. *Biochem Pharmacol* 2002, 64(4): 745-749.
- [2] 蔡丽萍, 刘志刚, 杨红. 丹参酮的药理作用和临床研究进展 [J]. 广东药学院学报 2008, 24(3): 321-324.
- [3] 张旭光, 张予民. 丹参酮 II A 磺酸钠治疗不稳定型心绞痛的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志 2006, 4(10): 857.
- [4] NIU Xi-Lin, ICHIMORI KOHJI, YANG Xia, *et al.* Tanshinone II A inhibits low density lipoprotein oxidation *in vitro* [J]. *Free Radic Res* 2000, 33(3): 305-312.
- [5] 苏子仁, 刘中秋, 同华, 等. 丹参酮醇提液在浓缩干燥工艺过程中的化学成分变化研究(1)——丹参酮 II A 湿热降解机理探讨 [J]. 中成药研究, 1997, 19(11): 5-7.
- [6] 姚建国, 蒋永红, 周卯星, 等. 超临界二氧化碳萃取丹参中的丹参酮 [J]. 山西中医学院学报 2003, 4(1): 41-44.
- [7] 朱晓薇, 郭俊华, 高卫东, 等. 丹参的微波提取研究 [J]. 天津中医药 2005, 22(3): 243-245.
- [8] 赵萌, 肖文平. 切割硅胶柱色谱法分离丹参中的丹参酮 II A [J]. 湖北农业科学 2009, 48(9): 2234-2236.
- [9] 白夺龙, 杨开华. 大孔吸附树脂分离纯化技术及应用 [J]. 海峡药学 2007, 19(9): 96-99.
- [10] 姜喜成, 秦培勇, 谭天伟. 大孔树脂对丹参酮 II A 的静态吸附研究 [J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2009, 36(3): 79-82.
- [11] 孟召全, 陈鸿楠, 钱捷. 丹参酮 II A 的分离纯化 [J]. 中国实验方剂学杂志 2010, 16(2): 6-7.
- [12] 徐伟, 张淑玲, 洪振丰, 等. 大孔吸附树脂分离纯化龙须藤总黄酮的工艺研究 [J]. 广东药学院学报 2009, 25(2): 144-146.
- [13] 蒋凤琴, 冯敬文, 沈雪梅. 大孔吸附树脂纯化复方川芎方乙醇提取液的研究 [J]. 广东药学院学报 2010, 26(1): 33-36.
- [14] 林恒标, 林恒宽. 丹参酮 II A 的稳定性研究 [J]. 中医研究 2005, 18(8): 16.

(责任编辑: 刘晓涵)

美国 FDA 批准 Gardasil 疫苗用于预防直肠癌

美国 FDA 于 2010 年 12 月 22 日批准 Gardasil 疫苗用于 9~26 岁人群预防直肠癌和与 6、11、16、18 型人类乳头瘤病毒 (HPV) 有关的癌前病变。在此之前, Gardasil 已经获准用于相同年龄组女性人群预防宫颈癌、外阴癌及阴道癌等。除此之外, Gardasil 还已经被批准用于预防因 6、11 型 HPV 引起的男、女性生殖器疣。

FDA 有关主管官员指出, 目前直肠癌的治疗正面临挑战, 通过使用 Gardasil 疫苗预防直肠癌非常重要, 因为它可以有效减少直肠癌发病例数及随之而来的外科手术、放射治疗和化疗方面的需求。

尽管直肠癌在普通人群中并不常见, 但发病率正在上升。据美国癌症协会估计, 美国每年有大约 5300 人被诊断出直肠癌, 其中女性多于男性, 且 90% 的直肠癌与 HPV 有关。先前在男同性恋人群中(该人群直肠癌发病率是最高的)进行了随机试验以验证 Gardasil 疫苗预防直肠癌和 HPV-16/18 感染引起的癌前病变(即 1、2、3 度直肠上皮内瘤变 AIN)的疗效。到研究结束时, Gardasil 疫苗预防与 HPV-16/18 有关的直肠上皮内瘤变(AIN)的有效率为 78%。由于直肠癌是男性和女性都会罹患的疾病, 这一数据可认为对女性同样适用。

如果注射疫苗时已经发生因 HPV 感染引起的直肠癌前瘤变, Gardasil 疫苗不会阻止病情继续发展。也就是说, Gardasil 疫苗只对接种前未感染 HPV 的人有效。但如果医生认为某些个体有必要进行直肠癌防癌检查, 那么这些人即使已经接种了 Gardasil 疫苗, 其直肠癌防癌检查也不应因此而停止或放弃。

Gardasil 由默克公司研制生产, 自 2006 年批准至 2010 年 5 月 31 日, 在全球范围内已经售出 6 500 万剂。其常见的副作用包括头晕、注射部位疼痛、头痛、恶心和发烧等。

(来源: 美国 FDA 新闻稿 2010-12-22 夏训明编译)