

文章编号:1004 - 9533(2007)01 - 0048 - 04

## 高速逆流色谱分离制备丹参脂溶性成分

屈 焱,杨悦武<sup>2</sup>,郭治昕<sup>2</sup>,祝国光<sup>2</sup>

(1. 天津大学化工学院,天津 300072; 2. 天士力集团有限公司,天津 300402)

**摘要:**应用高速逆流色谱法(High-Speed Counter-current Chromatography, HSCCC),从丹参的乙醇粗提物中分离纯化脂溶性成分。试验研究建立了以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水为溶剂体系,并优化了HSCCC的操作参数及操作方法,快速有效地分离得到5个丹参酮类化合物。经HPLC方法测定,其中丹参酮 A、隐丹参酮、丹参酮、二氢丹参酮 纯度均大于98%。该方法操作简捷,快速高效、费用低廉,重现性好,为中药丹参的质量控制所需要的高纯度化学对照品,提供了一种优良的制备分离方法。

**关键词:**高速逆流色谱;丹参;丹参酮

**中图分类号:**TQ028.8 **文献标识码:**A

## Preparation of Tanshinones from *Salvia Miltiorrhiza Bunge* by HSCCC

QU Yi<sup>1</sup>, YANG Yue-wu<sup>2</sup>, GUO Zhi-xin<sup>2</sup>, ZHU Guo-guang<sup>2</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Tansy Group, Tianjin 300402, China)

**Abstract:** Separation and preparation of tanshinones from Danshen (*Salvia miltiorrhiza Bunge*) crude ethanol extract were studied by high speed counter-current chromatography (HSCCC). The solvent system of petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (8 6 7 3) was selected and the optimum running parameters for apparatus was obtained through orthogonal experiment. Five tanshinone were separated and identified rapidly. Measured by HPLC, the purity of tanshinone A, cryptotanshinone, tanshinone, dihydrotanshinone were all over 98%. HSCCC is simple, economical, quick and with good repeatability for preparation of Danshen active components.

**Key words:** high speed counter-current chromatography; *salvia miltiorrhiza bunge*; tanshinone

丹参(*Salvia miltiorrhiza Bunge*)是我国传统医学中常用药物之一。从丹参中提取的化学成分为脂溶性和水溶性两类<sup>[1]</sup>。目前,研究发现丹参脂溶性成分具有对药物代谢的影响、对神经系统的保护作用、诱导细胞凋亡及对肿瘤的作用、心血管系统作用、抗菌作用及抗炎作用等,已经发现并阐明了化学结构的丹参脂溶性化合物已达40余种<sup>[2-5]</sup>。传统用柱层析方法精制提纯丹参脂溶性成分存在样品预处理要求高、处理周期长、吸附、损失、污染和峰形拖尾等

缺点。

高速逆流色谱(High-Speed Counter-current Chromatography, HSCCC)<sup>[6]</sup>是一种基于液液分配的新型色谱技术,可在短时间内实现样品的高效分离和制备。它不使用固相载体作固定相,不仅费用低,而且克服了固相载体带来的样品预处理要求高、吸附、损失、污染和峰形拖尾等特点。鉴于HSCCC的显著特点,此项技术已被应用于生化、生物工程、医药、天然产物化学、有机合成、环境分析、食品、地质及材料

收稿日期:2005-12-12

作者简介:屈焱(1981-),男,重庆人,硕士研究生。

联系人:杨悦武,电话:(022)26736121, E-mail:yyw@tasly.com。

等领域<sup>[7]</sup>。本研究以中药丹参为原料,利用用高速逆流色谱法分离纯化丹参中的丹参酮类单体成分的色谱分离系统,分离纯化了 5 个单体,实验取得了满意的结果。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 试剂与药材

甲醇、乙酸乙酯、石油醚(沸程 60~90)均为分析纯,天津化学试剂三厂;色谱纯甲醇, Fisher; 试验用水为自制二次蒸馏水,硅胶薄层板,青岛海洋化工厂。丹参饮片,天士力集团天士力陕西商洛种植基地。

### 1.2 仪器设备

半制备型高速逆流色谱仪 TBE-300A,上海同田生化技术有限公司。AKTA Prime 柱泵系统、检测系统及组分收集系统,通用医疗器械有限公司。温控恒温水浴,可调温度(-20~50),北京博康医疗器械有限公司。HPLC 高效液相色谱, Waters 2695 分离系统, 2996PDA 检测系统。

## 2 试验方法

### 2.1 样品和溶剂系统的制备

取 1 000 g 丹参饮片, 填充入渗漉筒中, 在室温下用 95% (体积分数) 乙醇约 5 000 mL 渗漉, 收集渗液直到液体颜色接近无色。将收集液在 50℃ 下旋蒸浓缩至约 300 mL, 加入 200 mL 石油醚萃取, 收集石油醚, 重复此操作 4 次。合并石油醚萃取液, 在 50℃ 下旋蒸浓缩, 得粗提膏状物 11.3 g, 保存于 -10℃ 下备用。

取石油醚、乙酸乙酯、甲醇、水, 按体积比 8:6:7:3 配制 HSCCC 用两相溶剂系统, 充分振荡后, 静置分层过夜后备用。

### 2.2 试验步骤

将饱和的两相系统分离, 取分层的上相作为固定相, 下相作为流动相。先将固定相快速注满管柱, 按 800 r/min 正转转速启动主机, 再将流动相以 2 mL/min 的流速泵入, 同时将恒温水浴调至 30℃, 待流动相从管柱出口流出, 紫外检测基线稳定后, 再将溶解有 200 mg 样品的下相溶剂 5 mL 由进样圈注入。管柱出口的流出物经紫外检测(254 nm), 并按响应峰收集相应的组分。经 250 min 洗脱后, 将泵

流速调至 4 mL/min, 直至整个洗脱过程完成。

### 2.3 分离各组分的 HPLC 鉴定

丹参粗提物以及经 HSCCC 分离的各馏分由 Waters 高效液相色谱检测。检测用色谱柱为 Agilent ZORBAX XDB-C18 (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) 反相柱, 检测条件: 甲醇和水的体积比为 8:2, 流速为 1 mL/min, 柱温 25℃, 检测波长 190~600 nm。

## 3 结果与讨论

### 3.1 两相溶剂系统的选择

高速逆流色谱法的应用中, 最关键和最难解决的问题是溶剂系统的选择。不同的溶剂系统具有不同的上、下相之比, 并且粘度、极性、密度等性质的差异, 均会对相同的成分产生不同的溶解分配能力, 形成分配系数的差异, 对分离效果产生显著的影响。为了使丹参粗提物中各组分在 HSCCC 上有较清晰的分割, 需要调整两相溶剂系统中各溶剂的体积比, 使丹参中各组分在两相中达到合适的分配系数 ( $K=0.5\sim 3$ )。根据文献和溶剂选择软件<sup>[8]</sup>给出的溶剂系统信息, 为此选择了下列几种不同的体积比配制的溶剂系统(20%), 取少量粗提样品溶于各体系中, 并用 HPLC 法测定相应各组分的分配系数  $K$ , 检测条件同上, 结果见表 1。从结果中不难看出, 石油醚、乙酸乙酯、甲醇和水配制体积比为 8:6:7:3 时, 大部分所需分离的组分其  $K$  值比较均匀的分布于 0.5~3 范围段的中部, 这对以后高载样量下的清晰分割是比较有利的。

表 1 不同溶剂体系中目标分离组分的  $K$  值

石油醚、乙酸乙酯、 甲醇和水的体积比	分配系数 $K$			
	隐丹参酮	丹参酮	A 丹参酮	二氢丹参酮
8:6:6:4	1.64	3.32	1.60	0.91
8:6:7:3	1.02	2.01	0.96	0.59
8:6:8:3	0.76	1.29	0.73	0.40
8:6:8:2	0.56	1.12	0.54	0.33

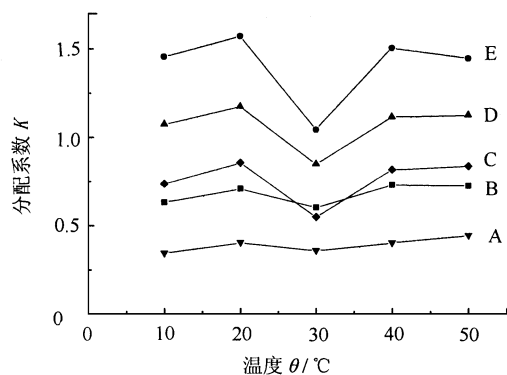
### 3.2 HSCCC 操作参数的确定

溶剂体系选定之后, 需要确定 HSCCC 仪器操作的温度、转速及流动相流量。其中, 温度、转速、流量与固定相的保留率密切相关, 而温度还与目标分离组分在两相中的分配, 及溶解度大小有关。因此, 选择温度、转速和流量为试验因素, 以目标组分分离情况为指标, 结果见表 2。

表2 三因素试验结果

流速 ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	转速 ( $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ )	温度 /	分离效果
1	700	40	组分峰分离度好,分离时间较长。
1	800	20	
1	900	30	
2	700	20	组分峰分离度好,分离时间合适,800r/min时保留值好且无乳化,适于制备。
2	800	30	
2	900	40	
3	700	20	组分峰分离度较差,分离时间短,当转速达900 r/min时,有乳化现象。
3	800	40	
3	900	30	

试验结果表明,800 r/min下,适中的流速2 mL/min,可以达到良好的分离效果。为了进一步确定操作温度,试验考察了选定溶剂体系中温度对不同组分间分配系数 $K$ 值的差异,见图1,由图中不难看出,20℃时组分间 $K$ 值差异较大,因此选用20℃作为操作温度。



A—二氢丹参酮 ;B—隐丹参酮 ;C—丹参酮 ;

D—未知化合物 ;E—丹参酮 A

图1 不同温度下丹参酮的分配系数

### 3.3 进样量的确定

试验结果表明,进样量影响分离度,尤其是最先出现的峰(图2中峰A前面的3个峰)。当样品量增加到150 mg以上时,前3个峰无法分离,而且二氢丹参酮(峰A)与隐丹参酮(峰B)的纯度降低。因此,一次进样量以不超过150 mg为宜。

### 3.4 溶解样品溶剂的确定

丹参粗提物在选定溶剂系统的上、下相中均能溶解,但在下相的溶解度大于上相。试验中分别用

上相、下相和上下相混合溶剂制备样品溶液,并上样分离。结果表明,以上相溶剂和上下相混合溶剂溶解时,分离过程中均存在固定相流失的问题,从而导致分离初期的基线严重漂移;以上相溶解样品时,由于样品在其中的溶解度较小,需要大量的溶剂才能完全溶解样品,而且,由于进样体积较大,造成整个分离过程的分离度大大降低。由于纯度较高的峰A~E5个丹参酮类化合物是本次分离的目标产物,其纯度随分离度的增加而提高,分离初期的基线漂移对其影响较小,因此,选择溶剂系统的下相作为溶样溶剂。

### 3.5 操作过程的优化

根据谱图2可以看到分离后期的两峰D和E

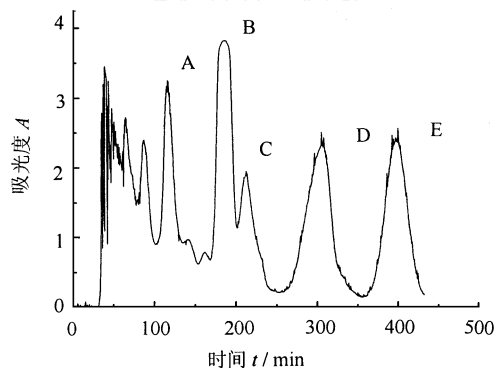


图2 优化前样品 HSCCC 图

的分离度很好,但时间占用较长。考虑分离至操作后半程时,小幅加大流动相的流速,试验结果表明在分离后半程适当的加大流动相的流速至4 mL/min,固定相的流失较少,而且对于各峰的分离没有明显的影响,同时分离时间由原来的420 min缩短至380 min,从而大大的节省了分离的时间,见图3。

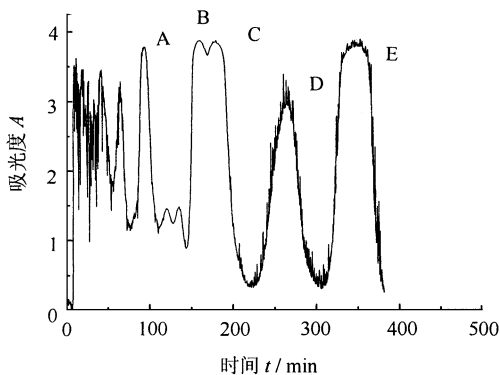


图3 优化后样品 HSCCC 图

### 3.6 TLC 及 HPLC 鉴定结果

试验用标准品隐丹参酮、丹参酮 A、二氢丹参酮 均从国家药品生物制品检定所购得。TLC 检测,薄板在紫外光检测器下观察,所得 5 个丹参酮类化合物均为单点。HPLC 检测,丹参酮的纯度检验采用外标法<sup>[9]</sup>,计算所得重结晶后的隐丹参酮、丹参酮 A、二氢丹参酮 其纯度均大于 98%,其中丹参酮 A 纯度达 99.5%,隐丹参酮的纯度达 98.7%。

## 4 展望

HSCCC 是一种新兴的分离分析技术,适用于极性、非极性化合物的制备分离,在天然产物有效成分的制备性分离有良好的应用<sup>[10]</sup>。随着实验技术方法和仪器的不断的改良发展,它必将成为分离科学领域一种新颖、有效和常用的手段。本研究结果也表明高速逆流色谱在植物化学分离领域具有广阔的应用前景,必将促进植物活性成分的开发和传统中草药的现代化研究。

### 参考文献:

- [1] 艾青. 丹参化学成份及药理作用[J]. 中华医学写作杂志, 2003, 10(9): 847 - 849.
- [2] 杜冠华, 张均田. 丹参现代研究概况与进展[J]. 医药导报, 2004, 23(6): 355 - 360.
- [3] 岑颖洲. 丹参化学成分的研究[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 1993, 14(3): 55 - 60.
- [4] 郭济贤. 丹参的研究与临床应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1992.
- [5] 中国医学科学研究所. 丹参抗菌作用的研究[J]. 新医学杂志, 1978, (3): 123.
- [6] IIO Y. Countercurrent Chromatography Theory & Practice [M]. New York: Marcel Dekker Inc., 1988.
- [7] 霍斯泰德曼 K, 马斯顿 A, 霍斯泰德曼 M. 制备色谱技术在天然产物分离中的应用[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2000.
- [8] LI Zongcheng. Property calculation and prediction for selecting solvent systems in CCC [J]. Liq Chromatogr & Related Tech, 2003, 26(9): 1 397 - 1 415.
- [9] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [10] 戴德舜. 高速逆流色谱研究进展[J]. 分析化学, 2001, 29(5): 586 - 591.