

不同提取方法对丹参中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 含量测定的影响^{*}

毕跃峰, 贾陆, 张小娟, 孙孝丽, 刘宏民

(郑州大学药学院, 郑州 450001)

摘要 目的: 比较不同的提取方法对丹参中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 含量测定的影响。方法: 分别采用加热回流提取、超声波提取和组织破碎提取 3 种提取工艺, 对丹参中丹参酮 II_A (脂溶性成分) 和丹酚酸 B (水溶性成分) 进行提取, 并利用 RP-HPLC 法对二者进行测定。色谱条件: 采用 YMC C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.5% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 270 nm (丹参酮 II_A) 和 286 nm (丹酚酸 B)。结果: 丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 浓度分别在 0.002~0.032 mg·mL⁻¹ ($r=0.9992$) 和 0.015~0.24 mg·mL⁻¹ ($r=0.9997$) 范围内线性关系良好, 组织破碎提取法比加热回流提取法、超声波提取法提取得到的丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 含量高, 而且节时节能。结论: 本法准确、方便、灵敏, 稳定性好, 可作为丹参质量研究手段; 同时表明组织破碎提取法明显优于加热回流提取法、超声波提取法, 高效经济, 是一种值得推广的高新提取工艺。

关键词: 丹参; 丹参酮 II_A; 丹酚酸 B; 组织破碎提取法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1209-04

Effects of different extractive methods on the content determination of tanshinone II_A and salvianic acid B from *Radix Salviae Miltiorrhizae*^{*}

BI Yue-feng, JIA Lu, ZHANG Xiao-juan, SUN Xiao-li, LIU Hong-min

(Pharmacy College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract Objective To study the effects of different extraction methods on the content of tanshinone II_A and salvianic acid B from *Radix Salviae Miltiorrhizae*. **Methods** Heating and refluxing extraction, ultrasonic extraction and smashing extraction were used respectively in the extraction of tanshinone II_A and salvianic acid B. The content of tanshinone II_A and salvianic acid B in *Radix Salviae Miltiorrhizae* were quantitated by using RP-HPLC on the YMC C₁₈ (250mm × 4.6 mm, 5 μm) column with the mobile phase consisting of methanol and 0.5% formic acid in gradient elution (flow rate 1.0 mL·min⁻¹), and the detection wavelength were 270 nm for tanshinone II_A and 286 nm for salvianic acid B. **Results** The linear ranges for tanshinone II_A and salvianic acid B were 0.002–0.032 mg·mL⁻¹ ($r=0.9992$) and 0.015–0.24 mg·mL⁻¹ ($r=0.9997$) respectively. The content of Tanshinone II_A and salvianic acid B, extracted by smashing extraction, was higher than that extracted by refluxing and ultrasonic extraction methods, and it was energy-saving and time-saving. **Conclusion** The method is simple, sensitive, reliable and reproducible and can be used for the quality study of *Radix Salviae Miltiorrhizae*. Smashing extraction is obviously superior to the refluxing and ultrasonic extraction methods. And it is high-active and economical and is a kind of high-tech extraction method to be worth generalizing.

Key words *Radix Salviae Miltiorrhizae*; tanshinone II_A; salvianic acid B; smashing extraction

丹参为唇形科鼠尾草植物 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根及根茎, 为常用的活血化瘀药。始载于《神农本草经》列为上品。其性微寒, 味苦, 无毒。有活血通经, 凉血消肿, 除烦清心之功效^[1]。

临床上广泛用于治疗心血管疾病、肾病、肝病等, 丹参的活性成分可分为水溶性成分和脂溶性成分两大类, 脂溶性成分包括丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 等, 水溶性成分包括丹酚酸 B、迷迭香酸、丹参素、原

* 国家科技型中小企业技术创新项目 (编号: 07C26214100621)

第一作者 Tel: 13939091607; Fax: (0371) 67781908; E-mail: 2000hy@sina.com

儿茶醛等^[2~4]。其中丹参酮 II_A 是丹参中脂溶性化合物的代表成分, 丹酚酸 B 是其水溶性化合物的代表成分。

本实验采用加热回流提取、超声波提取和组织破碎提取 3 种方法提取丹参中丹参酮和丹酚酸 B, 并采用 HPLC 法对二者进行了测定。结果表明不同的提取方法对丹参中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 含量测定的影响较大。本法准确、方便、灵敏、稳定性好, 可用于丹参及其产品的质量评价; 组织破碎法提取效率明显优于加热回流和超声波 2 种提取法, 而且大幅度地节能节时节约溶剂, 为对其进一步的研究和推广应用提供了科学依据。

1 仪器与试剂

HPLC 系统: G1314AVWD 紫外检测器; G1311A 四元泵; Agilent Chemstation 色谱工作站; BP211D 分析天平 (德国赛多利斯); KQ5200E 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); FW177 中药粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司); PA6-GF30 闪式提取器 (北京金鼎科技发展有限公司); BXHW 电热套 (北京科伟永兴有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。

对照品丹参酮 II_A (批号 110766-200416) 及丹酚酸 B (批号 111562-200403) 均购自中国药品生物制品检定所; 丹参采自河南省方城县, 由郑州大学刘若庸教授和潘成学副教授鉴定为唇形科鼠尾草植物 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎; 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 95% 乙醇、甲酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 YMC C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 25 ℃; 以甲醇 (A) - 0.5% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 进行梯度洗脱 [0~30 min, A-B (35:65); 30~35 min, A-B (35:65) → A-B (80:20); 35~50 min, A-B (80:20)], 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 丹酚酸 B 为 286 nm (0~30 min), 丹参酮 II_A 为 270 nm (30~50 min); 进样量 20 μL。

2.2 对照品储备液的配制 精密称取对照品丹参酮 II_A 5 mg 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得丹参酮 II_A 对照储备液; 精密称取丹酚酸 B 5 mg 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得丹酚酸 B 对照品储备液。

2.3 供试品溶液的配制

2.3.1 加热回流提取法 取干燥粉碎过 6 号筛的丹参粉末 50 g 精密称定, 置圆底烧瓶中, 浸泡 20 min 加热回流提取 3 次 (电热套加热, 温度设定为

65 ℃); 每次精密加入 75% 乙醇 400 mL, 提取时间分别为 45, 40, 40 min, 静置 10 min, 过滤, 合并 3 次滤液, 浓缩, 即得浸膏, 精密称定。精密称取浸膏 50 mg 置 50 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 以微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 备用。同法制备 3 批样品的供试品溶液。

2.3.2 超声波提取法 取干燥粉碎过 6 号筛的丹参粉末 50 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 浸泡 20 min, 利用超声波清洗机超声波室温提取 3 次: 每次精密加入 75% 乙醇 400 mL, 提取时间分别为 30, 25, 20 min, 静置 10 min, 过滤, 合并 3 次滤液, 浓缩, 即得浸膏, 精密称定。精密称取浸膏 50 mg 置 50 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 以微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 备用。同法制备 3 批样品的供试品溶液。

2.3.3 组织破碎法 取丹参药材 50 g 精密称定, 浸泡 20 min, 利用“闪式提取器”破碎室温提取 3 次: 每次分别精密加入 75% 乙醇 350, 300, 300 mL, 提取时间分别为 3, 2, 2 min, 静置 10 min, 过滤。合并 3 次滤液, 浓缩, 即得浸膏, 精密称定。精密称取浸膏 50 mg 置 50 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 以微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 备用。同法制备 3 批样品的供试品溶液。

2.4 线性关系

2.4.1 丹参酮 II_A 精密量取丹参酮 II_A 对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mL, 分别置于 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得系列对照品溶液。在“2.1”项色谱条件下进样测定。以丹参酮 II_A 的峰面积为纵坐标, 进样浓度 (mg · mL⁻¹) 为横坐标, 计算回归方程为:

$$Y = 121.3X + 26.60 \quad r = 0.9992$$

丹参酮 II_A 浓度在 0.002~0.032 mg · mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好。

2.4.2 丹酚酸 B 精密量取丹酚酸 B 对照品储备液 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 mL, 分别置于 5 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得系列对照品溶液。在“2.1”项色谱条件下进样测定。以丹酚酸 B 的峰面积为纵坐标, 进样浓度 (mg · mL⁻¹) 为横坐标, 计算回归方程为:

$$Y = 27.09X - 218.4 \quad r = 0.9997$$

丹酚酸 B 浓度在 0.015~0.24 mg · mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好。

2.5 精密度试验 取上述超声波提取法制得的供试品溶液重复测定 6 次, 测得丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 为 1.3%, 丹酚酸 B 峰面积的 RSD 为 1.7%。

2.6 重复性试验 按照“2.3.1”,“2.3.2”,“2.3.3”项下方法,同一批药材分别平行制备 5 份供试品溶液,进行测定。结果采用加热回流提取法、超声波提取法及组织破碎法测得的丹参酮Ⅱ_A平均含量($n=5$)分别为 0.229%, 0.251%, 0.314%, RSD 分别为 1.6%, 1.4%, 2.7%;丹参酚酸 B 平均含量($n=5$)分别为 1.81%, 1.53%, 2.46%, RSD 分别为 1.2%, 0.73%, 1.9%。表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 将加热回流、超声、组织破碎 3 种提取方法制得的供试品溶液,每隔 2 h 分别测定 1 次,结果丹参酮Ⅱ_A峰面积的 RSD 分别为 2.0%, 1.2%, 2.0%;丹参酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.5%, 1.2%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 回收率试验 采用标准加入法,加热回流提取法、超声波提取法及组织破碎法测得的丹参酮Ⅱ_A的平均回收率($n=5$)分别为 97.11%, 96.30%, 95.90%, RSD 分别为 2.4%, 1.4%, 2.5%;丹酚酸 B 的平均回收率($n=5$)分别为 98.07%, 98.41%, 97.85%, RSD 分别为 1.7%, 0.49%, 1.9%。

2.9 测定结果 取不同提取方法丹参的供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,用外标法计算。不同提取工艺比较及含量测定结果见表 1,色谱图见图 1。

表 1 不同提取方法提取中丹参酮Ⅱ_A和丹酚酸 B 工艺研究与含量测定结果

Tab 1 The contents of tanshinoneⅡ_A and salvianolic acid B in Radix Salviae miltiorrhizae with different extraction methods

	加热回流提取法 (heating and refluxing extraction)	超声提取法 (ultrasonic extraction)	破碎提取法 (smashing extraction)
乙醇浓度 (ethanol concentration) %	75	75	75
提取温度 (temperature) /℃	65	室温 (room temperature)	室温 (room temperature)
提取时间 (time) /min	60 60 60	35 30 25	3 2 2
溶剂量 (solvent amount) /mL	400 400 400	400 400 400	350 300 300
得膏率 (extract rate) %	40.4 39.5 40.8	37.5, 37.9	41.3 42.2
平均值 (mean) %, RSD %	40.2 1.2	37.4 0.8	41.7 0.7
丹参酮Ⅱ _A 含量 (tanshinoneⅡ _A content) %	0.238 0.228	0.240, 0.249	0.307, 0.303
平均值 (mean) %, RSD %	0.236 1.1	0.245 0.7	0.302 1.0

续表

	加热回流提取法 (heating and refluxing extraction)	超声提取法 (ultrasonic extraction)	破碎提取法 (smashing extraction)
丹参酚酸 B 含量 (salvianolic acid B content) %	1.88 1.91	1.65 1.70	2.33 2.35
平均值 (mean) %, RSD %	1.90 0.9	1.67 1.0	2.36 1.4

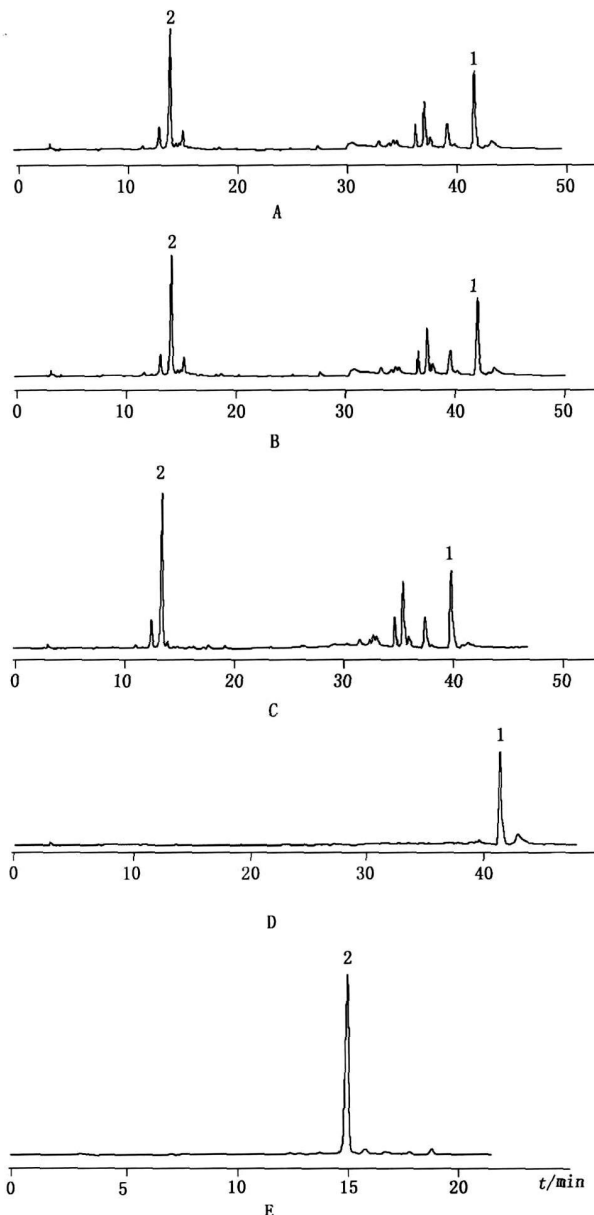


图 1 丹参酮Ⅱ_A和丹酚酸 B 含量测定色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram for the quantitation of tanshinoneⅡ_A and salvianolic acid B.

A. 加热回流提取法 (heating and refluxing extraction) B. 超声波提取法 (ultrasonic extraction) C. 组织破碎提取法 (smashing extraction) D. 丹参酮Ⅱ_A对照品 (reference substance of tanshinoneⅡ_A) E. 丹酚酸 B 对照品 (reference substance of salvianolic acid B)
1. 丹参酮Ⅱ_A (tanshinoneⅡ_A) 2. 丹酚酸 B (salvianolic acid B).

3 讨论

3.1 提取工艺研究

中药提取新工艺与新设备的开发研究, 是中药现代化的前提和拟待解决的关键技术之一, 然而我们至今无论在实验室还是在生产中, 仍然多用的是些传统提取工艺与设备, 如水煎煮提取法、回流提取法等, 这些传统提取工艺均存在着耗能、费时、提取效率低、破坏有效成分等不足, 中药提取新工艺研究的严重滞后影响了中药现代化的进程。

本实验利用加热回流提取法、超声波提取法和组织破碎提取法提取丹参中丹参酮和丹参酚酸并测定含量, 结果表明不同的提取方法对丹参中丹参酮 II_A和丹酚酸 B 含量测定的影响较大。“闪式提取器”(专利号: ZL 2005 2 0031604. 9)是运用组织破碎提取原理设计的中药提取新设备, 试验结果也同时表明组织破碎提取法较其他 2 种提取方法有着突出的优越性: 提取效率高(丹参酮 II_A和丹参酚酸 B 含量均高出其他 2 种方法), 而且大幅度地节约了能量、时间和溶剂, 是一种值得推广应用的高科技提取新工艺。

3.2 提取溶剂的选择 为有效地将丹参中脂溶性和水溶性成分同时提取出来, 使工艺更加简单经济, 经过文献查阅和前期试验研究^[4~8], 利用 75% 乙醇作为溶剂, 经过 3 次提取, 能较好地完成 2 种不同极性成分的同时提取, 并且 75% 乙醇溶剂较之其他溶剂具有低毒、经济的优势。并根据文献资料研究和前期试验研究^[4~8], 本文确定了回流提取、超声波提取的最佳时间。

3.3 流动相的选择 曾对不同比例流动相系统(甲醇-水, 甲醇-乙腈-甲酸-水, 甲醇-0.5%

甲酸水)等进行探索研究, 结果表明以甲醇-0.5% 甲酸水的分离度、保留时间较为理想, 能使丹参酮 II_A和丹参酚酸 B 与其他成分达到基线分离, 该方法稳定方便, 可以用于丹参药材及其产品的质量评价方法中。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2000. Vol I (一部): 57
- 2 KANG Ting-guo(康廷国). The Appraisal of Traditional Chinese Medicine(中药鉴定学). Beijing(北京): China Press of Chinese Traditional Chinese Medicine(中国中医药出版社), 2002 172
- 3 ZHENG Hu-zhan(郑虎占), DONG Ze-hong(董泽宏), YU Qian Research and Application Modernization of Traditional Chinese Medicine(中药现代化研究及应用). Beijing(北京): Academy Press(学苑出版社), 1997. 1100
- 4 MAO Ming-san(苗明三), LI Zheng-guo(李振国). Quality Control Technology of Modern Practical Traditional Chinese Medicine(现代实用中药质量控制技术). Beijing(北京): People's Publishing House(人民出版社), 2000. 247
- 5 WANG Hai-hua(王海华). The stability analysis of Fufang Danshen tablets(复方丹参片的稳定性分析). J Guangxi Coll Tradit Chin Med(广西中医学院学报), 2005, 8(3): 96
- 6 DU Guan-hu(杜冠华), ZHANG Jun-tian(张均田). Water-solubility effective component of Danshen—Research development of salvianolic acid B(丹参水溶性有效成分—丹酚酸研究进展). Basic Med Sci Clin(基础医学与临床), 2000, 20(5): 394
- 7 Zhou LM, Chow Moses Zuo Z. Improved quality control method for Danshen products—Consideration of both hydrophilic and lipophilic active components J Pharm Biomed Anal, 2006(41): 744
- 8 Pan XJ, Ni GG, Liu HZ. Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge Biochem Eng J, 2002(12): 71

(本文于 2009 年 6 月 5 日修改回)