

研究表明,补肾益气活血方可上调胎鼠脑 IGF-I 和 IGFBP-3 表达,提示补肾益气活血方具有促进神经细胞增殖和保护大脑细胞的作用,这对胎儿以后体格和智力的正常发育无疑具有重要的意义。

精氨酸作为 NO 的前体,具有扩张子宫动脉血管、提高胎盘血流量的作用,能增加胎儿在子宫内的营养供给。中药组与精氨酸组相比,两者在出生体质量方面差异无统计学意义,但中药组对 IGF-I 表达的上调作用强于精氨酸组,可能对胎儿神经系统的发育具有更加积极的意义,进一步说明补肾益气活血方较单纯扩管治疗具有更全面的防治作用,其作用靶点不仅在于改善子宫胎盘血流量,而可能具有多靶点、多用途的综合效应。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.08.001

参考文献

- [1] MANY A, FATTAL A, LEITNER Y, et al. Neurodevelopmental and cognitive assessment of children born growth restricted to mothers with and without preeclampsia [J]. *Hypertens Pregnancy*, 2003, 22(1): 25-29.
- [2] VERKAUSKIENE R, BELTRAND J, CLARIS O, et al. Impact of fetal growth restriction on body composition and hormonal status at birth in infants of small and appropriate weight for gestational age [J]. *Eur J Endocrinol*, 2007, 157(5): 605-612.
- [3] 马健, 麻宏伟, 田晓博, 等. 胎儿生长受限儿童学龄期的智力水平和智力结构分析 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(10): 833-835.
- [4] ONG K, KRATZSCH J, KIESS W, et al. Size at birth and cord blood levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) IGF-II/IGF-binding protein-1 (IGFBP-1) IGFBP-3 and the soluble IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in term human infants. The ALSPAC Study Team. Avon

Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(11): 4266-4269.

- [5] YOUNOSZAI M K, PELOSO J, HAWORTH J C. Fetal growth retardation in rats exposed to cigarette smoke during pregnancy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1969, 104(8): 1207-1213.
- [6] VOSATKA R J, HASSOUN P M, HARVEY-WILKES K B. Dietary L-arginine prevents fetal growth restriction in rats [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1998, 178(2): 242-246.
- [7] RUSSO V C, GLUCKMAN P D, FELDMAN E L, et al. The insulin like growth factor system and its pleiotropic functions in brain [J]. *Endocr Rev*, 2005, 26(7): 916-943.
- [8] WERTHER G A, RUSSO V, BAKER N, et al. The role of the insulin-like growth factor system in the developing brain [J]. *Horm Res*, 1998, 49(Suppl 1): 37-40.
- [9] CONOVER C A, POWELL D R. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 blocks IGF-I-induced receptor down-regulation and cell desensitization in cultured bovine fibroblasts [J]. *Endocrinology*, 1991, 29(2): 710-716.
- [10] KALLURI H S, DEMPSEY R J. IGFBP-3 inhibits the proliferation of neural progenitor cells [J]. *Neurochem Res*, 2010, 36(3): 406-411.
- [11] WALKER D M, MARLOW N. Neurocognitive outcome following fetal growth restriction [J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2008, 93(4): 322-325.
- [12] 舒益民, 黄光英, 原本旭, 等. 补肾益气活血方对宫内生长迟缓胎儿一氧化氮及脂质过氧化水平的影响 [J]. *微循环杂志*, 1999, 9(3): 14-16.
- [13] 黄光英, 舒沪英, 叶望云, 等. 活血化淤方药防治不匀称型胎儿宫内生长迟缓的作用机理探讨 [J]. *中西医结合杂志*, 1990, 10(3): 157-159.
- [14] 王琪, 黄光英, 袁永辉, 等. 补肾益气活血方对宫内发育迟缓胎鼠肝脏 IGF-I 表达的影响 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2003, 32(2): 212-215.

白花丹参脂溶性成分

超临界二氧化碳流体萃取与气相色谱-质谱分析*

王海燕¹, 李玉琴², 王广旭²

(1. 山东省泰安市药品检验所, 271000; 2. 泰山医学院药学院, 山东泰安 271016)

摘要 目的 采用超临界二氧化碳流体萃取与气相色谱-质谱技术谱分析白花丹参脂溶性成分。方法 采用正交实验, 以萃取温度、萃取时间、萃取压强及夹带剂浓度为考察因素, 以萃取率为指标, 确定白花丹参脂溶性成分超临界二氧化碳萃取的最佳条件, 并用气质联用技术对脂溶性化学成分进行分析。结果 白花丹参脂溶性成分最佳提取工艺为萃取温度 45℃, 萃取时间 1.5 h, 萃取压强 25 MPa, 乙醇浓度 90%。用气质联用技术从中鉴定了 22 种化合物, 其中丹参酮类成分以铁锈醇 (5.54%)、丹参酮 II A (12.54%)、隐丹参酮 (8.39%) 及异隐丹参酮 (11.92%) 为主。结论 白花丹参脂溶性提取物可作为一种富含丹参酮类化合物和不饱和脂肪酸的重要原材料, 该实验结果为白花丹参的进一步开发

利用提供理论依据。

关键词 白花丹参; 萃取, 超临界, 二氧化碳; 气相色谱-质谱联用

中图分类号 R286; TQ450.1

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2011)08-0979-04

Extraction of Liposoluble Components in *Salvia Bunge f. alba* by Supercritical Fluid Carbon Dioxide and Chemical Analysis by GS-MS

WANG Hai-yan¹, LI Yu-qin², WANG Guang-xu² (1. *Institute for Drug Control of Taian City, Shandong Province, Taian 271000, China*; 2. *College of Pharmacy, Taishan Medical University, Taian 271016, China*)

ABSTRACT Objective To isolate the liposoluble components in *Salvia Bunge f. alba* by supercritical fluid carbon dioxide and take a chemical analysis by gas chromatography mass spectrometry (GS-MS). **Methods** $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to optimize the supercritical fluid extraction (SFE) of liposoluble components in *Salvia Bunge f. alba* based on extracting temperature, duration, pressure and concentration of entrainer and the chemical composition of which was analyzed by GS-MS.

Results The optimal process was making the extraction for 1.5 h at 45 °C, under the pressure of 25 MPa, and with 90% ethanol as a modifier. 22 compounds were identified by GC-MS, in which the main constituents were ferruginol (5.54%), tanshinon IIA (12.54%), cryptotanshinone (8.39%), and isocryptotanshinone (11.92%). **Conclusion** The SFE technique was successfully applied to the extraction of the liposoluble in *Salvia Bunge f. alba*. The extraction could be a kind of important materials coating a lot of tanshinons and unsaturated fatty acids. The result offered a theory guidance to further empolder and utilize *Salvia Bunge f. alba*.

KEY WORDS *Salvia Bunge f. alba*; Supercritical fluid carbon dioxide; Gas chromatography mass spectrometry

白花丹参(*Salvia Bunge f. alba* C. Y. Wu) 系唇形科鼠尾草属植物, 是丹参的白花变型, 为多年生草本植物, 是主产于泰山及其周边地区的道地药材。白花丹参除具有丹参的功效外, 治疗血栓闭塞性脉管炎有独特疗效。其脂溶性有效成分大多为共轭醌、酮类化合物, 主要为丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮、丹参酮Ⅰ^[1]。它们均具有天然抗氧化、抗动脉粥样硬化、降低心肌耗氧量及抗菌抗炎等作用^[2], 但目前其分离量小, 市场难以得到, 为进一步研究其生物活性及药理作用等带来困难。近 30 a 来, 超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE) 二氧化碳(CO₂) 萃取因操作温度低、分离效率高且无溶剂残留等优点, 被应用于中草药有效成分的提取^[3-4]。笔者拟采用正交实验研究 SFE-CO₂ 白花丹参脂溶性成分的萃取工艺, 并用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 法分析其成分, 以便为白花丹参的资源开发与合理利用提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 HA121-50-06 型超临界萃取装置(江苏南通华安超临界萃取有限公司), QCMS-QP2010 气相色

收稿日期 2010-11-13 修回日期 2011-01-14

基金项目 * 山东省教育厅资助项目(基金编号: J09LF30)

作者简介 王海燕(1972-), 女, 山东泰安人, 主管药师, 学士, 主要从事中药制剂分析工作。电话: 0538-8334565, E-mail: zhongyaowang09@163.com。

通讯作者 李玉琴(1968-), 女, 甘肃金昌人, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向: 药物分析。电话: 0538-6229751, E-mail: lqq29@163.com。

谱质谱联用仪(日本岛津公司)。

1.2 试剂 白花丹参药材(山东泰安产, 经泰山医学院李同德教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物的干燥根及根茎), CO₂(纯度>99.9%), 无水乙醇(天津市永大化学试剂开发中心, 批号: 20090629), 超纯水(实验室自制, 批号: 20090630)。

2 方法

2.1 超临界 CO₂ 萃取流程 将药材投入萃取釜中, 对萃取釜、分离釜、贮罐分别进行加热或冷却, 当系统各部分达到设定温度后, 开启 CO₂ 钢瓶, CO₂ 气体经净化器净化后液化, 由高压调压柱塞泵送入预热器预热, 经净化再进入萃取釜, 升压到预定设置值, 使 CO₂ 成超临界流体, 对白花丹参中的脂溶性成分进行萃取, CO₂ 经分离釜减压, 与萃取物分离后循环使用。

2.2 超临界 CO₂ 萃取工艺优化 将粉碎后的白花丹参 300 g 放入萃取釜中, 按“2.1”所述的方法萃取, 将萃取物用对应浓度的乙醇定容至 500 mL。将萃取物摇匀, 取适量, 用孔径 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液备用。以白花丹参脂溶性成分的萃取率为考核指标, 以影响其萃取率的四个因素变量(温度、压强、时间、乙醇浓度), 设计三水平四因素的正交实验表 [$L_9(3^4)$ 表](表 1)。

2.3 萃取率的计算 萃取率(%) = $G_1 / G_2 \times 100\%$ 。 G_1 为丹参酮Ⅱ_A 峰面积, G_2 为样品质量(g)。

2.4 萃取物的 GC-MS 分析 色谱条件: 弹性毛细管柱 Rtx-1 MS(30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 载气为高纯氮气, 进样口温度 280 °C, 柱流量 0.63 mL·min⁻¹, 柱前压 52 kPa, 分流比 10:1。程序升温: 柱温 150 °C, 保

持 2 min, 以 $3\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速率升温至 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min。质谱条件: 接口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, 电离方式为电子轰击 (electron impact, EI), 电子能量 70 eV, 离子源温度 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, 标准调谐方式, 质量扫描方式为全扫描, 溶剂延迟 1.5 min, 质量扫描范围 $45 \sim 500\text{ amu} \cdot \text{s}^{-1}$, NIST05 标准质谱检索库。

表 1 超临界 CO_2 萃取白花丹参脂溶性成分正交实验设计表

Tab. 1 The orthogonal test design of extraction technology of liposoluble constituent from *Salvia Bunge f. alba* by SFE-CO_2

水平	温度/ $^{\circ}\text{C}$	压强/ MPa	萃取时间/ h	乙醇浓度/ %
1	40	20	1.0	80
2	45	25	1.5	90
3	50	30	2.0	100

3 结果

3.1 超临界 CO_2 萃取实验结果 见表 2。

表 2 超临界 CO_2 萃取白花丹参脂溶性成分正交实验结果

Tab. 2 The results of orthogonal test of extraction technology of liposoluble constituent from *Salvia Bunge f. alba* by SFE-CO_2

编号	温度/ $^{\circ}\text{C}$	压强/ MPa	萃取时间/ h	乙醇浓度/ %	萃取率/ %
1	40	20	1.0	80	4.31
2	40	25	1.5	90	5.75
3	40	30	2.0	100	5.03
4	45	20	1.5	100	8.14
5	45	25	2.0	80	8.63
6	45	30	1.0	90	7.61
7	50	20	2.0	90	6.67
8	50	25	1.0	100	5.68
9	50	30	1.5	80	6.15
K_1	5.030	6.373	5.867	6.363	
K_2	8.127	6.687	6.680	6.677	
K_3	6.167	6.263	6.777	6.283	
R	3.097	0.424	0.910	0.394	

表 4 超临界 CO_2 萃取的白花丹参脂溶性成分

Tab. 4 Name and relative content of liposoluble constituent from *Salvia Bunge f. alba* by SFE-CO_2

峰号	保留时间/ min	化合物中文名称	化合物英文名称	分子式	相对分子质量	峰面积/%	相似度/%
1	3.287	5-羟脯氨酸	5-Oxoproline	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$	129	2.37	85
2	17.689	邻苯二甲酸二异丁酯	Diisobutyl phthalate	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	278	4.15	77
3	18.418	1-(+)-抗坏血酸 2,6-双癸酸	1-(+)-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate	$\text{C}_{38}\text{H}_{68}\text{O}_8$	652	4.36	91
4	21.092	7-异丙基-1,1,4a,3-甲基-1,2,3,4,4a,9,10,10a-8 氢菲	7-Isopropyl-1,1,4a-trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}$	270	4.41	89
5	22.164	葎草烯-1,6-二烯醇	Humulane-1,6-dien-3-ol	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	222	4.87	88
6	23.327	(Z,Z)-9,12-癸三烯酸	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	280	5.81	91

3.2 影响因素分析 对上述正交实验结果采取方差分析 (表 3), 以偏差平方和最小的因素浓度作误差分析其他因子的显著性。结果表明, 在所选定的实验范围内, 四因素主次关系为: 萃取温度、萃取时间、萃取压强和乙醇浓度。选取最优水平组合的原则, 白花丹参脂溶性成分超临界 CO_2 萃取的最佳工艺条件为: 萃取温度 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 萃取时间 1.5 h, 萃取压强 25 MPa, 乙醇浓度 90%。笔者采用该组合条件进行了萃取试验, 在此条件下白花丹参脂溶性成分的萃取率可达 9.07%。

表 3 超临界 CO_2 萃取白花丹参脂溶性成分正交实验方差分析

Tab. 3 Variance analysis of extraction technology of liposoluble constituent from *Salvia Bunge f. alba* by SFE-CO_2

方差来源	偏差平方和	自由度	F	P
温度	14.723	2	56.846	<0.05
压强	0.289	2	1.116	>0.05
时间	1.499	2	5.788	>0.05
浓度	0.259	2	1.000	>0.05
误差	0.26	2	...	>0.05

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0, F_{0.1}(2, 2) = 9.0$$

3.3 超临界 CO_2 萃取的白花丹参脂溶性成分 GC/MS 分析 将萃取物摇匀, 取适量, 用孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取滤液 $1\text{ }\mu\text{L}$ 进样。得到总离子流色谱图 (图 1), 采用峰面积归一化法定量, 得白花丹参中的脂溶性成分的相对含量, 结果见表 4。

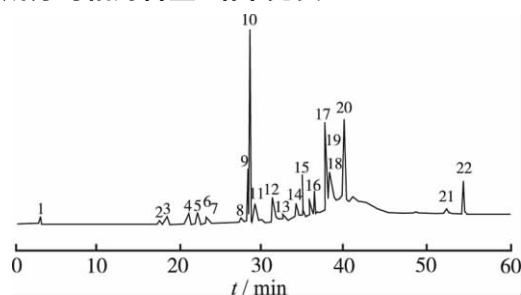


图 1 超临界 CO_2 萃取白花丹参脂溶性成分 GC/MS 分析总离子流图

Fig. 1 TIC of liposoluble constituent from *Salvia Bunge f. alba* by SFE-CO_2

续表 4 超临界 CO₂ 萃取的白花丹参脂溶性成分

峰号	保留时间/ min	化合物中文名称	化合物英文名称	分子式	相对分 子质量	峰面 积/%	相似 度/%
7	23.433	亚麻酸	Linolenic acidmethyl ester	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	3.99	84
8	27.575	9-cis-维生素 A 醛	9-cis-Vitamin A Aldehyde	C ₂₀ H ₂₈ O	284	4.71	70
9	28.262	松香酸-6,8,11,13-醋酸酯	Abieta-6,8,11,13-tetraen-12-yl acetate	C ₂₂ H ₃₀ O ₂	326	5.88	83
10	28.497	铁锈醇	Ferruginol	C ₂₀ H ₃₀ O	286	5.54	88
11	31.359	3-[3 甲基甲硅烷基] 四烯-17	3-[Trimethylsilyl]oxy tetraen-17-one	C ₂₁ H ₂₈ O ₂ Si	340	6.34	73
12	31.749	9(1H)-菲酮,2,3,4,4a,10,10a-六氢-6-氢-1,4a-三甲基-7-(1-甲基乙基)-, (4aS-trans)	2,3,4,4a,10,10a-hexahydro-6-hydroxy-1,1,4a-trimethyl-7-(1-methylethyl)-(4aR-trans)-	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300	3.92	75
13	32.644	二氢丹参酮	Dihydrotanshinone	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	278	4.83	70
14	34.221	8-丁基-5,6-二氢苯并喹啉-1,3-二胺	8-Butyl-5,6-dihydrobenzo [b] quinazoline-1,3-diamine	C ₁₆ H ₂₀ N ₄	268	5.65	73
15	35.017	2,6-对(1,1-二甲基乙基)-4-苯基苯酚	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-phenylphenol	C ₂₀ H ₂₆ O	282	3.97	71
16	35.832	9(1H)-菲酮,2,3,4,4a,10,10a-六氢-6-氢-1,4a-三甲基-7-(1-甲基乙基)-, (4aS-trans)	2,3,4,4a,10,10a-hexahydro-6-hydroxy-1,1,4a-trimethyl-7-(1-methylethyl)-(4aS-trans)-	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300	6.24	89
17	36.090	2,3,9-三甲氧基-二苯并环庚酮	Dibenz [b,l] cycloheptanone-2,3,9-trimethoxy-	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	298	5.51	72
18	36.406	异隐丹参酮	Isocryptotanshinone	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	296	11.92	80
19	38.298	丹参酮 II A	Tanshinon II	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294	12.54	80
20	40.173	隐丹参酮	Cryptotanshinone	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	296	8.39	83
21	52.406	β-豆甾醇	β-Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	7.56	82
22	54.471	3-β-羟基-5-胆烯酸	3-β-Hydroxy-5-cholenic acid	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	374	9.83	73

4 讨论

利用正交实验法优化白花丹参萃取脂溶性成分的工艺,最佳的工艺条件为: 萃取温度 45 ℃, 萃取时间 1.5 h, 萃取压强 25 MPa, 乙醇浓度 90%, 在此条件下白花丹参脂溶性成分的萃取率可达 9.07%。

将萃取所得的白花丹参脂溶性成分经 GC-MS 分析,共鉴定出 20 种化合物。由表 4 可以看出,白花丹参脂溶性成分含丹参酮 II A (12.54%)、隐丹参酮 (8.39%) 及异隐丹参酮 (11.92%)。从质谱的总离子流图 1 可知, SFE-CO₂ 图谱显示的峰更为丰富,提供的信息量也就更大,也说明以超临界流体作为前处理方法处理白花丹参药材更能保留药材中的化学成分,适合提取丹参药材中的脂溶性成分^[5-6]。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.08.002

参考文献

[1] 齐永秀,高允生,夏作理,等. 白花丹参不同部位微量元素分析比较 [J]. 微量元素与健康研究,2004,21(1):20-22.
[2] 肖淮,彭文珍,王正荣. 丹参抑制牵张诱导的心肌细胞 NF-κB 激活的观察 [J]. 华西药学杂志,2000,14(4):257-261.
[3] 邵荣,钱仁渊,秦金平,等. 超临界 CO₂ 萃取技术在油脂和脂肪酸分离中的应用 [J]. 中国油脂,2001,26(5):9-12.
[4] LIU B, LOCKWOOD G B, GIFFORD A. Supercritical fluid extra-ction of diosgenin from tubers of dioscorea nipponica [J]. J Chromatogr A,1995,690(2):250-253.
[5] 奕军. 试验设计的技术与方法 [M]. 上海: 上海交通大学出版社,1986:30-35.
[6] 张得权,胡晓丹. 食品超临界 CO₂ 流体加工技术 [M]. 北京: 化学工业出版社,2005:23-28.