

文章编号: 1001-6880(2006)01-0100-05

高速逆流色谱法分离制备丹酚酸 B

王凤美¹, 陈军辉², 李 磊³, 黎先春³, 王小如^{1,3*}

(1. 厦门大学化学化工学院化学系现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005;

2. 南昌大学食品科学教育部重点实验室, 南昌 330047;

3. 国家海洋局第一海洋研究所青岛市现代分析科技与中药标准化重点实验室, 青岛 266061)

摘要: 采用高速逆流色谱法分离纯化丹参水溶性成分丹酚酸类物质, 制备丹酚酸 B 化学对照品。分离采用的溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-水-甲醇(1.5:5:5:1.5), 上相做固定相, 下相做流动相, 流速为 1.7 mL/min, 仪器转速 850 rpm, 进样量 80 mg, 纯度用 HPLC 方法测定。结果表明: 一次分离可制备 63.4 mg 丹酚酸 B, 其纯度为 98.6%。该方法操作简单, 可作为高纯度丹酚酸 B 化学对照品的制备分离方法。

关键词: 丹参; 丹酚酸 B; 高速逆流色谱

中图分类号: R284.2; Q946.91

文献标识码: A

Preparative Separation of Salvianolic Acid B from *Salvia miltiorrhiza* by High Speed Counter-Current Chromatography

WANG Feng-mei¹, CHEN Jun-hui², LI Lei³, Frank Sen-Chun³, WANG Xiao-ru^{1,3*}

(1. The Key Laboratory of Analytical Science of MOE, the College of Chemistry and Chemical Engineering,

Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. The Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education,

Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Qingdao Key Lab on Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China)

Abstract Salvianolic acid B, a major bioactive component in Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bge.), was isolated and purified by high-speed counter-current chromatography (HSCCC) in semi-preparative scale from the crude extract of Danshen. Separation was performed with a two-phase solvent system composed of hexane-ethyl acetate-water-methanol (1.5:5:5:1.5 v/v) by eluting the lower aqueous phase at a flow-rate of 1.7 mL/min and a revolution speed of 850 rpm with injection volume of 80 mg. After the proceeding of separation, 63.4 mg salvianolic acid B was obtained, and analyzed by normalization method according to HPLC areas giving a purity of 98.6%. HSCCC is a recommendable method to prepare and purify the active constituents from *Salvia miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; Salvianolic acid B; HSCCC

丹参为唇形科植物 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦之功效^[1]。丹参主要含两类有效成分: 一为脂溶性的二萜类化合物, 二为水溶性的多聚酚酸类成分。实验研究证明, 丹参水溶性成分具有多方面的药理活性, 特别是表现出很强的抗氧化活性, 这些药理作用吸引着研究人员开发出一批具有较高水平的药物应用于临床^[2-3]。丹酚酸 B 为丹参中重要的水溶性有效成分之一, 由三分子丹参素与一分子咖啡酸缩合

而成, 在 2005 版中国药典中, 已将丹酚酸 B 作为丹参片的指标成分^[1]。据报道, 丹酚酸 B 有强烈的抗氧化和清除氧自由基的活性, 其抗脂质过氧化作用约为维生素 E 的 1000 倍, 对肾功能不全和肝损伤均有一定保护作用^[4]。分离制备丹参水溶性活性成分对进一步揭示丹参药效的物质基础和开发新的天然药物具有十分重要的意义。

高速逆流色谱 (High-speed Counter-current Chromatography, HSCCC) 是近几十年来迅速发展的新型液-液分配色谱技术, 其特点是被分离物质在两液相中进行分配分离, 不需任何固相载体, 克服了固相载体带来的样品吸附、损失、污染、峰形拖尾等缺点, 样品的回收率高, 预处理简单^[5], 已被广泛应用于天然药

收稿日期: 2005-05-27 接受日期: 2005-06-21

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(20235020); 厦门市科技创新重点项目(3502220031096)

*通讯作者 Tel: 86-532-88963253; E-mail: mt2ep@fio.org.cn

物成分的分离制备和中药的分析鉴定中^[6-9]。目前, 高效逆流色谱法分离纯化丹参脂溶性成分的研究已有文献报道^[10-13], 而丹参水溶性有效成分的高效逆流色谱法分离纯化国内还未见报道。本文采用 HSCCC 分离、纯化、制备中药丹参的水溶性活性成分丹酚酸 B, 为制备丹参水溶性有效成分的化学对照品提供了一种简捷实用的新方法。

1 实验仪器与材料

仪器: TBE-300A 型高速逆流色谱仪(深圳同田生化技术有限公司, 包括 SePu3000 色谱工作站和溶剂选择系统); 3057 型便携式记录仪(四川仪表总厂); 8823A 型紫外检测仪(北京市新技术应用研究所); S1007 型微机单缸泵(北京圣易通技术开发有限责任公司)。Agilent 1100 HPLC 仪(美国 Agilent 公司, 包括输液泵、脱气装置、自动进样装置和 DAD 检测器); MIKRO 22R 冷冻离心机(德国 Hettich 公司); FD-1 冷冻干燥机(北京博医康技术公司); SK3200LH 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); Milli-Q 超纯水制备系统(Millipore 公司, 美国)。

药品与试剂: 乙酸乙酯、正己烷、乙酸均为分析纯, 乙腈、三氟乙酸为色谱纯, 用于 HPLC 分析的水为经 Milli-Q 超纯水制备系统净化的去离子水, 其余用水均为去离子水, D101 型大孔树脂(西安蓝深离子交换树脂有限责任公司)。

样品: 丹参, 由四川中江股份有限公司提供, 并经中国医学科学院药用植物研究所鉴定为 *Sabia miltiorrhiza*。

2 实验方法

2.1 样品处理

丹参切片 100 g, 加 8 倍量水于 90 °C 水浴加热条件下提取两次, 每次 1 h。合并提取液, 高速离心, 上清液减压浓缩, 定容至 25 mL; 乙酸乙酯萃取, 萃取液减压蒸干, 用适量水溶解后, 以 4 mL/min 的流速上 D101 大孔吸附树脂柱, 静止吸附 2 h。50% 乙醇洗脱, 洗脱液减压浓缩除去乙醇, 冷冻干燥得丹酚酸粗提物。

2.2 分离溶剂系统的选择

根据各种溶剂的极性、黏度、比重、溶解度等因素, 设计一系列溶剂系统, 然后按溶剂系统的比例, 配制 20 mL 溶剂, 加入样品 10 mg, 充分振荡, 静置分层, 分别取上、下层溶液, HPLC 法测定上、下层所含

丹酚酸类各成分的浓度, 即可求得丹酚酸类各成分在该溶剂系统中的分配系数。

2.3 HSCCC 分离

将按比例配置的溶剂系统在分液漏斗中静置过夜, 次日分离后超声脱气 15 min。将上相(固定相)在最大流速下泵入并充满分离螺旋管, 开启循环水浴并将温度设定为选定的实验温度。然后将下相(流动相)以选定的流速泵入, 同时开启检测器并按选定的转速启动主机。待流动相从管柱出口流出且基线稳定后将样品溶液由进样圈注入。管柱出口处的流出物经紫外检测器检测并由色谱工作站和记录仪记录, 按需收集组分。

2.4 HPLC 纯度分析

色谱柱: Kromasil KR100-5C18 (150×4.6 mm), 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

流动相: 乙腈-水(含 0.05% 三氟乙酸) = 25: 75; 流速: 0.8 mL/min。

检测: DAD 检测器(检测波长: 290 nm; 参考波长: 500 nm; 波长宽度: 16 nm)。

3 结果与讨论

在本试验所建立的最佳色谱条件下, 固定相保留率为 53.6%, 进样 80 mg 进行分离, 分离 7 h 共洗脱出 5 个峰, HSCCC 图谱见图 1。

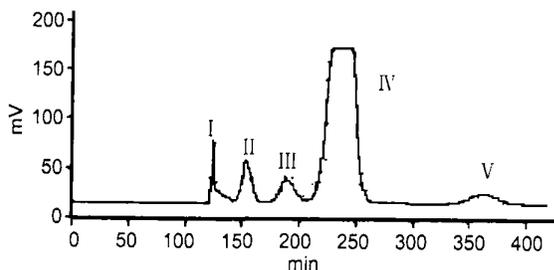


图 1 丹参水溶性成分 HSCCC 分离色谱图

Fig 1 Chromatogram of the crude salvianolic acids by HSCCC

3.1 溶剂系统选择

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, 对分离效果产生一定的影响。

根据色谱理论, 利用 HSCCC 进行样品分离的必要条件是样品在互不相溶的两相中具有合适的分配

系数。理想的分配系数应在 0.67 ~ 1.50 之间^[14], 可利用 HPLC、EC、TLC 来测定^[15-16], 本文采用 HPLC 测定。经过试验, 最终选择了一种较为满意的溶剂系统。表 1 中列出了其中两种溶剂系统中七种主要丹酚酸成分的分配系数, 丹酚酸粗提物的 HPLC 图谱见图 3。

表 1 七种主要丹酚酸成分在两种溶剂系统中的分配系数值
Table 1 Partition coefficient of salvianolic acid compounds in two solvent systems

峰号 Peaks	1	2	3	4	5	6	7
溶剂系统(1) Solvent systems(1)	0.43	11.3	1.37	3.72	0.64	1.43	1.9
溶剂系统(2) Solvent systems(2)	0.43	1.22	1.5	2.49	0.59	1.33	3.59

溶剂系统: (1) 正己烷: 乙酸乙酯: 水: 甲醇(1.5: 5: 5: 1.5, v/v) (2) 氯仿: 乙酸乙酯: 水: 乙酸(1.5: 3: 3: 0.5, v/v)
Solvent systems: (1) n-hexane: ethyl acetate: water: methanol (1.5: 5: 5: 1.5, v/v); (2) chloroform: ethyl acetate: water: acetic acid (1.5: 3: 3: 0.5, v/v);

由表 1 数据可知, 丹酚酸 B(图 3 中的峰 6)在两种溶剂系统中的分配系数在 0.67 ~ 1.5 范围内, 且和其它组分分配系数相差较大, 因此可初步确定此两种溶剂系统均适用于丹酚酸 B 的 HSCCC 分离。在实际应用中对两种溶剂系统进行比较, 溶剂系统(1)能将各组分有效分离, 可分离出 5 个峰; 溶剂系统(2)固定相保留值不到 40%, 分离效果不佳。因此本文选择溶剂系统(1)用于丹酚酸有效成分的分离。

3.2 HSCCC 分离参数的确定

3.2.1 工作温度的选择

据本实验室研究成果^[17], 温度对分离时间和分离度的影响均不显著。在 20 ~ 30 °C 范围内可获得比较理想的分离, 工作温度可根据实际的大气温度灵活选择, 故本研究分离温度确定为 25 °C。

3.2.2 流动相流速选择

流动相流速不但显著影响分离时间, 而且也会对分离度产生一定的影响, 在其他参数相同的条件下, 流速越大, 分离时间越短, 分离度越小^[14]。图 2a、图 2b 的结果表明, 流速对分离时间的影响非常显著, 流速越大, 分离时间越短, 分离度随流动相流速的增加而降低。因此, 在保证分离度的前提下尽可能缩短分离时间, 可以采用 1.7 mL/min 的流速。

3.2.3 主机转速的选择

研究表明, 螺旋柱(Ito 线圈)的旋转速度对两相溶剂在流体动力学平衡时的体积比影响很大, 转速

越高, 固定相的保留值越大^[18]。本试验结果表明, 在考察的转速范围(700 ~ 900 rpm)内, 700 rpm 时, 固定相保留值太低达不到分离的要求, 而 850 rpm 时, 分离度最大, 分离时间与 800 rpm 时相差不大, 见图 2b、图 2c。试验过程中还发现, 转速越大, 乳化越严重, 900 rpm 时固定相的流失已十分严重。因此, 850 rpm 是比较适宜的工作转速。

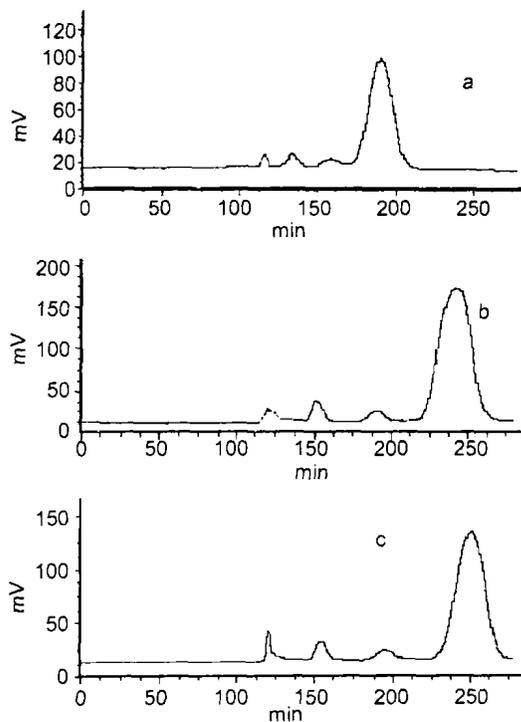


图 2 HSCCC 分离参数对分离的影响

Fig. 2 Effects of flow rate of mobile phase and rotary speed on HSCCC separation

a. 流速(Flow rate): 2 mL/min, 转速(Rotary speed): 800 rpm; b. 流速(Flow rate): 1.7 mL/min, 转速(Rotary speed): 800 rpm; c. 流速(Flow rate): 1.7 mL/min, 转速(Rotary speed): 850 rpm

3.3 进样量考察

试验结果表明, 进样量对分离度有一定的影响, 尤其是最先出现的峰(图 1 中前面的 3 个峰)。当进样量增加到 80 mg 以上时, 前三个峰分离度下降, 且丹酚酸 B(图 1 中的峰 IV)的纯度降低。因此, 一次进样量以不超过 80 mg 为宜。

3.4 溶剂系统的选择

试验得知, 丹酚酸 B 粗品在溶剂系统的上、下相中均能溶解, 但在上相的溶解度大于下相。试验中分别考察了用上相、下相和上-下相(1:1, v/v)混合溶剂制备样品溶液的分离情况。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; 以下相溶解样品时, 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, 虽然解决了分离初期基线漂移的问题, 但由于进样体积较大, 致使整个分离过程的分离度大大降低。由于纯度较高的丹酚酸 B 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, 本文选择溶剂系统的上相作为溶样溶剂。

综上所述, 选定的最佳 HSCCC 分离条件为: 流动相流速 1.7 mL/min, 工作温度为 25 °C, 主机转速为 850 rpm, 最大进样量 80 mg, 上相溶样。验证试验的 HSCCC 分离图见图 1。

3.5 HPLC 纯度分析结果

丹酚酸粗提物的 HPLC 分析结果(图 3)表明, 粗提物中至少包括 7 种化学成分, 其中峰 6 为丹酚酸 B, 含量相对最高。

在进样 80 mg 时, 分别收集图 1 中峰 II、III、IV、V 的流出液, 室温挥干溶剂后称重, 并采用 HPLC 法对各成分进行纯度分析, 其中峰 IV 为丹酚酸 B, 结果见表 2。丹酚酸 B HPLC(检测波长 290 nm)分析图谱见图 4, HPLC 三维光谱图见图 5, 根据 HPLC 图的峰面积, 归一化计算可知丹酚酸 B 的纯度为 98.6%, 而另外几个组分经过一次 HSCCC 分离后纯度均未达到 90%。

表 2 各峰的产率和纯度鉴定结果

Table 2 Salvianolic acids isolated from the crude water extract of *Salvia miltiorrhiza* by HSCCC

峰号 Peaks	制备量(mg) Isolated amount	产率(%) Yield	纯度(%) Purity
II	2.1	2.6	<90%
III	1.4	1.8	<90%
IV	63.4	79.2	98.6%
V	1	1.3	<90%

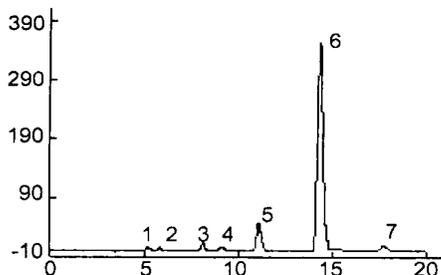


图 3 丹酚酸粗提物 HPLC 分析图谱

Fig 3 HPLC chromatogram of the crude salvianolic acids

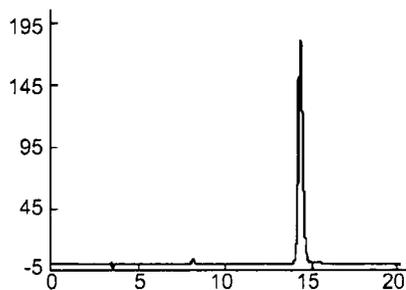


图 4 丹酚酸 B HPLC 纯度分析图谱(290 nm)

Fig 4 HPLC chromatogram of the purified salvanolic acid B (290 nm)

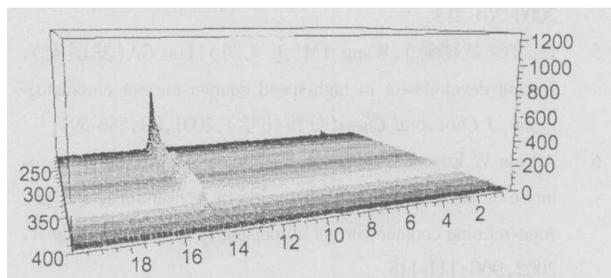


图 5 丹酚酸 B 的三维光谱图

Fig 5 The 3-D HPLC-DAD chromatogram of salvanolic acid B

4 结论

本文应用高速逆流色谱分离丹参水溶性成分, 一次分离, 可以得到 5 个峰, 经 HPLC 检测, 丹酚酸 B 是第 IV 峰, 纯度在 98% 以上。本试验结果表明 HSCCC 能有效的从低纯度的丹酚酸粗提物中分离得到高纯度的丹酚酸 B, 样品可以作为药物标准品用于分析测试或药理与毒理实验。该方法与制备 HPLC 相比较, 溶剂系统既是固定相又是流动相, 廉价易得, 可以随时更换调整, 不需要特殊的要求, 样品制备量大, 不存在色谱柱污染的问题; 而且与常压和低压色谱相比, 高速逆流色谱的分离能力要好, 有的样品经一次分离就可以得到一个甚至多个纯度较高的单体, 并且分离时间也较短, 一般是几个小时即可完成一次分离。

致谢: 本工作得到了青岛市现代分析技术及中药标准化重点实验室的经费资助, 以及厦门倍而思生化科技有限公司王文慎工程师和吴澄玉老师的大力支持和帮助, 在此一并表示感谢。

参考文献

1. National Pharmacopoeia Committee (国家药典委员会). Chi-

- nese Pharmacopoeia (中国药典), Vol I. Beijing: Chemical Industry Press 2005. 52-53.
- 2 Du GH(杜冠华), Zhang JT(张均田). Development of the water-soluble ingredients in *Salvia miltiorrhiza*-Salvianolic acids. *Bas Med Sci & Cli(基础医学与临床)*, 2000, 20: 394-398.
 - 3 Ai CB, Li LN. Structure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid C from *Salvia miltiorrhiza* radix extract. *J Nat Prod*, 1988, 51: 145-149.
 - 4 Peng SX(彭司勋), Zhao SX(赵守训), Liao QJ(廖清江), et al. The Development of Medical Chemistry (药物化学进展). Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2000. 201-215.
 - 5 Dai DS(戴德舜), Wang YM(王义明), Luo GA(罗国安). Recent development in high-speed counter-current chromatography. *J Chin Anal Chem(分析化学)*, 2001, 29: 586-591.
 - 6 Adrian W Eugene PM, Constance MM, et al. Preparative separation of isomeric sulfophthalic acids by conventional and pH-zone-refining counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2002, 966: 111-118.
 - 7 Li HB, Chen F, Zhang T, et al. Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2001, 905: 151-155.
 - 8 Du QZ, Li ZH, Yoichiro Ito. Preparative separation of isoflavone components in soybeans using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2001, 923: 271-274.
 - 9 Wu FY(伍方勇), Dai DS(戴德舜), Wang YM(王义明), et al. Application of high-speed counter-current chromatography electrospray ionization-mass spectrometry in analysis of traditional chinese herbs. *Chem J Chin Univ(高等学校化学学报)*, 2002, 23: 1698-1700.
 - 10 Tian GL, Zhang YB, Zhang TY. Separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Burge by high-speed counter-current chromatography using stepwise elution. *J Chromatogr A*, 2000, 904: 107-111.
 - 11 Li HB, Chen F. Preparative isolation and purification of six diterpenoids from the Chinese medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2001, 925: 109-114.
 - 12 Tian GL, Zhang YB, Zhang TY. Separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Burge by multidimensional counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2002, 945: 281-285.
 - 13 Gu M(顾铭), Ougang YF(欧阳藩), Su ZG(苏志国). Purification and fingerprinting development of *Salvia miltiorrhiza bunge* by high-speed counter-current chromatography. *Chin J Biotech(生物工程学报)*, 2003, 19: 740-744.
 - 14 American Chemical Society. Modern Counter-Current Chromatography. ACS Symposium Series 593. 1995. 78-86.
 - 15 Tan LQ(潭龙泉), Zhang SM(张所明), Ou QY(欧庆瑜). Application of thin layer chromatography insolvent system selection for high-speed counter-current Chromatography. *J Chin Anal Chem(分析化学)*, 1996, 24: 1448-1451.
 - 16 Tan LQ(潭龙泉), Ruan ZQ(阮宗琴), Ou QY(欧庆瑜). Application of capillary electrophoresis in solvent system selection for high-speed counter-current chromatography. *J Chin Anal Chem(分析化学)*, 1997, 25: 515-518.
 - 17 Wang QE, Frank Sen-Chun Lee. Isolation and purification of inflacoumarin A and licochalcone A from licorice by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2004, 1048: 51-57.
 - 18 Zhang TY(张天佑). Counter-Current Chromatography Technology (逆流色谱技术). Beijing: Beijing Science & Technology Press 1991.