

丹参中丹酚酸 B 的提取分离及分析方法研究进展

□ 孙金兰 韩伟* (华东理工大学药学院中药现代化工程中心 上海 200237)

摘要: 系统综述了提取、纯化、分析丹参中治疗心脑血管病的有效成分丹酚酸 B 的方法, 并对微波提取、超临界流体萃取、大孔树脂吸附技术与传统技术上作了比较和论述。

关键词: 丹参 丹酚酸 B 提取 纯化 分析方法

丹参中药材取自唇形科植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 的根, 在中医临床上, 丹参主要用来治疗冠心病、脑血栓、肝炎及肝硬化等。该药长期的临床应用背景及在治疗疾病方面的明显效果, 引起了国内外学者对其水溶性酚类化合物的重视。丹酚酸 B 是丹参水溶性成分中最主要的活性物质, 其含量较高, 占丹参药材的 2% ~ 8%^[1]。丹酚酸 B 的活性很强, 对脂质过氧化引起的细胞膜损伤有明显的保护作用, 还具有抗血小板聚集并对血栓形成的作用, 因此, 丹酚酸 B 的提取技术的研究受到了医药界的关注。本文对丹酚酸 B 的提取和分析方法的发展进行综述。

一、丹酚酸 B 的提取

目前, 丹酚酸 B 是从丹参水溶性成分中分离得到的, 因此要先提取丹参水溶性成分。丹参的水溶性成分主要以水、甲醇、乙醇或醋酸乙酯为溶剂来提取。传统的提取方法是水提醇沉, 这也是目前制备丹参注射

液及口服液的主要方法。随着科技的发展, 一些新技术也用于丹酚酸的提取, 如微波提取、超声波提取和超临界 CO₂ 提取。

1. 传统水煎法

富志军等^[2]在复方丹参提取工艺的研究中, 考察了药材粒度、加水量、浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数对总酚酸含量的影响, 采用正交试验设计筛选出最佳提取工艺: 将药材粉碎过 20 目筛, 加 8 倍量水浸泡 1.5h 煎煮 2 次, 第 1 次 1.5h 第 2 次加 6 倍量水, 煎 1.0h。

关昕等^[3]在丹参注射剂提取工艺研究中采用两种工艺流程: 原工艺和新工艺。原工艺采用两次醇沉: 第一次醇含量为 75%, 第二次醇含量为 85%, 新工艺采用一次醇沉, 醇含量达 60%, 上大孔树脂吸附。用高效液相色谱和比色法分别测定丹参素和总酚酸的含量。结果表明, 新工艺较原工艺丹参素提高了 23.1%, 总酚酸提高了 19.7%。

2. 超声波提取法

王凤美等^[4]将精密称取的丹参细粉分别用 30%

收稿日期: 2006-05-31

修回日期: 2006-08-30

* 联系人: 韩伟, 教授, 硕士生导师, 中药现代化工程中心常务副主任, 研究方向: 中药制药工程, E-mail: whan@ecust.edu.cn

乙醇, 50%乙醇, 70%乙醇, 100%乙醇, 30% 甲醇, 50% 甲醇, 70% 甲醇, 100% 甲醇及水各 30mL 冰浴超声处理, 计算丹酚酸 B 的提取量。结果表明, 丹参生药中丹酚酸 B 的提取以 70% 甲醇为溶剂提取率最高; 其次为 70% 乙醇, 其提取率为 70% 甲醇的 98.8%。但几种提取溶剂差异并不特别显著, 水的提取率相对较低, 为 70% 甲醇的 95.06%。由于水作溶剂成本较低, 又不会造成环境污染, 所以他们认为丹酚酸 B 直接用水提取较好。

3 回流提取法

回流提取法是目前提取水溶性酚类化合物的主要方法之一。刘重芳等^[5]准确称取丹参药材, 以丹参素、原儿茶醛和丹参酮 II A 为指标成分, 用正交试验设计对提取工艺进行优化, 考察乙醇浓度、乙醇量、回流时间和提取次数对指标成分含量的影响, 应用高效液相色谱法测定其含量。得出最优工艺: 用 10 倍量 50% 的乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h 所得的 3 种指标成分含量较高。

张启伟等^[6]精密称取丹参粉末, 用 75% 的甲醇水浴回流提取, 采用高效液相色谱法测定丹酚酸 B 的含量。色谱柱是 YWG-C₁₈, 流动相为甲醇-5% 乙酸, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 281 nm。丹酚酸 B 在 0.17~1.70 μg 范围内呈良好的线性关系 ($r=0.9997$), 回收率为 98.9%, RSD=1.82%。该法可作为丹参及其制剂的质量控制的分析方法。

4 超临界 CO₂ 萃取

萧效良^[7]在超临界 CO₂ 萃取技术提取中药有效成分的研究中, 采用了不同的表面活性剂和夹带剂。研究中他们先以第一种夹带剂进行萃取, 获取了以丹参酮类为主的脂溶性活性物质。待丹参酮类物质基本萃取完毕后改用第二种夹带剂继续萃取, 获取了以丹参素、原儿茶醛为主的水溶性活性物质。丹参酮 II A 提取物的含量大于 20%, 水溶性提取物的含量大于 35%, 收率为常规法的 2 倍以上, 而且工艺简单。李霞, 唐玉海等^[8]研究了超临界 CO₂ 流体对丹参中有效成分的萃取, 并与回流提取法、超声提取法进行了比较, 结果是超临界法萃取的成分最多, 萃取效率也高于其它两种方法。

5 微波提取

朱晓薇^[9]等人研究了微波提取丹参的优化工艺。他们以丹参的脂溶性成分丹参酮 II A、水溶性成分丹参素、原儿茶醛为指标, 用正交试验设计法对丹参的微波提取工艺进行了优化, 考察了提取时间、微波功率、加水量三个因素的三个水平, 并与传统工艺比较。丹参以 6 倍量 95% 的乙醇, 在微波功率为 320W 的条件下提取 30min 药渣再以 12 倍量水, 微波提取两次。以丹参酮 II A、丹参素和原儿茶醛三种成分的提取量为指标, 结果表明: 其提取量相当于或优于传统方法。

焦士龙等^[10]应用微波萃取丹参活性成分, 以丹参脂溶性成分丹参酮 II A 和水溶性成分丹参素、原儿茶醛为指标成分, 高效液相色谱法测定其含量, 并与传统回流法比较。研究中他们采用均匀设计法对丹参的微波提取工艺进行优化, 考察提取水量、辐射时间和微波功率的影响, 得出最优条件为 12 倍量的水提取药渣两次, 每次 60min, 微波功率 320W, 提取量分别为传统回流法的 1.297 倍和 1.26 倍。

6 浸渍法

浸渍法有冷浸法和温浸法两种。冷浸法即常温下浸泡; 温浸法是指温度高于常温下的浸泡。李静^[11]以原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸及其甲酯、丹酚酸 A、B 和 C 7 种有效成分的含量为指标, 考察了不同的溶剂-酸性丙酮、酸性甲醇、酸水对提取率的影响, 发现水为溶剂提取率最高。如果以丹酚酸 B 为指标, 酸性甲醇的提取率最高。进一步考察了不同的提取方法-冷浸、热提、超声提取的影响, 结果表明热提的效果最好。

韩丽^[12]设置温浸温度为 70℃, 考察了温浸提取时水的用量、提取时间、提取次数对丹参水溶性成分的提取效果的影响。他们采用三因素三水平的正交试验, 以总酚酸为指标, 筛选出最佳工艺条件: 用水 70℃ 时温浸提取 3 次, 第 1 次为 12 倍量水, 后 2 次为 10 倍量水, 每次 2h。结果表明: 总酚酸的含量温浸法较传统回流法低。

7 渗漉法

匡荣仁^[13]在香丹注射液指纹图谱研究中, 称取定量丹参, 加适量水, 使丹参被水浸没, 置冰箱冷冻, 待结冰后取出, 冰融后装渗漉筒, 收集渗流液, 其最佳工艺

为在冰冻条件下收集 24 倍量的渗漉液,以丹参素和原儿茶醛为指标,指标成分含量较高。

8 其它方法

韩丽^[12]应用逆流提取与膜分离技术研究丹参粉针工艺,用动态循环逆流提取丹酚酸。动态循环逆流提取由几个相等的提取单元组成,每个提取单元进行独立作业,采用机械强制循环方式,使溶剂从提取罐底部进入,经罐内颗粒状物料产生湍流,由罐顶部溢出,连续循环,流动浸出,提高固液扩散界面层的更新速度,使药材组织中的溶质与浸出液中的溶质在单位时间内能保持一个较高的浓度差。当某一阶段提取过程完成时,不饱和溶剂隔一个单元迁移继续循环提取,以增加物料与溶剂中有效成分的浓度差。最终确定的提取条件是:水为溶媒,药材粒度 1~8mm,提取温度 60℃。以总酚酸为目标产物,动态循环逆流提取与单罐逆流提取效果相差不大,含量较回流法略低。

二、丹酚酸 B 的分离与纯化

丹参水提物是一多组分的混合物,提取液中含有丹酚酸 A、B、C 及紫草酸、咖啡酸、丹参素、原儿茶醛和原儿茶酸等。当前丹参提取液精制分离最常用的方法是醇沉,通过几次不同浓度的醇沉除去提取液中大量的鞣质,但这种方法所需醇量大,有效成分损失严重。除了醇沉法外,还有萃取法、大孔树脂吸附法等。

1980年,陈政雄等^[14]用乙醚萃取丹参注射液,乙醚层浓缩析出原儿茶醛;水层用饱和食盐水盐析,过滤盐析物,滤液放置得到白色沉淀,在水中重结晶得丹参素,即丹参酸甲;盐析物酸化,用醋酸乙酯溶解振摇,溶剂层减压浓缩后进行纤维粉柱层析,用 0.001mol/L 的硫酸冲洗,洗脱部分再用醋酸乙酯萃取,取醋酸乙酯层进行制备性薄层层析,得到丹参酸乙(即丹酚酸 B 或紫草酸 B)和丹参酸丙。这是我国学者首次分离得到的丹参酸甲、乙、丙。

叶勇等^[15]发明了从丹参中提取酚酸各组分的方法。以热水短时间浸提,浸提液合并后离心,上清液超滤,滤液过反相柱,或用乙酸酯类萃取经酸化后的水提液,分离有机相回收溶剂后,过反相柱,获得不同组分。此提取方法稳定,收率高,利用此发明工艺得到丹酚酸

组分,纯度高,性能稳定。

周永刚等^[16]用 SIP905 型大孔树脂提取分离丹酚酸 B,用毛细管电泳法测定其含量,考察了大孔树脂吸附的最佳工艺条件。其结果是:丹酚酸 B 的吸附容量为 8.72mg/g 洗脱液为 4 倍量 20% 乙醇。大孔树脂对丹酚酸 B 的洗脱率为 96.28%,精制程度为 251.82%。此方法能明显提高丹酚酸 B 的收率和纯度。

张军等^[17]用 F 型大孔树脂吸附丹参药材提取液中丹酚酸,以丹酚酸 B 为指标,考察了丹参提取液在大孔树脂吸附工艺中的动态吸附曲线以及最佳洗脱条件。最大上样量(以丹酚酸 B 计)为 87.9mg/g 干树脂,以 3 倍柱体积 60% 乙醇为洗脱溶媒,吸附-洗脱过程中丹酚酸 B 的平均保留率可达 93.7%,固形物得率由过柱前的 41% 以上降低为过柱后的 8% 左右。该方法在有效地保留丹酚酸 B 的同时,可显著降低固形物的得率。

王凤美等^[18]在制备高纯度丹酚酸 B 的工艺中,通过比较几种不同大孔吸附树脂对丹酚酸 B 的吸附及洗脱性能,筛选出最佳树脂并对该树脂分离纯化丹酚酸 B 的工艺参数进行了优化。在确定的最佳工艺条件下,丹酚酸 B 回收率为 90.6%,纯度高达 91.8%,稳定性良好,可作为丹参制剂的原料药应用。

冯彩丽^[19]将丹参提取液的醋酸乙酯萃取物进行硅胶层析,用溶剂系统进行梯度洗脱,洗脱液经薄层检验,相近的合并,得到多种纯的化合物,其中一种是丹酚酸 B。黄黠^[20]在丹参药材和丹参注射液指纹图谱的研究中,将粗提物上硅胶柱,用氯仿-甲醇-甲酸展开,割带,收集,乙醇溶解,挥醇,得丹酚酸 B。

张立国等^[21]发明了一种从丹参中提取丹酚酸 B 的工艺方法。此方法将几种从丹参中提取丹酚酸 B 的方法组合在一起。先用水提取,然后用壳聚糖絮凝,接着醇沉,再用石油醚和醋酸乙酯分别萃取,最后采用硅胶柱层析得到较高纯度的丹酚酸 B。此方法成本低廉,适合于工业化生产。

三、丹酚酸 B 的含量测定

1. 薄层扫描法

该方法多用于丹参药材及其制剂中单一有效成分

的测定。由于误差比较大,使其近些年的应用受限,人们趋向于选用 HPLC 进行成分的分离与鉴别。李静^[11]应用高效薄层扫描法对丹参中的 7 种有效成分原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸及其甲酯、丹酚酸 A、B 和 C 进行了含量测定,将生药用热水提取、酸化后用醋酸乙酯萃取,萃取液浓缩后进行薄层色谱分离。采用系统展开剂分离得其余的 6 种成分。

2 毛细管电泳法

李翔等^[22]首次用毛细管电泳法测定丹参中丹酚酸 B 的含量。此法用肉桂酸的甲醇-水溶液为内标物测定丹酚酸 B 的含量。其结果在 12.23~195.68 μg/mL 范围内呈良好线性关系,平均加样回收率为 99.26%, RSD 为 1.8%,最低检测限为 3.0 μg/mL。该法为药材质量控制提供了可借鉴的依据。

3 高效液相色谱法

当前用来分析丹酚酸 B 最精确的方法是高效液相色谱法,程显隆等^[23]建立了用高效液相色谱法测定丹参中丹酚酸 B 的含量。检测条件如下:色谱柱是 Diamonsil ODS-C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-水-3%乙酸,流速是 1.0 mL/min,检测波长是 280 nm,进样量是 10 μL,丹酚酸 B 在 0.49~6.15 μg 范围内呈良好线性关系。

王凤美等^[4]建立了丹参中丹酚酸 B 的优化提取条件,并确立了其 HPLC 测定方法。色谱柱为 Alltima C₁₈ 流动相为乙腈-0.5%冰醋酸水溶液,采用梯度洗脱程序,流速为 1.0 mL/min,紫外检测波长为 290 nm。丹酚酸 B 在 0.07~0.70 μg 范围内呈良好的线性关系 (r=0.9997)。精密度实验中 RSD 为 1.62%,稳定性和重现性实验中 RSD 均小于 3%。该实验提取丹酚酸 B 处理方法简单,测定结果稳定可靠,可作为丹酚酸 B 含量测定方法。

汪红等^[24]采用高效液相色谱-梯度洗脱法一次测定复方丹参制剂中丹参 9 种有效成分的含量(丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、丹酚酸 B、丹参酸甲酯、二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A),并用 0.05% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱。检测波长:0~25 min 为 281 nm,5~55 min 为 254 nm;室温测定;流速:0.8 mL/min,回收率为:95.62%~104.22%,RSD 为 1.42%

~3.52%。

王凤美等^[25]建立了用高效液相色谱-荧光检测法测定丹酚酸 B 的含量的方法。色谱条件为:BACKMAN ODS 柱,以甲醇-0.5%冰醋酸水溶液为流动相,流速为 1.0 mL/min,荧光检测波长 λ_{EX}=338 nm,λ_{EM}=443 nm,进样量 5 μL。当丹酚酸 B 进样量为 0.12~1.2 μg 时,其质量与峰面积呈良好的线性关系 (r=0.9998);加样回收率为 98.6%~108%;最低检测限为 0.013 μg/mL。该法具有很高的灵敏度,为丹酚酸 B 的药代动力学研究提供基础。

四、结 语

丹参中的丹酚酸 B 目前在临床上治疗称为人类第三大杀手的心脑血管病的应用已深得认可,对高质量、无杂质和质量变动幅度小的丹酚酸 B 的药物的需求不断增强。但是,目前丹参酚酸 B 的提取和分离纯化多采用传统方法,产品得率低,纯度不高。随着科技的进步,新技术如微波萃取、超临界流体萃取和大孔吸附树脂也逐漸用于丹酚酸 B 的提取分离。我国丹参资源广泛,丹酚酸 B 的市场需求巨大,对丹酚酸 B 进行研究开发,具有巨大的经济和社会效益。

参考文献

- 1 叶勇.丹参有效成分分离的研究进展.药品评价,2005,2(2):146.
- 2 富志军,林以宁,叶华.复方丹参提取工艺的研究.安徽中医学院学报,2002,21(6):46
- 3 关昕,吴立军.丹参注射剂提取工艺研究.中医药学报,2005,33(3):6
- 4 王凤美,李磊,柳先平,等.丹参药材中丹酚酸 B 的提取及其 HPLC 法测定.现代中药研究与实践,2004,18:62
- 5 刘重芳,朱艳,张钰泉,等.丹参不同提取工艺比较.中成药,1999,21(8):386
- 6 张启伟,张颖,李计萍,等.高效液相色谱法测定丹参中丹酚酸 B 中国中药杂志,2001,26(12):848
- 7 萧效良,甘海涛,戚东林.CO₂超临界萃取技术提取中药有效成分.化工进展,2001,5:7
- 8 李霞,唐玉海,赵新锋,等.CO₂超临界流体萃取丹参中的有效成分.西安交通大学学报(医学版),2004,25(6):614.
- 9 朱晓薇,郭俊华,高卫东,等.丹参的微波提取研究.天津中医药,2005,22(3):243
- 10 焦士龙,张泽英,褚治德,等.微波提取丹参工艺研究,2005,36(11)

: 1640~1641

- 11 李静, 何丽一. 丹参中水溶性酚酸成分的薄层扫描测定法. 药学学报, 1993, 28(7): 543~54.
- 12 韩丽. 应用逆流提取与膜分离技术的中药注射剂新工艺研究—丹参粉针工艺研究 [博士学位论文]. 成都中医药大学, 2003
- 13 匡荣仁. 香丹注射液指纹图谱研究 [硕士学位论文]. 华东理工大学, 2003.
- 14 陈政雄, 等. 丹参水溶液酚酸成分的研究. 药学通报, 1981, 16(9): 24~25.
- 15 叶勇, 等. 一种从中药丹参提取酚酸各组分的方法及其冻干粉剂剂 (CN03132382.0).
- 16 周永刚, 李翔, 赵亮, 等. 大孔树脂吸附法提取丹酚酸 B 的应用研究. 药学实践杂志, 2003, 26(6): 339
- 17 张军, 王凤云, 肖凤霞, 等. 丹参药材提取液中丹参酚酸大孔树脂吸附工艺研究. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 206
- 18 王凤美, 陈军辉, 李磊, 等. 高纯度丹酚酸 B 的制备工艺研究. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 475.
- 19 冯彩丽. 心肌康注射液中丹参水溶性成分及指纹图谱的研究: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2002
- 20 黄黠. 丹参药材和丹参注射液指纹图谱的研究 [硕士学位论文]. 四川大学, 2002
- 21 张立国, 等. 一种从丹参中提取丹酚酸 B 的工艺方法 (CN03151476.6).
- 22 李翔, 赵亮, 张国庆, 等. 毛细管电泳法测定丹参中丹酚酸 B 的含量. 药物分析杂志, 2004, 24(4): 439
- 23 程显隆, 王峰, 冯玉飞, 等. 丹参中丹酚酸 B 的高效液相色谱法含量测定. 药物分析杂志, 2003, 23(2): 149
- 24 Wang Hong and Wang Qiang. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Nine Major Constituents in Roots of Salvia Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2002, 11(4): 148.
- 25 王凤美, 李磊, 沈金灿, 等. 高效液相色谱—荧光检测法测定丹酚酸 B 的含量研究. 中医药学刊, 2005, 23(5): 817.

Progress Review of Extraction, Purification, and Analysis of Salvianolic Acid B

Sun Jinlan, Han Wei

(Modern Engineering Center for Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, East China Polytechnic University, Shanghai 200237)

Salvianolic acid B is a popular element used in angiocardopathy medication. This paper presents a brief review of recent progresses made in extraction and purification of Salvianolic acid B in *Miltiorrhiza Bunge* and associated analyzing methods.

Key words: *Salvia miltiorrhiza Bunge*; Salvianolic acid B; extraction; purification; analyzing method

(责任编辑: 张述庆, 责任编审: 张志华、许有玲, 责任译审: 邹春申)

2006年中华医学科技奖颁奖大会 在京隆重举行

2006年中华医学科技奖颁奖大会于2007年1月25日在北京人民大会堂隆重举行。全国人大常委会副委员长何鲁丽、韩启德, 全国政协副主席张梅颖, 中国科协党组书记邓楠, 卫生部、国家食品药品监督管理局、国家中医药管理局、解放军总后卫生部、武警总部卫生部等领导出席大会, 并向获奖代表颁发了奖杯、获奖证书及奖金。来自全国各地的七百多名医学科技工作者参加了会议。

2006年全国共推荐了245项科研成果, 中华医学会将进行形式审查并组织中华医学科技奖评审委员会委员对推荐项目

进行初审、公示及终审。经中华医学会第23届理事会第4次常务理事会议确认, 包括基础医学、临床医学、预防医学、药学、中医中药学等专业的80项研究成果分别获得一、二、三等奖。其中“免疫应答调控的细胞与分子机制研究”等7个项目获一等奖, 每项奖金6万元; “炎症免疫及血流动力学因素在动脉粥样硬化发生中的机制研究”等25个项目获二等奖, 每项奖金2万元; “基因芯片技术平台的建立及其在表达谱研究与病原检测中的应用”等48个项目获三等奖。

中华医学科技奖是国家科技部首批批准的面向全国医药卫生行业的科技奖, 本届评选已是第六届。自2005年起, 国家科学技术奖励工作办公室批准中华医学会可以直接推荐国家科学技术奖。

(文摘)