

柱即可重复使用。

2.5 结果及得率: 银杏叶提取物 525 g, 银杏萜内酯 6.15% (白果内酯 3.44%, 银杏内酯 C 2.09%, 银杏内酯 A 0.5%, 银杏内酯 B 0.12%), 采用乙醇水梯度洗脱, 大孔吸附树脂柱连续分离银杏叶提取物中萜内酯组份, 真空浓缩后结晶, 粗晶用乙醇水溶液重结晶, 其 4 种萜内酯单体纯度和得率见表 1。

表 1 产品纯度和得率

Table 1 Purity and yield of products

组份	质量/g	得率/%	提取率/%
白果内酯	12.65	2.41	70.01
银杏内酯 C	8.18	1.46	75.45
银杏内酯 A	1.63	0.31	62.28
银杏内酯 B	0.43	0.08	69.84

采用本工艺将总萜内酯质量分数 6.15% 的 525 g 原料经纯化可得纯度为 95% 的白果内酯 12.65 g, 银杏内酯 C 8.18 g, 银杏内酯 A 1.63 g, 银杏内酯 B

0.43 g, 总萜内酯为 22.89 g。总得率为 4.26%, 平均提取率为 69.27%。晶体及原料采用 HPLC 法测定, 与对照品的 HPLC 图谱相同, 没有干扰峰。

3 讨论

本法只采用一次柱分离, 结晶纯化即可连续制得纯度达 95% 以上的白果内酯, 银杏内酯 A、B、C 单体。本工艺操作中只采用无毒试剂水和乙醇, 对产品药用提供了安全保障。由于采用的是可重复使用的大孔树脂, 使生产成本降低至约 5 万元/kg。本工艺简便, 采用有机试剂少。因此适用于中试及工业生产, 为大规模开发银杏萜内酯药品奠定了良好基础。

References

- [1] Li Z L. *Exploitation and Exertion of Ginkgo Leaves* (银杏开发与利用) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1996.
- [2] Zhang D Q, He Z F. *Research in the Chemical Ingredients in Leaves of Ginkgo biloba* (银杏叶资源化学研究) [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999.

超临界萃取结合水煎煮法提取丹参中有效成分的研究

张虹¹, 柳正良², 王洪泉¹, 杨莺^{3*}

(1. 同济大学附属同济医院, 上海 200065; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 利群医院, 上海 200333)

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 味苦, 性微寒, 祛瘀止痛, 活血通经, 清心除烦。丹参主要含有结晶性菲醌类化合物, 如丹参酮 I (tanshinone I)、丹参酮 II_A、II_B (tanshinone II_A、II_B)、隐丹参酮 (cryptotanshinone)、二氢丹参酮 (dihydrotanshinone); 水溶性有效成分为丹参素 (danshensu) 及酚酸类成分原儿茶醛 (protocatechualdehyde)、咖啡酸 (caffeic acid)、迷迭酸甲酯 (methyl rosmarinate) 等, 以及棕罗汉松酚 (ferruginol) 等其他成分。脂溶性有效成分丹参酮 II_A 经研究表明具有抑制血栓形成等药理作用; 水溶性有效成分丹参素能抗心肌缺血并对冠状动脉有较好作用, 原儿茶醛能显著增加冠状动脉流量, 对抗 ADP 诱导的血小板积聚, 并有广谱抗菌作用。本实验对脂溶性有效成分以丹参酮 II_A 为指标, 水溶性有效成分以丹参素、原儿茶醛为指标对丹参进行提取研究, 并作为制剂的一组质控指标。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪: 日本岛津 LC—9A, 配有 SPD—6A 紫外可变波长检测器; CR—4A 数据处理器; 超临界萃取设备: SFX₂—10 型超临界流体萃取器 (美国 Isco 公司); Branson 1200 型超声波清洗器。

丹参酮 II_A (批号: 0766-200011)、原儿茶醛 (批号: 0810-9402) 购自中国药品生物制品检定所; 丹参素 (纯度大于 99%) 购自复旦大学药学院天然药物化学教研室。丹参药材购于上海市药材公司, 经第二军医大学宓鹤鸣教授鉴定。本品经自然晾干后, 60 干燥 12 h, 粉碎, 过三号筛。甲醇为 HPLC 或 AR 纯, 蒸馏水为双蒸水 (自制)。

2 有效成分的测定

2.1 脂溶性成分丹参酮 II_A 的测定

2.1.1 色谱条件: 色谱柱: Diamonsil™ C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (迪马公司); 流动相: 甲醇-水

* 收稿日期: 2004-03-12

作者简介: 张虹 (1967—), 女, 浙江海宁人, 副主任药师, 1990 年毕业于上海医科大学药学院, 获理学学士学位, 2001 年毕业于第二军医大学药物分析专业, 获医学硕士学位, 主要从事药物分析及临床药学研究, 发表论文 10 余篇。
Tel: (021) 56051080-3203 E-mail: zkzhu@yahoo.com.cn

(85 15); 体积流量: 1.0 mL/min; 灵敏度: 0.08 AUFS; 检测波长: 270 nm; 柱温: 35 ; 进样量: 10 μ L。丹参酮 II_A 保留时间约为 12.5 min, 其他成分不影响。

2.1.2 线性关系考察: 精密称取丹参酮 II_A 对照品 10 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。用流动相稀释成 12~ 48 μ g/mL 的系列溶液, 进样 10 μ L, 以峰面积与质量浓度进行线性回归, 得标准曲线方程: $Y = 43\,365.7X + 0.690$, $r = 0.999\,98$ 。丹参酮 II_A 在 12~ 48 μ g/mL 时峰面积与其质量浓度具有良好的线性关系。

2.1.3 供试品溶液的制备: 精密称取经真空干燥后的萃取物 0.1 g, 加适量甲醇, 超声使溶解, 用甲醇配制成适当质量浓度, 取少量溶液用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液 0.1 mL 于 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 水溶性成分丹参素、原儿茶醛的含量测定

2.2.1 色谱条件: 色谱柱: DiamonsilTM C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) (迪马公司); 流动相: 甲醇-0.5% 醋酸水溶液 (25 75); 体积流量: 1.0 mL/min; 灵敏度: 0.08 AUFS; 检测波长: 280 nm; 柱温: 35 ; 进样量: 10 μ L。丹参素和原儿茶醛的保留时间分别约为 6.5、10.2 min。

2.2.2 线性关系的考察: 精密称取丹参素、原儿茶醛对照品各 5 mg, 分别置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用流动相稀释成一定质量浓度的系列溶液, 进样 10 μ L, 以峰面积与质量浓度进行线性回归, 得标准曲线方程及线性范围, 丹参素: $Y = 86.746X - 3.3$, $r = 0.999\,9$, 线性范围: 50~ 250 μ g/mL; 原儿茶醛: $Y = 623.400X + 92.59$, $r = 0.999\,9$, 线性范围: 25~ 200 μ g/mL。

2.2.3 供试品溶液的制备: 取丹参 SFE 提取后的残渣水煎液、SFE 提取物水煎液或丹参药材的水煎液, 浓缩, 甲醇定容于 10.0 mL 量瓶中。精密吸取 2.0 mL 样品液, 再加甲醇 2.0 mL, 摇匀, 超声 10 min, 冷却, 用 0.45 μ m 过滤膜滤过, 取滤液, 即得。

3 提取工艺的考察

3.1 脂溶性成分的提取: 精密称取样品粉末 (过 60 目筛) 300 g, 放入萃取罐中, 按表 1 设计因素水平, 选 L₉(3⁴) 正交设计表对丹参中脂溶性成分 (以丹参酮 II_A 为测定指标) 进行超临界萃取, 收集萃取液, 滤过, 浓缩, 浓缩后所得物再经真空干燥, 即得萃取物, 测定结果见表 2。

经统计学分析, 结果表明: 对丹参酮 II_A 影响为

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 提取时间/h	B 提取温度/°C	C 提取压力/MPa	D 夹带剂用量/%
1	1.5	45	25	25
2	2.0	55	30	30
3	2.5	65	35	35

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 2 Results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B	C	D	丹参酮 II _A /(g · 100 g ⁻¹)
1	1	1	1	1	8.18
2	1	2	2	2	16.46
3	1	3	3	3	12.94
4	2	1	2	3	12.15
5	2	2	3	1	13.18
6	2	3	1	2	10.99
7	3	1	3	2	12.14
8	3	2	1	3	15.16
9	3	3	2	1	17.34
K ₁	12.53	10.82	11.44	12.90	
K ₂	12.11	14.93	15.32	13.20	
K ₃	14.88	13.76	12.75	13.42	
R	2.77	4.11	3.87	0.52	

B > C > A > D。提取丹参酮 II_A 的最佳条件是: A₃B₂C₃D₃, 即: 夹带剂为 100 g 药材用 35 mL 的乙醇, 于 55 °C 温度、30 MPa 压力下萃取 2.5 h。

3.2 水溶性成分的提取: 称取经上述超临界萃取后的丹参残渣粉末 5 g, 按表 3, 选用 L₉(3⁴) 正交试验表对丹参素 SFE 残渣中的水溶性成分 (以丹参素、原儿茶醛为测定指标) 进行水煎煮提取。提取液按上述丹参素、原儿茶醛的测定方法进行测定, 测定结果见表 4。

表 3 因素水平表

Table 3 Factors and levels

水平	因素		
	A 煎煮时间/h	B 加水量/倍	C 煎煮次数/次
1	0.5	8	1
2	1.0	10	2
3	1.5	12	3

由统计学分析结果表明, 对丹参素、原儿茶醛的影响均为因素 A > C > B。提取丹参素和原儿茶醛的最佳条件是 A₃B₁C₃, 即: 以丹参残渣 8 倍量的水煎煮 3 次, 每次 1.5 h。

3.3 最佳工艺的验证试验: 本实验通过对丹参中有效成分提取方法的摸索, 发现 SFE^[1,2] 特别适合脂溶性有效成分, 如丹参酮 II_A 的提取, 丹参酮 II_A 的得率高, 杂质少; 但 SFE 不适合水溶性有效成分如丹参素、原儿茶醛的提取, 经检测, 丹参经 SFE 所得提

取物中未检测出水溶性成分丹参素、原儿茶醛, 两者存在于丹参的 SFE 残渣中, 结果见表 5。可见丹参 SFE 残渣中的丹参素、原儿茶醛较丹参药材中的浓度高, 其原因有待于进一步研究。

表 4 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 4 Results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B	C	丹参素/ (g · 100 g ⁻¹)	原儿茶醛/ (g · 100 g ⁻¹)
1	1	1	1	0.460 9	0.028 1
2	1	2	2	0.559 7	0.039 1
3	1	3	3	0.496 2	0.029 4
4	2	1	2	0.596 5	0.043 7
5	2	2	3	0.671 0	0.058 3
6	2	3	1	0.514 5	0.046 4
7	3	1	3	0.877 1	0.099 6
8	3	2	1	0.686 1	0.063 8
9	3	3	2	0.841 4	0.083 7
丹参素 K ₁	0.505 6	0.644 8	0.553 8		
K ₂	0.594 0	0.638 9	0.665 9		
K ₃	0.801 5	0.617 4	0.681 4		
R	0.295 9	0.027 4	0.127 6		
原儿茶醛 K ₁	0.032 2	0.057 1	0.046 0		
K ₂	0.049 5	0.053 6	0.055 5		
K ₃	0.082 3	0.053 2	0.062 4		
R	0.050 1	0.003 9	0.016 4		

表 5 丹参的有效成分的测定 (n= 3)

Table 5 Effective components in *S. miltorrhiza* (n= 3)

样 品	质量分数/%		
	丹参酮 II _A	丹参素	原儿茶醛
丹参药材	0.298 4	0.560 0	0.072 8
丹参 SFE 提取物	0.235 0	未检出	未检出
丹参 SFE 残渣提取物	0.070 0	0.893 2	0.092 0

将丹参按上述试验条件进行超临界萃取, 将其 SFE 残渣再按上述试验条件进行水煎煮提取, 之后所得残渣于 50~ 60 烘干, 称取烘干物适量, 照前述丹参酮 II_A、丹参素、原儿茶醛的测定方法测定各有效成分的残留量, 结果 SFE 残渣水煎后残渣中残留各成分分别为丹参酮 II_A 0.003 1%, 丹参素 2.907%, 原儿茶醛 7.936%。可见经上述提取工艺后, 丹参中大于 99% 的丹参酮 II_A、大于 97% 的丹参素、92.064% 原儿茶醛已被提出。

4 讨论

本试验提取丹参中有效成分的最佳工艺是: 首先, 利用 SFE 技术提取脂溶性成分如: 丹参酮 II_A 等, 其提取条件是: 精密称取样品粉末(过 60 目筛) 300 g, 放入 SFE 萃取罐中, 用 35% 乙醇, 于 55 温度、30 MPa 压力下萃取 2.5 h, 收集萃取液, 滤过, 浓缩, 浓缩后所得物再经真空干燥, 即得萃取物; 再利用传统的水煎法提取丹参 SFE 残渣中的水溶性成分如: 丹参素、原儿茶醛等, 其提取条件是: 以残渣 8 倍量的水煎煮 3 次, 每次 1.5 h。

丹参 SFE 残渣中的丹参素、原儿茶醛较丹参药材中的浓度高, 其原因有待于进一步研究。

References:

[1] King J W . Fundamentals and applications of supercritical fluid extraction in chromatographic science [J]. *J Chromatogr Sci*, 1989, 27(7): 355.

[2] Yuan H M , Dleak S V . Supercritical fluid and enhanced-flu- idity liquid extraction of phenolics from viver sediment [J]. *J Chromatogr*, 1997, 764: 265.

西红花及注射用西红花苷的 HPLC 指纹图谱研究

郁 健¹, 杜春波², 周素娣^{3*}

(1. 中国药科大学 分析化学教研室, 江苏 南京 210038; 2. 中国药科大学制药有限公司, 江苏 南京 210009; 3. 中国药科大学 中药分析教研室, 江苏 南京 210038)

西红花为鸢尾科番红花属植物番红花 *Crocus sativus* L. 的干燥柱头, 西红花苷(crocin)为西红花药材的提取物, 经过加工制成注射用西红花苷(冻干)制剂, 具有活血化瘀、散郁开结, 用于中风病血瘀证(脑脉痹塞), 临床上用于脑梗死, 或局限性脑梗死(包括脑血栓、脑栓塞、脑动脉痉挛等)。

西红花的主要成分为类胡萝卜素、苦味质和

挥发油^[1]。类胡萝卜素为西红花苷元(西红花酸 crocetin)与多种糖组成各种糖苷, 西红花苷分为西红花苷-1、2、3、4。目前有文献^[2、3]报道采用 HPLC 和 TLC 法对西红花苷-1、2 的测定。作为中药注射剂, SFDA 规定必须进行指纹图谱的研究, 以便控制中药注射剂的质量。本实验建立 HPLC 法, 对西红花药材、西红花提取物及注射用西红花苷制剂进行指纹图

* 收稿日期: 2004-03-13

作者简介: 郁 健(1959—), 男, 工程师, 江苏启东人, 主要从事药物分析工作, 研究领域包括中西药质量分析、药物体内分析研究等。
Tel: (025) 85322635 E-mail: yujian5959@163.com