

醇溶液提取,省却了传统薄层色谱法中的不同极性溶剂提取分离、多次萃取等繁琐“清洗”步骤,而所得薄层图像明亮清晰,各成分分离很好。因此可大胆推测,由于微乳溶液的组成特点,决定了微乳薄层色谱可省略多数供试液的前处理“清洗”步骤,大大节省实验时间和提高结果的重现性。

薄层色谱有别于其他色谱技术,除了都有固定相和流动相外,还存在气相。气相会对分离结果产生显著影响。常规薄层色谱多采用几种有机溶剂组成的混合溶剂,各种有机溶剂的挥发性不同,使得展开过程更加复杂。在甘草微乳薄层展开过程中,进行了单槽和双槽展开缸、未饱和与饱和 30~80 min 的比较实验。实验结果表明,展开室的形状和饱和情况对甘草各成分的分离几乎没有影响。关于甘草微乳薄层色谱展开特点的原因探究,笔者认为可能是因为微乳作为展开剂时,主要成分为水,表面活性剂形成的微乳挥发性不大,微乳展开剂长期放置亦可保持成分稳定。而展开过程亦因为展开剂成分的稳定,所以展开室的形状和饱和情况对分离效果没有什么影响。另外,也考察了温度和湿度对展开效果的影响。实验结果表明,30%~90%相对湿度的分离效果几乎没有差异。这一特点和微乳展开剂大量水分组成相联系,亦可以很容易得到解释。温度考察在 15~30℃进行,设置了 4 个温度水平:15、20、25、30℃,结果显示温度对甘草微乳薄层影响不大。

微乳薄层色谱具有明显的荧光增强增稳效应^[6],而色彩鲜明的荧光信息对薄层色谱具有特别

突出的意义。在甘草的微乳薄层鉴别中,由于微乳的荧光增强效应,无需衍生即可根据丰富的荧光信息进行鉴别。而甘草的传统薄层色谱则需要硫酸乙醇喷雾、加热等步骤才能得到荧光图像。

综上所述,微乳薄层色谱由于在供试品制备、展开、衍生等步骤所表现出来的优于传统薄层色谱的优点,使其重现性大大提高。微乳薄层色谱用于不同种类的甘草鉴别,方法简单经济,图像形象直观,无需衍生即可区分《中国药典》收录的 3 种甘草药材。

本研究样品收集得到厦门大学一开元区高新技术研究开发基地王文慎经理的帮助,以此表示感谢。

References:

- [1] Hu J F, Shen F J. A survey of the studies on chemical constituents of *Glycyrrhiza* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与实践), 1996, 8 (3): 77-91.
- [2] Committee of National pharmacopoeia. *Thin layer Chromatography Images of Chinese Materia Medica* (中药薄层色谱彩色图集) [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Publishing House, 1993.
- [3] Kang C, Wen L Y, Ding Z B, et al. Application of microemulsions to the thin layer chromatographic analysis of alkaloids [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2000, 28 (2): 137-141.
- [4] Kang C, Wen L Y, Ding Z B, et al. Studies on separation and identification of flavonoid composition with microemulsion thin layer chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20 (2): 121-125.
- [5] Kang C, Wen L Y, Ding Z B, et al. Studies on separation and identification of *Rhizoma Coptidis* drugs based on microemulsion thin layer chromatography [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25 (5): 262-265.
- [6] Cui S F, Fu B Q, Lee F S C, et al. Application of microemulsion thin layer chromatography fingerprinting of licorice (*Glycyrrhiza* spp.) [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 828 (1-2): 33-40.

丹参不同提取工艺的研究

于沈晶,殷文广,修志龙*

(大连理工大学环境与生命学院 生物科学与工程系,辽宁 大连 116024)

丹参是唇形科鼠尾草植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根和根茎,具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦之功效,主治冠心病、心绞痛、心烦不眠、月经不调、经闭、痛经等症^[1]。丹参中主要含有以丹参酮和丹参醌为主的脂溶性二萜类化合物和以丹参酚酸为主的水溶性多聚酚酸类化合物。现有的丹参有效成分提取工艺,如水醇法、蒸馏法、石硫醇法、

透析法、离子交换法,往往只注重考察某种单一成分的量,忽略了多种成分的复合作用。本研究考察了不同的提取方法对丹参提取液体外抗氧化作用和体内耐缺氧能力的影响,希望能为丹参提取工艺的选择提供一些参考。

1 材料与仪器

丹参药材购于大连美罗大药房(产地:安徽亳

收稿日期:2006-08-02

作者简介:于沈晶(1979—),女,沈阳人,硕士研究生,主要从事中药成分分离提取及塑料降解的研究工作。

*通讯作者 修志龙 Tel/Fax: (0411) 84706369 E-mail: zhixiu@dlut.edu.cn

州),经大连理工大学李晓晖副教授鉴定;18~22 g 昆明种小鼠购于大连医科大学实验动物中心;新鲜猪血购于大连市肉联厂;SOD与MDA检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);丹参素钠(批号55-200102)、原儿茶醛(批号110810-200205)对照品均购于中国药品生物制品检定所。

LC-1500型高效液相色谱(Jasco, Japan),721分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),RE-52旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),台式高速离心机(上海医用分析仪器厂),JA1003型电子天平(上海天平仪器厂),中空纤维素膜(Nissho Corporation, Japan)。

2 方法与结果

2.1 不同提取方法所得供试品溶液的制备:取5份丹参药材,各30 g,分别用300 mL不同的提取溶剂提取:①水冷浸(室温)24 h;②水加热提取2次,每次1 h;③50%乙醇加热回流提取2次,每次1 h;④水和95%乙醇各加热提取6 h;⑤95%乙醇和水各加热提取1 h。合并各种提取方法中两次提取液,滤过,减压浓缩至200 mL,分别记作1~5号供试品溶液。

2.2 丹酚酸水解液供试品溶液的制备:称取50 g丹参药材,加入500 mL水于室温下浸泡24 h,放于冰箱中,4℃保存,过夜;滤过,弃药渣,将滤液减压浓缩至40 mL将无水乙醇缓缓的加到浓缩液中,边加边搅拌,使溶液总体积达150 mL,静置,沉淀,放于冰箱中,4℃保存,过夜;取上清液,减压浓缩至20 mL,将浓缩液分成4等份,分别编号为1-1、1-2、1-3、1-4号溶液。将后3种溶液放于高压灭菌锅中(121℃,0.1 MPa),分别加热0.5、1、2 h,待其自然冷却后,将溶液过孔径为0.22 μm的膜后作为供试品溶液。

2.3 总酚酸的测定^[2]

2.3.1 对照品溶液的配制:精密称取5.1 mg原儿茶醛,于小烧杯中用70%乙醇溶解,并转移至50 mL量瓶中,稀释至刻度,摇匀。精密吸取5 mL,置50 mL量瓶中,加70%乙醇稀释至刻度,摇匀即得(原儿茶醛10.2 μg/mL)。

2.3.2 标准曲线的绘制:精密吸取对照品溶液0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL置25 mL量瓶中,70%乙醇稀释至5 mL,再各加0.3%十二烷基磺酸钠溶液2 mL,0.6%铁氰化钾溶液1 mL,0.9%三氯化铁溶液1 mL,摇匀,暗处静置5 min,用0.1 mol/L盐酸稀释至刻度,暗处静置30 min。以零号管作对照,置1 cm比色皿中,720 nm下测定吸光

度,绘制标准曲线。标准曲线为 $Y=0.79913X$, $r=0.9992$ 线性范围为:0.204~1.224 μg/mL。

2.3.3 测定:吸取供试品溶液各2 mL,用70%乙醇稀释至25 mL,摇匀,再从中取2 mL,用70%乙醇稀释至25 mL,摇匀,即得稀释液,备用。取稀释液1 mL,及原儿茶醛对照品溶液(10.2 μg/mL)4 mL,用70%乙醇稀释至5 mL,各加0.3%十二烷基磺酸钠溶液2 mL,0.6%铁氰化钾溶液1 mL,0.9%三氯化铁溶液1 mL。摇匀,暗处静置5 min。用0.1 mol/L盐酸稀释至刻度,在暗处静置30 min,在720 nm处测其吸光度。把吸光度值代入标准曲线计算总酚酸的质量。结果水冷提、水热提、50%乙醇提、水+95%乙醇提、95%乙醇+水提所得总酚酸分别为0.0108、0.0202、0.0173、0.0156、0.0142 g。

可以看出:水热提可使丹参提取液中总酚酸达到最高值,其次是50%乙醇提,然后是水+95%乙醇提、95%乙醇+水提,水冷提的最低,这可能是因为热水有助于大分子丹酚酸的溶出并加速其水解,而乙醇的加入使丹参中的部分蛋白沉淀在丹参表面,阻碍了丹酚酸的溶出。

2.4 体外抗氧化作用试验^[3]

2.4.1 红细胞悬浮液的制备^[3]:取20 mL枸橼酸三钠抗凝的猪血,3000 r/min离心15 min,吸取上清液,收集血红细胞,用3倍体积的生理盐水洗涤3次,再将其用生理盐水配制质量分数为0.5%的红细胞悬浮液。

2.4.2 不同提取液对猪血红细胞中的SOD活力和MDA量的影响^[4]:取350 μL枸橼酸三钠抗凝的猪血充入盛有14 mL生理盐水的试管中,混匀;取此混匀液6份各2 mL,放入离心管中,2000 r/min离心3 min;用玻璃毛细管吸去上清液,留沉淀红细胞;加入冰双蒸水0.2 mL,混匀;向其中5份中加入1~5号供试品溶液各15 μL,另一份加去离子水15 μL作为对照,然后按照SOD试剂盒的方法检测SOD活力。另取6份各1 mL红细胞悬浮液放入试管中,向其中的5支试管中加入1~5号供试品溶液的稀释液(去离子水稀释1000倍)各1 mL,第6支试管中加1 mL去离子水作为对照,然后按照MDA试剂盒的方法检测MDA的量。结果水冷提、水热提、50%乙醇提、水+95%乙醇提、95%乙醇+水提、对照中SOD活力和MDA的水平分别为33.6、84.0、69.4、67.2、45.9、13.4 U/mL和0.313、0.179、0.209、0.224、0.254、0.448 mol/L。可以看出与对照组相比各种方法得到的丹参提取液都可显

著提高猪红细胞中 SOD 的活力,降低硫酸亚铁和过氧化氢诱导的红细胞脂质过氧化产生的 MDA 的量,程度由强到弱依次为水热提>50%醇提>水+95%醇提>95%醇+水提>水冷提>对照组的样品,这与总酚酸质量的测定结果保持一致。

2.5 丹参素和原儿茶醛的 HPLC 测定

2.5.1 进样溶液的前处理:将 1~5 号和 1-1~1-4 号供试品溶液过孔径为 0.45 μm 的醋酸纤维素膜,再用中空纤维素膜(截留相对分子质量 5 000)进行超滤,即得。

2.5.2 色谱条件:色谱柱:Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 10 μm)(大连依利特科学仪器有限公司);流动相:0.5%醋酸水溶液-甲醇(95:5)(丹参素)、0.5%醋酸水溶液-甲醇(80:20)(原儿茶醛);体积流量:1 mL/min;检测波长:281 nm;进样量:20 μL。

2.5.3 标准曲线的建立:精密称取丹参素钠对照品 1.4 mg (相当于丹参素 1.26 mg),置于 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,即得 0.126 mg/mL 丹参素对照品溶液。分别取丹参素对照品溶液 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 μL 进样,测得峰面积。以峰面积对进样量做图,得丹参素标准曲线:Y = 96 188.502 86 X - 9 249.476 19, r=0.999 9。

精密称取原儿茶醛对照品 6.5 mg,置于 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,即得 0.26 mg/mL 原儿茶醛对照品溶液。分别取原儿茶醛对照品溶液 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 μL 进样,测得峰面积。以峰面积对进样量做图,得原儿茶醛的标准曲线:Y = 1.130 63×10⁶ X - 22 024.714 29, r=0.999 9。

2.5.4 测定:采用标准曲线法。结果见表 1,2。可以看出,提取方法中丹参素的质量分数:水热提>95%醇提+水>水+95%乙醇提≈50%醇提>水冷提;原儿茶醛的质量分数:水热提>水+95%醇提≈95%醇+水提>50%醇提>水冷提;对于 1-1~1-4 号样品丹参素和原儿茶醛的质量浓度随加热时间的增加而提高。

2.6 常压耐缺氧试验^[5,6]:将 1~5 号和 1-1~1-4 号样品分别过 0.22 μm 膜,作为 1~5 号和 1-1~1-4 号注射液。

取正常成年雄性小鼠 30 只,体重 18~22 g,随机分为 6 组,每组 5 只,其中 1 组为生理盐水对照组,其他 5 组为 1~5 号注射液组,每只 ip 0.2 mL,连续注射 5 d,每天 1 次,于末次注射 40 min 后,将各组小鼠分别放入 150 mL 磨口广口瓶内(每瓶 1

表 1 1~5 号样品中丹参素和原儿茶醛的比较

Table 1 Comparison of danshensu and protocatechualdehyde in samples No. 1-5

提取方法	质量分数/[mg·(50 g 生药) ⁻¹]	
	丹参素	原儿茶醛
水冷提	3.625	0.281
水热提	77.630	2.986
50%乙醇提	29.988	1.224
水+95%乙醇提	30.086	1.460
95%乙醇+水提	50.610	1.460

表 2 1-1~1-4 号样品中丹参素和原儿茶醛的比较

Table 2 Comparison of danshensu and protocatechualdehyde in samples No. 1-1-1-4

样品	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	
	丹参素	原儿茶醛
1-1	0.322	0.040 8
1-2	2.580	0.370 6
1-3	4.656	0.880 5
1-4	6.004	1.043 0

只),每瓶放 5 g 碱石灰,用凡士林封瓶口,盖严,使之不漏气,立即计时,以呼吸停止为指标,观察小鼠因缺氧而死亡的时间。

取正常成年雄性小鼠 25 只,体重 18~22 g,随机分为 5 组,每组 5 只,其中 1 组为生理盐水对照组,其他 4 组为 1-1~1-4 号供试品组,每只 ip 0.2 mL,连续注射 2 d,每天 1 次,于末次注射 40 min 后,将各组小鼠分别放入 150 mL 磨口广口瓶内(每瓶 1 只),每瓶放 5 g 碱石灰,用凡士林封瓶口,盖严,使之不漏气,立即计时,以呼吸停止为指标,观察小鼠因缺氧而死亡的时间。

结果见表 3 和表 4。可以看出,与用生理盐水对照相比,水热提的样品和 95%醇+水提的样品(5 号)都可显著延长小鼠在缺氧条件下的存活时间,其他样品也可延长小鼠在缺氧条件下的存活时间,但差异无显著性。与对照组相比,1-1~1-4 号供试品都可显著延长小鼠在缺氧条件下的存活时间。

表 3 丹参不同提取方法对小鼠常压耐缺氧能力的影响 (n=5)

Table 3 Effect of *S. miltiorrhiza* extracted by various methods on antihypoxic capacity of mice at normal pressure (n=5)

组别	死亡时间($\bar{x}\pm s$)/min
对照	18.69±1.57
1	19.93±1.81
2	22.58±2.80*
3	19.34±1.91
4	20.16±1.44
5	25.56±2.70**

与对照组比:*P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs control group

表4 不同丹酚酸水解液对小鼠常压耐缺氧能力的影响 (n=5)

Table 4 Effect of various phenolic acidity hydrolysate on antihypoxic capacity of mice at normal pressure (n=5)

组别	死亡时间($\bar{x} \pm s$)/min
对照	20.36 ± 1.52
1-1	26.83 ± 1.85**
1-2	37.74 ± 2.70**
1-3	39.91 ± 2.54**
1-4	43.41 ± 3.02**

与对照组比: * P < 0.01

** P < 0.01 vs control group

3 讨论

通过考察不同提取方法对丹参提取液中丹参素、原儿茶醛及总酚酸以及体内和体外的抗氧化作用效果的影响,推测:丹参素和原儿茶醛的质量浓度随加热时间的增加而提高,这说明它们是大分子丹酚酸的水解产物,且高温有助于丹酚酸的水解;根据提取液与体外猪红细胞作用后 SOD 活力和 MDA 的量测定结果,可以看出水热提的提取液抗氧化能力最强,其次是 50%乙醇提,接着是水+95%乙醇提和 95%乙醇+水提,水冷提的最低,这与总酚酸的测定结果保持一致,说明总酚酸的量直接关系到抗氧化能力,丹参提取液中总酚酸的量越高,抗氧化能力越强;常压耐缺氧试验结果表明:水

热提和 95%醇+水提以及水冷提液水解反应得到的样品均可显著延长小鼠在缺氧条件下的存活时间,其他的样品(水冷提、50%醇提、水+95%醇提)也可延长小鼠在缺氧条件下的存活时间,但无显著差异。可见,用水热提和 95%醇+水提及对水冷提液进行加热处理的方法提取丹参的有效成分都可明显提高机体的有氧代谢能力。但这一结果并没有与样品中总酚酸的测定结果呈现出明显的相关性,可能是因为样品中还有脂溶性的丹参酮等成分,它们在动物体内也起了一定的作用,而对样品中水溶性的丹酚酸而言,丹参素和原儿茶醛的量越高,小鼠的耐缺氧能力越强。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Li G S, Wang G X. The assaying of the component of total phenolic acidity in Danshen Oral Liquid [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2001, 12 (8): 683-684.
- [3] Wang J H, Zhang M. Effect of component 3 of polysaccharides from *Fructus Lycii* on damage induced by hydroxyl radicals [J]. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2001, 22 (1): 11-13.
- [4] Huang Y S, Zhang J T. Effect of antioxidation *in vitro* by three water-soluble components in Danshen [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1992, 27 (2): 96-100.
- [5] Jiang H F, Kong F Z. Study on resistance ability in mice by Shengmai Powder [J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med* (浙江中西医结合杂志), 2003, 6 (13): 86-87.
- [6] Huang X H, Tan X B. A Study of *Radix Rosa Laevigata* alcohol extract on anti-hypoxia effect [J]. *J Gannan Med Coll* (赣南医学院学报), 2003, 23 (5): 488-490.

正交试验优选獐牙菜的提取工艺

田 薇¹, 张喜民², 陈朝晖², 陈立仁³, 李永民³

(1. 浙江林学院食品与药学学院, 浙江 杭州 311300; 2. 甘肃省药物研究所, 甘肃 兰州 730070; 3. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730070)

龙胆科植物抱茎獐牙菜 *Swertia franchetiana* H. Smith 是一种多年生草本植物, 全草入药。有清热解毒、舒肝利胆之功效, 主治各种肝胆疾病, 临床对急性黄疸性肝炎、慢性肝炎、慢性胆囊炎等症疗效显著^[1]。其主要有效成分为环烯醚萜类、碳键黄酮苷类和吡啶酮苷类成分^[2-5]。目前, 中药提取工艺筛选试验中常用化学法、生物学法及有效浸出物综合评价的方法。用一种评价指标筛选提取工艺条件往往不够全面^[6]。现行的标准中对獐牙菜属药材的质量控制仅限于鉴别和检查^[7]。鉴于獐牙菜中环烯醚萜类

与吡啶酮类苷性成分的不同药理活性^[1,8], 本实验选择醇浸膏得率及以獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和獐牙菜吡啶酮苷为代表的总苷提取率为评价指标, 采用 L₉(3⁴) 正交试验筛选醇提取工艺条件, 同时考察了不同工艺条件对总苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜吡啶酮苷的提取率的影响, 可为研究和利用獐牙菜药材资源提供参考依据。

1 材料与仪器

岛津高效液相色谱仪: SPD-10Avp 泵系统, SPD-M10Avp 二极管阵列检测器, SIL-10ADVP