

2.4 优化组方的验证: 将各单味药按优化结果配成组方, 利用以上方法分别检测药效。结果见表 5

表 5 优化方对大鼠急性心肌缺血的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of optimized compound on acute myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	T波高度 /mV	Σ ST/mV
溶剂对照	0.26 $\pm$ 0.12	1.25 $\pm$ 0.51
优化方	0.14 $\pm$ 0.60	0.57 $\pm$ 0.29

与溶剂对照组相比: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

指标值为 0.507, 其值最小, 说明药效优于其他组方, 证明川芎、香附、冰片、牡丹皮的最佳配比为 5: 1.7: 1.4: 4.4 (原提取物的质量比), 剂量为 138 mg/kg (折生药 2.78 g/kg)

3 讨论

均匀设计是有别于正交设计的实验设计, 它的特点是有关因素的各个水平与水平数相等, 减少了多次试验, 且实验结果可用计算机处理, 通过回归方程得出理论的最佳实验条件。因此均匀设计广泛应用于工艺筛选, 近年来也越来越多的应用于复方药物筛选的药理研究^[4,5]。

本试验研究表明, 经均匀设计所得优化处方丹

心痛 138 mg/kg 能对抗大鼠注射 Pit 后造成的冠状动脉收缩痉挛, 血氧供应障碍, 降低大鼠心电图 T 波的抬高 ($P < 0.05$); 对 β 受体兴奋剂 Iso 引起的心率加快, 心肌收缩力增加等增加氧耗, 在心电图上主要表现为 ST 段 (Σ ST) 的偏移也有显著的对抗作用 ($P < 0.05$)。同时证明均匀设计可作为有效筛选组方最佳配比的方法, 初步药效学实验证明其优化方丹心痛对缺血心肌有一定的保护作用。

References

[1] The Ministry of Public Health of PRC. *Standards of Medicine—the Preparation of Chinese Traditional Patent Medicine* (中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂) [S]. Vol 15. 1997.
[2] Zhang Y H, Fang T H, Xu H Q, *et al.* Effect of heart-tonifying and vessel-softening capsule in preventing myocardial ischemia [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1998, 14(2): 86-89.
[3] Jin C H, Wang Y J, Zhang D M, *et al.* Effect of Shunxin Capsule on acute experimental myocardial ischemia of animals [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(12): 920-923.
[4] Li W M, Jin H, Zhang F L. Application of uniform design in extraction process for *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1993, 15(1): 8-9.
[5] Liu J, Shen Y J, Wei Y P. Application of uniform design during compound preparation [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1996, 18(10): 3-5.

液相色谱法制备丹参素钠

潘 见, 徐 涛*

(合肥工业大学 农产品生物化工教育部重点实验室, 安徽 合肥 230069)

摘 要: 目的 分离纯化丹参中的水溶性活性成分丹参素钠。方法 采用亲脂性吸附树脂与制备型反相高效液相色谱组合分离技术, 将丹参水提粗制品经亲脂性吸附树脂柱色谱预分离后, 再由制备型 RP-HPLC 纯化精制。结果 产品经熔点、MS、IR、UV 和 HPLC 图谱鉴定, 并与文献、标准对照品比较, 证明为丹参素钠, 纯度 > 98%。结论 该方法简单, 重复性较好, 采用的溶剂系统价廉易得、沸点低、易于回收。

关键词: 丹参素钠; 分离; 纯化; 制备色谱

中图分类号: R284.2; R286.0 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)02-0125-03

Preparative separation of D(+)- β -(3,4-dihydrophenyl)-lactate sodium from *Salvia miltiorrhiza* by HPLC

PAN Jian, XU Tao

(Key Laboratory for Biochemical Engineering of Agricultural Products of Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230069, China)

Abstract Object To develop a method for the isolation and purification of D(+)- β -(3,4-dihydrophenyl)-lactate sodium from *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Methods** Combined lipophilic adsorption resin and preparative RP-HPLC, the water extract of *S. miltiorrhiza* was pre-isolated by lipophilic adsorption

* 收稿日期: 2002-08-02
基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (20136020)
作者简介: 潘 见 (1955-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事天然产物分离纯化技术及装备研究。Tel (0551) 2900134

resin, the enriched extract was purified to give $D(+)-\beta-(3,4\text{-dihydrophenyl})\text{-lactate}$ sodium by preparative RP-HPLC. **Results** By contrast with the literature and standard reference substance, $D(+)-\beta-(3,4\text{-dihydrophenyl})\text{-lactate}$ sodium was identified by MS, IR, UV, HPLC and melting point. The final purity of the compound is $> 98\%$. **Conclusion** The developed method is simple, reproducible and easy to operate. The solvent is cheap, with low boiling point and easy to recovery property.

Key words $D(+)-\beta-(3,4\text{-dihydrophenyl})\text{-lactate}$ sodium; separation; purification; preparative HPLC

近年研究表明,丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 具有较强的抗氧化作用^[1],是目前治疗心血管疾病不可缺少的天然药物。丹参素及其酚酸类衍生物是丹参中主要的水溶性活性物质^[2]。研究丹参中各种酚酸类化合物的药理活性和协同作用以及在体内的代谢情况,开发丹参类新药,均需要大量高纯度的丹参酚酸类单体。因此,研究丹参素单体的高效分离纯化方法具有重要意义。

制备型 HPLC 具有分离过程样品不易变性、产品纯、回收率高和生产周期短的特点,特别适合某些珍贵和难分离物质的分离纯化。我们组合亲脂性树脂吸附层析与制备型色谱,将丹参粗制品经过亲脂性树脂柱色谱预处理后,再由制备型 HPLC 纯化精制,分离得到高纯度的产品。

1 仪器与材料

Waters Prep 4000 型制备色谱仪, Waters 2487HPLC, Nicolet Impact 410 红外分光光度计, Aglient 1100 LC/MS, 冷冻干燥机。亲脂性吸附树脂 AB-8 为南开大学化工厂产品;超纯水

2 方法与结果

2.1 HPLC 检测条件: 色谱柱: Waters Novapak C₁₈ (3.9 mm×150 mm, 5 μ m); 流动相: 乙醇-水-冰醋酸 (14.5: 85: 0.5); 检测波长: 278 nm; 温度: 25℃。

2.2 HPLC 制备条件: 色谱柱: Waters Novapak C₁₈ (40 mm×150 mm, 6 μ m); 上样量: > 150 mg; 分流比: 1: 30 梯度溶剂系统见表 1

表 1 丹参素钠制备型 RP-HPLC 的梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution condition of preparative RP-HPLC			
时间	流速	流动相	梯度
/min	/(mL·min ⁻¹)	(EtOH-H ₂ O-HAc)	曲线
0	45	10: 90: 0	线性
8	45	19.5: 80: 0.5	线性
25	45	70: 30: 0	线性

2.3 丹参素的提取和纯化: 取丹参粉碎至 200~300 目, 2% 盐酸水溶液 (固液比 1: 3) 索氏提取 3 次, 每次 1.5 h。冷却, 过滤后用乙酸乙酯萃取, 有机

相氮气流保护下减压浓缩, 得丹参素粗品。粗品加水溶解至 50 mL, 水液经过 AB-8 树脂柱层析, 以丙酮-水梯度洗脱, 混合溶剂中水从 100% 变化到 0%, 同时丙酮从 0% 变化到 100%。20 mL 分段收集, HPLC 检测, 合并浓缩主要含丹参素的流份。将上步产品溶于适量甲醇, 5% NaHCO₃ 调节 pH 至 6.5, 加乙醚至浑浊, 室温放置, 析出类白色粉末状物质^[3] (丹参素钠盐), 过滤, 充氮后低温保存。接上步中间品溶于适量高纯水中, 直接经过 HPLC 纯化, 适当浓缩, 冷冻干燥得丹参素钠白色针状结晶。

2.4 RP-HPLC 制备分离结果及产品鉴定: RP-HPLC 制备分离结果见表 2, 色谱图见图 1。纯化得到的物质为白色针状结晶, 分子式为 C₉H₉O₅Na, 熔点为 256℃~257℃, $[\alpha]_D^{25} + 36.28$ (水), $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 278, 301 (sh), IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3 450~2 400 (羟基), 1 525.6, 1 462.5 (苯核), 1 602.7, 1 378.6 (羧基), 1 207.0 (酚羟基), 1 115.7 (醇羟基)。ESI-MS m/z : 197.0 [M-H]⁻, 123.3 [M-H-CO₂-CHOH]⁻。对照文献数据^[3,4]并与对照品比较, 推断该化合物是丹参素钠。

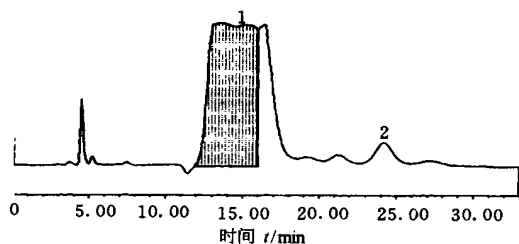
表 2 制备型 RP-HPLC 分离效果

Table 2 Separate effect of preparative RP-HPLC			
组别	质量 /mg	纯度 /%	提取率 /%
分离前	152.4	34.0	—
分离后	38.5	98.3	73.0

3 分析与讨论

3.1 制备条件由 HPLC 分析条件扩展而得。产品制备在上样量和分离目的方面不同于样品分析, 要求在达到一定纯度的前提下获得尽可能多的产品。分析型 RP-HPLC 的参数在制备色谱中有重要参考价值。

3.2 RP-HPLC 分析条件: 丹参素钠的 HPLC 分析条件, 经优化, 流动相选择乙醇-水-冰醋酸 (14.5: 85: 0.5)。该流动相粘度适中, 加入少量的冰醋酸调节溶液 pH 值, 有利于增加溶质分子在反相键合相上的保留时间, 提高分离度和色谱的重现性。由色谱图分析, 丹参素钠与相邻色谱峰的分度 > 1.7 , 分析型色谱柱理论塔板数以丹参素钠计为 3 500。



1-丹参素钠 2-原儿茶醛

1-D(+)-β-(3,4-dihydroxyphenyl)-lactate sodium

2-protocatechualdehyde

图 1 丹参素钠的制备型 RP-HPLC 色谱图
及中心切割示意图

Fig. 1 Central incision of D(+)-β-(3,4-dihydroxyphenyl)-lactate sodium by preparative RP-HPLC

3.3 分析型 RP-HPLC 条件转换至制备型 RP-HPLC 条件: 分析型 HPLC 条件向制备型 HPLC 转化时扩展因子 $SF = (r_p)^3 \times L_p / (r_a)^3 \times L_a = 105$ (式中: p 制备型 HPLC, a 分析型 HPLC, r 色谱柱内径, L 色谱柱长度)

选择小的容量因子有利于分离时间的缩短和出峰体积的缩小。高的分离度与制备型 HPLC 可能出现的过载相适应。

3.4 分离参数^[5]: 制备型 HPLC 的效能取决于分离速度、产品纯度和上样量(制备量)。为保证产品的最终纯度,采用的方法是选择与分析型 HPLC 粒度相同的反相键合固定相,加快流动相的流速(45 mL/min)和逐步加大上样量。

3.5 洗脱程序优化: 将分析型的填料直接应用于制备型色谱,勿需对流动相作较大改动。为了提高色

谱的分离效率,扩大各组分的容量因子的差别,在分析型 HPLC 优化条件的基础上,选择梯度分离条件。一次分离可在 30 min 内完成,丹参素钠的纯度达 98.3%。

3.6 色谱柱的超载和色谱峰中心切割: 为提高制备 HPLC 的分离能力,由分析型 HPLC 的分离规模和扩展因子转化为制备型 HPLC 分离时,逐步加大上样样品的浓度,使色谱柱浓度超载。此时的分离为非线性色谱,采用“中心切割”技术(图 1)进行收集,有效避免了丹参素钠色谱峰前后微量组分的污染。

3.7 本实验以丹参干燥根为原料,采用预处理、稳定化和 HPLC 制备方法进行了丹参素钠的分离纯化研究,得出如下结论: 利用亲脂性吸附树脂和制备型液相色谱组合分离技术,能较好地解决丹参素钠在分离过程物理性质不稳定问题,初步筛选出批量制备丹参素钠的工艺条件。分离所得丹参素钠产品,经 LC-MS, IR, UV, HPLC 和熔点鉴定以及与对照品比较,纯度达到 98%。

References

- [1] Liu Y L, Liu G T. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by salvianolic acid A [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2002, 37(2): 81-85.
- [2] Zhang H J, Li L N. Salvianolic acid I: a new depside from *Salvia cavaleriei* [J]. *Planta Med*, 1994, 60: 71-73.
- [3] Zhang D C, Wu W L, Liu X J, et al. Studies on water soluble active components of *Salvia miltiorrhiza* II. The structure of D(+)-β-(3,4-dihydroxyphenyl)-lactate [J]. *Acta Acad Med Shanghai* (上海第一医学院学报), 1980, 7(5): 384-385.
- [4] Cheng Z X, Gu W H, Huang H Z, et al. Studies on water soluble phenolic acid of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1981, 16(9): 536-537.
- [5] Attila F, Georges G. Comparing the optimum performance of the different modes of preparative liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 796: 59-74.

高效液相色谱法和薄层色谱法测定重楼中薯蓣皂苷元的含量

李惠芬¹, 平 渊², 陈 刚¹, 李军燕², 何 1*

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 中国中医研究院广安门医院, 北京 100053)

摘要: 目的 采用高效液相色谱和薄层色谱技术, 分别测定重楼中薯蓣皂苷元的含量。方法 采用 HPLC 法, 选用 ODS 柱, 流动相: 乙腈-水 (90:10), 检测波长: 203 nm, 柱温: 35℃; TLC 法选用硅胶 G 板, 展开剂: 环己烷-乙酸乙酯 (4:1), 测定波长: 610 nm, 参比波长: 420 nm。结果 线性范围分别为 1.2~7.2 μg ($r = 0.9998$), 0.2~1.0 μg ($r = 0.9957$)。平均回收率分别为 102.2%, $RSD = 3.39\%$ ($n = 6$); 100.9%, $RSD = 2.68\%$ ($n = 6$)。结论 两种方法均可用于重楼中薯蓣皂苷元的质量控制。

关键词: 重楼; 薯蓣皂苷元; 高效液相色谱; 薄层色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)12-0127-03