

硅胶柱色谱结合高速逆流色谱法分离纯化丹参中丹参酮

蓝天凤^{1,2}, 于宗渊³, 王岱杰², 王晓^{2*}, 管仁军¹

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355
2. 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014
3. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

摘要: 目的 建立硅胶柱色谱结合高速逆流色谱 (HSCCC) 法分离纯化丹参中丹参酮的方法。方法 丹参粗提物经硅胶柱色谱分离, 得到组分 F1、F2, 分别采用石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (4:3:4:2)、(8:5:8:3) 的溶剂系统进行 HSCCC 分离, 下相为流动相, 体积流量 2.0 mL/min, 转速 850 r/min, 检测波长 254 nm, 所得产物采用 ESI-MS、NMR 进行结构鉴定。结果 80 mg 组分 F1 分离得到丹参酮 I (14 mg)、二氢丹参酮 I (22 mg)、丹参酮 II_A (26 mg); 80 mg 组分 F2 分离得到二氢丹参酮 (11 mg)、三叶鼠尾酮 B (15 mg)、隐丹参酮 (30 mg); 6 个化合物进行 HPLC 分析, 质量分数均大于 96%。结论 硅胶柱色谱结合 HSCCC 是一种有效的分离制备丹参酮的方法。

关键词: 丹参; 高速逆流色谱 (HSCCC); 硅胶柱色谱; 丹参酮; 二氢丹参酮; 隐丹参酮

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0466-04

Separation and purification of tanshinone from *Salvia miltiorrhiza* by combination of silica gel and high-speed counter-current chromatography

LAN Tian-feng^{1,2}, YU Zong-yuan³, WANG Dai-jie², WANG Xiao², GUAN Ren-jun¹

1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
2. Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China
3. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To develop a method for separation and purification of tanshinone from *Salvia miltiorrhiza* by combination of silica gel and high-speed counter-current chromatography (HSCCC). **Methods** The crude extract of *S. miltiorrhiza* was separated by silica gel chromatography and F1 and F2 were obtained. Then, F1 and F2 were separated by HSCCC with a two-phase solvent system composed of petroleum ether-methanol-water (4:3:4:2 and 8:5:8:3), respectively. The lower phase was used as the mobile phase with a flow rate of 2.0 mL/min, while the apparatus rotated at 850 r/min and the eluates were detected at 254 nm. The structures of the target compounds were identified by ESI-MS and NMR. **Results** From 80 mg of F1, three compounds with tanshinone I (14 mg), dihydrotanshinone I (22 mg), and tanshinone II_A (26 mg) were obtained. And from 80 mg of F2, dihydrotanshinone (11 mg), trijuganone B (15 mg), and cryptotanshinone (30 mg) were obtained. The purities of these six compounds determined by HPLC were all over 96%, respectively. **Conclusion** Combination of silica gel and HSCCC is an efficient method for separation of tanshinone from *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; high-speed counter-current chromatography (HSCCC); silica gel chromatography; tanshinone; dihydrotanshinone; cryptotanshinone

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎^[1-2], 是我国应用最早、最广泛的中草药之一。始载于《神农本草经》, 列为上品, 历代本草均有记载。现代药理研究表明,

丹参脂溶性成分具有抗菌、抗炎、抗氧化等药理作用^[3-4], 其主要活性成分包括丹参酮 I、丹参酮 II_A、隐丹参酮、二氢丹参酮等^[5-9]。因此, 建立丹参酮的快速分离制备方法, 对丹参药材的质量控制及其相

收稿日期: 2010-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20872083); 山东省科技攻关项目 (2010GSF10287); 济南市高校院所自主创新计划 (201004011)

作者简介: 蓝天凤, 广西人, 在读硕士, 主要从事中药质量控制与研究。Tel: 13455110515 E-mail: piao.xue0473@163.com

*通讯作者 王晓 Tel: (0531)82605319 E-mail: wangx@keylab.net

关药物的开发十分必要。传统的硅胶柱色谱在丹参酮单体的分离制备上存在着耗时长、消耗溶剂多、分离效率低等缺点。高速逆流色谱 (high-speed counter-current chromatography, HSCCC) 法是一种不需要固态载体的液液分配色谱技术, 该技术与传统方法比较具有分离效率高、操作简便、可避免因不可逆吸附而引起的样品损失等优点, 已被广泛应用于天然产物有效成分的分离制备中^[10-15]。本研究采用硅胶柱色谱结合 HSCCC 对丹参中脂溶性成分进行分离纯化, 快速制备出了 6 个高纯度的丹参酮单体成分: 丹参酮 I、二氢丹参酮 I、丹参酮 II_A、二氢丹参酮、三叶鼠尾酮 B 和隐丹参酮。

1 仪器与材料

TBE-300A 高速逆流色谱仪 (上海同田生物技术有限公司), 配有聚四氟乙烯管分离柱 (内径 1.6 mm, 分离柱体积 266 mL); HX-1050 型恒流泵 (北京博康实验仪器有限公司); 8823AUV 检测器 (北京滨达英创科技有限公司); Waters 600 高效液相色谱仪; Varian INOVA-600 核磁共振波谱仪 (Varian 公司, 美国); 质谱分析采用电喷雾离子阱质谱 (Agilent 1100 series 6320 ion-trap, 美国)。

丹参药材购自山东中医药大学中鲁医院, 经山东省中医药研究院于宗渊研究员鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎。

甲醇为色谱纯; 石油醚 (60~90 °C)、醋酸乙酯、氯仿等均为分析纯; 硅胶 (200~300 目) 及 GF₂₅₄ 硅胶板 (购自青岛海洋化工厂); 实验用水为滤过蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 总丹参酮的提取

取丹参药材 3 kg, 粉碎, 过 40 目筛, 依次用石油醚、甲醇渗漉, 甲醇渗漉液浓缩后得浸膏 203.2 g。将此浸膏分散于 1 L 蒸馏水中, 用等体积氯仿萃取 3 次, 得氯仿萃取物 50.8 g。

2.2 HPLC 分析条件

色谱柱为 Symmetryshield C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (75:25), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.3 硅胶柱色谱粗分

本实验考察了石油醚-醋酸乙酯、石油醚-丙酮、氯仿、氯仿-甲醇洗脱系统, 结果表明, 当采用氯仿

洗脱时, 具有分离效果好, 样品上样量大等优点。取氯仿萃取物 50 g 经硅胶柱色谱初步分离, 氯仿洗脱, 每 100 mL 流出液收集为一个流份, 共收集得到 120 个流份, 通过硅胶薄层色谱检测, 展开剂为石油醚-醋酸乙酯 (4:1), 得到化学成分较简单、含量丰富的组分 F1 (14~30 号流份) 4.2 g 和 F2 (57~79 号流份) 3.5 g, 实现了 6 种丹参酮类化合物的富集和预纯化, 用于进一步 HSCCC 分离, 两组分液相色谱图见图 1。

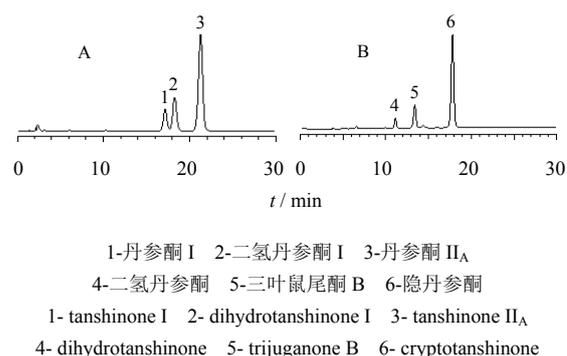


图 1 组分 F1 (A) 和 F2 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of F1 (A) and F2 (B)

2.4 HSCCC 溶剂系统的选择

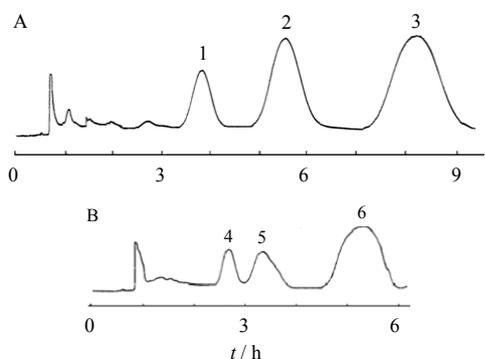
溶剂系统是影响 HSCCC 分离效果的主要因素之一, 也是逆流色谱分离工作的难点。合适分离体系主要取决于样品在固定相和流动相两者之间具有合适分配系数。由石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水组成的溶剂系统, 通过调整溶剂比例可以形成一个疏水范围很宽的溶剂体系, 本实验在参考文献[16]的基础上, 经多次调整溶剂比例, 最终筛选出石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (4:3:4:2) 为组分 F1 的溶剂系统, 石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (8:5:8:3) 为组分 F2 的溶剂系统, 两组分均可实现基线分离。

2.5 HSCCC 分离条件

溶剂系统石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (4:3:4:2)、(8:5:8:3) 分别配制于分液漏斗中, 剧烈振荡, 体系分相平衡后分离出上相 (固定相) 和下相 (流动相), 分别超声脱气 5 min, 备用。仪器转速 850 r/min, 流动相体积流量 2.0 mL/min, 紫外检测器波长 254 nm。

组分 F1 采用溶剂系统石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (4:3:4:2), 进样 80 mg 分离得到丹参酮 I (14 mg)、二氢丹参酮 I (22 mg)、丹参酮 II_A (26 mg), HSCCC 图见图 2-A, 经 HPLC 测定质量分数分别为

99.0%、99.6%、99.1%。组分 F2 采用溶剂系统石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (8:5:8:3), 进样 80 mg 分离得到二氢丹参酮 (11 mg)、三叶鼠尾酮 B (15 mg)、隐丹参酮 (30 mg), HSCCC 图见图 2-B, 经 HPLC 测定质量分数分别为 96.3%、98.2%、99.2%。



1-丹参酮 I 2-二氢丹参酮 I 3-丹参酮 II_A
4-二氢丹参酮 5-三叶鼠尾酮 B 6-隐丹参酮
1- tanshinone I 2- dihydrotanshinone I 3- tanshinone II_A
4- dihydrotanshinone 5- trijuganone B 6- cryptotanshinone

图 2 组分 F1 (A) 和 F2 (B) 的 HSCCC 色谱图
Fig. 2 HSCCC chromatograms of F1 (A) and F2 (B)

2.6 质谱和核磁数据分析

质谱分析条件: 正离子模式, 样品通过流动注射泵进样, 体积流量 0.2 mL/min, 干燥气温度 350 °C; 干燥气流量 9.0 L/min; 雾化气压力 2.41×10^5 Pa; 毛细管电压 4 kV。质量范围 m/z 50~1 200, 实验前质量数经过校正。

化合物 1: 棕红色针状结晶, ESI-MS m/z : 277 $[M+H]^+$, IR ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 423, 2 917, 1 647, 1 619, 1 510, 1 173, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 2.28 (3H, s, H-17), 2.68 (3H, s, H-18), 7.33 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6), 7.53 (1H, dd, H-2), 7.77 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-3), 8.27 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7), 9.23 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-1)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 118.7 (C-1), 130.7 (C-2), 124.8 (C-3), 135.2 (C-4), 132.7 (C-5), 132.9 (C-6), 128.3 (C-7), 129.6 (C-8), 123.1 (C-9), 133.6 (C-10), 183.4 (C-11), 175.6 (C-12), 121.8 (C-13), 161.2 (C-14), 142.0 (C-15), 120.5 (C-16), 8.8 (C-17), 19.9 (C-18)。经与文献报道数据对照^[17], 确定该化合物为丹参酮 I。

化合物 2: 枣红色针状结晶, ESI-MS m/z : 279 $[M+H]^+$, IR ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 327, 2 898, 1 655,

1 582, 1 515, 1 475, 1 207。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 1.35 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-17), 2.64 (3H, s, H-18), 3.60 (1H, m, H-15), 4.37 (1H, dd, $J=6.4$ Hz, 9.6 Hz, H-16), 4.90 (1H, t, $J=9.6$ Hz, H-15), 7.34 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-3), 7.51 (1H, dd, $J=6.8, 9.0$ Hz, H-2), 7.70 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-1), 8.25 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6), 9.24 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-7)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 120.4 (C-1), 130.5 (C-2), 128.9 (C-3), 135.0 (C-4), 126.2 (C-5), 132.0 (C-6), 125.1 (C-7), 132.2 (C-8), 128.3 (C-9), 134.8 (C-10), 184.4 (C-11), 175.8 (C-12), 118.4 (C-13), 170.6 (C-14), 81.7 (C-15), 34.7 (C-16), 18.9 (C-17), 19.9 (C-18)。经与文献报道数据对照^[18], 确定该化合物为二氢丹参酮 I。

化合物 3: 樱红色针状结晶, ESI-MS m/z : 295 $[M+H]^+$, IR ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 149, 2 954, 1 693, 1 670, 1 536, 1 581, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 1.31 (6H, s, H-18, 19), 1.66, 1.79 (2H each, m, H-2, 3), 2.67 (3H, d, $J=1.2$ Hz, H-17), 3.18 (2H, m, H-1), 7.22 (1H, H-15), 7.55 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7), 7.63 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 29.9 (C-1), 19.1 (C-2), 37.8 (C-3), 34.7 (C-4), 144.5 (C-5), 133.5 (C-6), 120.2 (C-7), 127.4 (C-8), 126.5 (C-9), 150.1 (C-10), 183.6 (C-11), 175.8 (C-12), 121.1 (C-13), 161.7 (C-14), 141.3 (C-15), 119.9 (C-16), 8.8 (C-17), 31.9 (C-18, 19)。经与文献报道数据对照^[17], 确定该化合物为丹参酮 II_A。

化合物 4: 橙红色针状结晶, ESI-MS m/z : 279 $[M+H]^+$, IR ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 423, 2 917, 1 647, 1 619, 1 510, 1 173, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 1.41 (3H, d, H-17), 2.69 (3H, s, H-18), 3.65 (1H, m, H-16), 4.43, 4.96 (2H, m, H-15), 7.39 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6), 7.56 (1H, dd, H-2), 7.73 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-3), 8.27 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7), 9.28 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-1)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 120.3 (C-1), 130.4 (C-2), 125.0 (C-3), 134.8 (C-4), 132.1 (C-5), 131.9 (C-6), 128.9 (C-7), 128.2 (C-8), 126.0 (C-9), 135.0 (C-10), 184.3 (C-11), 175.7 (C-12), 118.4 (C-13), 170.6 (C-14), 81.6 (C-15), 34.7 (C-16), 18.9 (C-17), 19.9 (C-18)。经与文献报道数据对照^[17], 确定该化合物为二氢丹参酮。

化合物 5: 棕红色针状结晶, ESI-MS m/z : 280 $[M+H]^+$, IR ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 2 966, 1 689, 1 612, 1 480, 1 382, 1 237, 1 129。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 1.37 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-17), 2.07 (3H, d, $J=1.8$ Hz, H-18), 2.25 (2H, m, H-2), 3.36 (2H, t, $J=7.8$ Hz, H-1), 3.62 (1H, m, H-15), 4.37 (1H, dd, $J=6, 9.5$ Hz, Hb-16), 4.90 (1H, t, $J=9.5$, Ha-16), 6.10 (H-3, m, H-3), 7.42 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-6), 7.51 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-7)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 24.6 (C-1), 22.5 (C-2), 123.2 (C-3), 140.8 (C-4), 118.7 (C-5), 129.7 (C-6), 127.2 (C-7), 131.0 (C-8), 126.1 (C-9), 143.4 (C-10), 184.7 (C-11), 176.0 (C-12), 111.2 (C-13), 170.6 (C-14), 34.6 (C-15), 81.4 (C-16), 19.7 (C-17), 18.5 (C-18)。经与文献报道数据对照^[19], 确定该化合物为三叶鼠尾酮 B。

化合物 6: 橙红色针状结晶, ESI-MS m/z : 297 $[M+H]^+$, IR ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 435, 3 125, 2 924, 1 672, 1 593。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 1.29 (6H, s, H-18, 19), 1.35 (3H, s, H-17), 1.77, 1.80 (2H, m, H-2, 3), 3.22 (2H, m, H-1), 3.60, 4.37 (2H, m, H-15), 4.90 (1H, m, H-16), 7.48 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-6), 7.64 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-7)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 29.7 (C-1), 18.9 (C-2), 37.8 (C-3), 34.8 (C-4), 143.7 (C-5), 132.6 (C-6), 122.5 (C-7), 128.3 (C-8), 126.2 (C-9), 152.3 (C-10), 184.2 (C-11), 175.7 (C-12), 118.3 (C-13), 170.8 (C-14), 81.4 (C-15), 34.6 (C-16), 19.0 (C-17), 31.9 (C-18, 19)。经与文献报道数据对照^[17], 确定该化合物为隐丹参酮。

3 结论

本实验采用硅胶柱色谱联合 HSCCC 快速分离得到 6 种质量分数高的丹参酮单体, 其中 5 种化合物的质量分数在 98.5% 以上, 满足对照品的要求。这两种技术的结合是一种有效的分离制备丹参酮单体的方法, 为该方法应用于其他类别天然产物的分离提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
 [2] Tian Y P, Wang Q, Yang W, *et al.* Determination of shionone in rat plasma by HPLC and its pharmacokinetic

study [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2):132-135.
 [3] 程文君, 张艳萍. 丹参脂溶性成分抗菌消炎作用及其临床应用 [J]. 中国现代实用医学杂志, 2007, 3(6): 61.
 [4] 陈 磊, 陆 茵, 郑仕中. 丹参药理活性成分的整合效应 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 476-479.
 [5] 赵小亮, 雷浩东, 张 继. 丹参有效成分提取的研究概述 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(6): 1795-1796.
 [6] 张英锋, 王燕革, 马子川, 等. 丹参活性化学成分的研究 [J]. 化学世界, 2009, 10: 638-640.
 [7] 和 凡, 钟国平, 赵立子, 等. 丹参酮 II_A 对大鼠细胞色素 P450 酶的诱导作用 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 938-942.
 [8] 赵广荣, 田莉莉, 王长松. 丹参素的抗癌活性研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 180-182.
 [9] 刘晓丹, 刘文达, 刘培庆, 等. 丹参酮 II_A 对白血病 K562 细胞的体外诱导凋亡作用研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1663-1666.
 [10] 韩利文, 陈锡强, 袁延强, 等. 高速逆流色谱在中药现代化研究中的应用 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 241-246.
 [11] Wang X, Li F W, Zhang H X, *et al.* Preparative isolation and purification of polymethoxylated flavones from Tangerine peel using high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1090(1/2): 188-192.
 [12] 郑国栋, 周 芳, 蒋 林, 等. 高速逆流色谱分离制备广陈皮中多甲氧基黄酮类成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 52-55.
 [13] 黄天辉, 周 俊. 高速逆流色谱分离纯化白芍中芍药苷的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(1):67-68.
 [14] 沈 洁, 苏燕评, 许 盈, 等. 高速逆流色谱分离纯化钩吻中钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1392-1395.
 [15] 苏 静, 谈 锋, 谢 峻, 等. 循环高速逆流色谱从曼地亚红豆杉枝叶提取物中分离紫杉醇和三尖杉宁碱 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1569-1572.
 [16] 屈 焱, 杨悦武, 郭治昕, 等. 高速逆流色谱分离制备丹参脂溶性成分 [J]. 化学工业与工程, 2007, 24(1): 48-51.
 [17] 薛 明, 史彦斌, 崔 颖, 等. 甘肃鼠尾草化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1999, 12(6): 27-32.
 [18] 房其年, 张佩玲, 徐宗沛, 等. 丹参抗菌有效成分的研究 [J]. 化学学报, 1976, 34(3): 197-209.
 [19] Lu X Z, Luo H W, Masatake N. Trijuganone A and B: two new phenanthrenequinones from roots of *Salvia trijuga* [J]. *Planta Med*, 1990, 56(1): 87-88.