

丹参二萜醌部位高速逆流色谱制备工艺及体外抗肿瘤活性研究

楼招欢¹, 杨波¹, 沈炜², 申力¹, 张光霁^{1*}

1. 浙江中医药大学 药物研究所, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006

摘要: 目的 优选分离丹参二萜醌最佳的高速逆流色谱(HSCCC)溶剂体系,明确丹参二萜醌的体外抗肿瘤活性。方法 采用CO₂超临界萃取法制备丹参总二萜醌,采用UPLC测定丹参酮II_A和隐丹参酮在不同溶剂系统上下相中的峰面积,计算分配系数(K)值及K值的比值(α),确定最佳溶剂体系。CKK-8法观察丹参二萜醌对人肝癌(QGY-7703)、肺癌(PC9、A549)、胃癌(MKN-45、HGC-27)、结肠癌(HCT116)、骨髓瘤(U266、RPMI8226)、乳腺癌(MCF-7)等9种人源肿瘤细胞株的抑制作用。结果 HSCCC溶剂系统为石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水(12:8:13:7)时,丹参酮II_A和隐丹参酮能得到较好的分离,丹参二萜醌的得率为8.65%。丹参二萜醌体外对人肝癌、肺癌、胃癌、结肠癌、骨髓瘤、乳腺癌等9种人源肿瘤细胞均有一定的抑制作用,其中对人肺癌PC9细胞及人乳腺癌MCF-7细胞的抑制作用最为显著。结论 确定的溶剂体系对丹参二萜醌有效部位的分离效果可靠,建立的HSCCC制备方法操作简单,可作为高效快速分离纯化丹参二萜醌的分离制备方法。丹参二萜醌在体外具有良好的抗肿瘤活性。

关键词: 丹参; 丹参酮II_A; 隐丹参酮; CO₂超临界萃取; 高速逆流色谱; 抗肿瘤

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)05-0679-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.05.011

Studies on HSCCC preparation technology of diterpenoidtanshinone and its antitumor activity *in vitro*

LOU Zhao-huan¹, YANG Bo¹, SHEN Wei², SHEN Li¹, ZHANG Guang-ji¹

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. The First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China

Abstract: Objective To optimize the solvent system of high-speed counter-current chromatography (HSCCC) for diterpenoidtanshinone separation and define its antitumor activity *in vitro*. **Methods** Total diterpenoidtanshinone was made by CO₂ supercritical fluid extraction (SFE), UPLC was applied to determining the peak area of tanshinone II_A and cryptotanshinone in different solvents up or under phase, and the partition coefficient K values of them were calculated. CKK-8 was used to observe the inhibitory effects of diterpenoidtanshinone on human liver cancer (QGY-7703), lung cancer (PC9, A549), gastric cancer (MKN-45, HGC-27), colon cancer (HCT116), myeloma (U266, RPMI8226), and breast cancer (MCF-7). **Results** The best solvent system for HSCCC was petroleum ether-ethyl acetate-methanol-aqua (12:8:13:7). The yield of diterpenoidtanshinone was 8.65%. Diterpenoidtanshinone has good effect of antitumor *in vitro* especially on human PC9 cell. **Conclusion** The selected solvent system is suitable for diterpenoidtanshinone separation by HSCCC, and the established HSCCC method is reliable and easy for operating. Diterpenoidtanshinone has good antitumor effect *in vitro*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; tanshinone II_A; cryptotanshinone; CO₂ supercritical fluid extraction; high-speed counter-current chromatography; antitumor

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的根及根茎,具有活血、化痰、益气等功效。丹参性味平和,毒副作用小,为临床常用大宗中药。《神农本草经》记载:“丹参,味苦、

收稿日期: 2014-10-24

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(博导类)(20123322110001); 浙江省重大科技专项计划项目(2012C13017-1); 中国博士后科学基金(2014M561791)

作者简介: 楼招欢(1978—),女,博士,助理研究员,主要从事中药药理及产品开发。Tel/Fax: (0571)86613602 E-mail: lou_jasmine@163.com

*通信作者 张光霁,男,教授,博士生导师,主要从事中医药抗肿瘤研究及产品开发。Tel: (0571)86633168 E-mail: zgj@zcmu.edu.cn

微寒。主心腹邪气，肠鸣幽幽如走水，寒热积聚，破症除瘕，止烦满，益气”。丹参脂溶性成分的应用可追溯到南北朝时期。中医典籍记载，丹参用苦酒与猪脂提取，所得即为“赤羔”，主治疮疡痈肿。“赤羔”即为丹参总二萜醌类成分，该类成分以丹参酮 II_A (tanshinone II_A, T)、隐丹参酮 (cryptotanshinone, C) 等为代表，临床主要用于心、脑血管疾病的治疗。近年来研究表明，丹参二萜醌对多种人源肿瘤细胞亦具有抑制作用，并且能诱导肿瘤细胞分化、凋亡，抑制肿瘤细胞侵袭、转移。因此，采用适宜的方法从丹参中分离和富集丹参二萜醌类成分，对于促进丹参有效成分药物开发研究及丹参更广泛的应用，具有重要现实意义^[1]。

目前丹参酮 II_A 等丹参二萜醌类成分的主要提取分离方法有醇提法^[2]、超临界 CO₂ 流体萃取法^[3] 等。现代仪器分离法能快速对复杂成分进行精分离，得到高纯度物质，其中高速逆流色谱 (high-speed counter-current chromatography, HSCCC) 是近年在天然植物活性成分分离中得到广泛应用的现代仪器分离法^[4-6]。相比制备型 HPLC, HSCCC 具有价廉简单，样品制备量大的优点。目前关于 HSCCC 技术分离丹参酮 II_A 和隐丹参酮等单体的研究有相关报道^[7]，但采用该技术从丹参中分离富含隐丹参酮和丹参酮 II_A 的丹参二萜醌类的研究未见报道。相比分离得到的单一化合物，主要成分明确的多组分中药有效部位，更能体现中药的特点和特色^[8]。本研究旨在选择分离经超临界流体萃取产物中丹参二萜醌最佳的 HSCCC 溶剂体系，利用 UPLC 法测定两相溶剂体系中各组分的分配系数 (*K*) 值，运用 HSCCC 技术分离丹参二萜醌部位，并进行体外抗肿瘤活性筛选，为丹参二萜醌类成分的进一步研发提供基础。

1 仪器与材料

TANTO TBE300A 高速逆流色谱仪，上海同田生物技术股份有限公司；Waters Acquity UPLC/TUV 超高效液相色谱，Waters 科技（上海）有限公司；KQ-250DB 数控超声波清洗仪，昆山市超声波仪器有限公司；Milli-Q 纯水仪，法国 Millipore 公司。

丹参饮片购自浙江中医药大学中药饮片厂（批号 140401；产地山东），饮片经浙江中医药大学陈孔荣副教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的根。丹参酮 II_A（批号 A0058，HPLC 测定质量分数 ≥ 98%）、隐丹参酮（批号

A0061，HPLC 测定质量分数 ≥ 98%），中国科学院成都生物研究所。石油醚，北京化工厂；醋酸乙酯，杭州双林化工试剂厂；甲醇，杭州化学试剂有限公司；以上试剂均为分析纯；乙腈、甲酸为色谱纯，德国默克公司；超纯水由 Milli-Q 纯水仪制得。

人肝癌 (QGY-7703)、肺癌 (PC9、A549)、胃癌 (MKN-45、HGC-27)、结肠癌 (HCT116)、骨髓瘤 (U266、RPMI8226)、乳腺癌 (MCF-7) 细胞株，均由浙江中医药大学附属第一医院中心实验室提供。

2 方法与结果

2.1 CO₂ 超临界萃取制备丹参总二萜醌

参考常虹飞等^[9]、李霞等^[10]确定的丹参酮 CO₂ 超临界萃取工艺及预试验结果，本实验中 HSCCC 分离的丹参总二萜醌制备工艺如下：取 10 kg 干燥的丹参饮片，粉碎，过 10 目筛，置于萃取釜中，进行 CO₂ 超临界流体萃取，萃取条件：萃取压力为 25 MPa，萃取温度为 55 °C，萃取 2 h，每小时加入 500 mL 无水乙醇，分离釜温度为 35 °C，分离提取液，在 50 °C 减压蒸干，得到红色膏状物（即丹参总二萜醌，得率为 0.312%，得率 = 膏状物质量/饮片质量），置 4 °C 冰箱保存，供 HSCCC 分离。

2.2 HSCCC 分离溶剂体系的确定

2.2.1 UPLC 分析用对照品溶液制备 取隐丹参酮及丹参酮 II_A 对照品适量，精密称定，配成隐丹参酮 10 μg/mL、丹参酮 II_A 50 μg/mL 的混合对照品溶液，备用。

2.2.2 UPLC 分析色谱条件 色谱柱为 Ultmatil XB C₁₈ 柱 (250 mm × 4 mm, 5 μm)；体积流量 0.3 mL/min，检测波长 270 nm，洗脱体系为乙腈-0.1% 甲酸水溶液，洗脱条件：0~19 min，25%~60% 乙腈，19~20 min，60%~25% 乙腈，进样量 2 μL。

2.2.3 *K* 值的测定及两相溶剂体系的选择 采用 UPLC 法测定丹参 CO₂ 超临界萃取物中各组分的 *K* 值，以确定用于 HSCCC 分离的两相溶剂体系^[11]。方法如下：配制不同比例的溶剂体系 20 mL 静置 15 h，分成上下两相。取适量样品于试管中，加入下相溶剂溶解，精密移取 5 mL 下相溶液，再加入 5 mL 上相溶液，充分振摇，静置分层，将上相及下相减压蒸干，分别用甲醇溶解并定容至 2 mL 量瓶中，采用 UPLC 法测定各样品中隐丹参酮和丹参酮 II_A 的峰面积（上相溶液中组分的峰面积为 *A*₁，下相溶液中组分的峰面积为 *A*₂），计算 *K* 值 ($K = A_1/A_2$)。

选取目标组分的 K 值为 0.5~2.0, 且不同相邻组分 K 值之比大于 1.0 的两相溶剂体系作为 HSCCC 分离用两相溶剂。

根据文献报道^[12]及预试验结果, 本实验选择石油醚、醋酸乙酯、甲醇、水作为两相系统溶剂, 通过配制不同比例的两相溶剂体系: 石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水(8:6:6:4、8:6:7:3、12:8:13:7), 根据丹参酮 II_A 和隐丹参酮的 K 值选出最佳两相溶剂体系, 结果见表 1。可见石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水(8:6:6:4) 溶剂系统丹参酮 II_A 和隐丹参酮的 K 值相对其他几个系统较大, 石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水(12:8:13:7) 系统 K 值略小, 但该系统分配比 (α , $\alpha = K_T/K_C$) 最大, 能够实现较理想的分离(图 1)。确定丹参二萜醌 HSCCC 分离最佳溶剂体系为石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水(12:8:13:7)。

2.3 HSCCC 分离丹参二萜醌

配制一定体积的溶剂系统, 充分振摇, 静置过夜, 分取上相及下相, 使用前超声 5 min; 将上相

表 1 不同体系下丹参酮 II_A 和隐丹参酮的 K 值及 α

Table 1 K values and α of tanshinone II_A and cryptotanshinone in different solvent systems

溶剂体系	组分	t_R /min	K 值	α
石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (8:6:6:4)	C	11.87	2.012	1.15
	T	15.52	2.320	
石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (8:6:7:3)	C	11.85	1.200	0.76
	T	15.47	0.908	
石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (12:8:13:7)	C	11.83	1.267	1.68
	T	15.43	2.134	

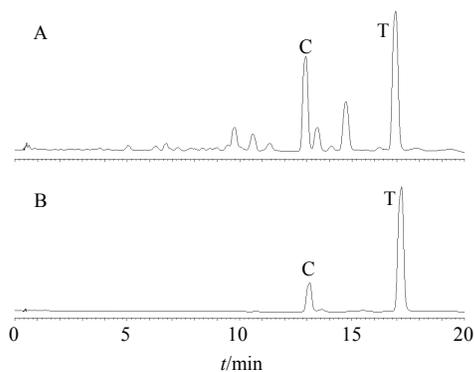


图 1 丹参 CO₂ 超临界萃取样品 (A) 和 HSCCC 分离的丹参二萜醌样品 (B) 的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC of *S. miltiorrhiza* extract by SFE (A) and diterpenoidtanshinone by HSCCC (B)

(固定相) 首先泵入逆流色谱仪, 体积流量 15 mL/min, 转速 300 r/min; 待有液体溢出后, 再以 6 mL/min 的体积流量泵入下相(流动相), 同时开启 HSCCC, 将转速调至 1 300 r/min, 达到动力学平衡后(固定相和流动相同时有液体流出时), 将约 8 g CO₂ 超临界萃取制得丹参总二萜醌, 用选定的下相溶液 20 mL 溶解后注入 HSCCC 仪, 结合 HSCCC 色谱图(图 2)及 UPLC 随行检测, 待红色流分流出管路后, 开始收集流分, 4 mL 收集 1 管, 取 6~11 管, 合并流分, 减压回收溶剂, 干燥, 即得到丹参二萜醌有效部位。

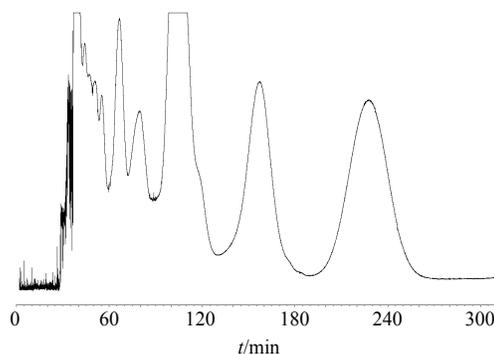


图 2 丹参二萜醌 HSCCC 分离图

Fig. 2 HSCCC of diterpenoidtanshinone

结果表明总计从丹参 CO₂ 超临界萃取浸膏 31.2 g 中分离得到含隐丹参酮、丹参酮 II_A 的丹参二萜醌 2.7 g, 得率为 8.65% (得率=丹参二萜醌干浸膏量/丹参 CO₂ 超临界萃取浸膏量)。UPLC 分析, 面积归一化法计算得样品中隐丹参酮的质量分数约 70%, 丹参酮 II_A 的质量分数约为 30%。

2.4 HSCCC 分离产物体外抗肿瘤活性筛选

取对数生长期的人源肿瘤细胞株, 消化计数后, 按每孔 $6 \times 10^3 \sim 9 \times 10^3$ 个细胞 (100 μ L) 接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 待细胞贴壁后, 用不同质量浓度的丹参二萜醌有效部位处理, 每孔设 3 个复孔。药物与肿瘤细胞孵育 24 h 后, 加 CCK-8, 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 1 h 后, 终止培养, 弃去培养液, 加入 DMSO (150 μ L/孔), 振摇均匀后, 用酶标仪在 450 nm 处测定各孔的吸光度 (A) 值, 计算丹参二萜醌对肿瘤细胞的抑制率 (抑制率=1-给药孔平均 A 值/对照组平均 A 值)。根据抑制率计算药物对肿瘤细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀), IC₅₀ 值用 82798-IC₅₀ 软件计算。实验重复 3 次, IC₅₀ 值取 $\bar{x} \pm s$ 。结果表明, 丹参二萜醌有效部位体外对肝癌 (QGY-7703)、肺癌 (PC9、A549)、胃癌 (MKN-45、HGC-27)、

结肠癌 (HCT116)、骨髓瘤 (U266、RPMI8226)、乳腺癌 (MCF-7) 9 种人源肿瘤细胞株均具有一定的抑制作用, 其中对人肺癌 PC9 细胞及人乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制作用较为显著, 见表 2。

表 2 丹参二萜醌对人源肿瘤细胞株的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 IC_{50} values of diterpenoidtanshinone on anti-anthropogenic tumor cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

肿瘤细胞株	IC_{50} 值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
QGY-7703	23.68 ± 5.60
PC9	7.39 ± 1.04
A549	15.41 ± 1.67
MKN-45	18.27 ± 0.77
HGC-27	21.73 ± 1.96
HCT116	28.96 ± 1.30
U266	12.42 ± 1.59
RPMI8226	14.23 ± 3.60
MCF-7	4.37 ± 0.51

3 讨论

实验中对 UPLC 分析梯度洗脱条件进行了优化, 分别考察了洗脱体系乙腈 (A) -0.1%甲酸水溶液: ① 0~17 min, 25%~60%乙腈; 17~18 min, 60%乙腈; 18~19 min, 60%~25%乙腈; ② 0~17 min, 20%~60%乙腈; 17~18 min, 60%乙腈; 18~19 min, 60%~20%乙腈; ③ 0~18 min, 25%~60%乙腈; 18~19 min, 60%~25%乙腈; ④ 0~19 min, 25%~60%乙腈; 19~20 min, 60%~25%乙腈; 最终确定④为最佳梯度洗脱系统。

HSCCC 分离中, 溶剂系统的选择对于样品中各组分的分离效果极为重要, 样品组分在两相溶剂中的 K 值为 0.2~5.0 时容易得到分离, 并且组分间的 α 差异越大, 分离效果越好。本实验结果表明, 石油醚-醋酸乙酯-甲醇-水系统比例为 8:6:6:4 和 12:8:13:7 样品中丹参酮 II_A 和隐丹参酮的 K 值较为接近, 但后者具有较大的分配比, 更利于上述两组分的分离。

HSCCC 与硅胶柱色谱、大孔吸附树脂等分离纯化方法相比, 更适合进行工业化生产, 属于绿色节能、环境友好型纯化方法。本实验建立的丹参二萜醌有效部位的制备方法操作简单, 生产成本低; 获得的丹参二萜醌体外对多种人源性肿瘤细胞具有较好的抑制作用, 其中对人肺癌细胞株 PC9、人乳

腺癌细胞株 MCF-7 有直接杀伤作用 (另文报道)。通过进一步的体内外抗肿瘤作用研究以及 HSCCC 生产工艺的放大、中试等研究, 有望使该部位开发成为成分明确的抗肿瘤药物。

参考文献

- [1] 郁丹红, 贾晓斌, 施亚琴, 等. 丹参二萜醌组分及其固体分散体微丸中主要成分在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 851-857.
- [2] 武尉杰, 盛 蓉, 谭 睿. 正交试验法优选丹参药材中丹参酮 II_A 提取工艺研究 [J]. 川北医学院学报, 2013, 28(1): 10-12.
- [3] 张建军, 全智慧, 付建武, 等. 超临界 CO₂ 流体萃取丹参中丹参酮 II_A 的工艺研究 [J]. 中成药, 2013, 35(6): 1329-1332.
- [4] 马丽娜, 张 岩, 陶遵威. 色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 58-62.
- [5] 赵永昕, 热依木古丽·阿布都拉, 吴 涛, 等. 高速逆流色谱法从棉花花提取物中分离制备异槲皮素 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(1): 34-36.
- [6] 胡 瑕, 谢红旗, 罗 巍, 等. 高速逆流色谱法分离制备蛹虫草发酵液中虫草素 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 557-561.
- [7] Shin D S, Kim H N, Shin K D, *et al.* Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(1): 193-202.
- [8] 黄显章, 赵清超, 袁 林. 中药有效部位 (群) 研究在中药及复方研究中的优势与展望 [J]. 江苏中医药, 2010, 42(5): 1-3.
- [9] 常虹飞, 杨 震. 正交试验法优选超临界 CO₂ 流体萃取丹参中丹参酮 II_A 工艺的研究 [J]. 河北工业科技, 2008, 25(6): 352-354.
- [10] 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 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2004, 25(6): 614-617.
- [11] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatoragr A*, 2005, 1065(2): 145-168.
- [12] Gu M, Zhang S F, Su Z G, *et al.* Fingerprinting of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by non-aqueous capillary electrophoresis compared with high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr*, 2004, 1057(1/2): 133-140.