

## 丹参中 3 种丹参酮的超临界二氧化碳萃取及液相色谱分析

李迎春<sup>1</sup>, 曾健青<sup>1</sup>, 刘莉玫<sup>1</sup>, 金雪松<sup>2</sup>

(1. 中国科学院广州化学研究所, 广东 广州 510650; 2. 南通市华安超临界萃取有限公司, 江苏 海安 226682)

**摘要** 用超临界 CO<sub>2</sub> 流体及共溶剂乙醇萃取丹参中的 3 种丹参酮, 分别采用正交设计法和系统法考察了萃取中的主要影响因素; 采用高效液相色谱法 (HPLC), 在甲醇-水 (体积比为 80:20) 溶液为流动相和检测波长为 280 nm 的条件下, 以外标法检测了萃取产物中 3 种丹参酮的含量。实验得到的最佳条件为: 萃取压力 20 MPa, 萃取温度 45 °C, 分离温度 35 °C, 共溶剂 95% (体积分数) 乙醇, 流量 1.0 mL/min。建立的 HPLC 测定方法简便快捷, 准确度高, 重现性良好, 相关系数  $r$  为 0.999 4~0.999 8, 相对标准偏差 RSD 为 2.37%~3.47%。

**关键词** 超临界二氧化碳; 萃取; 高效液相色谱法; 丹参; 丹参酮 II A; 丹参酮 I; 隐丹参酮

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2002)01-0040-03

## Extraction of Three Tanshinones from the Root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by Supercritical Carbon Dioxide Fluid and Their Analysis with High Performance Liquid Chromatography

LI Ying-chun<sup>1</sup>, ZENG Jian-qing<sup>1</sup>, Liu Li-mei<sup>1</sup>, JIN Xue-song<sup>2</sup>

(1. Guangzhou Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Nantong Hua'an Supercritical Fluid Extraction Co. Ltd., Hai'an 226682, China)

**Abstract**: The extraction of three tanshinones from the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) fluid with ethanol as co-solvent was investigated using four-factor and three-level orthogonal design method and the systematic method. The optimized conditions were established as follows: 95% ethanol was selected as a co-solvent, flow rate of co-solvent was 1.0 mL/min, extraction pressure was 20 MPa, extraction temperature was 45 °C, separation temperature was 35 °C. The sample solution was separated on a Nova-Pak C<sub>18</sub> column (3.9 mm i.d. × 300 mm 5 μm) with CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (80:20, V/V) as the mobile phase and detected at 280 nm. The correlation coefficients were 0.999 4–0.999 8 and the relative standard deviations were 2.37%–3.47%. The detection limits were 0.473 mg/L, 0.184 mg/L and 0.452 mg/L for tanshinone-II A, tanshinone-I and cryptotanshinone respectively.

**Key words**: supercritical carbon dioxide; extraction; high performance liquid chromatography; *Salvia miltiorrhiza* Bunge; tanshinone-II A; tanshinone-I; cryptotanshinone

丹参是唇形科植物 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的根, 是重要的常用中药。在 20 世纪 70 年代初, 丹参的各种制剂就已应用于临床治疗心、脑血管疾病<sup>[1]</sup>, 近期实验又证明丹参可有效地抑制体外肿瘤的繁殖<sup>[2]</sup>。丹参脂溶性部分的 3 种主要成分为丹参酮 II A、丹参酮 I 和隐丹参酮, 它们均已显示出较好的抗菌活性、扩张血管作用和较显著的耐缺氧效果<sup>[3]</sup>。

丹参中有效成分的传统提取方法主要是乙醇热回流提取, 然后浓缩成浸膏, 用于各种制剂。由于提

取温度高和受热时间长, 有效成分损失严重, 难以达到药典标准。近年来, 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取 (简称 SC-CO<sub>2</sub> 萃取) 技术因其固有的许多优点, 在中草药的提取和新药开发方面受到广泛重视<sup>[4]</sup>。用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取丹参中 3 种丹参酮的研究, 迄今未见报道。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器和试剂

Waters 991 型高效液相色谱仪, Shimadzu SPD-10A VP 紫外可见分光检测器。丹参酮 II A、丹参酮

I 和隐丹参酮标准品均购自中国药品生物制品检定所。水为超纯水,甲醇、乙醇及其他试剂均为分析纯。丹参购自山东烟台药材站,在 45 °C 下干燥 2 h,粉碎后待用。

## 1.2 色谱条件

色谱柱: Nova-Pak C<sub>18</sub>(3.9 mm i.d. × 300 mm, 5 μm) 流动相: 甲醇-水(体积比为 80:20)溶液; 流速 1.5 mL/min; 检测波长 280 nm, 进样量 50 μL。

## 1.3 SC-CO<sub>2</sub> 萃取流程

实验在自制的 0.3 L 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取设备中进行。将粉碎后的丹参装入萃取釜,当系统各部分均达到设定温度后,将萃取釜升压至设定压力。将一定浓度的乙醇溶液按设定的流量加入体系,与 CO<sub>2</sub> 混合后在整个体系中循环动态萃取一定时间。萃取完成后,将放出的提取液旋转蒸发,去掉共溶剂乙醇,得红色稠膏。取样配制成乙醇溶液,置于 4 °C 冰箱中密封保存,待分析。

## 1.4 样品溶液的测定

在优选的色谱条件下测定样品溶液中 3 种丹参酮的含量。隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 均能达到基线分离,峰形较尖锐,色谱图见图 1。

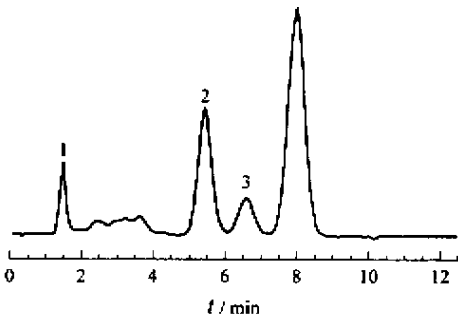


图 1 样品溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the extract of sample

1. cryptotanshinone; 2. tanshinone-I; 3. tanshinone-II A.

## 1.5 收率的计算

3 种丹参酮的收率( $\eta$ )分别为萃取出的相应丹参酮相对所萃取的丹参药材的质量分数,计算公式为:

$$\eta = (m_1 \times n) / m_2$$

式中, $m_1$  为萃取得到的丹参粗产物的质量(g), $n$  为粗产物中相应丹参酮的质量分数(%), $m_2$  为所萃取的丹参药材的质量(g)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SC-CO<sub>2</sub> 萃取条件的选择

2.1.1 正交设计法 选取了萃取压力、萃取温度、分离温度和共溶剂流量 4 个因素,选正交设计表 L<sub>9</sub>

(3<sup>4</sup>) 考察了 3 个水平,见表 1。正交实验结果见表 2。极差分析结果显示,以萃取出的丹参酮 II A 的收率为指标,得出的最佳条件为萃取压力 30 MPa,萃取温度 45 °C,分离温度 35 °C,共溶剂乙醇流量 1.0 mL/min。共溶剂流量是影响萃取的最主要因素,萃取温度、分离温度和萃取压力亦有较显著的影响。

表 1 正交设计中的因素-水平表

Table 1 Factor and level of orthogonal design

Level	Factor			
	extraction pressure (MPa)	extraction temperature (°C)	separation temperature (°C)	flow rate of co-solvent (mL/min)
1	30	55	35	1.0
2	25	45	45	0.7
3	20	35	55	0.4

表 2 正交实验结果分析表<sup>1)</sup>

Table 2 Results of orthogonal test<sup>1)</sup>

Level <sup>2)</sup>	$f_I^{3)}$	$f_{II}^{3)}$	$f_{III}^{3)}$	$f_{IV}^{3)}$
K <sub>1</sub>	0.0548	0.0538	0.0548	0.0597
K <sub>2</sub>	0.0519	0.0541	0.0521	0.0526
K <sub>3</sub>	0.0488	0.0476	0.0486	0.0433
Range	0.0060	0.0062	0.0062	0.0164

1) extraction conditions: co-solvent was 95% ethanol, separation pressure was 5.5 MPa, extraction time was 1.5 h; 2) K<sub>i</sub> average values of level criteria; 3) I, extraction pressure; II, extraction temperature; III, separation temperature; IV, flow rate of co-solvent.

2.1.2 系统法 以 3 种丹参酮的收率为指标,在一定的萃取时间下,用系统法对萃取压力、萃取温度、分离温度、共溶剂乙醇的体积分数和流量分别进行了考察。对应的考察范围分别为:萃取压力 10 MPa ~ 30 MPa,萃取和分离温度 25 °C ~ 55 °C;乙醇的体积分数 75%, 85%, 95% 和 100%;乙醇流量 0.2 mL/min ~ 2.0 mL/min,相当于乙醇与 CO<sub>2</sub> 物质的量比为 0.4% ~ 4.0%。结果表明,乙醇流量、乙醇的体积分数、萃取压力、萃取温度和分离温度各条件均存在最佳值,依次为 1.0 mL/min, 95%, 20 MPa, 45 °C 和 35 °C。

系统法与正交法得到的最佳条件除压力条件外,其他结果基本相同,为此做了进一步的比较实验。结果表明 20 MPa 下 3 种丹参酮的收率分别为 30 MPa 同等条件下收率的 1.8 ~ 2.0 倍。这是因为温度一定时,萃取压力越高,虽然对溶质的溶解能力越强,但同时也使 3 种丹参酮的选择性显著下降,从而导致它们收率的下降;而且过高的萃取压力显然对萃取操作和设备的使用寿命不利。故最佳萃取压力应选 20 MPa。

### 2.2 SC-CO<sub>2</sub> 萃取物中 3 种丹参酮的测定

**2.2.1 标准曲线的制作** 准确称取 3 种丹参酮标样适量,用无水乙醇分别配制成一系列 3 种丹参酮的标准溶液。以质量浓度  $C$  (mg/L)为横坐标,色谱峰面积平均值  $A$  为纵坐标作图,得标准工作曲线方程和相关系数(见表 3)。结果表明,隐丹参酮、丹参

酮 I 和丹参酮 II A 分别在质量浓度为 12.4 mg/L ~ 100 mg/L, 8.93 mg/L ~ 72.0 mg/L 和 17.8 mg/L ~ 211 mg/L 时与峰面积呈良好的线性关系。

**2.2.2 精密度和检测限** 精确吸取同一样品溶液,重复进样 5 次,考察方法的精密度的;以信噪比为 3 分别确定 3 种丹参酮的检测限。结果见表 3。

表 3 标准工作曲线的回归分析、方法的精密度和检测限

Table 3 Regression analysis for calibration curves, precision and detection limit of the method

Standard	Regression equation ( $n = 7$ )	$r$	RSD (%, $n = 5$ )	Detection limit (mg/L)
Cryptotanshinone	$A = 7\,906.1 + 7\,229.1C$	0.999 7	2.88	0.452
Tanshinone- I	$A = -2\,470.3 + 22\,306C$	0.999 8	2.37	0.184
Tanshinone- II A	$A = 24\,563 + 15\,681C$	0.999 4	3.47	0.473

$A$  :average area ;  $C$  :mass concentration , mg/L.

### 3 结论

在采用共溶剂的丹参的 SC-CO<sub>2</sub> 萃取过程中,共溶剂流量是影响萃取的最主要因素,萃取温度、分离温度和萃取压力亦有较显著的影响。用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取丹参中的 3 种丹参酮,操作温度低,提取效率较高,具有良好的选择性。在实验中建立的对 SC-CO<sub>2</sub> 萃取产物中 3 种丹参酮的 HPLC 测定方法简便、准确,重现性良好。可预测,SC-CO<sub>2</sub> 萃取在中草药的提取和质量控制中会得到更广泛的应用。

致谢 :感谢中国科学院广州化学所分析测试中心左雄军博士、李静副研究员和魏文同志在实验过程中给予的热情帮助。

### 参考文献 :

[ 1 ] GUO Ji-xian. Research and Clinical Application of the Root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Beijing : Chinese Medicine Science and Technology Press , 1992.3  
郭济贤. 丹参的研究与临床应用. 北京 :中国医药科技出版社, 1992. 3

[ 2 ] Ryu S Y , Lee C O , Choi S U. *Planta Med* , 1997 , 63 ( 4 ) 339

[ 3 ] ZHENG Guo-xi , SHI Ze-kuan. *Chinese Pharmaceutical Journal* , 1989 24( 1 ) 9  
郑国耀 柿泽宽. 中国药学杂志, 1989 24( 1 ) 9

[ 4 ] ZHANG Jing-cheng. *Supercritical Fluid Extraction*. Beijing : Chemical Industry Press , 2000. 105  
张镜澄. 超临界流体萃取. 北京 :化学工业出版社, 2000. 105