

高速逆流色谱法分离纯化丹参并尝试制订中药指纹图谱

顾 铭* 欧阳藩 苏志国

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室,北京 100080)

摘 要 用国产高速逆流色谱(HSCCC)分离纯化中草药——丹参,选用正己烷-乙醇-水体系,固定相保留率达到 78.8%。采用分步洗脱,3 个产地丹参各分离得到 12 个洗脱组分,经高效液相色谱仪和紫外光谱仪检测证明 3 张 HSCCC 洗脱图谱中对应洗脱峰为同一组分。HSCCC 洗脱图谱不包含非共有峰,并且对应洗脱峰保留时间的相对标准偏差 RSD < 3%,符合国家标准关于制订指纹图谱方法学考察资料的技术参数。因此,HSCCC 作为制订指纹图谱的方法之一具有可行性。

关键词 高速逆流色谱(HSCCC),中药指纹图谱,丹参

中图分类号 R917 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0740-05

高速逆流色谱(High-Speed Counter-Current Chromatography, HSCCC)是一种基于液-液多级逆流萃取建立的色谱体系,没有固相载体,避免了待分离样品与固相载体表面产生化学反应而变化 and 不可逆吸附^[1];高速逆流色谱可以直接纯化粗制样品,尤其适于分离极性较大的组分^[2];HSCCC 的仪器及试剂成本明显低于高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC),适用于制备高纯度、高附加值的化合物。

中药材的主要活性成分是次生代谢物,对后天的生长环境依赖性很强,使得活性成分的种类和含量因地域、气候和采收期有较大的差异,迫切要求建立中药材的质量标准。中药指纹图谱是近年来被广泛采用的质控方法,最常用的分析手段是色谱和光谱。光谱和波谱指纹图谱由于选择性的限制,不能表达中药这样的混合体系中各种不同化学成分浓度分布的整体状况,因此色谱指纹图谱成为首选方法^[4]。TLC 操作简便、成本低廉,但精密度较差;HPLC 精密度高,重现性好,适用范围较广,但需要有严格的样品预处理,很难分析,易造成固定相吸附的样品和高粘度的样品。因此本文提出使用高速逆流色谱(HSCCC)作为制订中药指纹图谱的方法之一。

选用丹参作为模式物。丹参具有活血通经、去瘀止痛、清心除烦等功效,近来也被用于糖尿病的辅

助治疗^[5]。在以往的研究报道中,利用逆流色谱分离纯化丹参最多得到 8 种组分^[6,7,8]。本文一方面摸索分离丹参适宜的溶剂体系和仪器参数,分离得到尽可能多的组分,使洗脱图谱中包含充分的化学信息,为制订指纹图谱打下基础;另一方面探索使用高速逆流色谱制订中药指纹图谱的可行性。

1 材料与方法

1.1 仪器

1.1.1 TBE-300 半制备型高速逆流色谱仪(深圳同田生化技术有限公司,中国)。聚四氟乙烯管缠绕在 3 个水平轴上形成螺旋管(管直径 2.6mm,分离体积 300mL),进样圈 20mL。高速逆流色谱配备了柱塞式泵(S 系列,北京圣益通技术开发有限责任公司,中国)紫外检测仪(8823A,北京新技术应用研究所,中国)记录仪(3057 型,四川记录仪器厂,中国)。

1.1.2 高效液相色谱(10Avp 系列,岛津,日本);双泵系统(LC-10ATvp)紫外检测仪(SPD-10Avp),柱温箱(CTO-10ASvp),系统控制器(SCL-10Avp),控制软件(Class-vp),20 μ L 进样圈;色谱柱:反向 C₁₈ 柱(150mm \times 4.6mm I. D., 5 μ m)。

1.2 试剂

1.2.1 高速逆流色谱试剂采用分析纯(天津化学试剂一厂)。水是通过反渗透 Mili-Q 18M Ω , Millipore, USA 制备。

1.2.2 高效液相色谱试剂采用一级色谱纯(Fisher Scientific Co. Ltd., UK)。将反渗透处理过的水(18M Ω , Millipore, USA)通过0.45 μ m滤膜减压过滤后使用。标准对照品用高速逆流色谱的流动相配制成1mg/mL,经0.45 μ m滤膜过滤使用。

1.2.3 丹参来自3个产地:河北、山东、江苏。

1.2.4 标准对照品:国家药品监督管理局,中国药品与生物制品检定所提供。

1.3 丹参粗提物的制备

将丹参根或根茎粉碎成粗粉或细粉,20g丹参粉溶于50mL溶剂(正己烷:乙醇=1:1, V/V),充分搅拌45min,沉降后取上清;沉淀再溶于25mL溶剂,充分搅拌45min,沉降后取上清;离心10000g \times 10min,弃沉淀,留上清,定容;按1:2(V/V)的比例加水,在分液漏斗中摇匀,静置过夜,分相;取上相(有机相),定容;用2倍于有机相体积的30%乙醇洗至下相(水相)接近无色;取上相(有机相)在真空干燥器内充分干燥成干粉;分离前称量100mg用溶剂体系A的下相溶解,并通过超声振荡提高溶解度,离心10000g \times 2min,取上清上样^[8];粗提品收率约为2%。

1.4 高速逆流色谱流动相的配制

溶剂体系A:正己烷:乙醇:水=10:5.5:4.5(V/V);溶剂体系B:正己烷:乙醇:水=10:7:3(V/V)。

1.5 高效液相色谱分析

标准品、洗脱组分均采用高效液相色谱分析。二元梯度洗脱:溶剂A(0.1%三氟乙酸, TFA), 溶剂B(0.1%TFA+乙腈)。洗脱方式如下:0~5min, 0%B; 5~25min, 0%~70%B; 25~40min, 70%B; 40~41min, 70%~0%B。流速1mL/min, 检测波长280nm。每检测1个样品, 以乙腈清洗色谱柱。

1.6 紫外-可见分光光度计分析

标准品和洗脱组分采用紫外-可见分光光度计进行扫描, 扫描波长:900~200nm。

2 结果与讨论

2.1 高速逆流色谱分离纯化丹参粗提品

丹参的有效成分主要分为两类:脂溶性化合物和水溶性化合物, 大多数的活性成分集中在脂溶性化合物中, 因此本文仅限于研究丹参中脂溶性化合物的分离和纯化^[9]。

用HSCCC分离纯化河北产丹参, 研究溶剂体系和仪器参数。提高HSCCC转速、降低流动相流速有

助于提高固定相保留, 使系统的分辨率得到保证, 同时兼顾运行时间, 确定HSCCC转速为900r/min, 流动相流速为2mL/min, 固定相保留率达到78.8%; 从进样阀进样6mL, 100mg; 洗脱过程中紫外检测仪在280nm连续监测, 根据记录仪显示的洗脱峰收集洗脱组分。(1)采用一步法洗脱, 即自始至终用溶剂系统A的下相, 整个洗脱过程耗时18h, 各洗脱峰分离度较好, 但最后2个峰的峰宽增大, 灵敏度下降;(2)采用分步洗脱:在210min前用溶剂系统A的下相作为流动相, 之后换为系统B的下相, 运行时间缩短至9h, 更换流动相后的2个洗脱峰分离度明显下降 $R_s < 0.8$;(3)为改善分离度调整分步洗脱的条件:在470min更换流动相为体系B的下相, 运行时间为12h, 分离度 $R_s > 1.25$ 。在达到较好分离度的基础上, 尽量缩短运行时间, 因此采用方法3, 即0~470min以溶剂体系A的下相为流动相, 470min后以体系B的下相为流动相。采用以上条件对另2个产地的丹参粗提物进行了分离纯化。图1显示了3个产地的丹参样品经高速逆流色谱分离纯化的洗脱曲线, 各得到洗脱峰12个, 利用国产HSCCC可以有效地分离纯化丹参。

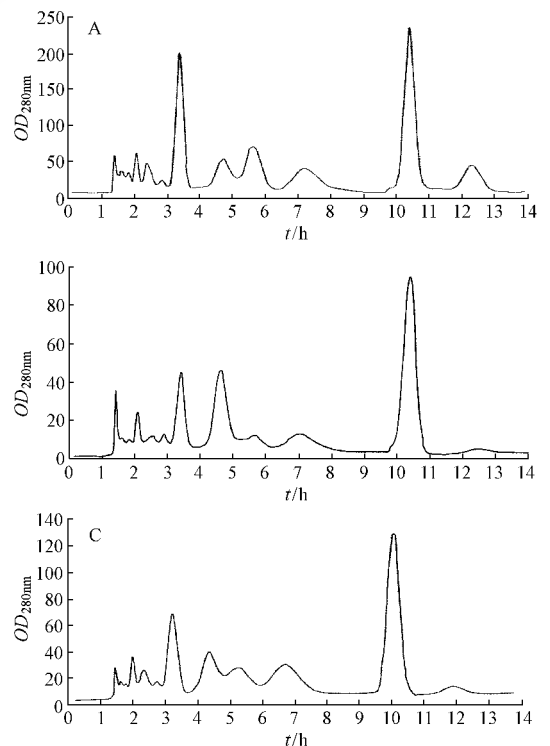


图1 3个产地丹参的高速逆流色谱洗脱曲线

Fig.1 Chromatograms of crude *S. miltiorrhiza* Bunge of different localities

表 1 HSCCC 洗脱组分在 HPLC 反相层析检测中的保留时间

Table 1 Retention times of HSCCC eluents of *S. miltiorrhiza* Bunge in reversed-phase HPLC analysis

Peak fractions No.	Retention time/min			
	Hebei	Shandong	Jiangsu	Average
1	27.669	27.687	27.649	27.668
2	27.597	27.638	27.630	27.622
3	28.995	28.998	29.005	28.999
4	28.292	28.280	28.271	28.281
5	29.126	29.144	29.129	29.133
6	30.912	30.936	30.900	30.916
7	30.788	30.772	30.794	30.785
8	29.460	29.421	29.433	29.438
9	31.067	31.205	31.210	31.161
10	32.294	32.287	32.311	32.297
11	34.686	34.644	34.658	34.663
12	35.544	35.529	35.520	35.531

表 2 HSCCC 洗脱组分的紫外吸收峰

Table 2 UV absorptions of HSCCC eluents of *S. miltiorrhiza* Bunge

Peak No.	Absorption peak	Absorption wavelength/nm		
		Hebei	Shandong	Jiangsu
1	1	276.5	277.4	278
2	1	275.9	276.2	276.7
3	1	233	233.2	233.6
	2	269.5	269.5	269.1
4	1	240.5	240.2	240.6
	2	291	292	292.6
	3	332.5	335.4	336
	4	417.5	417	416.8
5	1	223.5	224.6	223.6
	2	279.5	276.6	278.6
6	1	221.5	220.4	220.8
	2	253.5	252.8	253.8
	3	270	271	269.8
7	1	219.5	219	219
	2	264.5	264.4	264.2
	3	363	363.2	361.6
	4	452	457	454
8	1	246.5	246	246.2
	2	425	425	424.4
9	1	247	247.2	246.8
	2	326	325.4	325.8
	3	326	325.4	325.8
	4	365.5	365.2	367.4
10	1	227	226.8	226.6
	2	293.5	292.4	293.4
	3	512	512	512.4
11	1	224	223.8	223.8
	2	253	252.6	252.6
	3	270.5	269.6	269.6
	4	356	356.8	357.2
	5	468	468	468.6
12	1	275	276.8	274.2

2.2 3 张洗脱图谱中洗脱峰的对应性

3 个产地的丹参经 HSCCC 纯化,各得到 12 个洗脱峰,峰的数目一致,但必须确定 3 张洗脱图谱中对应的洗脱峰是否为同一组分。对各洗脱峰进行分析,依方法 1.5 测定各洗脱峰在反相高效液相色谱 (HPLC) 上的保留时间;依方法 1.6 在紫外-可见分光光度计 900 ~ 200nm 范围对各洗脱峰进行全波长扫描,得到吸收光谱。由表 1 和 2 可见,3 条 HSCCC 洗脱曲线中的洗脱峰 1 和 2 的保留时间及吸收波长相似,但没有足够的证据认为洗脱峰 1 和 2 为同一物质。从 HPLC 保留时间和紫外吸收光谱还可判定,3 个产地丹参洗脱曲线中的第 n (n 为 1 ~ 12) 个洗脱峰为同一组分。也就是说,3 个产地丹参的 HSCCC 洗脱图谱,不但洗脱峰个数一致,而且对应洗脱峰为同一组分。

分别与 3 个标准品比对 HPLC 保留时间和紫外吸收光谱,判定洗脱组分的化合物类型。由表 3 和 4 可以看出,洗脱峰第 7、8、11 分别为隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II A,结构式如图 2 所示。

表 3 3 个洗脱组分与相应标准品的 HPLC 保留时间对照

Table 3 Retention times of major components in purified *S. miltiorrhiza* Bunge and the standards by HPLC analysis

Retention time/min	Purified samples and standards					
	No.7	Cryptotanshinone	No.8	Tanshinone I	No.11	Tanshinone II A
	30.785	30.793	29.438	29.452	34.663	34.651

表 4 3 个洗脱组分与相应标准品的紫外吸收峰对照

Table 4 UV absorption of major components in the purified samples and standards

	Major components in samples and standards/nm					
	No.7	Cryptotanshinone	No.8	Tanshinone I	No.11	Tanshinone II A
WL1	219.2	219	246.2	245	223.9	224
WL2	264.4	264	424.8	422.9	252.7	253
WL3	362.6	360			269.9	270
WL4	454.3	451.5			356.7	357
WL5					468.2	467

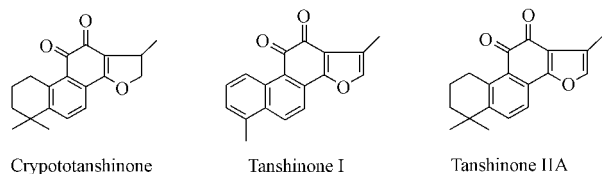


图 2 隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II A 的结构式

Fig. 2 Chemical structures of cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II A

2.3 高速逆流色谱作为制订指纹图谱的方法之一

从 3 个产地丹参的 HSCCC 洗脱图谱可以计算出对应洗脱峰虽为同一组分但峰面积的百分比不同,也就是组分的相对含量不同,如表 5 所示。以洗脱峰 7 为例,河北的丹参相对百分含量为 5.28%,山东的为 20.17%,江苏的为 9.07%。含量因产地、气候、采摘期等原因有了较大的区别,由此可见建立中药指纹图谱控制中药质量、监测中药有效成分是十分必要的。

中药指纹图谱的建立通常依赖高效液相色谱法和薄层层析法,本文提出将 HSCCC 作为建立指纹图谱的方法之一。在 2.2 中已得出结论:3 个产地丹参的 HSCCC 洗脱图谱,不但洗脱峰个数一致,而且对应洗脱峰为同一组分,这是利用 HSCCC 建立指纹图谱的基础。因不存在非共有峰,且 12 个洗脱组分分别对应,初步将这 12 个洗脱组分定义为共有指纹峰。由表 6 可见,HSCCC 法建立的指纹图谱各共有指纹峰保留时间的相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)最大为 2.88%,平均为 2.48%,符合国家关于方法学考察资料技术参数对 RSD ≤ 3% 的要求。因此,HSCCC 作为制订指纹图谱的方法之一具有可行性。

表 5 高速逆流色谱洗脱峰相对峰面积

Table 5 Peak areas of HSCCC eluents

Peak No.	Hebei/%	Shandong/%	Jiangsu/%
1	1.95	2.79	1.40
2	0.28	0.11	0.13
3	0.45	0.11	0.04
4	1.98	2.46	2.29
5	2.38	1.0	1.91
6	0.48	0.84	0.34
7	19.5	12.9	15.3
8	5.28	20.17	9.07
9	8.95	1.62	4.23
10	10.6	7.99	13.57
11	39.95	48.66	48.45
12	8.22	1.34	3.26

50mL 的分析型 HSCCC,并控制运行温度,可以大大缩短运行时间,并提高精密度。本研究因实验条件所限选用半制备型 HSCCC,它可以在制订出指纹图谱的同时,制备足量样品供结构鉴定及活性鉴定用。

表 6 HSCCC 制订指纹图谱的精密度

Table 6 Relative standard deviation of retention time of HSCCC eluents

Peak No.	Retention time/min			RSD of retention time/%
	Hebei	Shandong	Jiangsu	
1	78	80	76	2.56
2	89	93	94	2.88
3	102	105	108	1.16
4	116	121	121	2.41
5	137	145	141	2.84
6	159	168	165	2.79
7	190	199	192	2.44
8	263	273	260	2.57
9	312	326	315	2.32
10	400	417	398	2.58
11	578	610	596	2.70
12	688	723	701	2.51

3 结 论

不同产地、气候、收获期对中药材有效成分的含量甚至种类有一定的影响,所以需要建立指纹图谱来控制中药材质量。以丹参为模式物,利用国产高速逆流色谱有效地进行了分离纯化,得到 12 个洗脱组分。比较各洗脱组分在反相层析中的保留时间和吸收光谱峰值,认为 3 条 HSCCC 洗脱曲线中各组分依次对应。3 条洗脱曲线中不存在非共有峰,初步将这 12 个洗脱组分定义为共有指纹峰,各指纹峰相对保留时间的相对标准偏差 RSD 均 < 3%,符合国家建立指纹图谱方法学考察资料的技术参数。如果采用分析型 HSCCC,并对温度进行控制,HSCCC 的精密度有望得到明显提高。

将 HSCCC 用于制订中药材指纹图谱的实际操作中,还须依照国家标准,建立检测方法的方法学考察资料,包括供试品的稳定性实验,仪器的精密度,实验方法的重现性等等。

HSCCC 对高粘度样品和易造成填料吸附的化合物的分离有较大优势,其仪器及常用试剂十分廉价易于推广,作为建立指纹图谱的方法具有可行性。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Ito Y. Review: Recent advances in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* 1999; 838: 25. journals. im. ac. cn

- [2] Owen R O , McCreath G E , Chase H A . A new approach to continuous counter-current protein chromatography : direct purification of malate dehydrogenase from a *Saccharomyces cerevisiae* homogenate as a model system. *Biotechnology and Bioengineering* , 1997 , 53(4) : 427 - 441
- [3] ZHOU Y X(周玉新) , LEI H M(雷海明) , XU Y H(徐永红) *et al.* . Research technology of fingerprint of Chinese traditional medicine (中药指纹图谱研究技术) . Beijing : Press of Chemical Industry (化学工业出版社) , 2002
- [4] Committee of National Pharmacopoeia(国家药典委员会) . Pharmacopoeia of P. R. China(中华人民共和国药典) . Beijing : Press of Chemical Industry(化学工业出版社) , 2000
- [5] YANG Y(杨云) . Handbook of extracting chemical components of Chinese traditional medicine(中药化学成分提取分离手册) . Beijing : China Press of Traditional Chinese Medicin(中国中医药出版社) , 1998 , pp65
- [6] TIAN G L , ZHANG Y B , ZHANG T Y *et al.* . Separation of Tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high-speed counter-current chromatography using stepwise elution. *J Chromatography A* , 2000 , 904 : 107 - 111
- [7] TIAN G L , ZHANG T Y , ZHANG Y B , Ito Y . Separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by multidimensional counter-current chromatography. *J Chromatography A* , 2002 , 945 : 281 - 285
- [8] LI H B , CHEN F . Preparative isolation and purification of six diterpenoids from the Chinese medical plant *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* , 2001 , 952(1-2) : 109 - 114
- [9] WANG M X(王慕邹) . Analysis by high performance liquid chromatography of Chinese traditional medicine(常用中草药高效液相色谱分析) . Beijing : Press of Sciences(科学出版社) , 1999

Purification and Fingerprinting Development of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by High-speed Counter-current Chromatography

GU Ming* OUYANG Fan SU Zhi-Guo

(National Laboratory of Biochemical Engineering , Institute of Process Engineering , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract In an attempt to apply high-speed counter-current chromatography HSCCC for TCM fingerprints , the separation and purification of the Chinese medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* Bunge of different localities was realized using the technique . The equipments used include a HSCCC(TBE-300) of Shenzhen Tauto Biotech containing three connected preparative coils(diameter of tube = 2.6mm , total volume = 300mL) and a 20mL sample loop and a HPLC from Shimadzu of Japan with a Ultrasphere C18 column(150 × 4.6mm ID , 5μm) and a 20μL sample loop . *Salvia miltiorrhiza* Bunge samples from 3 locations were separated by HSCCC in a Step-wise elution program with solvent systems A(hexane : ethanol : water = 10 : 5.5 : 4.5) and B(hexane : ethanol : water = 10 : 7 : 3) at a speed of 900 r/min and a flow-rate of 2mL/min . All the 12 peak fractions were eluted within 13 hours . The contents of each component varied greatly in different samples , which confirmed previous observation that the locations and climates have a great impact on the TCM quality and also indicated a quality control system is necessary to safeguard the quality of the herb . The retention times of the 12 peak fractions from crude extracts of the samples were collected by HPLC and the absorption spectrums of the corresponding peaks were identified . The 12 components of the three crude samples were readily distinguishable and can be used as fingerprints of *S. miltiorrhiza* Bunge . The relative standard deviation of the HSCCC retention times was less than 3% , which satisfies the requirement of the national standard reference index . The components 7 , 8 and 11 from the standards were identified to be cryptotanshinone , tanshinone I and tanshinone II A respectively . This study demonstrates that if it is possible to apply HSCCC for TCM fingerprinting , especially with samples of high viscosity and highly absorptive components . The precision and the run time of fingerprinting can be further improved if larger volume and a temperature control system is used . With these and other improvements , HSCCC is expected to play an important role in TCM development .

Key words high-speed counter-current chromatography(HSCCC) , fingerprints of Chinese medicinal plant , *Salvia miltiorrhiza* Bunge