

的复方制剂,本实验采用 RRLC-MS/MS 法建立了同时检测三黄片中盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素的测定方法。研究结果发现以甲醇-水(0.1%醋酸)80:20 作为流动相,体积流量 0.2 mL/min,得到较好的分离度,且保留时间适当。方法学考察发现本方法可以很好地测定三黄片中小檗碱、黄芩苷与大黄素质量分数,不仅为三黄片的质量控制提供了一定参考和依据,同时为下一步研究大鼠口服三黄片后体内指标成分的药动学特征奠定了基础。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 蔡为群,顾雪中. 高效液相色谱法测定三黄片中黄芩苷的含量[J]. 时珍国医国药,2003,14(3): 136.
- [3] 蒋 晔,郝晓花,刘红菊. 非水反相液相色谱法测定三黄片中大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J]. 中草药,

- 2005,36(3): 378-380.
- [4] 田书霞,蒋晔. RP-HPLC 同时测定三黄片中 4 种有效成分的含量[J]. 中国药理学杂志,2006,41(3): 220-222.
- [5] 蒋 晔,李艳荣,田书霞,等. RP-HPLC 测定不同厂家三黄片 4 种指标成分含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(4): 351-352.
- [6] 祝忠民,卢晓荣. HPLC 法同时测定三黄片中 4 种成分的含量[J]. 西北药学杂志,2008,23(5):300-301.
- [7] 杨义芳. 超高效/高分离度快速/超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用[J]. 中草药,2008,39(8):1259-1263.
- [8] Huang H Q, Zhang X, Xu Z X, et al. Fast determination of saikosaponins in *Bupleurum* by rapid resolution liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2009, 49(4): 1048-1055.
- [9] Liang X, Zhang L, Zhang X, et al. Qualitative and quantitative analysis of traditional Chinese medicine Niu Huang Jie Du Pill using ultra performance liquid chromatography coupled with tunable UV detector and rapid resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2010, 51(3): 565-571.

氧化铝柱纯化吴茱萸提取液中总生物碱和柠檬苦素的研究

许海玉¹,刘 莹¹,张铁军^{2*},刘昌孝³,朱雪瑜²,许 浚²

(1. 天津中医药大学,天津 300193; 2. 天津药物研究院,天津 300193; 3. 天津药物研究院
天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室,天津 300193)

摘要:目的 研究中性氧化铝柱纯化吴茱萸总生物碱和柠檬苦素的工艺。方法 以转移率和质量分数为评价指标,对水沉工艺的 pH 值,氧化铝柱色谱的上样量、洗脱剂的种类、洗脱剂体积和洗脱剂体积流量进行考察。结果 水沉工艺的 pH 值为 3,氧化铝柱色谱的上样量 20 g,洗脱剂为醋酸乙酯-二氯甲烷(70:30),洗脱剂用量为 5 BV 和洗脱速度为 2 BV/h。结论 氧化铝柱色谱对吴茱萸活性成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的纯化方法可行,经济简便,效率较高。

关键词:吴茱萸;总生物碱;柠檬苦素;纯化;氧化铝柱色谱

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)05-0741-04

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang、疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 干燥的近成熟果实,广泛分布在贵州、江西、湖南、广东、广西等省。吴茱萸始载于《神农本草经》,列为中品,性辛,苦热,有小毒,归肝、脾、胃、肾经,具有温中止呕,散寒止痛,助阳止泻的功效且用于治疗疼痛症、胃寒呕吐、呃逆症、虚寒泄泻等症^[1]。在传统经方左金丸、反左金丸、吴茱萸汤等中应用广泛。吴茱萸含有多种化学成分,目前从中分离的主要有生物碱、柠檬苦素、挥发油、多糖^[2]

等化学成分。吴茱萸碱和吴茱萸次碱是吴茱萸中量较高的成分。临床实验表明,吴茱萸生物碱包括吴茱萸碱和吴茱萸次碱的量与其疗效有正相关关系^[3]。柠檬苦素具有抗菌、抗病毒、抗炎、镇痛以及抗肿瘤等活性^[4],在吴茱萸中的量较高^[5]。因此本实验先用水沉工艺,然后采用中性氧化铝柱色谱对吴茱萸中生物碱和柠檬苦素进行纯化,并优化其工艺。

1 仪器与试剂

Lab Alliance 高效液相色谱仪 (SPD-10AV 紫外检测器,LabAlliance HPLC 色谱工作室),Anke LXJ-11B 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

①收稿日期:2009-11-20

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BA106A01;2007BA141B06)

作者简介:许海玉,男,湖南永兴人,在读博士,主要研究方向为中药制剂和中药药代动力学。

吴茱萸碱(批号 110802-200606)、吴茱萸次碱(批号 110801-200505)、柠檬苦素(批号 110800-200404)对照品均购于中国药品生物制品检定所,中性氧化铝(色谱用,100~200目,上海五四化学试剂有限公司),95%乙醇为工业纯,其他试剂均为分析纯。吴茱萸产地浙江,均购于河北安国饮片厂,由天津药物研究院张铁军研究员鉴定为吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.

2 方法与结果

2.1 吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的 HPLC 法测定^[6]

2.1.1 色谱条件:Diamonsil-C₁₈柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm; 迪马公司);流动相:乙腈-水-四氢呋喃-冰乙酸(51:48:1:0.1);检测波长:225 nm;体积流量:1.0 mL/min;柱温:室温。理论板数按吴茱萸碱峰计算不低于 3 000。

2.1.2 标准曲线的绘制:分别精密称取在 60 °C 减压干燥 4 h 的柠檬苦素对照品 1.09 mg,吴茱萸碱对照品 1.03 mg 和吴茱萸次碱对照品 1.18 mg,同时置 10 mL 量瓶中,用 95%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液 4、8、12、16、20 μL 进样,测定峰面积。以各自峰面积对进样质量作线性回归,分别得柠檬苦素回归方程: $Y = 3.4394 X - 2.81$, $r = 0.9996$,线性范围:0.436~2.18 μg;吴茱萸碱回归方程为: $Y = 168.7 X + 7.9249$, $r = 0.9999$,线性范围:0.412~2.06 μg;吴茱萸次碱回归方程为: $Y = 87.843 X - 6.3498$, $r = 0.9998$,线性范围:0.472~2.36 μg。

2.1.3 供试品溶液的制备:吸取样品溶液适量,用 95%乙醇适当稀释后,过 0.45 μm 滤膜,弃去初滤液,取续滤液,即得。

2.2 药材中有效成分的测定:取吴茱萸粉末(过 3 号筛)约 0.2 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加入乙醇约 90 mL,浸泡 1 h,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)40 min,放冷,加入乙醇至刻度,摇匀,滤过,测定,分别计算药材中柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的质量分数,结果分别为 0.93%、0.55%、0.30%,总量为 1.78%。

2.3 转移率、干膏质量、质量分数的测定:按照转移率 = 样品中目标物质的质量 / 药材中目标物质的质量 × 100% 计算转移率。将各样品液分别精密量取 20 mL,水浴挥干乙醇,再置于 105 °C 条件下干燥至恒重的蒸发器中,烘干至恒重,计算干膏质量。按照质量分数 = 样品液浓度 × 体积 / 干膏质量 × 计

算质量分数。

2.4 上样样品制备:取吴茱萸,加入 8 倍量的 70%乙醇,提取 3 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,滤液减压回收乙醇至无醇味,加入 24 倍量的蒸馏水,然后分别用盐酸或氨水调 pH 值至 3。静止放置 2 h,在 4 500 r/min 离心 30 min,得下层沉淀。沉淀加入 24 倍药材量的 95%乙醇溶解得溶解液。根据试验要求取溶解液适量若干份,每份分别减压回收乙醇至干,浸膏转移置于蒸发皿中,加入适量中性氧化铝,少量甲醇,置 60 °C 水浴中挥干甲醇,搅拌均匀得上柱样品。上柱样品进行出膏率测定,出膏率为 11.1%。吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素 3 种物质在浸膏中的质量分数为 21.1%。

2.5 氧化铝柱色谱条件的考察

2.5.1 装柱和上样:将中性氧化铝于 140 °C 下干燥 40 min,放于干燥器冷却后加入洗脱液,湿法装柱,柱体积为 50 mL。控制体积流量用洗脱液平衡色谱柱。加入上柱样品,上样。

2.5.2 洗脱液的选择:取溶解液 240 mL,10 份,按要求制备上柱样品,分别用环己烷、二氯甲烷、醋酸乙酯、丙酮、甲醇不同极性溶剂进行洗脱,洗脱液用量为 6 BV,体积流量为 1 BV/h,以吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的转移率和总质量分数为指标,结果见图 1。可以看出,随着溶剂的极性增大,3 种物质的转移率依次增高,在环己烷和二氯甲烷作为洗脱剂时,柠檬苦素未被洗脱,而醋酸乙酯洗脱,转移率达到 63.9%,但总质量分数为 47.7%,未达到有效部位的要求,需进一步优化。

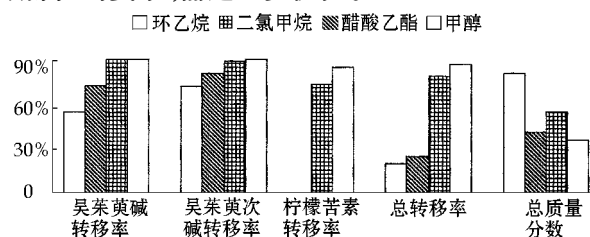


图1 洗脱液对转移率和质量分数的影响

Fig 1 Effect of different elution liquids on transfer rate and purity

接下来考察了醋酸乙酯和二氯甲烷两种溶液的配比的 4 个比例,即醋酸乙酯-二氯甲烷(90:10)、(80:20)、(70:30)、(60:40)分别进行洗脱,洗脱液用量为 6 BV,体积流量为 2 BV/h,以吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素的总质量分数为指标,结果见图 2。可以看出,以醋酸乙酯-二氯甲烷(70:30)为洗脱剂时总质量分数为 55.3% 为最高值,而且

达到了有效部位的要求。故最终确定醋酸乙酯-二氯甲烷(70 :30)为洗脱液。

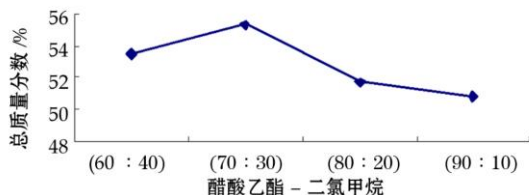


图 2 醋酸乙酯和二氯甲烷不同配比对质量分数的影响

Fig 2 Effect of different ratios between acetoacetate and dichloromethane on purity

2. 5. 3 上样量的考察:分别取溶解液 240、360、480、600、720 mL (相当于药材量 10、15、20、25、30 g) 5 份,制备上柱样品,上样,用洗脱液醋酸乙酯-二氯甲烷(70 :30)洗脱,洗脱体积为 6 BV,体积流量为 2 BV/h,以吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的转移率和质量分数为指标,结果见图 3。

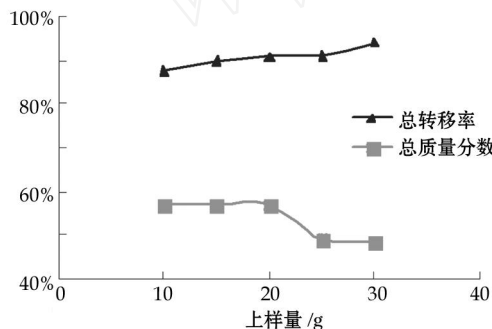


图 3 上样量对转移率和质量分数的影响

Fig 3 Effect of different loading amounts to transfer rate and content

可以看出,随着上样量的增大,吴茱萸碱和吴茱萸次碱的转移率先增大后稍有减少趋势,而柠檬苦素的转移率有增大趋势。为了节约溶剂,又能达到有效部位要求,最终确定为最大上样量为 20 g。

2. 5. 4 洗脱剂用量和洗脱体积分数的考察:制备样品 10 份,用洗脱液洗脱,洗脱体积为 2、3、4、5、6 BV,体积流量为 2 BV/h,以吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的转移率和质量分数为指标,结果见图 4。可以看出,吴茱萸碱和吴茱萸次碱的转移率在 2 BV 的洗脱液洗脱时就已经比较高,柠檬苦素主要在第 5 BV 时被洗脱下来,在第 6 BV 时,转移率有所提高,但质量分数反而有所降低,综合考虑,洗脱剂用量为 5 BV。

接下来考察了体积流量,按照上述确定工艺,制备样品 5 份,按要求进行洗脱,分别为 1、2、3、4、5 BV/h 的体积流量进行洗脱,以吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的总质量分数为指标,结果见图 5。可以看出 体积流量为 2 BV/h 时吴茱萸碱、吴茱萸次

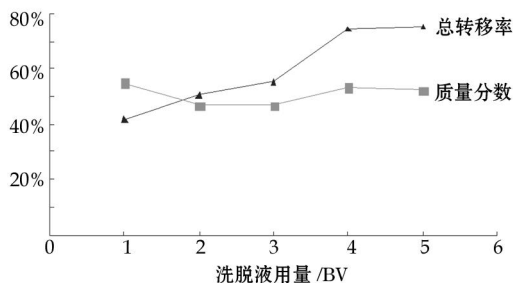


图 4 洗脱剂用量对转移率和质量分数的影响

Fig 4 Effect of eluant volume to transfer rate and purity

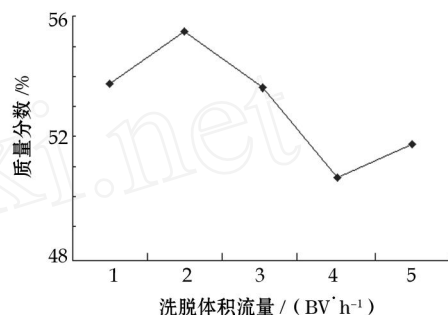


图 5 洗脱体积分数对质量分数的影响

Fig 5 Effect of eluant flow rate to content

碱和柠檬苦素的总质量分数最高为 55. 5 %。

2. 6 验证试验:分别取溶解液 480 mL (相当于药材量 20 g) 5 份,按要求进行干法拌样。上样,用洗脱液醋酸乙酯-二氯甲烷(70 :30)洗脱,体积流量为 2 BV/h,洗脱体积为 5 BV。以吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的总转移率和总质量分数为指标,结果见表 1。可以看出,中性氧化铝柱纯化吴茱萸中柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的平均总转移率能达到 73 %,得到的纯化物的平均质量分数能达到 56. 1 %,符合中药有效部位的要求,且重现性较好。与药材中上述 3 种物质的总量为 1. 78 %,经过此工艺的提取纯化,质量分数提高了将近 30 倍,与上柱前相比,质量分数提高了将近 2. 5 倍,达到了富集的作用。

表 1 验证试验结果

Table 1 Results of verification test

批号	总转移率 %	总质量分数 %
1	72. 9	55. 1
2	72. 7	56. 2
3	73. 4	57. 1
4	73. 2	56. 5
5	72. 6	55. 8

3 讨论

吴茱萸含有多种化学成分,乙醇提取液主要的活性成分有生物碱类、柠檬苦素类,为了尽可能多地保留有效成分 同时又可能多地除去杂质,以便于提

高疗效,减少服用剂量和便于质量控制,同时也便于制剂成型的目的。本实验采用多组分 HPLC 法测定,既控制了吴茱萸生物碱类成分,又控制了柠檬苦素类成分,为后期纯化工艺提供了保障。吴茱萸碱和吴茱萸次碱不溶于水、酸水和碱水等水溶性溶剂^[7],柠檬苦素类化合物属于三萜类似物,易溶于有机溶剂,在甲醇、乙醇中溶解度较大,难溶于水^[8],故可以采用水沉工艺进行纯化。但从实验中发现,柠檬苦素随着 pH 值增大溶解度也增大,在碱性水溶液中柠檬苦素的溶解度增大,而在酸性水溶液中溶解度较低,这可能与其结构中含有内酯键、醛基和醚键有关,能够表现酸性。

应用氧化铝柱对物质进行分离纯化,是溶剂对化合物的溶解力和氧化铝柱的吸附能力的一个综合结果。本实验开始采用湿法上样,但适度洗脱液不能完全溶解沉淀,在洗脱过程中容易堵塞色谱柱,采用干法上样能较好解决此问题。在洗脱液的考察时,发现吴茱萸碱和吴茱萸次碱在极性较低(环己烷、二氯甲烷)的洗脱液就能被洗脱下来,而柠檬苦素要在极性较强的洗脱剂(醋酸乙酯)才能被洗脱下来,根据相似相溶原理,吴茱萸碱和吴茱萸次碱属于

吲哚类生物碱,极性较弱,而柠檬苦素含有多个氧原子,极性相对较强些。

本实验先进行醇提水沉工艺,然后中性氧化铝柱色谱纯化吴茱萸中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素,并达到了有效部位的要求,便于制剂成型。该工艺可用于吴茱萸的活性成分的纯化,且经济简便,易于操作,转移率较高。

参考文献:

- [1] 李飞. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [2] 徐继华,刘文英,屠旦来. 吴茱萸多糖的分离和组成研究[J]. 中草药,2009,40(4):573-576.
- [3] 于静华,刘春禹,吕小丹,等. 吴茱萸药理研究进展[J]. 吉林中医药,2005,25(2):53.
- [4] Atsuda H, Yoshikawa M, linuma M, et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of limonin isolated from the fruits of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri* [J]. *Planta Med*, 1998, 64:339-342.
- [5] 李丽,贾英,陈晓辉,等. HPLC 法同时测定吴茱萸中吴茱萸苦素和柠檬苦素的含量[J]. 中国天然产物,2003,1(3):158-160.
- [6] 鲍天冬,董宇,杨庆,等. 高效液相色谱法同时测定吴茱萸及其提取物中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸内酯含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(6):1-3.
- [7] 柯铭清. 中草药有效成分理化与药理特性[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1982.
- [8] 杨云,张晶,陈玉婷. 天然药物化学成分提取分离手册[M]. 北京:中国中医出版社,2003.

板蓝根多糖的降解和单糖组成的毛细管区带电泳测定研究

郭怀忠^{1,2},张斌¹,徐相涛¹,张硕敏¹

(1. 河北大学药学院,河北保定 071002; 2. 河北省药物质量分析控制重点实验室,河北保定 071002)

摘要:目的 优化板蓝根多糖的提取、降解工艺,并对其单糖组成进行测定。方法 通过正交试验对板蓝根多糖的提取和降解条件进行优化。以 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)为单糖的柱前衍生化试剂,用毛细管区带电泳法(CZE)测定板蓝根多糖的单糖组成。结果 板蓝根多糖最佳降解条件为:1 mol/L 硫酸溶液,95 °C恒温降解 5 h。板蓝根多糖由木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖等组成。结论 采用优化工艺提取和降解板蓝根多糖,结果稳定,重现性好,毛细管区带电泳法用于板蓝根多糖的单糖组成测定及其质量控制,准确,可靠,结果满意。

关键词:板蓝根;多糖;正交试验;衍生;PMP;单糖

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)05-0744-04

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,始载于《神农本草经》,性寒、味苦,归心、胃经,有清热解毒、凉血消肿的功效^[1]。研究表明板蓝根含有靛玉红、靛蓝、多种氨基酸和多糖等

成分^[2]。有些糖类在抗肿瘤、抗肝炎、抗心血管疾病、抗衰老等方面具有独特的生物活性^[3]。目前有报道板蓝根多糖为均多糖,单糖组成为木糖^[4]。本实验采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)进行单

①收稿日期:2009-08-28

基金项目:河北大学自然科学基金资助项目(2007-111)

作者简介:郭怀忠(1968—),男,内蒙古商都县人,副教授,博士,2005年7月获沈阳药科大学药物分析专业理学博士学位,2005年10月于天津大学药学院从事教学和科研工作,2007年7月至今工作于河北大学药学院,承担国家863计划以及国家自然科学基金等项目的科研工作,参加国家药典委员会项目“板蓝根注射液指纹图谱研究”工作,获得实用新型专利1项,发表论文30余篇,研究方向为中药