

· 药剂与工艺 ·

苦参生物碱的高速逆流色谱法制备研究

—— 色谱参数和仪器参数的最佳化

上海中医药大学中药学院 (200032) 王新宏* 范广平 安睿 吴碧元 洪筱坤 王智华

摘要 应用新型的液液分配技术——高速逆流色谱法 (High Speed Counter-current Chromatography, HSCCC) 对苦参生物碱类成分的分离制备进行探讨。选用氯仿-磷酸-磷酸钠缓冲液 (pH 6.20) 溶剂系统, 经正交试验确定了 HSCCC 的最佳运行参数, 将苦参粗提物分离得到 6 个固态收集物, 经 TLC 4 种不同展开系统证实其中有一个为单一组分。实验表明, HSCCC 法是一种高效、简便的分离制备中草药有效成分纯品的新方法。

关键词 高速逆流色谱 苦参 生物碱

Preparation of Kushen Alkaloids by HSCCC—— Optimization of Chromatographic and Instrumental Parameters

College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM (Shanghai 200032) Wang Xinhong, Fan Guangping, An Rui, Wu Biyuan, Hong Xiaokun and Wang Zhihua

Abstract Separation and preparation of alkaloids from Kushen (*Sophora flavescens* Ait.) was studied by the new high speed counter-current chromatography——HSCCC. The solvent system consisted of chloroform, phosphoric acid, Na_3PO_4 buffer (pH 6.20) and the optimum running parameters were obtained through orthogonal experimental design. Six solid collections were separated and identified, one of them contained a single component. The experiment proved that HSCCC is a convenient, feasible and effective technique for the separation and purification of active components in Chinese herbal medicines.

Key words Kushen (*Sophora flavescens* Ait.) high speed counter-current chromatography (HSCCC) alkaloids

高速逆流色谱法 (High Speed Counter-current Chromatography, HSCCC) 是近十几年来发展的新型的液-液分配色谱新技术, 其特点是被分离物质在两相中进行分配分离, 不需任何固态载体, 不存在被分离组分的不可逆吸附及污染, 样品粗提物即可进样分离, 分离纯化与制备可同步完成, 被分离组分可以定量回收^[1]。

中药苦参临床应用广泛。在苦参化学成分分离鉴定方面, 生物碱类成分就已分离鉴定出 20 多种, 如苦参碱 (matrine), 氧化苦参碱 (oxymatrine), 羟基苦参碱 (sophorand) 等^[2]。对各组分的分离纯化始终未获满意解决, 即使是较易制得的化合物, 因不易结晶而使其纯度不理想。本文应用高速逆流色谱技术对中药苦参中生物碱的制备分离进行了研究。

1 实验部分

1.1 试剂: 磷酸钠、磷酸等均为分析纯, 水为蒸馏

水

药材: 苦参, 经本校吴赵云老师鉴定, 为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根。

标准品苦参碱、氧化苦参碱购自中国药品生物制品检定所。

1.2 仪器设备: 高速逆流色谱仪 HSCCC-GS10A2 型, 北京市新技术应用研究所。酸度计: PHS-2 型, 上海雷磁仪器厂。自动部分收集器: BXZ-160 型, 上海青浦沪西仪器厂。

1.3 样品的制备: 文献报道苦参生物碱的提取方法有乙醇法与氨-氯仿法^[3]。我们以 TLC 法对两种方法所得提取物进行鉴别, 证明均含有苦参碱和氧化苦参碱等多种生物碱。又经 HSCCC 法初步实验确定以出峰数多、杂质少的乙醇法制备总生物碱。

取苦参粗粉 1200 g, 用 95% 乙醇热浸 2 次, 过滤, 减压蒸馏, 除尽乙醇, 边加两倍体积的 2% 盐酸

* Address: Wang Xinhong, College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Shanghai

王新宏 医学博士, 副教授, 1963 年 7 月生。主要从事天然药物分析及质量标准研究工作, 参与多项不同级别科研课题及新药开发工作, 发表研究论文 10 余篇。

边搅拌,立即析出大量树胶质,放置过夜,过滤,弃去沉淀物。滤液用乙醚洗涤3次,弃去醚层,滤液用碳酸钠碱化至 pH9~10,加氯化钠饱和,用氯仿萃取至无生物碱反应。取氯仿液减压蒸馏至 250 mL。

1.4 实验步骤:将选好的两相互不相溶的溶剂系统在分液漏斗中充分振摇后静置分层,取一相作为固定相,另一相作为流动相。先将固定相注满管柱,再将流动相以选定的流速泵入,待流动相从管柱出口流出,基线稳定后,再将样品由进样器注入(并按选定的转速启动主机)。管柱出口的流出物经紫外检测,按需要收集的馏分接收于自动部分收集器的试管中。

1.5 HSCCC分离条件的确定

1.5.1 溶剂系统的确定:在主机转速 800 r/min 流动相流速 2.00 mL/min 进样量 0.5 mL的条件下,对正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1)^[4]和氯仿-磷酸-磷酸钠缓冲液(1:1)^[5]两种溶剂系统进行考察,并对后一系统设计了6种不同 pH值条件。

a. 正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1),上相为流动相,下相为固定相。实验结果在 60 min内仅出一个峰。

b. 氯仿-磷酸-磷酸钠缓冲液(1:1),上相为固定相,下相为流动相。在 pH值分别为 13~14、9~10、7~8、6~7、5~6、3~4的条件下进样,发现仅在 pH6~7情况下,60 min内共出4个峰,且基本上达到基线分离,峰形较好。

因此,确定溶剂系统为 pH6~7的氯仿-磷酸-磷酸钠缓冲液(1:1)。在此基础上,进一步对 pH6.84、6.48、6.34、6.20 4个条件进行精选,结果 pH值在 6.84时,前3个峰在 15 min内出完,未完全分离;6.48时,前3个峰在 25 min内出完,未能达到基线分离;6.34时,前3个峰在 33 min内出完,未能达到基线分离;6.20时,3个峰达到在线分离。见图 1-1。



图 1 样品 HSCCC图

1.5.2 仪器运行参数的选择:采用上述选定的溶剂

系统以上相为固定相,下相为流动相,在对仪器运行参数粗选的基础上进行了三因素(转速、流量、进样体积)三水平正交设计,以优选运行参数。实验结果见表 1。

表 1 三因素实验结果

流速 (mL/min)	转速 (r/min)	进样量 (mL)	分离情况
1	2	750	1 峰分辨率好,分离时间适
2	2	800	1.5 中,800 r/min 时保留值好
3	2	850	2 且无乳化,适于制备。
4	3	750	1.5 分离时间大大缩短,但进样
5	3	800	2 量增加时,固定相流失严重
6	3	850	1 重。
7	1.5	750	2 峰分辨率好,但分离时间大
8	1.5	800	1 大增加。
9	1.5	850	1.5

结果表明:①转速越高,越易产生乳化现象。②流速越大,固定相流失加重,所需流动相量大大增加。③进样量太大,峰间距变窄,峰形变宽。至于同一进样量,改变体积或浓度,分离情况相似。

基于上述情况,选择流速为 2.00 mL/min 转速为 800 r/min 进样量为 1.5 mL作为分离苦参生物碱的运行参数。见图 1-2。

1.6 制备:在选定的最佳条件下进行了苦参生物碱的分离制备。溶剂系统:氯仿-磷酸-磷酸钠缓冲液(pH6.20,1:1),运行参数:流速为 2.00 mL/min 转速为 800 r/min,进样量为 1.5 mL。

分别对各分离组分进行收集,经减压回收溶剂后得到6个无定型固体样品,待鉴定。

1.7 分离组分的 TLC鉴定

1.7.1 TLC分离条件的确定:对文献方法^[6,7]经反复试验并作适当改进后,确定以下列4种条件对分离组进行 TLC鉴定。见表 2,展开距离均为第一次 8 cm,第二次 12 cm。

表 2 层析条件

	硅胶 G薄板的 吸附剂	展开剂 (氨水饱和)	显色条件
1	0.5% CM C	氯仿-甲醇(5:0.2)	喷以碘化铍钾
2	1% CM C-0.4% NaOH	氯仿-甲醇(5:0.2)	
3	0.5% CM C	苯-丙酮-甲醇(8:3:0.5)	
4	1% CM C-0.4% NaOH	苯-丙酮-甲醇(8:3:0.5)	

1.7.2 TLC鉴定结果:有一组分为单一的生物碱类成分。

2 结果与讨论

2.1 苦参总生物碱经 HSCCC法分离收集到6个馏分,经回收溶剂后分别得到固态干燥品,通过4种

不同色谱系统进行 TLC 鉴定,用标准品苦参碱和氧化苦参碱对照,其中有一组分为单一的生物碱类成分,但不是该两成分,其结构有待进一步鉴定。另一组分对生物碱显色剂呈阴性反应,其组成亦有待于进一步鉴定。其他几个峰均为非单一组分,可考虑调整溶剂系统再作进一步分离。

2.2 本文采用的溶剂系统中,水相 pH 值对分离结果有很大影响,可考虑采用 pH 梯度洗脱方法,以求获得更理想的分离效果。

2.3 本实验条件下,某些组分在固定相中溶解度较大,在其达到饱和浓度前不会随流动相流出。因此,

制备时采用了连续进样方式,对分离结果无不良影响。同时流动相经蒸馏后可反复使用,从而大大节省了溶剂,缩短了制备时间。

参 考 文 献

- 1 张天佑.逆流色谱技术.北京:科学技术出版社,1991: 1
- 2 张守芳.中草药通讯,1997,(1): 38
- 3 于喜水,关荣娟,赵晓丽,等.中成药,1990,12(3): 3
- 4 张天佑.逆流色谱技术.北京:科学技术出版社,1991: 295
- 5 蔡定国,顾明娟,张吉德,等.中成药,1990,12(6): 32
- 6 崔建芳,章观德,王慕邹,等.药理学杂志,1985,(1): 59
- 7 张中苏,张树英,王润生,等.中国中药杂志,1995,20(3): 171

(1999-12-22收稿)

肉桂油 β 环糊精包合物的制备工艺研究[△]

沈阳军区总医院药剂科 (110015)

沈阳药科大学

解放军八七疗养院

宋洪涛* 郭 涛

颜秀涛 张汝华

张 群

摘 要 应用三因素六水平的均匀设计方法,研究了 β 环糊精对肉桂油的包合作用。通过对包合物收得率和包合率这两个指标的比较,筛选优化出肉桂油 β 环糊精包合物的最佳制备条件。在此条件下,分别采用 5 种不同的包合方法制备肉桂油 β 环糊精包合物,结果以搅拌法为最好,所得包合物的包合率为 82.16%,包合物收得率为 77.82%。

关键词 肉桂油 β 环糊精 包合物 均匀设计

Studies on the Preparaton of Cinnamon Oil β -Cyclodextrin Inclusion Complex

Department of Pharmacy, the General Hospital of Shenyang Military Region (Shenyang 110015) Song Hongtao and Guo Tao

Shenyang Pharmaceutical University Yan Xiutao and Zhang Ruhua

No. 87 Sanatorium of PLA Zhang Qun

Abstract Conditions for the preparation of the cinnamon oil β -cyclodextrin inclusion complex were studied by 3 factors and 6 levels uniform design. The inclusion rate of cinnamon oil and recovery of inclusion complex were used as criteria in the study. An optimal condition was established, and inclusion complexes were prepared under such condition with 5 different methods. The results showed that the agitation method gave the best result. The inclusion rate of cinnamon oil was 82.16% and the recovery of inclusion complex was 77.82%.

Key words cinnamon oil β -cyclodextrin inclusion complex uniform design

肉桂油 (cinnamon oil) 为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干皮及树皮经水蒸气蒸馏得到的挥发油,是一种常用中药,但其易挥发,遇光和热不稳定^[1,2]。为了更好地发挥其治疗作用,提高其稳定性,并使其粉末化以便于制备各种剂型,

已有文献报道将肉桂油与 β 环糊精 (β -CD) 制成包合物,但包合率较低^[3]。为提高其包合率,笔者对影响包合率的诸多因素进行考察,经筛选优化得到了较佳的包合工艺。

1 仪器与试药

* Address: Song Hongtao, Shenyang Military Region General Hospital, Shenyang

宋洪涛 男,32岁,博士,主管药师。已发表论文 30余篇,参编著作 2部,获军队科技进步三等奖 2项,辽宁省科技进步三等奖 1项。现主要致力于“复方中药速释与缓释制剂的研究”。

[△]辽宁省科学技术基金资助项目, No 9910500508