

素最优水平组合为 A₂B₃C₃, 即孵化温度为 60 , 药脂比为 1 : 40, 孵化时间为 30 min 时所制得石杉碱甲脂质体的包封率最高。

2.4 最优制备工艺的验证: 按正交试验优化处方制备 3 批石杉碱甲脂质体, 并且对包封率进行测定, 包封率测定结果为 87.02%、89.00%、88.60%, 结果表明 3 批石杉碱甲脂质体的包封率无显著性差异, 制备工艺重现性良好。

3 讨论

葡聚糖凝胶柱色谱法测定脂质体包封率具有方法简便、准确的特点, 能使混合物依据分子大小不同而分离。在柱色谱过程中, 洗脱液的流速及上样量的多少均对脂质体中分离游离药物有影响, 因此宜选择能使脂质体达到最大分离程度的洗脱条件, 才能保证测得准确的包封率。若上样量大, 脂质体有拖尾现象; 洗脱速度对分离效果可产生很大影响, 洗脱速度快, 凝胶微孔内外的游离药物来不及平衡, 提

前出峰, 分离不好。本实验通过研究发现脂质体上样量为 0.5 mL, 控制流速在 0.5 mL/min 以内时, 可避免拖尾现象, 达到良好分离。

硫酸铵梯度法是脂质体制备方法中主动载药方法-pH 梯度法的一种, 主要是依靠内、外水相硫酸铵梯度产生的较高驱动力来进行载药。石杉碱甲为弱碱性生物碱类药物, 能与脂质体双分子层内的硫酸根离子结合生成溶解度小的硫酸盐, 药物与硫酸根形成难溶性盐后, 不易透过双分子层, 从而减少了药物的泄漏。采用硫酸铵梯度法制备石杉碱甲脂质体可以达到良好的包封率, 解决了被动载药法包封率低的问题。

参考文献:

- [1] 张 磊, 万谦宏, 高文远. 石杉碱甲的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1422-1426.
- [2] 洪思佳, 王一涛, 李铭源. 石杉碱甲药理与临床研究进展 [J]. 中药药理与药理, 2007, 27(1): 83-86.

反相制备色谱法从朱砂根中分离朱砂根皂苷

甄 铨*

(四川农业大学, 四川 都江堰 611830)

摘要: 目的 研究了 C-18 制备色谱柱从朱砂根中分离朱砂根皂苷的方法。方法 用 BÜCHI 制备色谱系统, 以甲醇-水为流动相进行梯度洗脱, 用反相高效液相色谱监控分离过程。结果 朱砂根皂苷的得率为 5.9%, 相对纯度 95.4%。结论 该法简便, 耗时短, 效率高, 分离效果好, 可连续进样制备, 该法作为制备朱砂根皂苷对照品有较好的参考价值。

关键词: 朱砂根; 朱砂根皂苷; 反相制备色谱; 高效液相色谱。

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)06-0898-03

朱砂根皂苷 (cyclamiretin A-3-O- [-L-rhamnopyranosyl-(1→4)- -D-glucopyranosyl-(1→4)] [-D-glucopyranosyl-(1→2)]- -L-arabinopyranoside; ardicrenin^[1-2]) 是朱砂根 *Ardisia crenata* Sims 中所含三萜皂苷之一, 结构见图 1。朱砂根皂苷具有明显抑制癌细胞增殖和直接杀伤癌细胞^[3-5] 以及抗 HIV 活性^[6] 等作用。目前, 关于从朱砂根中提取、纯化三萜皂苷研究有报道^[7], 但用 C-18 制备柱纯化朱砂根皂苷未见报道。本实验采用 C-18 制备柱对朱砂根皂苷进行了分离, 采用反相高效液相色

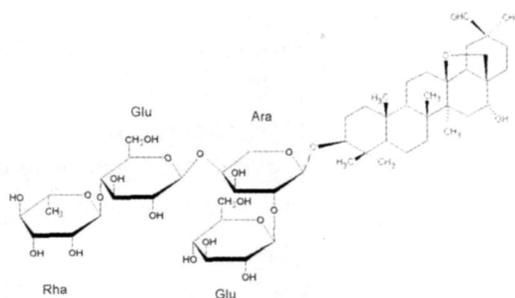


图 1 朱砂根皂苷的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of ardicrenin

* 收稿日期: 2008-09-18

基金项目: 四川省教育厅攻关项目(2006A016); 四川农业大学分校科技基金资助项目(N-200802)

作者简介: 甄 铨(1963—), 男, 副教授, 研究方向: 天然药用植物分析、提取和分离。

Tel: (028) 87122847 Fax: (028) 87133300 E-mail: zhenhua@scfc.edu

谱法测定朱砂根皂苷^[2],全程监控分离过程,研究了 C-18 制备柱分离朱砂根皂苷的条件。朱砂根皂苷对照品在市场上难以购买,对其研究带来不便。该方法作为制备朱砂根皂苷对照品有较好的参考价值。

1 仪器与试药

岛津 LC-20AB 高效液相色谱系统,具 CTO-10AS 柱箱、DGU-20A3 在线脱气、CBM-20A 系统控制器、SPD-20A 紫外可见检测器、LC solution 工作站;Sepacore 制备色谱系统(BÜCHI),具 C-605 泵(两台)、C-615 泵管理器、C-690 ODS 玻璃制备柱(230 mm × 26 mm, 50 μm);TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);离心浓缩机(CVE-2000,东京理化器械株式会社);显微热分析仪(WRX-1S,上海精密科学仪器有限公司)。

朱砂根皂苷对照品由本实验室制备,经中国科学院成都生物研究所质谱与核磁共振分析,分子式 C₅₃H₈₆O₂₂,相对分子质量 1 074,熔点 239 ~ 241,质量分数大于 98%;朱砂根为四川都江堰灵岩山、般若寺等地野生天然植株,经四川农业大学植物分类学专家易同培研究员鉴定。将采集的朱砂根植株根部洗净泥土,50 恒温烘至质量恒定后粉碎过 40 目筛,放入干燥器备用。HPLC 分析用乙腈为色谱纯、重蒸水、提取、制备用乙醇、甲醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 朱砂根的提取:取朱砂根粉末 10.00 g,按固液比 1:20 加入 80%乙醇,回流,提取 20 min,共提取 3 次(该条件为正交试验优化确定)。每次提取液 4 000 r/min 离心 10 min,用 80%乙醇适量洗涤沉淀物,4 000 r/min 离心 10 min,收集合并上清液。减压浓缩至溶液发泡;加蒸馏水至 200 mL 进行陈化。10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液至 250 mL 量瓶,加蒸馏水至刻度,即得。

2.2 朱砂根皂苷的高效液相色谱法测定^[2]

2.2.1 色谱条件:SHIM-PACK VP-ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(37:63);体积流量:1.0 mL/min;柱温:40;最大进样量:20 μL;检测波长:205 nm;灵敏度:0.16 AUFS。

2.2.2 对照品溶液的制备:精密称定朱砂根皂苷对照品 28.8 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇适量溶解并加至刻度,摇匀,即得(质量浓度为 2.88 mg/mL)。

2.2.3 标准曲线的建立:精密吸取 2.88 mg/mL 朱砂根皂苷对照品溶液,依次稀释,配制质量浓度分别为 0.028 8、0.057 9、0.288、0.576、2.88 mg/mL 溶

液,分别进样 10.0 μL 进行分析。结果朱砂根皂苷在进样量 0.288 ~ 57.6 μg 时与色谱峰面积线性关系良好,线性回归方程为 $Y = 2.07 \times 10^4 X + 1.76 \times 10^4$ ($r = 0.999 8$)。

2.2.4 提取液的测定:取朱砂根提取液,按以上所述测定方法,外标法计算,色谱图见图 2。测得朱砂根皂苷的质量为 602.0 mg,朱砂根皂苷提取率为 6.02%。

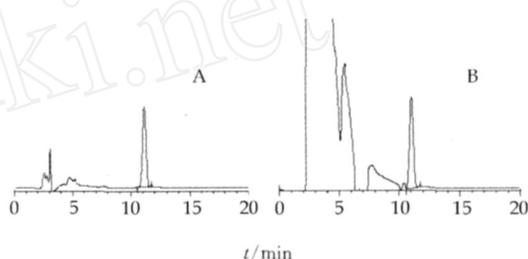


图 2 朱砂根皂苷对照品(A)和朱砂根提取液(B)的色谱图

Fig 2 Chromatograms of ardicrenin reference substance (A) and *A. crenata* extract solution (B)

2.3 制备色谱的条件:BUCHI C-690 ODS 玻璃制备柱(230 mm × 26 mm, 50 μm),内装 C-18 79 g;流动相:甲醇-水;体积流量:30.0 mL/min;温度:室温;梯度洗脱,0%甲醇洗脱 15 min,然后使用 20%甲醇洗脱 20.0 min,再用 70%甲醇洗脱 5 min。

2.4 制备色谱的操作:将朱砂根提取液用大体积进样仓进样 250 mL(朱砂根皂苷质量为 602.0 mg),按上述制备色谱的条件进行分离,当洗脱程序进入用 70%甲醇洗脱 5 min 阶段,以每份 10 mL 分段收集馏分,用高效液相色谱仪检测馏分中的目标物。合并目标物中质量分数高的馏分,减压旋转蒸发大量溶剂,离心浓缩,真空干燥后得朱砂根皂苷产品 591.2 mg。此过程,朱砂根皂苷收率为 98.2%。

2.5 制备过程的检测分析:在上述制备过程中,梯度洗脱程序在水洗脱 15 min 后,以 20%甲醇洗脱 20.0 min,以每分钟为单位收集馏分(每份 30 mL),HPLC 检测收集馏分,结果无朱砂根皂苷成分。然后 70%甲醇洗脱,5 min,再以 90%甲醇洗脱结束,以每 20 s 为单位(每份 10 mL)收集馏分 15 份并编号,进样 10 μL 测定,对 15 个馏分进行 HPLC 法检测,测得朱砂根皂苷色谱峰面积值代入线性回归方程计算质量浓度。以朱砂根皂苷质量浓度为纵坐标,时间为横坐标绘制洗脱曲线,结果见图 3。

2.6 产品的分析和得率测定:以产品得率 = 产品的质量/药材的质量 × 100% 计算得产品收率为 5.9%。熔点仪测出该产品的熔点为 239 ~ 240,与朱砂根皂苷对照品熔点一致。称取产品 1.6 mg,

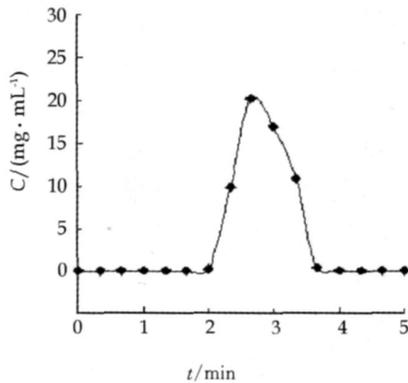


图3 洗脱曲线

Fig 3 Elution curve

用乙腈-水(37:63)溶解,1.00 mL定容,得产品供试液,进样20.0 μ L进行分析,该产品所含目标物的保留时间(10.791 min)与朱砂根皂苷对照品的保留时间(10.795 min)一致,外标法测得其质量分数为95.4% ($n=6$)。采用乙腈-水(37:63)、(35:65)、(32:68)洗脱系统,分别进样20.0 μ L产品供试液,HPLC面积归一法测得质量分数为96.4% ($n=6$),见图4。

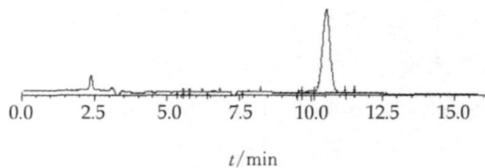


图4 朱砂根皂苷的色谱图

Fig 4 Chromatogram of ardicrenin

3 讨论

制备色谱流动相的选择:以反相高效液相色谱法测定朱砂根提取液中朱砂根皂苷的色谱图为依据进行分析,朱砂根皂苷的色谱峰独立,目标峰前后物质相距较远,为用反相柱制备朱砂根皂苷提供了很好的条件。制备色谱流动相选择了甲醇-水体系。在该体系中,调整甲醇的比例,可以控制目标物的保留时间,

甲醇的比例越小,目标物的保留时间越长。考虑到乙腈有较大毒性,制备色谱未使用乙腈作流动相。

制备色谱的条件建立和洗脱液的检测:通过预试验得知,在甲醇-水体系中,甲醇比例在50%以内,目标物保留时间较长,甲醇比例在70%以上,目标物保留时间较短。根据这一性质,确定两个阶段的梯度洗脱程序,70%甲醇洗脱之前阶段,主要分离极性杂质,使目标物保留;70%甲醇洗脱之后阶段,主要分离极性与目标物接近的成分,从洗脱曲线得知,在该阶段2~4 min收集的馏分,经HPLC检测,为高质量分数的目标物馏分。

由于朱砂根皂苷的吸光系数较小,最大吸收波长为205 nm,甲醇的截止波长为210 nm,这就使得紫外检测难以在线进行,因此,采用柱后分段收集,HPLC检测。

利用反相制备色谱对朱砂根皂苷进行了制备分离。通过一次分离,可得朱砂根皂苷单体。整个过程,用时短,效率高,分离效果好,可连续进样制备。本文提供的朱砂根皂苷制备方法,作为提供朱砂根皂苷对照品有较好的参考价值。

参考文献:

- [1] Wang M T, Guan X G, Hua X U, et al. A new triterpenoid saponin from *Ardisia crenata* [J]. *Planta Med*, 1992, 58(2): 205-206.
- [2] 甄 铎,蒲尚饶,马明东,等. 反相高效液相色谱法测定朱砂根中朱砂根皂苷[J]. *色谱*, 2007, 25(6): 944-945.
- [3] Plohmman B, Bader G, Hiller K, et al. Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins [J]. *Pharmazie*, 1997, 52(12): 953-955.
- [4] 梁克明,王四旺,王晓娟. 九节龙皂甙对8株人癌细胞的抑制作用[J]. *第四军医大学学报*, 2001, 22(7): 671-673.
- [5] 陶小军,龙静雯,贺建宇,等. 九节龙皂苷的抗肿瘤作用和免疫调节作用[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(9): 1070-1072.
- [6] Piacente S, Pizza C, de Tommasi N, et al. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(6): 565-566.
- [7] 尤晓宏,鱼红闪,金凤婵. 朱砂根皂苷的提取[J]. *大连轻工业学院学报*, 2006, 25(1): 23-24.

全鹿丸的质量标准研究

郑 成^{1,2},姚彤炜¹,向智敏^{2*}

(1. 浙江大学药学院,浙江 杭州 310080; 2. 浙江省药品检验所,浙江 杭州 310004)

摘要:目的 制定全鹿丸的质量标准。方法 采用薄层色谱法对方中的甘草、五味子、陈皮进行定性鉴别;采用反相高效液相色谱法测定补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素。结果 薄层色谱鉴别特征明显、专属性强;补骨脂素和

* 收稿日期:2008-11-25

作者简介:郑 成(1978—),男,浙江温州人,主管中药师,2001年毕业于沈阳药科大学中药学专业,现为浙江大学硕士研究生,主要从事中药的质量标准研究工作。Tel: (0571) 86459425 E-mail: jioeff20@yahoo.com.cn