

素在膜中可调节药物的释放速度。

参考文献:

[1] 谷满仓,钱亚芳,吕圭源,等. 白芍的化学成分及质量控制方法研究进展[J]. 科技通报,2006,22(3):337-341.

[2] 陈丽华. 白芍总苷治疗类风湿性关节炎[J]. 中华风湿病学杂志,2004,8(7):444-446.

[3] 闵伟琪,魏琴,李洪毓. 白芍总苷治疗类风湿关节炎的多中心临床研究[J]. 中华风湿病学杂志,2005,9(8):487-491.

[4] 李宁,刘利,高崇凯. 白芍总苷微孔渗透泵片中芍药苷的含量测定[J]. 广东药学院学报,2007,23(6):633-634.

## 高速逆流色谱分离纯化钩吻中钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱

沈洁,苏燕评,许盈,刘浩,刘铭,俞昌喜\*

(福建医科大学药学院 药理学系,福建 福州 350004)

**摘要:**目的 建立高速逆流色谱技术分离纯化钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱的方法。方法 采用高速逆流色谱分离技术分离纯化钩吻生物碱单体,以氯仿-甲醇-0.1 mol/L HCl(4:4:2)为溶剂体系,高效液相色谱技术分析所提产物的质量分数;核磁共振谱、质谱分析确证单体的化学结构。结果 从 300 mg 钩吻总碱中经过一次高速逆流色谱技术分离纯化获得 19.4 mg 钩吻素己和 21.2 mg 1-甲氧基钩吻碱,质量分数分别为 95.4%、98.6%;经过电喷雾质谱及核磁共振的结构鉴定分析,证实分离得到的两种生物碱分别是钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱。结论 高速逆流色谱技术可高效分离纯化钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱,为钩吻生物碱的研发提供了制备技术。

**关键词:**钩吻;钩吻素己;1-甲氧基钩吻碱;高速逆流色谱

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)09-1392-04

### Isolation and purification of gelsenicine and gelsevirine from *Gelsemium elegans* by high-speed counter-current chromatography

SHEN Jie, SU Yan-ping, XU Ying, LIU Hao, LIU Ming, YU Chang-xi

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

**Abstract : Objective** To establish a new technique of high-speed counter-current chromatography (HSCCC) for isolation and purification of gelsenicine and gelsevirine. **Methods** The compounds were isolated and purified by HSCCC, using chloroform-methanol-0.1 mol/L hydrochloric acid (4:4:2) as the two-phase solvent system. The purity of the compounds was analyzed by HPLC. The structures of the compounds were confirmed by ES/MS, <sup>1</sup>H-NMR, and <sup>13</sup>C-NMR. **Results** Gelsenicine (19.4 mg) and gelsevirine (21.2 mg) were successfully obtained from crude extract (300 mg) of *G. elegans* in one-step separation, with purities of 95.4% and 98.6% by HPLC, respectively. The structures of gelsenicine and gelsevirine were identified by ES/MS, <sup>1</sup>H-NMR, and <sup>13</sup>C-NMR. **Conclusion** These results indicate that HSCCC is a very powerful technique for the isolation and purification of gelsenicine and gelsevirine.

**Key words:** *Gelsemium elegans* (Gardn. et Champ.) Benth; gelsenicine; gelsevirine; high-speed counter-current chromatography (HSCCC)

钩吻为马钱科钩吻属植物钩吻 *Gelsemium elegans* (Gardn. et Champ.) Benth. 全草,盛产于闽、粤、桂等地,具有广泛的临床药用价值,但因其毒性大一直以外用治疗为主。钩吻的主要有效成分为吲哚类生物碱。钩吻总生物碱具有显著的抗肿瘤、镇静、镇

痛、促进造血、抑制血小板聚集、免疫抑制等作用<sup>[1-2]</sup>,但其有效量与中毒量较为接近,限制了临床应用。钩吻素己(图 1-A)为钩吻生物碱中毒性最强的单体<sup>[3]</sup>。1-甲氧基钩吻碱(图 1-B)为甲氧基取代钩吻素甲,其药理作用未见文献报道。用于分离纯

\* 收稿日期:2009-02-06

基金项目:福建省科技计划重点项目(2007Y0018);福建医科大学教授学术发展基金资助项目(JS06027)

作者简介:沈洁(1983—),女,福建长汀人,硕士研究生,主要从事神经精神药物药理学研究。

\*通讯作者 俞昌喜 Tel/Fax:(0591)83569311 E-mail:changxiyu@mai.fjmu.edu.cn

化钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱的传统方法为碱性硅胶柱或氧化铝柱色谱法<sup>[3]</sup>,但是此方法分离周期长,溶剂消耗大,得率低。高速逆流色谱(high-speed counter current chromatography, HSCCC)是一种基于液-液分配机制的新型色谱分离纯化技术,可避免液固色谱造成的固体载体对样品的不可逆吸附,分离效率高,回收率高,制备量大<sup>[4]</sup>。本实验采用 HSCCC 技术分离纯化钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱,旨在为钩吻生物碱单体的研发提供一种高效分离纯化制备技术。

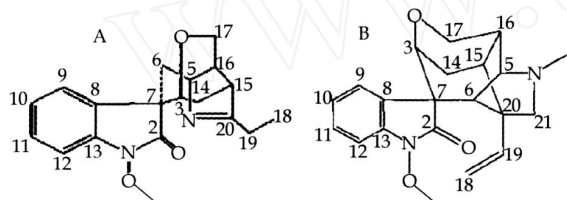


图 1 钩吻素己(A)和 1-甲氧基钩吻碱(B)的化学结构

Fig 1 Chemical structures of gelselicine (A) and gelsevirine (B)

## 1 仪器与材料

TBE—300A 高速逆流色谱仪、TBP—50A 恒流泵、TBD—23 紫外检测器(上海同田生物技术有限公司);DBS—100 电脑全自动部分收集器(上海青浦沪西仪器厂);HX—1050 恒温循环器(北京博医康实验仪器有限公司);1100 高效液相色谱仪(美国 Angilent 公司);Avance 400MHZ 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);LCQ 离子阱质谱仪(美国 Finnigan Thermo electron 公司)。

钩吻药材采集于福州市,经本课题组鉴定为钩吻 *G. elegans* (Gardn. et Champ.) Benth. 全草。实验中所用的乙醇、氯仿、甲醇均为分析纯,购自天津巴斯夫化工有限公司;高效液相色谱(HPLC)分析用甲醇为色谱纯,购自中国国药集团化学试剂有限公司;实验用水为自制重蒸水。

## 2 方法与结果

2.1 钩吻粗提物的制备:将晒干的钩吻根茎适当粉碎,称取钩吻粗粉 500 g,加入 3 000 mL 95%乙醇浸泡过夜。90℃水浴加热回流 3 h 后,滤过,减压蒸馏回收溶剂。重复上述步骤,共回流提取 3 次,每次 3 h。将所得滤液合并后减压蒸馏至无醇味,再加入 2%盐酸 300 mL,使 pH 值小于 2,静置过夜。将静置的溶液抽滤,滤液用 50 mL 乙醚萃取,除去脂质和色素,弃去乙醚层。然后缓慢加入 100 mL 5 mol/L 氢氧化钠,使 pH 值大于 11。最后依次用氯

仿、醋酸乙酯各萃取 3 次,合并萃取液,减压蒸馏即得钩吻总碱浸膏 3.06 g,提取率为 0.61%。

2.2 HSCCC 溶剂体系的选择:采用 HSCCC 分离天然产物中的化学成分,溶剂体系的选择至关重要。目前常用 HPLC 法测定组分在不同溶剂体系中的分配系数来指导溶剂体系选择。本研究根据钩吻生物碱的化学性质,选择分离中等极性化合物的 3 类溶剂体系:正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水、正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水、氯仿-甲醇-盐酸水溶液。

配制各种比例溶剂体系,静置 2 h。取适量钩吻总生物碱提取物,加入两相体系中的下相中充分溶解,用 HPLC 法测定下相中目标单体的峰面积(A<sub>1</sub>)。然后再加入等体积上相,将上下两相剧烈振荡充分混合,待生物碱在两相中分配完全后,测定下相中目标单体的峰面积(A<sub>2</sub>)。HPLC 测定时上下两相的进样体积相同。计算分配系数 [K = (A<sub>1</sub> - A<sub>2</sub>) / A<sub>2</sub>],结果见表 1。结果显示,两种目标化合物在溶剂体系正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水中的分配系数均小于 0.5,样品出峰太快,单体不能实现有效分离。而在溶剂体系正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水(3:3:2:3,3:4:2:3)或氯仿-甲醇-0.1 mol/L 盐酸(4:3:2)中的分配系数在 0.5~2.0,虽符合要求,但将上述比例的溶剂体系应用于 HSCCC 分离时,发现钩吻素己与其他成分同时出峰,样品质量分数不高。最终选定氯仿-甲醇-盐酸水溶液(4:4:2)作为分离钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱的最佳溶剂系统,该溶剂体系水溶液中 0.1、0.2 mol/L 的盐酸浓度对于分离的效果无显著差异。

表 1 钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱在不同种溶剂体系中的分配系数

Table 1 Partition coefficients of gelselicine and gelsevirine in various solvent systems

溶剂体系	分配系数	
	钩吻素己	1-甲氧基钩吻碱
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(3:3:3:3)	0.21	0.09
	0.41	0.39
	0.35	0.52
	0.75	0.81
	1.14	1.26
氯仿-甲醇-0.1 mol/L 盐酸(4:2:2)	5.08	2.37
	1.56	0.83
	1.16	0.89
	2.71	0.47
	2.67	0.51
(4:4:2)	1.01	0.88

2.3 HSCCC 仪器参数的优化:影响分离效果的仪器参数包括泵流速、主机转速、恒温浴槽的循环水温。

2.3.1 泵的流速的影响:流速越快则分离时间越短,分离效果越不理想;流速越慢则分离效果越好,分离时间越长。本研究考察了 1.0、1.5、2.0 mL/min 等流速,其中流速为 1.5 mL/min 时分离效果最好,上相保留率为 73%。

2.3.2 主机的转速的影响:由于氯仿-甲醇-盐酸水溶液形成的两相溶剂体系容易产生气泡,为了尽量减少气泡对分离效果和仪器管路造成的不利影响,实验之前先将上下相超声脱气 30 min,同时在不影响分离效果的前提下尽量减慢转速,实验发现转速 850 r/min 比较合适。

2.3.3 循环水温的影响:循环水温对分离效果影响不大,最终选用 25℃ 作为分离温度。

2.4 HSCCC 分离钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱的操作:配制氯仿-甲醇-0.1 mol/L HCl 溶剂体系(4:4:2),充分混匀后静置过夜。使用前分离溶剂体系的上下相,上相为固定相,下相为流动相,分别超声 30 min。300 mg 钩吻总碱超声溶解在 15 mL 下相中备用。将上相泵入高速逆流色谱仪主机,待上相从管道出口流出时,开启恒温循环器,调节温度至 25℃,设定流速为 1.5 mL/min,泵入下相,同时开启 HSCCC 主机,由首端向尾端正转洗脱,转速为 850 r/min。当流动相从主机出口流出,表明体系已经达到流体动力学平衡,此时将样品倒吸入仪器螺旋管柱内,检测波长为 254 nm。应用 N2000 色谱工作站采集紫外吸收信号,并根据色谱峰分段收集样品。300 mg 钩吻总碱粗品经 HSCCC 一次分离纯化,可得到 19.4 mg 流份 I 和 21.2 mg 流份 II。其 HSCCC 分离过程的色谱图见图 2。

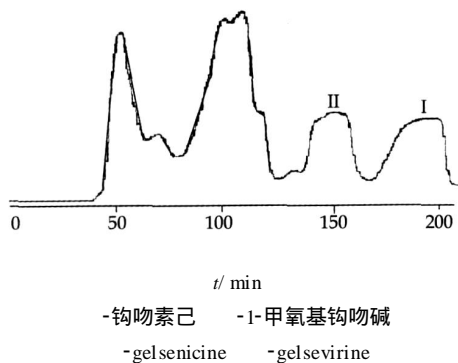


图 2 HSCCC 法分离纯化钩吻总生物碱色谱图

Fig 2 HSCCC Chromatogram for separation and purification of total alkaloids from *G. elegans*

## 2.5 质谱和核磁共振分析

化合物:电喷雾质谱(ESI-MS)  $m/z$  327.6 ( $M + H^+$ ),其相对分子质量应为 326.6。该化合物的

$^1H$ -NMR( $CDCl_3$ , TMS) 数据表明:芳香氢信号 7.54 (1H, dd, H-9)、7.25 (1H, ddd, H-10)、7.07 (1H, ddd, H-11)、6.88 (1H, dd, H-12),甲氧基信号 3.95 (3H, s,  $OCH_3$ ),甲基信号 1.29 (3H, t, 18-H)。 $^{13}C$ -NMR( $CDCl_3$ , TMS) 184.45 (C-2)、74.92 (C-3)、72.46 (C-5)、37.68 (C-6)、55.80 (C-7)、132.24 (C-8)、124.66 (C-9)、123.33 (C-10)、128.04 (C-11)、106.55 (C-12)、138.04 (C-13)、27.00 (C-14)、39.78 (C-15)、42.51 (C-16)、62.10 (C-17)、9.97 (C-18)、25.68 (C-19)、171.25 (C-20)、63.34 ( $OCH_3$ )。经与文献报道<sup>[3]</sup>提供的数据对照,确定该化合物为钩吻素己。

化合物:ESI-MS  $m/z$  353.2 ( $M + H^+$ ),其相对分子质量应为 352.2。 $^1H$ -NMR( $CDCl_3$ , TMS) 数据:其中芳香氢信号 7.41 (1H, d, H-9)、7.14 (1H, t, H-10)、7.28 (1H, t, H-11)、7.03 (1H, d, H-12),甲氧基信号 3.99 (3H, s,  $OCH_3$ ),甲基信号 2.73 (3H, s,  $Nb-CH_3$ )。 $^{13}C$ -NMR( $CDCl_3$ , TMS) 的信号:170.99 (C-2)、68.87 (C-3)、73.36 (C-5)、48.92 (C-6)、51.47 (C-7)、125.82 (C-8)、127.98 (C-9)、123.63 (C-10)、129.40 (C-11)、107.81 (C-12)、139.34 (C-13)、22.39 (C-14)、34.28 (C-15)、39.35 (C-16)、60.32 (C-17)、116.86 (C-18)、133.54 (C-19)、34.28 (C-20)、63.80 (C-21)、63.31 ( $Na-O-CH_3$ )、42.89 ( $Nb-CH_3$ )。经与文献报道<sup>[5]</sup>数据对照,确定该化合物为 1-甲氧基钩吻碱。

## 2.6 组分的质量分数的 HPLC 法测定

2.6.1 色谱条件:色谱柱为依利特 Hypersil ODS2 高效液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(大连依利特分析仪器有限公司);流动相为甲醇-0.2%正丁胺水溶液(50:50);二极管阵列检测器;体积流量为 1.0 mL/min;检测波长为 256 nm;柱温为 25℃。

2.6.2 紫外法测定结果:经 HSCCC 分离得到的流份 I 和 II 在高效液相色谱 190~600 nm 波长扫描发现,两样品在不同检测波长中均为单一的色谱峰。

2.6.3 HPLC 法测定结果:采用面积归一化法计算钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱的质量分数分别为 95.4%、98.6%,见图 3。

## 3 讨论

分离纯化钩吻生物碱通常采用碱性硅胶或氧化铝柱色谱等方法<sup>[3]</sup>,此方法分离周期长,损失大,得率低,操作繁琐。而本研究首次采用高速逆流色谱技术分离纯化钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱,大大提高了分离效率,此方法具有分离效果好,分离实验周

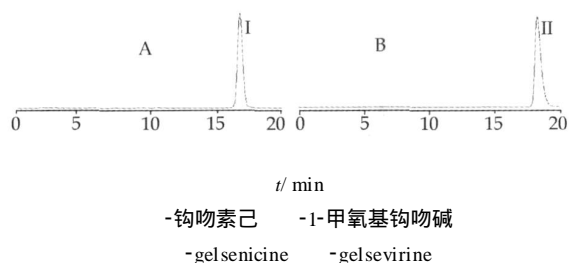


图 3 经 HSCCC 分离得到流份 (A) 和流份 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC Chromatograms of fraction (A) and fraction (B) by HSCCC

期短,样品损失少,操作简单等优点,为钩吻生物碱单体的研发提供了一种高效分离纯化的制备技术。

本研究采用半制备型高速逆流色谱分离纯化钩吻生物碱单体,一次进样300mg钩吻总碱粗品可

分离得到 19.4 mg 钩吻素己和 21.2 mg 1-甲氧基钩吻碱单体,质量分数分别为 95.4%、98.6%。此外,如采用制备型高速逆流色谱仪,其进样量大,可达克~100克量级,产量可达较大规模,易于衔接工业化生产制备。有关钩吻素己、1-甲氧基钩吻碱药理作用、毒理作用,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 刘浩,俞昌喜. 钩吻的研究进展[J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(5): 469-472.  
 [2] 迟德彪,杨鸿轩,郑有顺. 钩吻研究进展[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(2): 48-49.  
 [3] 杜秀宝,戴韵华,张常麒,等. 钩吻生物碱的研究. 钩吻素己的结构[J]. 化学学报, 1982, 40(12): 1137-1140.  
 [4] 袁黎明,傅若农,张天佑. 高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(1): 60-64.  
 [5] 韩海斌. 钩吻化学成分及生药学研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2007.

## 丹参酮自乳化药物传递系统的初步研究

杨小军,魏希颖\*,徐慧娴

(陕西师范大学生命科学院,陕西 西安 710062)

**摘要:**目的 筛选丹参酮自乳化药物传递系统的处方,考察其稳定性。方法 通过溶解度试验、乳化程度观察,乳化完全时间、乳滴粒径大小测定以及伪三相图绘制,确定丹参酮自乳化药物传递系统最佳处方,HPLC法测定处方中药物的量,光照、高温、低温条件下考察其稳定性。结果 丹参酮自乳化药物传递系统最佳处方中的油相为油酸乙酯,乳化剂为 TX10 和聚山梨酯 80,助乳化剂为异丙醇,四者比例为 60 84 21 35。结论 所得到的丹参酮自乳化药物传递系统处方在避光和常温下性质稳定。

**关键词:**丹参酮自乳化药物传递系统;丹参酮;伪三元相图;稳定性

中图分类号:R286.02 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)09-1395-04

### Preliminary study on self-emulsifying drug delivery system of tanshinone

YANG Xiao-jun, WEI Xi-ying, XU Hui-xian

(School of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract: Objective** To screen the formulation for tanshinone self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) and evaluate its stability. **Methods** The optimal tanshinone SEDDS formulation was established through solubility experiment, emulsion examination, fully emulsified time, droplet size determination, and pseudo-ternary diagram drawing. The content and stability were evaluated by HPLC assay under the condition of illumination, high and low temperature. **Results** The oil phase, surfactant and co-surfactant in the optimal tanshinone SEDDS formulation were ethyl oleate, TX10, Tween 80, and isopropyl alcohol (60 84 21 35). **Conclusion** The acquired formulation of tanshinone SEDDS is stable in the dark and room temperature.

**Key words:** tanshinone self-emulsifying drug delivery system (SEDDS); tanshinone; pseudo-ternary diagram; stability

\* 收稿日期:2009-01-17

作者简介:杨小军(1984—),男,内蒙古乌兰察布人,中药学专业硕士研究生,本科就读于内蒙古医学院中药学专业,研究方向为中药新剂型及中药药理。E-mail: yxj3905896@163.com

\*通讯作者 魏希颖 E-mail: whm801@yahoo.com.cn