

cm^{-1} : 3 347, 2 946, 2 848, 1 655, 1 614, 1 507, 1 466, 1 360, 1 264, 1 170, 1 120, 836. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ : 7.33 (2H, s, H-2', H-6'), 6.98 (1H, s, H-3), 6.59 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-8), 6.23 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-6), 3.89 (6H, s, $-\text{OCH}_3 \times 2$); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO) δ : 181.7 (C-4), 163.8 (C-2), 163.6 (C-7), 161.0 (C-9), 157.3 (C-5), 148.0 (C-3', C-5'), 139.7 (C-4'), 120.4 (C-1'), 104.1 (C-2', C-6'), 104.0 (C-10), 103.6 (C-3), 98.6 (C-6), 94.2 (C-8), 56.2 ($-\text{OCH}_3 \times 2$). 以上数据与对照品所测得数据相同, 因此确定所制备的供试品为苜蓿素。

3 讨论

苜蓿素为多种禾本科植物的共有成分, 在竹根量较高, 性质稳定, 用上述制备方法进行提取、分离、纯化, 操作方便, 重现性好, 符合对照品的质量分数要求, 因而可作为对照品使用, 供竹根药材及禾本科植物的定性、定量分析; 也可为从其他原料中提取苜蓿素对照品提供工艺参考。

苜蓿素为黄酮类化合物, 为了在增大提取效率的同时尽量减少其他组分的引入, 通过 TLC、HPLC 法对比水、不同体积分数的乙醇提取液的色谱峰, 并对比石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取物的色谱

峰, 结果用 80% 乙醇提取后用醋酸乙酯萃取的选择性较好, 进而对提取时间和提取次数进行了优化, 确定了本实验的条件, 使苜蓿素的制备收率提高。

提取后的样品通过硅胶柱色谱处理, 可以去除样品中大量的杂质, 并通过 50% 乙醇溶液重结晶, 此时可以得到粗品, 质量分数可达 91%, 但仍含有多种杂质, 需进一步纯化。曾将硅胶柱色谱后得到的苜蓿素粗品进行制备薄层色谱制备, 得到苜蓿素结晶, 但质量分数仍达不到对照品的要求。故选择制备高效液相色谱分离纯化, 既减少了样品的损耗, 又提高了制备的效率。

本研究采用 HPLC/DAD/ELSD 串联检测制备所得供试品的质量分数, 利用 DAD 与 ELSD 性能上的互补, 一次进样即可得到样品紫外光谱图、峰质量分数等信息。

参考文献:

- [1] 吴燕红, 张锐, 王少军, 等. 竹根化学成分的研究(I) [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2404-2405
- [2] 张锐, 徐彭, 吴艳红. 竹根的化学成分研究(II) [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1856-1858
- [3] Verschoyle R D, Greaves P, Cai H, *et al.* Preliminary safety evaluation of the putative cancer chemopreventive agent tricetin, a naturally occurring flavone [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57(1): 1-6

HPLC 法测定甘遂及其醋制品中 3 种二萜类成分

张丽, 李征军, 束晓云, 唐于平, 袁伟*, 段金康

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘要: 目的 测定甘遂与醋甘遂饮片中 3 种二萜类成分。方法 采用 HPLC 法, 分别在 235 nm 和 268 nm 测定了甘遂和醋甘遂饮片中甘遂大戟萜酯 C、3-O-苯甲酰基-20-去氧巨大戟二萜醇和 3-O-(2'E, 4'Z-癸二烯酰基)-20-O-乙酰基巨大戟二萜醇。结果 甘遂大戟萜酯 C、3-O-苯甲酰基-20-去氧巨大戟二萜醇和 3-O-(2'E, 4'Z-癸二烯酰基)-20-O-乙酰基巨大戟二萜醇的进样量分别在 1.636~0.052 μg ($r = 0.9998$), 1.458~0.046 μg ($r = 0.9996$) 和 1.782~0.056 μg ($r = 0.9996$) 呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 98.96% (RSD=2.71%)、99.21% (RSD=2.88%)、96.44% (RSD=2.78%)。结论 该法简便、快速、准确, 重现性好, 可用于甘遂与醋甘遂饮片的质量控制。
关键词: 甘遂; 醋甘遂; 甘遂大戟萜酯 C; 3-O-苯甲酰基-20-去氧巨大戟二萜醇; 3-O-(2'E, 4'Z-癸二烯酰基)-20-O-乙酰基巨大戟二萜醇

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)12-1987-04

甘遂为大戟科大戟属植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根^[1], 别名主

田、猫儿眼、黄甘遂、京甘遂、苦泽、甘泽、白泽、肿手花根、重泽、鬼丑、陵泽、甘藁、陵藁、化骨丹、萱根子、

收稿日期: 2010-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672678, 30973940); 国家教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-09-0163); 江苏省中医药管理局课题(H05075); 江苏高等学校优秀科技创新团队支持计划(2009 年度)

作者简介: 张丽(1971—), 女, 辽宁大连人, 博士, 主要研究方向为中药炮制与质量控制。E-mail: zhangliguanxiong@163.com

* 通讯作者 丁安伟 E-mail: awding105@163.com

头痛花、九头狮子草等^[2],主产于陕西、山西、河南、山东、宁夏等地,其中以陕西产者质量最佳^[3]。甘遂性味苦、寒,有毒,归肺、肾、大肠经,醋制后毒性降低,多入丸散用,具有泻水饮,破积聚,通二便等功效,常用于治水肿胀满,留饮,结胸,癰痛、噎隔,症瘕积聚、二便不通等症。中医用来治疗晚期食道癌、乳腺癌等恶性肿瘤以及哮喘、慢性支气管炎等症^[4]。甘遂中的二萜类成分为其毒效部位^[4,6],因此本实验以分离所得的甘遂大戟二萜酯 C(kansuiphorin C, KC)、3-O-苯甲酰基-20-去氧巨大戟二萜醇(3-O-benzoyl-20-deoxyingenol, 3-BDI)和 3-O-(Δ^2E, Δ^4Z -癸二烯酰基)-20-O-乙酰基巨大戟二萜醇(3-O-(Δ^2E, Δ^4Z -decadienoyl)-20-O-acetylingenol, 3-DAI)为指标性成分,建立了甘遂及醋甘遂饮片中有有效成分的 HPLC 测定方法,以期甘遂与醋甘遂饮片的质量控制提供依据。

1 仪器与试药

Waters515 型液相色谱泵、Waters2996 紫外检测器、Waters717 自动进样器、Empower 数据处理系统、红外测温仪(AZ8868)、AY220 型电子天平(精确到 0.1mg)、BP211D 型电子天平(精确到 0.01mg)、万能粉碎机(天津泰斯特)。

KC(自制, HPLC 法测定质量分数为 98.10%)、3-BDI(自制, HPLC 法测定质量分数为 98.05%)和 3-DAI(自制, HPLC 法测定质量分数为 98.01%)。甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱醇,美国 Tedia 公司)、水为重蒸水,其余试药均为分析纯。

生甘遂饮片 10 批(陕西产编号 1、2、3、4 批,山西产编号 5、6 批,河南产编号 7、8 批,市场统货 9、10 批),醋甘遂饮片(陕西产编号 1、0、3、4 批,山西产编号 5、6 批,河南产编号 7、8 批,市场统货 9、10 批),炮制品 9、10 批直接购自市场,其余均由生品按炮制规范的标准工艺炮制。甘遂药材分别购自安徽省亳州市药材总公司、无锡山禾集团靖江医药有限公司、南京中医药大学百草堂、国医堂门诊部,并经本院中药鉴定教研室王春根教授鉴定为大戟科大戟属植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的块根,见表 1。

2 方法与结果

2.1 炮制品的制备

2.1.1 生甘遂饮片:取生甘遂数个,除去杂质,抢水冲洗,50℃热风干燥,密封于塑料袋中于阴凉干燥处放置,备用。

2.1.2 醋甘遂饮片:取生甘遂数个,大小分档,加醋

表 1 生甘遂药材的采集情况
Table 1 Collection case of *Kansui Radix*

批号	产地	购买来源
1	陕西	安徽省亳州市药材总公司
2	陕西	安徽省亳州市药材总公司
3	陕西	安徽省亳州市药材总公司
4	陕西	安徽省亳州市药材总公司
5	山西	无锡山禾集团靖江医药有限公司
6	山西	无锡山禾集团靖江医药有限公司
7	河南	南京中医药大学百草堂
8	河南	南京中医药大学百草堂
9	市场统货	国医堂门诊部
10	市场统货	国医堂门诊部

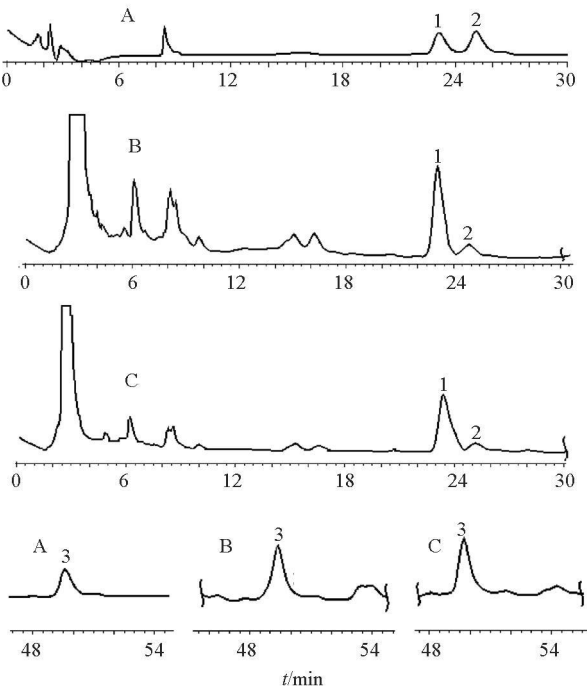
拌匀,闷透,待醋被吸尽后,将炒锅加热到 260℃左右,不断翻炒,9 min 后出锅,放凉,即可。每 100 kg 用醋 30 kg。醋制品颜色加深,略有焦斑。

2.2 色谱条件: Apollo C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇(A)-水(B) 二元梯度洗脱, 0~26 min, A 为 75%; 26~28 min, A 为 75%→83.0%; 28~52 min, A 为 83%; 52~55 min, A 为 83%→100%; 55~65 min, 100%; 65~70 min, A 为 100%→75%; 体积流量: 1.0 mL/min, 检测波长分别为 235 nm(KC、3-BDI)和 268 nm(3-DAI),柱温: 38℃,进样量 20 μL。理论塔板数按 KC 峰计算不得低于 3 000。色谱图见图 1。

2.3 对照品溶液的制备:分别精密称取 50℃减压干燥至恒重的 KC 对照品 7.58 mg, 3-BDI 对照品 6.75 mg 和 3-DAI 对照品 8.23 mg,分别置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。再分别精密量取上述 3 种对照品储备液 2.7 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得含 KC 81.8 μg/mL, 3-BDI 72.9 μg/mL, 3-DAI 89.1 μg/mL 的 1 号混合对照品溶液(总二萜类成分质量浓度为 0.243 8 mg/mL)。

2.4 供试品溶液的制备:取甘遂饮片与醋甘遂饮片粉末约 2 g,精密称定,置 25 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足损失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.5 线性关系考察:精密量取 1 号混合对照品溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得 2 号混合对照品溶液,同法采用逐级稀释法制得 3~6 号混合对照品溶液。分别精密吸取上述各混合对照品溶液 20 μL,注入高效液相色谱仪,按外标法以峰面积计算,以各对照品峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得 KC、3-BDI、3-DAI 回归方程为: $Y = 29\,041\,450.43 X - 34\,834$ ($r = 0.9998$);



1-甘遂大戟萜酯 C (KC) 2-3-O-苯甲酰基-20-
去氧巨大戟二萜醇 (3-BDI) 3-3-O-(2E, 4Z-
癸二烯酰基-20-O-乙酰基巨大戟二萜醇 (3-DAI)
1-kansuiaphorin C (KC) 2-3-O-benzoyl-20-deoxyingenol
(3-BDI) 3-3-O-(2E, 4Z-decadienoyl)-20-O-acetylingenol
(3-DAI)

图 1 对照品(A)、甘遂饮片(B) 和醋甘遂饮片(C)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC Chromatogram reference substance (A), Kansui Radix (B), and Kansui Radix stir baked with vinegar (C)

$Y = 38\,955\,942\,05 X - 964\,83 (r = 0.999\,6)$; $Y = 27\,107\,778.45 X - 45\,770 (r = 0.999\,6)$ 。结果表明各成分进样量分别在 0.052 ~ 1.636、0.046 ~ 1.458、0.056 ~ 1.782 μg 呈良好的线性关系。

2.6 精密度考察:在上述色谱条件下,以 3 号混合对照品溶液(总二萜类成分质量浓度为 60.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$)为考察对象,依法测定,连续进样 6 次,得 KC、3-BDI 和 3-DAI 3 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.07%、1.08%、1.09%。

2.7 重现性试验:取批号为 9 号的醋甘遂饮片,依法处理 6 份,依法测定,结果表明供试品中 KC 的平均质量分数为 376.6 $\mu\text{g}/\text{g}$, RSD 为 2.35%; 3-BDI 的平均质量分数为 40.4 $\mu\text{g}/\text{g}$, RSD 为 1.46%; 3-DAI 的平均质量分数为 333.0 $\mu\text{g}/\text{g}$, RSD 为 2.23%。

2.8 稳定性试验:取批号为 9 号的同一份醋甘遂饮片供试品溶液,在上述色谱条件下,分别于 0、4、8、

12、16、20、24 h 进样测定,得 KC、3-BDI 和 3-DAI 3 种成分峰面积的 RSD 分别为 2.85%、2.39%、2.69%。

2.9 加样回收率试验:取批号为 9 号的醋甘遂粉末品 6 份,每份各 1 g,精密称定,分别精密加入 KC 对照品储备液 1.2 mL、3-BDI 对照品储备液 0.16 mL 和 3-DAI 对照品储备液 1.0 mL,依法测定,计算,得 KC 的加样回收率为 98.96%, RSD 为 2.71%; 3-BDI 的加样回收率为 99.21%, RSD 为 2.88%; 3-DAI 的加样回收率为 96.44%, RSD 为 2.78%。

2.10 样品测定:分别对 10 批甘遂和醋甘遂饮片制备供试品溶液,进行测定,并以外标一点法进行计算,结果见表 2。

表 2 甘遂和醋甘遂饮片中有有效成分的测定结果(n= 2)

Table 2 Determination of active components in Kansui Radix and Kansui Radix stir baked with vinegar (n= 2)

批 号	KC/(mg·g ⁻¹)	3-BDI/(mg·g ⁻¹)	3-DAI/(mg·g ⁻¹)
甘 遂	1 0.361 6	0.049 2	0.194 3
	2 0.427 0	0.026 2	0.197 5
	3 0.395 7	0.033 6	0.405 4
	4 0.383 4	0.033 9	0.394 8
	5 0.576 5	0.069 1	0.326 6
	6 0.572 9	0.068 5	0.326 2
	7 0.248 3	0.027 6	0.105 7
	8 0.263 9	0.031 1	0.108 7
	9 0.444 9	0.041 6	0.160 0
	10 0.439 2	0.039 9	0.158 3
醋甘遂	1 0.197 7	0.025 0	0.099 7
	2 0.198 4	0.023 1	0.098 9
	3 0.226 7	0.033 6	0.240 2
	4 0.226 1	0.033 6	0.236 3
	5 0.223 8	0.032 0	0.237 0
	6 0.123 4	0.025 6	0.129 6
	7 0.117 1	0.025 2	0.130 7
	8 0.405 2	0.057 5	0.357 1
	9 0.376 6	0.040 4	0.333 0
	10 0.288 8	0.025 2	0.377 4

结果表明,各产地甘遂饮片的二萜类成分有较大差异,KC 的范围为 0.025% ~ 0.058%; 3-BDI 的范围为 0.003% ~ 0.007%; 3-DAI 的范围为 0.011% ~ 0.041%。各产地醋甘遂饮片 KC 的范围 0.012% ~ 0.041%; 3-BDI 的范围 0.002% ~ 0.006%; 3-DAI 的范围为 0.010% ~ 0.038%。结果表明,不同产地的甘遂中二萜类的成分差别较大,应用时为保证质量应注意产地。

3 讨论

对色谱柱温的考察结果表明,因甘遂中二萜类成分较多,若柱温较低,则分离效果较差,因此色谱柱温选择 38℃。

实验过程中选择了 3 种流动相系统甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水(0.05% TFA) 进行梯度洗脱, 对流动相的考察结果表明甲醇-水系统与乙腈-水系统差别不大, 从实验成本角度考虑, 选择了较为经济的甲醇-水系统。

实验选择了索氏提取法、回流提取法和超声提取法 3 种提取方法进行提取方式的考察。结果表明超声提取法优于其他两种提取方法。同时对超声时间的考察结果表明, 超声 30、45、60 min 的提取能力

无显著性差异, 故超声时间确定为 30 min。

参考文献:

- [1] 吴晓磊, 潘 勤. 甘遂化学成分的研究[J]. 中草药, 2010, 41(6): 877-881.
- [2] 刘道清. 中药别名大辞典[M]. 郑州: 中原农民出版社, 1999.
- [3] 权宜淑. 中药甘遂的本草调查[J]. 西北药学杂志, 1994, 12(9): 255-257.
- [4] 王立岩. 甘遂的化学成分及其生物活性的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [5] 郑维发. 甘遂提取物抗病毒活性成分及其毒性研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 1998.
- [6] 张 耀, 汪俊松, 孔令义. 甘遂烷型三萜的研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1733-1739.

黄柏生物碱大孔树脂纯化工艺研究

刘丽梅¹, 陈 琳¹, 王瑞海¹, 陈韩英², 杨立新³, 牛燕梅¹, 刘凤华⁴, 许剑琴⁵

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700; 2. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 4. 北京农学院 动物科技系, 北京 102206; 5. 中国农业大学动物医学院, 北京 102206)

摘要:目的 筛选黄柏总生物碱大孔树脂纯化工艺。方法 对黄柏总生物碱提取液纯化所用大孔树脂型号、洗脱剂体积分数、大孔树脂吸附容量、上柱药液 pH 值、上柱速度、洗脱剂用量、洗脱剂流速、洗脱液浓缩质量浓度、洗脱液浓缩后 pH 值进行考察。结果 黄柏总生物碱大孔树脂纯化最佳工艺: 大孔树脂载样量为 AB 8 大孔树脂: 黄柏药材= 1: 1.2(g/g), 上样速度为 2 BV/h, 50% 乙醇洗脱, 速度 1.5 BV/h, 收集 6BV 洗脱液, 回收乙醇, 浓缩至 1.5 g 生药/mL, 其相对密度为 1.015~1.017(70℃), 放置室温, 浓盐酸调节 pH 0.2~0.4, 冷藏放置 12 h, 离心, 沉淀低温减压干燥, 得黄柏总生物碱。提取物中盐酸小檗碱质量分数达到 57.38%, 黄柏总生物碱质量分数达到 59.04%。结论 该工艺稳定, 质量可控, 可用于柏总生物碱纯化的产业化生产。

关键词:黄柏; 总生物碱; 大孔树脂; 纯化

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)12-1990-04

黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 习称川黄柏, 具有清热燥湿、泻火除烦、解毒疗疮等功效^[1]。黄柏中含有多种生物碱, 主要为小檗碱, 还有巴马汀、药根碱、黄柏碱、蝙蝠葛碱、白瓜蒌碱、木兰花碱等生物碱^[2]。资料表明黄柏生物碱具有抗溃疡及抗腹泻作用, 对免疫功能具有调节作用^[2], 是本课题组提取的有效部位。前期研究确定了黄柏总生物碱提取工艺^[3], 本实验采用大孔树脂纯化, 使黄柏总生物碱大于提取物的 50%。

1 仪器和材料

SPS202 Ohaus 电子天平(梅特勒-托利多(常州)称重设备系统有限公司), Startorius CP 2250 天平(德国), T6 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器设备有限公司), WATERS-717-2487 高效

液相色谱仪。紫外灯(上海精科实业有限公司)。

AB-8、D4020、S-8 大孔树脂(天津南开大学化工厂), 860021、DM-130、CD-180、D001-SD 大孔树脂(山东鲁抗医药股份有限公司), 医用酒精(挚友酒精厂), 氯仿、甲醇、氨水均为分析纯。薄层色谱板(烟台市化学工业研究所)。

黄柏药材购自河北安国, 经中国中医科学院中药所冯学峰研究员鉴定为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 其盐酸小檗碱的质量分数为 3.65%。

2 方法与结果

2.1 盐酸小檗碱的 HPLC 测定方法的建立^[1]

2.1.1 色谱条件: 色谱柱 Waters C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液(50:50)(每 100 mL 加十二烷基磺酸钠 0.1 g); 检测波

收稿日期: 2010-02-27

基金项目: 北京市科技计划课题(Y0705003041631)

作者简介: 刘丽梅(1965—), 女, 黑龙江人, 副研究员, 从事中药研究及中医方证基础研究。

Tel: (010) 64014411-2592 E-mail: liulimeih@163.com