

表 8 验证试验结果

Table 8 The validation experimental results

试验号	醇提法		水提法	
	人参皂苷 Rb ₁ 转移率/%	干膏得率/%	大黄酚转移率/%	干膏得率/%
1	80.23	28.07	60.12	20.16
2	82.94	27.98	60.64	19.08
3	81.25	27.77	62.80	19.47
平均值	81.47	27.94	61.19	19.57

考2010年版《中国药典》人参含量测定项下方法，用三氯甲烷提取，先除去大部分脂溶性成分的干扰，再用正丁醇进一步提取，此方法下人参皂苷 Rb₁ 峰与其他峰分离良好，测定人参皂苷 Rb₁ 的含量更可靠，且保留时间适中，节约了溶剂用量。

本试验针对处方中各药味有效成分的化学性质，分别采用醇提法和水提法，通过正交试验优化了提取工艺。从正交试验结论可以看出提取次数是影响提取工艺的主要因素，这也验证了中医临床方剂制备时煎煮多次的合理性；优选工艺与正交设计最佳

工艺的结果基本一致，说明所选用的提取条件重复性好，可操作性强，稳定可行，适用于工业化生产。

参考文献：

- [1] 高爽, 汤淳, 刘乃侨. 论人参的成分及人参皂甙的药用价值[J]. 辽宁经济职业技术学院学报, 2008, (1): 63-65.
- [2] 石楸鸣. 人参皂苷的药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2967-2968.
- [3] 张丽媛. 人参皂苷 Rb₂ 的抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1467-1468.
- [4] 张前. 人参的化学成分和药理活性[J]. 光明中医, 2011, 26(2): 369.
- [5] 于立芬. 数理统计方法[M]. 上海: 上海科技出版社, 1984: 91.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 8.
- [7] 张宁, 张丽. HPLC 法测定颈康胶囊中人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 与三七皂苷 R1 的含量[J]. 中成药, 2008, 30(2): 241.
- [8] 李淑贤, 梁生旺. 肝瘤消胶囊中人参皂苷的含量测定[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(7): 22.

(编辑: 宋威)

高速逆流色谱分离制备钩吻素子

刘浩^{1,2}, 沈洁¹, 刘铭¹, 许盈¹, 俞昌喜¹(1. 福建医科大学药学院药理学系, 福建福州 350004; 2. 武警福建总队医院药剂科, 福建福州 350003)

摘要: 目的 建立应用高速逆流色谱技术分离纯化中国钩吻中钩吻素子的方法。方法 从中国钩吻中提取得到的钩吻总碱以氯仿-甲醇-0.1 mol/L HCl(4:4:2, V/V/V)为溶剂体系, 通过高速逆流色谱进行分离, 得到的目标单体采用高效液相色谱分析纯度, 核磁共振谱氢谱、质谱分析确证化学结构。结果 进样 300 mg 钩吻总碱, 分离得到生物碱单体为 75 mg, 经结构鉴定确证为钩吻素子, 高效液相色谱分析得到质量分数为 99.2%。结论 高速逆流色谱技术可高效分离纯化钩吻素子。

关键词: 钩吻; 钩吻素子; 高速逆流色谱; 分离纯化

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)02-0197-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.025

Separation and Purification of Koumine from *Gelsemium elegans* by High-speed Counter-current Chromatography

LIU Hao^{1,2}, SHEN Jie¹, LIU Ming¹, XU Ying¹, YU Changxi¹(1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004 Fujian, China; 2. Pharmacy Department, Armed Police Hospital of Fujian, Fuzhou 350003 Fujian, China)

Abstract: Objective To develop a new method of high-speed counter-current chromatography (HSCCC) for separation and purification of koumine from *Gelsemium elegans*. **Methods** The crude extract of *Gelsemium elegans* was sep-

收稿日期: 2012-10-18

作者简介: 刘浩, 男, 主管药师, 研究方向: 神经精神药物药理学。Email: guanghaol@163.com。通讯作者: 俞昌喜, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经精神药物药理学。Email: changxiyu@mail.fjmu.edu.cn。

基金项目: 福建医科大学重大科研项目(ZD009); 福建省发展和改革委员会产业技术开发项目(闽发改投资[2009]958号)。

arated by HSCCC with the two-phase solvent system consisting of chloroform-methanol-0.1 mol/L hydrochloric acid (4 : 4 : 2 in volume ratio). The purity of the compound was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The chemical structure of the compound was confirmed by electrospray ionization-mass spectroscopy (ESI-MS)¹H- nuclear magnetic resonance (NMR). **Results** Seventy-five mg of koumine was successfully obtained from 300 mg of the crude extract, and the structure was identified as koumine by ESI-MS and ¹H-NMR. Its purity was 99.2 % showed by HPLC. **Conclusion** The HSCCC can be applied to separate and purify koumine powerfully.

Keywords: *Gelsemium elegans*; Koumine; High-speed counter-current chromatography; Separation and purification

中国钩吻俗称钩吻或断肠草，传统用于治疗各种疼痛，特别是神经性疼痛和癌性疼痛。临床和基础研究表明，钩吻总碱有不同于阿片类镇痛药和阿司匹林的镇痛作用，其镇痛效应接近于吗啡而没有药物依赖性和成瘾性等副作用^[1]。但是，尽管没有累积毒性，总碱的治疗剂量却与中毒剂量相接近，从而限制了它的临床应用。因此，从钩吻总碱中分离得到高效低毒的生物碱单体成为科研工作者的目标。

从钩吻原植物中已经分离得到超过 40 种的吲哚类生物碱^[2]，采用的分离方法大多是传统的柱层析法，但这些方法耗时长，得率低。本文采用的高速逆流色谱 (high-speed counter current chromatography, HSCCC) 是一种基于液液分配机理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，周期短，回收率高，制备量大^[3]。本课题组首次采用 HSCCC 技术分离纯化钩吻素子，建立了一种高效的分离纯化制备钩吻生物碱单体的方法。

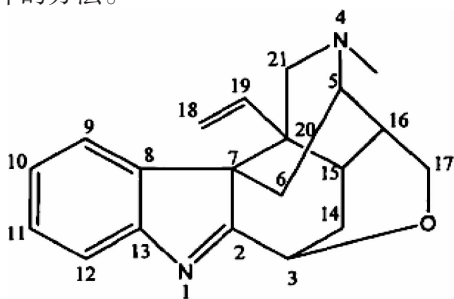


图 1 钩吻素子的化学结构

Figure 1 Chemical structures of koumine

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 Agilent 公司；依利特 Hypersil ODS2 高效液相色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)，大连依利特分析仪器有限公司；Avance

III 400 MHz 核磁共振仪，瑞士 Bruker 公司；LCQ 离子阱质谱仪，美国 Finnigan Thermo electron 公司。

钩吻原生药材采集于福建省福州市，经本课题组生药学专家张永红教授、石冬梅讲师鉴定为中国钩吻的全草^[4]；乙醇、氯仿、甲醇均为分析纯，购自天津巴斯夫化工有限公司；乙腈为色谱纯，购自中国药集团化学试剂有限公司；水为自制重蒸水。

2 方法与结果

2.1 钩吻总碱的制备 取晒干钩吻植物的根和茎适量，粉碎后过 40 目筛，称取钩吻粗粉 500 g，加入 95 % 乙醇 3000 mL 中浸泡过夜，用 90 °C 水浴加热回流提取 3 h 后，过滤，重复上述步骤，共回流提取 3 次，合并滤液，45 °C 减压蒸馏至无醇味，呈深棕色浸膏状。加入 2 % 盐酸 300 mL 溶解浸膏，调节 pH 值为 2，放置过夜。将静置的溶液抽滤后，滤渣 (变为深绿色) 再加入 2 % 盐酸 100 mL 振摇后抽滤，合并滤液；滤液用乙醚 50 mL 萃取，除去脂质和色素；乙醚重复萃取 1 次后，沿玻璃棒缓慢加入 5 mol/L NaOH 100 mL，使 pH 值大于 11，生成红棕色沉淀；然后用氯仿和乙酸乙酯分别萃取 3 次，合并萃取液，45 °C 减压蒸馏后获得钩吻总碱浸膏 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的选择。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 (A1)。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 (A2)。HPLC 测定时两次下相的进样体积相同。计算分配系数 $K = (A1 - A2) / A2$ ，K 值最好在 1 左右，一般在 0.2 到 2 之间，各组分分离因子 (各组分 K 值比) 应大于 1.5^[5]。

本研究根据钩吻生物碱的化学性质, 考虑到钩吻总碱中组分较多, 经过摸索, 选择分离中等极性化合物的溶剂体系: 氯仿-甲醇-0.1 mol/L HCl, 取得了较好的分离效果。

2.3 HSCCC 仪器参数的优化 影响分离效果的仪器参数主要包括泵的流速、主机转速、恒温浴槽的循环水温。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。课题组对 1.0, 1.5, 2.0 mL·min⁻¹ 等流速进行了考察, 选择最适宜流速 1.5 mL·min⁻¹, 上相保留率为 73 %。

由于两相溶剂体系容易产生气泡, 为尽量减少气泡对分离效果和仪器管路造成的不利影响, 试验之前先将上、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, 结果发现转速 850 r·min⁻¹ 比较合适。

考察循环水温对分离效果的影响, 发现循环水温对分离效果影响不大, 最终选用常温 25 °C 作为分离的温度。

2.4 HSCCC 分离钩吻素子的操作 配制氯仿-甲醇-0.1 mol/L HCl(4:4:2, V/V/V) 溶剂体系, 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。将 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 °C, 设定流速为 1.5 mL·min⁻¹, 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⁻¹。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, 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。

将收集到的钩吻 HSCCC 峰组分进行 HPLC 分析, 根据 HPLC 分析结果, 将纯度较高的目标组分合并, 于 45 °C 减压旋转蒸发溶剂, 获得高纯度目标单体。300 mg 钩吻总碱粗品经 HSCCC 分离纯化, 可得到 75 mg 单体。其 HSCCC 分离过程的色谱图见图 2。

2.5 结构鉴定 对分离得到的钩吻单体选用质谱、核磁共振氢谱等分析方法进行结构确证。质谱给出该单体的准分子离子峰[M+H]⁺ m/z 307.4, 其分子量应为 306.4。该化合物的 ¹H-NMR(CDCl₃, TMS) 给出如下信号: δ=5.015 (1H, d, 3-H), 2.790 (1H, m, 5-H), 2.373(2H, d, 6-CH₂), 7.556(1H, d, 9-H), 7.249(1H, t, 10-H), 7.356(1H, d, 11-H), 7.602 (1H, d, 12-H), 1.893 (1H, dd, 14α-H), 2.608

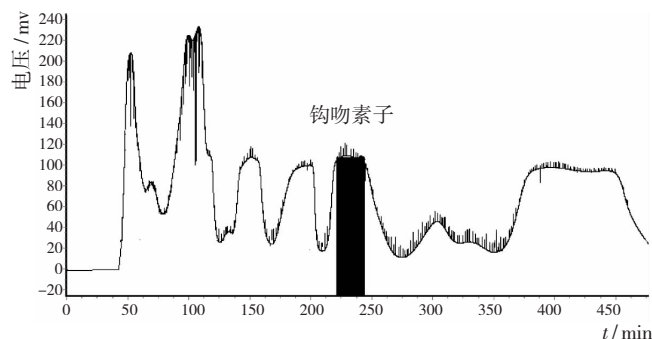


图 2 HSCCC 法分离纯化钩吻总生物碱色谱图

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

(1H, d, 14β-H), 2.388 (1H, dd, 15-H), 2.790 (1H, m, 16-H), 3.627(1H, d, 17α-H), 4.261 (1H, d, 17β-H), 4.653-4.844(3H, m, -CH=CH₂), 3.082(1H, d, 21α-H), 3.160(1H, d, 21β-H)。质谱与核磁共振图氢谱经与文献报道^[6-7]数据对照, 确定该化合物为钩吻素子。

2.6 组分质量分数的 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); 流动相为乙腈-0.2 % 正丁胺(60:40); 二极管阵列检测器; 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 256 nm; 柱温 30 °C。

2.6.2 紫外法测定结果 经 HSCCC 分离得到的目标组分在高效液相色谱 190~600 nm 波长扫描发现, 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子的质量分数为 99.20 %, 见图 3。

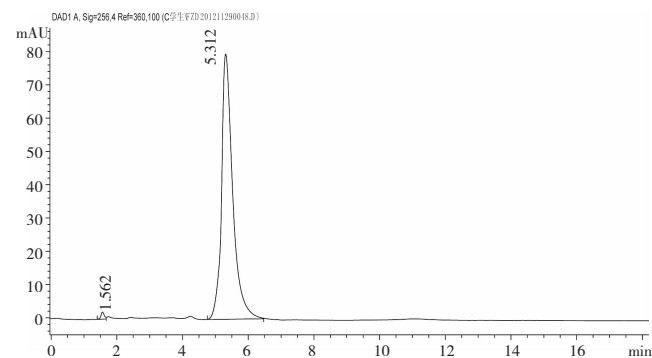


图 3 经 HSCCC 分离纯化后得到的钩吻素子的 HPLC 色谱图

Figure 3 HPLC graph of koumimine by HSCCC

3 讨论

钩吻素子是中国钩吻中含量最高的生物碱成分, 研究发现钩吻素子对体内、外肿瘤均有明显的抑制作用^[8], 对小鼠脾细胞增殖反应及体液免疫反应具

有抑制作用^[9]，对兔血小板聚集具有抑制作用^[10]。

钩吻素子极具药用价值，而长久以来受限于传统的柱层析分离方法得率较低的原因，无法进一步应用开发，本研究采用了近年来先进的高速逆流色谱技术，成功地从中国钩吻中分离到了高纯度的钩吻素子，300 mg 钩吻总碱可以得到 75 mg 钩吻素子，得率达到 25%，与传统方法相比，大大缩短了分离周期，一次高速逆流色谱仅需 1 d 就可以完成。如果在制备型高速逆流色谱仪上进行放大制备，进样量可以达到克~100 克量级，产量非常大，可以达到工业化生产的要求。在 HSCCC 基础上我们尝试采用 pH 区带精制逆流色谱(pH-zone-refining CCC)分离钩吻总碱^[11]，取得很好的效果，总碱进样量达到 1 g，得到的单体量可达几百毫克。因此，高速逆流色谱法为钩吻生物碱单体的研发提供了一种高效的分离制备方法，为下一步的研究打下坚实的基础。

本试验中高速逆流色谱分离纯化钩吻素子，提取方法高速有效，可用于钩吻生物碱的制备，应用前景广阔。

参考文献：

[1] 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.

[2] 张琳，赵庆春，李艳. 钩吻生物碱成分的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报，2007, 24(8): 515-520.

[3] 王尉，杜宁，周晓晶，等. 高速逆流色谱技术在天然产物研究方面的应用[J]. 现代科学仪器，2010, 8(4): 123-128.

[4] 刘浩，许盈，石冬梅，等. 榕产钩吻的药学研究[J]. 海峡药学，2008, 20(4): 62-64.

[5] 郑卫. 逆流色谱技术在抗生素分离纯化中的应用[J]. 中国抗生素杂志，2005, 30(3): 180-186.

[6] 刘铸晋，王绮文，王其灏. 钩吻素子的结构[J]. 化学学报，1986, 44: 157-172.

[7] 王志睿，张兰兰，黄昌全，等. 粤东产钩吻生物碱提取物的红外光谱与核磁共振谱分析[J]. 第一军医大学学报，2005, 25(1): 54-56.

[8] 吴达荣，秦瑞，蔡晶，等. 钩吻素子抗肿瘤作用研究[J]. 中药药理与临床，2006, 22(5): 6-8.

[9] 孙莉莎，雷林生，方放治，等. 钩吻素子对小鼠脾细胞增殖反应及体液免疫反应的抑制作用[J]. 中药药理与临床，1999, 15(6): 10-12.

[10] 方放治，单春文，陈平雁. 钩吻素子对兔血小板聚集的影响[J]. 中药药理与临床，1998, 14(1): 21-24.

[11] Su YP, Shen J, Xu Y, et al. Preparative separation of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. using pH-zone-refining counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218: 3695-3698.

(编辑：宋威)

复方姜黄素脂质立方液晶纳米粒中姜黄素和胡椒碱的包封率测定

付建武^{1,2}，涂瑶生^{1,2}，孙冬梅²，张建军²，施之琪²(1. 广州中医药大学，广东 广州 510405；2. 广东省中医研究所，广东 广州 510095)

摘要：目的 建立复方姜黄素脂质立方液晶纳米粒姜黄素和胡椒碱包封率的测定方法。方法 采用 HPLC 法测定，色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 4.6 μm)，流动相为乙腈-0.4%磷酸(48:52)，流速为 1 mL·min⁻¹，检测波长为 343 nm, 430 nm(波长转换时间: 16.5 min)；采用微柱离心法和透析法测定包封率。结果 姜黄素在 1.8081~18.081 ng 范围内线性良好($r=0.9998$)；胡椒碱在 3.3331~33.331 ng 范围内线性良好($r=0.9999$)；微柱离心法和透析法测定姜黄素、胡椒碱的包封率分别为 59.52%、56.02%和 60.13%、55.86%。结论 采用微柱离心法和 HPLC 法可以快速、准确地测定复方姜黄素脂质立方液晶纳米粒姜黄素和胡椒碱的包封率。

关键词：姜黄素；胡椒碱；脂质立方液晶；微柱离心；透析法；包封率

中图分类号：R284.1

文献标志码：A

文章编号：1003-9783(2013)02-0200-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.026

收稿日期：2012-10-19

作者简介：付建武，男，博士研究生，研究方向：中药新制剂与新剂型的研究。Email: fujian132@foxmail.com。通讯作者：涂瑶生，男，研究员，研究方向：中药制剂的研究。Email: tuyaos@21cn.com。

基金项目：广东省自然科学基金项目(S2011010005927)；广州市科技计划项目(11C36080689)。