

- 放研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(21):2236-2239.
- [3] 庞杰, 林琼, 张甫生, 等. 魔芋葡甘聚糖功能材料研究与应用进展[J]. 结构化学, 2003, 22(6):633-642.
- [4] 刘强, 周莉玲, 李锐. 青藤碱的研究概况[J]. 中草药, 1997, 28(4):247-249.
- [5] Peppas NA. Analysis of fickian and nonfickian drug release from polymers[J]. *Pharm Acta Helv*, 1985, 60(4):110-111.
- [6] Sujja-areevath J, Munday DL, Cox PJ, et al. Relationship between swelling, erosion and drug release in hydrophilic natural gum mini-matrix formulations[J]. *Eur J Pharm Sci*, 1998, 32(6):207-217.
- [7] Lindahl A, Ungell AL, Knutson L, et al. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women[J]. *Pharm Res*, 1997, 14(2):497-502.
- [8] Bhardwaj TR, Kanwar M, Lal R. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2000, 26(10):1025-1038.
- [9] 何东保, 彭学东, 詹东风. 卡拉胶与魔芋葡甘聚糖协同相互作用及其凝胶化的研究[J]. 高分子材料科学与工程, 2001, 17(2):28-31.
- [10] 蔡奕文, 赵谋明, 黎星尉, 等. 电解质对卡拉胶流变特性影响的研究[J]. 中国食品学报, 1999, 3(1):6-12.
- [11] 刘凌, 薛毅, 王亚南, 等. κ -卡拉胶凝胶特性研究[J]. 郑州轻工业学院学报, 1999, 14(1):64-68.

应用高速逆流一次性分离川芎中的蛇床内酯 A 和 Z-蒿本内酯

刘 雯¹, 吴平丽¹, 卓 超¹, 张继全², 沈平壤^{2*}

(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237; 2. 国家中药制药工程技术研究中心, 上海 201203)

关键词: 高速逆流色谱; 川芎; 蛇床内酯 A; 蒿本内酯

摘要: 目的: 研究高速逆流色谱分离川芎活性成分的方法。方法: 应用高速逆流技术一次性从川芎挥发油中分离出主要成分蛇床内酯 A 和 Z-蒿本内酯。采用两相溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水的四元体系, 上相为固定相, 下相为流动相, 转速为 892RPM, 流速为 1.2 mL/min。结果: 经过 EI-MS 和 ¹H-NMR 的鉴定, 可以分别确认是蛇床内酯 A 和 Z-蒿本内酯, 纯度可以达到 95%。结论: 高速逆流色谱技术适合应用于分离内酯类这种极性较小的成分, 分离度好, 产物纯度较高。

中图分类号: R283.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2010)05-0764-04

One step separation and preparation of senkyunolide A and Z – ligustilide in *Ligusticum chuanxiong* Hort by high speed counter current chromatography

LIU Wen¹, WU Ping-li¹, ZHUO Chao¹, ZHANG Ji-quan², SHEN Ping-niang²

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237; 2. National Engineering Research Center for TCM, Shanghai, 201203, China)

KEY WORDS: high speed counter current chromatography; *Ligusticum chuanxiong* Hort; senkyunolide A; Z-ligustilide

ABSTRACT: **AIM:** To research how to separate the active component in *Ligusticum chuanxiong* Hort by high speed counter current chromatography. **METHODS:** Senkyunolide A and Z-ligustilide, the main components of volatile oil in *Ligusticum chuanxiong* Hort were one step separated by high speed counter current chromatography. n-hexane-ethyl acetate-ethanol-water 1:1:1:1 (v/v), was used as the solvent system for HSCCC. Top phase and bottom phase were respectively used as static phase and mobile phase. Optimum speed and flow rate were 900 r/min and 1.2 mL/min respectively. **RESULTS:** Collected fractions were analyzed by HPLC and identified by EI-

收稿日期: 2009-07-19

基金项目: 国家科技部国际科技合作项目——戒毒中药“济泰片”方剂的配伍规律及防复吸的机理研究(2006DFA32720)

作者简介: 刘 雯(1983-) 女, 硕士研究生, Tel: 15900838802 E-mail: jinlan830612@hotmail.com

* 通讯作者: 沈平壤(1953-) 女, 华东理工大学教授, 从事中药现代化科技创新研究。Tel: (021) 50805522-4001 E-mail: spn@nercmcm.com

MS and ^1H NMR. Purity could reach more than 95%. **CONCLUSION**: Lactone is fit to be separated and prepared by high speed counter current chromatography with good resolution and high purity. We find a fast and efficient way to separate these.

川芎为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎,始载于《神农本草经》。其性温,味辛,微苦,具有活血行气、祛风止痛功效。主治血瘀气滞所致月经不调、痛经经闭、肝郁气滞而致血行不畅的胸胁疼痛、头痛、风寒湿痹、跌打肿痛等。

川芎挥发油含有多种苯酞化合物,其中 Z-蒿本内酯(Z-Ligustilide)含量最高,超过 1.0%^[1],其次为蛇床内酯 A (Senkyunolide A)。据报道,蒿本内酯与蛇床内酯可以抑制血小板凝聚、松弛子宫、气管与血管平滑肌,可用于治疗咳嗽、月经不调和高血压等^[2-3]。

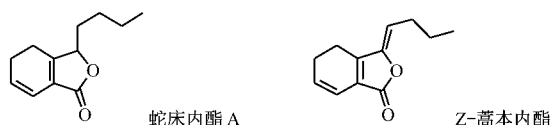


图 1 蛇床内酯 A 和 Z-蒿本内酯的结构

Fig. 1 The construction of senkyunolide A and Z-ligustilide

蒿本内酯与蛇床内酯结构均极不稳定,短时间内即可转换结构^[4]。传统的分离方法不适于蒿本内酯的分离,虽然也有文献报道用半制备高效液相色谱法、毛细管电泳分离蒿本内酯,但难以避免固相对分离物的吸附。

高速逆流色谱(High-Speed Counter-Current Chromatography, HSCCC)是近几十年来发展起来的液-液色谱分离技术。此项技术不需要固相载体,只需要被分离物在两相中分配,避免了固相载体带来的大量样品吸附、损失与污染等问题,样品回收率高,预处理及后处理都简便易行,已广泛应用于分离^[5-6]。

本研究应用 HSCCC 一次性分离了 Z-蒿本内酯和蛇床内酯 A,取得了良好的分离效果。

1 仪器与试剂

TBE-300A 型高速逆流色谱仪(上海同田生化有限公司),ÄKTA purifier P-900 泵,UV-900 紫外检测器(GE Healthcare 美国),HX-4050 恒温循环器(北京博医康),Agilent 1100 高效液相色谱系统(Agilent 美国)DAD 检测器,实验室超级纯水器(上海赛鸽电子科技有限公司)。

正己烷、乙酸乙酯、乙醇均为分析纯,水为超纯

水,乙腈为色谱纯。川芎药材由上海康桥饮片有限公司提供。

2 分离试验用粗提物的制备

称取川芎生药材 100 g,粉碎成细粉,加入 600 mL 乙醇,加热回流提取,提取 3 次,每次 2 h,过滤,减压蒸干,得 39 g 棕黄色浸膏备用。

3 溶剂体系分配系数的测定

在溶剂系统的选择中,样品组分的分配系数的测定是相当重要的准备工作,分配系数是样品组分在溶剂系统上下相中样品组分在溶剂系统中的分配系数 K 接近于 1(即 0.2—3),即分配系数在此范围内时即可用来分离目标产物,溶剂系统适合分离目标成分。

根据文献^[7]报道,选择正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水溶剂系统为基础,进行分配系数的筛选研究。

称取浸膏 1.0 g 左右,共称取 6 份,放入 20 mL 的具塞试管中,按照表 1 中的溶剂体系,各配制 10 mL,分层后,上下层各取 2 mL 加入到上面的试管中^[8],给予充分的振荡,摇匀后,再静置分层,将各个溶剂体系的上下相分别蒸干,使用甲醇溶液定容到 1 mL 的量瓶中,经过针式滤器过滤后,用高效液相色谱计算分配系数。

4 高速逆流色谱分离试验过程

根据分配系数测定的结果,两相溶剂系统采用正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(1:1:1:1),临用前分开上下相,超声 30min。以溶剂系统的上相为固定相,下相为流动相,以 9 mL/min 的流速将上相泵入管路,待固定相充满整个管路后,停泵,启动主机,把转速调至 892RPM,然后以 1.2 mL/min 的流速泵入流动相。当上下相平衡时,记录固定相流出的体积,计算得到固定相保留值 0.53。供试品 100 mg 溶解于 50 mL 流动相,浓度为 10 mg/mL,进样量为 10 mL,以 1.2 mL/min 的流速泵入流动相。紫外检测波长为 280 nm,根据紫外检测图谱,收集各峰的组分,将各峰对应的收集液分别浓缩,干燥。用 HPLC 及 TLC 检测。

5 结果

5.1 分配系数测定结果

采用文献报道的 HPLC^[14]测定方法分析,溶剂体系的分配系数计算结果如表 1。根据溶剂系统的

选择原则 选取 3、5 和 6 号体系进行分离试验考察，结果表明 3 号体系可以达到最佳分离效果。

表 1 样品组分在各溶剂体系中分配系数测定结果

Table 1 The K-value of different solvent system

序号	溶剂体系	分配系数 (蛇床内酯 A)	分配系数 (Z-蒿本内酯)
1	正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水 (5:5:3:7)	3.19	1.73
2	正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水 (5:5:4:6)	9.79	5.18
3	正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水 (5:5:5:5)	4.47	2.37
4	正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水 (5:5:5.5:4.5)	5.86	3.00
5	正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水 (5:5:5.8:4.2)	2.39	1.61
6	正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水 (5:5:6:4)	2.80	1.87

5.2 分离结果

川芎粗品的 HSCCC 见图 2。进样 60 min 后开始出峰，7 h 内出 5 个峰，分别对应收集流出液。根据已有文献的液相条件来初步确定成分，峰 4 为蛇床内酯 A，峰 5 为 Z-蒿本内酯。

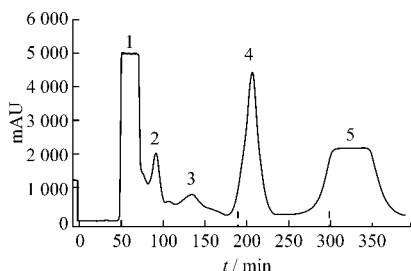


图 2 川芎高速逆流色谱技术分离结果

Fig. 2 The HSCCC result of the separation of *Ligusticum chuanxiong* Hort

5.3 结构鉴定

5.3.1 核磁共振 (NMR) 对 HSCCC 分离峰的结构分析

Z-蒿本内酯: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ ppm: 6.24 (1 H, d, $J=9.7$, H-7) 5.95 (1 H, dt, $J=9.5$, 4.4, H-6) 5.20 (1 H, t, $J=7.6$, H-8) 2.60 (2 H, m, H-4) 2.42 (2 H, m, H-5) 2.38 (2 H, m, H-9), 1.48 (2 H, tq, $J=7.4$, 7.8, H-10) 0.92 (3 H, t, $J=7.4$, H-11)。以上数据与关于蒿本内酯的文献^[9-10]一致。

蛇床内酯 A: $^1\text{HNMR}$ (CDCl_3): $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ ppm: 6.18 (1 H, dt, $J=9.6$, 2.0, H-7) 5.92 (1 H, dt, $J=9.6$, 3.8, H-6) 4.90 (1 H, dd, $J=7.7$, 3.8, H-3) 2.48 (2 H, m, H-4) 2.48

(2 H, m, H-5) 1.9 (1 H, m, H-8) 1.45 (1 H, m, H-8) 1.3 (2 H, m, H-9) 1.3 (2 H, m, H-10) 0.9 (3 H, t, $J=7.1$, H-11)。以上数据与关于蛇床内酯 A 的文献^[11-12]一致。

5.3.2 EI-MS 对 HSCCC 分离峰的结构分析

Z-Ligustilide: EI-MS: m/z 190.1 [M^+], 161, 148, 134, 105, 77, 55, Senkyunolide A: EI-MS: m/z 192.1 [M^+], 163, 135, 133, 105, 79。以上数据与关于 Z-蒿本内酯及蛇床内酯 A 的文献^[13]一致。

5.3.3 HPLC 对 HSCCC 分离峰的纯度分析

分别精密称量 4 号峰和 5 号峰干燥物质 3.1 mg、2.4 mg，用甲醇完全溶解，10 mL 定容，过滤，得供试品溶液。按照文献^[14]给出的高效液相色谱条件，进样量为 10 μL 。

根据面积归一化法，并且与空白试验结果进行比对，可以得到蛇床内酯 A 的纯度为 99.3%，Z-蒿本内酯的纯度为 97.7%。

5.3.4 回收率的计算

以分离得到的相对标准品的量与药材中蛇床内酯 A 和 Z-蒿本内酯实际测得药材中含量之比，可计算出蛇床内酯 A 及 Z-蒿本内酯的回收率。计算可知，蛇床内酯 A 的回收率较高，可以达到 96.61%，相比，Z-蒿本内酯的回收率可以达到 80.08%。

6 讨论

使用高速逆流色谱技术分离出川芎挥发油中的两个成分未见报道，我们首次使用此技术，一次性完成两个成分的分离及制备，得到两个活性成分——蛇床内酯 A 和 Z-蒿本内酯，并且纯度均达到 95% 以上；蛇床内酯的回收率为 96.61%，Z-蒿本内酯的回收率为 80.08%，推测残留一部分在固定相当中。蛇床内酯 A 与 Z-蒿本内酯的稳定性差，使用普通的柱层析分离，耗时长，不易保存和纯化；而半制备及制备型液相分离方法成本较高，均不适于快速、大量的制备分离 Z-蒿本内酯和蛇床内酯 A。而 HSCCC 分离过程短，避免传统方法带来的固相吸附，预处理简单，成本较低，成分得率高，后处理简便易行。说明 HSCCC 对于分离稳定性差的物质具有较大优势。

参考文献:

- [1] Lu Guang-hua, Chan Kelvin, Chan Chi-leng, et al. Quantification of ligustilides in the roots of *Angelica sinensis* and related umbelliferous medicinal plants by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 1046 (2004): 101-107.

- [2] Deng Chun-hui, Ji Jie, Wang Xiao-chuan, *et al.* Development of pressurized hot water extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of ligustilides in *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* [J]. *J Sep Sci*, 28(2005):1237-1243.
- [3] 谢文利 李宏捷 朱 江. 蒿本内酯镇咳作用研究[J]. 武警医学. 2008, 19(08):701-702.
- [4] 李桂生 马成俊 李香玉等. 蒿本内酯的稳定性研究及异构化产物的 GC-MS 分析.
- [5] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京:北京科学技术出版社, 1991:3.
- [6] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社 2005:3.
- [7] Li H B, Chen F. Preparative isolation and purification of chuanxiongine from the medicinal plant *Ligusticum Chuanxiong* by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogra A*, 2004, 1047:249.
- [8] Hu De-jun, Liu Miao, Xia Xing, *et al.* Preparative Isolation and Purification of Altertoxin I from an *Alternaria* sp. by HSCCC [J]. *Chromatographia*, 2008, (7):863.
- [9] Beck J J, Stermitz F R. Addition of Methyl Thioglycolate and Benzylamine to (Z)-Ligustilide, a Bioactive Unsaturated Lactone Constituent of Several Herbal Medicines An Improved Synthesis of (Z)-Ligustilide [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(7):1047-1055.
- [10] Andreas S, Samuel M P, Matthew M, *et al.* Dynamic Nature of the Ligustilide Complex [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71:1604-1611.
- [11] Naito T, Katsuhara T, Niitsu K, *et al.* Two Phthalides from *Ligusticum Chuanxiong* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31:639-642.
- [12] Zxchoke S, Klaiber I, Bauer R, *et al.* HPLC-coupled spectroscopic techniques (UV, MS, NMR) for the structure elucidation of phthalides in *Ligusticum Chuanxiong* [J]. *Mol Divers*, 2005, 9:33-39.
- [13] Lao S C, Li S P, Kelvin K W Kan, *et al.* Identification and quantification of 13 components in *Angelica sinensis* (Danggui) by gas chromatography-mass spectrometry coupled with pressurized liquid extraction [J]. *Analytica Chimica Acta*, 526(2004):131-137.
- [14] Lu Guang-hua, Chan Kelvin, Liang Yi-zeng, *et al.* Development of high-performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing Chinese *Angelica* from related umbelliferae herbs [J]. *J Chromatography A*, 1073(2005):383-392.

滋肾宁神胶囊中芍药苷在制剂工艺中的热稳定性考察

陈剑平¹, 林荣锋¹, 张惜强², 何耀慧¹, 黄晓其¹, 林 吉¹, 施旭光¹, 苏子仁^{1*}

(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广东宏兴集团股份有限公司, 广东 潮州 521011)

关键词: 滋肾宁神胶囊; 芍药苷; 热稳定性; 热降解动力学; HPLC

摘要: 目的: 考察不同工艺因素对滋肾宁神胶囊中芍药苷含量的影响, 初步探讨芍药苷热降解动力学, 进而优化工艺。方法: 采用高效液相色谱法测定不同工艺因素制备的滋肾宁神胶囊中间体中芍药苷的含量。结果: 滋肾宁神胶囊制剂工艺过程中加热温度及时间是影响芍药苷含量的主要因素; 芍药苷在复方水提液中热降解反应符合一级反应方程, 随温度的升高热降解速率常数 K 显著增大。结论: 滋肾宁神胶囊制剂工艺过程应避免高温及长时间受热; 采用减压浓缩及真空干燥可降低芍药苷降解速率, 明显减少芍药苷损失。

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 1001-4528(2010)05-0767-03

滋肾宁神胶囊是由炒白芍、制何首乌、熟地黄、五指毛桃等十六味药制成的胶囊剂, 具有滋补肝肾、宁心安神的功效。用于治疗肝肾亏损、头晕耳鸣、失眠多梦、怔忡健忘、腰酸遗泄、神经衰弱等症。滋肾宁神胶囊是由国家卫生部药品标准收载的中药保护品种滋肾宁神丸改进而成^[1]。方中炒白芍具有养血和阴、补肝肾之功效, 笔者在滋肾宁神胶囊的工艺

研究中发现, 其指标成分芍药苷化学性质较不稳定, 受工艺因素影响较大。本文从提取、浓缩、干燥工艺及其参数等方面入手, 考察了不同制剂工艺因素对芍药苷含量的影响。

1 仪器与试药

DIONEX SUMMIT P680 高效液相色谱仪(美国戴安公司); 试验室专用超纯水机(重庆利迪现代水

收稿日期: 2009-02-07

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B031408006)

作者简介: 陈剑平(1984-) 男, 硕士研究生, 主要从事中药研究。E-mail: lycjp@126.com

* 通讯作者: 苏子仁(1964-) 男, 教授, 主要从事中药研究。E-mail: suziren@gzhtcm.edu.cn