

## 四逆散总生物碱分离纯化

孙志明<sup>1</sup>, 段志刚<sup>2</sup>, 焦亮<sup>2</sup>, 张志斐<sup>2</sup>, 李小娜<sup>2\*</sup>

(1. 河北联合大学附属医院药剂科, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学药学院, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的:应用 001 × 7 阳离子树脂对四逆散中总生物碱成分进行分离纯化,并考察其纯化四逆散总生物碱的工艺参数。方法:考察洗脱溶剂、最佳上样浓度、吸附容量和洗脱溶剂用量等因素对阳离子树脂纯化四逆散总生物碱的影响。以辛弗林为对照品,用 UV 测定洗脱液中总生物碱的含量作为考察指标,确定最佳工艺参数。结果:洗脱溶剂应为 4% 氨水乙醇,最佳上样浓度为 0.25 g·mL<sup>-1</sup>,吸附容量为 5 mL,洗脱溶剂为 8 倍量吸附原液体积。结论:可以采用阳离子树脂纯化四逆散总生物碱,该纯化工艺简单、经济。

**[关键词]** 四逆散; 辛弗林; 总生物碱; 阳离子树脂; 紫外检测法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0011-03

## Separation and Purification process of Total Alkaloids from Sinisan

SUN Zhi-ming<sup>1</sup>, DUAN Zhi-gang<sup>2</sup>, JIAO Liang<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-fei<sup>2</sup>, LI Xiao-na<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China;  
2. School of Pharmacy, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the purification technological parameters of total alkaloids from Sinisan by 001 × 7 cation resin. **Method:** Eluting solvent, sample concentration, absorption capacity and the volume of eluting solvent were chosen to analyze their influence on the purification process. UV was used to determine the process parameters by compared with synephrine, and the content of total alkaloids from eluent as criteria. **Result:** Eluting solvent was 4% ammonia ethanol solution, the optimum sample concentration was 0.25 g·mL<sup>-1</sup>, the absorption capacity is 5 mL and the volume of eluting solvent is eight times to the volume of sample solution. **Conclusion:** Total alkaloids from Sinisan can be purified by cation resins. The purification process is simple and affordable.

**[Key words]** Sinisan; synephrine; total alkaloids; cation resin; UV

四逆散(Sinisan)由柴胡、枳实、白芍、甘草组成,现收于卫生部药品标准中药成方制剂第九册(W33-B-1724-94),临床主要用于胃肠道疾病、肝胆疾病和妇科疾病等<sup>[1-2]</sup>。我们拟制备四逆散总皂苷及总黄酮苷、总生物碱和总挥发油等有效成分群,探讨该复方的药效物质基础和作用机制。方中主要成分为生

物碱的药味是枳实,含辛弗林、乙酰去甲辛弗林、N-甲基酪胺和γ-氨基丁酸等生物碱,具有强心升压作用<sup>[3]</sup>。总生物碱可采用醇提后三氯甲烷萃取、阳离子树脂和大孔树脂等方法制备<sup>[4]</sup>,本文以辛弗林为指标,考察阳离子树脂法纯化四逆散总生物碱的工艺条件。

### 1 仪器与试药

TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),KDC-16H 型高速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),BT125D 型 1/10 万天平(塞多利斯精密科学仪器有限公司)。

柴胡、白芍、枳实和甘草药材(安国神禾中药材饮片有限责任公司,由河北联合大学药学院中药学

**[收稿日期]** 20110513(012)

**[第一作者]** 孙志明,学士,主管药师,从事中药有效成分的研究, Tel:0315-3725759, E-mail:bamboog@126.com

**[通讯作者]** \* 李小娜,博士,教授,从事中药药效物质基础与药物动力学研究, Tel:0315-3726307, E-mail:lixiaona71@126.com

科刘春艳副教授鉴定为正品), 辛弗林对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110727-200306), 001 × 7 阳离子树脂(河北华众化工有限公司, 批号 20110417), 其余试剂均为分析纯, 水为重蒸馏水。

## 2 方法与结果

**2.1 四逆散吸附原液的制备** 称取柴胡、白芍、枳实和甘草粉末(40 目)各 50 g, 加 8 倍量 30% 乙醇浸泡过夜, 回流提取 1 h, 过滤, 滤液回收乙醇, 浓缩制成每 1 mL 含 0.25 g 生药的溶液, 4 ℃ 保存备用, 临用前用 HCl 调 pH 2, 即得四逆散吸附原液。

**2.2 阳离子树脂预处理与再生** 用蒸馏水浸泡新购的树脂, 使其充分膨胀后, 加入 4 倍量 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 搅拌 2 h, 除去酸后水洗至中性, 加入 4 倍量的 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液搅拌 2 h, 除去碱后水洗至中性, 再加入 4 倍量 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 搅拌 2 h, 除去酸后水洗至中性备用。再生时同法操作。

### 2.3 四逆散总生物碱的含量测定

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密称取辛弗林对照品适量, 置于量瓶, 以甲醇溶解并稀释至刻度制成对照品储备液(质量浓度为 1.032 g·L<sup>-1</sup>), -20 ℃ 保存备用。

#### 2.3.2 供试品溶液的制备和测定

**2.3.2.1 供试品溶液的制备** 取预处理后的 001 × 7 阳离子树脂 15 mL, 湿法装柱。精密量取上述四逆散吸附原液 5 mL, 上样, 进行动态吸附。停留 0.5 h 后, 水洗至流出液中性, 4% 氨水乙醇(含 50% 乙醇) 40 mL 洗脱, 合并洗脱液置 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀即得。

**2.3.2.2 供试品溶液的测定** 精密量取供试品溶液 1 mL, 加 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 9.0 mL, 摇匀, 以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液为空白, 于最大吸收波长处测定吸光度(A), 按回归方程计算总生物碱的含量。

**2.3.3 最大吸收波长的选择** 将辛弗林对照品和供试品溶液于紫外-可见分光光度计中, 在 200 ~ 400 nm 进行光谱扫描, 二者均在 290.4 nm 处有最大吸收峰, 故测定波长确定为 290.4 nm。

**2.3.4 标准曲线绘制** 精密吸取辛弗林对照品储备液 0.10, 0.20, 0.40, 0.50, 0.60 mL 于 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液至刻度, 摇匀。以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液为空白, 于最大吸收波长处测定吸光度(A) 结果。以 A 为纵坐标, 辛弗林的浓度为横坐标, 得回归方程为  $A = 0.0171C - 0.0847$  ( $r =$

0.999 2), 结果辛弗林在 10.3 ~ 61.9 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好。

**2.3.5 精密度试验** 取同一供试品溶液, 重复 6 次测定供试品溶液的浓度, RSD 0.12%, 说明该仪器精密度良好。

**2.3.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 于室温分别放置 0, 1, 2, 4, 8, 24 h, 测定供试品溶液的浓度, RSD 0.34%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

**2.3.7 回收率试验** 精密取已知含量的四逆散吸附原液 5 mL, 平行 6 份, 分别精密加入辛弗林对照品溶液(1.032 mg·mL<sup>-1</sup>) 1 mL, 照 2.3.2 项下测定, 计算平均回收率为 96.4%, RSD 7.3%。

### 2.4 阳离子树脂纯化四逆散总生物碱工艺参数的研究

**2.4.1 洗脱溶剂的确定** 取 001 × 7 阳离子树脂柱 3 支, 分别用 2%, 4%, 6% 氨水乙醇 40 mL 洗脱, 其余按照 2.3.2.1 和 2.3.2.2 项下操作, 测定每份中总生物碱的含量, 结果总生物碱质量分数分别为 3.08, 3.79, 3.74 mg·g<sup>-1</sup>。

取树脂柱 3 支, 分别用 4% 氨水乙醇(含乙醇分别为 30%, 50%, 70%) 40 mL 洗脱, 其余按照 2.3.2.1 和 2.3.2.2 项下操作, 测定每份中总生物碱的含量, 结果总生物碱质量分数分别为 2.52, 3.17, 3.30 mg·g<sup>-1</sup>。

由结果可知, 4% 氨水、70% 乙醇洗脱效果最好, 但 50% 乙醇差别不大, 综合考虑, 四逆散总生物碱最佳洗脱溶剂为 4% 氨水乙醇(含乙醇 50%)。

**2.4.2 最佳上样浓度的确定** 取树脂柱 3 支, 分别取不同质量浓度(0.25, 0.5, 1 g·mL<sup>-1</sup>) 的四逆散吸附原液 5 mL 上样, 其余按照 2.3.2.1 和 2.3.2.2 项下操作, 测定每份中总生物碱的质量分数, 结果分别为 3.61, 2.54, 2.61 mg·g<sup>-1</sup>。由结果可知, 最佳上样质量浓度为 0.25 g·mL<sup>-1</sup> 的吸附原液。

**2.4.3 吸附容量的测定** 取 001 × 7 阳离子树脂柱 3 支, 分别取相同质量浓度的吸附原液 5, 10, 15 mL 上样, 其余按照 2.3.2.1 和 2.3.2.2 项下操作, 测定每份中总生物碱的质量分数, 结果分别为 3.48, 2.68, 2.27 mg·g<sup>-1</sup>。由结果可知, 吸附原液为 5 mL 时吸附最完全。

**2.4.4 洗脱溶剂的用量** 取树脂柱 3 支, 分别用 4% 氨水乙醇 20, 40, 60 mL 洗脱, 其余按照 2.3.2.1 和 2.3.2.2 项下操作, 测定每份中总生物碱的质量

# 大孔吸附树脂分离纯化芫花黄酮苷元工艺研究

夏林波, 李博, 邓仕任\*, 贾天柱, 英锡相  
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的: 研究考察大孔吸附树脂用于芫花中 2 种主要黄酮苷元-芹菜素和芫花素的分离纯化效果。方法: 采用静态和动态吸附法, 利用高效液相对芹菜素和芫花素进行定量分析, 筛选最佳分离纯化工艺。结果: 最佳工艺条件为 AB-8 树脂, 上样液的质量浓度  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 吸附流速  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 上样体积 5 BV。再以  $9 \text{ BV} 95\%$  乙醇洗脱, 洗脱流速  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 体积 9 BV。经树脂处理后 2 种黄酮苷元纯度均达到 20% 以上。结论: 大孔树脂对芫花中芹菜素和芫花素具有较好分离纯化效果, 优选工艺操作简单、稳定可行。

**[关键词]** 大孔吸附树脂; 芫花; 芹菜素; 芫花素

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0013-04

## Studies on Separation and Purification of Flavonoid Aglycone from Flos Genkwa by Macroporous Adsorption Resin

XIA Lin-bo, LI Bo, DENG Shi-ren\*, JIA Tian-zhu, YING Xi-xiang

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the purification method of two main flavonoid aglycones ( apigenin and

**[收稿日期]** 20101223(011)

**[基金项目]** 辽宁中医药大学药学人才基金 (yxrc0916)

**[第一作者]** 夏林波, 博士, 讲师, 从事中药药效物质基础研究及中药质量评价研究, Tel: 0411-87586006, E-mail: xialb@lnutcm.edu.cn

**[通讯作者]** \* 邓仕任, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究及中药质量评价研究, Tel: 0411-87586007, E-mail: dengsr@lnutcm.edu.cn

分数, 结果分别为 2.12, 3.16, 3.86  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

由结果可知, 洗脱溶剂的用量为 12 倍的吸附原液体积时洗脱效果最好, 但综合考虑洗脱溶剂用量及回收溶剂等因素, 最后选 8 倍量 (40 mL) 的洗脱溶剂。

**2.4.5 工艺验证试验** 取  $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  四逆散吸附原液 5 mL, 通过 15 mL 阳离子树脂, 用 4% 氨水乙醇 (含乙醇 50%) 40 mL 洗脱, 其余按照 **2.3.2.1** 和 **2.3.2.2** 项下操作, 测定 3 份样品的平均总生物碱质量分数为  $3.73 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 说明工艺稳定、可行。

### 3 讨论

曾采用 HPLC 测定四逆散中辛弗林的含量, 由于辛弗林保留时间短, 流动相常加入缓冲盐和十二烷基磺酸钠等离子对试剂<sup>[5]</sup>, 不容易平衡, 对色谱柱

也有损害。UV 法简单经济, 且能反映四逆散中多种生物碱的含量, 故试验选择了本法。

### [参考文献]

- [1] 陈长勇. 四逆散的临床应用[J]. 陕西中医, 2002, 23(11): 1039.
- [2] 王伟, 毕宏伟. 四逆散的临床应用进展[J]. 中医药信息, 2006, 23(5): 56.
- [3] 彭国平, 牛贺明, 徐丽华. 枳实活性成分的研究[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2001, 17(2): 91.
- [4] 孙静, 张明, 张小飞. 延胡索总生物碱纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 40.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2010: 230.

[责任编辑 仝燕]