

苦参总碱分离纯化方法的研究

胡艳丽¹, 郭 丽², 贾晓红³

(1. 新疆特种植物药资源教育部重点实验室 新疆 石河子 832002; 2. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036; 3. 新疆农业大学食品科学学院 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要: 本文旨在研究一种分离苦参总碱的最佳纯化方法。经实验, 确定氧化铝柱分离法与重结晶法相结合的方法是分离和纯化总碱中各组分的最有效方法, 并通过高效液相色谱对本实验所得到的苦参碱和氧化苦参碱结晶物进行纯度分析, 确定这两种生物碱结晶物纯度均高于 98%。

关键词: 苦参总碱; 氧化苦参碱; 苦参碱; 分离纯化

Study on Separation and Purification Technology of *Sophora alopecuroides* L.

HU Yan-li¹, GUO Li², JIA Xiao-hong³

(1. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources, Ministry of Education, Shihezi 832002, China;
2. School of Tea and Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;
3. School of Food Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: The aim of this paper was to research an optimally separated and purified method of *Sophora alopecuroides* L. The results of experiment determined that the most effective separating and purifying method for each ingredient in *Sophora alopecuroides* L. was a combined one by using alumina column followed recrystallization. Besides, the matrine and oxymatrine crystals obtained respectively from this experiment were analysed for their purification by high performance liquid chromatography (HPLC). Finally, we found that the purities of the two purified alkaloids both exceed 98%.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; oxymatrine; matrine; separation and purification

中图分类号: Q946.88

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0032-05

收稿日期: 2005-11-16

作者简介: 胡艳丽(1976-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事神经药理研究。

积的重量, 对鸡蛋冲击响应影响不大。

4 结 论

应用灰色关联理论对鸡蛋的主频率与影响因素之间的关系进行了分析, 所需的数据量不多且计算量少, 分析结果与实际的情况一致^[7], 是分析主频率和影响因素之间关系的一种有效的综合分析方法。同时, 分析表明: 蛋壳强度是影响主频率的首要因素, 而鸡蛋比重对主频率的影响不大。因此, 这为鸡蛋的冲击无损检测提供了重要的理论参考依据, 即可指导控制不利影响因素以采取措施来确保鸡蛋品质检测的准确和可靠。

参考文献:

[1] KETELAERE B DE, COUCKE P, BAERDEMAEKER J DE. Egg-

shell crack based on acoustic resonance frequency analysis[J]. Journal of Agricultural Engineering Research, 2000, 76: 157-163.

[2] COUCKE P, DECUYPERE E, DE DAERDEMAEKER J. Measuring the mechanical stiffness of an eggshell using resonant frequency analysis[J]. British Poultry Science, 1999, 40(2): 227-232.

[3] H K, CHO, W K, et al. Detection of surface in shell eggs by acoustic impulse method[J]. Transactions of ASAE, 2000, 43(6): 1921-1926.

[4] COUCKE P. Assessment of some physical quality parameters of eggs based on vibration analysis[D]. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, 1998.

[5] 郭爱明. 灰色系统理论和方法在食品科学中的应用[J]. 食品科学, 1994, 15(4): 3-6.

[6] 邓聚龙. 灰色系统基本方法[M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1987: 1-56.

[7] 姜瑞涉. 鸡蛋动力学品质分析与检测[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.

[8] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 614-622.

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)为豆科槐属植物,又名苦豆草、苦甘草、苦豆根、西豆根、欧苦参等^[1],是我国荒漠草原及农田上一种有毒的多年生草本植物,约有12种苦豆子集中分布于我国宁夏、甘肃、青海、新疆等北方荒漠地区。祖国医学认为苦豆子性寒味苦,具有清热利湿、退黄利尿、解毒等作用。现代药理学研究证实,苦豆子中的药物活性成份为苦参碱类,它具有清热燥湿、杀虫、抗病毒、抗炎、利尿、抗腹泻、抗溃疡、镇痛降温、降压降血脂等功效^[2]。近年研究表明,苦豆子中所含的苦参碱、氧化苦参碱等还具有抗癌作用。苦参总碱注射液,主要成分为苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱等七种化学结构近似的生物碱,经临床验证有抗肿瘤、抗病毒及抗心律失常之功效。目前,国内外以苦参碱类为主要成分开发的各种药类有几十种,苦参碱类药物和农药产品的研制及开发,将形成对苦参碱类原料的大量需求,为苦参碱类原料打开广阔的市场前景^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与试剂

苦豆子产自新疆阿克苏,为野生种。

无水乙醇、三氯甲烷、磷酸二氢钾、溴麝香草酚蓝、氢氧化钠、食用乙醇、碘化铋钾、氨水;苦参碱标准品(纯度99%) 中国药品生物制品检定所;氧化苦参碱标准品(纯度99%) 中国药品生物制品检定所;碱性氧化铝、高效硅胶G板等,以上试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

722型光栅分光光度计、HH.S21-4恒温电热水浴锅、SA720型pH计、WKY型微量移液器、FA2004电子天平、202-0S台式干燥箱、Agilent 1100液相色谱仪等。

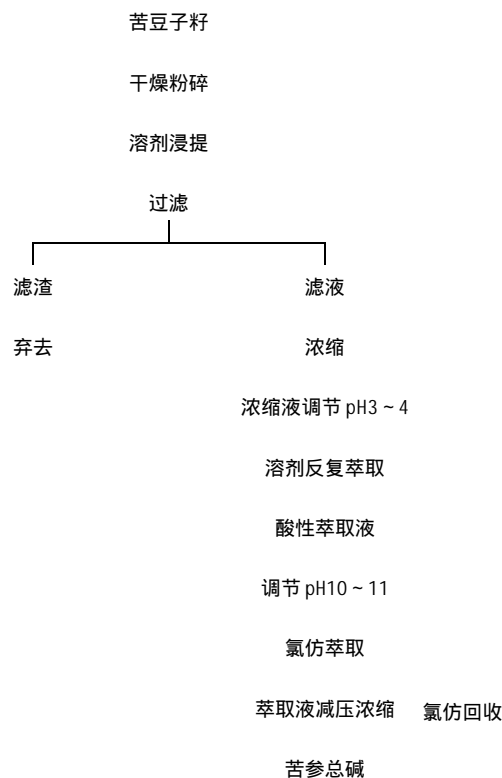
1.2 方法

1.2.1 苦参总碱提取工艺流程图

1.2.2 苦参总碱的分离纯化方法

1.2.2.1 柱分离法

取活化后的碱性氧化铝,用石油醚(沸程30~60℃)湿法装柱,柱参数为:1.7cm, L/D=20,动态平衡1d。取约3g处理后的苦参总碱,以少量氯仿溶解后,取适量碱性氧化铝拌匀,挥干氯仿后,石油醚(沸程30~60℃)湿法装于柱上端,最后在柱上端加满石油醚开始洗脱。继续不断地加入石油醚,极性小的物质先被石油醚洗脱下来,然后逐渐增加洗脱液的极性,依次



以氯仿、氯仿:甲醇(8:1)、氯仿:甲醇(7:2)、氯仿:甲醇(6:3)、氯仿:甲醇(5:4)、氯仿:甲醇(1:1)、氯仿:甲醇(1:2)、甲醇进行洗脱。每15ml收集一份,每一极性洗脱9倍柱体积(900ml),依次编号1~295。

将收集的洗出液分别点板(硅胶G板)展开,展距8cm,展开液为氯仿:甲醇:浓氨水(5:0.6:0.2),以碘蒸气显色,观察主斑点情况,从而确定柱分离使用的最佳洗脱剂。

1.2.2.2 重结晶法

分别合并上述经薄层层析法所确定的4~49份主斑点 R_f 值为0.7226(A)及51~120份主斑点 R_f 值为0.3276(B)的洗出液,真空浓缩至干。A样以30ml石油醚(沸程30~60℃)回流2次,每次1h,合并回流液,浓缩至约10ml,放置7~9℃温度条件下,经过3~4d,析出淡黄色结晶。再以石油醚(沸程30~60℃)重结晶1次,最终得到白色结晶A。B样以30ml丙酮回流2次,每次1h,合并回流液,浓缩至约10ml,放置7~9℃温度条件下,经过3~4d,析出淡黄色结晶。再以丙酮重结晶1次,最终得到白色结晶B。

1.2.3 苦参碱和氧化苦参碱含量的测定^[7]

1.2.3.1 标准溶液制备

精确称取苦参碱标准品(纯度99%)和氧化苦参碱标准品(纯度99%),分别用甲醇溶解,配制成含苦参碱34.000μg/ml溶液和含氧化苦参碱35.000μg/ml溶液作为

标准溶液。

1.2.3.2 样品溶液制备

精确称取 4.4000mg 苦参碱结晶样品和 4.5000mg 氧化苦参碱结晶样品, 分别用甲醇定容至 5ml。稀释 100 倍后作为待测样溶液备用。

1.2.3.3 色谱条件

色谱柱型号: Tsk gel ODS 5 μ m 4.6 \times 150mm; 流动相: 甲醇: 磷酸水溶液(pH2.1)=15: 85; 检测波长: 220nm; 流量: 1.0ml/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ l。

1.2.3.4 线性关系

分别取标准溶液 1、2、4、6、8 μ l, 用 HPLC 测定峰面积, 每样进 3 针取平均值, 以峰面积为纵坐标 y, 苦参碱量(μ g) 为横坐标 x, 得线性回归方程。

$$y = 9.6184x - 1.3572, r = 0.9999$$

氧化苦参碱量(μ g) 为横坐标 x, 得线性回归方程。

$$y = -24.6869x + 0.7429, r = 0.9999$$

1.2.3.5 样品中苦参碱(或氧化苦参碱)含量的计算

以 5 μ l 待测样品进样分析, 记录其响应时间和峰面积, 每样进 3 针取平均值。选取与标准品有相同响应时间的峰作为苦参碱(或氧化苦参碱)峰, 将样品峰面积值代入回归方程, 计算苦参碱(或氧化苦参碱)绝对进样量, 并按下式计算苦参碱(或氧化苦参碱)含量。

$$N_k = \frac{X_{nk} \times 2.5}{M_n} \times 100\%$$

式中, X_{nk} 为待测样品溶液中苦参碱(或氧化苦参碱)的绝对进样量(μ g); M_n 为待测样品取样量(mg); N_k 为待测样品中苦参碱(或氧化苦参碱)的百分含量(%)。

2 结果与分析

2.1 苦参总碱的柱分离纯化

2.1.1 洗脱剂的确定

吸附在氧化铝上物质的洗脱能力与氧化铝的活性、被吸附物质的性质及浓度、洗脱溶剂的极性有关。就洗脱剂而言, 应当逐渐增加极性, 使吸附在氧化铝柱上的不同化合物逐个洗脱, 达到分离的目的。本实验通过使用薄层层析法, 展开剂为氯仿: 甲醇: 浓氨水(5: 0.6: 0.2), 对柱层析分离中采用的 7 组不同的洗脱剂所收集到的洗出液进行展开, 比较各洗出液中包含的组分情况, 从而确定出最佳的洗脱剂, 见表 1。

由表 1 可知, 单一氯仿或甲醇洗脱剂都无法分别洗脱出苦参总碱液中各组成成分。但氯仿与甲醇的混合洗脱剂对苦参总碱各个组份有一定的分离洗脱效果, 且随

表 1 最佳洗脱剂的确定

Table 1 Selection of the optimal elution reagent

洗脱剂	洗出液中各组分展开情况
氯仿	出现大量的斑点, 几乎叠加在一起
氯仿: 甲醇(8: 1)	出现多个斑点, 几乎叠加在一起
氯仿: 甲醇(7: 2)	出现约 6~10 个斑点, 各组分未完全分开
氯仿: 甲醇(6: 3)	出现 6 个斑点, 各斑点稍微分开
氯仿: 甲醇(5: 4)	出现 4 个斑点, 各斑点距离很近
氯仿: 甲醇(1: 1)	出现明显的 3 个斑点, 各斑点距离较远
甲醇	出现大量的斑点, 几乎叠加在一起

着氯仿中甲醇含量的增加, 苦参总碱中各组份的分离洗脱效果越显著。故苦参总碱柱分离最佳洗脱剂的极性配比段应当以氯仿开始, 然后不断在氯仿中增加甲醇的比例来进行洗脱。

2.1.2 苦参碱与氧化苦参碱洗脱液的确定

通过使用薄层层析法, 展开剂为氯仿: 甲醇: 浓氨水(5: 0.6: 0.2) 对柱分离中采用最佳洗脱剂的极性配比洗脱所收集到的洗出液进行展开, 从而确定出苦参总碱中的

表 2 苦参碱与氧化苦参碱洗出液段的确定

Table 2 Selection of oxymatrine and matrine eluting liquid

洗出液编号	洗出液中各组分展开情况
1~3	无明显斑点
4~49	出现单一斑点, R_f 值为 0.7241
50	出现 2 个斑点, 主斑点 R_f 值为 0.3276
51~120	出现单一斑点, R_f 值为 0.3259
121~158	出现 3 个斑点, 主斑点 R_f 值为 0.2865, 其余两斑点很淡
159~289	只出现 1 个非常淡的斑点, R_f 值为 0.2643, 随编号增大减淡
290~295	无明显斑点

苦参碱与氧化苦参碱洗出液段, 并进行收集作后续处理, 见表 2。

表 2 表明, 4~49 号洗出液中主要含有 R_f 值为 0.7241 的生物碱; 51~120 号洗出液中主要含有 R_f 值为 0.3259 的生物碱。对照苦参碱与氧化苦参碱标准品相应 R_f 值(苦参碱 R_f 值 0.7226, 氧化苦参碱 R_f 值 0.3276), 大致可以推断 4~49 号洗出液中主要为苦参碱, 51~120 号洗出液中主要为氧化苦参碱。分别合并上述两段洗出液, 按照 1.2.2.2 中方法重结晶, 得到结晶 A 与结晶 B。

2.2 结晶样品的定性与定量分析

2.2.1 薄层色谱定性法

称取结晶 A 及 B 各约 2.5mg, 分别以无水乙醇定容至 5ml, 点板, 并在同一板上分别点苦参碱标准品和氧化苦参碱标准品的无水乙醇溶液, 硅胶 G 板定距展开 8cm, 展开液为氯仿: 甲醇: 浓氨水(5: 0.6: 0.2), 以碘蒸气显色, 观察主斑点情况, 见表 3 和图 1。

由表 3 和图 1 可看出, 结晶 A 和结晶 B 的 R_f 值分

表3 结晶样与相应标准品薄层色谱分析

Table 3 TLC analysis of the crystal samples and corresponding standards

名称	斑点情况	R _f 值
苦参碱标准品	单斑	0.7226
氧化苦参碱标准品	单斑	0.3276
结晶 A	单斑	0.7226
结晶 B	单斑	0.3276



由左至右依次为：苦参碱标准品、氧化苦参碱标准品、结晶 A、结晶 B。

图1 结晶样与标准品薄层色谱展开图

Fig.1 TLC of the crystal samples and corresponding standards

别与苦参碱与氧化苦参碱标准品 R_f 值相同，因此可以明确断定 4 ~ 49 号中结晶 A 主要为苦参碱，51 ~ 120 号中结晶 B 主要为氧化苦参碱，并且结晶 A 与结晶 B 均显示单斑，表明这两种结晶样品的纯度较高。

2.2.2 HPLC 定量测定法

根据 1.2.3 所述方法测定结晶 A 与结晶 B 纯度。通过 HPLC 测定可计算出，柱分离纯化所得的苦参碱结晶 A 与氧化苦参碱结晶 B 的纯度分别为 98.30% 和 98.76%，见图 2 ~ 5。

3 讨论

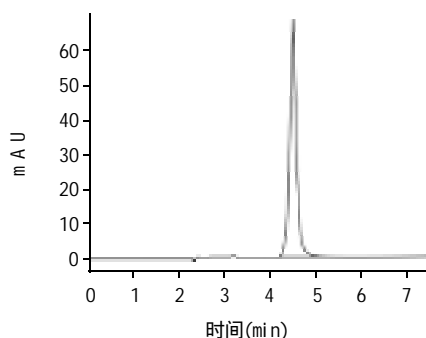


图2 结晶 A 的 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC of crystal sample A

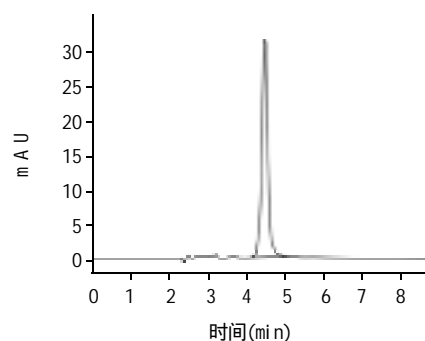


图3 苦参碱标准品的 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC of matrine standard

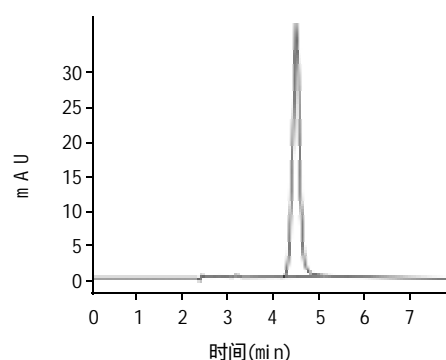


图4 结晶 B 的 HPLC 图谱

Fig.4 HPLC of crystal sample B

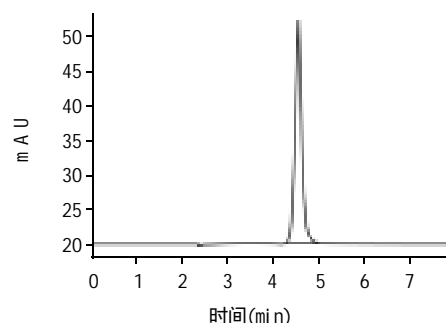


图5 氧化苦参碱标准品的 HPLC 图谱

Fig.5 HPLC of oxymatrine standard

利用先柱分离法后重结晶法相结合的方法分离纯化苦参总碱，并对分离纯化出的苦参碱和氧化苦参碱结晶样进行薄层定性和 HPLC 定量分析，结果表明，本实验所获得的这两种生物碱结晶物的纯度均高于 98%。通过查阅大量的文献资料，与其它提取纯化苦参总碱的方法相比，本实验所确定的分离苦参总碱的最佳纯化方法具有操作简单、生产成本低、溶剂使用种类简单、提取纯化效率高等优点。但由于受实验条件的限制，本文尚未对苦参碱和氧化苦参碱的结构进行深入地分析测定，这还有待于进一步的研究。

Chemical Compositions of Essential Oil of *Eucalyptus umbellata* Growing in Guangxi

TIAN Yu-hong^{1,2}, LIU Xiong-min¹, ZHOU Yong-hong¹, LAI Fang¹

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract: The essential oil of leaves from *Eucalyptus umbellata* growing in Guangxi was obtained by hydrodistillation and analysed by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). 51 compounds constituting 96.17% of the oil were identified. The major components are: 1,8-cineole (28.46%), α -pinene (12.21%), β -pinene (11.00%), globulol (7.27%), α -terpineol (6.59%), limonene (5.34%), aromadendrene (3.92%), p-Menth-1-en-4-ol (2.08%) and epiglobulol (1.77%).

Key words: *Eucalyptus umbellata*; essential oil; composition; gas chromatography-mass spectrometry

圆角桉叶精油的化学成分

田玉红^{1,2}, 刘雄民¹, 周永红¹, 赖芳¹

(1. 广西大学化学化工学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西工学院生物与化学工程系, 广西 柳州 545006)

摘要: 采用水蒸汽蒸馏法提取圆角桉叶精油, 通过气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用法分析鉴定两者的化学成分及质量分数。圆角桉叶精油共鉴定出 51 种化合物, 占总离子流出峰面积的 96.17%, 主要成分为 1,8-桉叶油素 (28.46%), 其后是 α -蒎烯 (12.21%)、 β -蒎烯 (11.00%)、蓝桉醇 (7.27%)、 α -松油醇 (6.59%)、柠烯 (5.34%)、香树烯 (3.92%)、4-松油烯醇 (2.08%)、表蓝桉醇 (1.77%)。

关键词: 圆角桉; 精油; 成分; 气相色谱-质谱

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0036-03

Eucalyptus oils have been widely applied on food, perfumery, toiletries as well as pharmaceuticals and medical compounds such as insecticide, antibacterial, anti-fun-

gal and spasmolytic. They are grouped as medicinal, industrial and perfumery types depending on their composition. There are large area of *Eucalyptus* plantation

收稿日期: 2005-10-08

基金项目: 广西科学基金资助项目 (桂科自 0481025; 桂科青 0542015)

作者简介: 田玉红 (1969-), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向为香料化学。

参考文献:

- [1] 张兰珍, 李家实, 皮特·豪佛顿, 等. 苦豆子种子生物碱成分研究[J]. 中国中药杂志, 1997(12): 740-743.
- [2] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用(第三卷)[M]. 北京: 学苑出版社, 1998: 2694-2728.
- [3] 郑虎占. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1998: 2694-2670.
- [4] 秦学功. 用大孔吸附树脂吸附分离苦豆子生物碱[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 428-430.
- [5] 赵辉, 赵志刚. 苦豆籽中总生物碱的含量测定[J]. 化学研究与应用, 2001, 13(2): 211-212.
- [6] 陆华. 薄层扫描法测定苦参散中苦参碱含量[J]. 广西中医药学报, 1999, 16(1): 10-11.
- [7] 金莉霞, 崔燕岩, 张观得. 苦参生物碱的高效液相色谱法测定[J]. 药学学报, 1993, 28(2): 136-139.
- [8] KWON O, K LEE H S, et al. Identification of biologically active ingredient in *Sophora flavescens* against brown planthopper[J]. RDA Journal of Agricultural Science, crop Protection, 1994, 36(1): 366-369.
- [9] SWARBRICK J, BOYLAN J C. Encyclopedia of pharmaceutical technology (Vol 8) [M]. New York & Basel: Marcel Dekker, INC, 1993.
- [10] XIAO Ping, LI Jia-shi, KUBO H, et al. (-)-Hydroxymatrine, a new lupine alkaloid from the root of *Sophora tonkinensis*[J]. Chem Pharm Bull, 1996, 44(10): 1953-1953.
- [11] KNOX J H. Theoretical aspect of LC with packed and open small bore columns[J]. Chrom Sci, 1980, 18: 453-461.