

中国医药工业杂志

Chinese Journal of Pharmaceuticals

- 中国中文核心期刊
- 中国生物医学核心期刊
- 中国期刊方阵入选期刊

- 中国科技核心期刊
- 中国科学引文数据库来源期刊
- 中国药学会系列期刊

本期导读：

铂类抗肿瘤药物纳米递送系统研究进展

孙飘，丁杨，周建平

罗米地辛潜在杂质的分离与鉴定

熊磊，闵涛玲，陈昌发，胡海峰



微信号 : cjph-cjph



主 办
上海医药工业研究院
中国药学会
中国化学制药工业协会

12

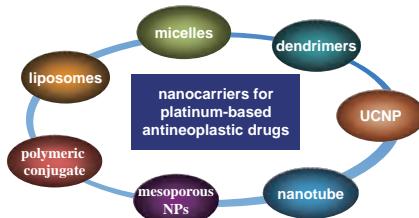
2019年12月

第50卷

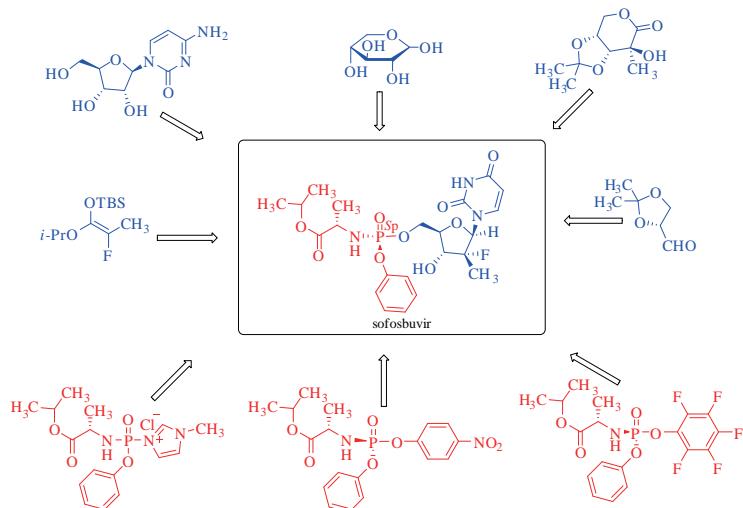
Vol.50 No.12

· 专论与综述 (Perspectives & Review) ·

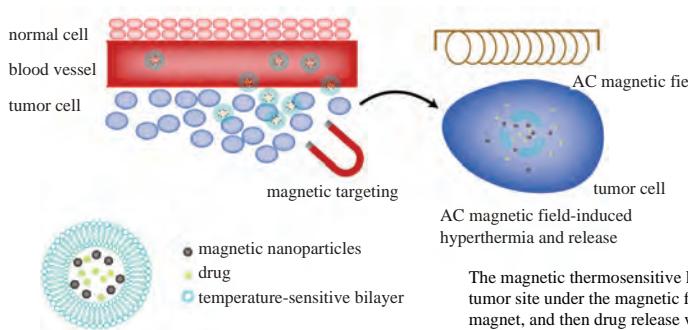
- 1383 铂类抗肿瘤药物纳米递送系统研究进展········孙 飘, 丁 杨, 周建平*
 Recent Progress in Drug Delivery Systems for Platinum Antineoplastic Agents········SUN P, DING Y, ZHOU J P*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.001



- 1393 索非布韦合成研究进展········韩美振, 秦晋晶, 谭志勇, 李振华*
 Progress in the Synthesis of Sofosbuvir········HAN M Z, QIN J J, TAN Z Y, LI Z H*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.002



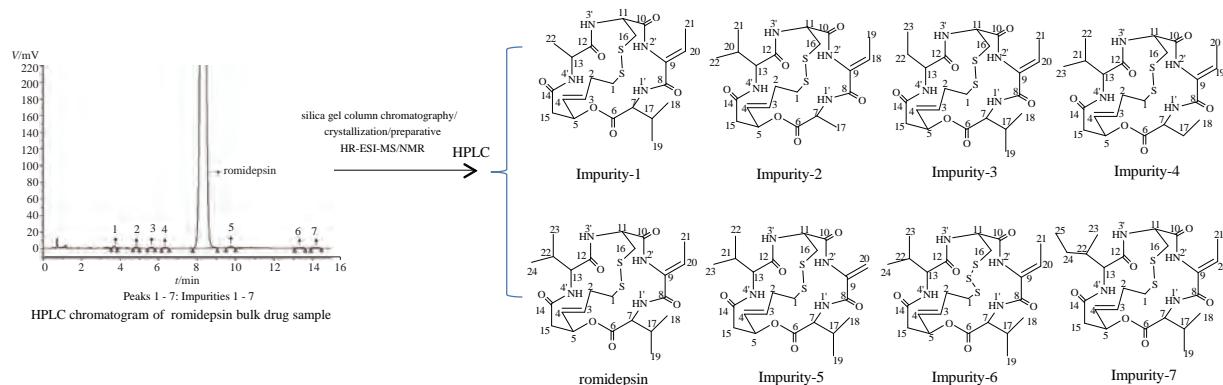
- 1405 磁靶向热敏脂质体在抗肿瘤靶向治疗中的新进展········马秋燕, 林华庆*, 张 静, 蒋 鸿, 鲁泊宏
 New Research Progress of Magnetic Thermosensitive Liposomes in Tumor Targeting Therapy········MA Q Y, LIN H Q*, ZHANG J, JIANG H, LU B H
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.003



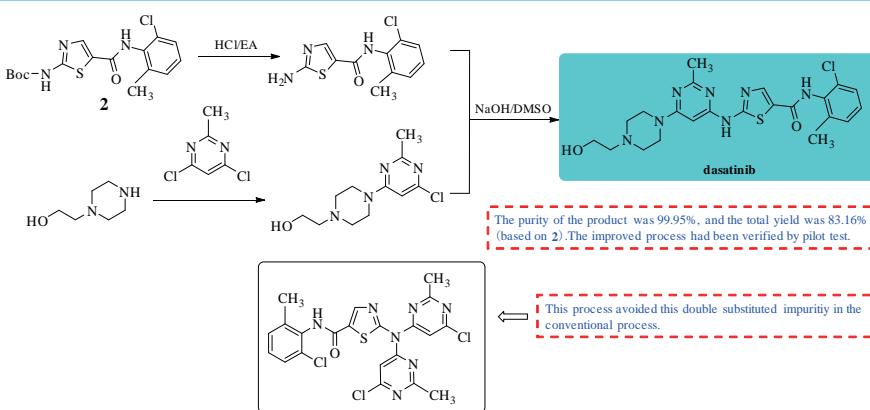
The magnetic thermosensitive liposomes can be targeted to the tumor site under the magnetic force generated by the horseshoe magnet, and then drug release will be triggered by hyperthermia upon local application of an AC magnetic field on the tumor tissue.

· 研究论文(Paper) ·

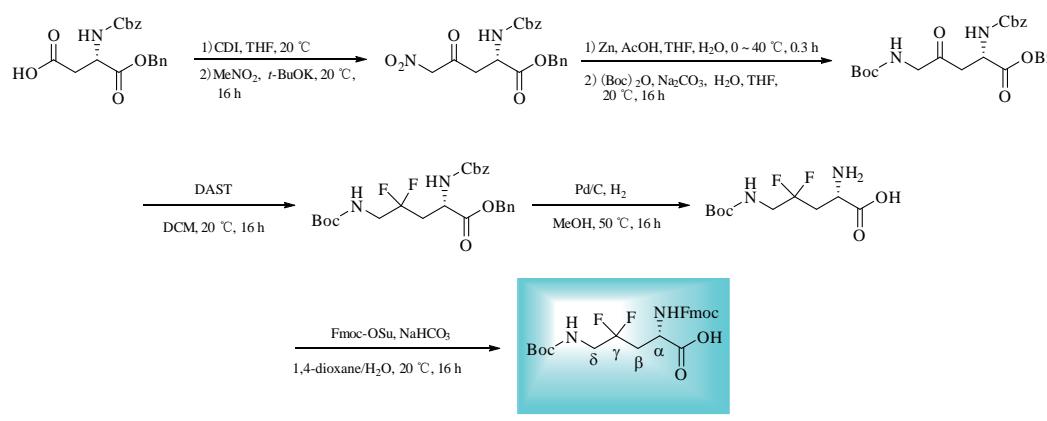
- 1413 罗米地辛潜在杂质的分离与鉴定.....熊磊, 闵涛玲, 陈昌发, 胡海峰*
 Isolation and Identification of Potential Impurities of Romidepsin.....XIONG L, MIN T L, CHEN C F, HU H F*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.004



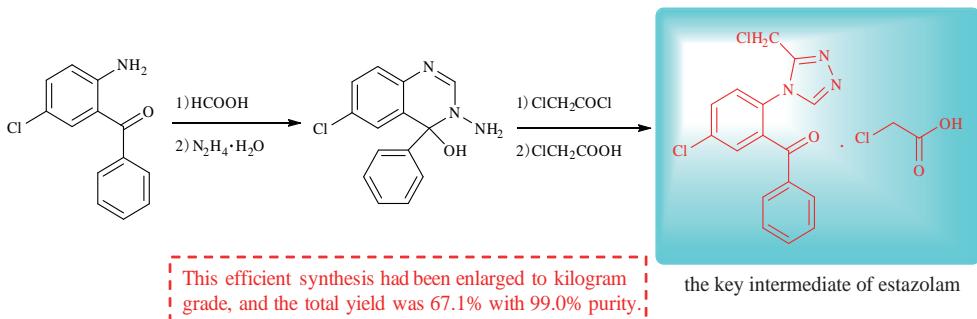
- 1423 达沙替尼的合成工艺优化.....王洪刚, 费凡, 张乃华, 潘高峰, 张贵民*
 Improved Synthetic Process of Dasatinib.....WANG H G, FEI F, ZHANG N H, PAN G F, ZHANG G M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.005



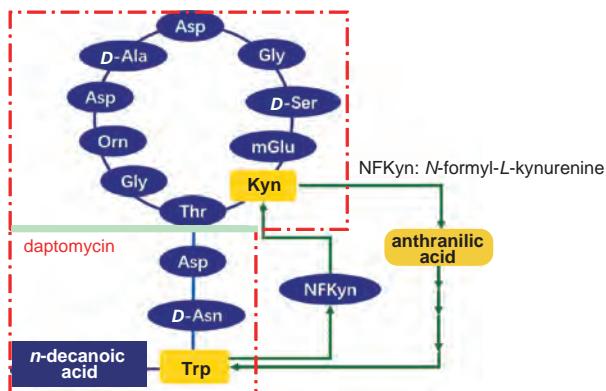
- 1427 (S)-2-[(芴甲氧羰基)氨基]-5-[(叔丁氧羰基)氨基]-4,4-二氟戊酸的合成.....王迪, 刘海侠, 傅磊*
 Synthesis of (S)-2-[(Fluorenylmethoxycarbonyl) amino]-5-[(tert-butoxycarbonyl) amino]-4,4-difluoropentanoic acid.....WANG D, LIU H X, FU L*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.006



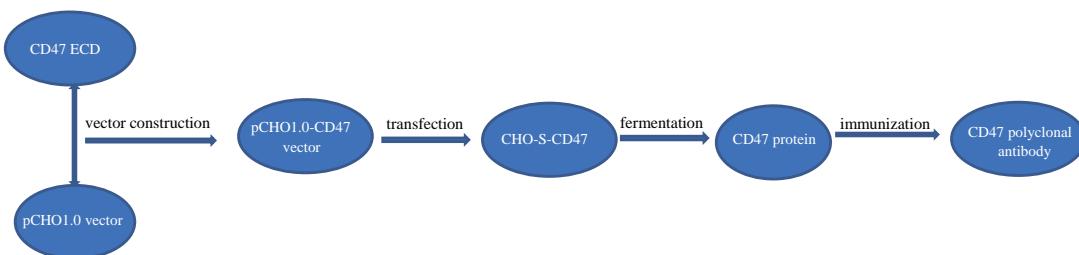
1431 5-氯-2-(3-氯甲基-1,2,4-三唑-4-基)二苯酮氯乙酸盐的合成.....范 钢, 仲 慧, 高浩凌, 卢时湧, 钱秀萍*
 Synthesis of 5-Chloro-2-(3-chloromethyl-1,2,4-triazol-4-yl)dibenzophenone Chloroacetate.....FAN G, ZHONG H, GAO H L, LU S Y, QIAN X P*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.007



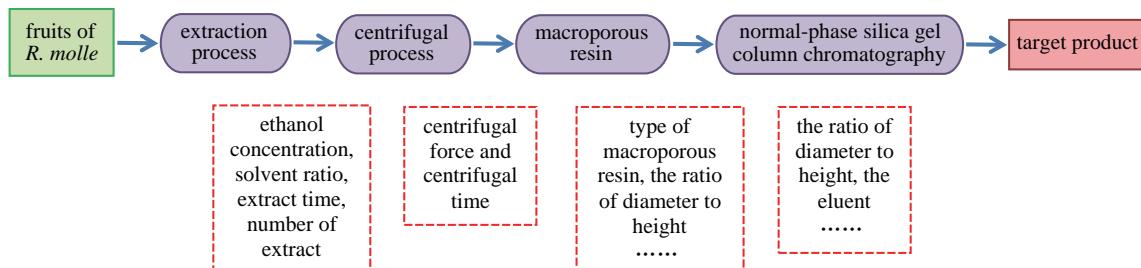
1434 邻氨基苯甲酸对达托霉素发酵的影响.....徐 鲁, 卢雪欢, 张建斌, 李继安, 林惠敏*
 Effect of Anthranilic Acid on Fermentation of Daptomycin.....XU L, LU X H, ZHANG J B, LI J A, LIN H M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.008



1439 CD47 胞外区蛋白的真核表达与多克隆抗体的制备.....朱中松, 赵丽丽, 王玲玲, 张贵民, 刘 忠*
 Eukaryotic Expression of CD47 Extracellular Domain Protein and Preparation of Polyclonal Antibody.....ZHU Z S, ZHAO L L, WANG L L, ZHANG G M, LIU Z*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.009

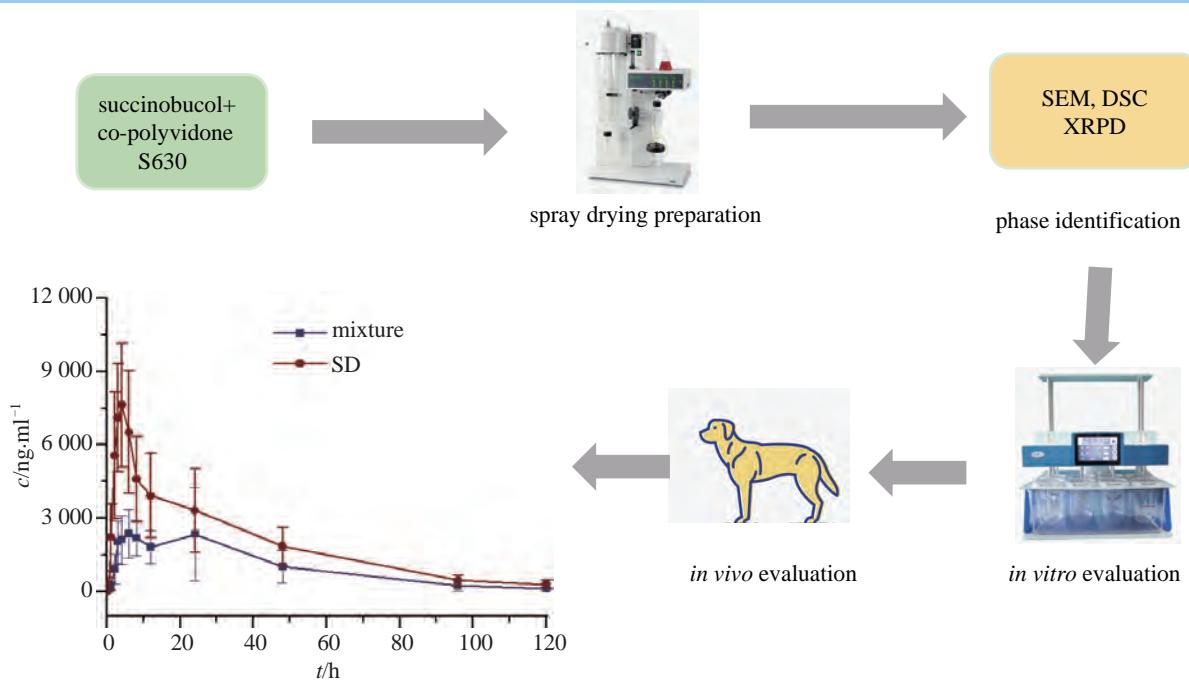


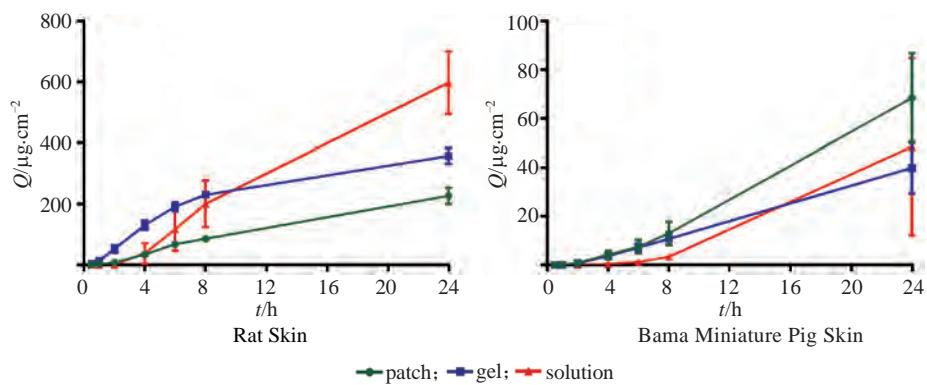
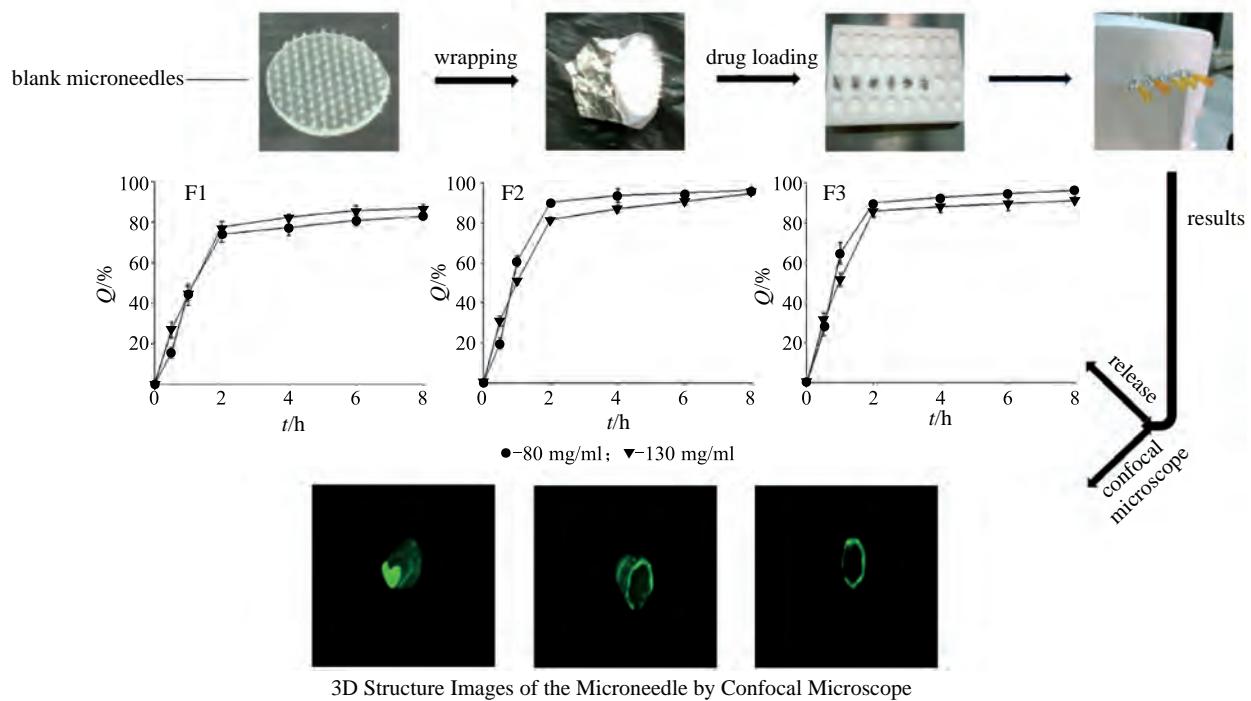
1444 大孔树脂-正相硅胶柱色谱法制备闹羊花二萜有效部位.....姚禹民, 房 鑫, 张继全, 阮克锋, 梁 爽*
 Preparation of Diterpenoid Fraction from Fruits of *Rhododendron molle* G. Don by Macroporous Resin Combined with Normal-phase Silica Gel Column Chromatography.....YAO Y M, FANG X, ZHANG J Q, RUAN K F, LIANG S*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.010

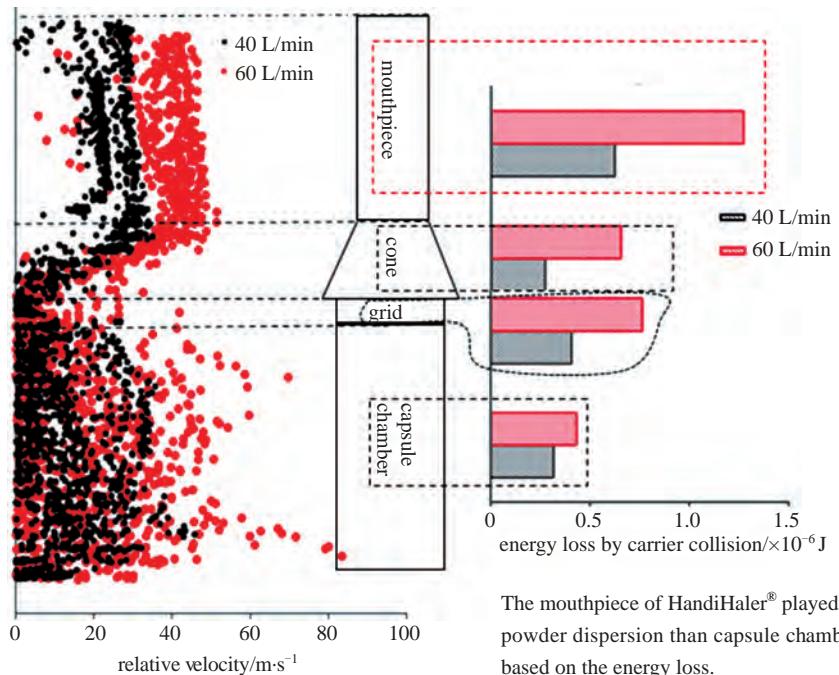


It is the first time to report the preparation process of diterpenoid fraction from fruits of *Rhododendron molle* G. Don which takes rhodojaponin III & IV as the indexes with purity no less than 50%.

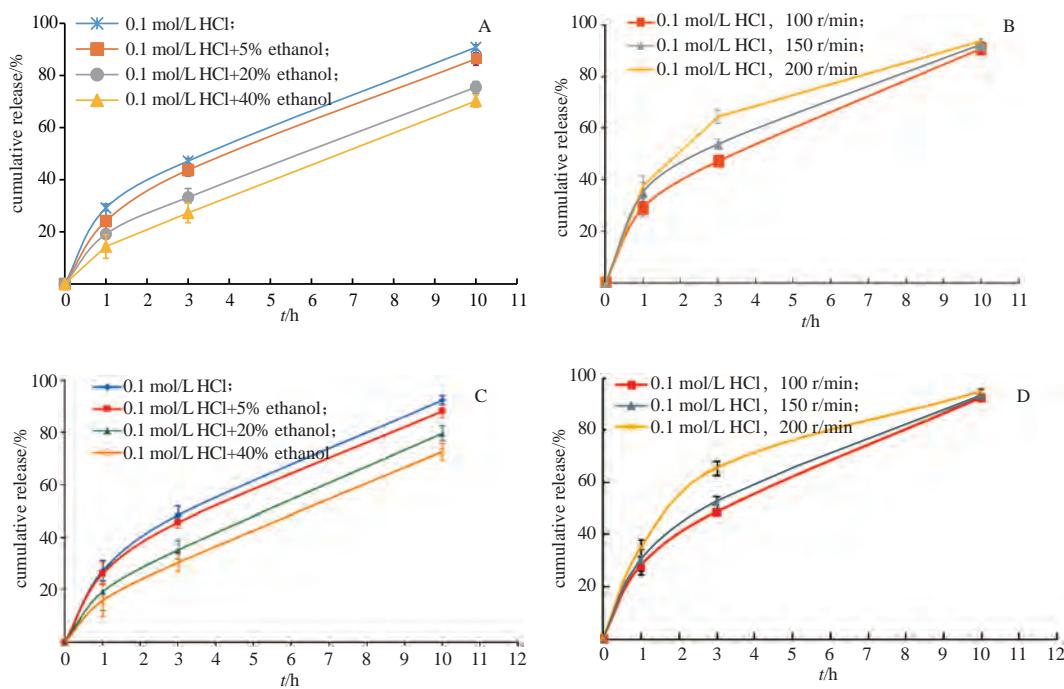
1450 琥珀布考固体分散体的制备及其Beagle犬体内药物动力学研究.....王 菁, 王 瑶, 张 磊, 张志文, 李又欣*
 Preparation of Succinobucol Solid Dispersion and Its Pharmacokinetics in Beagle Dogs.....WANG J, WANG Y, ZHANG L, ZHANG Z W, LI Y X*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.011





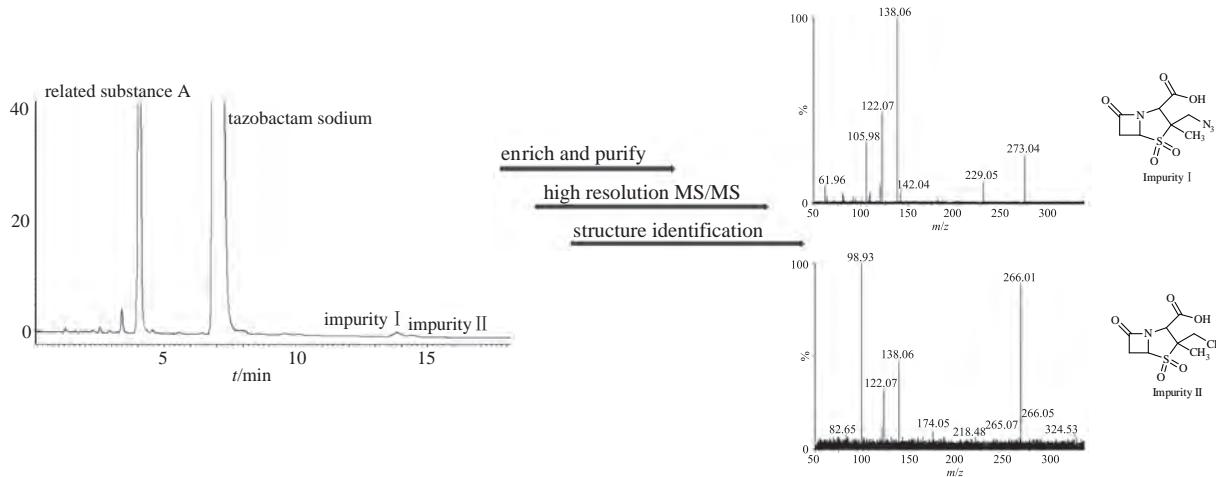


The mouthpiece of HandiHaler® played more impacts on powder dispersion than capsule chamber, cone and grid based on the energy loss.

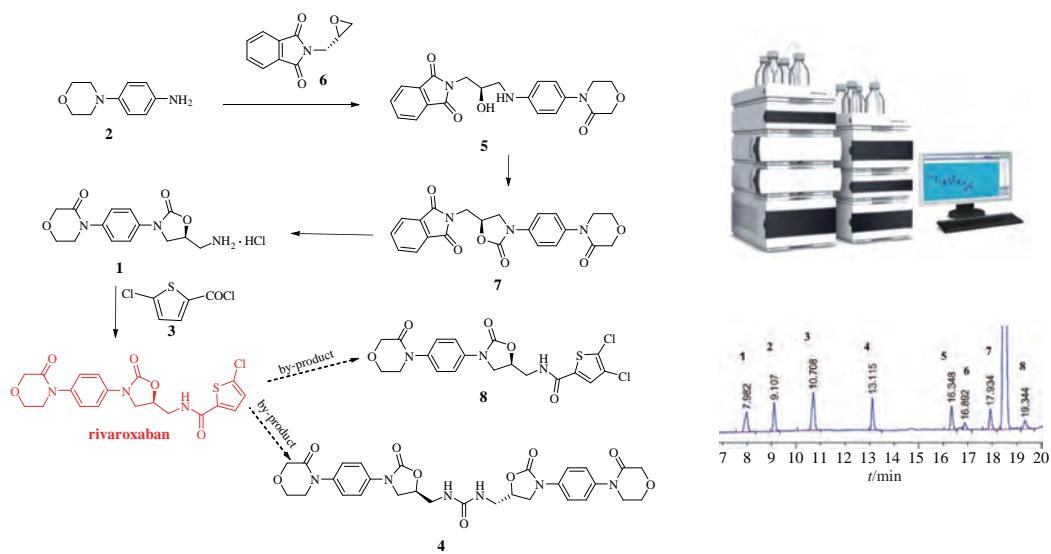


Release Profiles of Metformin Hydrochloride from the Commercial Tablets (A, B) and the Self-made Tablets (C, D)

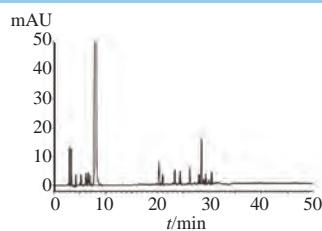
1482 他唑巴坦钠原料药中未知杂质的质谱结构研究.....陆 静, 蔡鹏俊, 李 悅*, 刘秀兰
 Structure Study of Unknown Impurities by Mass Spectrometry in Tazobactam Sodium Bulk DrugLU J, CAI P J, LI Y*, LIU X L
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.016



1487 利伐沙班有关物质的HPLC 测定.....尹秀娥, 胡小燕, 侯德粉, 张嘉月, 董 乔
 Determination of the Related Substances in Rivaroxaban by HPLC.....YIN X E, HU X Y, HOU D F, ZHANG J Y, DONG Q
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.017

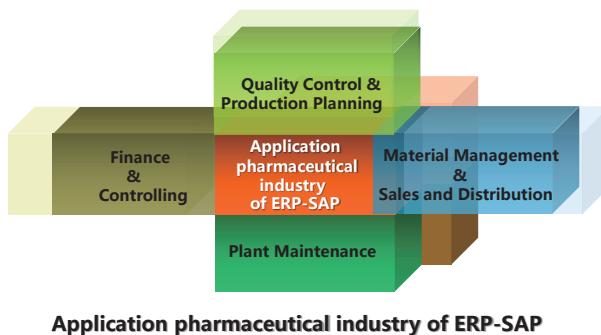


1492 阿莫西林胶囊有关物质的HPLC 法测定.....王 玮, 邓淑渊, 李翠芬, 邢 盛, 王健松
 Determination of Related Substances of Amoxicillin Capsules by HPLC.....WANG W, DENG S Y, LI C F, XING S S, WANG J S
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.018



A new HPLC method was established for simultaneous determination of amoxicillin and its 14 related substances.

- 1498 ERP+CSV在制药企业中的实施应用.....陆振宇,徐秀卉,徐蓉,沈忱*,章欢明
Implementation and Application of ERP&CSV in Pharmaceutical Manufacturers.....
.....LU Z Y, XU X H, XU R, SHEN C*, ZHANG H M
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.019



· 药学管理与信息(Pharmaceutical Management & Information) ·

- 1509 我国医药产业供给侧结构性改革的对策分析.....丁一磊
Countermeasure Analysis of Supply-side Structural Reform of Chinese Pharmaceutical Industry.....
.....DING Y L
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.020

- 1514 典型发达国家药品上市价值评估的分析及应用.....颜建周,雷璐倩,邵蓉*
Analysis and Application of Drug Market Value Assessment in Typical Developed Countries.....
.....YAN J Z, LEI L Q, SHAO R*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.021

- 1519 分析国家药品集中采购和使用试点政策对我国仿制药企业的影响.....王成
Analysis of the Impact of National Pilot Policies on Centralized Drug Procurement and Use on Generic Pharmaceutical Enterprises in China.....WANG C
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.022

- 1524 CAR-T疗法的研发现状与展望.....杜璇
Development Status and Prospects of Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T) Therapy...DU X
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.023

- 1530 2019 年前三季度我国医药工业经济运行情况分析.....郭文,钟一鸣,周斌*
Economic Operation of Chinese Pharmaceutical Industry from January to September 2019.....
.....GUO W, ZHONG Y M, ZHOU B*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.024

· 其他 ·

《中国医药工业杂志》2018 年度索引(1537)

广告索引(1426)

《中国医药工业杂志》向审稿专家致谢(1404)

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2019年第50卷 第12期 12月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.50 No.12 December 10, 2019

©All Rights Reserved

主 管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主 办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协 办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总 编 辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副 总 编 辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责 任 编 辑	王 盈, 刘玲玲	Executive Editor	WANG Ying, LIU Lingling
出 版 单 位	《中国医药工业杂志》编辑部	Editor by	Editorial Board of <i>Chinese Journal of Pharmaceuticals</i>
编 辑 部 地 址	上海市北京西路1320号(200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电 话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传 真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电 子 邮 件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网 址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广告发行联系			
电 话	021-62126987, 62473200	Tel	021-62126987, 62473200
传 真	021-62473200	Fax	021-62473200
电 子 邮 件	ouyy@pharmadl.com	E-mail	ouyy@pharmadl.com
印 刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发 行 范 围	公开发行		
国 内 发 行	上海市报刊发行局	Domestic Distributed by	Local Post Office
国 外 发 行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国 内 订 阅	全国各地邮政局		

* 通信联系人; 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*170*zh*P*20.00* *24*2019-12

2019年版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255
CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205
国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



微信号: cjph-cjph



微博: weibo.com/cjph

《中国医药工业杂志》第十六届编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF 《CHINESE JOURNAL OF PHARMACEUTICALS》

(以姓名拼音为序)

名誉主编(HONORARY EDITOR-IN-CHIEF)

桑国卫*(SANG Guowei)

主任编委(EDITOR-IN-CHIEF)

陈芬儿*(CHEN Fener)

顾问(CONSULTANT)

白 骥(BAI Hua)

蒋建东(JIANG Jiandong)

王广基*(WANG Guangji)

副主任编委(ASSOCIATE EDITOR-IN-CHIEF) (^常务副副主任编委)

陈 兵(CHEN Bing)

李明华(LI Minghua)

王 浩(^WANG Hao)

张贵民(ZHANG Guimin)

周 斌(ZHOU Bin)

编委(MEMBER OF THE EDITORIAL BOARD)

蔡正艳(CAI Zhengyan)

程卯生(CHENG Maosheng)

范代娣(FAN Daidi)

甘 勇(GAN Yong)

何 军(HE Jun)

胡又佳(HU Youjia)

李范珠(LI Fanzhu)

刘玲玲(LIU Lingling)

龙亚秋(LONG Yaqiu)

罗国强(LUO Guoqiang)

潘红娟(PAN Hongjuan)

沈 琦(SHEN Qi)

孙小强(SUN Xiaoqiang)

涂家生(TU Jiasheng)

王 健(WANG Jian)

王玉成(WANG Yucheng)

吴 勇(WU Yong)

杨苏蓓(YANG Subei)

张福利(ZHANG Fuli)

张卫东(ZHANG Weidong)

赵文杰(ZHAO Wenjie)

钟为慧(ZHONG Weihui)

朱建英(ZHU Jianying)

陈凯先*(CHEN Kaixian)

孔德云(KONG Deyun)

吴晓明(WU Xiaoming)

陈代杰(^CHEN Daijie)

林剑秋(LIN Jianqiu)

王军志*(WANG Junzhi)

张 霽(ZHANG Ji)

周伟澄(^ZHOU Weicheng)

丁 健*(DING Jian)

李绍顺(LI Shaoshun)

杨胜利*(YANG Shengli)

陈桂良(CHEN Gui liang)

潘广成(PAN Guangcheng)

魏宝康(WEI Baokang)

张万斌(ZHANG Wanbin)

朱建伟(ZHU Jianwei)

侯惠民*(HOU Huimin)

沈竞康(SHEN Jingkang)

朱宝泉(ZHU Baoquan)

胡文浩(HU Wenhao)

唐 岳(TANG Yue)

杨 超(YANG Chao)

张绪穆(ZHANG Xumu)

陈笑艳(CHEN Xiaoyan)

董 琳(DONG Lin)

傅 磊(FU Lei)

郭 文(GUO Wen)

胡海峰(HU Haifeng)

金 拓(JIN Duo)

刘东飞(LIU Dongfei)

柳 红(LIU Hong)

陆伟跃(LU Weiyue)

马 璞(MA Jing)

邵 蓉(SHAO Rong)

孙会敏(SUN Huimin)

陶 涛(TAO Tao)

王建新(WANG Jianxin)

王 彦(WANG Yan)

吴 伟(WU Wei)

杨 明(YANG Ming)

尤启冬(YOU Qidong)

张庆文(ZHANG Qingwen)

赵临襄(ZHAO Linxiang)

钟大放(ZHONG Dafang)

周一萌(ZHOU Yimeng)

*院士

《中国医药工业杂志》编辑部成员(EDITORIAL STAFF)

总编辑(Managing Editor): 周伟澄(ZHOU Weicheng)

副总编辑(Associate Managing Editor): 黄志红(HUANG Zhihong), 刘玲玲(LIU Lingling)

责任编辑(Editor): 刘玲玲(LIU Lingling)(兼), 王 盈(WANG Ying), 许文倩(XU Wenqian)

美术编辑(Art Editor): 沈建成(SHEN Jiancheng), 陆燕玲(LU Yanling), 钱苗苗(QIAN Miaomiao)

编辑助理(Editorial Assistant): 韦旭华(WEI Xuhua)

广告、发行负责(Avertisement Manager): 刘敬岩(LIU Jingyan), 金 雷(JIN Lei), 欧阳怡(OUYANG Yi)

大孔树脂-正相硅胶柱色谱法制备闹羊花二萜有效部位

姚禹民¹, 房 鑫¹, 张继全¹, 阮克锋^{1,2}, 梁 爽^{1*}

(1. 上海中医药大学创新中药研究院中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203;

2. 上海张江中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203)

摘要:首次建立了从羊踯躅果实中提取闹羊花二萜有效部位的工艺路线。以闹羊花毒素III和闹羊花毒素VI的总含量和转移率为指标,采用HPLC-ELSD法测定其含量,用正交试验对提取工艺中乙醇浓度、溶剂量、提取时间、提取次数进行考察,确定的最优制备工艺路线为:羊踯躅果实粗粉加8倍体积的70%乙醇,回流提取2 h,提取3次。提取液合并后经浓缩离心,取上清液上样于LSA-12S大孔树脂柱,每1 L大孔树脂上样体积为2 L上清液,上样流速2 BV/h,洗脱流速4 BV/h,径高比1:7,依次用5 BV去离子水、7 BV 30%乙醇洗脱,收集含闹羊花毒素III、VI的组分,浓缩干燥。将浸膏和正相硅胶按质量比1:2拌样,上正相硅胶柱,硅胶用量30:1,径高比1:10,依次用二氯甲烷:甲醇为20:1和10:1的洗脱液(各12 BV)洗脱,收集含闹羊花毒素III、VI的组分,浓缩干燥至恒重,即得闹羊花毒素III、VI总含量≥50%的闹羊花二萜有效部位。本制备工艺设备要求简单,高效、经济、环保,样品处理量大,便于工业化生产。

关键词:闹羊花二萜有效部位;含量测定;提取工艺;大孔树脂;正相硅胶柱色谱

中图分类号: TQ460 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2019)12-1444-06

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.010

Preparation of Diterpenoid Fraction from Fruits of *Rhododendron molle* G. Don by Macroporous Resin Combined with Normal-phase Silica Gel Column Chromatography

YAO Yumin¹, FANG Xin¹, ZHANG Jiquan¹, RUAN Kefeng^{1,2}, LIANG Shuang^{1*}

(1. Engineering Research Center of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203;

2. Modern Preparation Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiang High-Technology Park, Shanghai 201203)

ABSTRACT: The extraction process of diterpenoid fraction from fruits of *Rhododendron molle* G. Don was first reported in this paper. The concentrations of rhodojaponin III (Rj-III) and rhodojaponin VI (Rj-VI) in the extract were determined by HPLC-ELSD. The influence factors on extraction efficiency, namely ethanol concentration, ratio of solvent to material, extraction time and numbers, were optimized by orthogonal design with the total contents and transfer rates of Rj-III and Rj-VI as the indexes. The optimal process parameters were as follows: the crude material of *R. molle* was mixed with 70% ethanol (8 times volume to the mass of crude drug), then extracted for 3 times under reflux condition, 2 h per time. The extract liquor was concentrated and centrifuged, followed by separation and purification by macroporous resin combined with normal-phase silica gel column chromatography. The supernatant was added to the LSA-12S macroporous resin column with the ratio of diameter to height of 1:7 at a flow rate of 2 BV/h, and then was eluted by 5 BV of purified water for removing impurities, 7 BV of 30% ethanol at a flow rate of 4 BV/h for enriching Rj-III and Rj-VI. The obtained eluent was concentrated and stirred with normal-phase silica gel at a weight ratio of 1:2, the mixture was packed in a column with the ratio of diameter to height of 1:10 at a weight ratio of 1:30. Afterwards, 12 BV of dichloromethane: methanol (20:1) and 12 BV of dichloromethane: methanol (10:1) were used as eluent to prepare the final diterpenoid fraction with total contents of Rj-III and Rj-VI no less than 50%. This process requires simple equipment and low production cost, and its high efficiency, large sample handling capacity and environmental friendliness make it has the prospect of industrial production.

Key Words: diterpenoid fraction from fruits of *Rhododendron molle* G. Don; content determination; extraction process; macroporous resin; normal-phase silica gel column chromatography

羊踯躅 *Rhododendron molle* G. Don 为杜鹃花科植物, 是我国传统中药, 始载于《神农本草经》, 其花、果实、根均可入药^[1], 具有祛风燥湿、散瘀止痛、定喘、止泻等功效, 主治风寒痹痛、历节肿痛、跌打损伤、喘咳、泻痢、痈疽肿痛, 在治疗类风湿关节炎方面的应用历史悠久^[2], 现代临幊上仍然是治疗类风湿关节炎的常用中药之一^[3]。羊踯躅临幊疗效确切、应用广泛, 但因其毒性较大, 药材没有科学的质量标准, 临幊使用受到极大限制。本课题组前期研究已证实, 以闹羊花素III (rhodojaponin III, 1)、VI (rhodojaponin VI, 2) 为代表的二萜类成分是羊踯躅治疗类风湿关节炎的主要药效成分及毒性成分。因此本试验利用现代色谱技术, 以 1、2 为指标性成分, 对工艺各参数进行系统考察, 从羊踯躅中获得成分明确、质量可控、含量 50% 以上的闹羊花二萜有效部位 (diterpenoid fraction from fruits of *Rhododendron molle* G. Don, 3)。预试验结果表明, 果实中二萜类成分含量是根、花的 10 倍左右, 结合分析方法、制备工艺、转移率等因素综合考虑, 从羊踯躅果实中制备 3 的效率更优。因此本研究选择羊踯躅果实为药用部位。

1 仪器与试药

1200 型高效液相色谱仪 (含自动进样器、四元泵及检测器, 美国 Agilent 公司); 3300 型蒸发光散射仪 (美国 Alltech 公司); DXTQ2-100 小型提取浓缩机组 (南京仁宝制药设备有限公司)。

羊踯躅果实 (购于安徽亳州药材市场, 产地湖南邵阳, 由第二军医大学生药教研室黄宝康教授鉴定为杜鹃花科植物羊踯躅 *Rhododendron molle* G. Don 的干燥果实); 1 和 2 (自制, 由 HPLC-ELSD 峰面积归一化法测得其纯度均

大于 98%); AB-8 大孔树脂 (上海源叶生物科技有限公司, 粒径范围 0.3~1.2 mm); D101 大孔树脂 (天津海光化工有限公司, 粒径范围 0.3~1.2 mm); LSA-12S 大孔树脂 (西安蓝晓生物科技有限公司, 粒径范围 0.3~1.2 mm); 正相硅胶 (100~200 目, 烟台江友硅胶开发有限公司); 乙腈 (色谱纯), 甲酸 (分析纯), 95% 乙醇、二氯甲烷、甲醇 (合成级) 均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

混合对照品溶液: 分别精密称取 1、2 5.0 和 35.0 mg, 用适量 50% 甲醇超声 20 min, 转移至同一 10 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇定容, 摆匀, 得含 1 0.5 mg/ml 和 2 3.5 mg/ml 的对照品溶液。

供试品溶液: 称取羊踯躅果实粗粉 100 g 置圆底烧瓶中, 加 70% 乙醇 800 ml, 回流提取 2 h, 提取 3 次, 提取液合并后过 300 目筛, 旋干至恒重。精密称取羊踯躅果实提取物 700 mg 置烧杯中, 用适量 50% 甲醇超声 20 min, 转移至 10 ml 量瓶中, 用 50% 甲醇定容, 摆匀, 得 70 mg/ml 的羊踯躅果实提取物溶液, 即供试品溶液。

2.2 方法学考察^[4-5]

2.2.1 色谱条件

色谱柱 Welch Materials C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 乙腈 (A): 0.3% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0—5 min, 1% A; 5—80 min, 5% A); 流速 1.0 ml/min, 柱温 30 °C, 进样量 50 μl。选择蒸发光散射检测器, 漂移管温度 55 °C, 气体流量 1.6 L/min, 增益值 2。

2.2.2 专属性

分别精密吸取混合对照品溶液 20 μl 和供试品溶液 50 μl, 按上述色谱条件测定, 结果见图 1, 其中溶剂峰对样品测定不干扰, 对照品和供试品溶液色谱峰的峰形良好, 1 和 2 的色谱峰与其他成分色谱峰有明显的基线分离, 同时 1 和 2 在本色谱条件下的响应值相差较大。

2.2.3 线性关系和灵敏度考察

精密吸取混合对照品溶液 10、15、20、25、30、35、40 和 45 μl, 按“2.2.1”项下条件检测,

收稿日期: 2019-06-12

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目 (14401901400)

作者简介: 姚禹民 (1993—), 男, 硕士研究生, 专业方向: 中药药效物质基础。

Tel: 18221730761

E-mail: yaoyumin1993@163.com

通信联系人: 梁爽 (1973—), 男, 副研究员, 从事中药药效物质基础的研究。

Tel: 021-51323094

E-mail: ls7312@163.com

记录色谱图, 以进样量的对数 (X) 为横坐标, 峰面积的对数 (A) 为纵坐标, 进行线性回归, 得 **1** 的回归方程 $A_1=1.7314 X+1.7586$, $r^2=0.9984$, 进样量在 $5.0 \sim 22.5 \mu\text{g}$ 内线性关系良好; **2** 的回归方程 $A_2=1.4006 X+2.1570$, $r^2=0.9991$, 进样量在 $35.0 \sim 157.5 \mu\text{g}$ 内线性关系良好。

2.2.4 精密度考察

精密量取对照品溶液 $20 \mu\text{l}$, 连续进样 6 次, 计算得 **1** 和 **2** 峰面积的 RSD 为 1.60% 、 1.75% , 表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性考察

精密量取供试品溶液 $20 \mu\text{l}$, 分别于 0 、 2 、 4 、 8 、 12 和 24 h 进样, 计算得 **1** 和 **2** 峰面积的 RSD 为 0.21% 、 0.58% , 表明样品在 24 h 内稳定。

2.2.6 重复性考察

照“**2.1**”项下供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液, 分别进样, 计算得 **1** 和 **2** 含量的 RSD 为 1.11% 和 0.96% , 表明方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率

精密称取适量已知含量的羊踯躅果实粗粉 9 份, 每 3 份 1 组, 共 3 组, 每组中 **1** 和 **2** 的加入量分别为粗粉中含量的 60% 、 100% 、 140% , 照“**2.1**”项下供试品溶液制备方法操作, 所得供试品溶液分别进样, 计算得平均加样回收率为 $95\% \sim 105\%$, RSD 均小于 3.0% , 表明该方法准确度良好。

2.3 提取工艺研究^[6]

根据预试验结果, 确定提取工艺的主要影响因素有乙醇浓度、溶剂量、提取次数和提取时间。称

取羊踯躅果实粗粉 10 g , 共 9 份, 照 $L_9(3^4)$ 正交设计试验表分别进行试验。因素水平和试验结果见表 1 (正交结果存编辑部)。极差分析表明各影响因素对 **1** 含量影响的大小顺序为: 提取次数 > 溶剂量 > 乙醇浓度 > 提取时间, 对 **2** 含量影响的大小顺序为: 溶剂量 > 乙醇浓度 > 提取次数 > 提取时间。综合考虑 **1** 和 **2** 的总含量与经济环保、生产实际情况, 最终优选 70% 乙醇、8 倍体积溶剂量、提取 3 次、提取 2 h 作为最佳提取工艺。

2.4 大孔树脂分离工艺研究^[7-8]

2.4.1 上样样品的制备

按最佳提取工艺对羊踯躅果实进行提取, 将所得提取液浓缩到原体积的 $1/4$, 静置 12 h 后离心 ($1000 \times g$) 8 min , 取上清液备用。对沉淀进行含量分析, 结果显示沉淀中不含 **1** 和 **2**。

2.4.2 大孔树脂预处理

取 3 种型号大孔树脂 (AB-8、D101 和 LSA-12S) 适量, 分别用 4 倍体积 95% 乙醇浸泡 24 h , 取 3 根相同的色谱柱, 湿法装柱, 用去离子水洗至无醇味, 备用。

2.4.3 大孔树脂型号的筛选

根据 **1** 和 **2** 为中等极性的性质, 选择非极性 (D101) 和弱极性 (AB-8、LSA-12S) 大孔树脂采用动态吸附法进行筛选。

3 根大孔树脂柱上分别加入上清液 300 ml , 依次用去离子水和 10% 、 20% 、 30% 乙醇各洗脱 5 BV, 收集含 **1** 和 **2** 的组分, 测定含量, 重复试验 3 次。结果表明, 经 LSA-12S、D101 和 AB-8

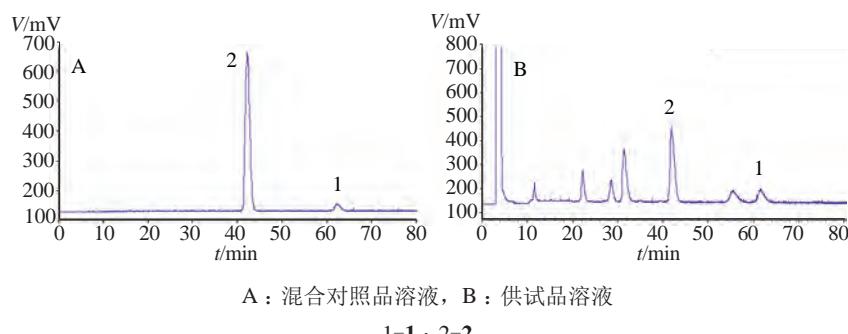


图 1 HPLC-ELSD 色谱图
Fig.1 HPLC-ELSD Chromatograms

表 1 正交设计和正交试验结果
Tab.1 Orthogonal Test Design and Grading Results

试验组	乙醇浓度/%	溶剂量/倍	提取时间/min	提取次数/次	1含量/%	2含量/%	1和2总含量/%
1	50	6	60	1	2.03	5.76	7.79
2	50	8	120	2	3.47	5.50	8.97
3	50	10	180	3	4.28	4.96	9.24
4	70	6	120	3	3.98	5.89	9.87
5	70	8	180	1	2.78	6.41	9.19
6	70	10	60	2	4.02	5.23	9.25
7	95	6	180	2	3.38	5.28	8.66
8	95	8	60	3	4.46	5.32	9.78
9	95	10	120	1	3.34	5.03	8.37

大孔树脂纯化后洗脱液中**1**和**2**总含量分别为 $(4.5\pm0.4)\%$ 、 $(3.5\pm0.5)\%$ 和 $(3.0\pm0.4)\%$ ，转移率[$(\text{组分中 } \mathbf{1} \text{ 和 } \mathbf{2} \text{ 总含量} \times \text{组分总质量}) \div (\text{上清液中 } \mathbf{1} \text{ 和 } \mathbf{2} \text{ 总含量} \times \text{上清液总质量}) \times 100\%$]分别为 $(94.0\pm2.4)\%$ 、 $(86.8\pm2.3)\%$ 和 $(56.7\pm2.5)\%$ ，所以选LSA-12S型号为试验用大孔树脂。

2.4.4 泄露考察

取预处理好的LSA-12S大孔树脂，湿法装柱，径高比1:7。按2BV/h流速上样。以洗脱液中**1**或**2**含量为纵坐标，上样药液体积为横坐标绘制泄漏曲线，见图2。结果表明，上样体积为375~450ml时**2**发生泄漏，因上样体积为泄漏体积的70%~80%最佳，所以经计算确定每1L大孔树脂上样体积为上清液2L。

2.4.5 上样流速考察

取预处理好的LSA-12S大孔树脂，湿法装柱，上样体积为300ml，以不同流速(1、2、4BV/h)上样，依次用去离子水、30%乙醇各洗脱5BV和7BV，收集含**1**和**2**组分，测定其含量。结果不同流速下所得洗脱液中**1**和**2**总含量分别为 $(5.9\pm0.4)\%$ 、 $(6.7\pm0.3)\%$ 和 $(6.2\pm0.5)\%$ (n=3)，转移率为 $(76.7\pm2.5)\%$ 、 $(84.7\pm2.9)\%$ 和 $(74.5\pm2.8)\%$ ，可知上样流速为2BV/h时含量、转移率最高，所以上样流速确定为2BV/h。

2.4.6 洗脱溶剂和用量考察

取预处理好的LSA-12S大孔树脂，湿法装柱，上样体积为300ml，上样流速为2BV/h。前期研究表明30%乙醇能将**1**和**2**完全洗脱，所以依次用去离子水、30%乙醇洗脱，洗脱流速为2BV/h。结果

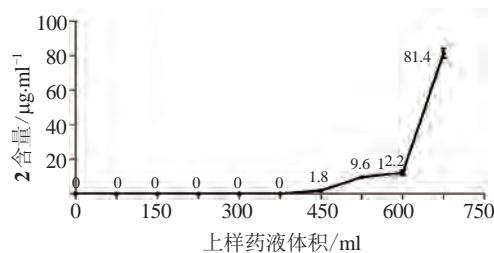


图2 LSA-12S大孔树脂柱色谱的泄漏曲线($n=3$)

Fig.2 Leakage Curve of LSA-12S Macroporous Resin Column Chromatography ($n=3$)

表明，用5BV去离子水洗脱杂质，7BV30%乙醇洗脱**1**和**2**。

2.4.7 洗脱流速考察

取预处理好的LSA-12S大孔树脂，湿法装柱，上样体积为300ml，上样流速为2BV/h，用5BV去离子水、7BV30%乙醇进行洗脱，洗脱流速分别为1、2、4BV/h，收集含**1**和**2**组分，测定其含量。结果不同流速下所得洗脱液中**1**和**2**总含量分别为 $(5.8\pm0.5)\%$ 、 $(5.3\pm0.4)\%$ 和 $(5.6\pm0.3)\%$ (n=3)，转移率为 $(90.2\pm2.7)\%$ 、 $(89.6\pm2.9)\%$ 和 $(89.1\pm2.8)\%$ ，可知洗脱流速对含量和转移率影响较小，从洗脱时间考虑，确定洗脱流速为4BV/h。

2.4.8 径高比考察

取预处理好的LSA-12S大孔树脂，湿法装柱，其径高比分别为1:7、1:10、1:15，上样体积为300ml，上样流速为2BV/h，用5BV去离子水、7BV30%乙醇进行洗脱，洗脱流速为4BV/h，收集含**1**和**2**组分，测定其含量。结果不同径高比色谱柱所得洗脱液中**1**和**2**总含量分别为 $(5.4\pm0.6)\%$ 、

(5.2 ± 0.4)% 和 (5.2 ± 0.5)% ($n=3$)，转移率分别为 (74.1 ± 3.1)%、(73.5 ± 2.9)% 和 (73.9 ± 3.0)%，可知径高比 1 : 7 时含量、转移率最高，所以径高比确定为 1 : 7。

2.5 正相硅胶柱色谱纯化工艺研究

羊踯躅果实提取液经大孔树脂纯化后，**1** 和 **2** 总含量未达到 50%，继续进行正相硅胶柱色谱纯化。预试验表明，100 ~ 200 目正相硅胶、二氯甲烷：甲醇体系可以达到纯化目的，所以对其进行工艺研究。

2.5.1 正相硅胶柱和上样样品的制备

取 100 ~ 200 目正相硅胶适量和 3 根相同的色谱柱，湿法装柱。将按上述优化条件进行大孔树脂纯化所得的洗脱液浓缩，干燥至恒重，同正相硅胶按质量比 1 : 2 拌样，备用。

2.5.2 洗脱梯度和用量考察

根据预试验结果，二氯甲烷：甲醇为 20 : 1、10 : 1 的洗脱液可以纯化 **1** 和 **2**，故采用此 2 个梯度洗脱。将样品上正相硅胶柱，径高比为 1 : 7，硅胶用量：样品量 =30 : 1，收集含 **1** 和 **2** 组分，测定其含量。结果表明，样品经二氯甲烷：甲醇为 20 : 1、10 : 1 的洗脱液各 12 BV 洗脱，可得 **3**，其中 **1** 和 **2** 总含量为 (52.0 ± 0.9)% ($n=3$)，转移率为 (68.3 ± 1.7)%。

2.5.3 径高比考察

取正相硅胶湿法装柱，使其径高比为 1 : 7、1 : 10、1 : 15，按硅胶用量：样品量为 30 : 1 上样，二氯甲烷：甲醇为 20 : 1、10 : 1 各洗脱 12 BV，收集含 **1** 和 **2** 组分，测定其含量。结果不同径高比条件下所得 **3** 中 **1** 和 **2** 总含量分别为 (52.9 ± 1.5)%、(58.3 ± 2.4)% 和 (58.3 ± 2.3)% ($n=3$)，转移率分别为 (47.8 ± 2.0)%、(65.9 ± 2.3)% 和 (61.2 ± 2.1)%，可知径高比 1 : 10 时含量、转移率最高，所以径高比确定为 1 : 10。

2.5.4 硅胶用量考察

取正相硅胶湿法装柱，按硅胶用量：样品量为 15 : 1、30 : 1、50 : 1 上样，径高比为 1 : 10，二氯甲烷：甲醇为 20 : 1、10 : 1 各洗脱 12 BV，收集含 **1** 和 **2** 组分，测定其含量。结

果不同硅胶用量条件下所得 **3** 中 **1** 和 **2** 总含量分别为 (47.5 ± 2.2)%、(58.3 ± 2.6)% 和 (59.5 ± 2.7)% ($n=3$)，转移率分别为 (51.9 ± 3.2)%、(65.9 ± 3.0)% 和 (65.6 ± 2.9)%，可知后 2 种条件下含量、转移率相差不大，考虑硅胶与试剂用量，确定 30 : 1 为最优硅胶用量。

2.6 验证试验

综上所述，**3** 最佳制备工艺为：羊踯躅果实粗粉加 8 倍体积的 70% 乙醇，回流提取 2 h，提取 3 次，提取液合并后浓缩到原体积的 1/4，静置 12 h 后离心 ($1000\times g$) 8 min，取上清液上大孔树脂柱，径高比 1 : 7，每 1 L 大孔树脂上样体积为上清液 2 L，上样流速 2 BV/h，依次用 5 BV 去离子水、7 BV 30% 乙醇洗脱，洗脱流速 4 BV/h，收集含 **1** 和 **2** 的洗脱液，旋干至恒重，同正相硅胶按质量比 1 : 2 拌样，上正相硅胶柱，径高比 1 : 10，硅胶与样品用量比 30 : 1，依次用二氯甲烷：甲醇为 20 : 1、10 : 1 的洗脱液各 12 BV 洗脱，收集含 **1** 和 **2** 的洗脱液，浓缩至恒重，得 **3**。所得制品 **3** 的 HPLC-ELSD 色谱图见图 3。

按最佳工艺进行 3 批 (2 kg) 验证试验和 1 批 (12 kg) 放大试验。结果所得 **3** 中 **1** 和 **2** 总含量为 (55.2 ± 2.4)% ($n=3$) 和 56.3%，回收率为 (56.6 ± 2.7)% 和 57.2%，表明本工艺稳定，重复性较好。

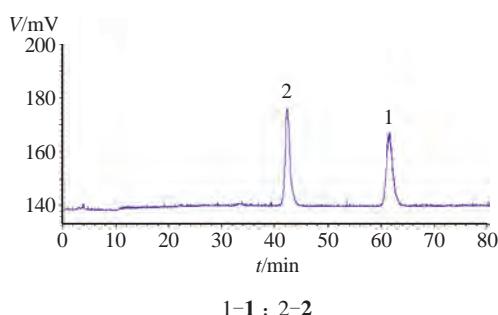


图 3 **3** 的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig.3 HPLC-ELSD Chromatogram of **3**

3 讨论

本试验首次建立了从羊踯躅果实中制备 **3** 的工艺，**1** 和 **2** 总含量大于 50%。本制备工艺采用提取、

离心、大孔树脂、正相硅胶柱色谱的分离纯化方法，高效经济、环保简便，有较好的工业化前景；所获得的**3**成分明确、含量稳定、质量可控，为后续成药性研究提供了物质基础，并为羊踯躅的临床应用和新药开发提供了参考依据。

致谢：上海中医药大学预算内项目（2016YSN24）、上海中医药大学杏林青年学者项目给予资助。

参考文献：

- [1] 马强, 房鑫, 李俊, 等. 羊踯躅的化学成分研究[J]. 中草药, 2018, **49**(5): 1013-1018.
- [2] 吴仪洛. 本草从新[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 90.
- [3] ZHOU J J, LIU J J, DANG T, et al. Mollebenzylanols A and B, highly modified and functionalized diterpenoids with a 9-benzyl-8,10-dioxatricyclo[5.2.1.0^{1,5}]decane core from *Rhododendron molle* [J]. *Organic Lett*, 2018, **20**(7): 2063-2066.
- [4] 张枝润, 周成, 娄志华, 等. HPLC-ELSD法测定闹羊花中Rhodojaponin-III和Rhodojaponin-IV含量[J]. 天然产物研究与开发, 2013, **25**(9): 1234-1236.
- [5] 张小红, 董磊迟, 李会军, 等. 高效液相色谱蒸发光散射检测法测定闹羊花中闹羊花毒素Ⅱ的含量[J]. 中国新药杂志, 2013, **22**(5): 602-604.
- [6] 窦志华, 曹瑞, 卞理, 等. 正交试验法优选大黄中蒽醌类成分提取工艺[J]. 中草药, 2018, **49**(14): 3279-3286.
- [7] 胡锦祥, 吴瑾瑾, 王群星, 等. 大孔吸附树脂纯化延胡索总生物碱工艺研究[J]. 中草药, 2018, **49**(18): 4302-4310.
- [8] 沈燚, 马利, 张巧艳, 等. 女贞子环烯醚萜总苷纯化工艺的优化[J]. 中成药, 2018, **40**(6): 1403-1406.