

# 大孔吸附树脂对喜树果中喜树碱和喜果苷的分离纯化研究

王瑞芳<sup>1</sup>, 欧来良<sup>2</sup>, 孔德领<sup>2</sup>, 史作清<sup>1</sup>

(1. 南开大学 高分子化学研究所, 天津 300071; 2. 南开大学 生物活性教育部重点实验室  
分子生物学研究所, 天津 300071)

**摘要:**目的 研究不同大孔吸附树脂对喜树碱和喜果苷吸附性能, 筛选出对喜树碱和喜果苷具有较高选择性的树脂。方法 考察了 ME-1、ME-2、ME-3 树脂对喜树碱和喜果苷静态和动态吸附性能, 并采用 HPLC 法定量分析喜树碱和喜果苷。结果 随着比表面积的升高, 树脂对喜树碱和喜果苷吸附容量逐渐增高, ME-3 较 ME-1 增加了约 40%。以 50% 乙醇为洗脱溶剂时, 提取物中喜树碱和喜果苷含量分别达到 15.08% 和 67.16%。结论 具有较高比表面积的弱极性吸附树脂 ME-3 对喜树碱和喜果苷具有较高的吸附选择性, 是一种较为理想的喜树碱和喜果苷分离介质。

**关键词:**喜树; 喜树碱; 喜果苷; 大孔吸附树脂

**中图分类号:** R284.2; R286.02

**文献标识码:** B

**文章编号:** 0253-2670(2005)06-0849-03

## Isolation and purification of camptothecine and vincoside-lactam from *Camptotheca acuminata* fruit by macroporous adsorption resins

WANG Rui-fang<sup>1</sup>, OU Lai-liang<sup>2</sup>, KONG De-ling<sup>2</sup>, SHI Zuo-qing<sup>1</sup>

(1. Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Institute of Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Key words:** *Camptotheca acuminata* Decne.; camptothecine; vincoside-lactam; macroporous adsorption resins

喜树中至今已分离出 20 多种化学成分, 其中以喜树碱和喜果苷(长春苷内酰胺, vincoside-lactam)含量较高。药理研究表明, 喜树碱类化合物和喜果苷均具有抗癌活性<sup>[1~3]</sup>。目前提取分离喜树果中的有效成分的方法主要是溶剂萃取法和氧化铝柱色谱法, 过程复杂, 收率很低<sup>[4,5]</sup>。本实验采用大孔吸附树脂法对喜树果中的喜树碱和喜果苷进行分离纯化, 使提取工艺大大简化, 收率显著提高。

### 1 仪器与材料

Waters 484 高效液相色谱仪, HL-2 恒流泵(上海沪西仪器厂), BSZ-2 自动部分收集器(上海沪西仪器厂), THZ88-1 台式多用恒温振荡器(江苏太仓鹿河生化仪器厂), 真空干燥箱(天津实验仪器厂), DT-100A 型分析天平(北京光学仪器厂)。

ME-1、ME-2、ME-3 大孔吸附树脂由天津欧瑞生物科技公司提供; 喜树果购自河北安国药材公司, 产地广西, 经鉴定符合《广西中药材标准》1990 年版“喜树果”项下规定。喜树碱对照品 [(+)-camptothecine, 质量分数为 98%, ACROS organics], 喜果苷对照品(自制, HPLC 紫外检测为

单一组分。经高分辨正离子二次离子质谱、核磁共振谱鉴定, 质量分数 99% 以上); 乙腈(色谱纯)。

### 2 方法与结果

2.1 树脂的预处理: ME-1、ME-2、ME-3 湿法装柱, 用工业乙醇洗至加水不浑浊, 然后用蒸馏水洗至无醇, 备用。

2.2 喜树碱和喜果苷的 HPLC 测定

2.2.1 色谱条件: Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水-乙腈(70:30); 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 256 nm; 温度: 室温。

2.2.2 标准曲线的绘制: 精确称取喜树碱和喜果苷对照品各约 100 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇-氯仿(1:1)至刻度。精密吸取 5、2、1、0.5、0.1 mL 溶液分别置于 10 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 混均, 取 20 μL 进行高效液相色谱测定。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得标准曲线方程。喜树碱:  $Y=5.3314X-0.14170$ ,  $r=0.99942$ ; 喜果苷:  $Y=1.08172X-2.24386$ ,  $r=0.99975$ 。

2.3 喜树果中喜树碱和喜果苷的测定: 精密称量 2.0 g 喜树果粉, 用 80% 乙醇在 100 mL 微型索氏提

收稿日期: 2004-08-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29974015)

作者简介: 欧来良(1972—), 男, 博士。Tel: (022) 23506660 E-mail: ouy11001@eyou.com

取器中回流提取 8 h,取提取液,测定喜树碱和喜果苷。结果喜树碱和喜果苷的质量分数分别为 0.085 4%和 0.313 9%。喜果苷的量远比喜树碱高,约是喜树碱的 3.7 倍。

2.4 供试品溶液的制备:称取 100 g 喜树果粉,分别 7.5 倍量 80%乙醇回流提取两次,每次 3 h,滤过,合并滤液,回收乙醇,加水稀释至 1 000 mL,即得。

2.5 静态吸附试验:将 0.200 g 湿树脂直接加入 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 25 mL 供试品溶液,将具塞锥形瓶放在 298 K 恒温振荡器上振荡一定时间,转速 120 r/min,吸附平衡后,取上清液测定喜树碱和喜果苷的质量浓度。按下式计算平衡吸附量  $q_e$  (mg/g)。结果见表 1。

$$q_e = V(C_0 - C_e) / m$$

式中  $V$  是供试品溶液的体积(L), $m$  是湿树脂的质量(g), $C_0$  是溶液中喜树碱和喜果苷的起始质量浓度(mg/L)

表 1 静态吸附结果

Table 1 Results of static adsorption

型号	表面性质	比表面积/ ( $m^2 \cdot g^{-1}$ )	吸附量/( $mg \cdot g^{-1}$ )		吸附率/%	
			喜树碱	喜果苷	喜树碱	喜果苷
ME-1	中性	350~400	9.95	21.28	63.08	45.52
ME-2	非极性	500~550	9.47	27.87	50.76	50.39
ME-3	弱极性	900~1 000	12.65	36.16	85.98	82.88

可以看出,随着比表面积的升高,树脂对喜树碱和喜果苷的吸附总量增加。这是因为,3种树脂均为弱极性或非极性树脂,主要以范德华力进行吸附,所以比表面积成为了影响吸附的关键因素。而对喜树碱的吸附,ME-1、ME-3 的吸附量均高于 ME-2,这无法用比表面积的影响进行解释。这主要因为 ME-1、ME-3 树脂在后交联过程中有羰基生成(红外光谱也证实了羰基的存在),其表面的极性基团与喜树碱分子之间增加了附加的静电亲和力,因而对喜树碱的吸附量有所增加。综合吸附量和吸附率来考虑,ME-3 是一种较为理想的喜树碱和喜果苷分离介质。

2.6 动态吸附和洗脱试验:7 mL ME-3 湿球装入内径 0.9 cm 交换柱。样品液以约 2 BV/h 上柱,进样量为 15 BV,吸附结果后先用 2 BV 的水洗柱,再用 50%乙醇溶液 1 BV/h 进行洗脱,流出液分部收集,同时对流份进行 HPLC 检测,结果见图 1、2。

可以看出,ME-3 对喜树碱和喜果苷均具有良好的吸附性能,但洗脱性能却有着明显的差异,在以 50%乙醇作为洗脱溶剂的情况下,前 15 个床体积喜果苷已经基本完全洗脱,而喜树碱才刚刚泄漏,如果通过合适的溶剂选择,甚至可以使两种成分完全分开,达到色谱分离的效果。

2.7 提取物的质量分数:对 ME-3 树脂纯化、动态吸附洗脱产物进行 HPLC 分析,喜树碱和喜果苷的质量分数分别达到 15.80%和 67.16%。HPLC 图谱见图 3。

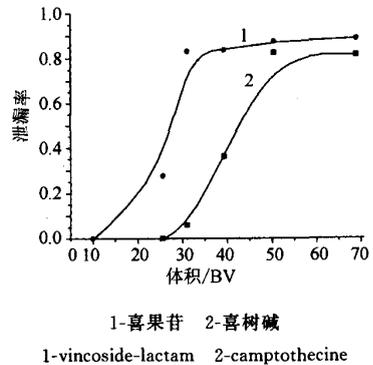


图 1 喜树果提取物在 ME-3 上的动态吸附曲线  
Fig. 1 Dynamic adsorption curve on ME-3 resin of *C. acuminata* fruit extract

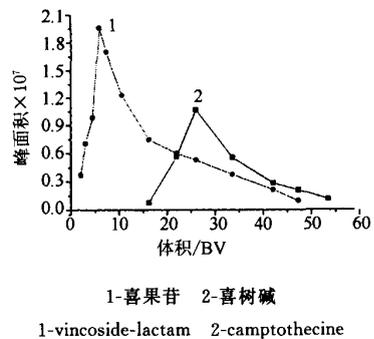


图 2 喜树果提取物在 ME-3 上的动态洗脱曲线  
Fig. 2 Dynamic desorption curve on ME-3 resin of *C. acuminata* fruit extract

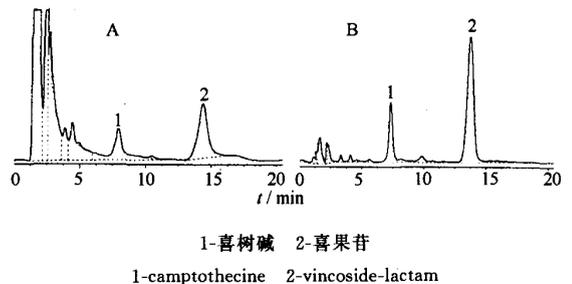


图 3 喜树果提取物(A)及其 ME-3 树脂处理产物(B)的 HPLC 图谱  
Fig. 3 HPLC chromatograms of *C. acuminata* fruit extract (A) and its products purified by ME-3 resin (B)

### 3 讨论

吸附容量、吸附选择性、洗脱性能是衡量一种树脂吸附性能的主要指标,本实验对具有不同极性和比表面积的几种树脂吸附性能进行了考察,发现比

表面积是决定树脂对喜树碱和喜果苷吸附容量的关键因素,极性基团(羰基)的引入,则有助于提高树脂对喜树碱和喜果苷的吸附选择性,这是因为具有较强接受质子能力的羰基和喜树碱分子上的胺基基团形成了具有较高专一性氢键的缘故。通过对 ME-1、ME-2、ME-3 树脂吸附性能的比较研究,发现具有高比表面积的弱极性吸附树脂 ME-3 对喜树碱和喜果苷具有更高的吸附选择性,并具有一定的色谱分离效果,是一种较为理想的喜树碱和喜果苷分离介质。

References:

[1] Wall M E, Waoi M C, Cock C E, *et al.* Plant antitumor agents: I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Am Chem Soc*, 1966, 88 (16): 3888-3890.

[2] Moertel C G, Schutt A J, Rettemeier R J, *et al.* Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with CPT (NSC-100880): Correlation with preclinical studies [J]. *Cancer Chemother Rep*, 1972, 56: 59-62.

[3] Li Y, Tang Q, Dong L, *et al.* Progress in research of structure modification and structure-activity of camptothecin and its analogues [J]. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2003, 6 (15): 744-749.

[4] Wang Y, Yu T, Zhang Y H, *et al.* New process of extraction of camptothecin from leaves of *Camptotheca acuminata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 10 (32): 882-884.

[5] Zhang Z X, Zhang S X, Song G B, *et al.* Study on extraction of camptothecin from leaves of *Camptotheca acuminata* [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2003, 5 (13): 24-25.

## HPLC 法测定养血清脑颗粒中马兜铃酸 A

高 钧<sup>1</sup>, 孙玉侠<sup>1</sup>, 李 伟<sup>1</sup>, 李德坤<sup>1</sup>, 魏 峰<sup>1</sup>, 赵洪芝<sup>2</sup>

(1. 天津天士力集团有限公司, 天津 300402; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072)

**摘要:**目的 检测养血清脑颗粒中是否含有肾毒性成分马兜铃酸 A。方法 建立高效液相色谱法, 采用 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-1% 冰醋酸水溶液 (53 : 47) 为流动相, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 317 nm, 测定 20 批养血清脑颗粒。结果 回收率为 97.7%, 标准曲线为  $Y = 2.05 X + 0.205$ , 在 5.2~68 ng 线性关系良好; 20 批养血清脑颗粒中均未检测到马兜铃酸 A。结论 养血清脑颗粒中不含有肾毒性成分马兜铃酸 A, 是一种安全的中药。

**关键词:**养血清脑颗粒; 马兜铃酸 A; 高效液相色谱

**中图分类号:** R286.02

**文献标识码:** B

**文章编号:** 0253-2670(2005)06-0851-02

### Determination of aristolochic acid A in Yangxue Qingnao Granula by HPLC

GAO Jun<sup>1</sup>, SUN Yu-xia<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, LI De-kun<sup>1</sup>, WEI Feng<sup>1</sup>, ZHAO Hong-zhi<sup>2</sup>

(1. Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering of Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Key words:** Yangxue Qingnao Granula; aristolochic acid A; HPLC

养血清脑颗粒由当归、川芎、熟地黄、白芍、钩藤、鸡血藤、夏枯草、决明子、珍珠母、延胡索和细辛 11 味中药组成, 用于治疗血虚肝亢所致的头痛、眩晕眼花、心烦易怒、失眠多梦等症。其处方中细辛占处方量的 1.35%。细辛为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.、汉城细辛 *A. sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai 或华细辛 *A. sieboldii* Miq. 的干燥全草<sup>[1]</sup>。细辛中含有微量的肾

毒性成分马兜铃酸 A<sup>[2]</sup>。由于细辛在处方中的比重小, 且制剂提取过程中以水为溶剂, 而马兜铃酸 A 不易溶于水, 因此, 研究养血清脑颗粒中是否含马兜铃酸 A。本实验建立了 HPLC 法检测养血清脑颗粒中的马兜铃酸 A, 以保证养血清脑颗粒的安全性。

#### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配置四元泵、二极阵列检测器、自动进样器、在线真空脱气机、柱温箱、配置 HP Chemstation 色谱工作站; Hitachi

收稿日期: 2004-08-09

作者简介: 高 钧 (1969—), 男, 辽宁沈阳人, 高级工程师, 博士, 1991 年获西北大学药用植物学专业学士学位, 2004 年获沈阳药科大学药物分析专业博士学位, 研究方向: 中药质量标准、指纹图谱研究, 生物等效性研究, 药动学研究, 农药残留研究。  
Tel: (022) 26736533 E-mail: gaojun1969@hotmail.com