

结果样品杂质峰对喜树碱峰有干扰,经改用甲醇-水(55:45),流速为0.8 mL/min后,样品的分离效果较好。经对3批样品(000809 011008 011012)进行试验,喜树碱峰与相邻杂质峰的分离度分别为1.9, 1.8和2.4,均大于1.5,且峰形对称尖锐。说明甲醇-水(55:45)作为流动相适用于该药喜树碱的测定。以2.2.1项下色谱条件对3批样品(批号同上)进行测定,结果理论塔板数按喜树碱峰计算,分别为3 242, 3 227, 4 100。考虑到用不同品牌和规格的色谱柱测定可能有偏差,故暂定理论塔板数按喜树碱峰计算应不低于2 000。

## References

- [1] Xu J S, Zhao T Y, Lin L Z *et al.* Chemical constituents of the anticancer plant *Camptotheca acuminata* Decne. II. Chemical constituents of the fruits of *Camptotheca acuminata* Decne. [J]. *Acta Chem Sin* (化学学报), 1997, 35(3-4): 193-199.
- [2] Information Center of Chinese Herbal Medicine, State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Constituents in Phytomedicine* (植物药有效成分手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.
- [3] *Guangxi Standard of Drug* (广西药品标准) [S]. 1984.
- [4] Zhang L, Yang Y. Determination of camptothecine in the fruit of *Camptotheca* Decne. by RP-HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(4): 234-235.

# 大孔树脂富集三裂叶蟛蜞菊倍半萜内酯 A和 B的研究

黄雪松<sup>1</sup>, 黄荣春<sup>2\*</sup>

(1. 暨南大学理学院 食品科学与工程系, 广东 广州 510632; 2. 香港中文大学 生物系, 香港 沙田)

**摘要:**目的 大量富集三裂叶蟛蜞菊倍半萜内酯 A, B(WTA, WTB) 方法 采用气相色谱法测定 WTA和 WTB,并以 WTA和 WTB的含量、洗脱率、精制度为考察指标,研究 D<sub>101</sub>大孔树脂吸附 WTA和 WTB的工艺条件及参数。结果 通过大孔树脂吸附后,WTA和 WTB的洗脱率达90%,50%乙醇洗脱部分中 WTA和 WTB的含量为总固物的4.01%~4.09%。结论 可以采用大孔树脂富集 WTA和 WTB  
**关键词:**三裂叶蟛蜞菊;三裂叶蟛蜞菊倍半萜内酯 A, B;大孔吸附树脂;气相色谱  
中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)08-0701-04

## Studies on enriched yield of wedeliatrilolactone A and B in *Wedelia trilobata* by macroporous resin

HUANG Xue-song<sup>1</sup>, VINCENT E. C. Ooi<sup>2</sup>

(1. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;  
2. Department of Biology, Chinese University of Hong Kong, Shatin, China)

**Abstract** **Object** To enrich the yield of wedeliatrilolactone A and B (WTA and WTB) from *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. **Methods** WTA and WTB were determined by gas chromatography and their eluting ratio and purities were analysed by determining their contents in different fractions eluted from D<sub>101</sub> macroporous resin. **Results** The eluting ratio of WTA and WTB was increased up to 90% and their contents were 4.01%~4.09% in 50% alcohol fraction. **Conclusion** WTA and WTB can be separated by D<sub>101</sub> macroporous resin.

**Key words** *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.; wedeliatrilolactone A and B (WTA and WTB); macroporous resin; GC

三裂叶蟛蜞菊为菊科植物三裂叶蟛蜞菊 *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.的干燥地上部分,在香港、深圳、广州等地广泛用作花园、路边、池塘等地的观赏植物。除叶子三裂外,其根、茎、花等植物学特

征与我国民间常用的蟛蜞菊 *W. chinensis* (Osb.) Merr.类似。因此,当地常将其视为蟛蜞菊使用。文献报道三裂叶蟛蜞菊中含有倍半萜内酯<sup>[1,2]</sup>。倍半萜内酯类物质具有抗肿瘤、细胞毒、刺激组织胺释放、

\* 收稿日期: 2002-09-29

作者简介: 黄雪松(1957-),男,山东汶上人,教授,博士,曾两次赴香港中文大学生物系研修,主要从事食品化学、食品功能因子及食品加工工艺方面的研究。

Tel (020) 85226630-6635 E-mail xshuang@sdau.edu.cn

抑制植物生长和抑制脱发等多种生物活性。三裂叶蟛蜞菊倍半萜内酯的提取、分离、富集、纯化等鲜有报道。作者通过硅胶柱色谱等方法获得了 5 个倍半萜内酯的晶体,其中的两个单晶结构完整,利用 X 衍射技术分析证实为 C<sub>5</sub>差向异构三裂叶蟛蜞菊倍半萜内酯 A、B(WTA 与 WTB)(图 1),并证实其具有较好的体内、体外抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>。但为了满足更大范围研究的需要,有必要探索大量提取蟛蜞菊倍半萜内酯的工艺。本实验旨在利用 D<sub>101</sub>型大孔树脂研究富集、纯化 WTA 与 WTB 的工艺条件与参数,为其大量提取及建立工业化生产的质量控制体系提供必要的依据。

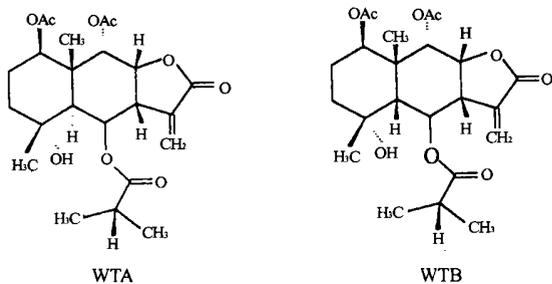


图 1 WTA 与 WTB 的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of WTA and WTB

## 1 仪器、材料和试剂

HP6890 气相色谱仪, Bi CHI Rotavapor R-200 旋转蒸发仪, Beckman J2-MI 离心机。

所用药材经香港中文大学胡秀英教授鉴定,系菊科植物蟛蜞菊属三裂叶蟛蜞菊 *W. trilobata* 的全草或花。D<sub>101</sub>型大孔吸附树脂(天津制药厂),其他试剂均为 AR 级。

倍半萜内酯对照品系作者在香港中文大学生物系天然产物及其药理实验室研究期间经分离纯化而精制的 WTA 与 WTB(纯度分别为 93% 与 93%),并经香港中文大学化学系采用 X 衍射技术鉴定。

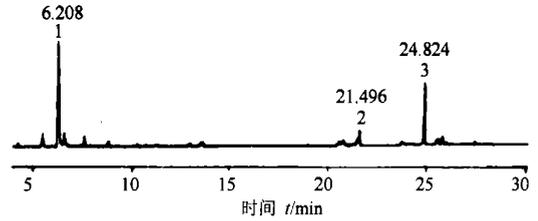
## 2 方法与结果

### 2.1 WTA 与 WTB 的 GC 测定

2.1.1 溶液制备: 利用 WTA 与 WTB 对照品对照定性,以 1 mg/mL 阿魏酸为内标。吸取 60 μL 内标液,加入到 180 μL 样品液中,混匀后自动进样测定。

2.1.2 气相色谱条件: HP-5 毛细管柱 (32 mm × 0.32 mm, 0.25 μm), 柱温: 初温 60 °C, 以 25 °C / min 升至 215 °C 并保温 10 min 后,再以 30 °C / min 升温至 270 °C 并保温 15 min,共记录 30 min。然后冲洗 10 min 后,再进行下一次自动进样。进样量: 2 μL, 载气: 氦气, 流速: 2 mL/min, 氢焰检测器, 进样

器和检测器温度均为 250 °C。色谱数据处理采用 GC Chemstation Rev. A. 06. 03 [509] integrator WTA WTB 和阿魏酸的保留时间分别为 24. 8, 21. 5, 6. 2 min。结果见图 1。



1-内标物阿魏酸 2-WTB 3-WTA

1-ferulic acid internal standard 2-WTB 3-WTA

图 2 WTA 和 WTB 的 GC 图谱

Fig. 2 GC chromatograms of WTA and WTB

2.2 原料中 WTA 与 WTB 的含量: 称取 1.000 g 冻干、粉碎的三裂叶蟛蜞菊全草或干燥花的粉(60 目,由香港中文大学校园采取,含水量为 83% ~ 87%),以 70% 乙醇回流提取 1 h,提取液于冰箱中放置 24 h 后,过滤、浓缩,并用甲醇定容至 50 mL (0.02 g 干生药 / mL)。按照上述 GC 条件测定 WTA 和 WTB 的含量,结果见表 1。

表 1 原料中 WTA 与 WTB 的含量 (n=3) μg · g<sup>-1</sup>

样品	WTA	WTB	WTA+ WTB	WTA/WTB
全草	238	156	394	1.52
花	233	171	404	1.36

由表 1 可以看出: 三裂叶蟛蜞菊全草和花中 WTA 的含量均高于 WTB 的含量,且全草中 WTA 的含量更高些。这种含量差异可能与 WTA 的结构比 WTB 的结构更稳定有关。

### 2.3 大孔树脂富集 WTA 和 WTB 条件的优选

2.3.1 上柱样品的制备: 称取一定量新鲜三裂叶蟛蜞菊,沸水煎煮两次,每次 1 h。合并水煎液,60 °C 下减压浓缩至原体积的 1/10,用 95% 工业乙醇调整乙醇浓度至 80%,在 4 °C, 12 000 r/min (22 095 g) 条件下离心 30 min,收集上清液,减压浓缩至干,称重,并用水调整到含生药 0.2 g/mL,用作大孔树脂分离上柱样品。

2.3.2 大孔吸附树脂的预处理<sup>[5]</sup>: 以甲醇湿法装柱 (20 mm × 90 mm,树脂干重 5.00 g),继用甲醇洗脱,不时检测流出的甲醇。当流出的甲醇与水混合不呈白色混浊时即可,然后用大量蒸馏水洗至无醇味。

2.3.3 不同浓度乙醇洗脱液对 WTA 和 WTB 的洗脱能力: 吸取三裂叶蟛蜞菊上柱液 10 mL 上柱,依次用蒸馏水 400 mL, 25% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙

醇各 200 mL 梯度洗脱,洗脱液流速为 1.5 mL/min 蒸馏水洗脱液先收集 100 mL 2份,再收集 500 mL 4份; 25%乙醇 50%乙醇 70%乙醇洗脱液分别收集 50 mL 4份。每份均浓缩至干,并用甲醇定容至 2.00 mL后,测定 WTA 与 WTB 的含量。以容量瓶编号和 WTA 与 WTB 总含量为坐标绘制洗脱曲线,结果见图 3



图 3 WTA 和 WTB 在 D<sub>101</sub> 大孔吸附树脂上的流出曲线  
Fig. 3 Elution curve of WTA and WTB from D<sub>101</sub> macroporous resin

由图 3 可见, WTA 与 WTB 主要集中在 25% 和 50% 乙醇洗脱液中, 占全部醇洗脱液量的 97%, 其中, 25% 乙醇洗脱部分占总洗脱量的 11.37%, 50% 乙醇洗脱部分占总洗脱量的 85.04% (表 2)。而且 50% 乙醇洗脱的解吸速度比 25% 乙醇快。综合考虑纯度、洗脱率、洗脱液等方面的影响, 确定大量提取时的洗脱条件为: 先用 10% 乙醇洗去大量的水溶性杂质和大部分强极性物质, 再用 50% 乙醇洗脱, 收集 50% 乙醇洗脱部分。

表 2 不同洗脱部分中 WTA 与 WTB 的含量比较 mg

Table 2 Comparison of WTA and WTB among different fractions mg

洗脱部分	WTA		WTB		WTA+ WTB		WTA+ WTB	
	WTA	WTB	+	WTA/ WTB	占洗脱固体质量分数 %	占洗脱量质量分数 %	占洗脱固体质量分数 %	占洗脱量质量分数 %
25% 乙醇	4.90	14.60	19.56	0.033	0.15	11.37		
50% 乙醇	61.10	47.67	108.77	1.280	4.20	85.04		
75% 乙醇	2.32	1.56	3.88	1.490	25.00	3.04		
总计	68.32	63.89	132.14	1.070				

表 2 还显示: 在 25% 乙醇洗脱液中, WTB 的洗脱量大于 WTA, 而在 50% 与 70% 乙醇洗脱液中, WTA 的洗脱量大于 WTB。这种差异显然与 WTA 和 WTB 的分子结构及其与树脂结合能力有关。其有关机制有待进一步研究。

由表 2 还可以看出: 各洗脱液中, 不仅 WTA+ WTB 的含量有差异, 而且各洗脱部分的纯度也有差异。70% 乙醇洗脱液中, WTA+ WTB 的量占总

洗脱固体物的 25%, 但产品总得率比较低, 仅为总洗脱量的 3.04%, 且乙醇用量比较高。而 50% 乙醇洗脱液中, WTA+ WTB 量占总洗脱固体物的 4.2%, 但占总洗脱量的 85%。因此, 大量提取 WTA 和 WTB, 宜选用 50% 乙醇作为洗脱液。但是, 若为获得少量的、高纯度的 WTA 和 WTB, 则宜收集 70% 乙醇洗脱部分。作者就是从该部分获得了 WTA 和 WTB 的结晶。

2.3.3 D<sub>101</sub> 大孔树脂对 WTA+ WTB 的吸附容量: 吸取三裂叶蟛蜞菊样品液 50 mL, 缓慢上柱约 1 h, 至流出液有内酯反应, 停止上柱, 并将过柱流出液重吸附 1 次, 收集每份 50 mL, 流速 1.5 mL/min, 平行 3 份。每份均浓缩至干, 并用甲醇定容至 5.00 mL, GC 测定 WTA 与 WTB 的含量, 计算树脂的吸附容量。结果 D<sub>101</sub> 大孔吸附树脂对 WTA 和 WTB 的吸附容量为 34.9 mg/g。

2.3.4 洗脱液的用量: 吸取三裂叶蟛蜞菊样品液 45 mL 3 份上柱, 分别采用 10% 乙醇 400 (条件 1), 300 (条件 2), 200 mL (条件 3), 冲洗后, 再分别用 50% 乙醇 400 mL, 依次洗脱, 分段收集, 每段 100 mL 测定 WTA 和 WTB 含量。取 50% 乙醇洗脱液 50 mL 减压浓缩至恒重, 测定固体质量, 并用甲醇定容至 5.00 mL, 测定 WTA 与 WTB 含量 (表 3)。

表 3 不同洗脱条件对 WTA+ WTB 洗脱率的影响

Table 3 Effects of elucidating condition on eluting capacity of WTA+ WTB

洗脱剂	条件 1		条件 2		条件 3	
	洗脱量 /mg	洗脱率 %	洗脱量 /mg	洗脱率 %	洗脱量 /mg	洗脱率 %
10% 乙醇	5.35	7.06	3.98	5.36	4.60	6.18
100 mL	5.02	6.80	4.01	5.40	4.33	5.82
50% 乙醇	59.02	80.39	62.30	83.86	61.30	82.90
100 mL	1.00	1.36	1.11	1.49	1.60	2.15
100 mL	0.47	0.60	0.66	0.51	0.38	0.51
总固体 /mg	1.75		1.76		1.75	
总固体中 WTA+ WTB 含量 %	4.08		4.09		4.01	

表 3 结果表明: 3 种洗脱条件所得总固体和 WTA 与 WTB 含量差异无显著性, 其内酯含量均大于 4%。洗脱条件 3 的洗脱率为 6.18%, 与洗脱条件 1 的洗脱率 7.06% 相近, 即基本除去了强极性杂质, 故可以确定洗去杂质时, 用 10% 乙醇 200 mL 达到这一目的。另外, 50% 乙醇前 200 mL 的洗脱率近 90%, 而后 200 mL 洗脱率约为 20%。因此, 从节省溶剂、降低生产成本等方面考虑, 可以只收集前 200 mL 50% 乙醇洗脱部分。如果将本实验结果放大到

生产上,可以确定解吸洗脱液,即 50%乙醇用量为 200 mL,折合每克干树脂约为 40 mL。

### 3 讨论

三裂叶蟛蜞菊所含化学成分复杂,有内酯、黄酮等。倍半萜内酯就有十多种。大都是  $\gamma$  亚甲基内酯同系物,其成环的数量及侧链的长短不同,其分离、测定也比较困难,尤其是在目前对照品难以获得情况下,分离、纯化工作的难度就更大。本实验通过 GC 行为的峰强度和保留时间定性,以阿魏酸为内标测定药材中样品的 WTA 和 WTB 含量,方法精确、可靠,唯操作较为烦琐。

大孔树脂吸附法适于从三裂叶蟛蜞菊原料中分离、富集 WTA 和 WTB。而且使用 D<sub>101</sub> 型大孔树脂具有吸附快、解吸率高、吸附容量大、洗脱率高等特点,在分离、富集 WTA 和 WTB 方面有工业应用、推广价值。但因其原料中含量低,所得产品的纯度仅稍高于 4%,更高纯度的产品还需其他的分离、纯化方法。这方面的工作有待进一步研究。

国内外许多文献报道了蟛蜞菊 *W. chinensis* 的活性成分为蟛蜞菊内酯 (wedelolactone),大、小鼠体内外实验证实其降低四氯化碳、半乳糖、毒伞素 (phalloidin) 诱导的肝损伤作用,具有抗肝毒素、抗炎等生理活性,已通过化学方法合成了该天然产物,并证实其含量随季节而变化<sup>[6-10]</sup>,作者在 GC-MS 分析中检测到该成分存在于三裂叶蟛蜞菊中,但根据活性跟踪测定,该成分很少或没有抗肿瘤活性。

### References

- [1] Farag S F, Emary N A, Niwa M. Eudesmanolides from *Wedelia prostrata* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44 (4): 661-664.
- [2] Yip N L. Antitumor activities of extracts and fractions from *Wedelia trilobata* [A]. *Dissertation of Master Degee of Chinese University of Hong Kong* (香港中文大学硕士学位论文) [D]. Hong Kong: Chinese University of Hong Kong, 2002.
- [3] Rodriguez E, Towers G H N, Mitchell J C. Biological activities of sesquiterpene lactones [J]. *Phytochemistry*, 1976, 15 (11): 1573-1580.
- [4] Ferreira D T, Levorato A R, Faria T D J. Eudesmanolide lactones from *Wedelia paludosa* [J]. *Nat Prod Lett*, 1994, 4 (1): 1-7.
- [5] Phytochemical Lab., Medical Research Institute, Chinese Scientific and Medical University. Macroreticular resin used in the extracting and separating the bioactive components in traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1980, 11(3): 138-141.
- [6] Murali B, Amit A, Anand M S, et al. Estimation of wedelolactone and demethylwedelolactone in *Eclipta alba* Hasck. by improved chromatographic [J]. *J Nat Remedies*, 2002, 2 (1): 99-101.
- [7] Kamalam M, Jegadeesan M. Estimation of bioactive principle, wedelolactone in *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr [J]. *Indian Drugs*, 1999, 36(7): 484-486.
- [8] Melo P A, Nascimento M C, Mors W B, et al. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of cro talid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents [J]. *Toxicon*, 1994, 32(5): 595-603.
- [9] Wong S M, Antus S, Gottsegen A, et al. Wedelolactone and coumestan derivatives as new antihepatotoxic and anti-phlogistic principles [J]. *Arzeimittelforsch*, 1988, 38(5): 661-665.
- [10] Wagner H, Fessler B. *In vitro* 5-lipoxygenase inhibition by *Elipta alba* extracts and the coumestan derivative wedelolactone [J]. *Planta Med*, 1986, (5): 374-377.

## 蒙成药高尤-13中多糖的研究

赵玉英,赵玉琴,朴贵金,孙占才\*

(内蒙古民族大学化学学院,内蒙古 通辽 028043)

多糖几乎存在于所有生物体中,具有能量储存、防御功能、抗肿瘤作用、免疫促进活性等多方面的生物功能,所以近年来多糖成为天然药物研究的热点<sup>[1,2]</sup>。高尤-13为丸剂(水丸),由槟榔、肉豆蔻、沉香、当归、木香、草乌(制)、筴拨、紫硃砂、葶苈子、丁香、广枣、干姜、胡椒等组成,调节“赫依”,安神止痛,用于心悸、失眠、精神失常、游走刺痛等症<sup>[3]</sup>。本实验

在研究广枣多糖组分<sup>[4]</sup>的基础上,研究了高尤-13水溶性多糖组成和含量。关于高尤-13化学组分的研究尚未见报道。

### 1 仪器及药品

HP5890气相色谱仪,721型分光光度计(上海)。高尤-13由内蒙古蒙药制药厂提供,批号为990102。木糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、岩藻糖、鼠李

\* 收稿日期: 2002-10-25

基金项目: 内蒙古自然科学基金资助课题 (ZD9924)

作者简介: 赵玉英 (1960-),女,内蒙古赤峰林东人,教授,1982年毕业于内蒙古师范大学化学系,1984年在南开大学进行研究生课程学习,1993年在东北师范大学进行课题研究。研究方向为配位化学和蒙药化学。Tel: (0475) 8313485