

冬凌草甲素的提取工艺研究

王 宁¹, 谢国祥², 史晓浩¹, 倪力军², 赵 军¹, 凌 峰^{1*}

(1. 上海雷允上药业有限公司, 上海 200001; 2. 华东理工大学化学与制药学院, 上海 200237)

摘要:目的 采用近红外光谱 (NIR) 技术对冬凌草中冬凌草甲素的提取工艺进行研究。方法 采用柱色谱法分离冬凌草甲素, 应用 NIR 技术寻找最佳工艺条件。结果 此工艺所得冬凌草甲素纯度较高, 且样品与对照品的 HPLC 峰保留时间相同, NMR 和 IR 图谱相同。结论 本法洗脱速度快, 安全、成本低、方便, 并且重现性好。

关键词: 冬凌草; 冬凌草甲素; 柱色谱法; 近红外光谱

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)10-0901-02

Study on method for extracting and separating oridonin in *Rabdosia rubescens*

WANG Ning¹, XIE Guo-xiang², SHI Xiao-hao¹, NI Li-jun², ZHAO Jun¹, LING Feng¹

(1. Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd, Shanghai 200001, China; 2. School of Chemistry and Pharmaceutical, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract **Object** To study the most suitable conditions of the extraction-separation process of the oridonin in *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara with NIR. **Methods** The oridonin was chromatographed on a silica column and found the optimum conditions with NIR. **Results** The oridonin extracted by this method had higher purity. The retention time of the sample was the same as that of the reference substance. The spectra of NMR and IR are the same. **Conclusion** This method is proved to be fast, safe, lower cost, simple and has good reproducibility.

Key words *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara; oridonin; column chromatography; NIR

冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 系唇形科香茶菜属植物, 广泛分布于黄河流域及其以南广大地区, 冬凌草中的主要成分为萜类化合物, 其中含量较高的为二萜和三萜类化合物, 二萜中的主要有效成分为冬凌草甲素和冬凌草乙素, 三萜中的主要有效成分为齐墩果酸和熊果酸。冬凌草甲素 (oridonin) 具有较强的抗肿瘤活性, 对体外培养的 Hela 细胞、人体食管癌 109 细胞及肝癌 BEL-7402 细胞有明显的细胞毒作用, 对多种移植性动物肿瘤如 ECA, S180, B88, L1210 肝癌及 AK5 有明显的抑制作用, 并且对食管上皮增生有轻度抑制作用^[1~3]。

冬凌草甲素的提取分离法目前主要有乙醚提取法、乙醇提取法及中压柱色谱法等, 但这些提取工艺得到的冬凌草甲素的含量很低。而冬凌草甲素对于肿瘤的确切疗效已经很明确, 为了适应中药制剂的需要, 纯度应该尽可能的提高, 为此本实验对冬凌草中冬凌草甲素的提取分离工艺进行研究, 以提高冬凌草甲素的纯度。

1 仪器与试剂

R201 旋转蒸发仪 (上海申科机械研究所); ZF-2 型三用紫外仪 (上海市安亭电子仪器厂); 近红外光谱仪 (AVATAR 360N, 美国尼高力公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪 (HP 公司)。

冬凌草购自河南济源, 由美国国际医疗研究所 Sophie Chen 博士鉴定。冬凌草甲素对照品 (含量 98.01%) 由美国癌症基金会提供。柱色谱用硅胶 (100~200 目, 上海五四化学试剂有限公司); 薄层色谱硅胶玻璃板 (HSGF254, 上海市科信化工公司); 其他溶剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 工艺流程: 取冬凌草叶用 95% 乙醇提取, 滤过, 滤液浓缩至膏状, 加 3 倍量水溶解, 滤过, 弃去固体, 水溶液用复合溶剂萃取。取上清液浓缩至干, 硅胶柱色谱分离, 以氯仿-丙酮洗脱, 洗脱液经浓缩得白色粉末, 用甲醇-丙酮重结晶, 得到白色针状结晶。在上述工艺流程中, 重点研究了提取和柱色谱过程。

2.1.1 提取: 在提取过程中, 采用近红外光谱仪 NIR 检测不同时间下的提取液, 结果见图 1 对图 1

* 收稿日期: 2002-12-31

基金项目: “十五”国家科技攻关计划项目 (2001BA701A04)

作者简介: 王 宁 (1951-), 男, 上海雷允上药业有限公司高级工程师, 研究方向为植物化学。Tel: (021) 64253694

中的 5 个图谱进行主成分分析 (PCA), 前两个主成分的累积贡献率为 77%, 分别以第一、第二主成分为横、纵坐标作图, 结果见图 2 由图 2 可见: 不同时间下冬凌草提取液中主成分差异很大, 这表明在不同的时间下, 物质的组成发生了极大的变化。这一变化的原因可能是: 物质溶解度的不同; 物质处于细胞位置的不同; 有效成分在药材中扩散速度的不同。本实验一律提取 6 h 后进入下一步骤。具体提取时间的变化对所提取有效成分得率与质量的影响有待进一步研究

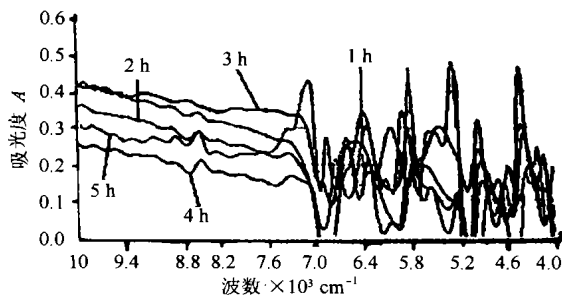


图 1 不同时间下冬凌草提取液 NIR 光谱图
Fig. 1 NIR spectra of extracting solution of *R. rubescens* at different times

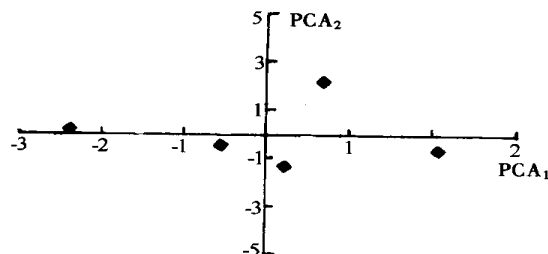


图 2 5 个不同提取时间下冬凌草提取液的 NIR 主成分分析结果

Fig. 2 PCA results of NIR of extracting solution of *R. rubescens* at five different times

2.1.2 柱色谱分离: 将工艺中进行萃取后的上清液浓缩至干的粉末 10 g 与适量硅胶拌匀, 将相当于粉末 5 倍量的硅胶装柱, 用氯仿 丙酮 (9:1)^[4] 以 5 mL/min 的流速进行洗脱, 按每份 100 mL 进行收集, 薄层色谱分析, 并与对照品对照。可见从第 6 份以后为纯的冬凌草甲素。减压浓缩, 用甲醇进行重结

晶, 减压过滤后, 用少量丙酮洗至白色, 干燥得白色结晶。

2.2 薄层色谱分析: 将冬凌草甲素对照品和供试品用甲醇溶解后, 在同一硅胶薄层板上点样, 以氯仿-甲醇 (9:1) 展开, 取出, 晾干, 在紫外灯下观察, 供试品和对照品具有相同的 R_f 值, 并呈现同样的亮黄色斑点, 在冬凌草甲素的供试品中无杂质斑。

2.3 HPLC 分析: 分得的冬凌草甲素供试品经 HPLC 面积归一化法得纯度为 99.83%。并且样品与对照品峰保留时间相同, 大致可认定为同一化合物。

2.4 核磁共振 (NMR) 和红外光谱 (IR) 分析: 冬凌草甲素供试品的 NMR 和 IR 图谱, 与文献对照, 基本相同^[5]。所以供试品可以确定为冬凌草甲素。

3 讨论

3.1 此实验在柱色谱分离过程中供试品为粉末状粗品, 节省了硅胶的用量。

3.2 减少了溶剂洗脱系统, 这里仅用一套洗脱系统, 节省了洗脱时间。

3.3 采用 NIR 技术定性判定出不同提取时间下药材中各组份溶出率不同。

3.4 HPLC, NMR, IR 测试结果表明提取最终产物为冬凌草甲素。

References

- [1] Research Team of Antitumour and Pharmacology, Medical and Scientific Institute of Henan. Research of anticancer and pharmacology of *Rabdosia rubescens* [J]. *J Henan Med Coll* (河南医学院学报), 1975, 10(2): 9.
- [2] Collaboration Team of *Rabdosia rubescens* & Research of Henan. 68 cases of clinical and medical observation of curing oesophagus cancer and cardia cancer with *Rabdosia rubescens* [J]. *J Henan Med Coll* (河南医学院学报), 1976, 11(5): 21.
- [3] Wang M Y, Zhang T M. Probing of M-period function mechanism to several tumour cells of oridonin [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 1984, 3(2): 84.
- [4] Fujita E, Fujita T, Katayama H, et al. Terpenoids Part XV. Structure and absolute configuration of oridonin isolated from *Isodon japonicus* and *Isodon trichocarpus* [J]. *J Chem Soc C*, 1970, 12, 1677.
- [5] Team of Pharmacology and Pharmaceutical Chemistry, Medical and Scientific Institute of Henan. Research of chemical and pharmaceutical theory of *Rabdosia rubescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1977, 18(10): 6-7.