

图3 POJ的IR图谱

Fig. 3 IR spectrum of POJ

因为这在果聚糖中较为常见。

References:

- [1] Zhou Y H, Xu D S, Feng Y, et al. Effects on nutrition blood flow of cardiac muscle in mice by different extracts in *Radix Ophiopogonis* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2003, 9 (1): 22-24.
- [2] Xu D S, Feng Y, Zhou Y H, et al. Active components of polysaccharide of *Ophiopogon japonicus* on acute myocardial ischemia [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26 (10): 832-837.

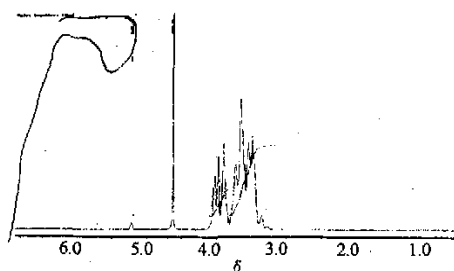


图4 POJ的¹H-NMR图谱

Fig. 4 ¹H-NMR spectrum of POJ

- [3] Huang Y, Washio Y, Hara M, et al. Simultaneous determination of dermatan sulfate and oversulfated dermatan sulfate in plasma by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization [J]. *Anal Biochem*, 1996, 240: 227-234.
- [4] Zhang W J. *Biochemical Technology of Compound Polysaccharide* (复合多糖生化技术) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987.

树脂法分离纯化喜树果中喜果苷的研究

欧来良¹, 王瑞芳², 史作清^{1*}, 仇农学²

(1. 南开大学 生物活性材料教育部重点实验室, 分子生物研究所, 天津 300071;

2. 陕西师范大学 食品系, 陕西 西安 710004)

自从1966年Wall等首次从喜树中分离出喜树碱并发现其具有显著抗癌活性后^[1], 至今已有20多种化学成分从中分离出来, 包括喜树碱(camptothecine, CPT)、10-羟基喜树碱、11-羟基喜树碱、10-甲氧基喜树碱、喜树次碱、白桦脂酸、喜果苷(vincoside-lactam VCS-LT)等^[2,3]。人工合成也取得了可喜的进展^[4]。研究发现喜树果中喜果苷明显高于喜树碱及其他类似物^[5]。目前由喜树果中分离提取喜果苷采用溶剂萃取和氧化铝柱色谱法, 过程复杂, 收率很低, 且尚处于实验室阶段。大孔树脂具有理化性质稳定、吸附选择性独特, 吸附效率高、易再生等优点。本实验采用树脂吸附分离法从喜树果中分离纯化喜果苷。

1 材料与仪器

乙腈(色谱纯), 喜树果由四川雅达药业公司提供, 产地为广西, 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(质量分数为

98%, ACROS organics); 喜果苷对照品(自制, 质量分数>98.5%); ME-1、ME-3树脂(天津欧瑞生物科技有限公司)。

Waters484 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), HL-2 恒流泵(上海沪西仪器厂), BSZ-2 型部分收集器(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)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 30% 乙腈水溶液; 体积流量: 0.8 mL/min; 紫外检测波长: 256 nm。

2.2 标准曲线的制备

2.2.1 喜果苷标准曲线的制备: 精密称取喜果苷对照品 10.2 mg, 用 50% 乙醇溶液定容于 50 mL 量瓶中。精密吸取 0.5、1.2、4、8 mL 此溶液分别置于 10

收稿日期: 2005-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29974015)

作者简介: 欧来良, 男, 讲师。Tel: (022) 23500660 E-mail: ouyll@nankai.edu.cn

* 通讯作者: 史作清

mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。按上述色谱条件进样,测定。以质量浓度对峰面积进行线性回归,结果喜果苷的标准曲线方程为 $C=1.08172 \times 10^{-5} A-2.24386$, $r=0.99975$,表明喜果苷在 $10 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 与峰面积的线性关系良好。

2.2.2 喜树碱标准曲线的制备:精密称取喜树碱对照品 12.0 mg,用甲醇-氯仿(1:1)定容于 50 mL 量瓶中。精密吸取 0.5、1、2、4、8 mL 此溶液分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。按上述色谱条件进样,测定。以质量浓度对峰面积进行线性回归,结果喜树碱的标准曲线方程为 $C=5.3314 \times 10^{-5} A-0.14172$, $r=0.99942$,表明喜树碱在 $12 \sim 240 \mu\text{g/mL}$ 内峰面积呈良好的线性关系。喜果苷和喜树碱对照品的高效液相色谱图见图 1。

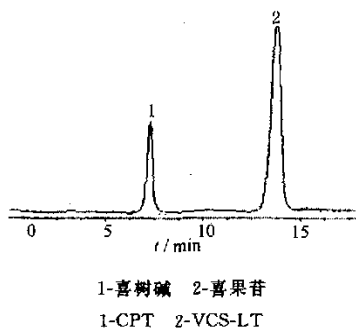


图 1 喜果苷和喜树碱对照品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of camptothecin and vincoside-lactam reference substance

2.3 喜树果粗提液的制备:100 g 喜树果粉以 50% 乙醇溶液 80°C 回流提取 3 次,提取液浓缩,冷却后滤过,得透明粗提液。HPLC 检测发现,提取液中含大量杂质,其有效成分主要有两种:喜树碱(保留时间 7 min 左右)和喜果苷(保留时间 13 min 左右),喜果苷的质量分数为 1.524%。见图 2。

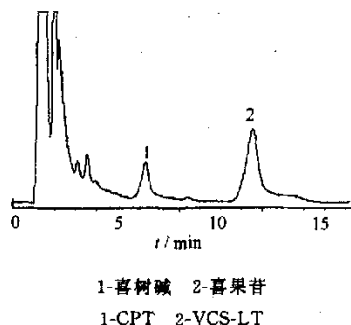


图 2 喜树果粗提液的 HPLC 谱图

Fig. 2 Chromatogram of crude extract solution

2.4 喜果苷的初步纯化:喜树果粗提液上 ME-1 树脂柱(内径为 1.5 cm,树脂为 3.5 mL)。先用 30% 乙

醇溶液洗柱以去除大量杂质,再用 50%~60% 乙醇淋洗,收集流出液。初步纯化后,大量杂质已被有效除去,有效成分保留下来,喜果苷的质量分数提高到 21.52%。见图 3。

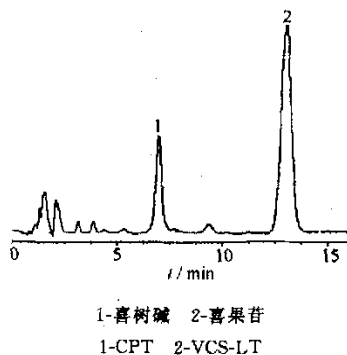


图 3 ME-1 树脂提纯液的 HPLC 谱图

Fig. 3 Chromatograms of solution refined by ME-1

2.5 喜果苷的进一步纯化:ME-1 树脂的淋洗液直接上 ME-3 树脂柱(内径 1.0 cm,树脂 25 mL)吸附。在吸附过程中,喜果苷迅速泄漏(0 BV 处),且泄漏曲线迅速趋平,喜树碱在 25 BV 处才开始泄漏,且泄漏浓度慢慢上升。见图 4。若收集 0~25 BV 的流出液,可以得到质量分数更高的喜果苷溶液,其质量分数提高至 60% 左右。见图 5。

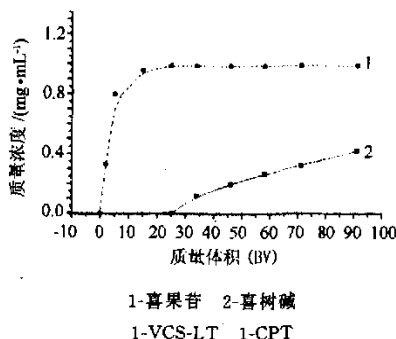


图 4 ME-3 树脂的吸附泄漏曲线

Fig. 4 Break-through curve of adsorption onto ME-3

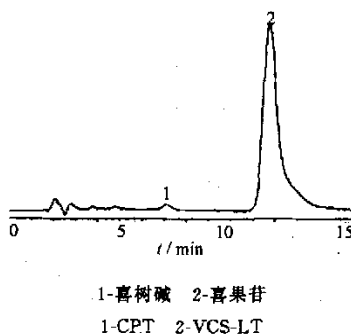


图 5 ME-3 树脂提纯液的 HPLC 谱图

Fig. 5 Chromatogram of solution refined by ME-3

2.6 喜果苷晶体的制备:喜果苷的收集液经旋蒸浓缩至析出少量固体,放置冷却析出大量针状晶体,滤过。针晶用50%乙醇溶液超声溶解,滤过,滤液旋蒸浓缩,多次重结晶后,晶体由淡黄色变为无色。最后将无色针晶晾干,50℃真空抽干至恒重。收率为0.03%,质量分数达99%。

3 讨论

ME-1树脂可有效除去喜树果提取液中的杂质,使喜果苷的质量分数由1.524%提高至21.52%,再经ME-3树脂吸附,喜树碱及其类似物也被有效去除,喜果苷的质量百分数可进一步提高到60%左右,最后经重结晶得到喜果苷晶体。此法提取工艺简单,收率较高(90%以上),利于工业化生产。

References:

- [1] Wall M E, Wani M C, Cook C E, *et al.* The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukethia and tuthor inhibitor from *Camptotheca acuminata*, [J]. *J. Am Chem Soc*, 1966, 88 (16): 3888-3889.
- [2] Lin L Z, Song C Q, Xu R S. The isolation and identification of 11-hydroxy camptothecin [J]. *Acta Chem Sin* (化学学报), 1982, 40 (1): 85-88.
- [3] Lin L Z, Zhao Z Y, Xu R S. The chemical constituents in root of *Camptotheca acuminata* [J]. *Acta Chem Sin* (化学学报), 1977, 35 (3,4): 227-230.
- [4] Feng J C, Zhang S H, Tan Y D, *et al.* The development in research on campto- theca acuminata and utilization of camptothecin [J]. *Sci Silvae Sin* (林业科学), 2000, 36 (5): 100-108.
- [5] Wang R F, Shi Z Q, Shi R F. Chromatographic separation of camptothecine and vincoside-lactam with macroporous hypercrosslinked resins [J]. *Ion Exchange Adsorp* (离子交换与吸附), 2002, 18 (5): 412-418.

高速逆流色谱分离茶叶中咖啡因和茶碱

陆向红¹, 王定海¹, 计建炳¹, 任其龙², 吴平东²

(1. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江大学材料与化学工程学院, 浙江 杭州 310027)

高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)是利用多层螺旋管行星式运动形成的特殊离心力场来实现两溶剂相在管柱里的单向性流体动力学分布状态,以使流动相在高速穿过管柱时保证固定相在管柱里达到较高的保留值,同时促进了两相间的充分混合和逆流传递。这种分离体系对不同物理性质的广泛溶剂系统具有较强的适应性,能够采用多样的体系条件和操作方式,因此逆流色谱在稀有金属、天然药物以及蛋白质的分离、纯化等很多方面有广泛的应用^[1~3]。本实验采用HSCCC对茶叶中咖啡因和茶碱实现分离,同时考察相关因素的影响。

1 仪器与材料

N型同步行星式高速逆流色谱仪,浙江大学二次资源国家专业实验室自制,色谱柱采用多层内径为2 mm的聚四氟乙烯螺旋管,色谱柱容量为270 mL,仪器的半径为10 cm, $\beta=0.5\sim1.5$,仪器的转速为0~1 500 r/min。HPUV—8452型紫外分光光度计,高压平流计量泵(杭州前进石油机械厂)。

咖啡因和茶碱均为生化级别,购自于Sigma公司;氯仿为分析纯,水由NANO pure ultrapure water system (Barmsteas USA)制备。

2 方法与结果

2.1 标准曲线制备:各称取20 mg咖啡因和茶碱对照品,分别用水溶解并转移到2个100 mL量瓶中,加水至刻度。分别稀释成10、15、20、25、30、45、50、60、80、90、100、120、160、180、200 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,在254 nm下测定吸光度。以质量浓度(C)对吸光度(A)作图,得到咖啡因和茶碱的标准曲线,通过最小二乘法关联实验数据,得到咖啡因和茶碱的标准曲线方程。咖啡因: $C=54.44 A, R^2=0.9993$ 。茶碱: $C=45.07 A, R^2=0.9990$ 。

2.2 溶剂系统的配制:将等体积的氯仿和水在分液漏斗中剧烈振荡摇匀,使两相达到平衡,静置分层,下相(氯仿相)为流动相,上相(水相)为固定相。

2.3 样品溶液的配制:准确称取咖啡因和茶碱对照品各100 mg,并用等体积的上下两相溶解,配制成50 mg/mL的混合溶液。

2.4 逆流色谱分离咖啡因和茶碱的操作:用计量泵将固定相注满螺旋管后开启直流电机,并调至某一转速,以一定流量从首端泵入流动相,在色谱柱尾端用量筒接受流出的固定相;待色谱柱尾端不再有固定相流出时,表明系统已稳定,量出流出的固定相体积,计算在此条件下的固定相保留率;进样0.7 mL,