

# 异长春花苷内酰胺大孔树脂纯化研究

孟兆青<sup>1,2,3,4</sup>, 丁岗<sup>1,2,3,4</sup>, 柳于介<sup>1,2,3,4</sup>, 徐甲<sup>1,2,3,4</sup>, 刘文君<sup>1,2,3,4</sup>, 萧伟<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. 江苏中康药物科技有限公司, 江苏 南京 210017;

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001;

4. 江苏省企业院士工作室, 江苏 连云港 222001)

**【摘要】** 目的:研究大孔树脂吸附分离纯化异长春花苷内酰胺的工艺,为异长春花苷内酰胺的工业化生产提供参考。方法:采用静态吸附-解吸方法,从10种大孔吸附树脂筛选出最佳树脂,另外采用单因素影响试验,对吸附量、水洗脱体积、乙醇洗脱浓度及体积进行了考察。结果:HPD400大孔树脂对异长春花苷内酰胺的吸附及解吸附效果最好,树脂的最佳吸附量为 $20.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,水及30%乙醇洗脱体积为6 BV,70%乙醇洗脱体积为4 BV。结论:该法简单可行,分离效果好,对大生产有一定指导作用。

**【关键词】** 胆木;异长春花苷内酰胺;大孔树脂;纯化

胆木 *Nauclea officinalis* Pierre ex Pitard 为茜草科乌檀属乔木,具有清热解毒、消肿止痛作用,可用于多种感染和炎症,以胆木为原料生产的胆木注射液、胆木浸膏片已在临床上应用多年,疗效确切<sup>[1]</sup>。现代研究表明胆木中主要有效成分为吲哚类生物碱,其中主要为异长春花苷内酰胺,含量约为生药的0.8%~2.5%<sup>[2]</sup>,国内外学者研究证明异长春花苷内酰胺具有抗菌、抗肿瘤、杀疟原虫等作用<sup>[3-5]</sup>。近年来,本研究组也发现异长春花苷内酰胺在抗炎、解热等方面具有较好的疗效,有望成为治疗上呼吸道感染的先导化合物,因此,建立异长春花苷内酰胺的纯化工艺具有十分重要的现实意义。本实验探讨了不同型号大孔树脂对分离纯化异长春花苷内酰胺的影响,另外对树脂的上样量、洗脱条件进行了研究,最终获得合理、可行的工艺路线与参数。

## 1 材料

AE 240 1/10 万型电子天平(瑞士梅特勒公司);Agilent 1100 液相色谱仪,DAD 检测器,(美国 Agilent 公司);BC-R205C 旋转蒸发器(上海贝凯生物化工设备有限公司);药材产于海南省,经鉴定为

药乌檀 *N. officinalis* 的心材;异长春花苷内酰胺对照品(自制,纯度大于98%);乙腈为色谱纯,甲醇、乙醇、磷酸等均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 异长春花苷内酰胺的测定<sup>[2]</sup>

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取异长春花苷内酰胺对照品 12.48 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含异长春花苷内酰胺 0.499 2 mg 的对照品溶液,备用。

**2.1.2 色谱条件** Lichrospher C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水-磷酸(30:70:0.1),检测波长 226 nm,流速 1 mL · min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 10 μL。色谱图见图 1。

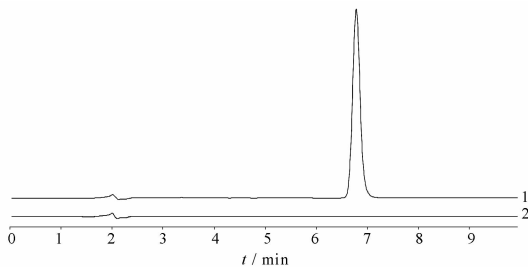


图1 异长春花苷内酰胺对照品(1)和空白溶剂(2)HPLC图

**【稿件编号】** 20110107009

**【基金项目】** 国家科技重大专项(2009ZX09103-389);江苏省科技支撑社会发展项目(BE2009618)

**【通信作者】** \*萧伟,研究员,主要研究方向中药新制剂的研究与开发,Tel:(0518)85522009, E-mail:kanionxw2010@126.com

**2.1.3 标准曲线的绘制** 精密量取异长春花苷内



酰胺对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 mL 至 6 个 10 mL 量瓶中, 分别加甲醇至刻度。精密吸取上述溶液各 10  $\mu$ L 进样, 按 2.1.2 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品进样量 ( $\mu$ g) 为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 得回归方程  $Y = 4\ 128.3X - 38.395$ ,  $r = 0.999\ 9$ ; 线性范围 0.249 6 ~ 4.992  $\mu$ g。

## 2.2 大孔吸附树脂富集异长春花苷内酰胺的工艺考察

### 2.2.1 上样液的制备

取胆木 5 kg, 粉碎, 过 1 号筛, 加 12 倍量 70% 乙醇回流提取 2 h, 滤过; 药渣再加 12 倍量 70% 乙醇溶液回流提 2 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 减压浓缩 (-0.08 MPa, 80  $^{\circ}$ C) 至每 mL 含 1 g 生药; 将浓缩液缓慢加入到 8 倍量水中, 放置过夜, 离心, 上清液即为上样液。

### 2.2.2 大孔树脂静态吸附解吸附的研究

取 2.2.1 项的上样液 10 份, 每份 150 mL, 分别加入 10 种预处理后的树脂 3 g, 室温下放置 24 h, 不时振摇, 滤过, 将滤干后的各树脂以纯水冲去表面药液, 分别加入 100 mL 70% 乙醇溶液振摇 5 h, 滤过, 得解吸液, 测定各吸附后药液与解吸液中异长春花苷内酰胺的含量, 计算静态吸附量与解吸率, 见表 1。

表 1 大孔吸附树脂静态吸附解吸附试验

树脂类型	静态吸附量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	静态解吸量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	静态解吸率 /%
HPD100	36.89	33.29	90.25
HPD400	40.56	37.46	95.36
DM130	34.81	29.83	85.70
AB-8	37.68	34.15	90.64
HPD600	30.16	24.55	81.40
HPD200A	38.21	34.86	91.23
D-101	34.56	31.33	90.65
ADS-17	32.97	28.27	85.74
ADS-7	34.53	31.03	89.86
NKA-9	29.65	25.02	84.38

注: 吸附量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  干树脂) = (样品液异长春花苷内酰胺量 - 未吸附量) / 干树脂重; 解吸量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  干树脂) = 解吸液中异长春花苷内酰胺量 / 干树脂重; 解吸率 = 解吸量 / 吸附量  $\times 100\%$ 。

结果显示, HPD400 树脂无论是静态吸附量还是解吸率在 10 种树脂中都是最高的, 因此, 确定 HPD400 作为纯化异长春花苷内酰胺的树脂。

### 2.2.3 动态吸附泄漏曲线的研究

将已预处理的 HPD400 型大孔吸附树脂抽干游离水分, 准确称取 5

g, 装入树脂柱中, 取上样液上样, 上样流速为 1.0  $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$  (BV 表示柱体积), 以 10 mL 为单位收集流出液, 分别测定流出液中异长春花苷内酰胺的含量, 绘制动态吸附曲线。结果显示, 上样 100 mL 后出现拐点, 根据上样液中异长春花苷内酰胺浓度 1.124  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  折算, 确定上样量为异长春花苷内酰胺-大孔吸附树脂 20.23  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 见表 2, 图 2。

表 2 动态吸附考察试验

No.	流出液中的异长春花苷内酰胺量/ $\text{mg}$	未吸附率 /%
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0.026	0.23
10	0.15	1.30
11	1.01	8.98
12	2.40	21.39
13	3.10	27.57
14	3.95	35.15

注: 未吸附率 =  $\frac{\text{流出液中异长春花苷内酰胺量}}{\text{吸附前上样液中异长春花苷内酰胺总量}} \times 100\%$ ; 吸附前异长春花苷内酰胺总量为 11.24  $\text{mg}$ 。

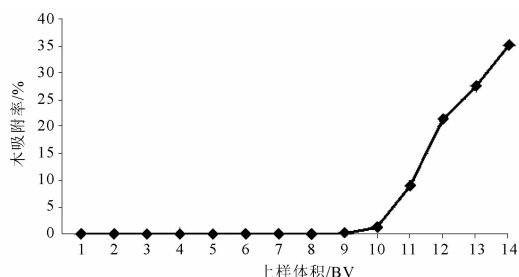


图 2 动态吸附曲线

### 2.2.4 水洗脱量的考察

取预处理过的 HPD400 大孔吸附树脂 10 g, 装柱, 取 200 mL 上样液上样, 然后用水以 2.0  $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速洗脱 8 个柱体积, 收集每一柱体积洗脱液, 测定洗脱液中异长春花苷内酰胺的含量以及洗脱液浓缩干燥后固形物的质量, 未检测到异长春花苷内酯, 见表 3。



表3 水洗脱量的考察

洗脱柱体积/BV	固形物重/g
1	1.76
2	0.44
3	0.23
4	0.13
5	0.11
6	0.09
7	0.04
8	0.02

结果显示,用8个柱体积的水洗脱除杂,异长春花苷内酰胺没有损失。根据固形物的质量看,6倍柱体积后已经达到较好的除杂效果,考虑到生产成本,因此确定水洗用量为6倍柱体积即可。

**2.2.5 除杂所用乙醇浓度的考察** 取预处理过的HPD400大孔吸附树脂,各称取10g,共3份,分别装柱,分别取200mL上样液上样,各以6倍量的水洗脱除杂,然后分别以20%,30%,40%乙醇洗脱6个柱体积,分别测定洗脱液中异长春花苷内酰胺的含量以及洗脱液浓缩干燥后固形物的重量,计算损失率,见表4。

表4 除杂所用乙醇浓度的考察

乙醇/%	异长春花苷内酰胺/mg	固形物重/g
20	0	0.1787
30	0	0.3011
40	28.01	0.3015

结果显示,30%乙醇和40%乙醇除杂的效果基本相当,但40%乙醇洗脱液已经可以将异长春花苷内酰胺洗脱下来,故不可取,而30%乙醇洗脱液中固形物的质量大于20%乙醇洗脱液中固形物的质量,故选择30%乙醇除杂。

**2.2.6 30%乙醇溶液洗脱用量的考察** 取HPD400大孔吸附树脂适量,按确定的工艺上样、水洗,用30%乙醇溶液以 $2.0\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速洗脱8个柱体积,收集每一柱体积洗脱液,测定洗脱液中异长春花苷内酰胺的含量以及洗脱液浓缩干燥后固形物的质量,未检测到异长春花苷内酰胺,见表5。

结果表明,6倍柱体积30%乙醇洗脱已经达到较好的除杂效果,且未将异长春花苷内酰胺洗脱下来,因此确定30%乙醇溶液的洗脱量为6倍柱体积。

表5 30%乙醇溶液洗脱用量的考察

洗脱体积/BV	固形物重/g
1	0.3579
2	0.4370
3	0.2298
4	0.1301
5	0.1064
6	0.0933
7	0.0257
8	0.0206

**2.2.7 异长春花苷内酰胺洗脱所用乙醇浓度的考察** 取预处理过的HPD400大孔吸附树脂10g,按照确定的工艺装柱、上样、除杂洗脱,然后分别以60%,70%,80%乙醇溶液洗脱6个柱体积,收集各浓度乙醇洗脱液,测定洗脱液中异长春花苷内酰胺的量,计算洗脱率,另外将洗脱液浓缩干燥后测定固形物中异长春花苷内酰胺的含量,见表6。

表6 乙醇洗脱浓度的考察

乙醇/%	异长春花苷内酰胺/mg	洗脱率/%	浸膏中异长春花苷内酰胺/%
60	224.31	79.20	72.16
70	262.43	95.67	75.11
80	262.77	95.79	70.09

结果显示,60%乙醇溶液的洗脱率比70%,80%乙醇低;70%乙醇溶液6BV可洗脱出95.67%异长春花苷内酰胺;80%乙醇溶液6BV可洗脱出95.79%;70%,80%乙醇溶液洗脱率基本相同,但80%乙醇洗脱液的浸膏中异长春花苷内酰胺的含量较70%乙醇洗脱液低,综合考虑,确定乙醇溶液洗脱浓度为70%。

**2.2.8 70%乙醇溶液洗脱用量的考察** 取预处理过的HPD400大孔吸附树脂,按照确定的工艺装柱、上样、除杂洗脱,然后用70%乙醇溶液洗脱6个柱体积,收集每一柱体积洗脱液,测定洗脱液中异长春花苷内酰胺的量,计算,见表7。

结果显示,70%乙醇溶液4BV洗脱后洗脱率达95.34%,继续洗脱异长春花苷内酰胺洗脱率增加很小,考虑到生产成本,确定70%乙醇溶液洗脱量为4BV。

**2.3 工艺验证试验**

称取HPD400大孔吸附树脂50g,共3份,预处



表7 70%乙醇溶液洗脱用量考察

洗脱柱 体积/BV	累积洗脱液异长春花苷 内酰胺量/mg	累积洗脱率 /%
1	16.17	5.71
2	140.40	49.58
3	223.58	78.95
4	261.50	95.34
5	261.92	95.49
6	262.46	95.68

理后,装柱。以  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速上样 1 000 mL,分别以水、30%乙醇溶液各洗脱 6 BV,洗脱流速  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ ,弃去洗脱液;以 70%乙醇溶液洗脱 4 BV,洗脱流速  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ ,收集洗脱液;减压浓缩干燥得浸膏,结果 3 批浸膏中异长春花苷内酰胺的含量分别为 75.46%、74.89%、75.15%,RSD 0.36%,表明工艺稳定可行。

### 3 讨论

近年来,大孔吸附树脂技术在中药研究中已日趋成熟,应用前景广泛,其本身具有因范德华力或氢键而产生的吸附性能,此外,其本身的多孔性结构还使其具有类分子筛的功能,所以不同成分可因其与树脂的吸附力的不同及成分相对分子质量的差异,通过大孔树脂处理得到分离<sup>[6]</sup>。

胆木中所含化学成分复杂,除含以异长春花苷

内酰胺为代表的生物碱外,还含有黄酮、有机酸等,所以异长春花苷内酰胺的富集纯化存在一定的困难。本文首先通过静态试验,比较了 10 种大孔吸附树脂对异长春花苷内酰胺的吸附和解吸性能,随后通过单因素对比试验,考察了最佳吸附量、水及乙醇洗脱的浓度及体积。验证试验结果表明,胆木醇提浓缩液水沉后,经 HPD400 树脂纯化处理,浸膏中异长春花苷内酰胺的含量和转移率均可达到较高水平,为后续精制纯化得到纯度大于 90% 的产品打下重要基础。

### [参考文献]

[1] 叶能良.胆木制剂生产工艺及质量标准简介[J].中草药通讯,1975,6(6):341.  
 [2] 李明慧,丁岗,沈鸣,等.胆木及制剂中异长春花苷内酰胺的分离鉴定和含量测定[J].中国天然药物,2006,4(2):104.  
 [3] Dai J R, Hallock Y F, Cardellina II J H, et al. 20-O-beta-glucopyranosyl camptothecin from *Mostuea brunonis*; a potential camptothecin pro-drug with improved solubility[J]. J Nat Prod, 1999, 62(10):1427.  
 [4] Abreu P, Pereira A. New indole alkaloids from *Sarcocephalus latifolius* [J]. Nat Prod Lett, 2001, 15(1):43.  
 [5] Hu X, Lv Y F, Bi K Sh. LC-MS-MS analysis of strictosamide in rat plasma, and application of the method to a pharmacokinetic study[J]. Chromatographia, 2009, 69(5):1073.  
 [6] 张雪琼,熊福良,刘莹.大孔吸附树脂纯化叶下珠总鞣质的研究[J].中成药,2010,32(1):151.

## Study on purification of strictosamide from *Nauclea officinalis* by macroporous resin

MENG Zhaoqing<sup>1,2,3,4</sup>, DING Gang<sup>1,2,3,4</sup>, LIU Yujie<sup>1,2,3,4</sup>, XU Jia<sup>1,2,3,4</sup>, LIU Wenjun<sup>1,2,3,4</sup>, XIAO Wei<sup>1,2,3,4\*</sup>  
 (1. Jiangsu Zeukov Pharmaceutical S&T Inc., Nanjing 210017, China;  
 2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;  
 3. State Key Laboratory of Pharmaceutical New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China;  
 4. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China))

[Abstract] **Objective:** To study on the purification of strictosamide from *Nauclea officinalis* by macroporous resin to provide reference for production. **Method:** The best macroporous resin was selected among 10 kinds of resins according to adsorption and desorption of the static adsorption experiments. The adsorption quantity, elution volume of water, concentration and elution volume of alcohol were determined according to the single factor experiment. **Result:** HPD400 was the best resin, and the best adsorption quantity was  $20.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , the elution volume of water and 30% alcohol was 6 BV, and the elution volume of 70% alcohol was 4 BV. **Conclusion:** This technology is simple, feasible, and it can provide reference for the industrialized production.

[Key words] *Nauclea officinalis*; strictosamide; macroporous resin; purification

doi:10.4268/cjcm20110813

[责任编辑 马超一]