

## 巴豆中巴豆苷的提取纯化及制备

李生梅<sup>1,2</sup>, 曾宝<sup>1,2</sup>, 黄孟秋<sup>1,2</sup>, 唐君苹<sup>1,2</sup>, 赖小平<sup>1,2</sup>, 林吉<sup>1,2\*</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

**[摘要]** 目的: 建立一种从巴豆中提取纯化及制备巴豆苷的方法。方法: 以巴豆苷得率为指标, 采用正交试验设计优化巴豆苷的提取工艺参数; 考察大孔树脂吸附脂纯化工艺条件; 应用制备型液相色谱分离高纯度巴豆苷。结果: 最佳巴豆苷提取工艺参数为 8 倍量 20% 乙醇提取 3 次, 每次 40 min; 大孔树脂吸附初步纯化后, 制备液相分离出巴豆苷单体, 质量分数达 98%, 可作为对照品。结论: 该方法简便易行, 可用于分离制备高纯度巴豆苷样品。

**[关键词]** 巴豆; 巴豆苷; 提取; 纯化; 大孔树脂; 制备液相

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0021-04

## Extraction Purification and Preparation of Isoguanosine from *Croton tiglium*

LI Sheng-mei<sup>1,2</sup>, ZENG Bao<sup>1,2</sup>, HUANG Meng-qiu<sup>1,2</sup>, TANG Jun-ping<sup>1,2</sup>, LAI Xiao-ping<sup>1,2</sup>, LIN Ji<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine; Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for extracting, purifying and preparing isoguanosine from *Croton tiglium*. **Method:** Orthogonal design was used to optimize extraction technology parameters with the content of isoguanosine as index; Studying purification process of isoguanosine with macroporous resin and preparing high purity isoguanosine by preparative liquid chromatography. **Result:** Optimum extraction technology of isoguanosine was extracted 3 times with 8 times the amount of 20% ethanol, 40 min each time. After preliminarily purifying by macroporous resin, isoguanosine was isolated from purified extracting solution and the purity was up to 98%. **Conclusion:** This method was simple and easy to operate, also could be used for preparation high purity isoguanosine samples.

**[Key words]** *Croton tiglium*; isoguanosine; extraction; purification; macroporous resin; preparative liquid chromatography

巴豆为大戟科植物巴豆的干燥成熟种子, 主产于西南及福建、湖北、湖南、广东、广西等地。性辛、热, 有大毒, 归胃、大肠经。内服泻下寒积、逐水消肿、祛痰利咽, 外用蚀疮, 可用于恶疮疥癣<sup>[1]</sup>。巴豆苷是一种以生物碱为苷元的核糖苷, 研究表明其具

有良好的抗肿瘤作用, 对 P338, HL-60, Sp2/O 等细胞有显著抑制作用; 在小鼠体内对 S-180 腹水和实体肿瘤细胞、Ehrlich 实体瘤细胞都具有良好的抑制作用<sup>[2]</sup>。近年来, 大量研究也表明巴豆中生物碱类成分具有显著的抗肿瘤作用, 如能诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞、人胃腺癌 SGC-7901 细胞等肿瘤细胞凋亡<sup>[3-4]</sup>。目前巴豆苷主要采用水提, 但提取率不高, 杂质多、纯度低且易变质等, 不利于进一步开展相关药理学、药效、活性机制研究。曾有报道<sup>[5]</sup>采用 DEAE 纤维素纯化后, 用 LiChroprep. RP-18 柱分离, 由于实验成本高, 实验过程条件苛刻, 只适合小样品获得。本研究采用高效液相法测定巴豆苷含量, 正交试验优选巴豆苷的提取方法; 运用大孔树脂

**[收稿日期]** 20111201(001)

**[基金项目]** 国家科技部重大新药创制专项(2009ZX09103-388)

**[第一作者]** 李生梅, 硕士研究生, 从事复方中药新药开发研究, Tel: 13631478581, E-mail: lishengmei99 @ yahoo. cn

**[通讯作者]** \* 林吉, 研究员, 研究生导师, 从事复方新药开发, Tel: 13602793023, E-mail: linji88 @ gzhtcm. edu. cn

纯化其提取物;制备液相分离出巴豆苷单体,取得良好效果。

### 1 仪器与试剂

巴豆药材购于成都五块石药材市场,经广州中医药大学赖小平研究员鉴定为巴豆 *Croton tiglium* L.。D101 型大孔树脂购于安徽三星树脂科技有限公司。对照品巴豆苷(成都普思生物科技有限公司,纯度 >98%,批号 20100420)。

Shimadzu LC-20AT 型高效液相色谱仪(SIL-20A 自动进样器,SPD-M20A 二极管阵列检测器,CTO-20A 柱温箱,Shimadzu LC Solution 色谱工作站,日本 Shimadzu 公司),Shimadzu LC-8A 型制备液相(手动进样,SPD-20A 检测器,N2000 工作站,日本 Shimadzu 公司),Shimadzu PRC-ODS 半制备柱(4.6 mm × 250 mm,7 μm),TOLEDO AB204-N 型电子分析天平(瑞士 METTLER),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

### 2 试验与结果

#### 2.1 巴豆苷的含量测定

**2.1.1 色谱条件与系统适用性试验** Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相水(A)-甲醇(B)按梯度进行洗脱:0~10 min 95% A,10~28 min 39% A,28~45 min 100% B,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 220 nm,记录时间 45 min,进样量 10 μL。理论塔板数按巴豆苷计不低于 5 000。

**2.1.2 对照品溶液的配制** 精密称取巴豆苷对照品适量,加水制成 6.04 g·L<sup>-1</sup>的巴豆苷对照品溶液。

**2.1.3 标准曲线的绘制** 精密吸取 2.1.2 项下的溶液 0.1,0.2,0.5,1.0,1.2,1.5 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加水定容至刻度,照高效液相色谱法测定。以峰面积(Y)为纵坐标,以样品进样量(A)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程  $Y = 2 \times 10^9 A + 5 \times 10^4$  ( $R^2 = 0.9999$ ),巴豆苷在 0.604~9.06 μg 呈良好线性关系。

**2.1.4 供试品溶液的制备** 取巴豆 10 g,打粉过二号筛,乙醚索氏提取去油,药渣用 8 倍量 20% 乙醇回流提取 3 次,每次 40 min,过微孔滤膜,即得供试品,进样量 10 μL。

**2.2 正交试验设计** 根据成分的性质和预试验结果,选取乙醇体积分数(A),提取次数(B),料液比(C),提取时间(D)4 个因素,每个因素选择 3 个水平,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验。因素水平见表 1。取巴豆适量,打粉过二号筛,准确称取巴豆粉末每份

30 g,共 9 份,乙醚索氏提取 3 h,取出晾干。药渣按正交表中各条件分别进行试验,正交试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 巴豆苷提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 提取 次数/次	C 加醇 量/倍	D 提取时间 /min
1	0	1	6	20
2	10	2	8	40
3	20	3	10	60

表 2 巴豆苷提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	巴豆苷提出量 /mg·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	4.871
2	1	2	2	2	8.073
3	1	3	3	3	8.462
4	2	1	3	3	5.636
5	2	2	2	1	6.952
6	2	3	1	2	6.821
7	3	1	3	2	5.707
8	3	2	1	3	6.024
9	3	3	2	1	8.208
K <sub>1</sub>	7.135	5.405	5.905	6.677	
K <sub>2</sub>	6.470	7.016	7.306	6.867	
K <sub>3</sub>	6.646	7.830	7.040	6.707	
R	0.665	2.425	1.401	0.190	

表 3 巴豆苷提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.713	2	11.317	
B	9.144	2	145.143	<0.01
C	3.320	2	52.698	<0.05
D(误差)	0.063	2	1.000	

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ ,  $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

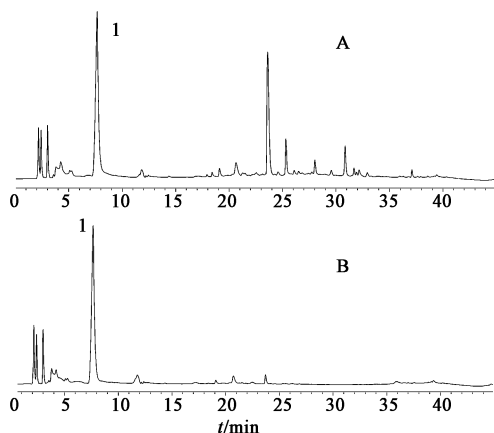
从表 2 结果可知,4 个因素影响顺序为  $B > C > A > D$ ,即提取次数影响最大,最佳提取工艺为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果表明提取次数和料液比具有显著性差异,乙醇体积分数显著性影响,综合回收溶剂、杂质含量及节省时间等考虑,巴豆苷的提取工艺可调整为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即巴豆去油后药粉,用 8 倍量 20% 乙醇提取 3 次,每次 40 min。

#### 2.3 巴豆苷大孔树脂纯化工艺

**2.3.1 巴豆苷的提取** 按 2.2 优选结果,取巴豆种

子药材 500 g, 打粉过二号筛, 乙醚索氏提取 3 h 去油, 药渣用 8 倍量 20% 乙醇回流提取 3 次, 每次 40 min, 过滤, 合并提取液后回收溶剂, 浓缩至  $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 即得巴豆苷提取液, 备用。

**2.3.2 大孔树脂纯化巴豆苷** 根据预试验结果, 发现 D101 型大孔树脂对巴豆苷有较好的纯化效果。取已处理好的 D101 型大孔树脂, 通过泄露曲线确定上样药材用量与树脂的比为 3.5:1 时纯化效果较理想, 树脂径高比 1:9; 加入 2.3.1 提取液, 上样液流速  $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 流出液复上柱 2 遍, 用 3~6 倍量的 7% 乙醇冲洗至无色, 合并冲洗液, 提取液经 D101 纯化前后 HPLC 对比图谱见图 1。经纯度测定, 提取液样纯化前巴豆苷的质量分数为 9.4%, 纯化后达 35.0% 以上, 得率为 66%。



A. 纯化前; B. 纯化后; 1. 巴豆苷

图 1 巴豆苷提取液 HPLC

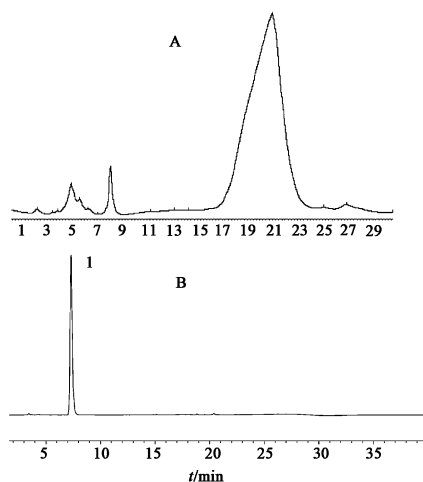
**2.4 反相制备柱分离巴豆苷** 采用制备型 HPLC ShimadZU PRC-ODS 柱 ( $20 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ )。考虑到巴豆苷极性大和甲醇成本低于乙腈的特点, 流动相采用甲醇-水, 巴豆苷和杂质在 220 nm 都有良好吸收, 故检测波长定为 220 nm。

**2.4.1 流动相组成对分离的影响** 分别采用 5:95, 7:93, 9:91, 11:89, 15:85 甲醇-水体系, 考察巴豆苷分离情况和出峰时间, 流速  $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。当甲醇体积分数增高时, 流动相的洗脱能力增强, 各组分出峰时间分别为 23, 15, 11, 9, 7 min, 当甲醇-水达到 10:90 以上与杂质分离度下降。故选甲醇-水 7:93。

**2.4.2 流速对分离的影响** 采用甲醇-水 7:93 为流动相, 分别以 10, 12, 15, 18, 20, 24  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速考察巴豆苷分离情况和出峰时间, 最终确定流速为  $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  时出峰时间约 20 min, 效果较为理想。

**2.4.3 上样量对分离的影响** 以巴豆苷含量计, 分别以每次 10, 15, 20, 25, 30, 40 mg 上样, 上样量少时分离度好, 峰形好看, 但浪费溶剂和时间; 上样量 > 20 mg 时, 分离度下降, 样品纯度降低, 故上样量选择相当于巴豆苷 20 mg 的溶液较好。

**2.4.4 验证试验** 综合上述参数, 流动相甲醇-水 7:93, 流速  $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 上样量以巴豆苷含量计约为 20 mg, 制备液相图谱; 见图 2 巴豆苷部分回收溶剂, 真空干燥后, 取巴豆苷粉末用 HPLC 检测 (图 2), 纯度达 98%, 总得率为 51.5% (以最初药液含量计)。



A. 制备液相; B. 巴豆苷粉末 HPLC; 1. 巴豆苷

图 2 巴豆苷图谱

### 3 讨论

文献报道<sup>[6]</sup> 少量巴豆去油后用 160 倍量水超声, 测定巴豆苷含量, 此方法因水溶性杂质多、回收困难及样品易变质等, 不适合制备纯度高的巴豆苷实验样品。本实验运用正交设计考察巴豆苷的提取工艺, 优选出低体积分数乙醇提取, 可避免上述问题。纯化巴豆苷 Jung Han Kim 等<sup>[2]</sup> 用 DEAE 纤维素, 树脂前处理步骤繁琐, 且对每一步使用的缓冲盐要求严格, 很难达到纯化效果, 另一方面 DEAE 纤维素成本是 D101 型大孔树脂的几十倍, 再生亦比大孔树脂麻烦。通过大孔树脂纯化后可以提高巴豆苷的纯度。制备液相可很好地分离巴豆苷, 经 HPLC 检测, 可以得到纯度 98% 的单体, 方法操作简单、分离效率高、产品质量好, 为巴豆苷的制备和研究提供了一种新的方法, 对于进一步开展相关的药理或机制研究十分必要。

### [参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:74.

# 西洋参茎叶总皂苷中分离纯化拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 工艺

田旭,任媛媛,李平亚,王翠竹,刘金平\*  
(吉林大学再生医学科学研究所,长春 130021)

**[摘要]** 目的:优选从西洋参茎叶总皂苷中分离纯化拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 的最佳工艺。方法:以拟人参皂苷 F<sub>11</sub> (PF<sub>11</sub>) 提取率为指标,建立 HPLC-ELSD 检测 PF<sub>11</sub> 的方法,并优选 AB-8 大孔吸附树脂纯化西洋参茎叶总皂苷中 PF<sub>11</sub> 的工艺。结果:最佳工艺为西洋参茎叶总皂苷过 10 倍量 AB-8 大孔吸附树脂柱,流速 5 mL·min<sup>-1</sup>,依次用 7.5 BV 30%~33% 乙醇,8 BV 35%~40% 乙醇进行洗脱,收集 35%~40% 乙醇洗脱液,回收乙醇,蒸干,得 PF<sub>11</sub> 粗品纯度 >50.0%。结论:大孔吸附树脂分离拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 方法简单、快速、可行。

**[关键词]** 拟人参皂苷 F<sub>11</sub>; 大孔吸附树脂; 分离纯化

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0024-03

## Separation and Purification Technology of Pseudo-ginsenoside F<sub>11</sub> from Total Saponins in Leaves and Stems of *Panax quinquefolium*

TIAN Xu, REN Yuan-yuan, LI Ping-ya, WANG Cui-zhu, LIU Jin-ping\*

(Research Institute of Regenerative Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize optimum separation and purification technology of pseudo-ginsenoside F<sub>11</sub> from total saponins in leaves and stems of *Panax quinquefolium*. **Method:** PF<sub>11</sub> was determined by HPLC-ELSD with yield of PF<sub>11</sub> as index, and AB-8 type macroporous adsorption resin was chosen to purify PF<sub>11</sub> from total saponins in leaves and stems of *P. quinquefolium*. **Result:** Optimum technology was: total saponins in leaves and stems of *P. quinquefolium* passed 10 times the amount of AB-8 macroporous adsorption resin with flow rate 5 mL·min<sup>-1</sup>, eluted with 7.5 BV 30% ethanol-33% ethanol, discard eluate, then eluted with 8 BV 35% ethanol-40% ethanol, collected eluate, recovered ethanol, evaporated, purity of pseudo-ginsenoside F<sub>11</sub> was more than 50%. **Conclusion:** This method of PF<sub>11</sub> was separated by macroporous adsorption resin was simple, rapid and feasible.

**[Key words]** pseudo-ginsenoside F<sub>11</sub>; macroporous adsorption resin; separation and purification

**[收稿日期]** 20110625(005)

**[基金项目]** 吉林省科技厅重大项目(20096039)

**[第一作者]** 田旭,在读硕士,从事天然药物化学成分及其生物活性的研究,Tel:13194361009,E-mail:tianxu09@mails.jlu.edu.cn

**[通讯作者]** \*刘金平,博士后,副教授,从事药物化学研究,Tel:0431-85619803,E-mail:liujp@jlu.edu.cn

- [2] Jung H Kim, Sang L L, Young B H, et al. Isolation of isoguanosine from *Croton tiglium* and its antitumor activity [J]. Arch Pharm Res, 1994, 17(2):115.
- [3] 陈武, 陈鹏英, 刘鹏, 等. 巴豆生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(7):1450.
- [4] 王明艳, 瞿融, 许冬青. 巴豆生物碱诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):119.
- [5] Liebich H M, Lehmann R, Stefano C D, et al. Analysis of traditional Chinese anticancer drugs by capillary electrophoresis [J]. J Chromatography A, 1998, 795(2):388.
- [6] 凌云, 赵红玉, 潘兴亮, 等. 高效液相色谱法测定巴豆中巴豆苷的含量[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(11):1057.

[责任编辑 全燕]