

## 抗癌药物戊柔比星的分离纯化与 HPLC 检测条件的确立

张长香\*

中蓝晨光化工研究设计院有限公司, 成都 610041

**摘要:** 本文以戊柔比星半合成粗品为原料, 先采用溶剂法对粗品进行初步除杂, 分离除去与戊柔比星极性相差较大的杂质, 然后通过两次柱层析进一步对其纯化。纯度可达到 98.9%。并通过将戊柔比星纯品的二氯甲烷超饱和溶液逐滴加入到正己烷中从而得到了均匀的戊柔比星橘红色粉末。此外, 还自行确立了相应的 HPLC 检测条件。

**关键词:** 戊柔比星、分离纯化、HPLC 检测

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.021

## Separation, Purification and Determination of Anti-cancer Drugs Valrubicin

ZHANG Chang-xiang\*

China Bluestar Chengrand Chemical Industry Research &amp; Design Institute Co. Ltd., Chengdu 610041, China

**Abstract:** Preparative chromatography purification of valrubicin from crude synthetic drug has been successfully performed in this study. The method of precipitation with bad solvent was used to remove impurity firstly. Then a tandem column chromatography were applied for purifying valrubicin. After this process, the purity of valrubicin achieve 98.9%. In addition, corresponding HPLC method was established for determinating valrubicin.

**Key words:** Valrubicin; separation and purification; HPLC

戊柔比星 Valrubicin (见图 1), 是蒽环类抗生素-阿霉素(一种抗肿瘤药)的一种半合成衍生物<sup>[1]</sup>, 属于细胞毒素, 是由美国 Anthra 公司开发出的一种新的 TOPO II 抑制剂, 并于 1998 年被美国 FDA 批准、1999 年世界首次上市的抗肿瘤新药<sup>[2]</sup>。其主要用于治疗膀胱癌<sup>[3]</sup>。其化学名称为: (2S-cis)-2-[1,2,3,4,6,11-hexahydro-2,5,12-trihydroxy-7-methoxy-6,11-dioxo-[4,2,3,6-trideoxy-3-(trifluoroacetyl)-amino-L-lyxo-hexopyranosyl]oxyl]-2-naphthacenyl]-2-oxoethyl pentanoate。戊柔比星是一种具有高度亲脂性的橘黄色或橘红色粉末<sup>[4]</sup>, 可以溶解于二氯甲烷, 乙醇, 甲醇和丙酮中, 难溶于水<sup>[5]</sup>。其分子式是:  $C_{34}H_{36}F_3NO_{13}$ , 分子量为 723.65。结构式见图 1。

戊柔比星是多柔比星的一个半合成同系物, 是一种蒽环类抗生素, 能够对多个相互关联的生物功能产生影响, 这些功能大多都与核酸代谢有关。它能够毫无阻碍地穿透并进入细胞, 抑制核苷酸结合

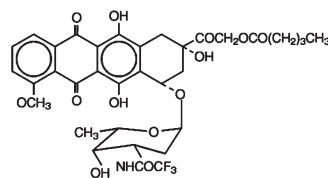


图 1 戊柔比星的结构式

Fig. 1 Chemical structure of valrubicin

为核酸, 对细胞染色体造成极大的破坏<sup>[6]</sup>。此外, 它还可以在细胞分裂周期中的 G2 期抑制细胞分裂。尽管戊柔比星与 DNA 的结合并不是很强烈, 但由于戊柔比星的主要作用机理是其代谢产物对正常细胞 DNA 拓扑异构酶 II 的解旋——聚合过程进行抑制, 使 DNA 无法进行复制而导致癌细胞死亡<sup>[7]</sup>。因此具有较强的抗癌作用。戊柔比星已被用来治疗浅表性膀胱癌。与多柔比星不同, 戊柔比星能迅速穿透细胞膜并在胞浆中积蓄, 治疗效果好且毒性小<sup>[8-11]</sup>。本文对戊柔比星半合成粗品进行了纯化, 并根据需要建立了简单快速的 HPLC 检测定量方法。为戊柔比星产业化生产中的纯化与定量提供了理论基础和可行性依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器及药品

WFH-203 三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司),UV-2550,高效液相色谱仪 JASCO PU-980 Intelligent HPLC pump, JASCO UV-975 Intelligent UV/VIS Detector, 色谱柱 HIQ Sil C18W (4.6 mm × 250 mm), 旋转蒸发仪(上海青浦沪西仪器厂); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

二氯甲烷、三氯甲烷、乙醚、乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、正己烷、乙腈,所用试剂均为分析纯;二次蒸馏水,戊柔比星粗品(含量约为 25%),98% 戊柔比星对照品(自制)。

### 1.2 实验操作

#### 1.2.1 戊柔比星标准曲线的绘制

精确称取戊柔比星对照品 3.0 mg 于 10 mL 的容量瓶中,以选定的流动相定容,摇匀备用。分别精确吸取戊柔比星对照品母液 100、200、300、400、500  $\mu\text{L}$  于 1 mL 容量瓶中,用流动相定容,摇匀,备用。按照色谱条件,分别取上述系列标准溶液进行 HPLC 分析,每个样平行测定三次,取平均值。以戊柔比星的色谱峰面积对其溶液浓度作图,得回归方程为:  $y = 12015687.62x - 2902.9$ , 相关系数:  $R^2 = 0.9988$ 。

#### 1.2.2 色谱条件

流动相:乙腈:水(80:20, V/V);流速:1 mL/min;检测波长:234 nm;柱温:22  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:10  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.2.3 戊柔比星粗品的预处理

采用溶剂法对 25% 戊柔比星粗品进行初步除杂。步骤:用丙酮溶解 25% 戊柔比星样品,然后加入正己烷(也可用石油醚、环己烷等非极性溶剂代替)可观察到有大量得到深棕色沉淀析出,过滤除去沉淀,浓缩上清液进一步用丙酮溶解,然后再加入正己烷,过滤。

#### 1.2.4 TLC 检测过程中展开剂的选取

实验中,我们选择了不同体系的展开剂:1)、乙醚-乙醇(10:0.1);2)、乙醚-乙醇(5:0.1);3)、乙醚-二氯甲烷-乙醇(1:20:0.6);4)、乙醚-二氯甲烷-乙醇(1:5:0.1)。

#### 1.2.5 柱层析过程中洗脱剂的选取

在实验过程中,我们尝试了多种不同组分、不同

比例的洗脱剂:三氯甲烷:乙酸乙酯(10:1);乙醚-二氯甲烷-乙醇(1:5:0.1)。

## 2 结果与分析

### 2.1 戊柔比星粗品的预处理

采用溶剂法对 25% 戊柔比星粗品进行初步除杂,并结合柱层析法进一步纯化。利用样品中部分杂质在不同极性溶剂中溶解度的不同,使其以沉淀的形式析出,从而对粗品进行除杂。为防止同时析出的有戊柔比星,我们用 98% 戊柔比星对照品作了对照试验:在上述相同的条件下,加入相同量的 98% 戊柔比星,无沉淀析出,可说明,上述得到的棕色沉淀主要为杂质,HPLC 检测也证明了这一点。

### 2.2 TLC 检测过程中展开剂的选取

找到合适的展开剂是分离纯化的先决条件,戊柔比星粗品中含有极性大小不同的杂质。实验中,我们选择了不同体系的展开剂,结果如下:1)、乙醚-乙醇(10:0.1),在此展开剂中,样品可以与杂质显著分离,但样品点拖尾现象严重;2)、乙醚-乙醇(5:0.1),拖尾减弱,但分离效果不如前者;3)、乙醚-二氯甲烷-乙醇(1:20:0.6),拖尾现象明显收敛,但样品与杂质几乎没有分开;4)、乙醚-二氯甲烷-乙醇(1:5:0.1),拖尾现象较小,比移值  $R_f$  适中,分离效果最好。

### 2.3 柱层析过程中洗脱剂的选取与柱层析

洗脱剂要选择对被洗脱的物质有较大溶解度的溶剂,同时又要要把被洗脱物从吸附剂上洗脱。在实验过程中,我们尝试了多种不同组分、不同比例的洗脱剂,其中一次柱层析的最佳洗脱剂为三氯甲烷:乙酸乙酯(10:1);二次柱层析的最佳洗脱剂为:乙醚-二氯甲烷-乙醇(1:5:0.1)。

将初步去杂后的上清液进行浓缩,进行一次柱层析。柱层析纯化过程中利用 TLC 跟踪检测,并通过 HPLC 检测其含量,其中 TLC 的展开剂(乙醚:二氯甲烷:乙醇 = 1:5:0.1)。经过一次柱层析后,纯度达到 83%,得率为 43.36%。

在实验过程中,用了以下几种不同体系的展开剂进行对照试验。结果如下:将一次柱层析后得到的馏分蒸馏浓缩后进行二次柱层析,洗脱剂(乙醚:二氯甲烷:乙醇 = 1:5:0.1)。二次柱层析馏分纯度为 98.9%,得率 69.7%,柱层析纯化过程中利用 TLC 跟踪检测。色谱图见图 2。

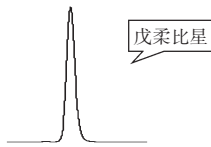


图2 两次柱层析后样品色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of purified valrubicin

## 2.4 戊柔比星的分散

粗品在经过预处理、两次柱层析后,虽然纯度已高达98.9%,但馏分经蒸发浓缩后并不是像有关文献所说的橘黄色或橘红色粉末,而是呈暗红色、块结状。因此要想得到均匀的粉末,还须对其做进一步的处理。方法:将块结状的戊柔比星溶解于极少量的二氯甲烷中,使戊柔比星呈过饱和状态,然后将上述过饱和溶液逐滴滴入到正己烷中。使戊柔比星在正己烷中均匀地分散开。(加入速度不能太快,否则戊柔比星又会胶连在一起),这时在正己烷溶剂底部会出现橘红色的沉淀。经过简单过滤、洗涤、真空干燥后即可得到均匀单一的橘红色粉末。

## 3 结论

根据本文研究结果表明,戊柔比星的纯化过程中,TLC展开剂和柱层析中的洗脱剂的选取是影响纯化结果的重要因素。此外,研究结果表明,在两次柱层析后,虽然戊柔比星的纯度已高达98.9%,但并不是像有关文献所说的橘黄色或橘红色粉末。因此,对柱层析后馏分进行了溶剂分散,并得到了良好的分散粉末。

### 参考文献

- 1 Onrust SV, Lamb HM. Valrubicin. *Drug Aging*, 1999, 15: 69.
- 2 van der Heijden AG, Witjes JA. EAU Update Series 1. 2003, 71.

- 3 Krishan A, Israel M, Modest EJ, *et al.* Differences in cellular uptake and cytofluorescence of adriamycin and N-trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate. *Cancer Res*, 1976, 36: 2108-2109.
- 4 Chuang LF, Kawahata RT, Chuang RY. Inhibition of chicken myeloblastosis RNA polymerase II activity in vitro by N-trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate. *FEBS Lett*, 1980, 117: 247-251.
- 5 Chuang RY, Chuang LF, Kawahata RT, *et al.* Effect of N-trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate on [<sup>3</sup>H] thymidine uptake and DNA synthesis of human lymphoma cells. *J Biol Chem*, 1983, 258: 1062-1065.
- 6 Israel M, Modest EJ, Frei E III. Trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate, an analog with greater experimental antitumor activity and less toxicity than adriamycin. *Cancer Res*, 1975, 35: 1365-1368.
- 7 Blum RH, Garnick MB, Israel M, *et al.* Preclinical Rationale and Phase I Clinical Trial of the Adriamycin Analog, AD 32. *Cancer Treat Rep*, 1979, 63: 919.
- 8 Niell HB, Hunter RF, Herrod HG, *et al.* Effects of N-trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate (AD-32) on human bladder tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1987, 19: 47-52.
- 9 Sweatman TW, Parker RF, Israel M. Pharmacologic rationale for intravesical N-Trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate (AD 32): a preclinical study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1991, 28: 1-6.
- 10 Markman M, Homesley H, Norberts DA, *et al.* Phase I Trial of Intraperitoneal AD-32 in Gynecologic Malignancies. *Gynecol Oncol*, 1996, 61: 90-93.
- 11 Greenberg RE, Bahnson RR, Wood D, *et al.* Initial report on intravesical administration of N-trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate (AD 32) to patients with refractory superficial transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urology*, 1997, 49: 471-475.