

大孔树脂纯化马甲子五环三萜类成分的工艺研究

王京^{1,2}, 阮佳², 徐超群^{2*}¹成都中医药大学, 成都 610075; ²四川省中医药科学院, 成都 610041

摘要: 研究马甲子中五环三萜类化合物白桦脂酸、马甲子素的大孔吸附树脂纯化工艺。以白桦脂酸、马甲子素为指标, 通过对 10 种大孔树脂 (DA201、AB-8、D1400、D4020、NKA-9、HPD100、HPD700、H130 和 X-5) 的静态、动态饱和吸附量和解析率实验筛选适宜的大孔树脂, 并优化纯化工艺。工艺条件: 马甲子素、白桦脂酸浓度分别为 16.07、1023 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 上样体积为 1000 mL (上样量为 0.4 g/g, 醇提取物/干树脂), 洗脱剂为 85% 乙醇, 用量为 900 mL, 洗脱速度为 3 mL/min。经树脂纯化后马甲子素的含量提高了 8 倍, 白桦脂酸的含量提高了 5 倍, 色素等杂质含量大大降低。大孔吸附树脂纯化后的马甲子提取物, 其 Hep-G2、AGS 细胞的 IC_{50} 分别为 30.79 ± 8.49 、 8.75 ± 2.83 mg/L。本纯化工艺条件合理, 适用于马甲子五环三萜类有效成分的纯化富集。

关键词: 马甲子; 五环三萜; 大孔树脂; 纯化工艺

中图分类号: R914

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.026

Purification of Pentacyclic Triterpenoids from *Paliurus ramosissimus* by Macroporous Resin

WANG Jing^{1,2}, RUAN Jia², XU Chao-qun^{2*}¹Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;²Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China

Abstract: To investigate the purification technology of pentacyclic triterpenoids from *Paliurus ramosissimus* by macroporous resin. The absorption and desorption capacity of 10 resin (DA201, AB-8, D1400, D4020, NKA-9, HPD100, HPD70, H130 and X-5) for betulinic acid and paliurusene were investigated to select the optimal macroporous resin. The adsorption characters and the influencing factors of the selected macroporous resin were also investigated to optimize the purification technology. The optimized conditions were as follows: the concentration of betulinic acid was 16.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the concentration of paliurusene was 1023 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the loading volume was 1000 mL (loading amount was 0.4 g/g), eluent was 85% ethanol, the amount of 900 mL, elution rate of 3 mL/min. After purification of the resin, the content of paliurusene was increased by 8 times, the content of betulinic acid was increased by 5 times, and the content of pigment and other impurities was greatly reduced. The IC_{50} of Hep-G2 and AGS cells were 30.79 ± 8.49 , 8.75 ± 2.83 mg/L, respectively, after purification using macroporous resin. The purification process was reasonable, suitable for the purification of active ingredients in *Paliurus ramosissimus*.

Key words: *Paliurus ramosissimus*; pentacyclic triterpenes; macroporous resin; purification process

马甲子 *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir 为鼠李科植物,《贵州草药》记载其具有祛风湿、治劳伤、解毒等功效。民间有口服马甲子鲜叶治疗消化道肿瘤的案例,且疗效好、无毒副作用^[1]。本课题组在对马甲子的研究过程中分离出了以白桦脂酸为母核的多种五环三萜类化合物,其中马甲子素为新化合

物,经大量细胞实验表明此类化合物大都具有良好的抗肿瘤活性^[2,3]。课题组自制的醇提取物中含有大量色素等杂质,降低了药物的抗肿瘤活性,不利于为后续马甲子制剂的研发提供较为标准化的原料药。因大孔吸附树脂 (macroporous resin) 吸附性能好、价格低廉、可重复利用,近年来广泛用于天然产物的分离、纯化,本实验室采用马甲子素和白桦脂酸的吸附量和解析率为指标,筛选分离纯化富集马甲子五环三萜类成分的树脂型号,并以上样量、洗脱剂浓度及洗脱速率等为考察指标,对其进行工艺优化,降低浸

收稿日期: 2017-07-27 接受日期: 2017-11-02

基金项目: 国家重大新药创制 (2017ZX09301055); 四川省科研院所科技成果转化资金 (1501110); 四川省科技支撑计划 (15ZC1978); 四川省公益性科研院所基本科研业务专项

* 通信作者 Tel: 86-28-85213973; E-mail: chaoqun_xu@sina.com

膏中杂质类成分的含量,为后期马甲子的研发提供实验基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪,检测器为 1260 DAD 和 3300 ELSD(美国);LQ-A10002 电子天平(瑞安市安特称量设备有限公司);SB-5200D 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HYA 恒温摇床(中国科学院武汉科学仪器厂);玻璃层析柱 3.3 cm × 60 cm(成都市凌云玻璃仪器厂)。

1.2 材料与试剂

白桦脂酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111802-201402);马甲子素对照品(课题组自制,纯度 ≥ 98%,批号:20150801);马甲子醇提物(批次:20150721,马甲子素、白桦脂酸含量分别为 0.078%、6.5%);DA201 型、AB-8 型、D1400 型、D4020 型、NKA-9 型、HPD100 型、HPD700 型、H130 型和 X-5 型大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司);乙腈(色谱纯,美国 Sigma);石油醚,乙酸乙酯,甲醇,氯仿等试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 马甲子素、白桦脂酸的测定

2.1.1 色谱条件^[3]

色谱柱:Phenomenex luna-C₁₈(250 × 4.6 mm, 5 μm);流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;DAD 检测波长:320 nm;ELSD 漂移管温度:45 °C,载气流速:1.0 L/min;进样量:10 μL。流动相:0.1% 甲酸溶液(A)~乙腈(B),梯度洗脱程序:0~5 min,98% A;5~55 min,98%~0% A。

2.1.2 对照品溶液的制备

分别取马甲子素对照品、白桦脂酸对照品,精密称定,甲醇溶解,制得 0.490、0.402 mg/mL 的溶液,即马甲子素对照品贮备液、白桦脂酸对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察

精密称取马甲子素对照品贮备液,甲醇稀释为系列对照品溶液,各取 10 μL,进样,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程:Y(马甲子素) = 2.954 × 10³X - 4.648 (r² = 0.9998)。精密称取白桦脂酸对照品溶液,以 3、5、10、15、20 μL 为进样量,lg A(峰面积)为纵坐标,lg M(进样

量)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 Y(白桦脂酸) = 1.3289X + 2.4303 (r² = 0.9998)。马甲子素、白桦脂酸对照品分别在 0.015 ~ 0.490 μg, 1.206 ~ 8.040 μg 线性关系良好。因白桦脂酸标准曲线截距较大,在实际测定时采用外标两点法计算其含量。

2.2 样品溶液的选用与制备

取马甲子醇提物 9 份各 1 g,选用不同浓度不同体积的乙醇溶液超声溶解定容。测定马甲子素和白桦脂酸含量,计算其溶解率。选取醇提物加 50 倍量 70% 乙醇超声溶解,过滤,滤液备用;滤渣超声溶解 2~3 次得滤液,合并滤液得样品溶液(马甲子素、白桦脂酸含量为 16.07、1023 μg/mL)。

2.3 大孔树脂的预处理

取 1.2 项中各类大孔树脂,95% 乙醇浸泡溶胀,湿法装柱至层析柱,浸泡过夜,95% 乙醇冲洗,至洗脱液与 5 BV 蒸馏水混合不出现浑浊,改用 65% 乙醇冲洗。

2.4 考察指标

2.4.1 大孔树脂的静态吸附量、解析率考察

取预处理后的大孔树脂,置三角瓶,加入 100 mL 样品溶液。120 rpm、25 °C 恒温恒速摇床中振摇 24 h,精密取上清液,测定指标成分(马甲子素和白桦脂酸)含量,计算比吸附量;取大孔树脂置另一三角瓶,加入 100 mL 95% 乙醇,其余操作同上,得解吸后滤液,测定指标成分含量,计算解析率。比吸附量(mg/g) = [(原液浓度 - 滤液浓度) × 溶液体积] / 树脂量;解吸率(%) = (解吸液浓度 × 解吸液体积) / [(原液浓度 - 滤液浓度) × 溶液体积] × 100%。

2.4.2 大孔树脂的动态比吸附量、解析率考察

取经预处理后的树脂柱,样品溶液过柱,收集下柱液,用 65% 乙醇冲洗,后依次用定量 75%、85%、95% 的乙醇解吸附。分别测下柱液、65% 冲洗液、75%、85%、95% 乙醇洗脱液中指标成分含量,并计算比吸附量与洗脱率。比吸附量(mg/g) = (上柱液中成分量 - 下柱液中成分量 - 60% 乙醇冲洗液中成分量) / 树脂量;洗脱率(%) = (洗脱液活性成分浓度 × 洗脱液体积) / 吸附量。

2.5 试验设计

选择大孔树脂的吸附条件优化(上样浓度、泄露曲线)与洗脱条件优化(洗脱剂浓度、洗脱速率、洗脱曲线)几个单因素水平分析,以考察马甲子五环三萜类成分最佳纯化工艺,最后采用工艺验证试

验确定最佳纯化工艺条件。

2.6 马甲子五环三萜类化合物抗肿瘤活性的研究

取对数生长期 HepG-2 和 AGS 细胞,配制一定浓度细胞悬液,接种于 96 孔板,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养至贴壁,加入终浓度为 50、40、30、20、10、5、2、1 mg/L 的马甲子大孔树脂纯化物,设阳性对照(0.025 mg/mL 5-Fu 注射液,天津金耀氨基酸有限公司,批号 1605061)、阴性对照(含 0.2% DM-SO DMEM 培养基)、空白对照组(含 10% FBS 的 DMEM 培养基),培养 48 h,弃上清液,用含 0.5 mg/

mL MTT 培养基孵育 3 h,弃上清液,加 150 μL DM-SO/孔,酶标仪于 490 nm 处检测吸光度(A)值。实验重复 3 次,计算细胞生长抑制率。抑制率 = $1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}})$ 。

3 结果与分析

3.1 样品溶解醇浓度的确定

结果如表 1,1 g 马甲子醇提取物中白桦脂酸和马甲子素近乎完全溶于 50 mL 70% 乙醇溶液中,故选用该浓度为制样浓度。

表 1 各样品液中马甲子素和白桦脂酸溶解率的测定结果

Table 1 Determination of the dissolution rate of paliurusene and betulinic acid in each sample solution

编号 No.	乙醇浓度 Concentration (%)	溶剂体积 Volume (mL)	马甲子素含量 Content of paliurusene (mg/g)	马甲子素溶解率 Dissolution rate (%)	白桦脂酸含量 Content of betulinic acid (mg/g)	白桦脂酸溶解率 Dissolution rate (%)
1	50	25	0.5405	62.86	-	-
2	50	50	0.6383	74.24	-	-
3	50	100	0.7167	83.35	-	-
4	60	25	0.8097	94.18	6.55	12.69
5	60	50	0.8416	97.88	13.91	26.96
6	60	100	0.8460	98.39	29.01	56.21
7	70	25	0.8431	98.06	27.66	53.59
8	70	50	0.8524	99.14	51.53	99.81
9	70	100	0.8785	102.18	63.27	102.54

3.2 指标考察

大孔树脂的静态吸附量及解吸率,见表 2,随着大孔树脂极性的增大,两指标成分的比吸附量均有增大趋势,其中,H130 型、DA201 型大孔树脂对马甲子素的吸附能力较强,对白桦脂酸的吸附能力较差,

HPD100 型、D1400 型、X-5 型、AB-8 型和 NKA-9 型大孔树脂对两指标成分的比吸附量均较大。95% 乙醇洗脱各树脂,两指标成分的洗脱率数据未表现出明显的规律性。通过综合比较,可初步选出 AB-8 型、X-5 型、NKA-9 型树脂作为马甲子的纯化树脂。

表 2 10 种树脂的静态吸附量和解吸率数据

Table 2 Static adsorption and desorption data for 10 resins

树脂型号 Resin model	树脂类型 Resin type	马甲子素比吸附量 Relative adsorption amount of paliurusene (mg/g)	马甲子素解吸率 Resolution rate of paliurusene (%)	白桦脂酸比吸附量 Relative adsorption amount of betulinic acid (mg/g)	白桦脂酸解吸率 Resolution rate of betulinic acid (%)
HPD100	非极性	0.2065	85.55	11.31	89.81
HPD700	非极性	0.1775	95.23	9.99	98.69
D101	非极性	0.1810	93.38	10.01	99.89
D1400	非极性	0.2291	80.54	11.38	90.98
D4020	非极性	0.1349	96.64	8.38	103.10
H130	非极性	0.2348	76.99	10.87	93.04
X-5	弱极性	0.2335	83.49	12.57	89.62
AB-8	弱极性	0.2469	73.78	12.79	83.09
NKA-9	极性	0.2390	74.93	12.52	82.41
DA201	极性	0.2440	69.91	9.19	103.50

大孔树脂的动态饱和和吸附量和解析率,见表3。以马甲子素和白桦脂酸的比吸附量及解吸率为指

标,结合 AB-8 型分离纯化后样品成型性更好。最终选定 AB-8 型大孔树脂。

表3 3种大孔吸附树脂的动态比吸附量和解吸率测定结果

Table 3 Dynamic ratio of adsorption and desorption rates of 3 macroporous adsorption resin

树脂型号 Resin model	树脂类型 Resin type	马甲子素比吸附量 Relative adsorption amount of paliurusene (mg/g)	马甲子素解吸率 Resolution rate of paliurusene (%)	白桦脂酸比吸附量 Relative adsorption amount of betulinic acid (mg/g)	白桦脂酸解吸率 Resolution rate of betulinic acid (%)
AB-8	弱极性	0.4518	86.35	23.86	77.82
X-5	弱极性	0.3040	83.32	15.64	74.49
NKA-9	极性	0.3578	82.71	15.57	78.38

3.3 AB-8 型大孔树脂纯化工艺优化

3.3.1 上样浓度考察

取不同浓度样品液(指标成分含量一定)。上样吸附后,测定各流出液指标成分的含量,计算比吸

附量。见表4,随着上样浓度的减小,AB-8 型大孔树脂对两指标成分的比吸附量逐渐减小,选用马甲子素浓度 16.07 $\mu\text{g/mL}$ (白桦脂酸浓度 1023 $\mu\text{g/mL}$)为最佳上样浓度。

表4 上样浓度的考察结果

Table 4 Results of the sample concentration

成分 Ingredient	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	马甲子素比吸附量 Relative adsorption amount of paliurusene (mg/g)	白桦脂酸比吸附量 Relative adsorption amount of betulinic acid (mg/g)
	16.07(1023.0)	0.4420	27.66
马甲子素(白桦脂酸) Paliurusene (betulinic acid)	8.70(515.4)	0.4050	21.63
	5.93(363.8)	0.4119	20.79
	4.51(273.7)	0.3998	18.36

3.3.2 上样量的考察

取 AB-8 型树脂柱,上样吸附后,分段收集流出液(100 mL/段),共 20 份,测定各洗脱液中指标成分含量,绘制泄露曲线,见图1。结果表明,当流出液至第 10 份,白桦脂酸达泄漏点,当流出液至第 12

份,马甲子素达泄漏点,至第 17 份,指标成分均达最大值,即大孔树脂达到饱和状态。因此在马甲子素浓度 16.07 $\mu\text{g/mL}$ (白桦脂酸:1023 $\mu\text{g/mL}$)时,最大上样体积为 1000 mL,马甲子醇提物的上样量为 0.4 g/g 干树脂。

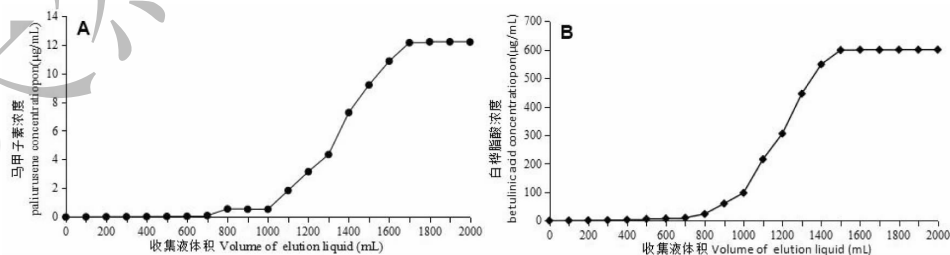


图1 马甲子素(A)和白桦脂酸(B)的泄露曲线

Fig. 1 Leakage curve of paliurusene (A) and betulinic acid (B)

3.3.3 洗脱剂浓度的考察

取 AB-8 型树脂柱,上样吸附后,65% 的乙醇冲

洗,相同体积流量下 75%、85% 和 95% 乙醇梯度洗脱,测定各洗脱液指标成分的含量,并计算洗脱率,

75%、85%、95%乙醇的马甲子素、白桦脂酸洗脱率分别为 10.81%、5.26%；68.56%、74.06%；13.70%、14.67%。在乙醇浓度达到 85% 时,两指标成分的洗脱率最高,经 95% 乙醇洗脱时,指标成分洗脱率较小,且出现大量色素,不利于纯化物的进一步研究,因此,选取 85% 乙醇为洗脱溶剂。

3.3.4 洗脱速率的考察

取 AB-8 型树脂柱,上样吸附后,65% 乙醇冲洗,85% 乙醇分别以 2、3、4 mL/min 洗脱,收集流出液,测定其指标成分含量,并计算洗脱率。2、3、4 mL/min 流速下三甲子素、白桦脂酸的洗脱率为

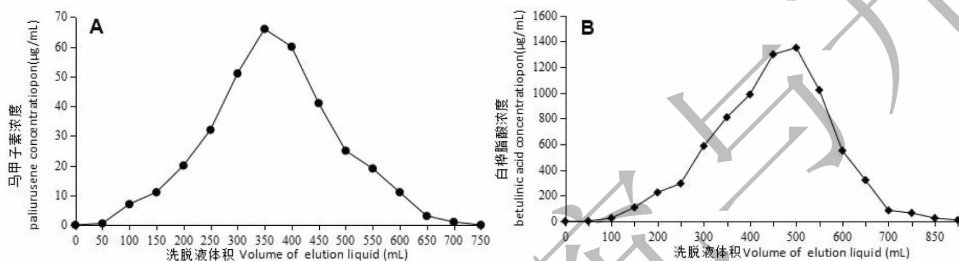


图2 洗脱剂用量对三甲子素(A)白桦脂酸(B)洗脱性能的影响

Fig. 2 Effect of eluent dosage on the elution performance of paliurusene (A) and betulinic acid (B)

3.4 验证试验

取 AB-8 型树脂柱,在最优工艺条件下(三甲子素、白桦脂酸浓度分别为 16.07、1023 μg/mL,上样体积为 1000 mL,上样量为 0.4 g/g(醇提取物/干树脂),洗脱剂为 85% 乙醇,用量为 900 mL,洗脱速度为 3 mL/min)进行 3 次验证试验,收集洗脱液,测定三甲子素和白桦脂酸的含量分别为 0.732%、43.7%,0.717%、42.2%,0.728%、44.6%。方法稳定可行,适用于三甲子的进一步纯化。

3.5 抗肿瘤活性检测

细胞生长抑制率,见图 3。细胞 MTT 实验表明,大孔吸附树脂纯化后的三甲子提取物具有一定的抗肿瘤活性,Hep-G2、AGS 细胞的 IC₅₀ 分别为 30.79 ± 8.49、8.75 ± 2.83 mg/L。

4 结论

经纯化后,三甲子素的含量提高了 8 倍,白桦脂酸的含量提高了 5 倍,减少了色素类成分的含量,分离纯化后样品成型性更好。该大孔树脂纯化工艺的建立,为三甲子药材中五环三萜类成分的富集及后续相关原料药制剂奠定了基础。体外抗肿瘤活性实验可知,大孔树脂纯化物具有一定的抗肿瘤活性作用。

84.89%、80.12%、82.36%、77.82%、72.39%、69.54%。综合考虑流速和洗脱率,选用洗脱速度 3 mL/min。

3.3.5 洗脱剂用量的考察

取 AB-8 型树脂柱,上样吸附后,65% 乙醇冲洗,85% 乙醇以 3 mL/min 的流速洗脱,50 mL/份,收集洗脱液,测定各份中指标成分的含量,计算洗脱率。见图 2,收集至第 18 份时,洗脱液中已检测不到两指标成分,此时,三甲子素和白桦脂酸的洗脱率分别为 88.23%、73.52%。因此,确定洗脱剂用量为 900 mL。

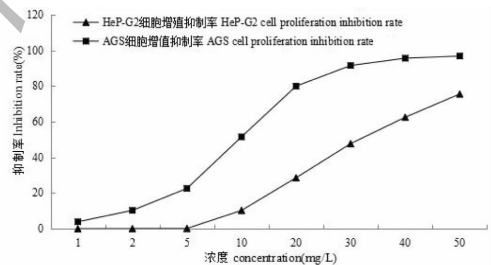


图3 不同浓度大孔树脂纯化物对 HeP-G2 和 AGS 细胞增殖抑制率

Fig. 3 Inhibition of the purified product at different concentrations on proliferation of HeP-G2 and AGS cells

参考文献

- Zhu H(朱华), Zhang KF(张可锋), Gao Y(高雅), et al. Pharmacognosy study of *Paliurus ramosissimus* [J]. *Guangxi Tradit Chin Med* (广西中医药), 2008, 1: 56-57.
- Song LQ(宋联强), Wu RJ(武蕊娟), Tan L(谭镭), et al. HPLC determination of *Paliurus ramosissimus* 1# content in *Paliurus ramosissimus* leaves [J]. *China Measure Test* (中国测试), 2015, 4: 43-45.
- Lu XW(卢辛未), Xie Y(谢莹), Wang J(王京), et al. Two new compounds from the leaves of *Paliurus ramosissimus* [J]. *Chin J Organ Chem*, 2017, 2: 520-525.