

大孔树脂结合半制备型高效液相色谱 分离纯化桃儿七中鬼臼毒素研究

许显莉^{1,2,3}, 刘盈盈^{1,2,3}, 沈建伟¹, 冯海生^{1,2}, 马世震^{1,2*}, 李彩霞^{1,2,*}

¹中国科学院西北高原生物研究所; ²青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 西宁 810008;

³中国科学院大学, 北京 100049

摘要:本研究使用大孔树脂结合半制备型高效液相色谱(PHPLC),对桃儿七中鬼臼毒素进行了分离纯化。先通过大孔树脂静态吸附试验比较了12种树脂吸附和解吸鬼臼毒素的性能,确定最佳树脂型号;并通过动态吸附试验,考察上样浓度、上样体积、上样流速、洗脱浓度、洗脱流速和洗脱体积对树脂分离效果的影响,确定最佳工艺条件。再经PHPLC进行进一步分离纯化,考察不同色谱柱、流动相比、进样量、流量等因素对分离效果的影响,确定适宜条件。最后,对所得最终产物进行纯度和化学结构鉴定。试验结果表明,HPD-100树脂为最佳树脂,其分离纯化鬼臼毒素的最佳条件为:上样浓度为0.46 mg/mL、上样体积为60 mL、上样流速为3 mL/min、洗脱浓度为80%、洗脱流速为3 mL/min、洗脱体积为120 mL。PHPLC进一步分离纯化的适宜条件为:色谱柱为Megres或Dubehe;流动相为乙腈-水溶液(34:66);体积流量为14 mL/min;进样量为1 mL。最终产物经鉴定,纯度>98%,结构为鬼臼毒素。本文建立桃儿七中鬼臼毒素的分离纯化方法分离效果好、制备效率高、易于工业化,可用于大规模分离制备。

关键词:大孔树脂;半制备型高效液相色谱;桃儿七;鬼臼毒素;分离纯化

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)Suppl-0073-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.S.011

Study on separation and purification of podophyllotoxin from *Sinopodophyllum hexandrum* using microporous resin combined with preparative high-performance liquid chromatography

XU Xian-li^{1,2,3}, LIU Ying-ying^{1,2,3},
SHEN Jian-wei¹, FENG Hai-sheng^{1,2}, MA Shi-zhen^{1,2,*}, LI Cai-xia^{1,2,*}

¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences;

²Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Xining 810008, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: To establish a method for separating and purifying podophyllotoxin (PPT) from *Sinopodophyllum hexandrum* using microporous resin combined with preparative high-performance liquid chromatography (PHPLC). Firstly, static adsorption test was used for choosing the best type of microporous resin. Secondly, the optimum conditions (the load solution concentration, volume and flow rate of loading solution, and eluent concentration, eluent volume and eluent flow rate) were determined by dynamic adsorption experiment. Finally, PHPLC was used for isolating and purifying PPT. The confirmation of chemical structures was performed by ¹H NMR and ¹³C NMR. The optimum purification conditions of microporous resin was obtained as follows: the 60 milliliter of 0.46 mg/mL PPT extract was loaded on the resin column at flow rate of 3 mL/min and eluted with 120 milliliter of 80% ethanol at flow rate of 3 mL/min. PPT with high purity was obtained by preparative HPLC with a C₁₈ column (Megres) by using 34% acetonitrile in ultrapure water at a constant flow rate of 14 mL/min and a sample volume of 1 mL. HPLC analysis showed that the purities of PPT > 98%, and the structure was confirmed as PPT. The method is simple,

收稿日期:2021-03-18 接受日期:2021-04-08

基金项目:青海省应用基础研究(2019-ZJ-7061)

* 通信作者 E-mail:szma@nwipb.cas.cn,lcx@nwipb.cas.cn

economic, efficient and can be applied to the separation and preparation of PPT from *Sinopodophyllum hexandrum*.

Key words: microporous resin; preparative high-performance liquid chromatography; isolation and purification; *Sinopodophyllum hexandrum*; podophyllotoxin

桃儿七药材 [*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying] 为小檗科桃儿七属 (*Sinopodophyllum Ying*) 植物的根及根茎^[1], 主要分布在我国青海、西藏、四川、甘肃等地区^[2], 具有祛风除湿、活血止痛、镇咳止喘、祛痰等功效^[3]。桃儿七中含有大量木脂素类化合物, 主要为鬼臼毒素。研究发现, 鬼臼毒素抗肿瘤作用显著, 还具有抗艾滋病、利气活血、止痛、解毒等活性^[4]。此外, 鬼臼毒素还可用于依托泊苷、替尼泊苷等抗癌药物的合成^[5,6]。随着高纯度鬼臼毒素需求量的增加, 高效低耗分离纯化鬼臼毒素已成为科技工作者关注热点。

目前, 已有相关鬼臼毒素分离纯化的研究报道。Liao 等^[7] 选用二氯甲烷:丙酮作为洗脱剂, 硅胶柱层析后, 乙醇重结晶, 制备出高纯度鬼臼毒素。温普红等^[8] 将桃儿七甲醇提取物经苯回流提取和脱色后, 再采用二步结晶法, 制得纯度大于 96% 的鬼臼毒素。虽然上述分离纯化法能得到纯度较高的鬼臼毒素, 但其过程复杂且不易控制、产量低、有机试剂消耗量巨大、部分试剂为致癌物。

大孔吸附树脂已广泛用于天然化合物黄酮^[9]、皂苷^[10]、二萜^[11]、生物碱^[12] 等分离纯化, 具有吸附性能好、吸附效率高、再生简单、解析方便等优点^[13], 但其分离纯化产物纯度不高。同时, 由于大孔树脂特殊的物理特性(如极性, 粒径, 表面积, 范德华力和氢键相互作用), 大孔树脂类型及其分离工艺条件对不同成分的分离纯化效果有较大影响^[14,15]。半制备型高效液相色谱(Pre-HPLC) 技术可实现高纯度产品的快速高效分离, 具有广泛使用性、操作简便性和分离高效性等优势, 已成为药物分离制备的主流技术^[16,17]。但 Pre-HPLC 要求样品必须对进行预纯化。因此, 大孔树脂结合半制备型高效液相色谱分离方法可结合两者优点, 实现高纯度目标化合物的高效分离。但目前有关大孔树脂结合半制备型高效液相色谱分离方法进行桃儿七鬼臼毒素的分离纯化研究较少。

综上所述, 为建立一种实现高纯度鬼臼毒素的高效分离方法, 本研究先采用大孔树脂法进行初步分离纯化, 其次采用半制备型高效液相色谱法进行二次分离纯化, 最后对获得产物进行纯度和结构鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桃儿七样品购买于青海省西宁市八一路药材市场, 由中国科学院西北高原生物研究所马世震研究员鉴定为桃儿七; 鬼臼毒素标准品(纯度 $\geq 98\%$, 批号:17112303, 成都普菲德生物技术有限公司); 甲酸(色谱纯, 天津市凯信化学工业有限公司); 乙腈(色谱纯, 德国默克股份两合公司); 甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司); 无水乙醇(分析纯, 成都市科隆化学品有限公司); 大孔吸附树脂 AB-8、HPD-300、HPD-600、HPD-100、D3520、HPD-450、DA-201、D101、DM301、HPD-400、X-5(上海紫铭试剂厂)。

1.2 仪器与设备

ML2047 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); SL-500A 型高速万能粉碎机(浙江省永康市松青五金厂); BPG-9140A 型电热鼓风干燥箱(一恒科学仪器有限公司); Agilent Infinity 1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 安捷伦科技有限公司); 汉邦半制备高效液相色谱仪, 汉邦科技 NU3000D 检测器, NP7005C 输液泵(江苏汉邦科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 提取物制备

参考 Liu 等^[18] 的超声辅助提取方法, 在料液比为 1:40 (g:mL), 超声时间为 21 min, 超声温度为 55 °C, 甲醇体积分数为 82% 的提取条件下, 得到桃儿七鬼臼毒素粗提液。

1.3.2 标准曲线

称取鬼臼毒素标准品 0.001 g, 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液溶解并定容至刻度, 得浓度为 0.1 μg/μL 的标准品溶液。吸取配置的标准品溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 采用非极性 C₁₈ 色谱柱, 以乙腈(A)-0.04% 甲酸水溶液(B) 为流动相, 梯度洗脱(表 1), 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 290 nm。依次设定进样量 2、4、6、8、10、12、14、16 μL, 按表 1 的色谱条件进行测定分析。以对照品质量(X) 为横坐标, 峰面积(Y) 为纵坐标, 进行线性回归分析。

表1 梯度洗脱的流动相比例

Table 1 The mobile phase ratio of gradient elution

时间 Time (min)	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)
0	15	85
4	15	85
10	24	76
15	24.5	75.5
20	32	68
25	32	68
35	55	45
40	55	45

1.3.3 树脂预处理

称取 5 g 不同型号的大孔树脂浸泡于 90% 乙醇 24 h, 充分溶胀后湿法装柱, 采用 90% 乙醇反复冲洗, 直至洗出液与水混合 ($V_{液}:V_{水}=1:5$) 后澄清, 继续水洗至无醇味, 另加入 5% 盐酸浸泡 3 h, 用水洗至中性后; 再加入 5% 氢氧化钠溶液浸泡 3 h, 用水洗至中性, 备用^[19]。

1.3.4 树脂型号选择

称取 12 种不同型号的大孔树脂 (AB-8、HPD-300、HPD-600、HPD-100、D3520、HPD-450、DA-201、D101、DM301、HPD-400、X-5) (见表 2) 各 0.5 g 置于锥形瓶内, 分别加入质量浓度为 1.54 mg/mL 的鬼臼毒素提取液 50 mL, 静态吸附 24 h, 期间分别充分

表2 12种试验树脂的性能参数

Table 2 Physical properties of the test macroporous resins

树脂型号 Resin type	极性 Polarity	结构 Structure	比表面积 Specific surface are (m ² /g)	粒径 Partical size (mm)
AB-8	弱极性	苯乙烯	480 ~ 20	0.30 ~ 1.25
HPD-400	极性	丙烯酸酯	500 ~ 550	0.30 ~ 1.20
D3520	非极性	苯乙烯	570 ~ 590	0.30 ~ 1.20
HPD-450	弱极性	苯乙烯	500 ~ 550	0.30 ~ 1.20
X-5	非极性	苯乙烯	500 ~ 600	0.30 ~ 1.25
HPD-300	非极性		800 ~ 870	0.30 ~ 1.25
D101	非极性	苯乙烯	480 ~ 520	0.30 ~ 1.25
DM301	中等极性	苯乙烯	330 ~ 380	0.30 ~ 1.25
DA201	强极性	苯乙烯	150 ~ 200	0.30 ~ 1.25
NKA-9	极性	丙烯酰胺	250 ~ 290	0.30 ~ 1.25
HPD-600	极性	丙烯酰胺	550 ~ 600	0.30 ~ 1.20
HPD-100	非极性	苯乙烯	550 ~ 600	0.30 ~ 1.20

摇动 12 次左右, 随后过滤, 测定滤液鬼臼毒素含量, 通过式(1)和(2)计算出不同型号大孔树脂的静态吸附量和吸附率^[20]。

$$E_e = (m_0 - m_e) / m \quad (1)$$

$$Q_e = (m_0 - m_e) / m_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: m_0 为提取液中鬼臼毒素含量, mg; m_e 为饱和吸附后滤液中鬼臼毒素含量, mg; m 为干燥的大孔树脂质量, g; E_e 为静态饱和和吸附量, mg/g; Q_e 为静态饱和和吸附率, %。将过滤后的树脂置于锥形瓶内, 加入 80% 乙醇 50 mL, 静态洗脱 24 h, 过滤, 测定滤液中鬼臼毒素含量, 通过(3)和(4)式计算不同型号树脂的洗脱率和回收率。

$$D_d = m_d / (m_0 - m_e) \times 100\% \quad (3)$$

$$R = m_d / m_0 \times 100\% \quad (4)$$

式中: m_0 为提取液中鬼臼毒素含量, mg; m_e 为饱和吸附后滤液中鬼臼毒素含量, mg; m_d 为洗脱液中鬼臼毒素质量, mg; D_d 为静态洗脱率, %; R 为回收率, %。

1.3.5 动态吸附试验

1.3.5.1 上样液浓度影响

配制质量浓度分别为 1.85、0.93、0.46、0.23 和 0.12 mg/mL 的鬼臼毒素提取液 60 mL, 以流速 3 mL/min 上样至大孔树脂内, 分别收集柱后流出液, 测定其鬼臼毒素含量。

1.3.5.2 上样流速影响

配制浓度为 0.46 mg/mL 鬼臼毒素提取液 60

mL,分别以 1、3、5、7 和 9 mL/min 流速上样至大孔树脂内,分别收集柱后流出液,测定其中鬼臼毒素含量。

1.3.5.3 上样体积影响

配制浓度为 0.46 mg/mL 鬼臼毒素提取液 60 mL,以流速 3 mL/min 上样至大孔树脂内,分段收集柱后流出液,每段 15 mL,测定收集液中鬼臼毒素含量,绘制泄露曲线。

1.3.5.4 洗脱液浓度影响

配制浓度为 0.46 mg/mL 的鬼臼毒素提取液 60 mL,以流速 3.0 mL/min 上样至大孔树脂后,分别采用 90 mL 质量浓度为 50%、60%、70%、80% 和 90% 的乙醇溶液以 2.0 mL/min 流速洗脱,分别收集柱后洗脱液,测定其鬼臼毒素浓度。

1.3.5.5 洗脱流速影响

配制浓度为 0.46 mg/mL 的鬼臼毒素提取液 60 mL,以 3.0 mL/min 流速上样至大孔树脂后,用 90 mL 80% 乙醇溶液分别以 1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mL/min 流速洗脱,分别收集柱后洗脱液,测定其鬼臼毒素浓度。

1.3.5.6 洗脱液体积影响

配制浓度为 0.46 mg/mL 的鬼臼毒素提取液 60 mL,以 3.0 mL/min 流速上样至大孔树脂后,用 80% 乙醇溶液以 2.0 mL/min 流速洗脱,分段收集柱后洗脱液,每段 10 mL,测定各段收集液中鬼臼毒素含量,绘制洗脱曲线。

1.3.6 PHPLC 单因素的考察

1.3.6.1 色谱柱型号的考察

在柱温 30 °C,体积流量为 1 mL/min,上样质量浓度为 4.2 mg/mL,上样体积为 10 μ L 的条件下,考察不同型号的色谱柱 Ods、C30、安捷伦、Megres、Dubehe 和 Ods-AQ 对鬼臼毒素分离效果的影响。

1.3.6.2 流动相的选择

在柱温 30 °C,体积流量为 1 mL/min,上样质量浓度为 4.2 mg/mL,上样体积为 10 μ L 的条件下,考察不同比例的乙腈和水 (32:68、34:66、36:64、38:62、40:60) 对鬼臼毒素分离效果的影响。

1.3.6.3 进样量的考察

在柱温为 30 °C,体积流量为 5 mL/min 的条件下,以乙腈-水溶液 (34:66) 作为流动相,考察不同进样量 0.4、0.6、0.8、1 和 1.2 mL 对鬼臼毒素分离效果的影响。

1.3.6.4 流动相体积流量的影响

在柱温 30 °C,上样浓度为 4.2 mg/mL,上样体积为 1 mL 的条件下,以乙腈-水溶液 (34:66) 水溶液作为流动相,考察不同流量 10、12、14、16、18 mL/min 对鬼臼毒素分离效果的影响。

1.3.7 产品性质表征

1.3.7.1 纯度表征

分离制备所得鬼臼毒素通过 HPLC,在检测波长 290 nm 处,按“1.3.2”项下色谱条件,利用面积归一化法进行纯度分析。

1.3.7.2 结构表征

为进一步鉴定鬼臼毒素的化学结构,将从制备型 HPLC 收集的馏分在 45 °C 下用旋转蒸发仪中旋蒸除去有机试剂,在真空下干燥成粉末后进行氢谱和碳谱 NMR 分析。

2 试验结果

2.1 线性关系考察

按照“1.3.2”项色谱条件依次进样,测定峰面积。以峰面积积分值 (Y) 对进样量 (X) 进行线性回归,得鬼臼毒素回归方程为 $Y = 930.8 X + 9.7857$, $r = 0.9998$,表明鬼臼毒素在 0.2 ~ 1.6 μ g 具有良好线性关系。

2.2 不同型号树脂吸附与洗脱性能比较

由图 1 可知,12 种大孔吸附树脂对鬼臼毒素的吸附量大小排序依次为:AB-8 > NKA-9 > HPD-100 > HPD-450 > X-5 > HPD-300 > D-101 > HPD-600 > HPD-400 > DA201 > DM-301 > D3520;解析性能排序依次:D-101 > HPD-100 > HPD-300 > HPD-600 > X-5 > DM-301 > NKA-9 > HPD-450 > AB-8 > HPD-400 > DA201 > D3520;鬼臼毒素回收率排序依次为:HPD-100 > HPD-300 > X-5 > NKA-9 > D-101 > AB-8 > HPD-600 > HPD-450 > DM-301 > HPD-400 > DA201 > D3520,结果显示,AB-8、NKA-9、HPD-100 型树脂对鬼臼毒素的吸附效果最好,D101、HPD-100、HPD-300 型树脂对鬼臼毒素的解析效果最好,HPD-100 型树脂对鬼臼毒素的总回收率最高,因此综合考虑选择 HPD-100 型大孔吸附树脂对桃儿七鬼臼毒素进行纯化。

2.3 动态吸附试验

2.3.1 上样液浓度影响

不同上样液浓度对鬼臼毒素的吸附率影响见图 2A 所示。上样液质量浓度 0.46 mg/mL 时,树脂对鬼臼毒素的吸附率达到饱和,继续增大上样液浓度,吸附率保持不变。因此,最佳上样浓度为 0.46 mg/mL。

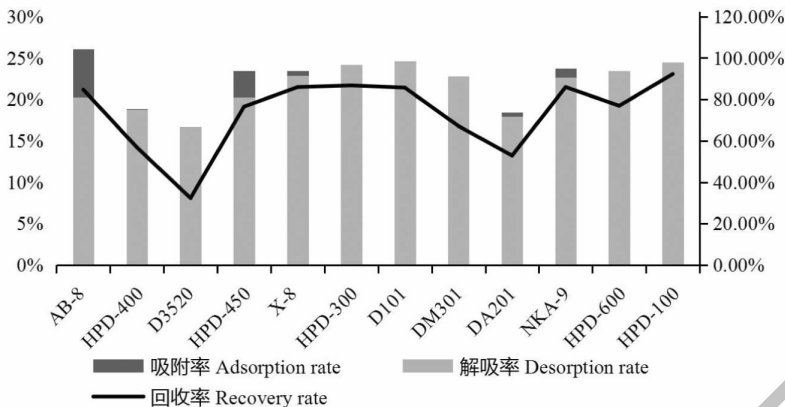


图 1 大孔树脂的静态吸附和解吸试验结果

Fig. 1 The result of static absorption and desorption tests on macroporous resins

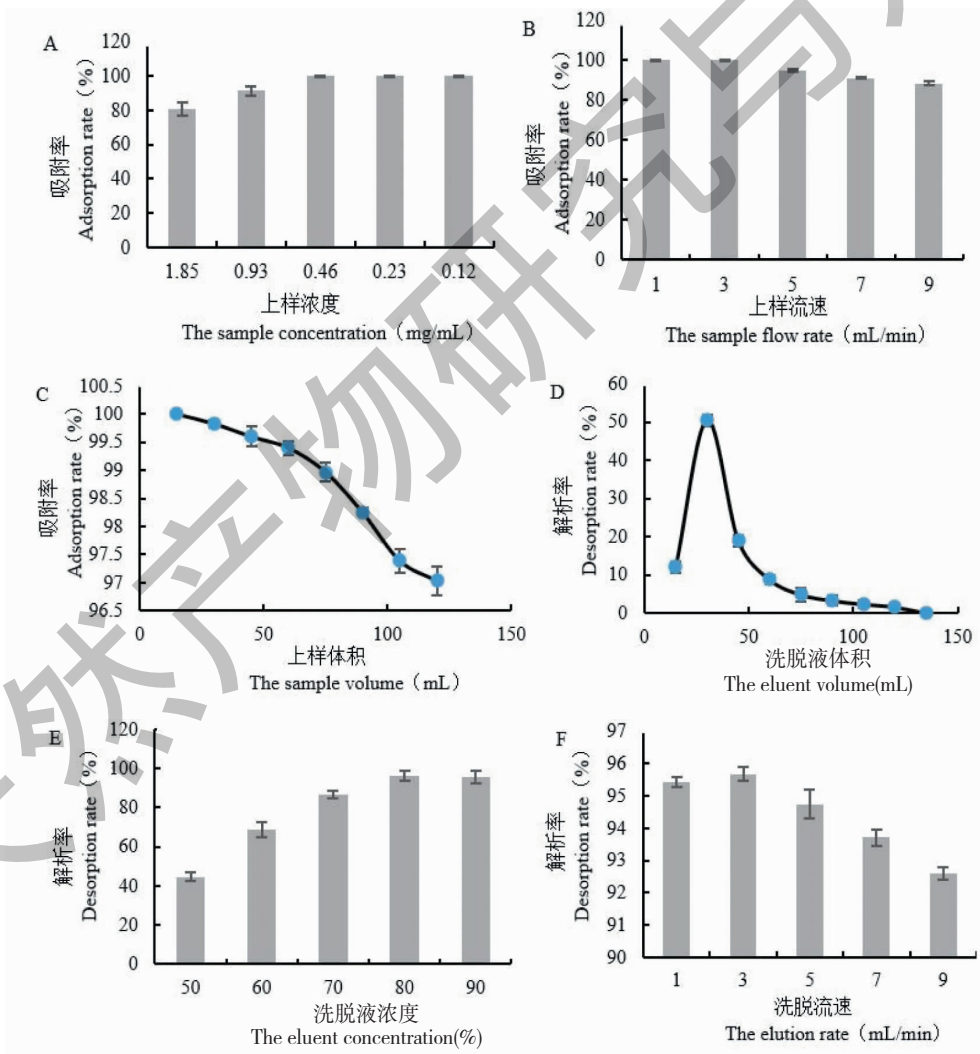


图 2 大孔树脂 HPD-100 的动态吸附试验结果

Fig. 2 The result of dynamic absorption on HPD-100 macroporous resins

2.3.2 上样流速影响

由图 2B 可知,树脂对鬼臼毒素的吸附率随流

速的增大而减小,当上样流速为 1 mL/min 和 3 mL/min 时树脂对鬼臼毒素的吸附量基本饱和,当上样

流速大于 3 mL/min 时吸附率显著降低,因此,最适上样流速为 3 mL/min。

2.3.3 上样液体积影响

不同上样液体积对树脂吸附鬼臼毒素的影响,见图 2C 所示。随着上样量的增加,收集的流出液中鬼臼毒素浓度随之增大,上样液体积超过 60 mL,流出液中鬼臼毒素浓度急剧上升,且大于上样液浓度的 10%,此时树脂吸附量达到泄漏点。因此,选择 60 mL 作为该纯化工艺上样液体积。

2.3.4 洗脱液体积影响

不同洗脱液体积对鬼臼毒素的洗脱影响见图 2D。洗脱液体积 35 mL 时,其鬼臼毒素含量达到最大值,随后洗脱液体积继续增大,鬼臼毒素含量不断下降,所得洗脱曲线单一、尖锐且无明显拖尾,在洗脱液体积达 120 mL 时,80% 乙醇溶液可基本完全洗脱树脂吸附的目标化合物。因此,最适洗脱液体积为 120 mL。

2.3.5 洗脱液浓度影响

不同浓度洗脱液对鬼臼毒素的洗脱率影响,见图 2E 所示。洗脱液浓度从 50% ~ 80%,鬼臼毒素解析率呈上升趋势,当乙醇体积分数大于 80% 时,鬼臼毒素解析率基本饱和,因此 80%、90% 乙醇适合用于鬼臼毒素的洗脱,但考虑到节约成本,减少实际消耗,选用 80% 的乙醇作为鬼臼毒素洗脱液。

2.3.6 洗脱流速影响

不同洗脱流速对鬼臼毒素洗脱率的影响见图 2F 所示。当洗脱流速为 1、3 mL/min 时,洗脱率基本保持不变,随着洗脱流速的增大,洗脱率持续减小,因此综合考虑生产时间及目标产物的得率,选择 3 mL/min 作为最适洗脱流速。

2.4 PHPLC 单因素试验结果

2.4.1 色谱柱型号的考察

由图 3 可知,不同色谱柱对桃儿七中活性成分的分离效果不同,色谱柱 Megres、Dubehe、C30 的分离效果最好,能将桃儿七中鬼臼毒素与其他活性成分明显分开。并且由于实验室并无色谱柱 C30 相应的制备柱,因此,选择 Megres、Dubehe 这两种色谱柱进行进一步分离制备桃儿七鬼臼毒素研究。

2.4.2 流动相的选择

如图 4 所示,乙腈与水的比例不同,桃儿七中各种活性成分之间的分离程度不同。乙腈浓度较低时,相应的时间内无法洗脱出鬼臼毒素,乙腈浓度较

高时,各化合物出峰时间早,但桃儿七中各活性成分之间分离度较差,不能将鬼臼毒素与其他活性成分分开。在乙腈:水 = 34:66 时,鬼臼毒素分离效果最好,且耗时较短。因此,选择 34% 的乙腈作为流动相。

2.4.3 进样量的考察

制备过程中,进样量大于 1 mL,34% 的乙腈洗脱时分离效果较差,且出现峰形不对称的现象,废液中也有鬼臼毒素检出;当进样量为 0.4、0.6、0.8 mL 时,废液中虽无鬼臼毒素检出,分离效果较好,但制备效率较低,且造成有机试剂的浪费。因此,选择最适进样量为 1 mL。

2.4.4 流动相体流量的影响

在桃儿七鬼臼毒素的制备过程中,当流动相体流量大于 14 mL/min 时,制备系统压力较大,太大内压可能会对仪器产生损伤;当体流量较低时,延长鬼臼毒素出峰时间,制备效率较低。因此,流动相的最适体流量为 14 mL/min。

2.5 产品表征

2.5.1 纯度表征

HPLC 纯度表征结果如图 5 所示,积分结果表明其中无明显杂质峰存在,且鬼臼毒素纯度大于 98%,鬼臼毒素出峰时间与标品一致。

2.5.2 结构表征

鬼臼毒素溶液除去溶剂后溶解于氘代丙酮中,做核磁共振分析,氢谱和碳谱核磁数据归属如下。¹H NMR(600 MHz, (CD₃)₂CO) δ: 7.18(1H, s, H-5), 6.5(1H, s, H-8), 6.41(2H, s, H-2', 6'), 5.99(2H, d, *J* = 3.6 Hz, OCH₂O), 4.95(1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-4), 4.56(1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-1), 4.50(1H, dd, *J* = 8.0 Hz, H_α-3a), 4.13(1H, dd, *J* = 8.8, 8.0 Hz, H_β-3a), 3.68(3H, s, 4'-OMe), 3.67(6H, s, 3', 5'-OMe), 3.05(1H, dd, *J* = 13.2, 4.8 Hz, H-2), 2.84(1H, m, H-8); ¹³C NMR(150 MHz, (CD₃)₂CO) δ: 44.7(C-1), 44.7(C-2), 174.3(C-2a), 40.8(C-3), 71.7(C-3a), 71.8(C-4), 107.9(C-5), 147.3(C-6), 147.2(C-7), 109.2(C-8), 131.5(C-9), 134.9(C-10), 136.4(C-1'), 109.2(C-2'), 153.6(C-3'), 137.4(C-4'), 152.6(C-5'), 109.2(C-6'), 101.3(OCH₂O), 55.6(OMe-3'5'), 59.6(OMe-4')。与文献报道^[21]基本一致,故确定该化合物为鬼臼毒素。

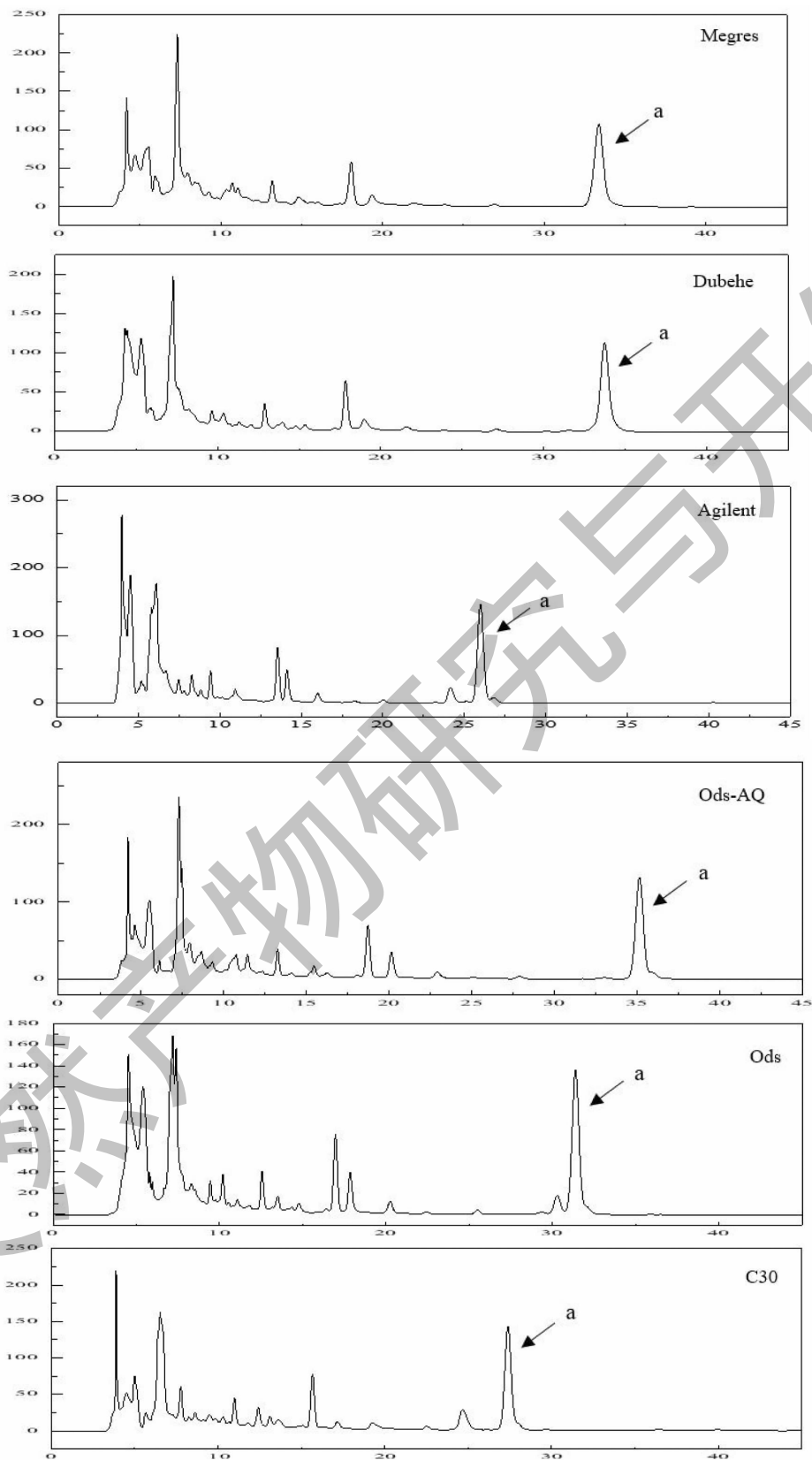


图3 不同型号色谱柱对鬼臼毒素分离效果的影响

Fig. 3 The effect of different types of chromatographic columns on the separation of podophyllotoxin

注:以下图中a均表示鬼臼毒素色谱峰。Note:The chromatographic peaks of podophyllotoxin are shown in "a" in the following figure.

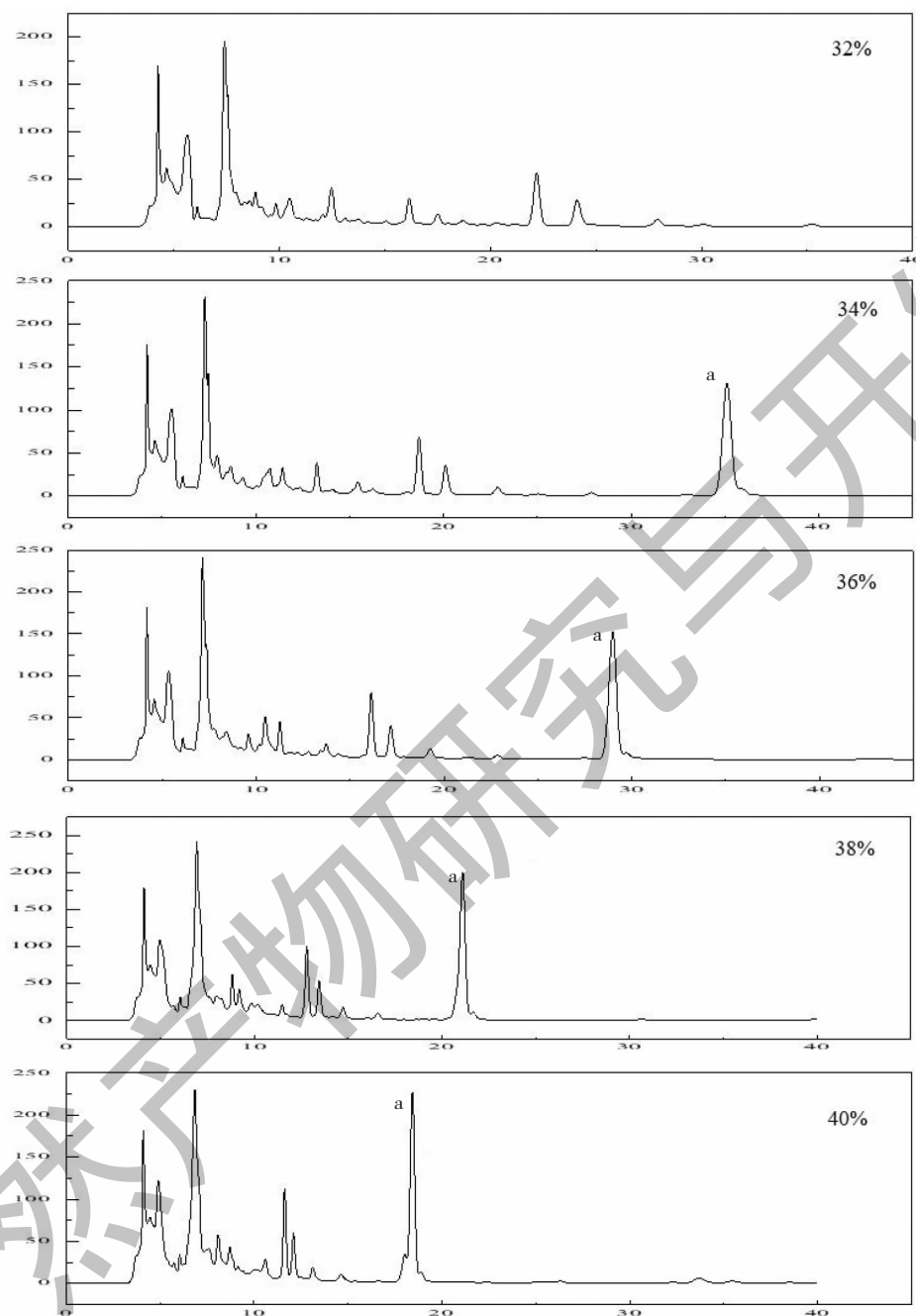


图4 不同比例的流动相对鬼臼毒素分离效果的影响

Fig. 4 The effect of different proportion of mobile phase on the separation of podophyllotoxin

3 讨论与结论

大孔吸附树脂是一类不含有离子交换基团且具有大孔结构的高分子吸附剂,它主要通过吸附性和分子筛原理,根据化合物分子质量的大小和吸附力的强弱,在大孔吸附树脂上经一定浓度和一定量的溶剂洗脱而达到分离的目的^[22]。吸附效果的好坏

通常取决于被吸附化合物的极性强弱和分子质量的大小,不同型号树脂由于具有不同极性、孔径与比表面积,所以对目标化合物的吸附作用和解析性能大有不同^[23]。本试验考察的12种大孔吸附树脂中,AB-8、HPD-450属于弱极性树脂,HPD-100、D101、X-5、HPD-300等属于非极性树脂,通常极性物质在水

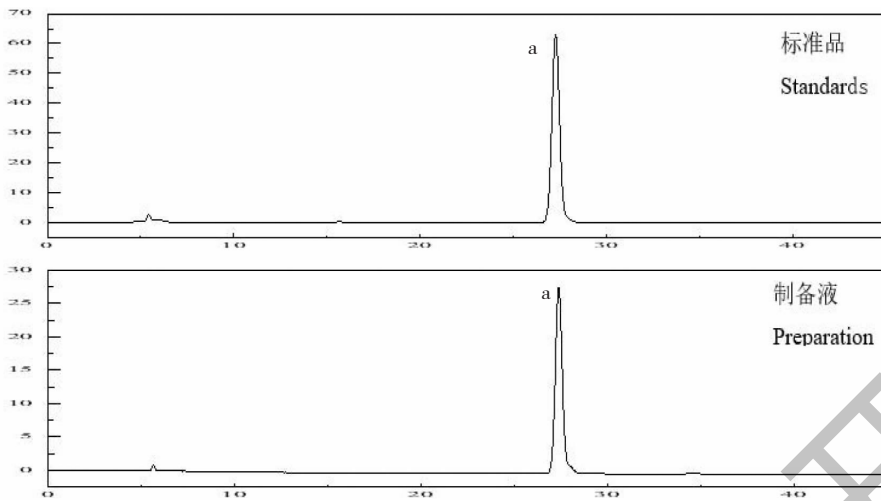


图5 桃儿七鬼臼毒素标准品与纯化产物对比图

Fig. 5 The comparison diagram of podophyllotoxin standard and purified product

溶液中易被极性的树脂吸附,非极性物质在水溶液中易被非极性的树脂吸附。结果表明 AB-8、HPD-100 型大孔树脂静态吸附木脂素类化合物的吸附率高于其他树脂,与 Li^[24]、Huang^[25] 等研究结果一致。主要原因是桃儿七中木脂素类成分是一类低极性小分子化合物,而弱极性大孔吸附树脂(A8-8、HPD-100 等)孔表的疏水性较强,不含任何功能基团,它通过与小分子内的疏水部分作用来吸附溶液中的有机物,最适合从极性溶剂中吸附弱极性物质,使得对木脂素类成分具有较好的分离效果。而 D101 树脂的解析性能最强,其次为 HPD-100,与 Shao 等^[26] 在大孔树脂富集纯化牛蒡子中木脂素的工艺研究结果一致。Wang^[27] 研究结果表明,HPD-100 型大孔吸附树脂对桃儿七水提取物中鬼臼毒素具有良好的吸附能力。综合考虑不同型号的吸附、解析性能及回收率,本研究选择 HPD-100 作为分离纯化桃儿七鬼臼毒素的最佳树脂。

大孔树脂的吸附率随着上样液质量浓度的增加而缓慢降低,若继续增加上样液质量浓度,其吸附率迅速降低,这是由于在等温条件下,当上样液质量浓度较低时,木脂素类化合物与树脂接触得越充分,大孔树脂的吸附率越高,但是吸附量较小;当上样液质量浓度过大时,受到大孔树脂吸附容量和孔容的影响,导致大孔树脂吸附量、吸附率均减小。上样液质量浓度过低会导致吸附量太小,纯化效率不高,而上样液质量浓度过高会导致大孔树脂吸附不充分,浪费原料^[28]。另外在动态吸附试验中如果上样和洗脱时流速过大,就会使树脂的吸附量下降,导致提早

泄漏,耗能增多,所以在考察其他因素对纯化的影响时,应尽量将流速均限定在最小范围内流出液中木脂素浓度随上样速度增加而上升,因为流速主要影响提取液中溶质分子向树脂表面扩散,当流速过大时,粗提液中的分子还没来得及被树脂吸附,就已经流出层析柱;而流速较慢时,溶液中的木脂素分子可以和树脂充分接触,吸附率较高,但如果流速过慢,会使过柱时间过长^[29]。

其次,洗脱时洗脱液的体积分数对树脂的解析性能有一定的影响,通常乙醇体积分数较低时,大孔树脂的解析率也很低,随乙醇体积分数增大,解析率逐渐上升即解析液中木脂素的含量随之增大。本试验中,当乙醇体积分数为 80% 时,解析液中鬼臼毒素含量最高,继续增加乙醇浓度,鬼臼毒素含量呈下降趋势。这可能是由于木脂素类分子利用氢键作用力吸附在大孔树脂上,乙醇体积分数的提高加大了对氢键的破坏,所以解析率随着升高^[30]。当乙醇体积分数超过 80% 后,由于乙醇溶液与木脂素类化合物的极性差异导致吸附在树脂上的木脂素得不到充分溶解,所以解析率呈下降趋势^[31]。因此,选择体积分数为 80% 的乙醇溶液进行洗脱。

与分析色谱比较,PHPLC 要求在尽可能短的时间内获得更多的目标产物,属于非线性色谱。目标产物的质量分数、产量、消耗时间和成本等往往是 PHPLC 的主要考量因素^[32]。制备型高效液相色谱在分离制备研究中,进样量、流动相和体积流量是影响其制备效率关键的因素^[33]。本试验以目标化合物的分离度和制备时间作为考察指标来综合评价分

离质量和分离效率,分别考察了色谱柱型号、流动相的比例、体积流量和进样量这四个因素对分离效果的影响。而对于半制备色谱,其他色谱条件确定后,进样量是最重要的参数,它直接决定生产量的大小和制备单体化合物的纯度。试验结果表明,当进样量大于 1 mL 时,色谱分辨率急剧下降,即使增大流动相流量,也不能实现理想的分离效果,当进样量为 1.2 mL 时,出现峰形不对称,表明上样量已超过等温吸附的线性范围,当进样量低于 1 mL 时,可以实现理想的分离效果,但每次制备的目标化合物较少,且造成试剂、时间的浪费,因此本研究选定的最佳进样量为 1 mL。本研究通过单次 PHPLC 分离,即可得到纯度较高的鬼臼毒素单体,整个制备过程仅需 38 min,分离效果较好,可连续进样制备,分离所得的产品鬼臼毒素的纯度 >98%,可用于新药研发的分析样品。

本试验首先对 12 种大孔吸附树脂的吸附和解吸性能进行比较,最终确定 HPD-100 型大孔树脂为分离纯化桃儿七鬼臼毒素的最佳树脂;并通过 HPD-100 型大孔树脂的动态吸附试验,确定分离纯化桃儿七鬼臼毒素的工艺参数为:上样浓度 0.46 mg/mL、上样体积 60 mL、上样流速 3 mL/min、洗脱液 80% 乙醇、洗脱流速 3 mL/min 和洗脱体积 120 mL。其次在大孔树脂初步分离纯化基础上,采用 PHPLC 进行桃儿七鬼臼毒素的分离制备,结果表明在流动相为 34% 的乙腈,进样量 1 mL,恒定流速 14 mL/min 时,可快速高效制备得高纯度的鬼臼毒素,每次制备仅需 38 min。制备所得化合物经鉴定为纯度 98% 以上的鬼臼毒素。

参考文献

- Xu WH, Xu WJ, Li YL. Study on the optimization of culture conditions of Tibetan medicine *Sinopodophyllum hexandrum* seeds *in vitro* [J]. J Chin Mater Med (中药材), 2019, 42: 725-729.
- Kumar NP, Afroz AM, Harvinder S, et al. Assessment of genetic diversity through RAPD, ISSR and AFLP markers in *Podophyllum hexandrum*; a medicinal herb from the North-western Himalayan region [J]. Physiol Mol Biol Pla, 2010, 16: 135-148.
- Li MF, Ge L, Kang TL, et al. High-elevation cultivation increases anti-cancer podophyllotoxin accumulation in *Podophyllum hexandrum* [J]. Ind Crop Prod, 2018, 121: 338-344.
- Ze RWM, Yu SL, Ni Z, et al. The Investigation on distribution and resource amount of 13 Tibetan medicine plants in Tibet [J]. Beijing Agr (北京农业), 2010(36): 56-60.
- Xiong WY. Studies on the chemical constituents and resources of the endangered plant *Sinopodophyllum hexandrum* [D]. Xi'an: Northwest University (西北大学), 2010.
- Qin Y. Studies on chemical constituents of *Sinopodophyllum emodi* wall [D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2009.
- Liao KP. A new technology for preparing podophyllotoxin of high purity [J]. Anhui Chem Ind (安徽化工), 2012, 38(6): 25-26.
- Wen PH. New preparation technology of high purity podophyllotoxin [J]. Fine Chem (精细化学), 2001(10): 605-607.
- Tang YF, Pu CH, Zhang Y, et al. Separation and purification of flavonoids from buckwheat hull with macroporous resins and evaluation of antioxidant activities [J]. J Jilin Agr Univ (吉林农业大学学报): 1-9 [2021-04-26]. <https://doi.org/10.13327/j.jilau.2020.5029>.
- Li PX, Gan NX, Jin Y, et al. The separation process of total flavonoids and total saponins from fibrous roots of *Ophiopolygon japonicus* by macroporous resins [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2020, 45(5): 221-227.
- Ma RL, Li M, Xu XQ, et al. Preparation of total diterpenes from *Rabdosia excisa* (Maxim.) Hara by microporous adsorption resin [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2014, 36: 848-851.
- Liu Y, Chen WH, Kang D, et al. Research progress on macroporous resin application in enriching and separating alkaloids [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 1650-1659.
- Wei Q. Application of macroporous resin adsorption technology in Chinese traditional medicine compound preparation [J]. J Tradit Chin Vet Med (中兽医医药杂志), 2009, 28(4): 76-78.
- Dong MY. Research progress on purification technology of lignans from Schisandraceae by microporous resin [J]. Seed Sci Technol (种子科技), 2018, 36(12): 119-120.
- Li HJ, Liu Y, Yi YT, et al. Purification of quercetin-3-O-sophoroside and isoquercitrin from *Poa cynosuroides* leaves using macroporous resins followed by Sephadex LH-20 column chromatography [J]. J Chromatogr B, 2017, 1048: 56-63.
- Wang XR, Qi JP, Wu XQ, et al. Advances in drug separation and purification by preparative high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab (分析实验室), 2014, 33: 1476-1480.

- 17 Wu X, Deng Q, Cen JR, et al. Application of preparative high performance liquid chromatography in separation of natural product[J]. Chem Anal Meter(化学分析计量), 2017, 26(1):113-117.
- 18 Liu YY, Li CX, Feng HS, et al. Optimization of ultrasonic extraction of podophyllotoxin from *Sinopodophyllum hexandrum* by response surface methodology [J]. Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源), 2020, 39(4):11-16.
- 19 Tan JQ, Sun Q, Liu CC, et al. Adsorption properties of macroporous resin for adsorption of anthocyanins from raspberry [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2018, 43(9):302-309.
- 20 Zhang P, Song ZJ, Xing ZF. Process of macroporous resin for purification of total saponins in *Polygonatum sibiricum* extract by response surface methodology [J]. The Food Ind(食品工业), 2019, 40(10):136-141.
- 21 Xiao CQ. Study on the components of *Podophyllum emodi* Wall and preliminary study on the resources of podophyllotoxin analogues[D]. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), 2007.
- 22 Wei H, Ruan JL, Lei YF, et al. Enrichment and purification of flavones from rhizomes of *Abacopteris penangiana* by macroporous resins [J]. Chin J Nat Med, 2012, 10(2):119-124.
- 23 Liang L, Liu GM, Yu GY, et al. Simultaneous decoloration and purification of crude oligosaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch) by macroporous adsorbent resin [J]. Food Chem, 2019, 277:744-752.
- 24 Li P, Li XF, Shang ZY, et al. Research on the purification process of total lignans in *Schisandra chinensis* with macroporous resin [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med(成都中医药大学学报), 2015, 38(3):35-37.
- 25 Huang JF, Zhou XD, Zhou S. Process investigation on purification of *Schisandra chinensis* lignans by macroporous resin [J]. Chin J Mod Drug App(中国现代药物应用), 2014, 8(19):12-16.
- 26 Shao J, Ren Y, Yu XH. Enrichment and purification of ligans from *Arctium lappa* L. with microporous resin [J]. J Chin Mater Med(中药材), 2016, 39:2306-2309.
- 27 Wang JH, Jin ZM, Li MX. Enrichment and purification of podophyllotoxin from *Sinopodophyllum hexandrum* with microporous resin [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2016, 38:212-215.
- 28 Wang L, Sui CH. Study on separation and purification of anthocyanins from black rice by macroporous resin [J]. Cereals Oils, 2021, 34(2):104-107.
- 29 Xu LL, Wang YC, Xue GJ, et al. Study on extraction and purification technology of total lignans in *Schisandra chinensis* and its activity analysis [J]. J Jilin Med Univ(吉林医药学院学报), 2018, 39:467-469.
- 30 Zhang Y, Wang BY, Jia Z, et al. Adsorption/desorption characteristics and enrichment of quercetin, luteolin and apigenin from *Flos populi* using macroporous resin [J]. Rev Bras Farmacogn, 2019, 29(1):69-76.
- 31 Ma CH, Liu TT, Yang L, et al. Preparation of high purity biphenyl cyclooctene lignans from *Schisandra* extract by ion exchange resin catalytic transformation combined with macroporous resin separation [J]. J Chromatogr B, 2011, 879:3444-3451.
- 32 Xu J, Fan KM, Qian JQ. Isolation of isoorientin and orientin from bamboo leaf flavones using preparative high-performance liquid chromatography [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45:2184-2188.
- 33 Kuang PQ, Song D, Yuan QP, et al. Separation and purification of sulfuraphene from radish seeds using macroporous resin and preparative high-performance liquid chromatography [J]. Food Chem, 2013, 136:342-347.