



酸水解工艺提高喜树果中 10-羟基喜树碱含量的 HPLC 法考察

郭 群

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430064)

摘要: 考察喜树果中的 10-羟基喜树碱葡萄糖苷转化为 10-羟基喜树碱的情况,以便提高 10-羟基喜树碱的收得率。通过高效液相色谱法,测定喜树果酸水解前后,10-羟基喜树碱与 10-羟基喜树碱葡萄糖苷的面积比值。结果显示,酸水解后 10-羟基喜树碱与 10-羟基喜树碱葡萄糖苷的峰面积比值明显增加。证明酸水解工艺能将喜树果中的 10-羟基喜树碱葡萄糖苷转化为 10-羟基喜树碱。

关键词: 喜树果;10-羟基喜树碱葡萄糖苷;10-羟基喜树碱;酸水解;高效液相色谱法

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1671-931X (2019) 04-0082-04

10-羟基喜树碱(10-hydroxycamptothecin,HCPT)是从珙桐科植物喜树(Camptotheca acuminata Decne)中分离得到的具有较强抗肿瘤活性的一种生物碱^[1],它不仅是临床效果较好的抗肿瘤药物^[2],而且还是制备其他喜树碱类衍生物药品的重要中间体^[3]。由于喜树中 10-羟基喜树碱含量甚微^[4],因此需要寻找新的资源,以及研究提取率更高的制备方法。我们在前期研究中,从喜树果中提取得到一个化合物的,命名为 10-O-(1-β-D-glycosyl) camptothecin^[5],其结构为 10-羟基喜树碱葡萄糖苷。从结构上分析,如果能将葡萄糖苷键水解^[6,7],将可获得 10-羟基喜树碱。本研究通过高效液相色谱法^[8-10],考察喜树果原料经过酸水解后,其中 10-羟基喜树碱葡萄糖苷转化为 10-羟基喜树碱的情况,为改进 10-羟基喜树碱提取工艺,提高收得率,提供实践依据。

一、材料及仪器

10-羟基喜树碱葡萄糖苷为本研究课题组提取制备,10-羟基喜树碱对照品由李时珍药业集团提供;喜树果采购自湖北;甲醇和乙腈均为色谱纯;

UV-1800 紫外可见分光光度仪(日本岛津);LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津)配备 Inertsil® ODS-SP 4.6×150 mm 5 μm 分离柱(日本岛津)和 LCsolution Lite 工作站软件。

二、实验

(一)10-羟基喜树碱葡萄糖苷和 10-羟基喜树碱的 HPLC 色谱条件考察

1.10-羟基喜树碱葡萄糖苷和 10-羟基喜树碱紫外吸收波长测定

分别称取 1.5mg 10-羟基喜树碱葡萄糖苷和 10-羟基喜树碱溶解于 10ml 甲醇中,取溶解后的溶液置于石英比色皿中在 200nm-600nm 范围内进行紫外扫描,数据显示 10-羟基喜树碱葡萄糖苷的最大波长为 263nm,10-羟基喜树碱的最大吸收波长为 267nm。因此,选择中间值 265nm 作为高效液相色谱法的检测波长。

2.10-羟基喜树碱葡萄糖苷和 10-羟基喜树碱对照品的 HPLC 图谱

10-羟基喜树碱葡萄糖苷和 10-羟基喜树碱的溶

收稿日期:2019-05-24

项目来源:武汉职业技术学院科研项目“10-羟基喜树碱衍生物的转化利用研究”(项目编号:2015YK011)。

作者简介:郭群(1959-),女,湖北武汉人,硕士,武汉职业技术学院教授,研究方向:天然药物化学。

液浓度与紫外扫描样品相同,进样前用 0.45 μ m 微膜过滤。HPLC 参数:检测波长 267nm,流速 1.0mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,流动相:乙腈-水 20:80,进样量 15 μ l。结果显示,10-羟基喜树碱葡萄糖苷 tR(min)为 4.270,10-羟基喜树碱 tR(min)为 11.025。

10-羟基喜树碱葡萄糖苷和 10-羟基喜树碱对照品的 HPLC 图如图 1 和图 2。

(二)喜树果样品的 HPLC 测定

1.喜树果样品的处理

称取喜树果粗粉 1.000g,用 70%乙醇 15mL 溶解,在 35 $^{\circ}$ C 工作频率为 40kw 的条件下超声 50min;将上述所得溶液静置,取 1mL 上清液在 5000r/min 下离心 10min;取离心后的上清液,通过 0.45 μ m 薄膜过滤,得到喜树果提取液。

2.高效液相色谱法测定

高效液相色谱条件:流动相:乙腈:水=20:80;波长:267nm;进样量:25 μ l;柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:1.000mL/min。

样品测定:用进样针取 25 μ l 喜树果提取液进行

HPLC 检测,见图 3。初步推断在 11.053min 处的峰可能为 10-羟基喜树碱,而 10-羟基喜树碱葡萄糖苷因为亲水性较强,保留时间较短,峰位置不清晰,根据其对照品保留时间推断,应该在 4.205min 处。因此,需要选择梯度洗脱色谱条件。

3.梯度洗脱色谱条件的确定

高效液相色谱条件,流动相:乙腈:水=16:84 \rightarrow 22:78;波长:265nm;柱温:40 $^{\circ}$ C;流量:1.000mL/min;进样量:25 μ l;二元高压梯度泵。经过多次实验,选定了基本满足实验要求的梯度洗脱时间程序。即 LC 时间程序设置为在 0.01min 时,乙腈:水=16:84;5.00min 时,乙腈:水=18:82;7.00min 时,乙腈:水=20:80;15.00min 时,乙腈:水=22:78。LC 时间程序通过改变流动相的比例将前面比较密集的峰分开,而将后面比较稀疏的峰提前,缩短测定时间。

4.喜树果提取液梯度洗脱 HPLC 测定

用梯度洗脱色谱条件对喜树果提取液进行 HPLC 检测,结果如图 4:

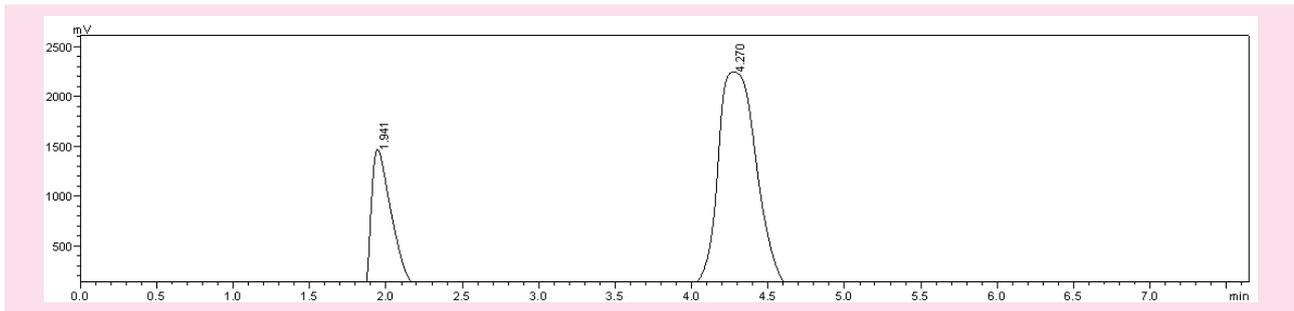


图 1 10-羟基喜树碱葡萄糖苷的 HPLC 图谱

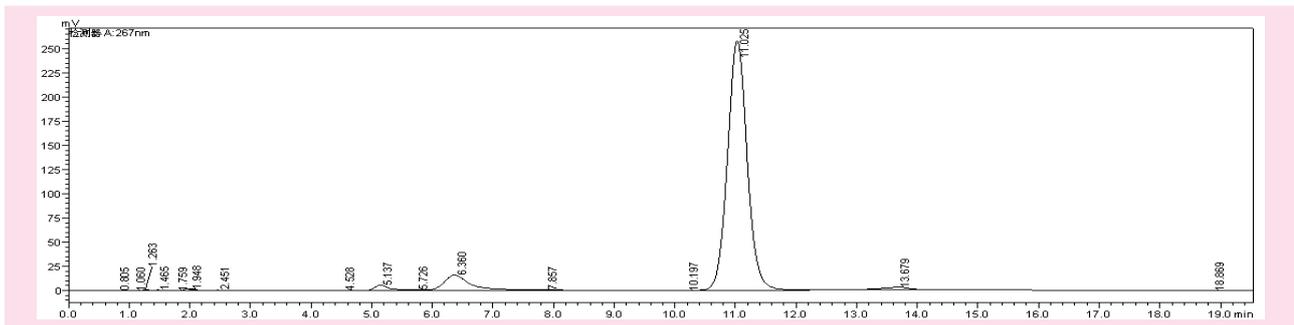


图 2 10-羟基喜树碱的 HPLC 图谱

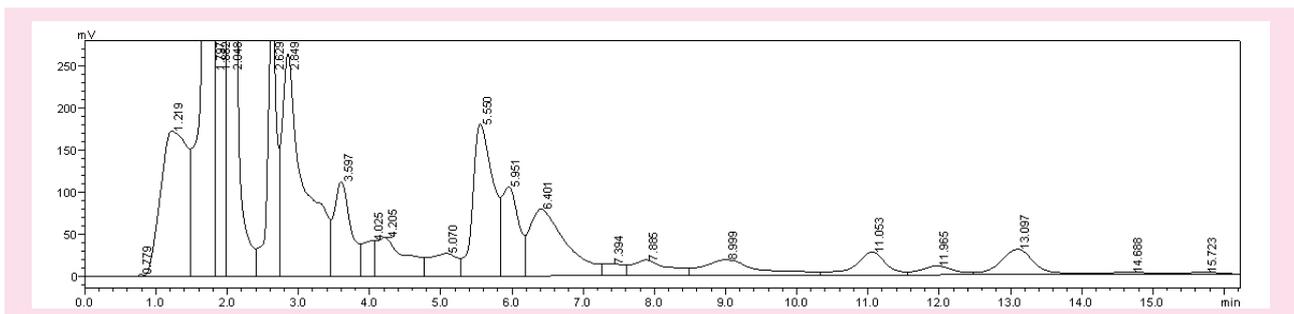


图 3 喜树果样品的 HPLC 检测图

保留时间为 6.049min 的峰,峰面积为 2211797,推测该位置为 10-羟基喜树碱葡萄糖苷;保留时间为 14.753min 的峰,峰面积为 701473,推测该位置为 10-羟基喜树碱。峰的准确位置,还需通过样品加标实验进一步确认。10-羟基喜树碱与 10-羟基喜树碱葡萄糖苷的峰面积之比为 0.317。峰面积值由 LCsolution Lite 工作站软件计算。

5. 样品加标试验

准确确定羟基喜树碱和羟基喜树碱葡萄糖苷的峰位置。色谱条件用梯度洗脱色谱条件,同上。取上述处理好的喜树果提取液两份,在其中分别加入 10-羟基喜树碱和 10-羟基喜树碱葡萄糖苷对照品,取混合后的溶液 25ul 进行 HPLC 检测,结果如图 5 和图 6。

与未添加对照品的喜树果提取液的 HPLC 图谱比较(见图 4),加了 10-羟基喜树碱的图谱,在

14.689min 处的峰明显增大,可以确定 14.689min 处的峰为 10-羟基喜树碱,见图 5;加了 10-羟基喜树碱葡萄糖苷的图谱,在 5.941min 处的峰明显增大,确定为 10-羟基喜树碱葡萄糖苷。图谱比对,可确定喜树果提取液梯度洗脱时在 6.049min 和 14.753min 处出峰分别为 10-羟基喜树碱葡萄糖苷和 10-羟基喜树碱。

(三) 喜树果样品酸水解及水解样品的 HPLC 测定

准确称取 1.00g 湖北产喜树果粉末,加入 6mL 0.5%(v/v)的盐酸在 75℃下水浴加热 2h,向其水解液中加入 9mL 无水乙醇,在 30℃下以 4000Hz 超声 50min,静置,取其上清液,以 5000r/min 离心 10min,取其上清液,用 0.45um 的膜过滤,用进样针取 25ul 进样,计算羟基喜树碱葡萄糖苷和羟基喜树碱的面积比。如图 7。

当 $t_R=5.980\text{min}$ 时,羟基喜树碱葡萄糖苷出峰,

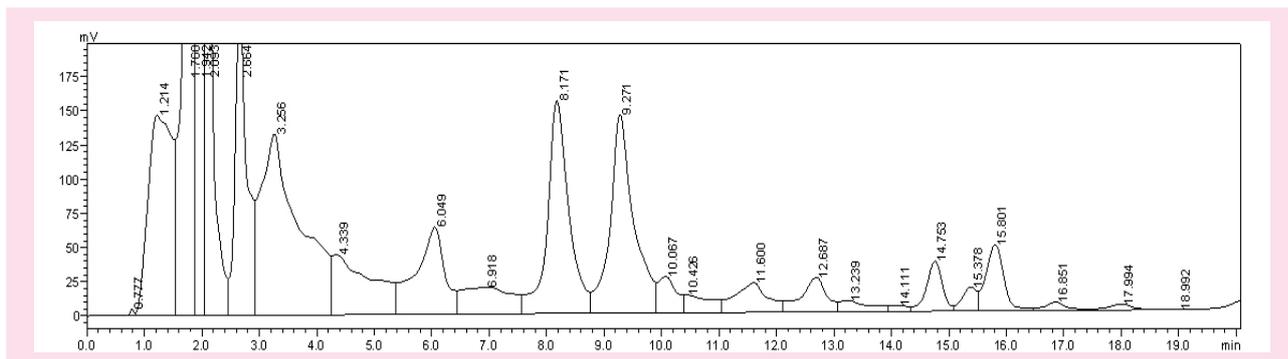


图 4 喜树果提取液的梯度洗脱 HPLC 的检测图

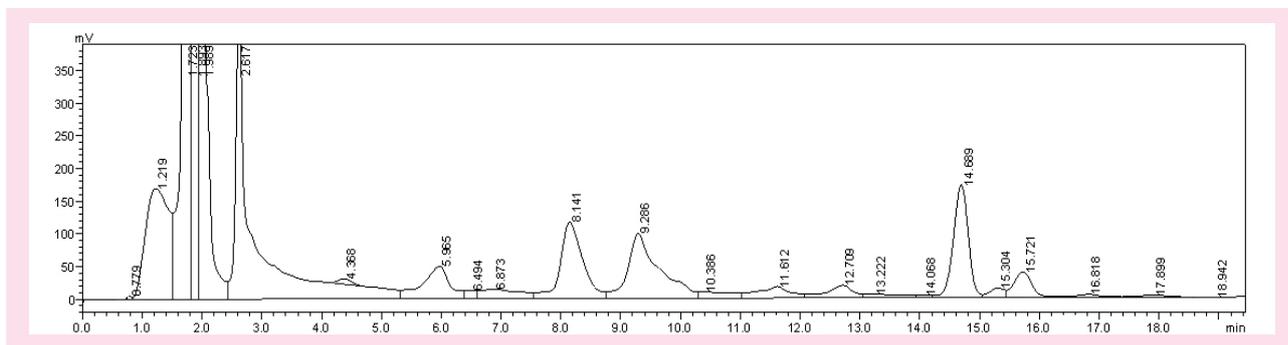


图 5 喜树果提取液+10-羟基喜树碱的 HPLC 检测图

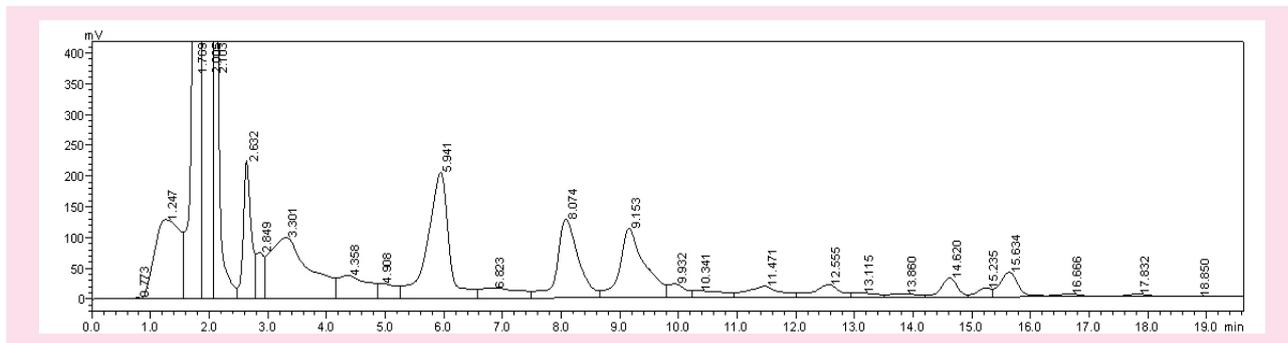


图 6 喜树果提取液+10-羟基喜树碱葡萄糖苷的 HPLC 检测图

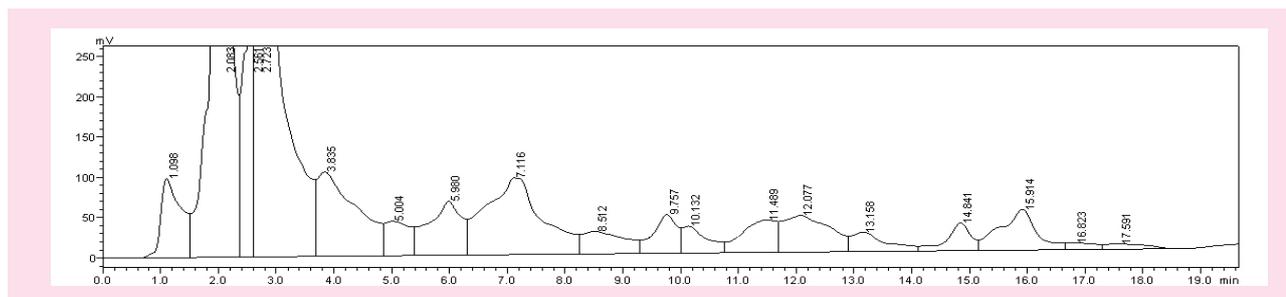


图7 喜树果样品酸水解后的HPLC检测图

峰面积为 2654239;当 $t_R=14.841\text{min}$ 时,羟基喜树碱出峰,峰面积为 974469。10-羟基喜树碱与 10-羟基喜树碱葡萄糖苷的峰面积之比值为 0.367。

三、结论

10-羟基喜树碱与 10-羟基喜树碱葡萄糖苷的峰面积之比,在酸水解前为 0.317,酸水解后为 0.367,峰面积比值提高 15.77%,比值明显增大。说明酸水解工艺后 10-羟基喜树碱葡萄糖苷的峰面积占比减小,而 10-羟基喜树碱的峰面积占比增大。由此可以推测是由于部分 10-羟基喜树碱葡萄糖苷水解转化为了 10-羟基喜树碱。因此可以初步断定,在喜树果中提取 10-羟基喜树碱的工艺中添加酸水解的步骤,可以使 10-羟基喜树碱的收得率提高。

参考文献:

[1] 祖元刚,史伟国,赵春建,等.喜树果中喜树碱和 10-羟基喜树碱的匀浆提取工艺[J].天然产物研究与开发,2008,(20):1088,1124.
[2] 袁丹,容如滨,喻宗沅,等.抗肿瘤药物 10-羟基喜树碱的研究与应用进展[J].化学与生物工程,2007,(12):9-11.

[3] 周云隆,尤启冬,李玉艳,等.喜树碱及其衍生物的合成[J].中国医药工业杂志,2001,(8):375-379.
[4] 郭群.HPLC法对五省产地喜树果中 10-羟基喜树碱的含量测定[J].武汉职业技术学院学报,2018,(2):107-109.
[5] Qun Guo,Qiaoyu Yuan. A novel 10-Hydroxycamptothecin-Glucoside from the fruit of *Camptotheca acuminata* [J]. Natural Product Research,2016,(9):1053-1059.
[6] 李明娟,刘磊,傅春燕,等.车前草黄酮苷酸水解工艺条件的反相高效液相色谱法考察[J].时珍国医国药,2013,(9):2123-2125.
[7] 何安宁,何凡,侯嵩,等.应用酸水解法制备牛蒡苷元的工艺研究[J].中国现代中药,2012,(6):43-45.
[8] MA Mei-fang,YU Tao,DAI Shao-jun, et al. Determination of contents of 10-Hydroxycamptothecin in *Camptotheca acuminata* by high-performance liquid chromatogram [J]. Journal of Forestry Research,2002,(2):144-146.
[9] 赵荣国,真国辉,王贺双.10-羟基喜树碱的提取方法及工艺优化研究[J].中国医药生物技术,2010,(2):147-148.
[10] 沈少华,刘姬艳,胡江琴,等.喜树碱和 10-羟基喜树碱提取方法的比较与优化[J].湖北农业科学,2011,(21):4459-4462.

[责任编辑:高小娥]

Investigation of the content increase of 10-hydroxycamptothecin in *Camptotheca acuminata* fruit after acid hydrolysis by HPLC method

GUO Qun

(School of Biology Engineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan430074,China)

Abstract: The conversion of 10-hydroxycamptothecin glucoside to camphora 10-hydroxycamptothecin was studied in order to increase the yield of 10-hydroxycamptothecin. The area ratio of 10-hydroxycamptothecin to 10-hydroxycamptothecin glucoside before and after hydrolysis of camptothecin was determined by high performance liquid chromatography. The results showed that the peak area ratio of 10-hydroxycamptothecin to 10-hydroxycamptothecin glucoside increased significantly after acid hydrolysis. It was proved that the acid hydrolysis process can convert 10-hydroxycamptothecin glucoside in camptotheca aglycosate into 10-hydroxycamptothecin.

Key words: *Camptotheca acuminata*; 10-hydroxycamptothecin glucoside; 10-hydroxycamptothecin; acid hydrolysis; high performance liquid chromatography