

· 药剂与工艺 ·

从喜树叶中碱法提取喜树碱新工艺

王 洋,于 涛,张玉红,祖元刚⁽²⁰⁾

(东北林业大学 森林植物生态学开放研究实验室,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要: 目的 探讨以喜树为原料提取喜树碱的工艺条件。方法 通过均匀试验设计法。结果 确定了以稀 NaOH 溶液为溶剂提取喜树碱的最佳工艺条件:提取溶剂浓度为 0.3%,提取时间为 3 h,NaOH 溶液用量 16 mL/g 原料。次 结论 首次研究了以稀 NaOH 溶液为喜树碱提取溶剂,从很少被利用的喜树叶中提取喜树碱的工艺条件。结果表明喜树叶的喜树碱提取率达到 0.1% 以上,是一个较好的喜树碱提取原料。利用此方法提取喜树碱生产成本低、提取率高、防火等级低,是相对于乙醇提取更为优秀的喜树碱提取方法。

关键词: 喜树叶;喜树碱;碱提

中国分类号: TQ461 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2670(2001)10-0882-03

New process for extraction of camptothecin from leaves of *Camptotheca acuminata*

WANG Yang, YU Tao, ZHANG Yu-hong, ZU Yuan-gang

(Laboratory of Forest Plant Ecology, Dongbei Forestry University, Harbin Heilongjiang 150040, China)

Abstract Object To develop a new process for the extraction of camptothecin from leaves of *Camptotheca acuminata* Decne. **Methods** By uniform experimental design after proper choice of solvent. **Results** The optimal conditions were extraction with 16 times of 0.3% NaOH for three hours each time. **Conclusion** This is the first attempt to use dilute NaOH solution for the extraction of camptothecin from the previously seldom utilized leaves of *C. acuminata*, which resulted in a yield well over 0.1%. The process resulted in a lower production cost and require less fire protection measures as compared with the conventional use of alcohol.

Key words leaves of *Camptotheca acuminata* Decne; camptothecin; extraction by dilute NaOH solution

喜树碱 (camptothecin, CPT), 是我国特有树种喜树 *Camptotheca acuminata* Decne 中所含的一种生物碱^[1], 具有显著的抗肿瘤活性, 是迄今为止发现的唯一一种专门通过抑制拓扑异构酶 I 发挥细胞毒性的抗癌药物^[2,3]。喜树碱毒性较大, 但从喜树碱衍生物中筛选与喜树碱具有相同抗癌机制且高效低毒的新化合物已成为获得新型抗癌药物的途径之一^[4~6]。

喜树碱作为一种原料药具有相当重要的生产及研究价值。传统的喜树碱提取工艺, 均是以喜树果实及根皮为原料, 以乙醇为溶剂^[7~9]。以根皮为原料需大量砍伐喜树, 以果实为原料又受季节限制。研究表

明, 喜树叶尤其是嫩叶中喜树碱含量很高^[10], 是一种不受季节限制且采用方便的喜树碱生产原料。以乙醇为溶剂则相对存在成本高、防火要求高等缺点。为了克服以上问题, 本文首次探讨了以喜树叶为原料以稀 NaOH 液为溶剂提取喜树碱的工艺条件。

1 提取原理

喜树碱的化学结构非常独特, 化学性质也与一般生物碱不同, 它对常用的生物碱检测试剂如 Dragendorff 试剂及苯酚 (三氯化铁) 试剂, 均呈负反应; 不与各种酸形成结晶性盐。但其 E 环所具有的 α 羟基内酯结构使其在室温时遇碱即可打开内酯环, 生成喜树碱的钠盐, 遇酸后又可还原得到喜树碱。见图 1。

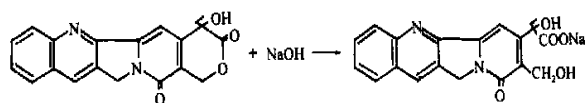


图 1 喜树碱碱性条件下成盐反应

(20) 收稿日期: 2000-12-21

基金项目: 引进国外先进林业技术 (林业“948”) 项目 (96-4-10-11)、东北林业大学森林植物生态学开放实验室开放基金资助项目

作者简介: 王 洋, 女, 讲师, 2000 年毕业于东北林业大学植物学科获理学博士学位, 主要从事植物资源化学及药用植物有效成分的研究工作。

Tel (0451) 2190871(办) Fax: (0451) 2102082

2 仪器和材料

JASCO 高效液相色谱仪, 975型紫外检测器, Biofuge 22R高速冷冻离心机

乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 喜树碱对照品由美国斯特林癌症研究基金会提供, 喜树叶采自东北林大实验林场栽培的 3年生喜树幼树

3 实验方法

3.1 喜树碱含量的 HPLC分析

3.1.1 标准溶液的配制: 精密称取喜树碱对照品 3.5 mg, 置于 100 mL 的容量瓶中, 以乙腈-水 (4: 6) 为溶剂, 超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用

3.1.2 色谱条件: 色谱柱: 英国 HPLC公司的 ODS 柱 (4.6 mm× 25 cm); 流动相: 乙腈-水 (4: 6); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量 10 μ L

3.1.3 标准曲线的绘制: 分别精密吸取喜树碱标准溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用相同溶剂稀释至刻度, 摇匀。按照上述色谱条件, 分别取稀释后样品及原标准溶液进样分析, 每样重复测定 3次, 取峰面积的平均值。得峰面积 (Y) 与喜树碱浓度 (X) 的线性回归方程为: $Y = 1\,786.50X - 1\,345.4$, $r = 0.999\,8$

3.1.4 喜树碱提取率的测定: 定容后的样品在上述色谱条件下分析后, 计算喜树碱浓度, 计算喜树碱的提取率。

表 1 $U_{10}(10^3)$ 均匀设计因素水平表

水平	因素		
	A NaOH 溶液浓度 (%)	B 提取时间 (h)	C NaOH 溶液加入量 (mL/g 原料·次)
1	0.1	1	7
2	0.2	2	8
3	0.3	3	9
4	0.4	4	10
5	0.5	5	11
6	0.6	6	12
7	0.7	7	13
8	0.8	8	14
9	0.9	9	15
10	1	10	16

3.2 喜树碱的提取: 精密称取干燥喜树叶粉 (60 目) 5 g 于 100 mL 锥形瓶中, 加入适量 NaOH 溶液, 室温下磁力搅拌提取一定时间后, 离心后倾出提取液。再加入相同体积的 NaOH 溶液在相同的条件下提取, 共提取 3次, 合并提取液, 滴加盐酸调节至 pH 值为 5~ 6 然后在 8 000 r/min 的条件下离心 8 min, 将上清液移入 500 mL 容量瓶中。以蒸馏水洗涤剩余沉淀, 离心后与上清液合并, 以蒸馏水稀释至刻度。取样按上面的方法分析喜树碱浓度, 计算喜树碱

提取率

3.3 工艺条件的研究: 选择 NaOH 溶液浓度、NaOH 溶液用量及提取时间为因素, 进行了三因素十水平 $U_{10}(10^3)$ 均匀设计。

4 结果与讨论

均匀试验结果见表 2

表 2 $U_{10}(10^3)$ 均匀试验设计结果 (%)

试验号	因素			CPT 提取率
	A	B	C	
1	0.1	5	13	0.080 5
2	0.2	10	9	0.064 8
3	0.3	4	16	0.100 9
4	0.4	9	12	0.070 8
5	0.5	3	8	0.054 4
6	0.6	8	15	0.087 9
7	0.7	2	11	0.061 6
8	0.8	7	7	0.036 6
9	0.9	1	14	0.063 0
10	1	6	10	0.034 3

对试验结果进行逐步回归分析 (引入变量 F 检验值 $F_1 = 0.05$, 剔除变量 F 检验值 $F_2 = 0.05$), 得如下回归方程:

$$Y = -0.064\,656 + 0.535\,882X_1 + 0.026\,731X_2 + 0.004\,566X_3 - 0.809\,091X_1^2 - 0.000\,762X_2^2 - 0.000\,108X_2X_3 - 0.000\,002X_3^2$$

其中 X_1 : NaOH 溶液浓度 (%) X_2 : 提取时间 (h) X_3 : NaOH 溶液用量 (mL/g 原料·次)

回归方程的 $F = 952.89 > F_{(0.01)} = 99.34$, 因此回归方程显著, 有意义。另外, 回归方程的复相关系数 $r = 0.999\,9$, 残差标准差 $s = 0.007\,9$, 残差平方和 $SE = 0.000\,1$, 说明本方程对试验结果拟合较好。

对回归方程的各项的偏回归系数进行计算, 结果见表 3 可以看出, X^2 项的回归系数最显著, 其次

表 3 偏回归系数显著性检验

变异来源	F	显著性
X_1	45.76	0.05
X_2	3.36	不显著
X_3	19.79	0.05
X_1^2	128.10	0.01
X_2^2	1.30	不显著
X_2X_3	4.47	不显著
X_3^2	0.44	不显著

$$F_{(0.05)} = 18.51 \quad F_{(0.01)} = 98.49$$

是 X_1 项及 X_3 项, 其它各项影响均不显著。这说明 NaOH 溶液浓度及 NaOH 溶液的用量对提取率有显著影响, 而提取时间对提取结果影响不显著。另外, 体现各因素间交互作用的二次项中, 仅存在 X_2X_3 项, 说明 NaOH 溶液用量与提取时间之间存

在着交互作用,而 NaOH溶液浓度与 NaOH溶液用量和提取时间之间没有交互作用。

以逐步回归方程对最佳试验条件进行分析,结果表明在所选试验条件范围内最佳提取溶剂浓度为 0.3%,最佳提取时间为 3 h,最佳 NaOH溶液用量为 16 mL/g原料。次

最佳提取溶剂浓度为 0.3%,最佳提取时间为 3 h,与通常的观念似乎相悖,但这可能均与喜树碱钠盐性质不稳定有关,喜树碱钠盐在常温便易分解,不宜长时间保存。提取溶剂浓度增加,或提取时间延长均会对分解反应起促进作用。

最佳 NaOH溶液用量为实验条件下的最大值,从理论上,也可得出提取溶剂的增加会提高提取率的结论。为了确定更有利于喜树碱提取的 NaOH溶液用量,进行了补充试验:在 NaOH溶液尝试为 0.3%、提取时间为 3 h的条件下,增加了每次的 NaOH溶液的加入量(17~ 20 mL/g原料。次)。喜树碱的最高提取率达到了 0.102%,但各实验间提取率变化很小。本试验中溶剂的用量为 16 mL/g原料。次,最佳提取率也达到了 0.1007%,说明进一步提高溶剂用量意义不是很大。因此在生产中可适当增加 NaOH溶液的用量,但不宜增加过多。

5 结论

确定的最佳工艺条件为:NaOH溶液浓度为 0.3%,提取时间为 3 h,NaOH溶液用量为 16 mL/g原料。次

喜树果实中喜树碱含量一般为 0.1%左右,根及根皮则还要低一些。而经分析我们所采集的喜树叶中的喜树碱含量为 0.114%,实验提取率也达到了 0.1%以上,因此喜树叶是一种喜树碱提取的优质原料。

质原料。

以乙醇为溶剂提取喜树碱不仅成本高,且通常提取时间较长,能量消耗较大。以稀 NaOH溶液为溶剂成本低,提取反应在常温下进行,提取时间短,提取率也较高(本实验最佳条件下喜树碱提取率占原料中喜树碱含量的 88%)。

参考文献:

- [1] Wall M E, Wani M C, Cook C E, *et al.* Plant Antitumor Agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Campotheca acuminata* [J]. J Amer Chem Soc, 1966, 88(16): 3888-3890.
- [2] Hsiang Y H, Herizberg R, Hecht S, *et al.* Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. J Biol Chem, 1985, 260: 14873-14878.
- [3] Hsiang Y H, Liu L F, Wall M E, *et al.* DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues [J]. Cancer Res, 1989, 49(16): 4385-4389.
- [4] Giovanella B C. Topoisomerase I inhibitors [A]. Teicher BA. Cancer Therapeutics: Experimental and Clinical Agents [C], Totowa: Humana Press, 1997: 137-152.
- [5] 耿宝琴. 紫杉醇类喜树碱类的研究进展 [J]. 实用肿瘤杂志, 1995, 10(4): 199-201.
- [6] 翁绳美, 胥彬. 喜树碱类抗癌物质对拓扑异构酶 I 的作用研究进展 [J]. 肿瘤, 1991, 11(2): 74-77.
- [7] 上海药物研究所植化室喜树研究组. 喜树果中的抗癌有效成分喜树碱与 10-羟基喜树碱 [J]. 中草药通讯, 1975, (5): 17-18.
- [8] 徐任生, 赵志远, 林隆泽, 等. 抗癌植物喜树化学成分的研究 I. 喜树根的化学成分 [J]. 化学学报, 1977, 35(3, 4): 227-230.
- [9] 徐任生, 赵志远, 林隆泽, 等. 抗癌植物喜树化学成分的研究 II. 喜树果中的化学成分 [J]. 化学学报, 1977, 35(3, 4): 193-199.
- [10] Lopez-Meyer M, Nessler C L, McKnight T D. Sites of accumulation of the antitumor alkaloid camptothecin in *Campotheca acuminata* [J]. Planta Med, 1994, 60: 558-560.

植物生长调节剂对金钗石斛药用化学成分的影响

陈仕江¹, 张明¹, 李泉森¹, 夏鸿西², 朱利泉², 别之龙^{2,20)}

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 西南农业大学, 重庆 400716)

摘要: 目的 研究植物生长调节剂对金钗石斛药用化学成分的影响。方法 用 6-BA、GA₃两种植物生长调节剂浸根处理金钗石斛。结果与结论 表明两种植物生长调节剂在一定浓度下可使石斛可溶性总糖含量增加,而对金钗石斛碱的含量无影响。GA₃能显著提高石斛总生物碱的含量。

关键词: 植物生长调节剂; 金钗石斛; 化学成分

²⁰⁾ 收稿日期: 2001-02-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770903)

作者简介: 陈仕江, (1967-), 男, 四川人, 副研究员, 硕士。先后主持和主研国家“七·五”、“八·五”、“九·五”科技攻关、国家自然科学基金、重庆市教委、国家中医药管理局科研项目 10余项, 获国家、省部级成果奖 3项, 发表学术论文 40余篇。研究方向: 药用动植物资源的再生及综合利用。Tel (023) 62462123 E-mail Shijiang Cher@ 163.com