

鬼臼毒素的提取及其溶剂加合物的表征

王晓玲^{1,2}, 杨伯伦¹, 刘谦光³, 张尊听^{3*}

(1. 西安交通大学环境与化学工程学院, 陕西 西安 710049; 2. 宝鸡文理学院 化学化工系, 陕西 宝鸡 721007; 3. 陕西师范大学化学与材料学院, 陕西 西安 710062)

鬼臼毒素, 俗名鬼臼素、足叶草素、鬼臼脂素, 是小檗科植物桃儿七 *Sinopodophyllum emodi* Ying 窝儿七 *Diphylleia sinensis* Li 中的主要药用成分, 具有抗肿瘤活性, 以鬼臼毒素为原料进行修饰改性, 还可以合成数十种新的抗肿瘤新药^[1-2], 所以, 大量而有效的提取鬼臼毒素, 对新的抗肿瘤药物的开发有重要意义。

鬼臼毒素的提取分离工艺有 CO₂ 超临界萃取法^[3], 甲醇回流-水-氯仿纯化法^[4], 柱层析法^[5]等, 本实验将超声提取与传统回流法相结合, 得到了鬼臼毒素提取分离的优化工艺, 并对其溶剂化合物进行了简单的分析与表征。

1 试药及仪器

桃儿七, 窝儿七 (陕西太白县药材公司), 鬼臼毒素对照品 (美国 Sigma 公司), 超声波细胞粉碎机 (KS-161, 宁波), WPS-1 数字熔点仪 (上海物理光学仪器厂), TGA-7 热重分析仪 (美国 PE 公司), 岛津 LC-4A 液相色谱仪。

2 方法与结果

2.1 鬼臼毒素含量的测定: 采用 HPLC 法 色谱柱: μ -Bondapak C₁₈ (4.6 mm × 250 mm); 流动相: 甲醇-水 (7: 3); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25°C; 检测波长: 229 nm

2.2 提取过程的优化: 以桃儿七为研究对象, 按 L₈(4³) 正交设计表进行试验, 结果见表 1~3

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	A 方法	B 甲醇用量	C 提取次数	D 提取时间 /min
1	超声	4 倍量	2	20
2	回流	5 倍量	3	30
3				60
4				120

结果表明, 提取方法和提取次数对桃儿七中鬼臼毒素提取率的影响显著。最佳的提取工艺为

A₁B₃C₂D₂, 即采用超声辅助提取, 每次甲醇用量为原料量的 5 倍, 提取 3 次, 每次提取 30 min

表 2 提取试验方案与结果

Table 2 Scheme and results of extracting

试验号	A	B	C	D	E(误差)	鬼臼毒素提取率 /%
1	1	1	1	1	1	1.22
2	1	2	2	2	2	2.84
3	1	1	1	3	2	2.04
4	1	2	2	4	1	2.85
5	2	1	2	1	2	0.78
6	2	2	1	2	1	0.82
7	2	1	2	3	1	2.21
8	2	2	1	4	2	1.60
I	8.95	6.25	5.68	2.00	7.10	
II	5.41	8.11	8.68	3.66	7.26	
III				4.25		
IV				4.45		

表 3 提取试验的方差分析

Table 3 Variance analysis of extracting

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	1.567	1	1.567	522.3	< 0.05
B	0.433	1	0.433	144.3	
C	1.125	1	1.123	375.0	< 0.05
D	1.855	3	0.618	206.0	
E(误差)	0.003	1			

$$F_{0.05}(3, 1) = 215.7 \quad F_{0.05}(1, 1) = 161.4$$

2.3 分离过程的优化: 以上述最佳提取工艺条件下获得的 20 g 浸膏为研究对象, 按 L₉(4³) 正交设计表进行试验, 结果见表 4~6

表 4 分离方案的因素水平表

Table 4 Factors and levels of separating design

水平	A 苯用量 /mL	B 提取次数	C 提取时间 /h
1	400	1	1.0
2	500	2	1.5
3	600	3	2.0

结果表明: 提取次数对实验影响最为显著, 每次提取中苯用量对提取有一定影响, 而提取时间对提取几乎没有什么影响。最佳的分离工艺为 A₃B₃C₂, 但从表 6 来看, 提取时间对提取几乎无影

* 收稿日期: 2002-08-08

基金项目: 陕西省教委科研基金资助项目 (01JK080)

作者简介: 王晓玲 (1968-), 女, 陕西乾县人, 讲师, 硕士, 宝鸡文理学院教师, 西安交通大学在职博士, 研究方向为天然产物提取分离。

E-mail: xiaolingwang@eyou.com

响,从提高效率,节省能源方面考虑,选择最佳提取工艺为 A₃B₃C₂,即 20 g 浸膏每次用 600 mL 苯回流 1.0 h,回流 3 次。各方法中所得晶体含量经 HPLC 法测定均在 93%~95%。

表 5 分离试验方案与结果

Table 5 Scheme and results of separating

试验号	A'	B'	C'	D'(误差)	结晶量/g
1	1	1	1	1	0.60
2	1	2	2	2	1.32
3	1	3	3	3	1.86
4	2	1	2	3	0.75
5	2	2	3	1	1.58
6	2	3	1	2	1.98
7	3	1	3	2	1.35
8	3	2	1	3	1.70
9	3	3	2	1	2.84
I'	3.78	2.70	4.28	5.02	
II'	4.31	4.60	4.91	4.65	
III'	5.89	6.68	1.79	4.31	

表 6 分离试验的方差分析

Table 6 Variance analysis of separating

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A'	0.803 3	2	0.401 7	9.55	
B'	2.641 9	2	1.321 0	31.41	< 0.05
C'	0.741 3	2	0.370 7	8.81	
D'	0.084 1	2			

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

2.4 桃儿七与窝儿七中所得浸膏及晶体量的比较:采用上述最佳的提取工艺及分离工艺对桃儿七与窝儿七进行实验比较,结果见表 7

表 7 两种药用植物的结果比较 (n= 3)

Table 7 Results of two medicinal plants (n= 3)

名称	浸膏提取率 %	晶体得率 %
桃儿七	22.8	2.74
窝儿七	26.2	1.88

可看出,窝儿七中浸膏得率稍高于桃儿七,而晶体量低于桃儿七,这说明秦岭山区的桃儿七质量优于窝儿七

2.5 鉴定

2.5.1 薄层色谱鉴定:取晶体及鬼臼毒素对照品各少量,制成溶液,点样于同一 2.5 cm×7.5 cm 的硅胶 G 板上,以氯仿-乙酸乙酯 (3: 2) 作展开剂展开,取出,晾干,喷以 50% 硫酸乙醇溶液,于 120℃ 烘烤约 5 min, Rf= 0.6 处对照品及样品均出现一个棕红

色斑点

2.5.2 熔点测定:用数字熔点仪测定由苯-乙醇混合溶剂结晶的产品,熔点为 108℃~112℃,由文献^[4]可知此为溶剂化合物,产品再用苯重结晶,熔点无变化,这说明溶剂化合物中结合的溶剂分子为苯,产品于真空干燥箱中 105℃ 干燥 2 h,熔点变为 180℃~183℃,与鬼臼毒素的文献值一致^[4]。

2.5.3 热重分析:为了确定晶体中苯的含量,去除产品中化学键合的有毒溶剂苯,对其进行了热重分析,热重图谱见图 1 可以看出:物质在 105℃ 失重 7.53%,经计算含苯的溶剂化合物的分子式为 C₂₂H₂O₈·1/2C₆H₆,继续加热至 418℃ 失重 80.25%,说明物质在此温度分解变性

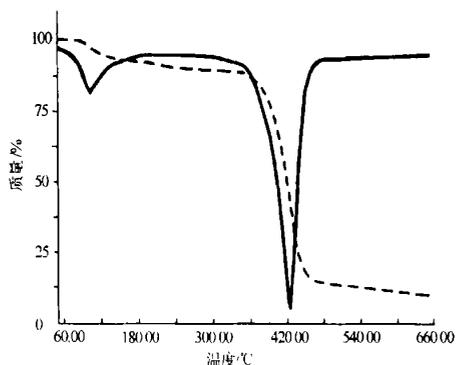


图 1 鬼臼毒素的苯溶剂化合物的热重图谱

Fig. 1 Thermogravimetric spectrum of solvate of podophyllotoxin

References

[1] Chen Y H. The studies of *Sinopodophyllum* plants in our country [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1979, 14(2): 101.

[2] Xu C Y, Jia J B, Chen Z D. The study progress of β-substituted 4'-demethylpodophyllotoxin derivatives [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(5): 389-391.

[3] Choi Y H, Kim J Y, Ryu J H, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of podophyllotoxin from *Diosma pleianthum* roots [J]. *Planta Med*, 1998, 64(5): 482-483.

[4] Sun W J. *Preparation and Separation of Active Constituents from Traditional Drugs* (天然药物成分提取分离与制备) [M]. Beijing: China Medicinal Science and Technology Publishing House, 1999.

[5] Wang B X, Wang R S, Wang Q, et al. Extraction and analysis by HPLC of podophyllotoxin from *Sinopodophyllum extneditum* (Wall.) Ying [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 1999, 30(11): 484-485.