

响应曲面优化喜树生物碱醇提工艺研究

余响华*, 蒋琼凤, 邵金华

湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室 湖南科技学院, 永州 425100

摘要:对喜树果中喜树碱的最佳醇提工艺条件进行了研究。采用乙醇浸提法,考查了乙醇浓度、液料比、提取温度及提取时间对喜树碱提取率的影响,经过一系列的单因素实验,结合响应曲面实验设计法及响应曲面分析(RSM),得到喜树碱的最佳提取工艺为:乙醇浓度 88.53%,液料比 21.4:1(mL/g),时间 2.23 h,提取温度 40℃,经验证,在此提取工艺条件下,喜树碱提取率可达 0.847 mg/g。

关键词:喜树;喜树碱;响应曲面法;高效液相色谱

中图分类号:Q5

文献标识码:A

Optimization of Extraction of Camptothecin From *Camptotheca acuminata* Fruits by Response Surface Methodology

YU Xiang-hua*, JIANG Qiong-feng, SHAO Jin-hua

Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantaged Plant Resources in Hunan

South, Hunan Science & Technology College, Yongzhou 425100, China

Abstract: The ethanol extraction technology of camptothecin from *Camptotheca acuminata* fruits was optimized. Based on single-factor experiments and response surface analysis, the optimal extraction conditions were determined to be: ethanol concentration of 88.53% (v/v), liquid-to-solid ratio of 21.4:1, leaching time of 2.23 h, extraction temperature of 40℃. Under these conditions, the total extraction yield of camptothecin reached up to 0.847 mg/g (dry weight) by a series of industrial extraction & purification processes subsequently. This study offered an important experimental reference for further developments and utilizations of *C. acuminata*.

Key words: *Camptotheca acuminata*; camptothecin; response surface method; HPLC

喜树(*Camptotheca acuminata*)又名早莲、水栗、水桐树、早莲子、野芭蕉等,属蓝果树科(Nyssaceae)、喜树属(*Camptotheca*),为我国特有植物,主要分布于长江以南地区^[1]。喜树中含有显著、广谱抗肿瘤活性^[2]的生物碱物质-喜树碱(camptothecin, CPT),它能够稳定拓扑异构酶 I-DNA 裂解复合物,使之转变为细胞毒素 DNA 的双链裂解,最终导致细胞死亡^[3]。CPT 是迄今为止发现的唯一通过抑制拓扑异构酶 I 发挥细胞毒性的天然植物活性成分^[4]。由于喜树碱本身具有较大毒性,不能直接用于临床治疗,较为可行的是以喜树碱为前体原料,通过合成高效低毒的衍生物以获得新的抗癌药物^[5]。目前美国食品和药物管理局(FDA)已批准 4 种喜树碱衍生物 CPT-11、TPT-9-AC、9-INC 用于治疗结肠/直肠癌及卵

巢癌^[6,7],开发出的 CPT 衍生物已成为继紫杉醇后的又一类重要抗癌新药。因此,对当今抗癌新药的原料药-喜树碱的研究仍具有十分重大的现实意义。

不同地区喜树中喜树碱含量差异性较大,湖南产喜树果中 CPT 在 0.9% 左右^[8,9]。本研究以湖南产喜树果为原材料,运用 Design-Expert 7.0 软件,建立正交实验组,通过对实验结果的分析优化,建立了喜树碱乙醇提取的最佳工艺条件,为喜树碱的规模化生产提供实验参考。

1 材料与仪器

喜树果,2013 年 11 月采摘自湖南永州,根据《中国植物志》的描述,结合咨询 2 位具有天然植物有效成分(药用)方面的博士(姜红宇、刘小文),鉴定为喜树果(*Camptotheca acuminata* fruit),晒干后 4℃低温贮藏。

喜树碱标准品(纯度 >98%,上海纯优生物,批号:P0281)、甲醇(色谱纯)、氯仿、95%乙醇、无水乙

醇、甲醇、NaOH、盐酸均为 AR 级;

主要设备与仪器:粉碎机、TG21KR 离心机、日本岛津 LC-10ATvP 高效液相色谱仪、Kromstar C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、予华仪器 HH-WO 型旋转蒸发仪、HASUC DZF-6030 型真空干燥箱。

2 实验方法

2.1 工艺流程

干燥、粉碎→乙醇回流浸提→减压浓缩得浸膏→氯仿提取→减压浓缩→甲醇回流提取→过滤,得不溶物→NaOH 溶解→离心,收集滤液→调酸→加甲醇,保温析出→抽真空干燥→定容→HPLC 检测。

2.2 原料及提取液的处理

2.2.1 原料的前处理

将采集到的喜树果实经 60 °C 低温干燥,控制水分在 5% 以下,粉碎过 20 目筛,备用。

2.2.2 乙醇浸提流程

准确称取 20.0 g 喜树果粉末,按一定的料液比加入乙醇溶液回流浸提,收集浸提液,减压浓缩得浸膏,加 200 mL 氯仿震荡提取,旋转蒸发仪减压浓缩,回收氯仿,干物质经 200 mL 甲醇回流提取,抽真空过滤,用 50 mL 2.5 mol/L 的 NaOH 震荡溶解滤渣部分,6500 rpm 离心 5 min,取上清液,2.0 mol/L HCl

调酸至 pH 2.0 ~ 3.0,加 200 mL 的甲醇震荡析出喜树碱,旋转蒸发仪 60 °C 蒸发至干,加甲醇(色谱级)溶解,定容于 100 mL 容量瓶中,备用,HPLC 检测。

2.3 喜树碱含量的测定

2.3.1 标品溶液配制

精确称取喜树碱标准品 1.0 mg,用 10 mL 色谱级甲醇溶解,配成 100 mg/L 母液备用。将母液稀释成 5.0、10.0、15.0、20.0、40.0 mg/L 的系列标准品溶液。

2.3.2 HPLC 条件

流动相:甲醇:水(v/v) = 60:40;流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm^[10],柱温 25 °C,进样量 10 μL。

2.3.3 样品喜树碱含量的测定

按上述色谱条件,吸取 10 μL 样品溶液,上 HPLC 仪检测。测得数据代入标准曲线回归方程,得样品喜树碱浓度,喜树碱含量按下式计算:

$$\text{喜树碱含量}(\text{mg/g}) = C \times V/M \times 10^3$$

式中,C 为样品喜树碱浓度(mg/L),V 为样品定容的体积(mL),M 为称取样品质量(g)。

2.4 乙醇浸提喜树碱单因素实验

设定其它条件不变的情况下,分别考察液料比、乙醇浓度、提取温度和提取时间对喜树碱得率的影响(表 1)。

表 1 喜树碱乙醇提取单因素变化条件

Table 1 Condition of single factor experiments for ethanol extraction

因素 Factor	单因素变化条件 Single-factor experimental condition					其它条件 Fixed boundary condition
乙醇浓度 Ethanol concentration(v/v)	80	85	90	95	100	20:1 液料比、40 °C 浸提 2.0 h
液料比 Liquid-solid ratio(mL: g)	10:1	15:1	20:1	25:1	30:1	90 % 乙醇、40 °C 浸提 2.0 h
温度 Temperature(°C)	20	30	40	50	60	90 % 乙醇、20:1 液料比、浸提 2.0 h
时间 Time(h)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	90 % 乙醇、20:1 液料比、40 °C

2.5 响应面实验设计

依据单因素实验结果,选取对喜树碱提取率有显著影响的 3 个因素:料液比、乙醇浓度、提取时间,

利用正交实验结合 Design-Expert 7.0 软件分析上述 3 个因素在 3 个水平上对喜树碱提取效果的影响,实验设计如表所示。

表 2 响应面实验因素与水平

Table 2 Factors and levels of RSM experiment

水平 Level	因素 Factors		
	A 乙醇浓度 Ethanol level (v/v)	B 液料比 Liquid solid ratio (mL: g)	C 提取时间 Time (h/t)
-1	85	15:1	1.5
0	90	20:1	2.0
1	95	25:1	2.5

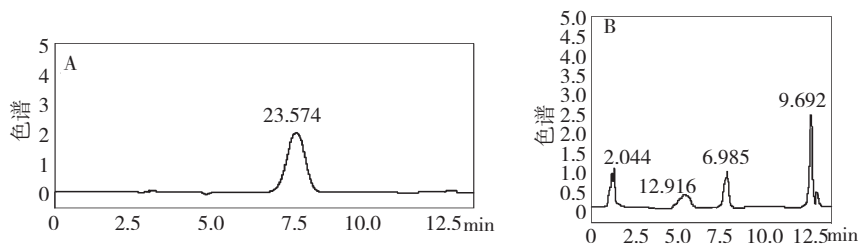


图1 喜树碱标准品(A)及样品(B)HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of camptothecin standard (A) and sample (B)

3 结果与分析

3.1 喜树碱含量测定

将标准喜树碱溶液和分离纯化后的样品溶液上HPLC仪器检测,所得图谱如下:

结果表明,喜树碱标准品的保留时间为7.492 min(图1A);喜树碱浓度(mg/L) X 与峰面积($uv \cdot s$) Y 的线性回归方程为: $Y = 16713X - 20674$, $R = 0.9994$,表明喜树碱在5.0~40.0 mg/L范围内具有良好的线性关系;样品(图1B)在7.502 min处出峰,且与其它组分达到基线分离,证明提取物中含有喜树碱。

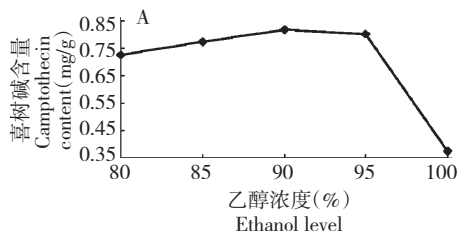
3.2 乙醇浸提喜树碱单因素实验结果

3.2.1 乙醇浓度对喜树碱提取效率的影响

取喜树果粉末20.0 g,按20:1液料比分别加入80%、85%、90%、95%、100%的乙醇40℃浸提2.0 h,经纯化后测定喜树碱浓度,得乙醇浓度与喜树碱含量变化曲线,如图2(A)。结果表明,提高乙醇浓度有利于喜树碱的浸出,当乙醇浓度超过90%,得率反而降低,100%时提取效率最低,仅有0.375%。水的存在有利于喜树果粉末有效成分的溶出,提高乙醇浓度可增加喜树碱提取率,在90%时达到最大值,因此选择90%的乙醇溶液为浸出最优浓度。

3.2.2 液料比对喜树碱提取的影响

取喜树果粉末20.0 g,按10:1、15:1、20:1、25:1、30:1的液料比加入90%的乙醇40℃浸提2.0 h,经纯化后测定喜树碱浓度,得料液比与喜树碱含



量变化曲线,如图2(B)。结果显示,随着提取溶剂用量的增加,喜树碱含量也相应提高,但增幅随溶剂用量的增加而减缓,当浓缩比超过1:20后,喜树碱的得率保持不变,为节省溶剂及回收溶剂的能耗,选择最佳液料比为20:1。

3.2.3 提取温度对喜树碱提取率的影响

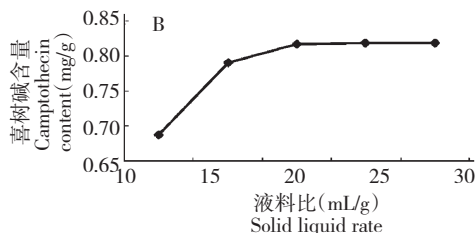
取喜树果粉末20.0 g,按20:1的液料比加入90%的乙醇,分别于20、30、40、50、60℃浸提2.0 h,经纯化后测定喜树碱浓度,得提取温度与喜树碱含量变化曲线,如图2(C)。

结果显示,在20~40℃提取范围内,随着温度升高,喜树碱得率缓慢增加,但增势不明显,仅为0.84%;40℃至60℃时则基本无变化,说明在40~60℃范围内,温度对提取效率影响不显著,因此喜树碱乙醇提取温度宜控制在40℃,后续实验不再考查温度因素。

3.2.4 提取时间对喜树碱提取率的影响

取喜树果粉末20.0 g,按20:1液料比加入90%的乙醇,40℃下分别浸提0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,经纯化后测定喜树碱浓度,得提取时间与喜树碱含量变化曲线,如图2(D)。

由图可知,浸提时间对喜树碱的得率有较大影响,提取时间越长,喜树碱得率越高。考虑到提取时间过长将延长提取周期,且会增加喜树碱发生氧化概率,进而降低喜树碱提取效率,因此选择浸提时间2.0 h为宜。



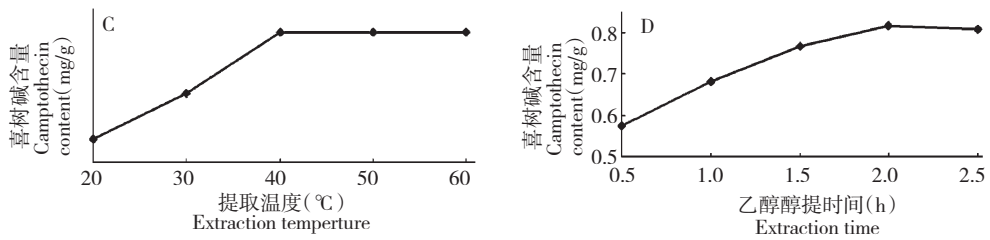


图2 乙醇浓度(A)、液料比(B)、温度(C)及时间(D)对喜树碱提取效率的影响

Fig. 2 Effects of ethanol concentration (A), liquid:solid ratio (B), temperature (C) and time (D) on the extraction yield of camptothecin

3.3 响应面实验结果与分析

时间3因素作3水平的响应面正交设计实验,所得结果见表3。

3.3.1 响应面实验结果

对影响提取率较大的液料比、乙醇浓度、提取

表3 响应面实验结果

Table 3 Results of RSM experiments

编号 No.	因素 Factor			喜树碱含量 Camptothecin content (mg/g)
	A (v/v)	B (mL: g)	C (h)	
1	0	0	0	0.817
2	1	1	0	0.769
3	1	0	-1	0.716
4	0	0	0	0.818
5	-1	1	0	0.793
6	0	0	0	0.817
7	-1	-1	0	0.785
8	0	1	-1	0.763
9	0	-1	-1	0.728
10	1	-1	0	0.744
11	1	0	1	0.746
12	-1	0	1	0.808
13	0	0	0	0.817
14	0	0	0	0.818
15	0	-1	1	0.802
16	0	1	1	0.805
17	-1	0	-1	0.719

3.3.2 模型的建立及其显著性检验

分析如表4所示。

对上述实验结果进行响应曲面分析,所得方差

表4 回归模型方差分析表

Table 4 ANOVA of regression models

方差来源 Source	总方差 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F值 F Value	P值 P value
回归模型 Model	0.022	9	2.495×10^{-3}	3205.03	< 0.0001
A	2.11×10^{-3}	1	2.11×10^{-3}	2713.3	< 0.0001

B	6.30×10^{-4}	1	6.30×10^{-4}	809.33	< 0.0001
C	6.90×10^{-3}	1	6.90×10^{-3}	8866.4	< 0.0001
AB	7.225×10^{-5}	1	7.23×10^{-5}	92.8	< 0.0001
AC	8.702×10^{-4}	1	8.70×10^{-4}	1117.75	< 0.0001
BC	2.56×10^{-4}	1	2.56×10^{-4}	328.81	< 0.0001
A ²	5.44×10^{-3}	1	5.44×10^{-3}	6989.33	< 0.0001
B ²	3.19×10^{-4}	1	3.19×10^{-4}	409.33	< 0.0001
C ²	4.93×10^{-3}	1	4.93×10^{-3}	6325.43	< 0.0001
残差 Residual	5.45×10^{-6}	7	7.79×10^{-7}		
失拟值 Lack of Fit	4.25×10^{-6}	3	1.42×10^{-6}	4.72	0.0839
纯误差 Pure Error	1.20×10^{-6}	4	3.00×10^{-7}		
总误差 Cor Total	0.022	16			

利用 Design-Expert 7.0 对表 2 试验数据进行多元回归拟合,得到生物碱提取率(Y)对乙醇体积分数(A)、液料比(B)、时间(C)的二次多项回归模型为: $Y = -12.2613 + 0.26399A + 6.795 \times 10^{-3}B + 1.20095C + 1.7 \times 10^{-4}AB - 5.9 \times 10^{-3}AC - 3.2 \times 10^{-3}BC - 1.438 \times 10^{-3}A^2 - 3.48 \times 10^{-4}B^2 - 0.1368C^2$, $R^2 = 0.9998$,表明拟合情况良好,回归方程模型可行。

方差分析结果表明,各因素与响应值之间线性关系显著:回归模型 F 值 = 87.72, $P < 0.0001$,表明二次多元回归模型极其显著;失拟 F 值 = 4.72, $P = 0.0839 > 0.05$,模拟失拟不显著;模拟的整确定系数 $R^2 = 0.9998$,说明该模型拟合程度比较好,实验误差小,适合用于对喜树生物碱提取进行分析和预测。

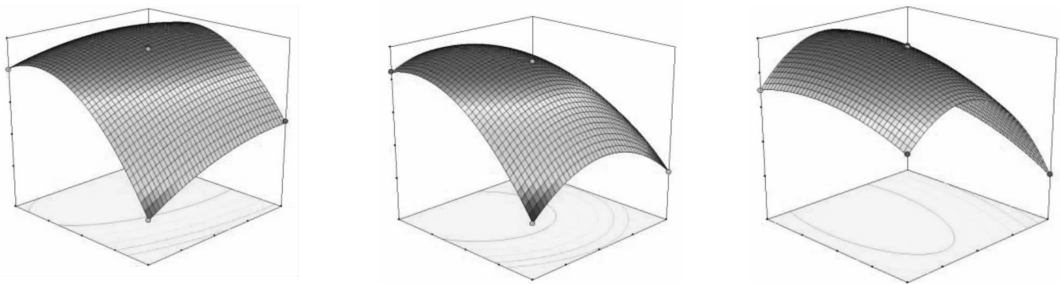


图 3 3 因素交互作用对喜树碱提取率影响的响应面图(B-C、A-C、A-B)

Fig. 3 Response surface plots showing the cross interaction among three factors (BC, AC, AB)

图 4 分别表示在固定乙醇浓度 90%、液料比 20:1 (mL/g) 和醇提时间 2.0 h 的条件下,液料比-时间(B-C)、液料比-时间(A-C)、乙醇浓度-液料比(A-B)3 因素交互作用对提取率的影响。结果显示,A、B、C 三者交互作用显著。对回归方程进行一阶求导,得 3 元一次方程: $0.26399 - 0.00017B - 0.0059C - 0.002874A = 0$; $0.006795 - 0.00017A - 0.0032C - 0.00696B = 0$; $1.20095 - 0.0059A - 0.0032B - 0.2736C = 0$ 。求解方程得到最佳提取条件为:乙醇浓度 88.53%,液料比 21.4:1 (mL/g),时间 2.23 h,按照上述条件补做验证性实验,结果显示喜树碱提取率

提高至 0.847 mg/g(干重),较单因素最佳提取工艺提高了 3.42%,优化效果显著。

4 结论

依据单因素实验结果,采用响应面正交实验法对喜树生物碱 3 个影响因素进行分析,确定最佳提取工艺为乙醇浓度 88.53%,液料比 21.4:1 (mL/g),时间 2.23 h,此时喜树生物碱提取率可达到 0.847 mg/g(干重)。本研究首次采用响应面正交实验的方法对湖南产喜树生物碱提取工艺进行了优化。本研究为实现喜树中特殊成分-喜树碱提取效

率的提高,进一步开发利用喜树这一重要药用植物提供了重要的实验依据,为喜树碱的提取工艺提供了又一科学合理,准确可靠的实验数据。

参考文献

- 1 Zhao JL(赵金良),Tang XD(唐晓丹),Yun D(运达),*et al.* Optimization of extraction process of camptothecin and 10-hydrxycamptothecin by orthogonal design. *J Anhui Agric* (安徽农业科学),2012,40:9655-9656.
- 2 Liu LF,Desai SD,Li TK,*et al.* Mechanism of action of camptothecin. *Ann NY Acad Sci*,2000,922:1-10.
- 3 Mross K,Richly H,Schleucher N,*et al.* A phase I clinical and pharmacokinetic study of the camptothecin glycoconjugate,BAY 38-3441,as a daily infusion in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol*,2004,15:1284-1294.
- 4 Hsiang YH,Liu LF,Wall ME,*et al.* DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res*,1989,49:4385-4389.
- 5 Giovanella BC. Topoisomerase I Inhibitors. *Cancer therapeu-*

tics:experimental and clinical agents (B. Teicher Humana eds.),1997,137-151.

- 6 Wang Y(王洋),Yu T(于涛),Zhang YH(张玉红),*et al.* Study on extraction of camptothecin by NaOH AQ. From fruits of *Camptotheca acuminata*. *Bull Bot Res* (木本植物研究),2000,20:433-437.
- 7 Lorence A,Nessler CL. Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochem*,2004,65:2735-2749.
- 8 Zhang YH(张玉红). The geographical variation and seasonal changes of camptothecin in fruits of *Camptotheca acuminata*. *J Nor East Forest Univ* (东北林业大学学报),2002,30(6):44-46.
- 9 Wang LL(王玲丽),Liu WZ(刘文哲). Contents of camptothecin in *Camptotheca acuminata* from different provenances. *Chin Bull Bot* (植物学通报),2005,22:584-589.
- 10 Zhang YH(张玉红),Zu YG(祖元刚). Study on camptothecin content in leaves of *Camptotheca acuminata* from different regions and season. *Chin Bull Bot* (植物学通报),2003,20:572-575.

(上接第 1857 页)

- 2 Xiao ZY(肖志勇),Mu Q(穆青). Advances on chemical investigation of *Hypericum*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2007,19:344-355.
- 3 Yin ZQ(殷志琦),Ye WC(叶文才),Zhao SX(赵受训). Advances in pharmacological effects *Hypericum*. *China Prac Med*(中国医学生物技术应用杂志),2003,02:14-16.
- 4 Tang X(唐栩),Xu DH(许东辉),Mei XT(梅雪婷),*et al.* Pharmacological studies 26 kinds of natural active ingredients flavonoids progress. *J Chin Med Mater*(中药材),2003,26:46-54.
- 5 Yan M(严敏),Tang XL(唐筱露). Research survey of flavonoids antiviral. *Asia-Pacific Tradit Med*(亚太传统医药),2009,5:149-150.
- 6 Zhu RX(朱荣鑫),Zhang SL(张赛龙),Jin LS(金永生). Recent advances in the study on antitumor effects of flavonoids. *Drugs Clinic*(现代药物与临床),2010,25:5-10.
- 7 Wang YS(王跃生),Wang Y(王洋). Research advances of macroporous resin. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2006,31:961-965.
- 8 Liu Y(刘玥). Progress of application of macroporous resin in the extraction and purification of traditional Chinese medicine. *World Chin Med*,2013,8:232-234.
- 9 Huang YC(黄月纯),Huang YH(黄樱华),Liu CL(刘翠玲),*et al.* Study on purification of the total flavonoids (phe-

nolic acids) from *Herba Lycopk* with S-8 macroporous adsorption Resin. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学),2010,21:694-698.

- 10 Chen C(陈超),Chen GQ(陈国芹),Chen AL(陈阿丽),*et al.* Optimization of purification technology for effective parts from compound Tongmai granules by AB-8 macroporous absorption resin. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学志),2013,19(5):4-6.
- 11 Dong HY(董恒颖),Wang Y(王莹). Purification process for flavonoids from haw thorn leaves with ADS type of macroporous resin. *Tianjin Pharm*(天津药学),2010,22(5):67-71.
- 12 Huang XZ(黄相中),Yin Y(尹燕),Yang QL(杨晴来),*et al.* Studies on antioxidation and detemination of total flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves from Kunming. *J Yunnan Univ of Nat,Nat Sci Ed*(云南民族大学学报),2010,19:369-371.
- 13 Fu BQ,Liu J,Li H,*et al.* The application of macroporous resins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid. *J Chromatogr A*,2005,1089:18-24.
- 14 Liu FQ(刘福强),Xia MF(夏明芳),Yao SL(姚姗丽),*et al.* Adsorption equilibria and kinetics for phenol and cresol onto polymeric adsorbents: effects of adsorbents adsorbates structure and interface. *J Hazard Mater*,2008,152:715-720.