

# 从喜树叶中连续分离喜树碱和羟基喜树碱

罗虹<sup>1</sup>, 戴汉松<sup>1\*</sup>, 王家文<sup>2</sup>, 王涛<sup>3</sup>

<sup>1</sup>四川师范大学化学与材料科学学院, 成都 610068;

<sup>2</sup>四川大学华西医院国家重点实验室, 成都 610041; <sup>3</sup>四川理工学院化学系, 自贡 643000

**摘要:** 以喜树叶为原料, 用 0.3% NaOH 碱法提取, 加入生石灰过滤去除果胶, 用乙醇萃取滤液, 然后用盐酸调 pH = 3。经柱层析用梯度淋洗法可分别得到喜树碱和 10-羟基喜树碱, 淋洗条件为: 2% 甲醇的氯仿溶液和 4% 甲醇的氯仿溶液。喜树碱的收率为 0.34%, 羟基喜树碱的收率为 0.02%。喜树碱和羟基喜树碱的纯度均在 98.5% 以上。

**关键词:** 喜树叶; 喜树碱; 10-羟基喜树碱; 分离

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

## A Method of Separating Camptothecin and 10-Hydroxycamptothecin from Leaves of *Camptotheca Acuminate* Decne in a Row

LUO Hong<sup>1</sup>, DAI Han-song<sup>1\*</sup>, WANG Jia-wen<sup>2</sup>, WANG Tao<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Chemistry and Material Science, SiChuan Normal University, Chengdu 610068, China;

<sup>2</sup>National Main Laboratory of Huaxi Hospital, SiChuan University, Chengdu 610041, China;

<sup>3</sup>Department of Chemistry, SiChuan Science and Engineering College, Zigong 643000, China

**Abstract:** The leaves of *camptotheca acuminate* decne are used as the raw material for extraction of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin. The leaves are dipped in 0.3% NaOH. Quicklime is added to precipitate the pectin and filtrate it. The liquid is extracted by ethyl alcohol. Then the filtrate liquid is become pH = 3 though dropping in hydrochloric acid. The camptothecin and 10-hydroxycamptothecin can be gotten by the 2% and 4% methanol in the chloroform through the silica chromatogram. The rate of yield of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin is 0.34% and 0.02% respectively, and their purity all exceed 98% (HPLC).

**Key words:** leaves of *camptotheca acuminate* decne; Camptothecin; 10-Hydroxycamptothecin; separating

喜树 (*Camptotheca acuminate* Decne) 是我国特有的珙桐科植物, 主要分布于四川、云南、贵州、重庆以及长江以南等地区。1966 年, Wall<sup>[1]</sup> 等人首次从喜树杆中分离出一种新的生物碱-喜树碱 (Camptothecin, CPT)。随后又分离出羟基喜树碱等 20 多种喜树碱衍生物。这些化合物具有不同的生物活性, 其中喜树碱和羟基喜树碱 (Hydroxycamptothecin, HCPT) 表现出显著的抗癌活性。喜树碱毒性较大, 临床上已停止使用。1985 年 Hsiang<sup>[2]</sup> 等人发现喜树碱及其衍生物是以拓扑异构酶 I (TopoI) 为作用靶抑制脱氧核糖核酸的合成而发挥抗癌作用的机制后, 它们再一次引起人们的关注, 成为抗癌领域研究的新热点。因此以喜树碱及其衍生物为基础, 开发

高效、低毒抗癌药物具有简便经济的优点, 是当前抗癌药物主要开发途径之一<sup>[3-5]</sup>。10-羟基喜树碱对肿瘤有明显抑制作用, 效果好且毒性低, 已经临床上广泛应用, 成为喜树碱类衍生物研究的重要原料药<sup>[6,7]</sup>。喜树碱和羟基喜树碱的结构如下图所示:

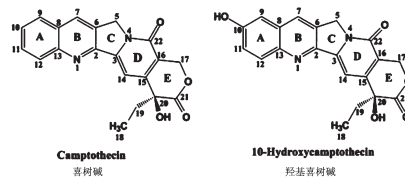


图 1 喜树碱和羟基喜树碱结构

Fig. 1 The chemical structures of Camptothecin and 10-Hydroxycamptothecin

目前, 喜树碱主要是从喜树果实和喜树根皮部提取的。随着喜树碱需求量的增加, 对原料的需求

也逐渐增加。但是喜树果实受季节限制,一年只产一次;而根皮则需大量砍伐喜树,既毁坏植被,又破坏生态环境,因此已没人采用。而喜树叶则不受季节影响,且再生性很强,是以后喜树碱和羟基喜树碱的主要来源。据研究,在喜树叶中也含有丰富的喜树碱和羟基喜树碱,并且在嫩叶中含量最高<sup>[8,9]</sup>。目前研究喜树碱和羟基喜树碱提取工艺的人很多,一般的提取工艺为:先用70%的乙醇进行渗漉,然后回收乙醇,再用氯仿反复萃取,浓缩氯仿近干,再用大量的氯仿和甲醇的混合液进行反复结晶,得喜树碱;然后用乙酸乙酯反复萃取,再用层析柱多次分离,得到羟基喜树碱<sup>[10-12]</sup>。该法生产过程太长,生产成本低,处理复杂。而我们先用0.3%的NaOH水溶液浸泡,生石灰沉淀去除果胶,乙醇萃取后,再将溶液pH调到3,浓缩后上层析柱,分别用2%和4%甲醇的氯仿溶液洗脱,可得到喜树碱和羟基喜树碱。该法处理过程简单,产品收得率较高,产品纯度高(HPLC $\geq$ 98.5%),容易在生产中推广应用。

## 1 试剂与仪器

### 1.1 原料与试剂

喜树碱对照品购自北京中西公司;高效薄层板(粒径2~5  $\mu\text{m}$ ,厚度0.25 mm) Merck CO.;层析用硅胶 C. P(100~200目)青岛海洋化工厂生产;氢氧化钠 A. R. 天津市博迪化工有限公司;盐酸 A. R. 成都科龙化工有限公司;甲醇 A. R. 天津市博迪化工有限公司;乙醇 A. R. 天津市博迪化工有限公司;丙酮 A. R. 天津市博迪化工有限公司;氯仿 A. R. 天津市博迪化工有限公司。

### 1.2 仪器

HP110 高效液相色谱仪,美国惠普公司;Bruier Avance 600 核磁共振仪,CDCl<sub>3</sub> 作溶剂;R-501B 型旋转蒸发仪,上海申胜实验仪器有限公司;熔点仪, XRC-1 型;SHZ-D 循环水真空泵。

## 2 实验部分

### 2.1 喜树叶的处理

将采集的新鲜喜树叶在通风阴凉处风干,粉碎。

### 2.2 提取

取1 kg 喜树叶,加入16 L 0.3%的NaOH水溶液,在室温下浸提4 h,抽滤,重复提取三次,合并滤液。加入95%乙醇24 L,加入生石灰300 g,搅拌30 min,过滤沉淀去除果胶。用浓盐酸调滤液pH=2~3。

### 2.3 分离、纯化

将乙醇相浓缩至1 L(旋干约为15 g)。加入30 g 100~200目硅胶,混匀,旋干。取600 g 柱层析硅胶(100~200目)干法装柱(柱尺寸:6 cm $\times$ 80 cm)。硅胶顶端再放一张与柱内径相同的一片滤纸(需把滤纸均匀的扎无数个小孔),再将吸附有样品的硅胶均匀上样,在其上再覆盖一层石英砂。在上样之前,需先在硅胶上加入4~5 cm高的2%甲醇的氯仿溶液。然后先用2%甲醇的氯仿溶液洗脱,每100 mL洗脱液收集为一份,洗脱至流出液呈淡黄色为止。将淋洗液旋转至干,再用氯仿:甲醇=1:1的溶剂进行重结晶,得浅黄色固体0.34 g,为化合物(I)。然后再用4%甲醇的氯仿溶液对层析柱进行洗脱,用薄层板跟踪检测,洗脱至流出液无浅黄色液体为止。将该浅黄色液体旋转至干,再用氯仿:甲醇=1:1的溶剂进行重结晶,得黄色固体0.02 g,为化合物(II)。用高效薄层板检测(展开剂:氯仿:丙酮=7:3),知喜树碱呈蓝色 $R_f=0.5$ ,10-羟基喜树碱呈浅红色 $R_f=0.2$ 。

## 3 结构鉴定

对所得到的化合物进行结构鉴定,结果如下:

**化合物(1)** 为浅黄色粉状物质,mp. 265.5  $^{\circ}\text{C}$ (理论值:264~267  $^{\circ}\text{C}$ ); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +31.2^{\circ}$ ;<sup>1</sup>H NMR(DMSO- $d_6$ ) $\delta$ :0.89(3H,t,C-18),1.89(2H,m,C-19),5.28(2H,s,C-5),5.43(2H,s,C-17),6.49(1H,s,C-20,OH),7.35(1H,s,C-14),7.6~8.25(4H,m,C-9,10,11,12),8.68(1H,s,C-7);MS  $m/z$ :348( $M^+$ )。与报道的喜树碱的结构一致。经高效液相色谱(HPLC)分析知纯度为:99.11%。

**化合物(2)** 为黄色粉状物质,mp. 264~269  $^{\circ}\text{C}$ (分解)(文献值:266~267  $^{\circ}\text{C}$ );IR(KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3424.1(OH),1743.0(lactone),1656.0(pyridione),1587.7(aromatic)  $\text{cm}^{-1}$ ;<sup>1</sup>H NMR(300 Hz,DMSO- $d_6$ ) $\delta$ :0.87(3H,t, $J=7.3$  Hz,H-18),1.86(2H,m,H-19),5.23(2H,s,H-5),5.41(2H,s,H-17),6.51(1H,s,H-20-OH),7.26(1H,s,H-14),7.27~7.44(2H,m,H-9,11),8.03(1H,d, $J=9.11$ ,H-12),8.45(1H,s,H-7),10.34(1H,s,H-10-OH)。与报道的羟基喜树碱结构一致。经高效液相色谱(HPLC)分析知纯度为:98.49%。

## 4 讨论

通过实验得知,以喜树嫩叶为原料,喜树碱的收

得率为 0.34‰, 羟基喜树碱为 0.02‰, 与从喜树果实中提取的收得率相差不多(从喜树果实中提取喜树碱的收得率一般在 0.34 ~ 0.4‰, 羟基喜树碱的收得率一般为 0.018‰), 并且喜树叶资源丰富, 不受季节变化的限制, 是提取喜树碱和羟基喜树碱的理想原料。提取工艺中, 氢氧化钠的浓度以 0.3% ~ 0.5% 为宜, 太高容易破坏 E 环的内酯结构, 甚至发生断键, 同时叶子中的果胶和粘液汁溶解过多, 在乙醇萃取时不易分层, 需利用生石灰去除果胶; 氢氧化钠浓度太低, 喜树碱的提取率太低。利用喜树碱和羟基喜树碱的  $R_f$  值差距较大(在氯仿:丙酮 = 7:3 体系中, 喜树碱的  $R_f = 0.5$ , 而 10-羟基喜树碱的  $R_f = 0.2$ ), 在过层析柱时先用 2% 甲醇的氯仿溶液洗脱, 这时羟基喜树碱不容易被洗脱下来。当喜树碱完全被洗脱后, 再改用 4% 甲醇的氯仿溶液洗脱, 这时羟基喜树碱很容易被洗脱, 使操作简化, 产品纯度高(HPLC  $\geq 98.5\%$ ), 易于生产。

#### 参考文献

- 1 Wall ME, Wani MC, Cook CE, et al. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata. *J Am Chem Soc*, 1966, 88:3888-3890.
- 2 Hsiang YH, Herizberg R, Hecht S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 1985, 260:14873-14878.
- 3 Giovanella B C. Topoisomerase I. Inhibitors. *Cancer Therapeutics: Experimental and Clinical Agents* (B Teicher Humanaeds), 1977, 137-152.
- 4 Dai HS(戴汉松), Wang JW(王家文), Wang T(王涛). Rapid separation of camptothecin and hydroxycamptothecin from the fruit of camptotheca acuminata decne. *Sci Technol West Chin*(中国西部科技), 2013, 12(5):1, 6.
- 5 Lei YJ(雷英杰). 20(S)-Camptothecin: a family of natural antitumor agents. *Chem Res Appl*(化学研究与应用), 2001, 13:359-362.
- 6 Zu YG(祖元刚), Tang ZH(唐中华), Yu JH(于景华), et al. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin accumulate differentially under specific developmental control in camptotheca acuminata. *Acta Botanica Sin*(植物学报), 2003, 45:494-499.
- 7 Yuan D(袁丹), Rong RB(容如滨), Yu ZY(喻宗沅), et al. The progress of research and application of anticancer drug 10-Hydroxy camptothecin. *Chem Bioeng*(化学与生物工程) 2007, 24:9-11, 24.
- 8 Lopez-Meyer M, Nessler CL, Mcknight TD. Sites of accumulation of the antitumor alkaloid camptothecin in *Camptotheca acuminata*. *Planta Med*, 1994, 60:558-560.
- 9 Liu LJ(刘丽杰), Yu JH(于景华). Dynamic change of camptothecin content and 10-hydroxy camptothecin content of leaves of one year old camptotheca acuminata in different developmental stage. *J Qiqihar Univ*(齐齐哈尔大学学报), 2009, 25(4):63-67.
- 10 Ming X(明霞), Wei ZH(魏忠环), Xu QH(徐清海). A process for the extraction of camptothecin from fruits of camptotheca acuminata decne. *J Shenyang Agric Univ*(沈阳农业大学学报), 2005, 36:101-103.
- 11 Shanghai institute of medicine, plant room camptothecin research group(上海药物研究所植化室喜树碱研究组). Anti-cancer active ingredients of camptothecin and 10-hydroxy camptothecin in the fruits of camptotheca acuminata decne. *Chin Herb Med Commun*(中草药通讯), 1975, 5:17.
- 12 Luo HW(罗厚蔚). A new process for separation of 10-hydroxy camptothecin-continuous chromatography. *Chin Herb Med Commun*(中草药通讯), 1975, 1:33-34.