

应用均匀设计法优化喜树果乙醇渗漉工艺条件

黄瑞松¹, 胡秋萍², 陈燕军³, 孔桂豪¹

(1 中国中医研究院广西民族医药研究所, 广西 南宁 530001; 2 广西中医学院, 广西 南宁 530001;
3 中国中医研究院中药研究所; 北京 100700)

摘要: 目的: 优化喜树果乙醇渗漉提取工艺条件。方法: 应用均匀设计法考察乙醇浓度(X_1)、渗漉速度(X_2)、漉液收集量(X_3)对喜树碱提取得率的影响。结果: 喜树碱得率与乙醇浓度及漉液收集量成正比, 与渗漉速度无关。最佳工艺条件为: 以 80% 乙醇作溶剂, 渗漉速度为 $6\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 收集漉液量为 8 倍药材量。结论: 优化的最佳提取工艺条件是科学的, 喜树碱得率较高。

关键词: 喜树果; 喜树碱; 均匀设计; 最佳工艺条件

中图分类号: R283.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)02-0012-03

喜树果为蓝果树科(洪桐科)植物喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 的干燥成熟果实。本品有抗癌、散结、破血化瘀之功。喜树主要含生物碱, 其中喜树碱以果实含量最高^[1]。动物试验表明, 喜树碱具有显著的抗肿瘤活性^[2]。广西昌弘制药有限公司根据广西民间用药经验, 利用喜树果配伍其它中草药, 研制成中草药制剂复生康胶囊, 用于治疗胃癌、肝癌有较好疗效。复生康胶囊制备工艺中, 根据喜树碱的特性, 我们采用乙醇渗漉提取法提取喜树果药材, 并采用均匀设计法优化提取工艺条件, 取得满意效果。

1 仪器与材料

1.1 仪器 LC-8A 高效液相色谱仪, SPD-6AV 可见一紫外光检测器, C-R4A 色谱处理机(均为日本岛津公司)。

1.2 材料 喜树碱, 中国科学院上海药物所提供(含量 > 98%)。喜树果购于南宁市医药总公司, 产地广西, 经鉴定符合广西中药材标准 1990 年版“喜树果”项下规定。高效液相流动相所用甲醇为优级纯, 水为重蒸水, 其它化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取溶剂的选择 喜树果主要含喜树碱、10-羟基喜树碱、11-羟基喜树碱、10-甲氧基喜树碱、11-甲氧基喜树碱、脱氧喜树碱、喜树次碱等。其中喜树碱可溶于乙醇、氯仿。用乙醇提取, 对药材渗透力强, 溶剂回收方便, 对人体比较安全, 且喜树果的醇

提取物有抗癌的药理作用^[2]。故喜树果采用乙醇作为提取溶剂。

2.2 提取方法的确定 据文献资料报道, 喜树碱遇光易氧化, 使毒性增大; 遇热易破坏, 使疗效降低^[2], 提取时宜低温避光进行。有报道喜树果粉用 80% 乙醇渗流提取^[1]。故本研究采用乙醇渗漉提取喜树果。

2.3 试验设计 喜树果用乙醇渗漉提取, 影响喜树碱得率的因素可能有乙醇浓度, 漉速及漉液收集量。为此, 我们采用均匀设计法对乙醇渗漉提取喜树果工艺条件进行研究, 条件设计为三因素三水平。见表 1。

表 1 乙醇渗漉提取喜树果的因素水平设计

因素	水平		
乙醇浓度(X_1)/%	60	70	80
漉速(X_2)/ $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	2	4	6
漉液收集量(X_3)/倍药材量	4	6	8

因喜树果的主要有效成分为喜树碱, 故选择喜树碱得率 Y (%, 喜树碱/药材) 作为考核指标。根据拟水平法, 选择均匀设计 $U_6^*(6^4)$ 表 1 2.3 列安排试验^[4]。见表 2。

2.4 提取方法 喜树果药材粉碎成最粗粉(过 10 目筛), 称取 100g, 加入一定浓度乙醇 160ml, 拌匀, 密闭 1h, 移至渗漉筒内, 压紧, 上面放一张滤纸, 上压玻珠数粒, 缓缓加入乙醇至高于药面 2cm, 浸渍 24h, 以一定漉速渗漉, 收集一定体积漉液, 即得。

2.5 喜树碱含量测定

2.5.1 供试品溶液的制备 分别精密吸取上述 2.4

的渗漉液 1ml 置 10ml 量瓶中, 各加相应浓度乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取喜树碱对照品 12.94mg, 置 200ml 容量瓶内, 加甲醇至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ml, 置 25ml 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.3 色谱条件 色谱柱: shim-pack CLS-ODS 柱 (6.0 × 150mm); 流动相: 甲醇-水 (53: 47), 流速: 0.8ml · min⁻¹; 检测波长: 254nm; 柱温: 室温。

2.5.4 线性关系 精密吸取上述对照品溶液各 10μl 分别进样测定, 以进样量为 X 轴, 峰面积为 Y 轴, 绘制标准曲线。回归方程为: $Y = 214413.592X - 1699.8669$, $r = 0.9999$ 。喜树碱在 0.0605~ 0.3020μg 之间与峰面积呈良好线性关系。

2.5.5 样品测定 精密吸取对照品溶液 (3.882μg/ml) 与供试品溶液各 10μl, 分别进样测定。结果见表 2。

表 2 乙醇渗漉提取喜树果均匀设计及试验结果

No	X ₁ /%	X ₂ /ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	X ₃ /倍	Y/%
1	60	2	6	0.0548
2	60	4	8	0.0768
3	70	6	4	0.0659
4	70	2	8	0.1091
5	80	4	4	0.0872
6	80	6	6	0.0959

2.6 回归与优化分析 将表 2 的数据输入微机, 进行多元逐步回归处理, 得到回归方程: $Y' (Y'$ 为理论值, Y 为实测值) = $-7.515675 \times 10^{-2} + 1.425393 \times 10^{-3} X_1 + 1.378933 \times 10^{-4} X_1 X_3$, $R = 0.9512$, $S = 7.9290 \times 10^{-3}$, $F = 14.2458 > F_{2,3}(0.05) = 9.55$, 表明回归方程可信。

回归方程表明, 在本试验条件下喜树碱得率 (Y') 与漉速 (X_2) 无关, 与乙醇浓度 (X_1) 及漉液收集量 (X_3) 成正比。

应用网络法^[5] 进行优化处理, 令 $Y' > 0.07$, $G = 5$ 时, 可得到 18 组优化结果, 详见表 3。

由表 3 可知, 同一漉液收集量, 乙醇浓度不同, 喜树碱得率差别较大, 80% 的乙醇得率最高; 同一乙醇浓度, 漉液收集量不同, 喜树碱得率差别亦较大, 收集 8 倍药材量的漉液得率最高; 因喜树碱得率 Y 与流速 X_2 无关, 选择较快的漉速, 可缩短渗漉时间, 提高生产效率。综上所述, 最佳生产条件应为: 以 80% 乙醇作溶剂, 渗漉速度为 6ml·min⁻¹·kg⁻¹, 收集

漉液量为 8 倍药材量。

表 3 乙醇渗漉提取喜树果工艺条件优化结果

No.	X ₁ (%)	X ₃ (倍)	Y' (%)	No.	X ₁ (%)	X ₃ (倍)	Y' (%)
1	60	8	0.0766	10	75	5	0.0835
2	65	6	0.0713	11	75	6	0.0938
3	65	7	0.0802	12	75	7	0.1041
4	65	8	0.0892	13	75	8	0.1145
5	70	5	0.0729	14	80	4	0.0830
6	70	6	0.0825	15	80	5	0.0940
7	70	7	0.0922	16	80	6	0.1051
8	70	8	0.1018	17	80	7	0.1161
9	75	4	0.0731	18	80	8	0.1271

2.7 验证试验 称取喜树果最粗粉 5000g, 加 80% 乙醇 8000ml 拌匀, 密闭 1h, 装入渗漉筒中, 加入 80% 乙醇浸过药面数 cm, 浸渍 24h, 开始渗漉, 流速为 30ml·min⁻¹, 收集源液量为 40000ml。参考上述方法制备供试品溶液, 并进行测定。结果喜树碱得率 $Y = 0.1195\%$, 实测值 Y 与理论 Y' 接近, 说明优化条件符合实际生产情况。

2.8 喜树果药材含量测定 取喜树果粗粉 (过 40 目筛) 约 0.1g, 精密称定, 置 50ml 锥形瓶中, 加 80% 乙醇置 50℃ 水浴温浸 2 次 (25, 25ml), 每次 30min, 不时轻轻振摇, 滤过, 滤液转移置 50ml 量瓶中, 加 80% 乙醇至刻度, 摇匀。精密吸取 10μl 进样, 参照上述 2.5.3 条件测定。结果喜树果药材中喜树碱含量为 0.1384%。

3 讨论

喜树果体积较小 (一般长 2~ 2.5cm, 宽 0.5~ 0.7cm), 粉碎时不宜过细, 以免堵塞孔隙, 妨碍溶剂通过。我们曾将完整的喜树果及粉碎成最粗粉的药材分别用相同的条件进行渗漉, 得到的渗漉液进行喜树碱含量测定, 结果完整果实得率为 0.0833%, 最粗粉得率为 0.1195%, 后者明显高于前者。故试验中投料药材粉碎为最粗粉。

试验结果表明, 在本试验条件范围内喜树果最粗粉用乙醇渗漉提取, 喜树碱的提取得率与乙醇的浓度及漉液的收集量成正比, 与渗漉速度无关。经回归方程进行区间优化, 得到 18 组优化结果。乙醇浓度与漉液收集量对喜树碱的得率均影响较大, 喜树碱以的 80% 乙醇渗漉、收集漉液为 8 倍药材量得率最高; 喜树碱的得率虽然与漉速无关, 但从缩短渗漉时间、提高生产效率出发, 应选择较快的漉速进行渗漉。故以 80% 乙醇作为提取溶剂、渗漉速度为

$6\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、收集漉液为 8 倍药材量作为最佳提取条件。以此条件进行验证,结果证实喜树碱提率的实测值 Y 与理论值 Y' 接近,说明优化条件符合实际生产情况。

经测定,试验所用的喜树果药材喜树碱含量为 0.1384%,验证试验最佳提取条件渗漉提取液的得率为 0.1195%,喜树碱含量从药材到提取液转移率为 86.34%,说明本提取工艺能提取得到喜树果中的大部分喜树碱成分,提取工艺是科学合理的。

参考文献:

[1] 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.

- [2] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986. 166.
- [3] 唐明珠. 光和热对喜树碱含量测定的影响[J]. 药学通报, 1983, 18(1): 8.
- [4] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 69.
- [5] 夏念凌. 最优化问题的计算机实用算法[M]. 北京: 水利电力出版社, 1990. 11.