论著

文章编号:1000-5404(2007)19-1886-03

紫杉醇提取工艺的优化试验研究

杨 宪[1,2],杨水平[1],张 雪[1],谭 劼[2] ([1]西南大学资源环境学院,重庆 400716;[2]重庆赛诺生物药业股份有限公司,重庆 410041)

提 要:目的 优化并建立红豆杉树皮中紫杉醇的提取工艺。**方法** 以使用RP-HPLC测定的紫杉醇含量为指标,采用正交试验法对提取过程中乙醇浓度(A)、乙醇用量(B)、提取次数(C)、提取时间(D)4因素进行优选试验。**结果** 从红豆杉中提取紫杉醇的最主要影响因素是乙醇浓度及乙醇用量,高浓度、适当多的用量有利于提取;提取时间和次数也极为重要,单因素效果分别以每次提取2 h和共提取2次为最佳。**结论** T9($A_3B_3C_2D_1$)、T8($A_3B_2C_1D_3$)为优化选出的紫杉醇最佳提取工艺条件。

关键词:红豆杉;紫杉醇;HPLC;正交试验

中图法分类号:R282.71;R284.2 **文献标识码**:A

Optimization of taxol extraction from *Taxus baccata L.*

YANG Xian[1,2], YANG Shui-ping[1], ZHANG Xue[1], TAN Jie[2] ([1]College of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400716; [2]Chongqing Sino Biology Pharmaceutical Co. LTD., Chongqing 410041, China)

Abstract: **Objective** To optimize and establish the extractive technology of taxol from *Taxus baccatal L.*. **Methods** HPLC was applied to determine the content of taxol. The orthogonal test was adopted to examine the effects of the 4 factors consisting of ethanol concentration, ethanol volume, extractive times and extractive time. **Results** Ethanol concentration and ethanol volume were essential factors influencing the extraction of taxol. High concentration and amount of ethanol facilitated the extraction. Extractive times and extractive time were also important. By single-factorial effect, 2 h and 2 times in each extraction of taxol were the best. **Conclusion** The optimum extractive condition is T9 ($A_3B_3C_2D_1$) and T8 ($A_3B_2C_1D_3$).

Key words: *Taxus baccatal L.*; taxol; HPLC; orthogonal test

红豆杉(*Taxus baccata L.*)又名紫杉,属红豆杉科红豆杉属常绿乔木,是世界珍稀濒危的古老树种,至今已有200多万年的历史,而紫杉醇(*Taxo*l)系红豆杉属(*Taxus L.*)植物特有的次生代谢产物,它是最具抗癌活性的天然化合物之一[1,2],也是目前国际市场上最热门的新型抗癌药物,用来治疗肺癌、白血病、前列腺癌、子宫癌等肿瘤疾病及艾滋病。

由于红豆杉的提取物紫杉醇(二萜类化合物)具有独特的抗癌机制,被公认为是继阿霉素、顺铂后,对多种癌症疗效好、副作用小的新型抗癌药物。这种从红豆杉属植物中提取的紫杉醇,在红豆杉属植物体中的含量又相当低,占树皮干重的0.01%左右,而对红豆杉中紫杉醇的提取,相关报道少,现有的提取工艺一般以乙醇为提取剂,但采用的乙醇用量和浓度、提取的时间与次数随意性比较大,未考虑提取效果与成本的关系。基于此,本研究采用正交试验设计,探寻紫杉醇的最佳提取工艺条件,为红豆杉的进一步开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

紫杉醇对照品来自中国药品生物制品检定所;试药:甲醇为色谱纯,乙醇、二氯甲烷为分析纯;红豆杉树皮:重庆赛诺生物药业提供,经重庆市中药研究院生药室鉴定。

1.2 仪器

高效液相色谱仪(岛津LC-2010AHT型)、电子天平(METTER AE240)、植物粉碎机(型号:FZ102型,天津市泰斯特仪器有限公司);水浴锅(DZKW-D,河北黄骅航天天仪器厂);超声波清洗器;加热回流装置。

1.3 试验设计和测定方法

1.3.1 试验设计 本研究以乙醇浓度、乙醇用量、提取次数、提取时间作为试验因子,采用3水平4因素[$L_9(3^4)$]9个处理提取紫杉醇,具体设计见因素水平表(表1)和试验安排表(表2),每个处理重复3次。

作者简介:杨 宪(1976-),男,四川省阆中市人,药师,主要从事药物质量分析及新药开发方面的研究。电话:13638313627

通讯作者:杨水平,电话:(023)68251429

收稿日期:2006-10-13;修回日期:2007-04-18

表 1　紫杉醇提取的因素水平表

水平	因素			
	A:乙醇浓度(%)	B:乙醇用量(ml/100 g)	C:提取次数	D:提取时间(h)
1	75	400	1	2
2	85	600	2	3
3	95	800	3	4

表 2　紫杉醇提取的试验安排表[$L_9(3^4)$]

试验序号	A:乙醇浓度(%)	B:乙醇用量(ml)	C:提取次数	D:提取时间(h)
T1	1	1	1	1
T2	1	2	2	2
T3	1	3	3	3
T4	2	1	2	3
T5	2	2	3	1
T6	2	3	1	2
T7	3	1	3	2
T8	3	2	1	3
T9	3	3	2	1

1.3.2　紫杉醇测试方法　①提取液的制备:先取适量的同一批红豆杉树皮,进行粉碎,过筛成中粉,在 50 ℃条件下减压干燥 5 ~ 8 h,水分控制在 10% 以内[3];再分别精密称取中粉约 100 g,按表 1 和表 2 进行提取,制成提取液。②样品液的制备[4]:取上述提取液于 60 ℃条件下减压浓缩至干,得浸膏,称重后加 5 倍量水和 3 倍量二氯甲烷混合液,超声使溶解,转入 1 000 ml 分液漏斗中进行萃取[5],静止,分层,分取二氯甲烷层,再用 200 ml 二氯甲烷先后萃取 2 次,合并萃取液,在 40 ℃条件下减压浓缩至干,残渣加色谱甲醇溶解,转移至 25 ml 棕色容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得。③分析测定:高效液相色谱法[6]:岛津 ODS-C8 柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相为甲醇-水-乙酸(55∶44∶1),流速 1.0 ml/min,检测波长 227 nm,柱温:30 ℃。

1.4　统计学方法

应用 Excel 和 DPS 软件进行红豆杉中紫杉醇含量的方差分析。

2　结果

2.1　各因素对红豆杉原料中紫杉醇提取效果影响

经方差分析(表 3),乙醇浓度、乙醇用量、提取时间、提取次数对紫杉醇提取效果的影响都具有很高的显著性,根据显著性大小可以确定影响提取效果各因素的主次顺序是:乙醇浓度 ≈ 乙醇用量 > 提取时间 > 提取次数。可见,乙醇浓度和用量是影响紫杉醇提取最主要的因素,而提取时间和次数也是非常重要的因素。4 种因素的对紫杉醇提取的单因素效果见图 1。

乙醇浓度因素的 3 个水平彼此相差极显著($P < 0.01$),提取效果为 95% > 85% > 75%,表现为浓度越高效果越好的规律,紫杉醇得率与乙醇浓度有呈指数变化趋势;因此,生产中应当选择高浓度的乙醇(95%)作提取剂。

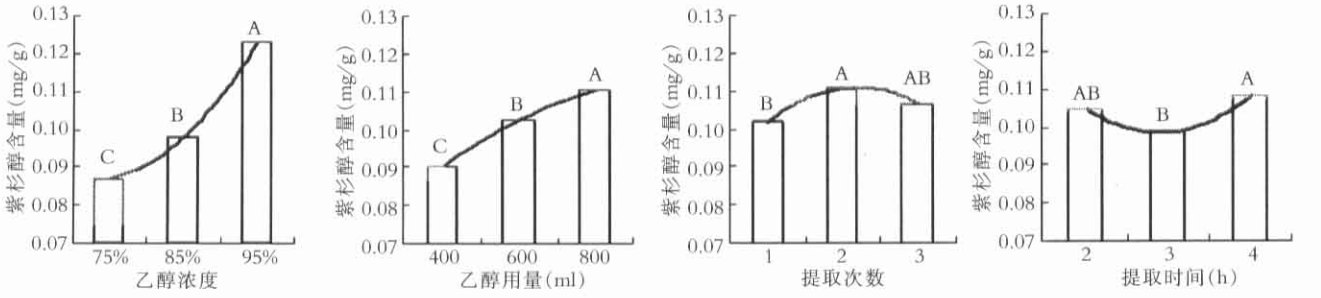
乙醇用量与乙醇浓度呈类似的作用效果,即乙醇用量越多紫杉醇得率越高,但与浓度因素作用不同的是,紫杉醇得率随乙醇用量可能呈对数变化;考虑到乙醇的成本,不宜无限制地越多越好,即要把握适当的用量。

提取次数以 2 次为最佳,极显著高于提取 1 次($P < 0.01$),提取 3 次的效果界于两者之间,与提取 1 次或 2 次相差不显著。

提取时间以 2 h 和 4 h 效果好,两者差异不显著,但显著高于 3 h($P < 0.01$);从时间成本来看,宜选 2 h 作为生产提取时长。

表 3　紫杉醇提取结果方差分析法(SSR)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
乙醇浓度	0.610 4	2	0.305 2	106.1	0.000 0
乙醇用量	0.201 3	2	0.100 6	34.97	0.000 0
提取次数	0.027 3	2	0.013 64	4.742	0.024 2
提取时间	0.039 1	2	0.019 54	6.792	0.007 3
误差	0.051 8	18	0.002 88	-	-



A、B、C 不同字母之间比较,$P < 0.01$

图 1　各处理因素对红豆杉原料中紫杉醇提取的效果

2.2　提取工艺的优化选择

2.2.1　正交组合的多重比较　正交设计中的 9 个组合处理的多重比较见表 4。其中,T9($A_3B_3C_2D_1$)提取效果最好,即用 800 ml 的 95% 乙醇提取 2 次,每次提取 2 h,显著优于其他处理;其次为 T8($A_3B_2C_1D_3$)即用 600 ml 的 95% 乙醇提取 1 次,提取 4 h;而 T1($A_1B_1C_1D_1$)和 T2($A_1B_2C_2D_2$)的提取效果为最差,浪费红豆杉原料,生产中应当避免。

2.2.2　利润与效益核算　任何生产都要核算成本,获取大的经济效益。紫杉醇提取的利润可以按所获紫杉醇的收益扣除生产工艺成本消耗求得,即:

利润 = 紫杉醇收益 - 提取溶剂成本 - 红豆杉原料成本

用单位时间获得的利润表示生产效益,即:

生产效益 = 单位时间的利润 = 利润 ÷ 提取总时长

以 100 g 红豆杉原料和市场现价(不考虑市场波动)计算:

紫杉醇收益 = 紫杉醇纯品价 8.00(8 元/mg) × 紫杉醇含量(mg/g 红豆杉) ×100(g 红豆杉) ×0.9。其中,0.9 为系数,即经乙醇醇提取后,得到紫杉醇浸膏,但如要得到纯品,还需经过脱脂、过柱等一系列分离纯化过程,根据我们多次实践来看,由浸膏到纯品,紫杉醇收率一般为90%。

提取溶剂成本 = 乙醇价为 5.00(元/1 000 ml) × 乙醇用量 B(ml/次) × 提取次数 C

红豆杉原料成本 = 红豆杉原料价 5.00(元/kg) ×100 g = 0.50 元

提取总时长 = 提取时间 D(h) × 提取次数 C

从而获得正交试验 9 个组合处理的利润和效益(表 5)。按利润计,T9 是最好的,其次是 T8,而 T1 是最差的,与按紫杉醇提取多重比较的结果(表 4)完全一致,可见,按现有价格计算,由于紫杉醇收益远远高于成本,利润基本就由紫杉醇提取量所决定,故各处理排序不改变提取效果的多重比较排序(表 4)。但按生产效益计,T1 则最好, T9、T6、T8 也较高(但其中的 T1、T6 每 100 克原料所获得的紫杉醇量和利润都很低,特别是 T1 对红豆杉原料资源浪费最大);而 T3、T7、T4 由于耗时过长,利润不突出,效益明显很低;T2、T5 效益也比较低。因此,综合利润和效益,T9、T8 为推荐的生产工艺条件,T3、T4、T7、T1、T2 在生产中不应当采用。

表 4 正交组合处理紫杉醇提取效果多重比较法(SSR)

处理	紫杉醇提取量	5% 显著水平	1% 显著水平
T9	0.137 3	a	A
T8	0.124 7	b	A
T7	0.107 0	c	B
T3	0.101 3	cd	B
T5	0.100 3	cd	BC
T6	0.098 7	cd	BC
T4	0.094 7	de	BC
T2	0.087 3	e	C
T1	0.072 7	f	D

表 5 正交组合处理工艺的利润与效益(以 100 g 红豆杉原料计)

处理	紫杉醇收益 (元)	乙醇成本 (元)	利润 (元)	提取总时长 (h)	生产效益 (元/h)
T9	98.86	8.00	90.36	4	22.59
T8	89.78	3.00	86.28	4	21.57
T7	77.04	6.00	70.54	9	7.84
T3	72.94	12.00	60.44	12	5.04
T5	72.22	9.00	62.72	6	10.45
T6	71.06	4.00	66.56	3	22.19
T4	68.18	4.00	63.68	8	7.96
T2	62.86	6.00	56.36	6	9.39
T1	52.34	2.00	49.84	2	24.92

3 讨论

4 个影响从红豆杉中提取紫杉醇的因素中,乙醇浓度、乙醇用量和提取时间的影响达极显著,提取次数显著,影响的主次顺序是:乙醇浓度≈乙醇用量 > 提取时间 > 提取次数。其中就单因素效果而言,乙醇浓度越高、用量越多,越有利于紫杉醇的提取;2 次和每次 2 h分别为最佳提取次数和时间。

以紫杉醇提取效果、生产利润与效益等指标,均以 T9($A_3B_3C_2D_1$)、T8($A_3B_2C_1D_3$)为优选组合,推荐为生产工艺;但 T1、T2、T3、T4、T7 因提取效果差利润低或耗时过长效益差,生产中应当避免采用。

紫杉醇在甲醇、乙醇或氯仿中溶解,在乙醚中微溶,在水中几乎不溶[7],本试验在确定试验因素水平过程中,将乙醇浓度(%)、乙醇用量、提取次数、提取时间作为主要因素,而对工艺中的提取方法、浸膏浓度作为固定因素,提取方法采用热浸提法,简单可行,即在 60 ℃左右提取,而对浓缩出来的浸膏,因要进行下一步的萃取,故浓缩至干。

由于红豆杉树皮中含有较多的脂溶性成分,在氯仿萃取并浓缩至干后,可用适量石油醚进行脱脂,避免脂溶性成分液相对色谱柱造成污染。

参考文献:

[1] Cragg G M, Schepartz S A, Suffness M, *et al*. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents[J]. J Nat Prod, 1993, 56(10): 1657 - 1668.

[2] 苏建荣,张志钧, 陈智勇. 藏东南云南红豆杉的药用成分含量研究[J]. 林业科学研究, 2006, 19(1): 15 - 20.

[3] 国家药典委员会. 中国药典一部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005: 附录 47.

[4] 李春斌,佟憬憬,范圣第. 东北红豆杉紫杉醇的提取纯化与 HPLC 检测[J]. 大连民族学院学报, 2005, 7(5): 22 - 25.

[5] 陈海涛,未作君,元英进. 红豆杉细胞两液相体系中紫杉醇的分离研究[J]. 化学工业与工程, 2001, 18(2): 99 - 102,124.

[6] 施树云,钟世安,周春山. 高效液相色谱测定湖南红豆杉中紫杉醇的含量[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(5): 552 - 553.

[7] 黄语欣. 紫杉醇提取纯化技术及市场前景分析[J]. 医药化工, 2005, (7): 6 - 11.

(编辑 薛国文)

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期,减少编排错误,请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后,将修改稿以 Word 格式存入软盘,并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号,连同修改稿一并寄交本刊编辑部或 E-mail: aammt@mail.tmmu.com.cn(校外稿件请邮寄)。

本刊编辑部