

基于响应面法的马比木中喜树碱提取工艺的优化

林劲草¹, 肖莉^{2,3}, 吴酬飞^{2,3}, 张绍勇^{2,3}, 杨惠宁², 张立钦^{1,2,3}

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300; 2. 湖州师范学院 生命科学院, 浙江 湖州 313000; 3. 湖州师范学院 浙江省媒介生物学与病原控制重点实验室, 浙江 湖州 313000)

摘要: 【目的】应用响应面法及超声波辅助优化马比木 *Nothapodytes pittosporoides* 中喜树碱的提取工艺。【方法】采用高效液相色谱法测定喜树碱含量, 以市售马比木为研究对象, 在单因素实验的基础上, 选取甲醇体积分数、液料比及超声时间为影响因素, 喜树碱提取率为响应值, 通过 Box-Behnken 响应面法设计 3 因素 3 水平实验, 确定最优提取工艺。

【结果】最优提取工艺为甲醇体积分数 46.4%, 超声时间 26.1 min, 液料比 21.20 mL·g⁻¹, 喜树碱的提取率为 0.084 4%, 二项式拟合相关系数 R^2 为 0.969 3, 预测值与实验值偏差为 3.2%。【结论】采用 Box-Behnken 优化马比木中喜树碱提取工艺, 精确度高, 预测值与实验值吻合度较高, 预测性良好。图 2 表 3 参 13

关键词: 植物学; 喜树碱; 马比木; 高效液相色谱; 响应面法

中图分类号: S718.43 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2020)05-1014-06

Optimization of camptothecin extraction process from *Nothapodytes pittosporoides* by Box-Behnken response surface method

LIN Jincan¹, XIAO Li^{2,3}, WU Choufei^{2,3}, ZHANG Shaoyong^{2,3}, YANG Huining², ZHANG Liqin^{1,2,3}

(1. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, Zhejiang, China; 3. Key Laboratory of Vector Biology and Pathogen Control of Zhejiang Province, Huzhou University, Huzhou 313000, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aims to optimize extraction process of camptothecin from *Nothapodytes pittosporoides* by response surface method and ultrasonic wave. [Method] The content of camptothecin was determined by high performance liquid chromatography, and *N. pittosporoides* wood available on the market was used as the research object. Based on the single factor experiment, methanol concentration, liquid to solid ratio and ultrasonic time were taken as the influencing factors, and the extraction rate of camptothecin as the response value. Box-Behnken response surface method was used to design the experiment with 3 factors and 3 levels, so as to determine the optimal extraction process. [Result] The optimal extraction process was as follows: methanol concentration 46.4%, ultrasonic time 26.1 min, liquid to solid ratio 21.20 mL·g⁻¹, extraction rate of camptothecin 0.084 4%, binomial fitting correlation coefficient R^2 0.969 3, and deviation between the predicted value and the experimental value 3.2%. [Conclusion] Box-Behnken can be used to optimize the extraction process of camptothecin from *N. pittosporoides*, with high precision and good predictability. [Ch, 2 fig. 3 tab. 13 ref.]

Key words: botany; camptothecin; *Nothapodytes pittosporoides*; high performance liquid chromatography; response surface method

收稿日期: 2019-09-10; 修回日期: 2020-03-22

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2019C02030, 2019C02024); “十三五”国家重点研发计划子课题资助项目 (2018YFD0600201-3)

作者简介: 林劲草, 从事森林保护研究。E-mail: hxlin8819@163.com。通信作者: 张立钦, 教授, 博士, 从事森林病虫害防治研究。E-mail: zhangliqin@zafu.edu.cn

喜树碱 (camptothecin, CPT) 是一种细胞毒性喹啉类生物碱, 1966 年由 WALL 等^[1]首次从喜树 *Camptotheca acuminata* 中分离得到。作为植物源农药的喜树碱是一种昆虫不育剂^[2], 并且对昆虫有触杀和胃毒的作用^[3]; 对黄瓜白粉病 *Sphaerotheca fuliginea*、番茄灰霉病 *Botrytis cinerea* 等也有较好的防治效果^[4]。因此, 喜树碱在农业病虫害防治方面有一定的应用开发潜力。马比木 *Nothapodytes pittosporoides* 是茶茱萸科 Icacinaceae 假柴龙树属 *Nothapodytes* 灌木, 又名海桐马比木、公黄珠子、追风伞^[5]。主产于贵州、湖南、湖北、四川等地, 入药能除湿、祛风、理气, 主治湿痹、浮肿、疝气^[6-7]。在马比木植株中, 其根、茎、枝、叶、果实和种子中都含有喜树碱^[8-10]。随着市场对喜树碱需求量不断增加, 马比木作为喜树碱药源, 具有原料成本低的优点, 是国家二级保护植物喜树的最佳替代品, 已成为提取喜树碱的重要原料^[11-13]。目前国内关于马比木中喜树碱提取工艺的研究较少, 且基本采用的均为正交设计优化。本研究以马比木为原料, 以喜树碱提取率作为优化指标, 采用 Box-Behnken 响应面法对喜树碱的提取工艺进行了研究, 以期对喜树碱提取工艺的优化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验仪器 高效液相色谱仪 (型号 1260, Agilent); 高速多功能粉碎机 (800Y-304, 旭曼); 超声波清洗器 (DS-080S, 工作频率 40 kHz, 东森); 电子分析天平 (ME204E, METTLER TLEDO)。

1.1.2 实验材料 马比木 (购于贵州中药材市场, 主要为枝和叶), 晒干后粉碎过 60 目筛。

1.1.3 实验试剂 甲醇 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 分析纯); 甲醇 (北京百灵威科技有限公司, 色谱纯); 乙腈 (北京百灵威科技有限公司, 色谱纯); 水为超纯水; 喜树碱对照样品 (纯度 $\geq 98\%$, 合肥博美有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 对照样品溶液制备 称取喜树碱标准样品 10.50 mg, 置于容量瓶中, 甲醇溶解稀释、定容至 50 mL, 配制质量浓度为 $0.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的喜树碱对照样品溶液, 摇匀, 备用。

1.2.2 样品溶液制备 称取粉碎后马比木粉末 5.06 g, 置于锥形瓶中, 加入甲醇 100 mL, 室温下超声 30 min, $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤, 取续滤液备用。

1.2.3 色谱条件 色谱柱 Alltima C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250.0 mm, 5 μm); 流动相为乙腈:水=25:75 (V:V); 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 254 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

1.2.4 标准曲线绘制 取对照样品溶液 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容至 10 mL, 按照 1.2.3 色谱条件进行检测。以喜树碱质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.5 马比木中喜树碱提取率测定 称取粉碎后的马比木粉末 10.16 g, 置于锥形瓶中, 加入甲醇 100 mL, 温度条件 30 $^{\circ}\text{C}$, 超声 30 min, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液按照 1.2.3 色谱条件进行检测。根据以下公式计算喜树碱提取率 (R_1): $R_1 = CV/1000M \times 100\%$ 。其中: C 表示提取液中喜树碱质量浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), V 表示溶剂体积 (mL), M 表示药材质量 (g)。

1.2.6 单因素试验设计 称取粉碎后马比木粉末 10 g, 置于锥形瓶中, 将 3 个实验因素: 甲醇体积分数、超声时间、液料比中 2 个固定不变, 1 个作为变量进行单因素试验, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液在 1.2.3 色谱条件进行检测, 平行 3 次, 取平均值。

1.2.7 Box-Behnken 设计优化提取条件 在单因素实验基础上, 选择超声时间 30 min、甲醇体积分数 80% 和液料比 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ (溶剂体积:药材质量=100:5) 3 个因素进行优化实验。以喜树碱提取率为指标, 采用 Box-Behnken 设计优化提取条件。因素水平如表 1 所示。

1.2.8 数据处理及分析 响应面实验数据采用 Designer-Expert 8.0 软件进行处理, 并对数据进行差异显著性分析。

表 1 因素水平表

水平	A. 甲醇体积 分数/%	B. 超声 时间/min	C. 液料比/ ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)
-1	70	20	12(60:5)
0	80	30	20(100:5)
1	90	40	28(140:5)

2 结果与讨论

2.1 标准曲线绘制

为准确测量马比木中喜树碱的质量浓度,建立高效液相色谱法,以喜树碱质量浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),计算得线性回归方程为: $y=9 \times 10^6 x + 902\,381$,相关系数 $R^2=0.999\,2$,喜树碱质量浓度的线性范围为 $0.021 \sim 0.189 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 甲醇体积分数对喜树碱提取率的影响 在超声时间为 30 min ,液料比为 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,选取甲醇体积分数为 50% 、 60% 、 70% 、 80% 、 90% 的条件下进行提取。由图 1A 可知:随着甲醇体积分数的增大,喜树碱的提取率先增大后减小。当甲醇体积分数超过 80% 时,提取率开始减小。提高甲醇体积分数有利于喜树碱的提取,当甲醇体积分数 $>80\%$ 时,喜树碱提取率反而降低,可能由于随甲醇体积分数的提高,提取液极性减小,其中某些杂质的溶出增加,干扰了马比木的检测,提取率下降。当甲醇体积分数为 80% 时,提取率达最大值,因此选择甲醇体积分数为 80% 为宜。

2.2.2 超声时间对喜树碱提取率的影响 在甲醇体积分数为 80% ,液料比为 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,选取超声时间分别为 10 、 20 、 30 、 40 和 50 min 的条件下进行提取。由图 1B 可知:随超声时间的增加,喜树碱提取率先增加后减小,在超声时间为 30 min 时喜树碱提取率最高。这是因为随超声时间增加,喜树碱发生氧化的概率也会增大,使提取率降低,所以选择提取时间为 30 min 适宜。

2.2.3 液料比对喜树碱提取率的影响 在超声时间为 30 min ,甲醇体积分数为 80% 时,选取液料比分别为 12 、 16 、 20 、 24 和 $28 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 的条件进行提取。由图 1C 可知:随着液料比由小到大,喜树碱提取率先增加后减小,提取率最高的液料比为 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。随着溶剂的增多,马比木与溶剂之间能充分接触,有利于马比木溶解于溶剂中,当液料比超过 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 后,已经达到饱和状态,再加就稀释了,喜树碱提取率下降,所以选择液料比 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 较适宜。

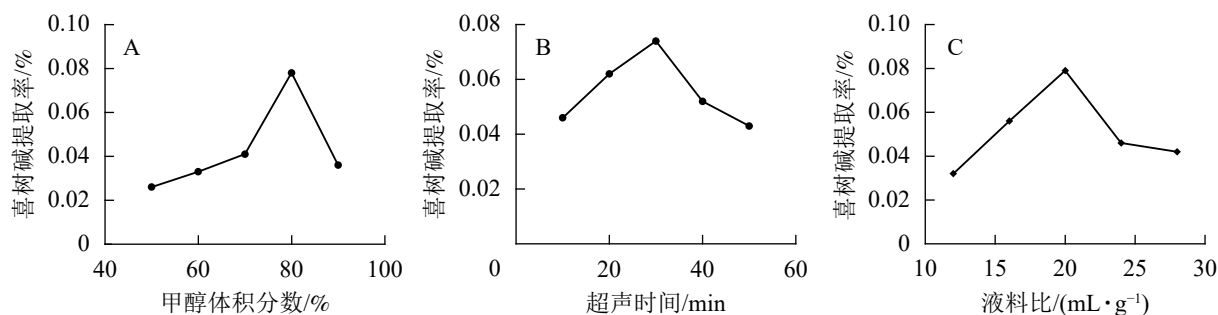


图 1 不同影响因素下喜树碱提取率的变化

Figure 1 Change of the extraction rate of camptothecin under different influencing factors

2.3 响应面优化实验结果

依据单因素实验结果,初步选定甲醇体积分数 80% 、超声时间 30 min 和液料比 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 为最佳提取条件,采用 Box-Behnken 响应面法对其进行优化,结果如表 2 所示。

以喜树碱提取率为指标 (R_1),采用 Designer-Expert 8.0 软件进行二次多项式回归拟合,得到方程: $R_1=0.11-8.500 \times 10^{-3} A+6.125 \times 10^{-3} B+4.375 \times 10^{-3} C+7.000 \times 10^{-3} AB-0.014 AC+0.015 BC-0.026 A^2-0.024 B^2-0.030 C^2$ 。其中: A 表示甲醇体积分数, B 表示超声时间, C 表示液料比。多元回归模型的方差分析见表 3。由 ANOVA 分析可知:在考察指标的二项式方程中,模型的 F 为 $24.59 (P=0.000\,2 < 0.001)$,说明回归模型极显著;拟合相关系数 $R^2=0.969\,3$,调整系数 $R^2_{\text{Adj}}=0.929\,9$,失拟项显著 ($P=0.034\,3 < 0.05$)。该模型拟合程度较好,实验误差较小;信噪比较高,为 $12.503 > 4.000$,说明该多元回归模型可预测马比木中喜树碱的最优提取工艺条件。

显著性检验结果表明:甲醇体积分数 (A)、超声时间 (B)、液料比 (C) 对马比木中喜树碱提取率的影响顺序依次为 A 、 B 、 C 。甲醇体积分数的二次项 A^2 、超声时间的二次项 B^2 、液料比的二次项 C^2 对马比木中喜树碱的提取率有极显著影响 ($P < 0.001$);超声时间和液料比的交互项 BC 对马比木中喜树碱的提

取率有极显著影响 ($P<0.01$)；甲醇体积分数 A 与甲醇体积分数和液料比的交互项 AC 对马比木中喜树碱的提取率有显著影响 ($P<0.05$)；超声时间 B 、液料比 C 、甲醇体积分数与超声时间的交互项 AB 对马比木中喜树碱提取率的影响不显著 ($P>0.05$)。

相对于 3 个单因素的其中 2 个因素，采用 Box-Behnken 绘制三维响应面图，两两因素的交互作用对马比木中喜树碱提取率的影响见图 2。由图 2A 可见：甲醇体积分数 A 的曲面较陡峭，超声时间 B 的曲面较平缓，说明甲醇体积分数对马比木中喜树碱提取率的影响比超声时间的影响大。由图 2B 可见：甲醇体积分数 A 的曲面较为陡峭，液料比 C 的曲面较为平缓，说明甲醇体积分数对马比木中喜树碱提取率的影响比液料比大。由图 2C 可见：超声时间 B 的曲面较陡，液料比 C 的曲面较为平缓，表明超声时间对马比木中喜树碱提取率的影响

表 2 Box-Behnken 设计实验和结果

Table 2 Box-Behnken Design tests and results				
实验号	A. 甲醇体积分数	B. 超声时间	C. 液料比	提取率 R_1 /%
1	1	-1	0	0.043
2	0	0	0	0.108
3	-1	-1	0	0.062
4	0	-1	-1	0.057
5	0	0	0	0.113
6	0	1	-1	0.043
7	-1	0	-1	0.045
8	1	0	1	0.029
9	1	0	-1	0.043
10	0	1	1	0.078
11	0	-1	1	0.031
12	0	0	0	0.105
13	0	0	0	0.103
14	-1	1	0	0.056
15	0	0	0	0.106
16	-1	0	1	0.085
17	1	1	0	0.065

表 3 响应面回归模型 ANOVA 分析结果

Table 3 Response surface regression model ANOVA analysis results						
方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	0.013	9	1.469×10^{-3}	24.59	0.000 2	***
A	5.780×10^{-4}	1	5.780×10^{-4}	9.67	0.017 1	*
B	3.001×10^{-4}	1	3.001×10^{-4}	5.02	0.060 0	
C	1.531×10^{-4}	1	1.531×10^{-4}	2.56	0.153 4	
AB	1.960×10^{-4}	1	1.960×10^{-4}	3.28	0.113 0	
AC	7.290×10^{-4}	1	7.290×10^{-4}	12.20	0.010 1	*
BC	9.303×10^{-4}	1	9.303×10^{-4}	15.57	0.005 6	**
A^2	2.874×10^{-3}	1	2.874×10^{-3}	48.10	0.000 2	***
B^2	2.502×10^{-3}	1	2.502×10^{-3}	41.87	0.000 3	***
C^2	3.885×10^{-3}	1	3.885×10^{-3}	65.02	<0.000 1	***
残差	4.183×10^{-4}	7	5.975×10^{-5}			
失拟项	3.603×10^{-4}	3	1.201×10^{-4}	8.28	0.034 3	
误差	5.800×10^{-5}	4	1.450×10^{-5}			
总和	0.014	16				

说明：A. 甲醇体积分数；B. 超声时间；C. 液料比。*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ ；***表示 $P<0.001$

比液料比的影响大。可见，在选择的 3 个单因素中，甲醇体积分数 A 对马比木中喜树碱的提取率的影响显著，表现为其曲线较陡；在两两因素交互作用中，甲醇体积分数与液料比的交互作用 (AC) 对马比木中喜树碱的提取率影响显著，超声时间与液料比的交互作用 (BC) 对马比木中喜树碱的提取率影响显著。

2.4 最优方案验证

根据模型预测，得到马比木中喜树碱提取的最优工艺为：甲醇体积分数 46.4%，超声时间 26.1 min，液料比 $21.20\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在此条件下进行 3 次平行实验，测得喜树碱提取率分别为 0.080 4%、0.082 6%、0.082 1%，与模型预测值接近，平均误差 3.2%，表明模型能较好地预测喜树碱实际提取率。

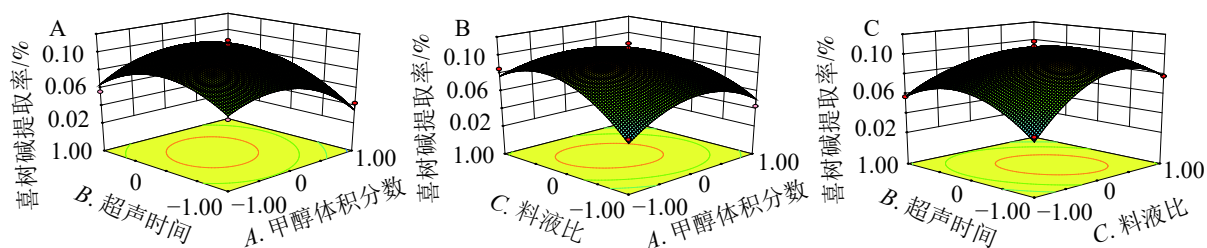


图2 不同影响因素对喜树碱提取率影响的响应面图

Figure 2 Response surface diagram of the effect of different influencing factors on camptothecin extraction rate

3 结论

本研究以马比木为原料,以喜树碱提取率作为优化指标,在单因素实验基础上,选取甲醇体积分数、超声时间和液料比3个因素,通过Box-Behnken响应面法对17组实验进行分析,在整个区域得到回归方程,可以直观反映出各个因素对喜树碱提取率的影响。优化的最优工艺为:甲醇体积分数46.4%,超声时间26.1 min,液料比21.20 mL·g⁻¹,喜树碱提取率为0.084 4%。3次验证实验结果显示:提取率平均误差3.2%。说明本次建立的拟合模型较为成功,可以为马比木中喜树碱的提取应用提供一定的参考。

4 参考文献

- [1] WALL M E, WANI M C, COOK C E, *et al.* Plant antitumor agents, the isolation and structure of *Camptothecin*, a novel alkaloidal leukaemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Am Chem Soc*, 1966, **88**(16): 3888 – 3890.
- [2] 曾庆钱, 郑海, 黄意成, 等. 喜树采后生理调控对喜树碱次生代谢的影响[J]. *广东化工*, 2017, **44**(16): 69 – 70.
ZENG Qingqian, ZHENG Hai, HUANG Yicheng, *et al.* Effects of post-harvest physiological regulation on secondary metabolism of *Camptothecin* [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2017, **44**(16): 69 – 70.
- [3] 吴海霞, 洪仁辉, 苟志辉, 等. 喜树碱在喜树体内分布及在有害生物防治上的应用[J]. *热带林业*, 2014, **42**(4): 39 – 42.
WU Haixia, HONG Renhui, GOU Zhihui, *et al.* The distribution of camptothecin in *Camptotheca acuminata* Decaisne and its usage in pest control [J]. *Trop For*, 2014, **42**(4): 39 – 42.
- [4] 毛胜凤, 周湘, 范迎春, 等. 喜树碱对番茄灰霉病菌的毒理效应[J]. *浙江农林大学学报*, 2015, **32**(4): 585 – 589.
MAO Shengfeng, ZHOU Xiang, FAN Wenchun, *et al.* Toxicological effects of camptothecin on *Botrytis cinerea* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2015, **32**(4): 585 – 589.
- [5] 陈旭, 雷帮星, 文庭池, 等. 1株马比木植物内生真菌 *Trichoderma* sp. 抗癌活性研究[J]. *时珍国医国药*, 2017, **28**(3): 522 – 525.
CHEN XU, LEI Bangxing, WEN Tingchi, *et al.* Anticancer activity of an endophytic fungus *Trichoderma* sp. [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2017, **28**(3): 522 – 525.
- [6] 白永花, 宋启示. 马比木根的化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2014, **26**(2): 197 – 201.
BAI Yonghua, SONG Qishi. Chemical constituents from the roots of *Nothapodytes pittosporoides* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2014, **26**(2): 197 – 201.
- [7] 杨艳, 王道平, 李齐激, 等. SPME-GC-MS 分析马比木中挥发性成分[J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2016, **29**(3): 435 – 438.
YANG Yan, WANG Daoping, LI Qiji, *et al.* Analysis natural volatile constituents of *Nothapodytes pittosporoides* with SPME-GC-MS [J]. *J Xinyang Norm Univ Nat Sci Ed*, 2016, **29**(3): 435 – 438.
- [8] 白永花, 宋启示. 马比木根中喜树碱和9-甲氧基喜树碱的HPLC分析[J]. *药物分析杂志*, 2014, **34**(1): 100 – 103.
BAI Yonghua, SONG Qishi. HPLC analysis of camptothecin and 9-methoxycamptothecin in the roots of *Nothapodytes pittosporoides* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, **34**(1): 100 – 103.
- [9] 周翔, 林森, 罗娅君, 等. 喜树果和马比木中喜树碱含量的比较[J]. *食品与发酵科技*, 2014, **50**(2): 89 – 91.
ZHOU Xiang, LIN Sen, LUO Yajun, *et al.* Comparison of camptothecin content in *Camptotheca acuminata* fruit and mappia foetida [J]. *Food Ferment Technol*, 2014, **50**(2): 89 – 91.

- [10] 刘盛权, 于敬亮, 刘振德, 等. 马比木根中喜树碱提取液稳定剂的优化[J]. 中药材, 2016, **39**(3): 603 – 605.
LIU Shengquan, YU Jingliang, LIU Zhende, *et al.* Optimization of stabilizing agent of camptothecin extraction from *Nothapodytes pittosporoides* roots [J]. *J Chin Med Mater*, 2016, **39**(3): 603 – 605.
- [11] 高渐飞, 张凡, 杨艳, 等. 马比木不同部位喜树碱含量测试分析[J]. 绿色科技, 2018(1): 1 – 5.
GAO Jianfei, ZHANG Fan, YANG Yan, *et al.* Camptothecin contents and transfer process in different parts of *Nothapodytes pittosporoides* [J]. *J Green Sci Technol*, 2018(1): 1 – 5.
- [12] 罗娅君, 边清泉, 罗英, 等. 大孔树脂吸附马比木中喜树碱的工艺[J]. 中成药, 2015, **37**(8): 1859 – 1862.
LUO Yajun, BIAN Qingquan, LUO Ying, *et al.* Process for adsorbing camptothecin in macrobiporous resin [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2015, **37**(8): 1859 – 1862.
- [13] 卞赛男, 常鹏杰, 王宁杭, 等. 氮素形态对喜树叶片生长、叶绿素荧光参数及叶绿体相关基因表达的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2019, **36**(5): 908 – 916.
BIAN Sainan, CHANG Pengjie, WANG Ninghang, *et al.* Leaf growth, chlorophyll fluorescence characteristics, and expression of photosystem-related genes in *Camptotheca acuminata* with different N forms' fertilization [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2019, **36**(5): 908 – 916.