

郝婧玮,梅念念,渠利霞,等. UV-B 对红豆杉不同提取方式紫杉醇含量的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(21):266-269.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.21.064

UV-B 对红豆杉不同提取方式紫杉醇含量的影响

郝婧玮^{1,2}, 梅念念¹, 渠利霞¹, 黄 静¹, 季宇彬²

(1. 牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 黑龙江牡丹江 157011; 2. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江哈尔滨 150076)

摘要:以东北红豆杉的枝和叶为原材料,在 UV-B 紫外辐射的条件下,分别采用超声提取法、酶解法、微波法来研究紫杉醇的提取工艺,定时取样。对 3 种方法提取的紫杉醇样品通过高效液相色谱法(HPLC)进行含量检测,研究 UV-B 对不同提取方式下紫杉醇含量的影响。测定结果显示,紫杉醇标准品在 5.7~6.1 min 出峰,计算峰面积,进而求得紫杉醇提取率,来判断 UV-B 对这 3 种提取方法的影响。结果表明,在 UV-B 条件下,1~2 h 内,紫杉醇含量增加,在紫外辐射 2 h 时,提取率达到最大值;在 3~5 h 内,紫杉醇含量逐渐下降。在 3 种方法中,超声提取法优于酶解法,酶解法优于微波法,微波法的提取效果稍差,超声提取法在紫外辐射 2 h 时,提取率达到最大值,为 7.65%。其中 2 种方法合用优于单一法,加入纤维素酶的微波法在紫外辐射 2.5 h 时,提取率为 8.39%。

关键词:紫杉醇;高效液相色谱(HPLC);UV-B 紫外辐射;红豆杉;提取方式

中图分类号:S791.490.1;R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)21-0266-04

红豆杉(*Taxus chinensis*)是红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus*)植物的总称,别名紫杉。因资源稀少,红豆杉被划分在我国一级珍稀保护树种范围内^[1]。我国红豆杉有 1 个变种 4 个种,分散于我国大部分地区^[2]。从红豆杉树皮和枝叶中提取的紫杉醇(Paclitaxel,商品名 Taxol)的药用价值很高,是一种治疗癌症的一线临床用药^[3]。

东北红豆杉作为珍稀药用植物^[1-4],主要分布在中国东北地区、日本、朝鲜、俄罗斯等,主要以茎、枝、叶、根入药,有抗肿瘤作用,并可以抑制糖尿病和心脏病^[5-6]。从东北红豆杉枝叶中分离得到了紫杉烷类二萜化合物、倍半萜类化合物、甾体类化合物、木脂素类化合物、黄酮类化合物、糖苷类化合物及其他类化合物等多种成分,多种化合物是通过植物次生代谢途径生成的,其中最具代表性的物质是紫杉醇和三尖杉宁碱。紫杉醇是从红豆杉属植物中分离得到的一种具有五甲基十五碳烯骨架的二萜类化合物,具有独特的抗癌作用,能与微管蛋白结合,并促进其聚合、抑制癌细胞有丝分裂,阻止癌细

胞的增殖,对卵巢癌、子宫癌、乳腺癌等十几种癌症具有很好的疗效^[7-8],同时对治疗恶性黑色素瘤、类风湿性关节炎和早老性痴呆^[9-11]等也有一定潜力。由于其作用机制新颖、疗效独特、广谱抗癌的特点,紫杉醇成为世界关注的焦点^[12-14]。紫杉醇的开发、研究和应用已成为近年来肿瘤化疗研究中的热点之一。然而,植物中紫杉醇的含量极低,天然资源匮乏、含量低、全合成成本高一直制约着紫杉醇的临床应用^[15-16],从 1 kg 干树皮中仅能分离得到 50~150 mg 紫杉醇,1 g 紫杉醇需要 3~4 株 60 龄的树来生产。为满足临床用药的需求,寻找新的生物资源已迫在眉睫。本研究以东北红豆杉枝叶为试验材料,对其紫杉醇进行了初步研究,并建立了应用高效液相色谱法测定东北红豆杉枝和叶中紫杉醇含量的方法^[9-11],对不同方法提取红豆杉中紫杉醇最佳工艺进行研究,为东北红豆杉这种可再生资源的开发、利用及质量标准研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料预处理

剪取东北红豆杉植物体部分枝叶,放入恒温箱中烘 24 h,烘干至恒质量。将枝叶放入微型植物粉碎机中粉碎,称取,分装。称取 1.5 g 红豆杉粉末分别装在①②③④号锥形瓶中,按料液比 1 g:10 mL 用甲醇对红豆杉粉末进行浸提;将 4 个锥形瓶于紫外灯下照射 5 h,并且隔 1 h 取样,备用。

收稿日期:2018-08-09

基金项目:牡丹江师范学院科研项目(编号:QY2014010);黑龙江省教育厅项目(编号:1353MSYQN009);哈尔滨商业大学研究生创新科研专项基金(编号:YJSCX2017-402HSD)。

作者简介:郝婧玮(1985—),女,辽宁宽甸人,硕士,讲师,主要从事肿瘤药理学研究。Tel:(0453)6511042;E-mail:swxhjw@126.com。

参考文献:

- [1] 罗海燕,方文青,杨林波,等. 叶中含梗率与相关打叶质量指标的关系[J]. 烟草科技,2005(7):11-13.
- [2] 孙纪周,彭 勇,卢友良,等. 打叶复烤线叶梗分离段节能降耗的方法及成效[J]. 节能,2013(7):72-74.
- [3] 陈家东,陶智麟,刘全喜. 打叶复烤加工过程造碎及碎烟处理工艺研究[J]. 烟草科技,2000(4):4-7.

- [4] 李跃锋,姜焕元,刘志平,等. 烟叶温度和含水率与打叶质量的关系[J]. 烟草科技,2005(2):5-6,18.
- [5] 刘其聪,夏正林,罗登山. 影响打叶质量的因素分析与降低烟叶损耗[J]. 烟草科技,1998(3):3-5.
- [6] 刘利锋,王花俊,朱晓牛,等. 不同打叶参数对打叶质量的影响[J]. 安徽农业科学,2009,37(24):11519-11520,11531.
- [7] 国家烟草专卖局. 打叶烟叶质量检验:YC/T 147—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2011.

1.2 试验方法

1.2.1 酶解法提取 依据 10 : 1 的红豆杉粉末、纤维素酶的质量比例,在①号样品瓶中加入 0.15 g 纤维素酶。60 min 后,将①号样品瓶再放于紫外灯下照射 5 h,每 1 h 取样,得到样品,备用。

1.2.2 超声提取法提取 将②号样品瓶放入超声波清洗机中超声 60 min。然后,将①号样品瓶再放于紫外灯下照射 5 h,每 1 h 取样,得到样品,备用。

1.2.3 微波法提取 依据 10 : 1 的红豆杉粉末、纤维素酶的质量比例,在④号样品瓶加入 0.15 g 纤维素酶,与③号样品瓶一同放入微波炉中大火微波 4 ~ 5 s。将③号和④号锥形瓶样品再放于紫外灯下照射 5 h,每 1 h 取样,得到样品,备用。

1.2.4 高效液相色谱检测条件的建立 色谱条件:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇 - 乙腈 - 水(体积比为 34 : 32 : 34)为流动相,检测波长为 227 nm^[17]。将样品离心 6 ~ 8 min,12 000 r/min。取有关物质项下系统适用性溶液 10 μ L 注入液相色谱仪^[18-19],对标准品、抽样的样品进行液相色谱分析,将样品紫杉醇峰与紫杉醇标准品进行对照,观察出峰时间。得到数据,谱图,进行分析。

1.2.5 标准曲线的建立 精确称取 4 mg 紫杉醇标准品,用 2 mL 甲醇配制成浓度为 2 mg/mL 的标准品溶液,取 1 mL 标

准品溶液进行稀释,在此溶液中再取 1 mL 进行稀释,以此类推,梯度浓度不断稀释,配制出 2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg/mL 一系列浓度的溶液,得到标准品溶液^[19]。按高效液相色谱(HPLC)条件进行检测,求峰面积。绘制标准曲线,计算回归方程。

2 结果与分析

2.1 标准曲线回归方程

线性回归方程为 $y = 6 \times 10^6 x + 20\ 357$,相关系数为 $r^2 = 1$ 。其中 y 为峰面积, x 为标准品质量浓度(图 1、图 2)。

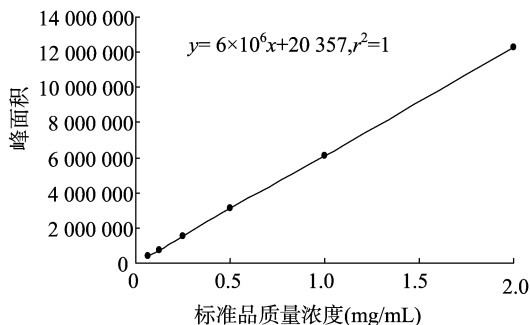


图1 紫杉醇标准品标准曲线

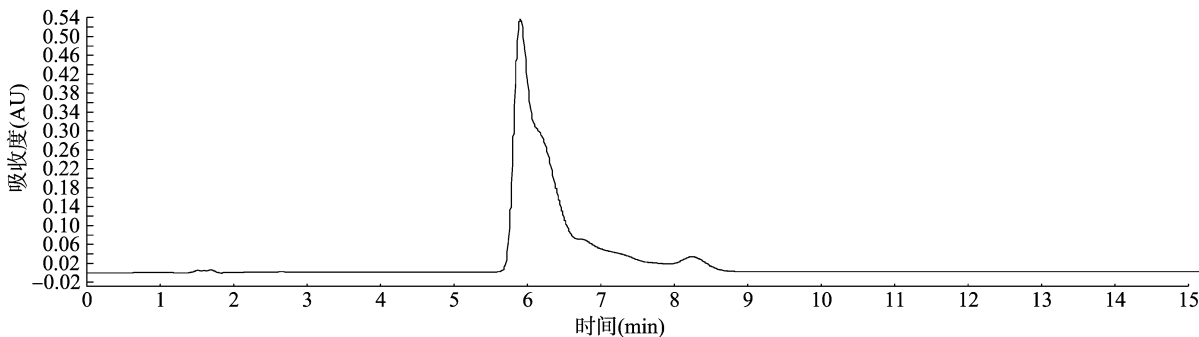


图2 浓度为 2 mg/mL 的标准品的检测图谱

2.2 UV - B 对酶解法提取紫杉醇含量的影响

通过图 3、图 4 可以看出,紫外照射前 5 h 内,原材料经预处理后进行浸提过程紫外照射 1 ~ 2 h,紫杉醇含量增加,紫外照射 3 ~ 5 h,紫杉醇含量下降。在酶解法中,加入纤维素酶后

进行提取,由于酶分解细胞壁的作用促进紫杉醇含量增加,在紫外照射 1 ~ 2 h 内,紫杉醇含量增加;在紫外照射 3 ~ 5 h 内,紫杉醇含量逐渐下降。

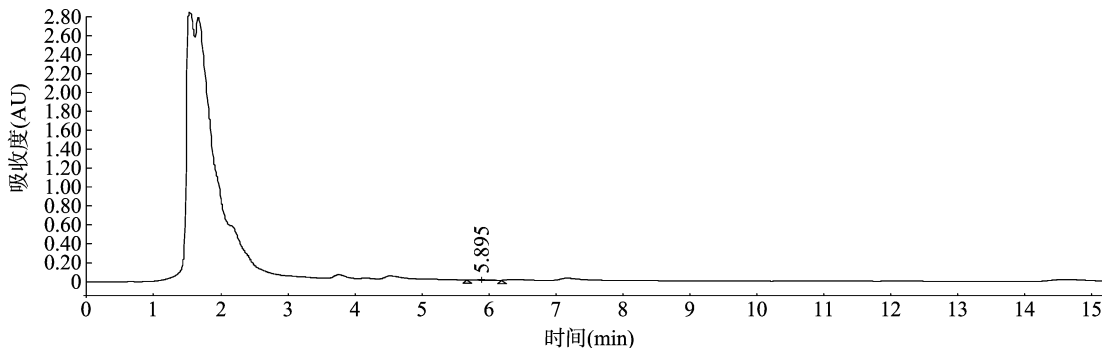


图3 加入纤维素酶后未进行紫外照射的样品谱图

2.3 UV - B 对超声波法提取紫杉醇含量的影响

通过图 5、图 6 可以看出,在超声提取法中,由于振荡破碎作用,紫杉醇含量增加,在紫外照射 1 ~ 2 h 内,紫杉醇含量

增加;在紫外照射 3 ~ 5 h 内,紫杉醇含量逐渐下降。

2.4 UV - B 对微波法提取紫杉醇含量的影响

通过图 7、图 8、图 9 可以看出,在微波法中,由于微波加

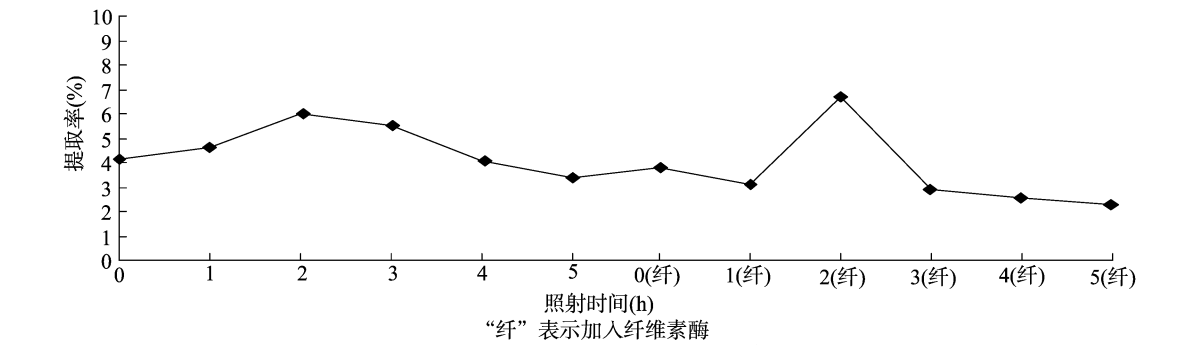


图4 UV-B 对纤维素酶酶解法提取紫杉醇含量的影响

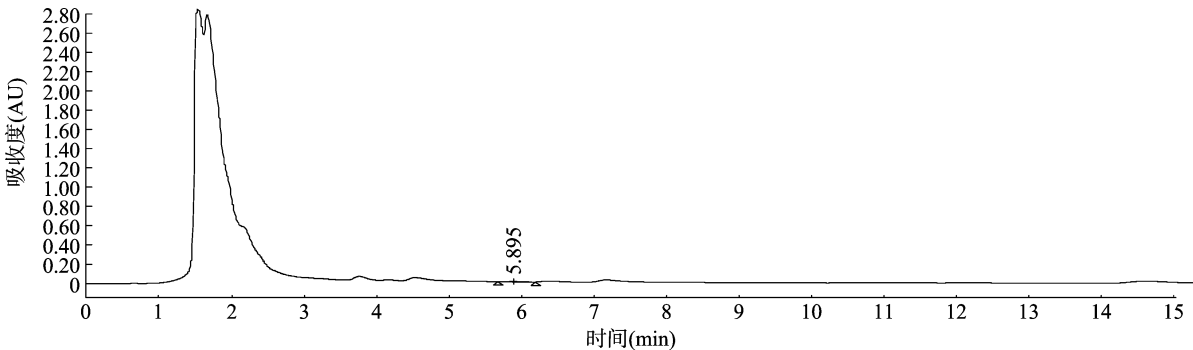


图5 超声波法提取紫外照射 1 h 后样品谱图

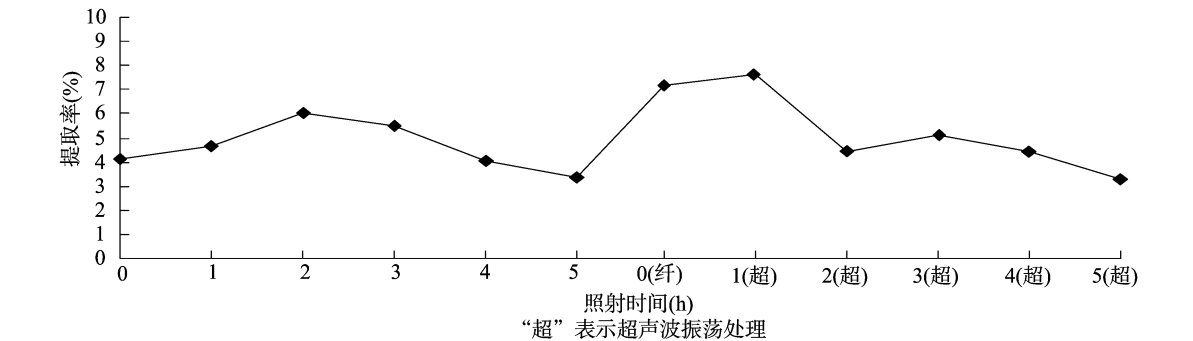


图6 UV-B 对超声波法提取紫杉醇含量影响

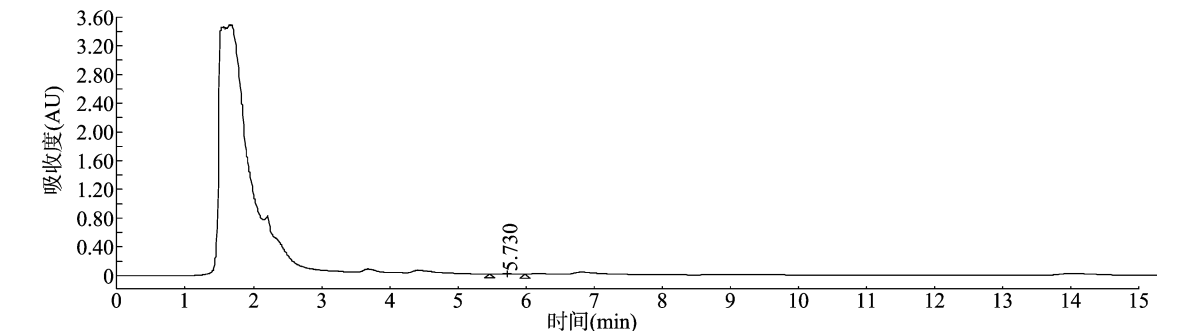


图7 加入纤维素酶后微波法紫外照射 2.5 h 的样品谱图

热作用,紫杉醇含量增加,紫外照射 2.5 h 内,紫杉醇含量缓慢增加,紫外照射 5 h 时,紫杉醇含量下降。加有纤维素酶的微波法,由于双重作用,紫杉醇含量增加明显,照射 2.5 h 时,含量比照射 0 h 时明显增加了 2 倍以上,照射 5 h 时,含量有所下降。

3 讨论

本研究主要分析 UV - B 对不同提取方法紫杉醇含量的

影响。在 UV - B 相同的条件下,观察 UV - B 对不同提取方法紫杉醇含量的影响。通过紫杉醇提取率的比较,结果表明,UV - B 对酶解法、超声提取法、微波法这 3 种不同提取方法提取的紫杉醇含量有不同的影响,但影响趋势是相似的,均为在 UV - B 条件下 1 ~ 2 h 呈增长趋势,3 ~ 5 h 呈现下降趋势。这可能是由于紫外辐射的增强可诱导植物产生较多酚醛类等紫外吸收物质,增强抗氧化能力,减少紫外辐射对植物自身的

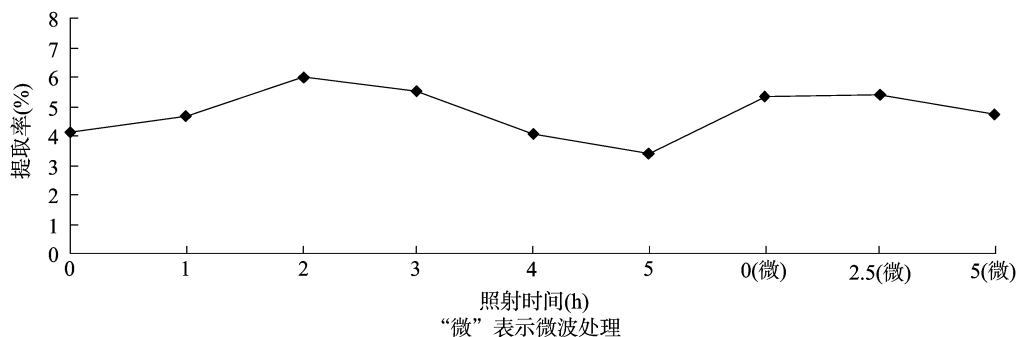


图8 UV-B 对微波法提取紫杉醇含量影响

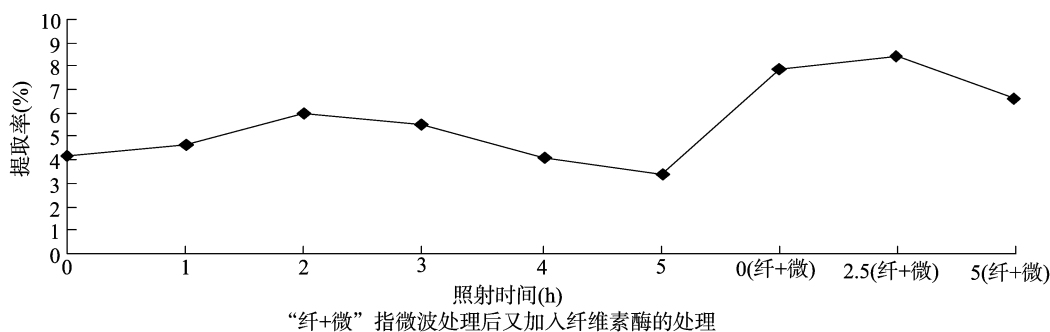


图9 UV-B 对加纤维素酶的微波法提取紫杉醇含量影响

伤害。有研究表明,二萜类化合物合成的关键酶乙酰辅酶 A (acetyl - CoA) 与乙酰乙酰辅酶 A (acetoacetyl - CoA) 受紫外和蓝光调控,在紫外辐射下二萜类合成途径的乙酰辅酶 A 与乙酰乙酰辅酶 A 以及其他分支点的酶积累或活性加强,引起植物体内萜类及二萜类化合物等的增加。作为二萜类化合物的紫杉醇与三尖杉宁碱是红豆杉光合作用过程中通过一系列酶促反应得到的,其代谢受到许多代谢酶的调控。在紫外胁迫的环境下,东北红豆杉鲜叶中二萜类化合物表现出含量变化的现象,其实质是紫外辐射影响了萜类化合物代谢过程中的许多关键酶和调节萜类代谢的一些重要反应。在本试验中,由于不同方法本身对红豆杉植物的作用不同,所以紫杉醇含量的增加或下降的幅度不同。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志 (第七卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 438 - 443.
- [2] 王亚飞, 王 强, 阮 晓, 等. 红豆杉属植物资源的研究现状与开发利用对策[J]. 林业科学, 2012, 48(5): 116 - 125.
- [3] Mok T S, Wu Y L, Thongprasert S. Gefitinib or carboplatin - paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. The Journal of Evidence - Based Medicine, 2009, 361(10): 947.
- [4] 费永俊. 红豆杉药用价值评价及解决药源危机的途径[J]. 时珍国医国药, 1997(5): 463 - 464.
- [5] 李振麟, 吕旭辉, 王新婕, 等. 曼地亚红豆杉枝叶化学成分研究[J]. 中草药, 2018, 49(14): 3226 - 3231.
- [6] 孟爱平, 李 娟, 濮社班. 红豆杉属植物化学成分及药理作用研究新进展[J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(2): 47 - 51.
- [7] 余 琨, 丁艳涛, 孟宪璟, 等. 紫杉醇在我国的应用近况[J]. 肿瘤防治杂志, 2001, 8(4): 440 - 443.
- [8] 兰文智, 余龙江, 吴元喜. 磷酸戊糖途径的调节对红豆杉细胞生

- 长及紫杉醇合成的影响[J]. 植物研究, 2002, 2(2): 201 - 204.
- [9] 查 冲, 杜亚填, 刘磊磊, 等. 南方红豆杉枝叶中 10 - DAB Ⅲ 与紫杉醇 HPLC 检测及检测样的制备[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 140 - 145.
- [10] Oliver S J, Banquerigo M L, Brahn E. Suppression of collagen - induced arthritis using an angiogenesis inhibitor, AGM - 1470, and a microtubule stabilizer, taxol [J]. Cellular Immunology, 1994, 157(1): 291 - 299.
- [11] 高明波, 阮成江, 李 贺, 等. 紫杉醇和紫杉烷的生物合成途径研究进展[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(24): 1900 - 1903.
- [12] 刘先芳, 梁敬钰, 孙建博. 紫杉醇: 具有里程碑意义的天然抗癌药物[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2017(6): 941 - 949.
- [13] Sun N K, Huang S L, Chang T C, et al. TLR4 and NF kappa B signaling is critical for taxol resistance in ovarian carcinoma cells [J]. Journal of Cellular Physiology, 2017, 233(3): 2489 - 2501.
- [14] Mastropaolo D, Camerman A, Luo Y G, et al. Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(15): 6920 - 6924.
- [15] 李乃伟, 汪 庆, 束晓春, 等. 营养胁迫对曼地亚红豆杉生长与生理指标及紫杉醇含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2010(4): 193 - 195.
- [16] 刘本叶, 叶和春, 李国凤. 抗癌新药紫杉醇的研究概况[J]. 植物学报, 1995, 12(3): 8 - 14, 27.
- [17] 常杰华, 张万忠. 紫杉醇提取及分离纯化技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(11): 3388 - 3390.
- [18] 王秀君, 张 伟, 王 军. 红豆杉紫杉醇提取方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(5): 789 - 791.
- [19] 李乃伟, 束晓春, 彭 峰. 紫杉醇提取方法和曼地亚红豆杉 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 296 - 298.