



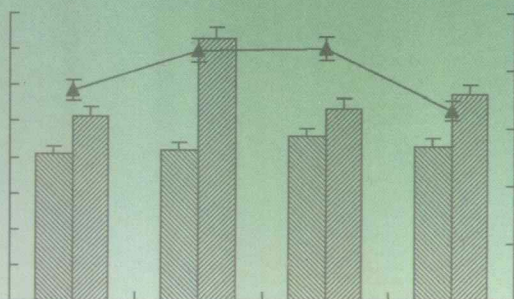
新世纪学术创新团队著作丛书

长春花生生物活性物质的高效生态利用

丛书主编 祖元刚

本书主编 祖元刚

著 者 杨 磊 张 琳 赵修华
罗 猛 姜守刚 祖元刚



95



科学出版社

www.sciencep.com

13
新世纪学术创新团队著作丛书

长春花生生物活性物质的高效生态利用

丛书主编 祖元刚

本书主编 祖元刚

著 者 杨 磊 张 琳 赵修华
罗 猛 姜守刚 祖元刚

科技部中德国际合作项目(项目编号: CHN02/329)

国家科技支撑计划项目(项目编号: 2006BAD18B04)

国家林业局重点科学技术项目(项目编号: 2006-58)

科技部农业科技成果转化资金项目(项目编号: 2007GB23600476)

科学出版社

北 京

Q949.95

2979

内 容 简 介

本书介绍了对长春花中具有重要经济价值的多种生物活性物质进行高效生态利用的方法。全书共分 10 章,主要内容包括:生物半合成定向诱导促进长春花中长春碱的增加;在封闭条件下,采用匀浆对射流提取、pH 梯度萃取、连续中压柱层析和负压蒸发式结晶等方法,实现长春花目的活性物质的快速高效分离,工艺过程获得的最终产品为长春碱、长春质碱、长春新碱、文多灵、熊果酸和齐墩果酸;采用 Fe^{3+} 和 H_2O_2 双催化法,以文多灵和长春质碱为原料半成长春碱;采用超声空化法半成长春碱高附加值衍生物长春瑞宾,并通过负压干柱层析法实现长春瑞宾的快速分离;采用无氧高温热解将工艺废渣转化为生物质炭、植物焦油和植物醋液,实现工艺的非线性、闭合式循环;采用膜系统、液环式溶剂回收尾气截留真空系统处理废水和废气,使整体工艺生态化。本书内容也为其他植物的高效生态利用提供了理论指导。

本书可供植物化学、林产化学以及药学等领域的科研、教学人员和研究生参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

长春花生物活性物质的高效生态利用/祖元刚主编. —北京:科学出版社, 2009

(新世纪学术创新团队著作丛书)

ISBN 978-7-03-026120-5

I. 长… II. 祖… III. 长春花-生物活性-物质-综合利用 IV. Q949.95

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 217366 号

责任编辑:李韶文 莫结胜/责任校对:宋玲玲

责任印制:钱玉芬/封面设计:王 浩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新 蕾 印 刷 厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 12 月 第 一 版 开本:B5(720×1000)

2009 年 12 月第一次印刷 印张:10 3/4

印数:1—1 000 字数:261 000

定价:48.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

丛 书 序 言

自从宇宙大爆炸以来，自然天体即在介观的水平上，以夸克等粒子的随机碰撞为基本的能量运动形式，由介观向纳观、微观、中观、宏观、宇观方向，以运动的异质性为自然演化的源泉，以无限性的宇量规模演化成太阳系、地球、生命系统直至形成具有高度发达大脑的人类。

然而，人类直观认知自然界的视野仅限于宏观水平，对于从介观到宇观无限性宇量规模的认知，人类也只能借助于各类观测工具由局部、定性、可数计量开始逐渐加深对自然界复杂性的认知，其间经历了数万年的发展历程，因而也推动着科学技术由定性研究到定量研究再到智能研究，由单一学科到学科交叉再到学科融合的方向发展，也规范着科学研究的行为由个体化向群体化方向发展。进入20世纪90年代，人类开始迅捷共享全球科技资源，科学研究的群体化整合进一步增强了科学家在整体观上全面认知自然界本质的凝聚力，并对酝酿着人类在21世纪通过学术团队创新来实现对自然界整体本质认知的重大突破。

我于1972年开始接触生命科学研究，1978年开始从事生命科学研究，在大约30年的学术生涯中，逐渐认识到单一学科和个体化研究的局限性，为此，我于1990年开始，下决心以重点实验室的形式组建学术团队，发挥集体智慧的优势，试图将宏观研究与微观研究结合来，全面揭示生命系统与环境系统相互作用的内在机理。经过十几年的努力，积累了一些原始创新性的研究成果，现以《新世纪学术创新团队著作丛书》的形式陆续刊出，以有利于自由探索式学术交流和集成发展。

祖元刚

2004年1月于哈尔滨

序 言

恶性肿瘤严重威胁着人类的生命，近些年来，肿瘤化疗取得了相当大的进步，但对危害人类生命健康最严重的、占恶性肿瘤 90% 以上的实体瘤的治疗却未能达到满意的效果。1990 年前后相继从植物中开发出了许多细胞毒药物，如紫杉醇、喜树碱、长春花碱等天然药物，使实体瘤治疗有了很大发展，并对抗肿瘤药物的研发具有重要的科学意义。

长春花原产马达加斯加岛至西印度一带，在我国栽培历史悠久，现在我国西南及华东广泛栽培。长春花枝叶含有长春碱、长春新碱、文多灵、长春质碱、熊果酸和齐墩果酸等重要生物活性物质，是国际上应用最多的抗癌植物药源。目前生产长春花生物碱的方法多为国外专利保护工艺，我国企业难以利用，而且生产工艺污染严重，效率低。我国目前正在构建和谐社会，其基础之一是工业文明的生态化，因此工艺排放物的净化措施的实施成为植物生态提取业的重要研究内容。由于长春花生物活性物质生产工艺中排放的废水、废气和提取后的固形废弃物会给环境带来很大压力，因此如何通过技术手段将这些排放物转化为生物质能源产品及生物质化学品，同时通过创新的技术手段使它们在进一步资源化利用过程中不产生二次污染问题，从而使整个长春花提取物高效利用工艺的全程无污染化、生态化，成为开发具有自主知识产权的生态化生产工艺的当务之急。

我于 2000 年开始从事长春花生态利用的研究，相继获得科技部中德国际合作项目——植物活性成分筛选分离 (CHN02/329)、国家科技支撑计划项目——林源活性物质及天然功能成分的提取和高效加工利用 (2006BAD18B04)、国家林业局重点科学技术项目——长春碱及其衍生物高效提取生态工艺研究 (2006-58) 和科技部农业科技成果转化资金项目——长春碱衍生物分离合成的中试与示范 (2007GB23600476)，并在这些项目的资助下，指导我的博士后杨磊、博士研究生张琳、罗猛及赵修华深入开展此方面的开发工作。在我的指导下，杨磊完成了《长春花生物碱分离纯化过程中的三废处理生态工艺》博士后出站报告，张琳撰写了《长春花 HPLC 指纹图谱的建立及长春瑞宾合成纯化研究》博士学位论文，罗猛撰写了《长春花生物活性物质高效诱导和分离研究》博士学位论文。在此期间，我与我的博士研究生赵修华和姜守刚将研究成

果统为一稿并进行了认真的修改、补充，经我们多次的研讨后定稿并进一步整理出此专著。现将此专著收录于我主编的《新世纪学术创新团队著作丛书》中，不足之处，殷盼指正。

祖元刚

2009年8月于哈尔滨

前 言

长春花 [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] 原产马达加斯加岛至西印度一带,早在宋代以前就传入我国,现在我国西南及华东广泛栽培。长春花枝叶含有长春碱、长春新碱、文多灵、长春质碱、熊果酸和齐墩果酸等重要生物活性物质,是目前国际上应用最多的抗癌植物药源,具较大开发价值,因此世界各国对长春花中生物碱的基础和应用研究比较多。我国长春花活性物质提取纯化的产业化水平较低,很少有厂家能够生产出纯度为 95% 以上的产品,且成本高,质量不稳定。现有生产工艺主要采用溶剂浸泡法提取长春花生物碱,生产率较低;少数企业尝试以超临界法提取,但由于长春花中活性物质含量极低,一般在千分之一以下,需要较大的原料处理能力,而目前超临界设备很难处理这样大量的物料。在长春碱和长春瑞宾半合成方面,现有工艺为过氧化物酶法、紫外合成法、单催化合成法等,产品收率不高,且多为国外专利保护工艺,我国企业难以利用。市场强烈希望科研单位能够提供更加有效的、科学的新工艺来替代以往的传统工艺,从而增加经济效益和社会效益。尽管前面提及的一些生产工艺能够得到粗提物,但其经济附加值过低且缺乏自主创新的技术成分,因而在国际市场上的竞争力太低。可见,在长春花生物活性物质的利用方面也需要科研单位紧密按照市场和社会需要,加大科研力量提供具有自主创新并具有知识产权的新工艺。当前抗癌药物的销售份额已占世界药品市场的 15%。从药用植物中提取抗癌新药,是众多科学家热衷研究的课题,也为我国生产企业提供了大好的前沿商机。我国仅海南省目前就有 3 万多亩 (1 亩 $\approx 666.7\text{m}^2$, 全书同) 地用于长春花培育,无疑能够为上述系列产品的提取和纯化提供物质资源。

本书是在我们的长春花研究合作团队和生物质研究合作团队的共同努力下完成的,导师祖元刚教授对书稿的完成倾注了大量的心血。本书是对长春花生物活性物质生态利用多年研究成果的汇总,对其他植物提取物的高效利用具有借鉴作用,对我国植物提取物产业的发展具有启示意义。感谢赵春建博士、王化硕士、孙国勇硕士,硕士研究生田浩、牛卉颖、刘莉娜、夏禄华、朱磊、李家磊、刘玉、贾佳、王晓鹏、刘婷婷、马春慧和卫蔚等对本书研究内容付出的大量工作。限于作者水平,疏漏之处在所难免,恳请各位读者提出建议和批评!

作 者

2009 年 8 月于哈尔滨

目 录

丛书序言

序言

前言

第一篇 国内外的研究进展和意义

第 1 章 绪论	3
1.1 长春花概述	3
1.1.1 长春花来源	3
1.1.2 长春花形态特征	3
1.1.3 长春花生物学特性	3
1.1.4 长春花分布	4
1.1.5 长春花应用	4
1.1.6 长春花细胞培养研究进展	5
1.1.7 长春花生物碱提取物产业化现状和趋势	8
1.2 长春花中主要生物活性物质	9
1.2.1 长春碱	9
1.2.2 长春新碱	13
1.2.3 文多灵和长春质碱	15
1.2.4 长春瑞宾	16
1.2.5 熊果酸和齐墩果酸	19
第 2 章 植物生态提取业	27
2.1 植物生态提取业的概念及其内涵	27
2.1.1 野生资源的生态保护	27
2.1.2 人工资源的生态培育	28
2.1.3 分离纯化的清洁生产	28
2.1.4 废弃物质的循环利用	28
2.2 生态工艺	29
2.2.1 原料来源生态化——生态培育 (eco-cultivation)	29
2.2.2 工艺过程生态化——清洁生产 (cleaner production)	29
2.2.3 工业剩余物处理生态化——生态利用 (eco-utilization)	30

2.3 发展植物生态提取业的意义	30
2.4 植物生态提取业的发展趋势	31
2.4.1 野生植物资源的保护生态化	31
2.4.2 人工植物资源的定向培育生态化	31
2.4.3 分离纯化过程生态化	32
2.4.4 废弃物质的循环利用生态化	32

第二篇 长春碱生物半合成定向诱导及其高效分离

第3章 长春花生物半合成定向诱导	35
3.1 长春碱生物半合成培养体系的建立	35
3.1.1 材料与方法	35
3.1.2 采用匀浆水培养体系定向诱导长春碱的生物半合成	35
3.2 长春碱代谢模式及调控因子优化参数的选择	37
3.2.1 长春碱代谢模式及调控因子的选择	37
3.2.2 诱导剂浓度的选择	39
3.2.3 匀浆时间的确定	41
3.3 长春花鲜磨匀浆后浆液的生物学特性	42
3.3.1 长春花匀浆固形物组成	42
3.3.2 长春花匀浆后浆液 pH 的测定	43
3.3.3 长春花匀浆后浆液中激素的测定	44
3.4 调控因子优化参数的选择	45
3.4.1 固液比的确定	46
3.4.2 培养温度的选择	47
3.4.3 培养时间的选择	47
3.5 匀浆培养生物半合成机理及设备	48
3.5.1 匀浆培养生物半合成通气时间的选择	49
3.5.2 鲜磨匀浆悬浮培养长春碱生物半合成强化工艺比较	50
3.6 长春花鲜磨匀浆生物半合成中间试验	51
3.6.1 鲜磨匀浆生物半合成设备	51
3.6.2 匀浆生物半合成工艺优化	52
第4章 高效提取纯化长春花中生物碱的生态工艺	55
4.1 对射流强化浸取长春花匀浆培养物中生物碱的生态工艺	55
4.1.1 对射流萃取理论	55
4.1.2 强化动态萃取法处理长春花匀浆培养物的工艺	57
4.1.3 对射流萃取工艺参数的选择	58

4.1.4	对射流固液萃取与其他常规提取方法的比较	63
4.1.5	长春花生物碱高效清洁提取中试过程	64
4.1.6	长春花生物碱提取工艺的生态化特征	65
4.2	长春花生物碱的分离纯化	66
4.2.1	双水相 pH 梯度-对射流液液萃取分离 4 种生物碱	66
4.2.2	长春质碱和文多灵的分离纯化	68
4.2.3	长春碱和长春新碱的分离纯化	69
4.2.4	长春花生物碱高效纯化中间试验	70
4.2.5	层析产物的重结晶	77
4.2.6	长春花生物碱纯化工艺的生态化特征	78

第三篇 长春碱及长春瑞宾的合成及纯化研究

第 5 章	长春碱的高效半合成及纯化	81
5.1	长春碱半合成原理	81
5.1.1	过氧化氢酶法	81
5.1.2	化学偶合法	82
5.1.3	紫外合成法	82
5.2	两步法合成长春碱	82
5.2.1	文多灵与长春质碱合成脱水长春碱	82
5.2.2	脱水长春碱转化为长春碱	85
5.3	长春碱双催化半合成研究	86
5.3.1	双催化半合成机理	86
5.3.2	长春碱双催化半合成小试研究	86
5.3.3	长春碱双催化半合成中间实验研究	87
5.4	长春碱的分离与纯化	88
5.4.1	材料与方法	88
5.4.2	硅胶柱层析纯化长春碱	88
第 6 章	长春瑞宾的高效合成及纯化	89
6.1	超声方法合成长春瑞宾的研究	89
6.1.1	超声波技术及物理机制	89
6.1.2	超声合成长春瑞宾	90
6.2	负压干柱层析方法纯化长春瑞宾	93
6.2.1	负压干柱层析技术	93
6.2.2	负压干柱层析设备及工作原理	93
6.2.3	负压干柱层析设备优点	94

6.2.4 负压干柱层析纯化长春瑞宾	95
6.2.5 长春瑞宾的重结晶	97

第四篇 长春花非生物碱类成分的提取及纯化

第7章 长春花中熊果酸和齐墩果酸的提取及纯化	101
7.1 熊果酸和齐墩果酸提取工艺参数的确定	101
7.1.1 原料处理	101
7.1.2 提取溶剂 pH 的选择	101
7.1.3 提取次数的选择	101
7.1.4 提取料液比的选择	102
7.1.5 沉淀熊果酸齐墩果酸的酸性溶剂 pH 的选择	103
7.2 熊果酸和齐墩果酸的分离	103
7.3 熊果酸和齐墩果酸纯化工艺参数的选择	103
7.3.1 柱层析纯化熊果酸	103
7.3.2 柱层析纯化齐墩果酸	104
7.4 熊果酸和齐墩果酸提取纯化工艺的中间试验	104

第五篇 废弃物的资源化利用与回收利用

第8章 长春花提取废水的清洁化处理	107
8.1 长春花提取废水的处理思路	107
8.2 长春花提取废水的处理方法	107
8.2.1 膜过滤设备	108
8.2.2 工艺流程	108
第9章 长春花提取废气的清洁化处理	110
9.1 长春花提取废气的来源及处理思路	110
9.2 长春花提取废气的处理方法	110
9.2.1 真空设备	110
9.2.2 处理流程	111
9.3 废气处理结果	112
第10章 长春花提取固形废弃物的资源化利用	113
10.1 长春花的化学组成	113
10.2 长春花提取固形废弃物的处理方法	116
10.3 长春花提取固形废弃物的资源化利用研究	116
10.3.1 长春花提取固形废弃物的干燥	116
10.3.2 固化成型	116

10.3.3 无氧热解制备生物质炭、焦油和醋液的实验研究	119
10.3.4 无氧热解制备生物质炭、焦油和醋液的中间实验	122
10.3.5 低温沉降分离植物醋液和植物焦油	125
10.3.6 长春花资源化利用的工艺流程	126
10.3.7 长春花资源化利用的物料衡算	126
10.4 长春花热解产品的组成	127
10.4.1 生物质炭	127
10.4.2 植物焦油	130
10.4.3 植物醋液	134
10.5 固形废弃物无氧热解处理与直接燃烧的比较	137
10.6 长春花无氧热解资源化利用的建厂设计	138
10.6.1 工艺流程	138
10.6.2 生物质热解炉	138
10.6.3 生物质热解产物分离系统	138
10.6.4 年处理 5000t 长春花植物药渣物料衡算	138
10.6.5 经济评价	138
10.7 长春花生物碱纯化失效的硅胶和氧化铝废弃物的回收利用	140
10.7.1 硅胶	140
10.7.2 氧化铝	140
参考文献	141
附录 1 长春花无氧热解资源化利用的工艺流程	153
附录 2 无氧热解炉	154
附录 3 生物质热解产物分离系统	155

第一篇

国内外的研究进展和意义

卷之五

第 1 章

绪 论

1.1 长春花概述

1.1.1 长春花来源

长春花为夹竹桃科 (Apocynaceae) 长春花属 (*Catharanthus*) 植物长春花 [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] 的全草, 别名五瓣梅、日日新、雁来红、四时春等, 株形整齐, 叶片苍翠具光泽, 花瓣 5 枚平展, 酷似梅花, 花期又长, 是我国江南园林中最常见的草本花卉。

1.1.2 长春花形态特征

长春花为直立多年生草本或亚灌木状。茎基常木质化, 叶草质稍革质, 对生; 叶柄短, 叶腋及叶腋间具腺体。花冠紫红、红、粉红或白色, 单生或 2~3 朵组成聚伞花序, 顶生或腋生。花萼裂片窄长圆形, 无腺体; 花冠高脚碟状, 花冠筒无毛或稍被微柔毛, 喉部缢缩, 被棉毛或茸毛, 花冠裂片平展, 斜倒卵形, 向左覆盖; 雄蕊着生花冠筒膨大处, 花药与子房离生, 长圆形; 花盘具 2 腺体; 心皮 2, 离生, 胚珠多数, 花柱丝状, 柱头头状。蓇葖果, 圆柱形。种子 15~30, 黑色, 长圆形, 被小瘤。花期 6~9 月 (图 1.1)。

1.1.3 长春花生物学特性

长春花喜温暖、稍干燥和阳光充足的环境。生长适温 3~7 月为 18~24℃, 9 月至翌年 3 月为 13~18℃, 冬季温度不低于 10℃。长春花忌湿怕涝, 盆土浇水不宜过多, 过湿会影响生长发育。尤其是室内过冬植株应严格控制浇水, 以干燥为好, 否则极易受冻。露地栽培, 盛夏阵雨, 注意及时排水, 以免受涝造成整片死亡。长春花为喜光性植物, 适合生长在稍干燥和阳光充足的环境中, 生长期必须有充足的阳光, 叶片苍翠有光泽, 花色鲜艳, 若长期生长在荫蔽处, 则叶片发黄凋落。宜肥沃和排水良好的土壤, 耐瘠薄土壤, 但切忌偏碱性土壤。板结、通气性差的黏质土壤, 会使结果植株生长不良, 叶子发黄, 不开花。多采用播种繁殖。生长适温 3~7 月为 18~24℃, 9 月至翌年 3 月为 13~18℃, 冬季温度不低于 10℃。

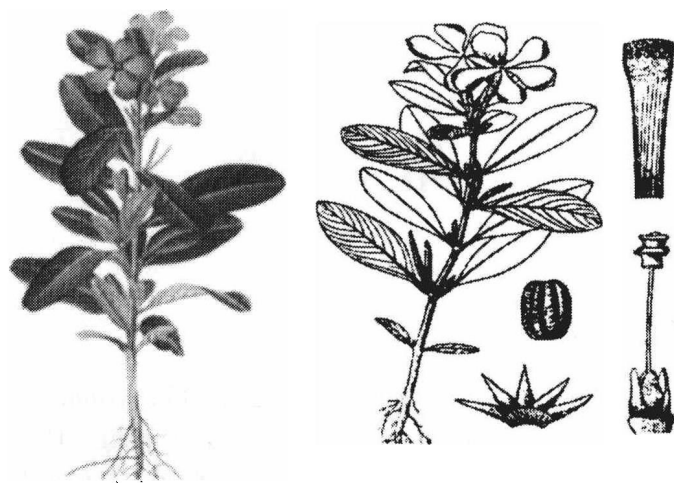


图 1.1 长春花基本形态特征图（引自《中国高等植物图鉴》）

Fig. 1.1 Basic characteristics of *Catharanthus roseus*

(Cited from *Higher Plants Illustrated Handbook of China*)

1.1.4 长春花分布

长春花全属约 8 种，7 种产于马达加斯加，1 种原产印度及斯里兰卡。我国引入栽培 1 种，早在宋代以前就传入我国。长春花在国际上栽培较为普遍，尤其在亚热带和温带地区都作为一年生花卉栽培。我国栽培长春花的历史不长，主要在长江以南地区栽培，海南、广东、广西、云南等省区栽培较为普遍。近年来，国内外市场对长春花需求量的增加，促进了长春花产业化发展。海南省是我国长春花的主产区，亦为野生长春花资源丰富的地区。

1.1.5 长春花应用

人们很早就知道长春花可用于止血、止痛、清洗伤口，治疗坏血病和控制糖尿病。长春花全株有毒，误食易造成细胞萎缩、白血球减少、血小板减少、肌肉无力、四肢麻痹等。但是长春花也是一种防治癌症的良药，全草均可入药，其植株内含上百种生物碱，例如长春碱、长春新碱、文多灵、长春质碱等。由于长春碱和长春新碱对治疗绒癌等恶性肿瘤、淋巴肉瘤及儿童急性白血病等都有一定疗效，因此，长春花是目前国际上应用最多的抗癌植物药源，具有较高的药用开发价值。

1.1.6 长春花细胞培养研究进展

利用细胞培养进行长春花生物碱的代谢调控是一种重要的手段。很多学者在这方面进行了卓有成效的工作。吲哚生物碱的生物合成源于两个不同途径：莽草酸途径和甲羟戊酸途径（图 1.2）。由莽草酸途径来的色胺和由甲羟戊酸途径经多步反应生成的裂环马钱子苷，在异胡豆苷合成酶的催化下偶合成吲哚生物碱的共同前体异胡豆苷。异胡豆苷经不同的途径生成文多灵和长春质碱或阿吗碱等。有 3 个方面的因素影响植物次生代谢物的积累，即酶催化的生物合成、产物在细胞内或组织间进行分部运输和积累、产物的生物和化学降解。所以细胞内次生代谢物的积累是生物合成和降解的总结果。因此只有了解了长春花生物碱的合成途径和关键限速酶，才能利用生物工程和基因工程生产长春花生物碱。

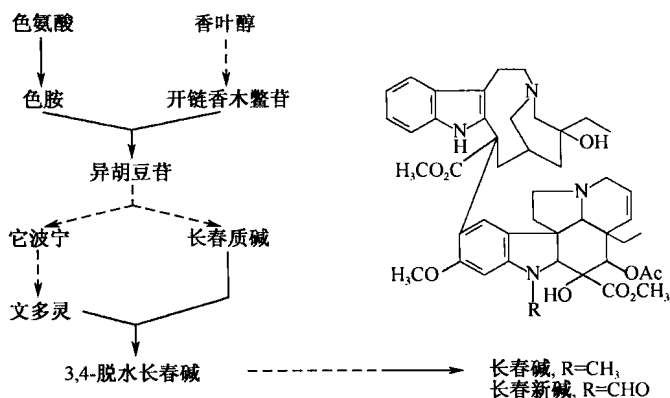


图 1.2 长春碱代谢途径

(引自 http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/Schoroeder/P450_Vinblastine_Syn.html)

Fig. 1.2 Metabolic pathway of Vinblastine

(Cited from http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schoroeder/P450_Vinblastine_Syn.html)

国际方面，El-Sayed 和 Verpoorte (2005) 研究了长春花叶片处理过程中茉莉酸甲酯对萜类吲哚生物碱的促进作用。发现 MJ 能够诱导二聚吲哚生物碱的形成，并使脱水长春碱含量达到原来的 2 倍，同时基础过氧化物酶的活性与生物碱的变化出现同值峰期。显示出了 POD 对长春花体内生物碱代谢的影响。Gregorio 和 Victor (1997) 研究了乙酰水杨酸对长春花次生代谢的影响，发现 ASA 可作为一种新的长春花细胞培养生产次生代谢产物的生物诱导子，但未发现其与真菌诱导子和顺式苯乙烯酸表现出明显的协同增效作用。Papon 等 (2005) 通过研究两种植物激素细胞分裂素和乙烯对长春花细胞培养过程中 TIA 的影响，发现二者均通过提高 G₁₀H 的活性来促进生物碱的积累。Mitsubishi 等 (2005) 利用栽培过程中施加高浓度无机磷酸盐和阳离子来诱导植酸的合成和液泡中生物碱的积累。