

喜树叶中喜树碱含量的高效液相色谱分析

阎秀峰, 王 洋, 于 涛, 张玉红, 殷丽君

(东北林业大学 森林植物生态学开放研究实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要: 建立了一种简便、快速、准确的喜树叶片中喜树碱含量的高效液相色谱分析方法; 采用英国 HPLC Technology 公司的 Techsphere ODS 柱 (25 cm × 4.6 mm ID, 5 μm), 流动相乙腈-水 (体积比 4: 6), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL; 样品制备方法以 61% (φ) 乙醇为溶剂, 50 °C 下超声提取喜树叶粉 10 min; HPLC 法测定喜树碱的含量; 该法的 RSD 为 2.5% (n = 6), 平均回收率为 96%。

关键词: 高效液相色谱法; 喜树; 叶片; 喜树碱

中图分类号: Q946.88; Q949.761.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2002)02-0015-03

喜树碱(campotohecine, CPT)是我国特有树种喜树(*Camptotheca acuminata* Decne., 珙桐科)中所含的一种生物碱^[1], 具有显著的抗肿瘤活性, 其抗癌机理独特, 是迄今为止发现的唯一专门通过抑制拓扑异构酶 I 发挥细胞毒性的天然植物活性成分^[2], 目前已有 TPT、CPT-11 等喜树碱类药物(喜树碱衍生物)获得美国 FDA 批准用于临床治疗癌症。喜树中的喜树碱含量很低, 一般仅为 0.01% ~ 0.1%, 很多研究工作集中在探求高喜树碱含量的喜树原料上^[3, 4], 但对喜树碱含量的测定方法尤其是供试样品的制备方法则很少深入探讨。已有的喜树碱含量测定方法中均以甲醇或乙醇浸提数次的方法来提取喜树碱^[3~5], 提取时间长, 且不易提取完全。本文系统地探讨了高效液相色谱法测定喜树叶中喜树碱含量的样品制备方法, 提出了将原料保存于提取液体系中一次超声提取以获得待分析样品的技术路线, 建立了一种简单、快速、可靠的喜树碱含量分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

JASCO 高效液相色谱仪, 1580 泵, 1575 型紫外检测器, Version 6.1 色谱工作站。

喜树碱标准品由美国 The Stehlin Foundation for Cancer Research 提供, 纯度 99.0%; 用于探讨样品制备方法的喜树叶采自东北林业大学实验林场栽培的 3 年生喜树幼树, 用于分析的喜树叶样品采集自我国各喜树产地。

1.2 色谱条件

英国 HPLC Technology 公司的 Techsphere ODS 柱(25 cm × 4.6 mm ID, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (体积比 4: 6), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

1.3 标准溶液的配制

精密称取喜树碱标准品 7.0 mg 于 100 mL 的容量瓶, 以乙腈-水 (体积比 4: 6) 为溶剂超声溶解并定容至刻度, 摇匀备用。

1.4 样品制备方法

精密称取喜树叶粉 4 g 于 100 mL 容量瓶, 加入 90 mL 61% (φ) 的乙醇, 50 °C 下超声提取 10 min, 冷却至室温, 稀释至刻度。取 1 mL 提取液, 12 500 g 离心 10 min, 吸取上清液 10 μL 进样。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的确定

以乙腈为空白, 在 200~400 nm 对一定含量的喜树碱乙腈溶液的紫外吸收进行扫描, 喜树碱在 254 nm 处有强吸收(图 1), 因此选择 254 nm 作为紫外检测器的检测波长。

2.2 流动相的选择

分别以不同比例的乙腈-水为流动相进样分析表明, 流动相乙腈-水体系在体积比 3: 7~4:

收稿日期: 2001-04-19; 修回日期: 2001-10-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070086); 黑龙江省留学归国基金资助项目(L00C009)

作者简介: 阎秀峰(1965-), 男, 黑龙江肇东人, 教授, 博士; 殷丽君, 现为中国农业大学食品学院博士后。

6 之间时喜树碱的保留时间为 4.8 min~ 8.7 min, 峰形良好且可保证提取样品的喜树碱与相邻组分良好分离(图 2), 理论塔板数按喜树碱峰计算不低于 3 000, 喜树碱峰与相邻峰的分离度大于 1.5。为了提高分析速度, 本法选择了体积比 4: 6 的乙腈- 水作为流动相。

2.3 标准曲线的绘制

分别精密吸取喜树碱标准溶液 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、8.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 以乙腈- 水(体积比 4: 6)为溶剂定容、摇匀。按照上述的色谱条件, 分别取稀释后样品及原标准溶液进样分析。喜树碱质量浓度(Y ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$))与峰面积(X)的线性回归方程为: $Y=4.938 \times 10^{-4}X-0.3951$, $r=0.9999$, 线性范围 0.70~70 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 样品制备方法的确定

2.4.1 提取溶剂的筛选 分别以 95% 乙醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿作为溶剂超声提取喜树碱, 结果表明, 95% 乙醇的提取效果最佳。

2.4.2 提取方法的比较 分别采用 3 种提取方法制备样品: (1) 称取 4 g 样品于 100 mL 容量瓶中, 加入 90 mL 95% 乙醇超声提取 30 min, 冷却定容, 取样离心, 进样分析; (2) 称取 4 g 样品于锥形瓶中, 30 mL 95% 乙醇超声提取 3 次, 每次 30 min, 合并提取液于 100 mL 容量瓶中, 95% 乙醇定容至刻度, 取样离心, 进样分析; (3) 称取 4 g 样品, 95% 乙醇索氏提取 6 h, 定容于 100 mL 容量瓶, 取样离心, 进样分析。经差异显著性分析, 3 种方法制得的样品分析结果差异不显著, 1 法的结果略高于 2 法及 3 法。作者认为, 造成这一结果的原因可能是: (1) 在 1 法的提取条件下获得的是喜树碱稀溶液, 可以达到组织外溶液及组织内液体的浓度平衡, 因而尽管未达到一般意义上的“提取完全”, 但在此条件下组织内液体也是提取液的一部分, 并不影响分析结果; (2) 2 法在多次反复提取的处理过程中不可避免造成少量损失, 而 3 法则需使提取液较长时间处于较高的温度下, 易于造成植物提取样品的变化。而且, 1 法操作简便, 尤其是处理大批样品时, 更具有 2 法及 3 法所无法比拟的优越性, 因而本法采用了 1 法。

2.4.3 最佳提取条件 选择乙醇含量、提取时间及提取温度进行 3 因素 10 水平 $U_{10}(10^3)$ 均匀设计试验, 试验条件及结果见表 1。

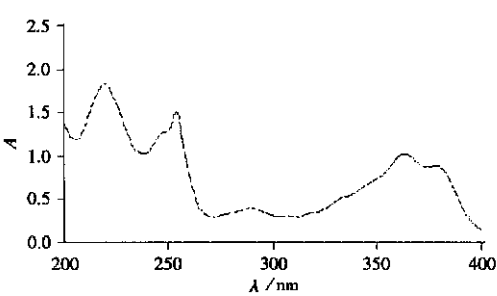


图 1 喜树碱标准品紫外吸收谱
Fig.1 UV absorbance curve of CPT standard in acetonitrile

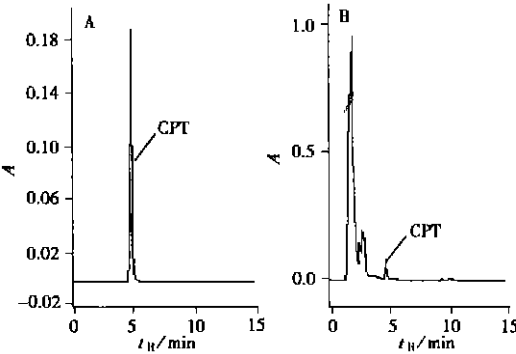


图 2 标准品(A)和喜树叶样品(B)色谱图
Fig.2 Chromatograms of standard (A) and sample of leaves of *Camptotheca acuminata* Decne. (B)

表 1 $U_{10}(10^3)$ 均匀设计试验条件及结果(偏差值 0.194 4)
Table 1 $U_{10}(10^3)$ experimental conditions and results by uniform design(deviation 0.194 4)

No	Content of alcohol φ/%	Extraction temperature θ/℃	Extraction time t/min	Yield of CPT R/%	Fitted value %	Residual value %
1	10	60	60	0.042 4±0.001 4	0.042 4	0.000 0
2	20	25	120	0.042 7±0.001 3	0.042 7	0.000 1
3	30	50	160	0.048 2±0.001 5	0.048 4	- 0.000 2
4	40	30	40	0.053 9±0.001 6	0.053 7	0.000 2
5	50	35	20	0.060 8±0.001 2	0.061 2	- 0.000 4
6	60	15	200	0.052 2±0.001 3	0.052 3	- 0.000 1
7	70	45	100	0.059 1±0.001 6	0.058 7	0.000 4
8	80	20	140	0.041 0±0.000 8	0.040 9	0.000 1
9	90	55	80	0.053 3±0.001 6	0.053 4	- 0.000 1
10	100	40	180	0.024 8±0.000 7	0.024 9	- 0.000 1

对试验结果进行逐步回归分析 (引入变量 F _检验值 $F = 0.05$, 剔除变量 F _检验值 $F \geq 0.05$), 得回归方程:

$$Y = -0.021\,351\,85 + 0.001\,251\,35\varphi + 0.001\,638\,38\theta + 0.000\,249\,70t - 0.000\,011\,56\varphi^2 + 0.000\,003\,22\varphi\theta - 0.000\,001\,32\varphi t - 0.010\,912\,5\theta^2 - 0.000\,006\,31\theta t,$$

回归方程的复相关系数 $r = 0.999\,8$, 残差标准差 $s = 0.000\,65$, 残差平方和 SE 为 $0.000\,01$, 本方程对试验结果拟合较好。对回归方程中各项的偏回归系数分析结果表明, 在选定试验条件下乙醇含量对喜树碱的提取率有显著影响, 而提取温度及提取时间对提取结果影响不显著。根据回归方程, 最佳乙醇含量为 61% (φ), 最佳提取温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 最佳提取时间为实验最小设定值 20 min 。为了更准确地反映提取时间对喜树碱提取率的影响, 进行了补充试验: 在最佳乙醇含量和提取温度下, 分别超声提取样品 $1、2、3、4、5、10、15、20、25$ 及 30 min , 并进样分析。结果表明, 在 $1\sim 10\text{ min}$, 喜树碱提取率随提取时间的延长而提高; 10 min 后, 提取率随提取时间的延长而略有降低, 但在提取时间为 $5\sim 20\text{ min}$ 间, 所有提取样品的 RSD 为 3.6% , 说明在此条件下, 提取时间为 $5\sim 20\text{ min}$ 时喜树碱的提取率基本稳定, 选择的提取时间为 10 min 。因此, 喜树碱最佳提取条件为: 乙醇含量 61% , 提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 提取时间 10 min 。

2.5 干燥方法

采集一定数量的喜树鲜叶, 以叶脉为中线将喜树叶对称分为 2 份, 分别采用 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重及冻干至恒重的方法干燥, 干燥后置于同一干燥器中保存 1 周。分别按上述方法制备分析样品, 结果表明冻干样品的喜树碱含量高于烘干样品。因此, 分析喜树碱含量时, 在实验条件许可的情况下应采用冻干的方法来处理样品。

2.6 回收率测定

精密称取 6 份喜树叶粉, 每份 2 g , 分别加入喜树碱标准品 1.2 mg , 按 1.4 方法制备样品, 测得加标回收率为 96% 。

2.7 精密度

精密称取 6 份喜树叶粉, 每份 4 g , 按 1.4 方法制备样品, 测定喜树碱含量, RSD 为 2.9% 。

2.8 样品分析

采用上述方法对采自不同省份的喜树嫩叶及成叶进行了喜树碱含量分析(表 2)。由于试验条件限制, 用于分析的喜树叶采用 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的方法。

传统喜树碱生产均以果实为原料。从上述测定结果可以看出, 喜树嫩叶的喜树碱含量也较高, 显著高于成叶。广西产喜树嫩叶的喜树碱含量达 0.17% , 甚至高于喜树果实的喜树碱含量^[5, 6]。因此, 喜树嫩叶亦可作为生产喜树碱的原料, 而且易于采收且不受树龄限制。测定的喜树叶片中, 广西产喜树嫩叶及成叶喜树碱含量均高于其他各省, 质量最佳。

表 2 不同省份喜树叶中喜树碱含量

Table 2 Content of CPT in leaves of *Camptotheca acuminata* Decne. in different provinces

No	Province	Content of CPT w/%	
		Tender leaves	Grown leaves
1	Guizhou(贵州)	0.067 6	0.032 7
2	Sichuan(四川)	0.106 8	0.051 3
3	Guangxi(广西)	0.169 4	0.054 5
4	Yunnan(云南)	0.070 3	0.020 5
5	Henan(河南)	0.093 9	0.049 4

参考文献:

[1] WALL M E, WANI M C, COOK C E, *et al.* Plant antitumor agents I : The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. J Amer Chem Soc, 1966, 88(16) : 3888- 3890

[2] HSIANG Y H, HERIZBERG R, HECHT S, *et al.* Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. J Biol Chem, 1985, 260(27) : 14873- 14878.

[3] LIU Z J, CARPENTER S B, BOURGEOIS W J, *et al.* Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata* [J]. Tree Physiol, 1998, 18(4) : 265- 270.

[4] MEYER M L, NESSLER C L, MCKNIGHT T D. Sites of accumulation of the antitumor alkaloid camptothecin in *Camptotheca acuminata* [J]. Planta Med, 1994, 60(6) : 558- 560

[5] 张丽艳, 杨玉琴. 反相高效液相色谱法测定喜树果实中喜树碱的含量[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(4) : 234- 235.

[6] 王 洋, 于 涛, 张玉红, 等. 碱法提取喜树碱工艺的研究[J]. 植物研究, 2000, 20(4) : 433- 437.

测定裸大麦中生育酚和生育三烯酚的正相高效液相色谱法

夏向东¹, 吕飞杰¹, 赵环环², 台建祥¹, 付勤¹

(1. 中国农业科学院作物育种栽培研究所 加工室, 北京 100081; 2. 中国农业大学 作物学院, 北京 100094)

摘要: 建立了同时测定裸大麦中 α 、 β 、 δ 生育酚和 α 、 γ 、 δ 生育三烯酚以及 γ 生育酚+ β 生育三烯酚含量的正相高效液相色谱法; 采用国产 YWG-SiO₂ 柱 (250 mm $\times$ 4 mm ID, 5 μ m), $V_{\text{正己烷}}$: $V_{\text{异丙醇}}$ = 99: 1 体系为流动相, 流速为 1. 2 mL/min, 荧光检测器检测, 激发波长 290 nm, 发射波长 330 nm, 并采用正交设计法优化样品的皂化工艺。

关键词: 高效液相色谱; 裸大麦; 生育酚; 生育三烯酚; 皂化

中图分类号: Q949. 714. 2 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2002)02- 0018- 04

维生素 E (VE) 是生育酚 (tocopherol, 简写 T) 和生育三烯酚 (tocotrienol, 简写 T₃) 以及具有 D- α 生育酚生理活性的衍生物 (如酯类等) 的总称。目前已经从植物资源中分离出 4 种生育酚 (α 、 β 、 γ 、 δ) 和 4 种生育三烯酚 (α 、 β 、 γ 、 δ)^[1]。由于生育酚研究较早, 生理功能也得到认可, 并且已经广泛应用, 因此通常所说的维生素 E 就是指生育酚, 国家标准中规定的维生素 E 含量也以 α 生育酚为标准^[2]。

随着科学研究的逐步深入, 已经证明维生素 E 的上述 8 种同系物的生理功能及活性是有区别的, 尤其近 10 年来已经有越来越多的证据表明生育三烯酚在抗氧化性能、降低胆固醇、抑制癌症等方面具有独特的生理功能, 并且在某些方面具有比生育酚更优越的生理功能^[3]。因此, Hendrich 等^[4]认为应当把生育三烯酚和生育酚区分开来, 并把生育三烯酚、异黄酮、类胡萝卜素作为人体所需的新营养素。由于生育酚和生育三烯酚结构和性质相近, 给分析检测带来难度, 目前国内还未见生育三烯酚检测方法的报道, 本文报道同时测定生育酚和生育三烯酚的正相高效液相色谱法。

1 实验部分

1. 1 仪器与试剂

美国 Waters 高效液相色谱仪: Waters 600 色谱泵, Waters 474 荧光检测器, Millennium³² 色谱数据

收稿日期: 2001- 05- 22; 修回日期: 2002- 01- 11

基金项目: 中国农业科学院西部大开发基金资助项目 (2000- 24)

作者简介: 夏向东 (1974-), 男, 山东邹平人, 博士研究生。

(上接 17 页)

Determination of Camptothecin in Leaves of *Camptotheca Acuminata* Decne. by HPLC

YAN Xiu_feng, WANG Yang, YU Tao, ZHANG Yu_hong, YIN Li_jun

(Open Research Laboratory of Forest Plant Ecology, Northeast Forestry University, Haerbin 150040, China)

Abstract: A simple, rapid and sensitive method for the determination of camptothecin in leaves of *Camptotheca acuminata* Decne. was established. Camptothecin in the leaves was ultrasonically extracted with 61% alcohol at 50 °C for 10 min, and determined by high performance liquid chromatography. The camptothecin was separated on a Techsphere ODS column (25 cm $\times$ 4. 6 mm ID, 5 μ m) at 25 °C, using acetonitrile- water (4: 6 by volume) system with 1. 0 mL/min as the mobile phase, and detected at 254 nm. Relative standard deviation of 2. 5% ($n=6$) and average recovery of 96% for the method were found.

Key words: HPLC; *Camptotheca acuminata* Decne.; Leaves; Camptothecin