

马比木根中喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱的 HPLC 分析*

白永花^{1 2} 宋启示^{1 **}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室 ,昆明 650223; 2. 中国科学院大学 ,北京 100049)

摘要 目的: 建立测定马比木根中喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱的高效液相色谱法。方法: 采用 5 种方法对马比木根中的喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱进行提取; 运用高效液相色谱法, 采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(4. 6 mm × 250 mm 5 μm) ,以甲醇 - 水(50: 50) 为流动相, 流速 0. 8 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 26 °C。结果: 喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱进样量分别在 0. 24 ~ 4. 00 μg(*r* = 0. 9997) 和 0. 24 ~ 4. 00 μg(*r* = 0. 9995) 范围内线性关系良好; 乙醇溶液室温浸泡提取得到的喜树碱含量(0. 944%) 和 9 - 甲氧基喜树碱含量(0. 237%) 明显高于其他方法。马比木是目前发现的喜树碱类含量最高的植物。结论: 本文建立的 HPLC 检测法简便、准确、灵敏度高, 乙醇溶液室温浸泡提取法安全、成本低, 提取率高, 适用于喜树碱类提取和马比木的质量检测。

关键词: 马比木根; 假柴龙树属; 喜树碱; 9 - 甲氧基喜树碱; 不同提取方法比较; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2014) 01 - 0100 - 04

HPLC analysis of camptothecin and 9 - methoxycamptothecin in the roots of *Nothapodytes pittosporoides**

BAI Yong - hua^{1 2} SONG Qi - shi^{1 **}

(1. Key Laboratory of Tropical Plant Resource and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of camptothecin and 9 - methoxycamptothecin in the roots of *Nothapodytes pittosporoides*. **Methods:** Five extraction methods were carried out respectively in the extraction of camptothecin and 9 - methoxycamptothecin from roots of *N. pittosporoides*. HPLC was adopted. The separation was performed on a Waters Symmetry C₁₈ column(4. 6 mm × 250 mm 5 μm) at 26 °C. The mobile phase was methanol - water (50: 50) with a flow rate of 0. 8 mL · min⁻¹. The detective wavelength was set at 254 nm. **Results:** The linear ranges for camptothecin and 9 - methoxycamptothecin were 0. 24 - 4. 00 μg(*r* = 0. 9997) and 0. 24 - 4. 00 μg(*r* = 0. 9995) respectively. The contents of camptothecin and 9 - methoxycamptothecin of the extracts from soaking in ethanol under room temperature were 0. 944% and 0. 237% respectively, which were higher than other extraction methods. *N. pittosporoides* contained the highest amount of camptothecins. **Conclusion:** This method is simple, sensitive and accurate, which is suitable for extraction and analysis of camptothecins, and also can be applied in the quality control of *N. pittosporoides*.

Key words: root of *Nothapodytes pittosporoides*; *Nothapodytes*; camptothecin; 9 - methoxycamptothecin; comparison of different extraction methods; content determination; HPLC

马比木(*Nothapodytes pittosporoides* (Oliv.) Sleum.) 为茶茱萸科假柴龙树属植物, 又名海桐假柴龙树、公黄珠子、追风伞。马比木为灌木, 分布于贵州、

湖南、湖北、四川等地^[1]。入药能祛风除湿、理气散寒, 主治风寒湿痹、浮肿、疝气。假柴龙树属植物共 7 种, 已有报道该属的臭味假柴龙树(青脆枝) 含有

* 中国科学院重要方向项目(KSCX2 - EW - R - 15) ,中国科学院“一三五”专项(XTBG - F02)

** 通讯作者 Tel: (0871) 65160902; E - mail: songqs@xtbg. ac. cn

第一作者 Tel: (0871) 65138281; E - mail: byh4856@126. com

喜树碱,其平均含量可达到干重的0.3%^[2]。喜树碱及其衍生物具有较好的抗肿瘤活性,已经成为了抗肿瘤药物的主要成分之一。喜树碱由Wall^[3]等首次从喜树植物中分离出来,但据报道喜树中喜树碱的含量较低,如福建产喜树果实中喜树碱的含量最高为干重的0.169%^[4]。而马比木植株中也含有大量喜树碱,其中喜树碱含量最高的为细根(可达干重的0.53%),主根次之。茎、枝、叶、花序、果实和种子也含有喜树碱^[5],为极具价值的抗肿瘤药物资源。国内外有关喜树碱提取分离和含量测定的研究已有许多报道^[6-7],马比木根中喜树碱含量测定的方法也有一些报道^[5,8-11],但马比木根中9-甲氧基喜树碱含量测定的方法还未见报道。本研究分别采用5种方法对马比木根中的化学成分进行提取,再采用高效液相色谱法测定提取物中喜树碱和9-甲氧基喜树碱的含量,比较这5种提取方法对喜树碱和9-甲氧基喜树碱的提取效果,选出从马比木根中获取喜树碱和9-甲氧基喜树碱的最佳提取方法,为开发利用马比木植物资源奠定基础。

1 仪器与试剂

Waters 1525 分析型高效液相色谱仪; AL104 型电子天平; DWF-100 型电动植物粉碎机; 98-1-B 型加热提取器。喜树碱和9-甲氧基喜树碱对照品为实验前期分离所得,纯度为97%左右;提取时所用甲醇、乙醇、氢氧化钠、盐酸为分析纯,HPLC 所用甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水。

马比木(*Nothapodytes pittosporoides*)的根于2011年10月采于湖南省凤凰县,并由中国科学院西双版纳热带植物园宋启示研究员鉴定,标本存放在中国科学院西双版纳热带植物园民族药研究组实验室。

2 方法与结果

2.1 提取方法

将采集来的马比木根晾干,粉碎过60目筛,备用。采用以下5种方法对马比木根中的化学成分进行提取。

2.1.1 方法1(乙醇热回流提取法) 取粉碎好的样品300g,加入80%乙醇溶液3000mL,加热回流提取3次,每次8h。合并提取液,减压浓缩制成干浸膏。

2.1.2 方法2(乙醇室温浸泡提取法) 取粉碎好的样品300g,加入80%乙醇溶液3000mL,室温浸泡提取3次,每次24h,前12h每隔1h超声1次(功率260W,频率40kHz,每次5min)。合并提取液,减压浓缩制成干浸膏。

2.1.3 方法3(甲醇热回流提取法) 取粉碎好的样品100g,加入95%甲醇溶液1000mL,加热回流提取3

次,每次8h。合并提取液,减压浓缩制成干浸膏。

2.1.4 方法4(碱法提取) 取粉碎好的样品300g,用0.3%氢氧化钠溶液冷浸提取3次,每次8h,氢氧化钠溶液用量为16mL·g⁻¹。合并提取液,向提取液中加入硫酸调pH至5~6,减压浓缩制成干浸膏。

2.1.5 方法5(酸法提取) 取粉碎好的样品300g,用pH为1.9的盐酸溶液冷浸提取3次,每次8h。合并提取液,减压浓缩制成干浸膏。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 精密称取上述5种提取方法得到的干浸膏适量(方法1所得干浸膏:35.9mg;方法2所得干浸膏:17.4mg;方法3所得干浸膏:19.3mg;方法4所得干浸膏:99.9mg;方法5所得干浸膏:100.9mg),分别加入色谱甲醇适量,超声(功率260W,频率40kHz)溶解30min后定容至10mL,8000r·min⁻¹离心10min,经0.45μm的滤膜过滤,即得。

2.2.2 对照品储备液 分别取喜树碱和9-甲氧基喜树碱的对照品适量,精密称定,加色谱甲醇制成浓度均为0.20mg·mL⁻¹的单一成分对照品储备液,避光保存,备用。

2.3 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈(4.6mm×250mm, 5μm); 流动相: 甲醇-水(50:50); 流速: 0.8mL·min⁻¹; 检测波长: 254nm; 柱温: 26℃; 进样量: 20μL。该色谱条件下喜树碱、9-甲氧基喜树碱对照品和乙醇室温浸泡提取法所得样品的色谱图见图1。

2.4 线性关系考察

精密吸取喜树碱对照品储备液0.6、4.8、6.0、8.0、10.0mL,分别置于10mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀。分别吸取上述对照品溶液20μL,按照“2.3”项下色谱条件进行测定。以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得到的喜树碱线性回归方程为:

$$Y = 4.918 \times 10^6 X + 8.528 \times 10^4 \quad r = 0.9997$$

结果表明,喜树碱进样量在0.24~4.00μg范围内线性关系良好。

精密吸取9-甲氧基喜树碱对照品储备液0.6、3.6、6.0、8.0、10.0mL,分别置于10mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀。分别吸取上述对照品溶液20μL,按照“2.3”项下色谱条件进行测定。以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得到的9-甲氧基喜树碱线性回归方程为:

$$Y = 4.161 \times 10^6 X + 9.983 \times 10^3 \quad r = 0.9995$$

结果表明,9-甲氧基喜树碱的进样量在0.24~4.00μg范围内线性关系良好。

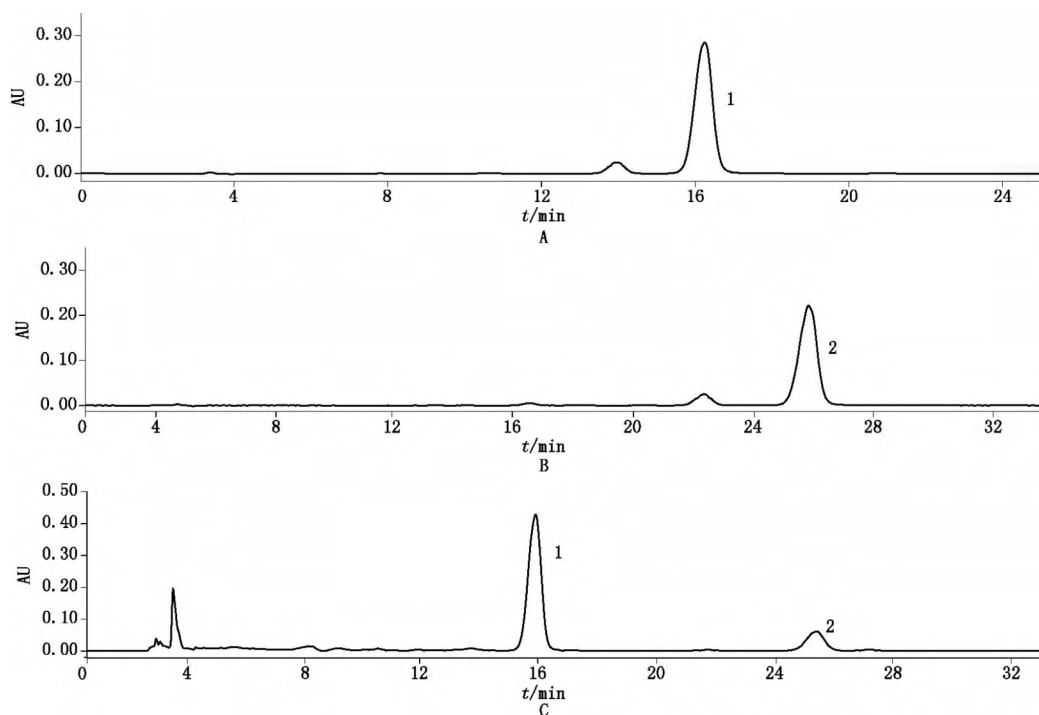


图1 对照品和马比木样品 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances and samples

A. 喜树碱对照品溶液(reference substance solution of camptothecin) B. 9 - 甲氧基喜树碱对照品溶液(reference substance solution of 9 - methoxycamptothecin) C. 乙醇室温浸泡提取法制备的供试品溶液(test sample solution from soaking in ethanol under room temperature)

1. 喜树碱(camptothecin) 2. 9 - 甲氧基喜树碱(9 - methoxycamptothecin)

2.5 精密度试验

分别精密吸取喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱的对照品溶液, 照“2.3”项下色谱条件连续进样 5 次, 得出喜树碱峰和 9 - 甲氧基喜树碱面积的 RSD 分别为 1.5% 和 1.2%, 表明色谱系统精密度良好。

2.6 重复性试验

取方法 2(乙醇室温浸泡提取法) 所得浸膏 5 份, 按“2.2.1”项下方法制成供试品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件进样测定。计算出喜树碱平均含量为 0.956%, RSD 为 2.4%; 9 - 甲氧基喜树碱峰平均含量为 0.240%, RSD 为 2.2%, 表明实验重复性良好。

2.7 稳定性试验

取方法 2(乙醇室温浸泡提取法) 所得浸膏, 按“2.2.1”项下方法制成供试品溶液, 分别放置 0.2、4、8、12 h 后按照“2.3”项下色谱条件进样, 计算出喜树碱峰面积的 RSD 为 0.47%, 9 - 甲氧基喜树碱峰面积的 RSD 为 3.6%, 表明样品溶液在 12 h 内的稳定性良好。

2.8 回收率试验

取已测含量的方法 2(乙醇室温浸泡提取法) 所得提取液, 分为 3 份, 各 1 mL, 分别精密加入浓度为 0.20、0.16、0.12 mg · mL⁻¹ 的喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱的对照品溶液各 1 mL, 制备供试溶液后按照

“2.3”项下色谱条件重复进样 3 次, 测定峰面积, 计算喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱的回收率和 RSD。结果喜树碱低、中、高 3 个加入量的平均回收率($n=3$) 分别为 92.53% (RSD = 0.80%)、98.01% (RSD = 2.1%)、102.5% (RSD = 3.4%); 9 - 甲氧基喜树碱低、中、高 3 个加入量的平均回收率($n=3$) 分别为 87.17% (RSD = 1.4%)、93.91% (RSD = 2.6%)、95.82% (RSD = 3.4%)。结果表明被测成分加样回收率良好。

2.9 样品含量测定

精密称取上述 5 种提取方法得到的干浸膏适量, 按“2.2.1”项下方法制成供试品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件各进样 3 次, 测定峰面积。以回归方程计算各样品中喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱的含量。5 种提取方法下马比木根中喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱的含量见表 1。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

结合相关文献^[12], 本研究选择 254、274 nm 2 种吸收波长对供试品溶液进行试验, 结果表明喜树碱和 9 - 甲氧基喜树碱在 274 nm 的吸收不如在 254 nm 处的强, 故选用 254 nm 作为检测波长。在流动相的优化中, 选用了甲醇 - 水的体系, 以不同配比

表 1 马比木根(干重)中喜树碱和 9-甲氧基喜树碱的含量测定结果(% $n=3$)

Tab 1 Content determination of camptothecin and 9-methoxycamptothecin in the roots of *Nothapodytes pittosporoides*

提取方法 (extraction method)	喜树碱 (camptothecin)	9-甲氧基喜树碱 (9-methoxycamptothecin)
乙醇热回流提取法 (hot ethanol extraction)	0.517	0.228
乙醇室温浸泡提取法 (soaking in ethanol under room temperature)	0.944	0.237
甲醇热回流提取法 (hot methanol extraction)	0.683	0.118
碱法提取 (alkaline extraction)	0.328	0.110
酸法提取 (acid extraction)	0.050	0.018

(60:40; 50:50; 40:60) 进行考察。结果表明,当甲醇-水比例为 50:50 时喜树碱和 9-甲氧基喜树碱出峰时间适中,色谱峰形好,喜树碱及 9-甲氧基喜树碱能和其他杂质峰完全分离。

3.2 提取方法的比较

对 5 种提取方法的提取率进行比较,结果显示乙醇室温浸泡提取得到的喜树碱和 9-甲氧基喜树碱含量最高,该方法的提取效果最好,且该方法简便、安全、成本低。热回流提取要在高温(高于提取溶剂的沸点)下进行,喜树碱及其衍生物不溶于水和普通的有机溶剂,对光、热敏感易分解,因而乙醇热回流提取和甲醇热回流提取的提取效果不如乙醇室温浸泡提取,并且使用热回流操作烦琐且安全系数低。在长时间的碱液浸提过程中,由于喜树碱在钠盐中十分不稳定,很容易和其他物质结合生成更稳定的物质,增加了还原为喜树碱的难度,导致碱法提取的提取液中喜树碱和 9-甲氧基喜树碱含量低。并且喜树碱在酸水中的溶解度极低,也使得酸法提取的提取率低。

3.3 小结

本研究以马比木根为原料,测定出马比木根中喜树碱的含量为 0.944%, 9-甲氧基喜树碱的含量为 0.237%,证明马比木根中富含喜树碱和 9-甲氧基喜树碱,是生产喜树碱和 9-甲氧基喜树碱的好原料,马比木可作为喜树碱的新植物资源进行深入研究 and 开发利用。所建立的高效液相色谱法测定马比木根中喜树碱和 9-甲氧基喜树碱的含量方法简便、快速、准确、灵敏、可靠。本研究得出的最佳提取条件为:用 80% 乙醇溶液室温浸泡提取 3 次,每次 24 h,前 12 h 每隔 1 小时超声 1 次(功率 260 W,频率 40 kHz,每次 5 min)。

参考文献

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita(中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora Reipublicae Popularis Sinicae(中国植物志) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社) 2009: 48
- [2] Shaanker RU, Ramesha BT, Ravikanth G, et al. Chemical profiling of *Nothapodytes nimmoniana* for camptothecin, an important anticancer alkaloid: towards the development of a sustainable production system [M] // Ramawat KG, Merillon JM. Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Berlin: Springer 2008: 197
- [3] Wall ME, Wani MC, Cook CE, et al. Plant Antitumor Agents. I. 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
- [4] LIU Wen-zhe(刘文哲), QIN Hai-yan(秦海燕), SUO Zhi-rong(索志荣). HPLC analysis of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in fruit of *Camptotheca acuminata* Decne. (喜树果中喜树碱和 10-羟基喜树碱的 HPLC 分析) [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2005 25(2): 168
- [5] LÜ Jiang-ming(吕江明), LIU Shi-biao(刘世彪), CAI Qi-hui(蔡其辉), et al. Microscopic fluorescence histological localization and variation of camptothecin in *Nothapodytes pittosporoides* (马比木的显微荧光组织学定位及其中喜树碱的变化研究) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2010 41(9): 1530
- [6] Singh I, Kumaravade N, Gnanam R, et al. RP-HPLC analysis for camptothecin content in *Nothapodytes nimmoniana*, an endangered medicinal plant [J]. *J Med Plant Res* 2010 4(3): 255
- [7] Zhang J, Yu Y, Liu D, et al. Extraction and composition of three naturally occurring anti-cancer alkaloids in *Camptotheca acuminata* seed and leaf extracts [J]. *Phytomedicine* 2007 14(1): 50
- [8] DENG Shi-ming(邓仕明), WANG Fa-song(王发松), ZHOU Da-zhai(周大寨), et al. HPLC determination of camptothecin in roots of *Nothapodytes pittosporoides* (HPLC 法测定马比木根中喜树碱的含量) [J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学) 2010, 38(9): 4965
- [9] PU Shang-rao(蒲尚饶), YANG Lang-sheng(杨朗生), JIAN-Kai(蹇凯), et al. Determination method of camptothecin content in roots of *Nothapodytes pittosporoides* (Oliv.) Sleum. by HPLC (马比木根中喜树碱含量的 HPLC 测定方法) [J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学) 2010 38(6): 2934
- [10] ZHENG Juan(郑涓), WANG Fa-song(王发松), LUO Qing-lin(罗庆林), et al. Extraction technology of camptothecin from roots of *Nothapodytes pittosporoides* (从马比木根中提取喜树碱的工艺研究) [J]. *J Hubei Univ Nat*(湖北民族学院学报), 2012 30(1): 57
- [11] LI Meng(李猛), HUANG Yi-han(黄意涵), LI Qin-yuan(李沁媛), et al. HPLC determination of camptothecin in *Nothapodytes pittosporoides* (HPLC 法测定马比木中喜树碱的含量) [J]. *J Mianyang Norm Univ*(绵阳师范学院学报) 2010 29(2): 60
- [12] WU Kai-hui(吴开慧), CAI Qi-hui(蔡其辉), LÜ Jiang-ming(吕江明), et al. Camptothecin in herb of *Nothapodytes pittosporoides* from different areas of Wuling Mountain(武陵山不同产地马比木药材中喜树碱的含量比较) [J]. *Cent South Pharm*(中南药学) 2011 9(3): 197

(本文于 2013 年 3 月 21 日收到)