



HPLC 法对五省产地喜树果中 10- 羟基喜树碱的含量测定

郭 群

(武汉职业技术学院 生物工程学院 湖北 武汉 430074)

摘 要 为了寻找提取 10- 羟基喜树碱的最佳喜树果原料,用 HPLC 法对湖北、四川、江西、广西和甘肃等五产地喜树果中的 10- 羟基喜树碱进行了含量测定,结果显示,不同产地喜树果中 10- 羟基喜树碱的含量差异较大,广西产的喜树果中的含量最高,为 0.125%。

关键词 喜树果;10- 羟基喜树碱;含量测定;HPLC

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1671- 931X (2018) 01- 0107- 03

10-羟基喜树碱是疗效已经明确的抗癌有效成分^[1],其重要来源之一就是喜树果中提取获得^[2]。喜树果为珙桐科植物喜树 *Camptotheca acuminata* Decne 的果实,广泛分布于我国长江流域及西南各省。由于 10-羟基喜树碱在喜树果中的含量较低,提取分离的成本较高,而且在不同地理种群的喜树果实中含量差异较大^[3],因此选择含量较高的喜树果原料,很有必要。目前 10-羟基喜树碱含量测定的主流方法为高效液相色谱法(HPLC)^[4-6]。

本研究从喜树果的主要产地湖北、四川、江西、广西和甘肃等五省采购到喜树果样品 5 份。研究了 10-羟基喜树碱测定的提取方法,摸索了高效液相色谱法的测定条件,并进行了系统适用性分析。测定了来自 5 省的 5 份样品的 10-羟基喜树碱的含量。

一、材料及仪器

10-羟基喜树碱对照品由李时珍药业集团提供;喜树果采购自湖北、四川、江西、广西和甘肃等地;甲醇和乙腈均为色谱纯;UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津);LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛

津) 配备 Inertsil[®] ODS-SP 4.6×150mm 5μm 分离柱(日本岛津)。

二、实验

(一)HPLC 色谱条件及系统适用性分析

1.紫外扫描测定 10-羟基喜树碱对照品的最大吸收峰波长

取 10-羟基喜树碱对照品 1.5g 溶于 10ml 甲醇中,40KHz 超声溶解,进行 200-600nm 波长范围的紫外光谱扫描,紫外光谱见图 1。可以看出选择 267nm 作为 10-羟基喜树碱的高效液相检测波长最合适。

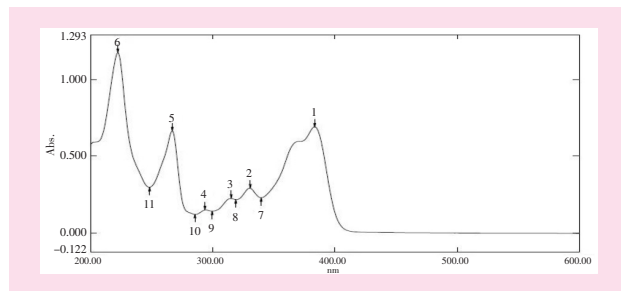


图 1 10- 羟基喜树碱对照品紫外扫描测定

收稿日期 2018-01-16

基金项目 武汉职业技术学院 2015 年科研项目“10-羟基喜树碱衍生物的转化利用研究”(项目编号:2015YK011)。

作者简介 郭群(1959-),女,湖北武汉人,硕士,武汉职业技术学院生物工程学院教授,研究方向:天然药物化学。

2. 10-羟基喜树碱 HPLC 分析的流动相的选择

10-羟基喜树碱样品浓度与紫外扫描样品相同,进样前用 0.45 μ m 微膜过滤。HPLC 参数:检测波长 267nm,流速 1.0ml/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,流动相:乙腈-水,进样量 15 μ l。

实验结果:乙腈-水为 30:70 时,tR(min)为 3.81,理论塔板数为 4183;乙腈-水为 25:75 时,tR(min)为 5.534,理论塔板数为 4740;乙腈-水为 20:80 时,tR(min)为 11.025,理论塔板数为 5760,拖尾因子 T 为 1.073。

当选用流动相为乙腈:水=20:80 时,保留时间为 11min 左右,可以有效避开样品检测时的水溶性杂质峰的干扰,理论塔板数满足检测的需要。因此,确定选择乙腈:水=20:80 为样品检测的流动相。

在后续的喜树果样品(湖北产)测定中,用乙腈:水=20:80 为流动相,10-羟基喜树碱峰与前后杂质峰的分离度分别为 2.169 和 1.172,基本能达到分离,

也证明上述的 HPLC 色谱条件适用于喜树果分析。

(二)喜树果样品加标实验

根据 10-羟基喜树碱对照品的 HPLC 图,10-羟基喜树碱峰的 tR(min)为 11.025。但是因为样品溶液中含有大量的杂质成分,将影响到 10-羟基喜树碱峰的保留时间,因此必须通过样品加标实验来进一步确定样品中 10-羟基喜树碱的峰位置。

取 1.041g 喜树果粉末(甘肃),溶于 15ml 70%乙醇溶液中,4000Hz 超声 50min,取 1ml 上清液 5000r/min 离心 10min,上清液于 0.45 μ m 滤膜过滤,进样量 15 μ l,HPLC 检测。将样品液中加入 10-羟基喜树碱对照品溶液,HPLC 检测。10-羟基喜树碱对照品、喜树果样品和样品加标的 HPLC 图谱见图 2。在 10.93min 处峰面积显著增大;因此,在 10.5-11.5min 范围内为 10-羟基喜树碱成分。

(三)喜树果样品处理方法

三次取喜树果粉末(甘肃)分别为 2.003g、2.001g

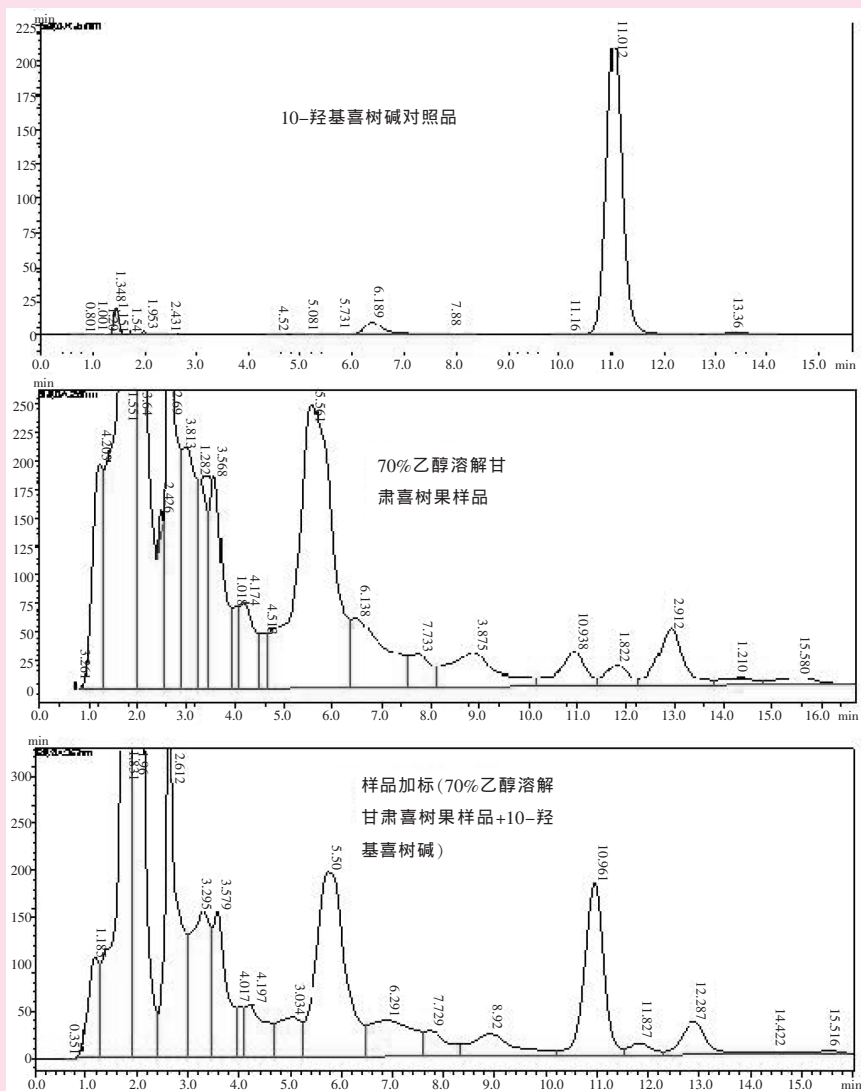


图2 喜树果样品加标实验

和2.006g,分别溶于15ml 60%、70%和75%乙醇溶液中,4000Hz超声50min,取1ml上清液5000r/min离心10min,上清液于0.45 μ m滤膜过滤,进样量15 μ l,HPLC检测。10-羟基喜树碱的峰面积比(面积归一化法计算)分别为:0.96%,1.04%和0.59%。由数据可以得出,当其他条件不变时,乙醇浓度为70%时,面积归一化法计算的10-羟基喜树碱的峰面积百分比最大,提取成分效果最佳。

(四)10-羟基喜树碱标准曲线的测定

取3.5mg10-羟基喜树碱对照品溶解在50ml70%乙醇中,分别取1ml、2ml、3ml、4ml、5ml溶解液加入5个10ml的容量瓶中,加70%乙醇定容至刻度,所有样品采取HPLC分析。

10-羟基喜树碱的进样量与面积由仪器工作站计算可得(见表1):

表1 10-羟基喜树碱的进样量与面积值

| 进样量 μ g | 0.105 | 0.210 | 0.355 | 0.420 | 0.525 |
|-------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| 峰面积 | 420980 | 832790 | 1265059 | 1695971 | 2114855 |

由进样量与峰面积的数据关系可得线性方程:

$$Y=4048454X-9342.5$$

相关系数 R^2 为0.9999,线性范围:0.105 μ g-0.525 μ g。

(五)五产地喜树果样品中10-羟基喜树碱的含量测定

分别取湖北、四川、江西、广西和甘肃喜树果各1.000克粉末,溶于15ml 70%乙醇溶液中,在30-

表2 五产地喜树果样品的10-羟基喜树碱含量

| 产地 | 湖北 | 四川 | 江西 | 广西 | 甘肃 |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 峰面积 | 828466 | 773010 | 650239 | 836315 | 578352 |
| 进样量 μ g | 0.2069 | 0.1932 | 0.1629 | 0.2089 | 0.1452 |
| 含量(%) | 0.1241 | 0.1159 | 0.0977 | 0.1253 | 0.0871 |

35 $^{\circ}$ C下,4000Hz超声50min,取1ml上清液5000r/min离心10min,上清液于0.45 μ m滤膜过滤,进行HPLC检测。根据标准曲线的计算公式可得各产地样品的10-羟基喜树碱的含量。见表2。

三、讨论

本研究建立的喜树果中10-羟基喜树碱含量的高效液相色谱测定方法,准确简单实用。样品测定结果显示,不同地理种群的喜树果中10-羟基喜树碱的含量差异较大;广西产的喜树果中的含量最高,湖北产的其次。

参考文献:

- [1] 郭鹏.喜树碱类抗癌药的研究进展[J].武警医学院学报,2001,10(3):255-258.
- [2] YAN Pi,KEJI Jiang,RONG Hou,et al.Examination of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in Camptotheca acuminata plant and cell culture,and the affected yields under several cell culture treatments[J].BIOCELL,2010,34(3):139-143.
- [3] 王自芬,刘文哲.不同产地喜树果实中喜树碱及10-羟基喜树碱的差异[J].中草药,2005,36(5):762-764.
- [4] 沈少华,刘姬艳,胡江琴,等.喜树碱和10-羟基喜树碱提取方法的比较与优化[J].湖北农业科学,2011,50(21):4459-4462.
- [5] MA Mei-fang,YU Tao,DAI Shao-jun,et al.Determination of contents of 10-Hydroxycamptothecin in Camptotheca acuminata by high-performance liquid chromatogram[J].Journal of Forestry Research,2002,13(2):144-146.
- [6] 赵荣国,真国辉,王贺双.10-羟基喜树碱的提取方法及工艺优化研究[J].中国医药生物技术,2010,5(2):147-148.

[责任编辑:张磊]

Determination of 10-Hydroxycamptothecin in Camptotheca Acuminata Fruits Produced in Five Provinces by HPLC

GUO Qun

(School of Biology Engineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan430074, China)

Abstract In order to find the best camptotheca fruit material for the extraction of 10-hydroxycamptothecin, the content of 10-hydroxycamptothecin in the fruit trees of Hubei, Sichuan, Jiangxi, Guangxi and Gansu was determined by HPLC. The results showed that the content of 10-hydroxycamptothecin in different habitats differs greatly. The content of camptotheca in Guangxi is the highest, which is 0.125%.

Key words camptotheca; 10-hydroxycamptothecin; determination; HPLC