

# 不同时间采摘的喜树嫩叶中喜树碱含量的HPLC分析

李红英 向极钡, 曾凡忠, 黄建民 (湖北省恩施州农业科学院植物园艺研究所, 湖北恩施445000)

**摘要** [目的] 探讨喜树碱含量最高的喜树叶片的最佳采摘时间。[方法] 采用高效液相色谱法研究同一地区不同时间采摘的喜树嫩叶中的喜树碱含量差别。[结果] 高效液相色谱的条件为: Kromasil C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为: 甲醇-水=6:4(体积比), 流速1.0 ml/min, 检测波长为254 nm, 柱温为室温, 进样量20 μl。样品制备条件: 以甲醇为溶剂, 60℃下超声提取1 h。高效液相色谱法测定喜树嫩叶中喜树碱最高含量为3.25%。喜树嫩叶在4月中旬到4月末这段时间, 喜树碱的含量是最高的, 它比喜树果和喜树成叶都高, 因此喜树嫩叶可作为喜树碱的生产原料。[结论] 该研究为喜树碱的工业化生产奠定了基础。

**关键词** 喜树; 喜树嫩叶; 喜树碱; 高效液相色谱法

中图分类号 S794.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)13-05825-01

## Analysis on the Contents of Camptothecin in Young *Camptotheca acuminata* Leaves Picked in Different Dates by HPLC

LI Hong-ying et al (Institute of Plant Horticulture, Ershi Academy of Agricultural Sciences in Hubei Province, Ershi, Hubei 445000)

**Abstract** [Objective] The aim was to discuss the optimum pick time of *Camptotheca acuminata* leaves with highest camptothecin content. [Method] The difference of camptothecin content from young leaves of *C. acuminata* picked in different time at the same area was studied by HPLC. [Result] The HPLC conditions were as follows: Kromasil C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-water = 6:4 (volume ratio), flow rate was 1.0 ml/min, determining wavelength was 254 nm, column temperature was room temperature and injection volume was 20 μl. The sample preparation conditions were as follows: methanol was taken as solvent and ultrasonic extraction was taken for 1 h at 60℃. The highest content of camptothecin from young leaves of *C. acuminata* was 3.25%, which was determined by HPLC. The camptothecin content of young leaves of *C. acuminata* was highest from the mid April to the end of April, which was higher than that from the fruit and mature leaves of *C. acuminata*. So young leaves of *C. acuminata* could be taken as materials for camptothecin production. [Conclusion] The research laid the foundation for the industrial production of camptothecin.

**Key words** *Camptotheca acuminata*; Tender leaves of *C. acuminata*; Camptothecin; HPLC

喜树(*Camptotheca acuminata*)属珙桐科(*Nyssaceae*)多年生落叶乔木,是我国特有树种<sup>[1]</sup>。喜树碱是喜树中所含的吲哚生物碱<sup>[2]</sup>,具有显著的抗癌活性,抗癌机理独特,是迄今为止发现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<sup>[3]</sup>。据报道福建地区所产喜树果中喜树碱的含量比其他省的(1.00%~1.30%)均高,为1.69%<sup>[4]</sup>。有报道已对喜树的成叶和嫩叶中喜树碱含量做了对比试验<sup>[5]</sup>,结果是嫩叶中喜树碱含量显著高于成叶的,而且最佳的是广西产喜树嫩叶的含量(1.69%)。笔者主要研究了同一地区不同采摘时间对喜树碱含量的影响,探索最佳采摘时间,为大量生产提供了可靠依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** SY-8100 高压输液泵; SY-8200 紫外分光检测器; HF-220 色谱柱恒温箱; Version 5.12 色谱工作站; 喜树碱标准品,由上海龙翔生物公司提供,纯度98.8%;喜树嫩叶样品采集自湖北省恩施州建始县。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 色谱条件。** Kromasil C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水=60:40(体积比), 流速1.0 ml/min, 检测波长254 nm, 柱温: 室温, 进样量20 μl。

**1.2.2 标准溶液的制备。** 精密称取喜树碱标准品10.0 ng于100 ml容量瓶中,以甲醇(色谱纯)为溶剂超声溶解并定容至刻度,摇匀备用。临用时取5 ml备用液于50 ml容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀即可。

**1.2.3 样品溶液的制备。** 精密称取喜树嫩叶粉末(过60目筛)1 g于100 ml容量瓶中,加入80 ml甲醇(分析纯),60℃下超声提取1 h,冷至室温,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用针头式过滤膜过滤提取液,取过滤液20 μl进样。

**1.2.4 干燥方法。** 采集一定数量的喜树嫩叶,于60℃的恒温干燥箱中干燥至恒重即可。

## 2 结果与分析

**2.1 流动相的选择** 分别以不同比例的甲醇-水为流动相,分析表明流动相甲醇-水体系在体积比为5:5~7:3时喜树碱的保留时间为3.90~7.59 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,理论塔板数按喜树碱峰计算不低于4000,喜树碱峰与相邻峰的分度大于1.5。为了提高分离速度,该试验选择了体积比6:4的甲醇-水作为流动相。得出的喜树碱标样和喜树嫩叶的图谱如图1、2所示。

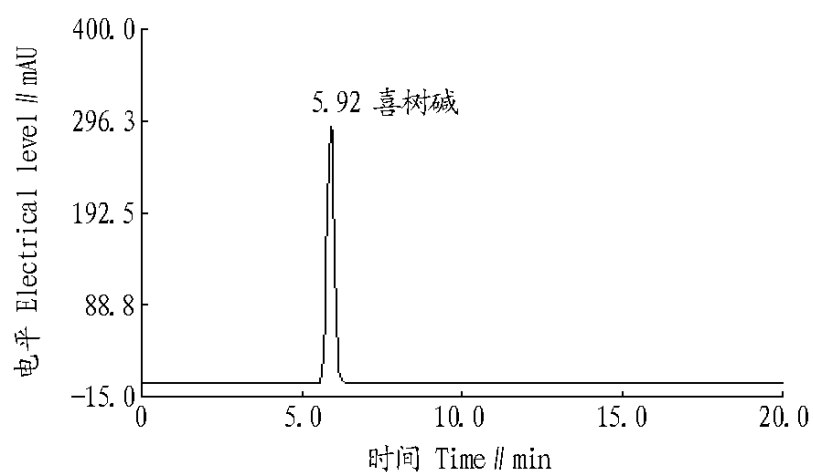


图1 喜树碱标样

Fig.1 The standard sample of camptothecin

**2.2 不同采摘时间对嫩叶中喜树碱含量的影响** 采用上述分析方法对采自同一地区不同时间的喜树嫩叶进行了喜树碱含量分析,结果表明:3月28日采的喜树碱含量为0.63%,4月1日的为0.91%,4月15日的为3.25%,4月30日的为2.09%,5月15日的为0.70%,5月30日的为0.67%,6月15日的为0.61%,6月30日的为0.58%;喜树果的含量为0.41%。

传统喜树碱生产均以喜树果为原料,从上述测定结果可以看出,喜树嫩叶在4月中旬到4月末这段时间,喜树碱的含量最高,且与以往的报道不同,它比喜树果和喜树成叶

(下转第5827页)

基金项目 恩施州农业科学院资助项目。

作者简介 李红英(1982-),女,湖北利川人,助理工程师,从事植物提取研究。

收稿日期 2009-02-16

供试液的1、2、6号峰对应,说明有3个热淋清颗粒的原型成分吸收入血,其中一个为槲皮素;而热淋清颗粒含药血浆和

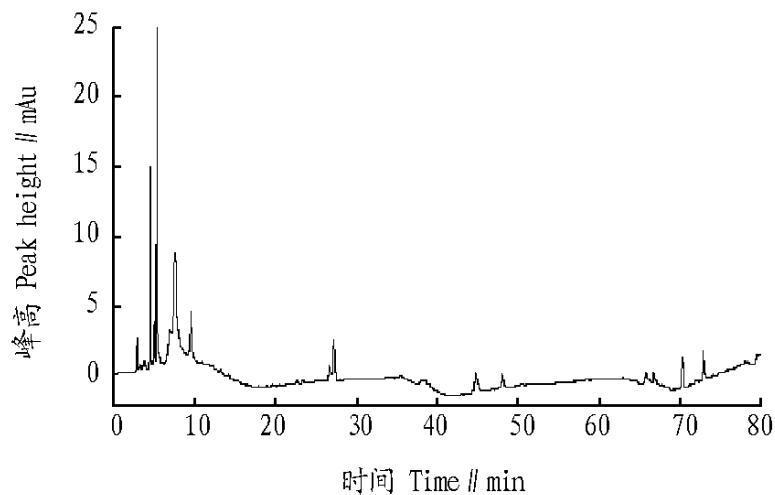


图1 空白血浆样品色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of blank plasma

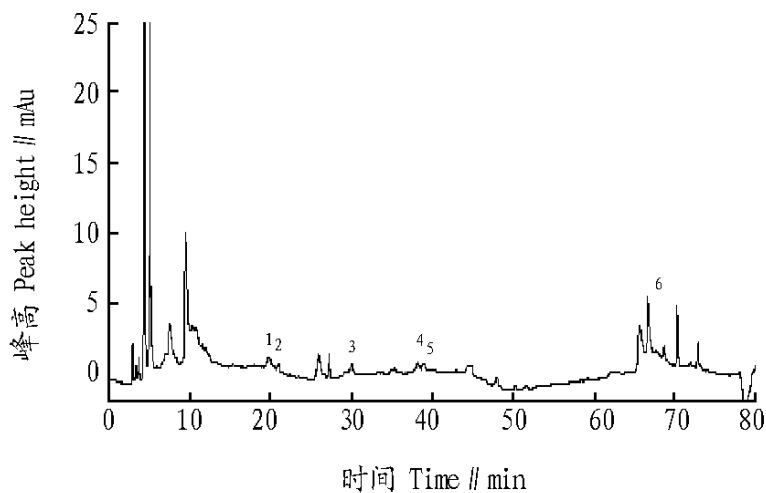


图2 热淋清颗粒含药血浆样品色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of plasma samples with Reijing granule

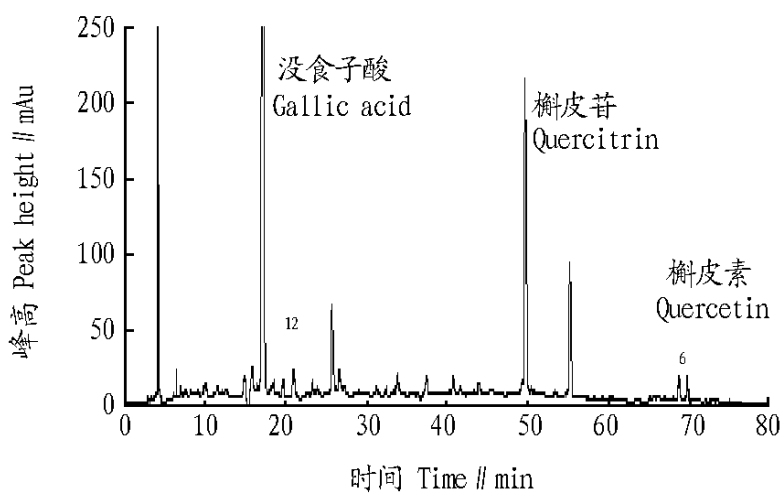


图3 热淋清颗粒样品色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of Reijing granule

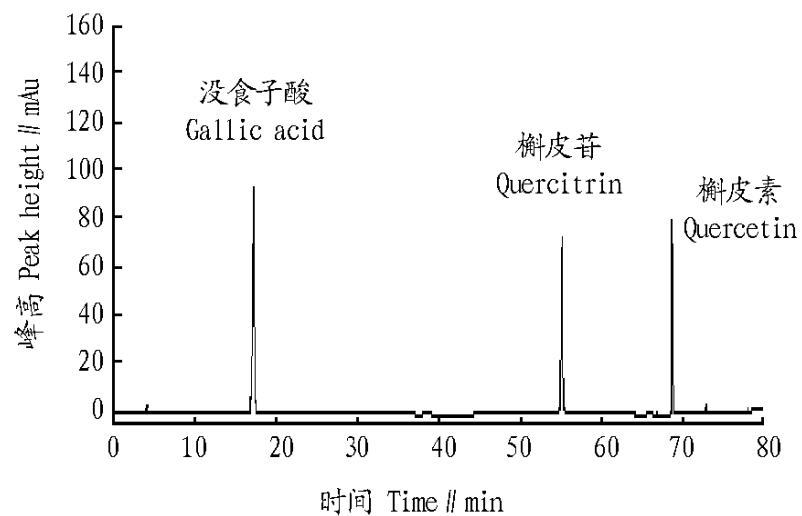


图4 对照品色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of reference substance

空白血浆在色谱图上未出现没食子酸与槲皮苷峰,说明热淋清颗粒中的没食子酸与槲皮苷没有被吸收入血,或者被代谢成其他成分。而在图3中的3、4、5号峰是热淋清颗粒含药血浆的特有峰,可能是热淋清颗粒在大鼠体内的代谢产物。

分别采用30%乙醇、80%乙醇、30%甲醇、80%甲醇、乙醇和甲醇提取制备热淋清颗粒供试液。通过比较发现,其中80%甲醇提取效果较为理想。因此,采用80%甲醇提取法制备热淋清颗粒供试液。同时,对供试液的稳定性、仪器的精密度和测定方法的重现性进行了考察,均符合相关要求。

### 3 结论与讨论

试验中分别采用甲醇沉淀法、乙腈沉淀法对血浆样品进行处理,从对待测组分的影响、干扰情况及对色谱分析条件的影响等方面进行考虑,确定采用乙腈沉淀法处理血浆样品。

目前,主要通过测定槲皮素或没食子酸的含量来评价热淋清制剂及其原料头花蓼药材的质量<sup>[1-2]</sup>。但笔者的试验结果表明,由单味药材头花蓼提取制成的单方制剂热淋清颗粒的含药血浆中发现了6个入血成分,说明控制药材及其制剂的质量仅测定个别指标的做法有待商榷。

### 参考文献

- [1] 龙凤荣,孙敏. HPLC 测定热淋清胶囊中槲皮素的含量[J]. 中成药, 2007, 29(4): 613-615.
- [2] 王祥培,万德光,王强,等. HPLC 测定不同产地的头花蓼中没食子酸的含量[J]. 华西药理学杂志, 2007, 22(2): 204-205.
- [3] 王喜军. 中药血清药物化学的研究动态及发展趋势[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789-792, 835.

(上接第5825页)

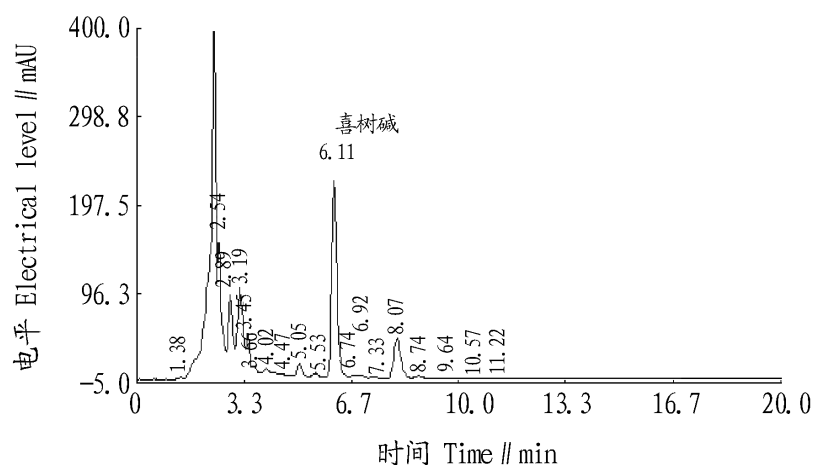


图2 喜树嫩叶图谱

Fig.2 The atlas of tender leaves of *Camptotheca acuminata*

都高,因此,喜树嫩叶亦可作为喜树碱的生产原料,可为喜树碱的工业化生产提供丰富的资源。

### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 144.
- [2] WALL ME, WAN MC, COOK CE, et al. Hart artituner agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88(16): 3888-3890.
- [3] HSIANG Y H, HERZBEN R, HECHT S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I[J]. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260: 14873-14878.
- [4] 刘文哲,秦海燕,索志荣. 喜树果中喜树碱和羟基喜树碱的HPLC分析[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(2): 168-170.
- [5] 阎秀峰,王洋,于涛,等. 喜树叶中喜树碱含量的高效液相色谱分析[J]. 分析测试学报, 2002, 21(2): 15-17.