

不同产地喜树果实中喜树碱及 10-羟基喜树碱的差异

王自芬, 刘文哲*

(西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

表 1 喜树果实产地

Table 1 Habitats of *C. acuminata* fruits

编号	省区	产地
1	福建	武夷山
2	四川	成都
3	广东	广州
4	浙江	杭州、金华、磐安
5	湖南	吉首
6	陕西	西安
7	湖北	武汉
8	江苏	南京
9	云南	昆明
10	江西	九江
11	安徽	合肥
12	广西	南宁
13	贵州	六盘水

喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 为珙桐科落叶乔木, 我国特有树种, 分布于我国长江流域及西南各省^[1]。喜树全株含抗肿瘤生物碱喜树碱 (camptothecin, CPT) 及衍生物^[2]。1966 年美国的 Wall 等首次从喜树中分离出喜树碱^[3], 抗肿瘤实验证明这种吲哚类生物碱具有抗癌活性^[4], 但由于其副作用较大, 未能实现临床应用^[5]。20 世纪 80 年代以来的研究发现了喜树碱通过抑制拓扑异构酶 I (topoisomerase I) 来发挥细胞毒性的独特抗癌机制^[4], 引发了喜树碱抗癌研究的新热潮。从喜树碱衍生物中筛选与喜树碱具有相同抗癌机制且高效低毒的新化合物, 已成为获得新型抗癌药物的重要方法之一。

喜树广泛分布于我国长江流域及西南各省, 张玉红等仅研究分析了中国境内 7 省区喜树果实中喜树碱的质量分数, 为了更全面地掌握我国喜树资源品质, 本研究采集到全国 13 个省区 15 个地区的喜树果实, 应用 HPLC 法研究分析喜树碱及 10-羟基喜树碱 (10-HCPT) 质量分数, 以选择喜树碱及 10-羟基喜树碱质量分数均较高的喜树地理种源, 为我国喜树及喜树碱产业化提供理论依据。

1 仪器、材料与方法

1.1 仪器、材料: HP1100 高效液相色谱仪, MA200 型电子分析天平 (上海第二天平仪器厂), SENCO R 系列旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司), DL-180 超声波清洗器 (浙江省象山县石浦海天电子仪器厂), 色谱纯甲醇 (中国上海陆忠试剂厂), 分析纯甲醇 (天津市化学试剂六厂三分厂), 去离子水。喜树果实于 2003 年采自下列 13 个省区 (表 1)。喜树碱和 10-羟基喜树碱对照品为德国 Boehringer Ingelheim 制药公司 Bischoff 教授所赠。

1.2 方法

1.2.1 对照品制备: 精密称取喜树碱对照品 5.20 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇, 超声波助溶并定容至刻度, 摇匀, 备用。精密称取 10-羟基喜树碱对照品 5.50 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇, 超声

波助溶并定容至刻度, 摇匀, 备用。

1.2.2 供试品溶液: 干燥的喜树果经粉碎、过筛后, 准确称取其粉末 100 mg, 置于锥形瓶中, 加入 10 mL 甲醇超声波提取 20 min, 重复 3 次, 滤过, 浓缩, 用甲醇定容至 1 mL, 用 0.45 μ m 针头过滤器滤过, 即得供试品溶液。

1.2.3 色谱条件: ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m) 色谱柱 (美国); 流动相: 水 (A), 甲醇溶液 (B); 梯度洗脱程序: 0 min (A-B, 6 : 4), 40 min (A-B, 3 : 7); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 254.36 nm; 柱温为 25 $^{\circ}$ C; 进样量为 10 μ L。该色谱条件下喜树碱及 10-羟基喜树碱对照品和供试品的色谱图见图 1。

2 结果

2.1 不同产地的喜树果实中的喜树碱及 10-羟基喜树碱: 通过对 13 省区的 15 产地喜树果实中喜树碱和 10-羟基喜树碱分析, 不同地理种群的喜树中, 其喜树碱和 10-羟基喜树碱差异显著, 其中福建产的喜树果实中喜树碱质量分数最高, 为 0.190 2%; 贵州产喜树果实中喜树碱质量分数最低, 为 0.085 3%, 两者差异极显著 ($P < 0.01$) (图 2)。四川产的喜树果实中 10-羟基喜树碱最高, 为 0.057 3%; 贵州产喜树果实中 10-羟基喜树碱最低, 为 0.0052%, 两者

收稿日期: 2004-08-17

基金项目: 陕西省教育产业化培育项目 (03JC39); 西北大学科研基金项目 (02NW10); 西北大学生物技术省级重点实验室基金

* 通讯作者 E-mail: lwenzhe@nwwu.edu.cn

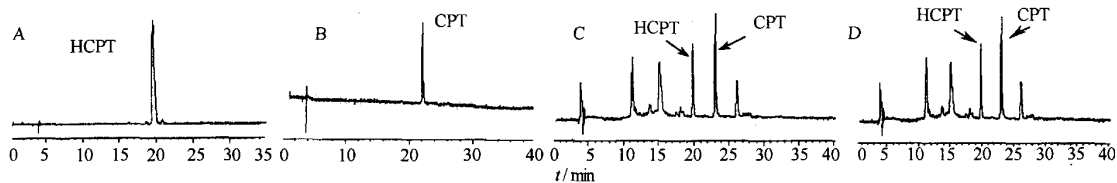


图 1 10-羟基喜树碱(A)和喜树碱(B)及喜树果实甲醇提取物色谱图(C-福建、D-湖南)

Fig. 1 HPLC chromatograms of 10-HCPT (A), CPT (B), and methanol extracts of *C. acuminata* fruits (C: Fujian, D: Hunan)

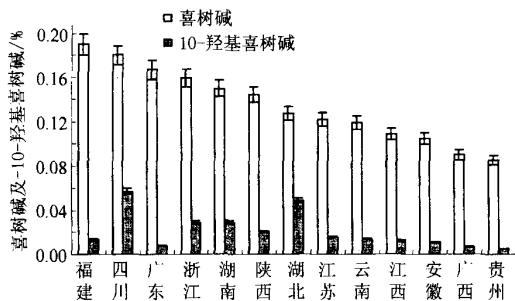


图 2 不同产地喜树果实中喜树碱及 10-羟基喜树碱含量比较

Fig. 2 Comparison of CPT and 10-HCPT in *C. acuminata* fruits from different habitats

差异极显著 ($P < 0.01$) (图 2)。

2.2 同一省份内不同地区喜树果实中的喜树碱及 10-羟基喜树碱:在对不同省区的喜树果实中喜树碱及 10-羟基喜树碱比较分析同时,也以浙江省(杭州、金华、磐安)为例对同一省份内不同地区的喜树果实中喜树碱及 10-羟基喜树碱做了研究分析。结果表明,杭州、金华、磐安喜树果实中喜树碱质量分数分别为 0.158 1%、0.165 2%、0.140 4%,3 者差异不显著。杭州、金华、磐安喜树果实中 10-羟基喜树碱质量分数分别为 0.028 9%、0.018 6%、0.117 4%,3 者差异不显著。

2.3 新鲜喜树果实与放置一年喜树果实喜树碱及 10-羟基喜树碱:取 2002 年和 2003 年广西、湖南、浙江(杭州)喜树果实各 1 份,比较新鲜与放置一年的喜树果实中喜树碱及 10-羟基喜树碱的差异。结果表明,广西、湖南新鲜喜树果实与放置一年喜树果实喜树碱差异不显著;而浙江(杭州)新鲜喜树果实与放置一年喜树果实喜树碱差异极显著 ($P < 0.01$)。广西、湖南新鲜喜树果实与放置一年喜树果实 10-羟基喜树碱差异不显著。而浙江(杭州)新鲜喜树果实与放置一年喜树果实 10-羟基喜树碱差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.4 果皮及种子中喜树碱及 10-羟基喜树碱:果实是众多木本药用植物的主要药用部位,它由果皮和种

子共同组成。以四川产喜树果实为对象将喜树果实的果皮和种子分离,分别测定了它们的喜树碱和 10-羟基喜树碱。结果表明,种子中的喜树碱质量分数为 0.253 8%,而果皮中仅为 0.028 5%,两者差异显著 ($P < 0.01$)。种子中的 10-羟基喜树碱质量分数为 0.057 4%,果皮中为 0.043 0%,两者差异不显著。

3 讨论

药用植物中某种次生代谢产物的高低与多种环境因素有关,喜树作为药用植物其生物碱的量也同样受到环境因素的影响^[6,7]。通过张玉红等^[8]和本次实验研究表明,不同地理种群的喜树果实中,喜树碱和 10-羟基喜树碱差异较大;由于材料采集的年份、地区不同,本研究所收集的各地喜树果实中喜树碱与张玉红等人的实验结果不尽相同,但均认为不同地理种群的喜树果实中喜树碱和 10-羟基喜树碱差异较大。这表明海拔、气候、土壤等因素对喜树中生物碱的积累的确存在影响。

通过对同一省份不同地区的喜树果实中喜树碱和 10-羟基喜树碱进行研究分析表明其差异不明显,即小范围内各种因素对喜树果实中喜树碱及 10-羟基喜树碱影响不大。对喜树碱及 10-羟基喜树碱含量的综合分析认为四川喜树果实中喜树碱及 10-羟基喜树碱均较高,可以作为喜树及喜树碱产业化的供选地理种源。

本研究还发现,部分产地新鲜与放置一年喜树果实中喜树碱和 10-羟基喜树碱差异不明显;而部分产地新鲜与放置一年喜树果实中喜树碱和 10-羟基喜树碱差异明显。出现这一结果的原因可能有两个:一是不同年份的气候因素及外界刺激对喜树果实中次生代谢产物积累的影响;二是喜树果实中的喜树碱和 10-羟基喜树碱在放置过程中有可能分解。所以,在提取时为了得到更多的抗癌活性物质应当即采即提。

另外,对喜树果皮和种子中喜树碱和 10-羟基喜树碱进行分析,发现喜树碱主要存在于喜树种子中,而 10-羟基喜树碱在喜树果皮和种子中的含量

相当。

References:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Acadimiae Sinicae Edita. *Flora Republicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus 75. Beijing: Science Press, 1982.
- [2] Sakato K, Misawa M. Effects of chemical and physical conditions on growth of *Camptotheca acuminata* cell cultures [J]. *Agric Biol Chem*, 1974, 38: 491-497.
- [3] Wall M E, Wani M C, Cooke C E, et al. Plant antitumor agents, the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukaemia and tumourinhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 88: 3888-3890.
- [4] Hisang Y H, Herizberg R. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260 (27): 14873.

- [5] Li S Y, Adair K T. *Camptotheca acuminata* Decaisne, XI SHU, a promising antitumor and antiviral tree for the 21st century [A]. Hen M. *Rockwell Monograph* [M]. Nacogdoches Texas; The Tucker Center College of Forestry, Stephen F. Austin State University Nacogdoches TX, 1994.
- [6] Zhang L, Ren L J, Li K M. Comparison of the content of chebulinic acid in *Phyllanthus urinaria* in different areas and seasons [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (2): 157-159.
- [7] Zhang K J, Wang Y Q, Ma X H, et al. A study on ecology of metabolites of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *Sci Silvae Sin* (林业科学), 1999, 35 (6): 28-34.
- [8] Zhang Y H. The geographical variation and seasonal changes of camptothecin in fruits of *Camptotheca acuminata* [J]. *J Northeast Forest Univ* (东北林业大学学报), 2002, 30 (6): 44-46.

RP-HPLC 法测定墓头回中的齐墩果酸

曹艳萍¹, 李翠芹^{2*}

(1. 榆林学院 化学系, 陕西 榆林 719000; 2. 西安交通大学药学院, 陕西 西安 710061)

墓头回别名箭头风、臭罐子等, 系败酱科败酱属植物异叶败酱 *Patrinia heterophylla* Bunge 或糙叶败酱 *P. scabra* Bunge, 分布于陕西、河南、河北、山西等地。根及全草入药^[1]。有消肿排脓、祛瘀止痛的功效, 临床上用于治疗急性阑尾炎初起、瘰疬、无名肿痛、宫颈糜烂、跌打损伤、骨折等症^[2]。现代药理研究表明, 该植物对体内、外肿瘤癌细胞有强大的杀伤作用^[3]。对该植物的生药学研究和化学成分研究表明, 有效成分主要是以齐墩果酸苷元和常春藤苷元组成的三萜皂苷^[4]。齐墩果酸具有降低谷丙转氨酶, 促进细胞再生, 防止肝硬化, 抗炎和强心作用, 是治疗肝炎的有效成分^[5]。已有文献报道, 用比色法和薄层扫描法^[6-8]测定齐墩果酸。但用 RP-HPLC 测定墓头回中齐墩果酸未见报道, 本实验建立了用 RP-HPLC 法测定墓头回中齐墩果酸的方法, 并对 5 种不同产地墓头回植物中齐墩果酸进行了测定, 为墓头回药材的质量控制及合理使用提供了依据。

1 仪器、试剂与药品

日本岛津高效液相色谱仪(包括 Lc-10 ATvp 泵、SPD-10AvP 紫外检测器和 SPD-M10Avp 二极管阵列检测器), 7725 型手动进样阀(美国 Rneodyne 公司), ANASTAR 色谱工作站(奥泰科

技术有限公司), KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 齐墩果酸对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 0709-9803), 甲醇为色谱纯, 实验用水均为二次蒸馏水, 墓头回药材购于各地药店或直接从产地收集, 均由西安交通大学药学院牛晓峰教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Kromail ODS 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 0.5 μm); 流动相为甲醇-0.05% 冰醋酸水溶液(88:12); 体积流量为 1.00 mL/min; 柱温为室温(26 °C); 检测波长为 225 nm; 进样量 20 μL; 理论板数按齐墩果酸峰面积计算应不低于 2 000。在该色谱条件下齐墩果酸的保留时间是 11.3 min。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的齐墩果酸对照品 50.0 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇 15 mL 超声处理 5 min, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀得质量浓度为 2 mg/mL 对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的墓头回粉末(100 目) 1 g 于 150 mL 三角瓶中, 加入 10% 硫酸 30 mL, 沸水浴中水解 4 h, 放冷后滤过, 滤渣用水洗至中性, 45 °C 烘干, 精密加入氯仿 50 mL, 超声提取 50 min, 补足损失质量, 滤过, 精密量取续

收稿日期: 2004-07-17

作者简介: 曹艳萍(1958—), 女, 陕西榆林人, 副教授, 主要从事药物分析和有机化学研究。

Tel: (0912) 3891144 E-mail: lcq16@mailst.xjtu.edu.cn

* 通讯作者 Tel: (029) 82655142 Fax: (029) 82655451