

荧光分析法测定喜树果药材中的喜树碱

王立屏^{1,2}, 魏永巨^{1*}

(1. 河北师范大学化学与材料科学学院, 河北 石家庄 050024; 2. 河北化工医药职业技术学院, 河北 石家庄 050026)

摘要: 研究了喜树果药材、喜树碱和 10-羟基喜树碱的三维荧光图谱和薄层荧光色谱, 建立了测定喜树果药材中喜树碱含量的荧光分析方法。在三维荧光图谱中, 喜树碱呈现 3 个荧光峰, 激发波长 λ_{ex} 分别为 215、255 和 365 nm, 发射波长 λ_{em} 均为 430 nm; 10-羟基喜树碱呈现 4 个荧光峰, λ_{ex} 分别为 220、265、325 和 375 nm, λ_{em} 均为 555 nm。喜树碱的荧光比 10-羟基喜树碱的荧光强。三维荧光图谱对照和薄层荧光色谱分析表明, 喜树果药材中的荧光成分主要是喜树碱, 10-羟基喜树碱和其他共存组分对喜树碱的荧光基本无干扰。在 pH 3.0~6.7 条件下, 喜树果提取液有稳定的强荧光。以甲醇为溶剂制备喜树果药材提取液, 用水适当稀释后于 365/430 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) 波长下测定喜树碱的含量。在 0.00235~0.235 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 荧光强度与喜树碱浓度之间呈线性关系, 回归方程为 $I_F = 9 + 30.844 c$, 相关系数 $r = 0.999$ ($n = 9$)。将本法用于喜树果样品中喜树碱含量的测定, 结果为 0.127%, 加标回收率为 102%。用薄层荧光扫描法验证了本法的可靠性。结果表明, 本法可用于喜树果药材的质量检验。

关键词: 喜树果; 喜树碱; 10-羟基喜树碱; 荧光分析法; 三维荧光图谱; 薄层荧光色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2012) 10-1370-05

Fluorimetric analysis of camptothecin in Chinese herbal medicine common *Camptotheca* fruit

WANG Li-ping^{1,2}, WEI Yong-ju^{1*}

(1. College of Chemistry and Material Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China;

2. Hebei Chemical & Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China)

Abstract: Three-dimensional (3D) fluorescence spectra and thin layer fluorescence chromatogram of common *Camptotheca* fruit (CCF) crude drug, camptothecin (CPT) and 10-hydroxycamptothecin (HCPT) have been studied, and a novel fluorimetric method for determination of CPT in CCF crude drug has been established. In 3D fluorescence spectra, CPT presented 3 fluorescence peaks with excitation wavelengths λ_{ex} of 215, 255 and 365 nm, separately, and all peaks with emission wavelength λ_{em} of 430 nm. HCPT presented 4 fluorescence peaks with λ_{ex} of 220, 265, 325 and 375 nm, separately, and all peaks with λ_{em} of 555 nm. The fluorescence of CPT is much stronger than that of HCPT. Comparison of 3D fluorescence spectra and analysis of thin layer fluorescence chromatogram revealed that the main fluorescent component of CCF is CPT. HCPT and other components basically do not interfere with the fluorescence of CPT. Under the condition of pH 3.0~6.7, CCF aqueous solution can produce strong and steady fluorescence. Using methanol as solvent, the extracting solution of CCF was prepared, and diluted properly with water, then measured fluorescence intensity at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/430$ nm to determine the content of CPT. A linear calibration curve covered the concentration range 0.002 35~0.235 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The regression equation was $I_F = 9 + 30.844 c$, with correlation coefficient $r = 0.999$ ($n = 9$). The method has been applied to the analysis of CPT in a CCF sample, with a result of 0.127% and a spiked recovery rate of 102%. The reliability of the method has been verified by a thin layer chromatography-fluorescence

收稿日期: 2012-07-01; 修回日期: 2012-08-20。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20675025, 20975029, 81173496).

*通讯作者 Tel: 86-311-80787400, E-mail: weiyju@126.com

scanning method. Experimental results demonstrated that this method can be used for quality evaluation of CCF crude drug.

Key words: common *Camptotheca* fruit; camptothecin; 10-hydroxycamptothecin; fluorimetric analysis; 3D fluorescence spectrum; thin layer fluorescence chromatogram

喜树果 (common *Camptotheca* fruit, CCF) 是我国特有的珙桐科植物喜树的干燥果实, 具有抗癌、散结、破血化瘀等功效。喜树果中的主要药效成分是喜树碱 (camptothecin, CPT)。1966 年, 美国化学家 Wall 等^[1]首先从喜树中提取出喜树碱, 并用 X 线衍射法测定了结构。喜树碱类化合物具有抗肿瘤活性, 因而被认为是有希望的抗癌药物而得到持续多年的研究^[2, 3]。我国科研人员^[4]从 1969 年开始从喜树根中提取分离喜树碱, 并对其药理作用进行了研究, 证明喜树碱对胃癌、肠癌、膀胱癌和白血病等都有较好的疗效。1977 年, 徐任生等^[5]报道了从喜树果中分离得到喜树碱与 10-羟基喜树碱 (10-hydroxycamptothecin, HCPT) 以及其他微量喜树碱类化合物, 并且发现 HCPT 对肿瘤有更明显的抑制作用, 且毒性较小, 经过大实验后用于临床。近年来, 国内外关于喜树碱类化合物的抗癌作用仍有一些研究报道^[6-8]。

CPT 和 HCPT 属于喹啉类生物碱 (图 1), 分子中的喹啉环具有共轭刚性结构, 因而能产生荧光。虽然早已观察到 CPT 和 HCPT 溶液具有荧光^[4, 5], 然而, 喜树果药材中 CPT 的荧光分析方法未见报道。本实验中观察到喜树果药材提取液具有特征的三维荧光图谱^[9], 经与 CPT 和 HCPT 对照品的三维荧光图谱对比并用薄层荧光扫描法检验, 证实产生特征荧光的成分是 CPT。喜树果药材中 HCPT 的含量很低、荧光较弱, 且与 CPT 的荧光波长差异很大, 对 CPT 的荧光测定无干扰, 其他共存组分对 CPT 的荧光测定亦无干扰。据此, 本文制定了测定喜树果药材中 CPT 含量的荧光分析方法, 可在不经分离的情况下测定喜树果药材中的 CPT。与目前常用的高效液相色谱法^[10-12]和薄层扫描法^[13]相比, 荧光分析法具有灵敏度高、分析速度快、手续简便和环境友好等优点^[14], 可应用于喜树果药材的质量检验, 也可考虑用于其

他生物医学样品中 CPT 的分析测试。

材料与方法

仪器与试药 F-4600 型荧光分光光度计 (Hitachi), 配备 150 W 氙灯, 1 cm 荧光池, 选择激发和发射狭缝 (slit) 均为 5.0 nm, 光电倍增管负高压 (PMT) 为 700 V; CS-9301PC 型薄层扫描仪 (Shimadzu), 配备氘灯、碘钨灯和氘灯; 硅胶 H-0.5% CMC-Na 板 (10 cm×20 cm, 青岛海洋化工厂); 868 型 pH/ISE 测试仪 (Orion); 十万分之一电子天平 (Shimadzu)。

CPT (中国食品药品检定研究院, 批号 100532-200401) 对照溶液: 用甲醇配制得到 101 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液, 置于冰箱中保存, 用时稀释; HCPT (中国食品药品检定研究院, 批号 100526-200301) 对照溶液: 用甲醇配制得到 99.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液, 置于冰箱中保存, 用前稀释; 喜树果药材, 购于河北安国冷背医药药材公司。

样品提取液制备 本文采用甲醇为溶剂, 参照文献^[13]的方法制备样品提取液。称取药材粉末 (过 60 目筛) 约 0.1 g, 精密加入甲醇 50 mL, 称重, 于 60 °C 恒温水浴中加热 1 h, 取出, 冷却, 补足重量, 取上清液为供试品溶液, 浓度记为 2.016 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (每 mL 提取液相当于 2.016 mg 药材)。使用时适当稀释。

三维荧光光谱 分别将喜树果提取液、CPT 溶液和 HCPT 溶液以水定容于 10 mL 量瓶中, 摆匀后扫描三维荧光光谱。

pH 对荧光的影响 在一系列 10 mL 量瓶中, 各加入一定量的喜树果提取液, 分别用 HCl 和 NaOH 溶液适当调节 pH, 以水定容, 摆匀, 扫描二维荧光光谱, 再测定各溶液的 pH。

薄层荧光扫描 在硅胶板上用定量毛细管点样,

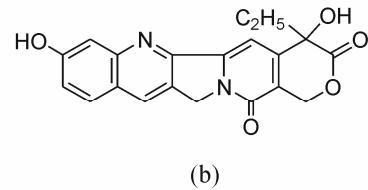
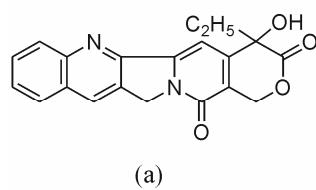


Figure 1 Molecular structure of camptothecin (CPT, a) and 10-hydroxycamptothecin (HCPT, b)

以氯仿-丙酮 (7:3) 为展开剂, 上行展开, 展距 20 cm, 扫描薄层荧光色谱图。

结果

1 喜树果、CPT 和 HCPT 的三维荧光光谱

图 2a、b 和 c 分别为喜树果提取液、CPT 和 HCPT 水溶液的三维荧光等高线光谱。图中纵坐标为 λ_{ex} , 横坐标为 λ_{em} , 指纹状等高线表示荧光强度, 荧光峰位于等高线中心, 在 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 处出现瑞利散射, 在 $2\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 处出现二级散射。

由图 2 可见, 喜树果提取液的三维荧光图谱中出现 4 个明显的荧光峰, 图中左侧 (短波处) 的 2 个荧光峰位分别位于 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 225/340$ nm 和 $275/340$ nm; 另 2 个荧光峰分别位于 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 255/430$ nm 和 $365/430$ nm。此外, 还有 1 个荧光峰位于 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 215/430$ nm, 此峰由于与二级散射重叠而不明显。根据荧光光谱的一般规律, 推测短波处的 2 个荧光峰归属于某种共轭程度较小的取代苯类化合物, 而发射波长位于 430 nm 的 3 个荧光峰归属于共轭程度较高的另一种化合物。与图 2b 对比, 可见图 2a 中发射波长位于 430 nm 的 3 个荧光峰与 CPT 的荧光峰吻合, 表明喜树果中的这种化合物是 CPT。

由图 2c 可见, HCPT 的三维荧光图谱中出现 4 个荧光峰, 分别位于 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 220/555$ nm、 $265/555$ nm、 $325/555$ nm 和 $375/555$ nm, 4 个荧光峰的激发波长不同, 但发射波长相同。将图 2c 与图 2b 相比, 可见 HCPT 与 CPT 的发射波长相差 125 nm; 两图中的荧光强度相近, 但 HCPT 的浓度比 CPT 的浓度高近 10 倍, 说明 HCPT 的荧光弱得多。将图 2c 与图 2a 相比, 可知喜树果提取液中 HCPT 的含量低至不呈现荧光。由图 2a 可知, 在测定喜树果中 CPT 时, 若将测量波长选择在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/430$ nm, 则 HCPT 不干扰, 发射波长位于 340 nm 的共存荧光组分也不干扰。

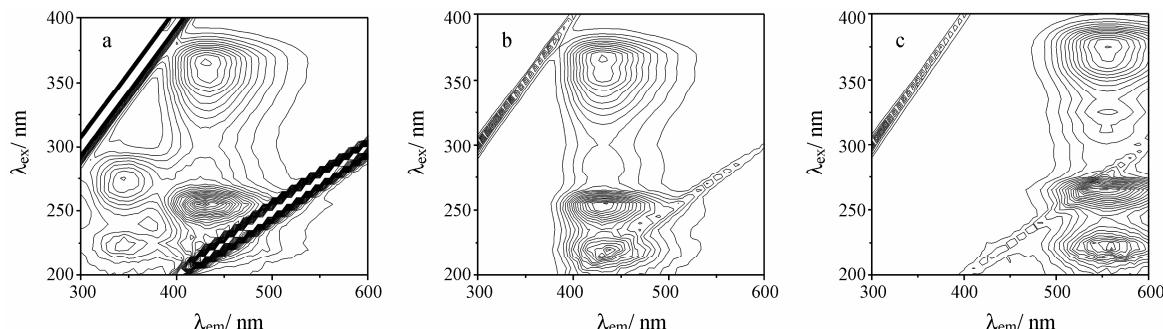


Figure 2 Three-dimensional fluorescence spectra of common *Camptotheca* fruit (CCF, a), CPT (b) and HCPT (c) aqueous solutions. a: $c_{\text{CCF}}: 100.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5% methanol; b: $c_{\text{CPT}}: 0.101 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 2% methanol; c: $c_{\text{HCPT}}: 0.992 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1% methanol. Contour interval: 300

2 喜树果中荧光成分的薄层色谱法

由上述分析可知, 选择适当的荧光测量波长, 可以实现喜树果中喜树碱的选择性测定。但是, 为验证图 2a 中发射波长为 430 nm 的荧光峰除了喜树碱之外是否还包含其他成分, 采用薄层荧光扫描法考察了喜树果中的其他荧光成分, 所得薄层荧光色谱图如图 3。

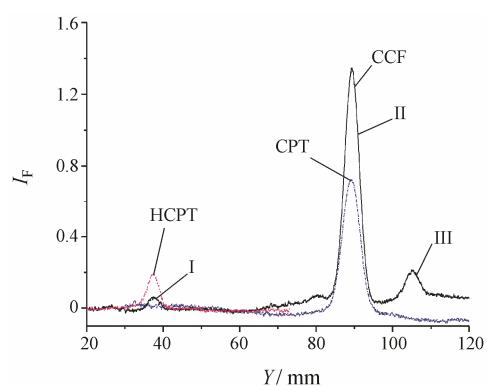


Figure 3 Thin layer fluorescence chromatogram of CCF, CPT and HCPT. $\lambda_{\text{ex}}: 350$ nm; light filter: 400 nm; beam size: $0.4 \text{ mm} \times 10.0 \text{ mm}$. I: HCPT; II: CPT; III: Unknown

由图 3 可见, 喜树果药材的薄层荧光色谱图中出现了 3 个色谱峰, 对应于 3 个荧光斑点, 其中色谱峰 I 非常弱, 与对照品比较后确认归属于 HCPT; 色谱峰 II 很强, 是喜树果药材中的主要荧光组分, 与对照品比较后, 确认归属于 CPT; 色谱峰 III 是未知荧光组分。将薄层板上的斑点 II、III 和溶剂前沿及其他位置的硅胶分别以适量甲醇-水溶解, 扫描滤液的三维荧光图谱, 得图 4。

由图 4a 可见, 斑点 II 的荧光图谱与 CPT 的荧光图谱完全一致, 证明属 CPT。图 4b 表明斑点 III 虽然在硅胶板上有荧光, 但溶解后基本无荧光, 此组分不会对喜树碱的测定产生干扰。图 4c 表明薄层板溶剂前沿及其他部位含有荧光物质, 但与 CPT 的荧

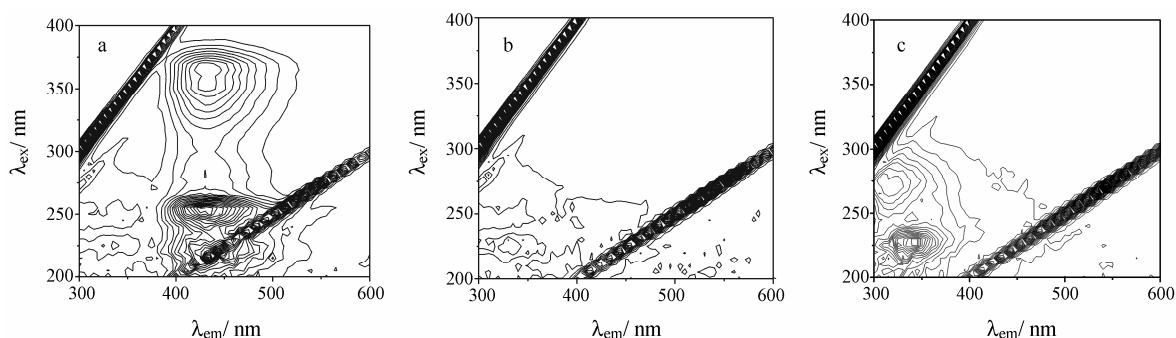


Figure 4 Three-dimensional fluorescence spectra of leaching solutions of spot II (a), spot III (b) and solvent front (c) on thin-layer plate. Contour interval: 100

光差别很大, 在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/430 \text{ nm}$ 附近无荧光。结果表明, 喜树果中的共存组分对 CPT 的荧光测定无干扰。

3 pH 对荧光的影响

喜树碱分子结构中存在可以质子化的氮原子, 所以, pH 对喜树碱的荧光光谱和荧光强度有重要影响。为了选择合适的 pH, 考察了在不同 pH 下喜树果提取液的二维荧光光谱和荧光强度随 pH 的变化, 结果如图 5 所示。

由图 5a、b 可见, 喜树果提取液的荧光强度随 pH 的改变而变化, 但光谱形状变化不大, 只是在碱性条件下, 荧光激发和发射波长略有红移。由图 5c 可见, 在 pH 3.0~6.7, 荧光强度达到最大且基本不变, 因此, 本实验选择在近中性条件下进行。用二次去离子水对喜树果甲醇提取液进行适当稀释后直接测定, 无需另加 pH 缓冲溶液。

4 甲醇对荧光的影响

为了验证不同量的甲醇是否可能对 CPT 的荧光强度产生影响, 测定了相同浓度的 CPT 在不同体积分数的甲醇-水溶液中的荧光强度, 结果表明, 当甲醇体积分数在 5%~60% 时, 水溶液中甲醇不会对 CPT 荧光强度产生明显影响。

5 荧光强度的稳定性与测量的重复性

移取一定量的 CPT 溶液, 置于 10 mL 量瓶中, 以水定容, 每隔 10 min 测量一次荧光强度。结果表明在 3 h 内, 喜树碱荧光强度稳定, 相对标准偏差 RSD 为 0.45%。测量 8 份相同浓度的 CPT 溶液的荧光强度, 结果 RSD 为 0.52%, 表明重复性良好。

6 标准曲线法测定喜树果中喜树碱的含量

配制一系列不同浓度的 CPT 溶液并测量荧光强度, 绘制标准曲线, 在 $0.002 \sim 0.235 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 回归方程为: $I_F = 9 + 30844 c, r = 0.999 (n = 9)$ 。取不同体积的喜树果提取液, 分置于 10 mL 量瓶中, 以水定容并测量荧光强度。由标准曲线计算喜树果中 CPT 含量, 结果见表 1。

Table 1 Determination of CPT in CCF by standard curve method. I_F : Fluorescence intensity

No.	CCF / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	I_F	CPT / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	CPT content /%	Average content /%	RSD /%
1	79.20	3 156	0.102 0	0.128 8		
2	90.80	3 559	0.115 1	0.126 8	0.127 0	1.6
3	101.0	3 998	0.129 3	0.128 1		
4	110.0	4 224	0.136 7	0.124 2		

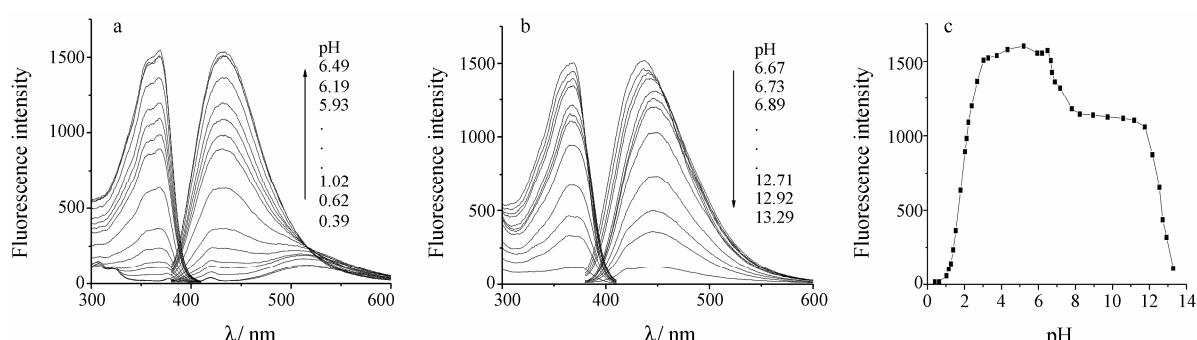


Figure 5 Fluorescence spectra of CCF at different pHs (a, b) and influence of pH on fluorescence intensity (c). $CCF: 40.32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}: 365/430 \text{ nm}$

7 标准加入法

取相同体积的喜树果提取液若干份，分置于10 mL量瓶中，加入不同量的CPT溶液，以水定容，测量荧光强度，绘制标准加入曲线，回归方程为： $I_F = 1601 + 31141 c (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$, $r = 0.999$ ($n = 6$)。用外推法，算得喜树果样品中喜树碱的含量为0.127 3%，与标准曲线法测定结果一致。标准加入法实验中，5个实验点加标回收率的平均值为102%。

8 方法准确性的验证

用薄层荧光扫描法检验了上述荧光分析法的准确性，测得同一喜树果样品中喜树碱的含量为0.122%^[15]，与本文测定结果基本一致。

结论

喜树果药材中的荧光成分主要是CPT，其最大荧光激发和发射波长出现在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/430 \text{ nm}$ 。HCPT在喜树果中的含量很低、荧光较弱，且其荧光发射波长与CPT的相差125 nm，不干扰CPT的测定。喜树果中其他共存组分的荧光激发、发射波长都与CPT相差较远，均不干扰CPT的测定。喜树果药材提取液制备可以用甲醇为提取溶剂，60 °C水浴1 h，取上清液以水适当稀释后直接测定，无需加入pH缓冲溶液或其他辅助试剂，样品用量仅需0.1 g。本法准确、简便、灵敏、耐用、环境友好，可用于喜树果药材中CPT的定量分析。

References

- [1] Wall ME, Wani MC, Cook CE, et al. Antitumor agent I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. J Am Chem Soc, 1966, 88: 3888–3890.
- [2] Wani MC, Wall ME. Plant antitumor agents. II. Structure of two new alkaloids from *Camptotheca acuminata* [J]. J Org Chem, 1969, 34: 1364–1367.
- [3] Pan XD, Wang CY. Current status of camptothecin derivatives as natural antitumor agents [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2003, 38: 715–720.
- [4] Lin LZ, Zhao ZY, Xu RS. Chemical constituents of the anticancer plant *Camptotheca acuminata* Decne I. Chemical constituents of the roots of *Camptotheca acuminata* Decne [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 1977, 35: 227–231.
- [5] Xu RS, Zhao ZY, Lin LZ, et al. Chemical constituents of the anticancer plant *Camptotheca acuminata* Decne II. Chemical constituents of the fruits of *Camptotheca acuminata* Decne [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 1977, 35: 193–200.
- [6] Li DZ, Wang CY, Pan XD, et al. Synthesis and antitumor activity of A-ring modified hexacyclic analogues of camptothecine [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2005, 40: 241–247.
- [7] Ping YH, Lee HC, Lee JY, et al. Anticancer effects of low-dose 10-hydroxycamptothecin in human colon cancer [J]. Oncol Rep, 2006, 15: 1273–1279.
- [8] Lin J, Wang X. The synergistic antitumor effects of berberine α -hydroxy- β -decanoylethyl sulfonate with hydroxycamptothecine and its effect on topoisomerase [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2011, 46: 390–394.
- [9] Wang LP. Fluorometric Analysis of Active Components of Chinese Medicine Common *Camptotheca* Fruit, *Fructus Aurantii Immaturus* and Establishment of 3D Fluorescence Fingerprint of *Fructus Arctii* (中药喜树果、枳实活性成分的荧光分析及牛蒡子三维荧光指纹图谱的建立) [D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2011.
- [10] Zu YG, Zhao CJ, Fu YJ, et al. Quantitative determination of camptothecin and hydroxycamptothecin in seeds of *Camptotheca acuminata* Decne by wavelength detection in high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2004, 32: 1441–1444.
- [11] Liu WZ, Qin HY, Suo ZR. HPLC analysis of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in fruit of *Camptotheca acuminata* Decne [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2005, 25: 168–170.
- [12] Wang LL, Ma PQ, Liu WZ. HPLC determination of camptothecin in young shoots of *Camptotheca acuminata* Decne [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2008, 28: 1535–1537.
- [13] Zhou FL, Huang RS, Su Q, et al. Determination of camptothecin in *Camptotheca acuminata* fruit from different habitats by TLCS [J]. West Chin J Pharm Sci (华西药学杂志), 2008, 23: 610–612.
- [14] Yang F, Liu CG, Wei YJ. Fluorimetric analysis of paeonol in Chinese herbal medicine *Cynanchi Paniculati Radix* by aluminum ion sensitized fluorescence [J]. Acta Pharm Sin B, 2012, 2: 294–299.
- [15] Wang LP, Wei YJ. Determination of camptothecine and 10-hydroxycamptothecine in common *Camptotheca* fruit by TLC-fluorescence scanning method [J]. J Instrum Anal (分析测试学报), 2012, in press.