

河南地区红豆杉中紫杉烷类化合物含量分析

徐博涵¹, 董玉山², 熊德元^{1*}

(1. 广西大学 化学化工学院, 广西 南宁 530004; 2. 河南省林业科学研究院, 河南 郑州 450002)

摘要: 采用高效液相色谱法测定河南地区红豆杉不同产地、品种、部位紫杉烷类化合物含量, 为河南省红豆杉人工林培育奠定基础。结果表明: 信阳与开封栽植的加拿大曼地亚红豆杉中, 紫杉醇含量无显著差异; 10-DAB 在信阳加拿大曼地亚红豆杉针叶中含量较高, 为 170.37 $\mu\text{g/g}$; 巴卡亭Ⅲ在信阳加拿大曼地亚红豆杉枝中含量较高, 为 60.95 $\mu\text{g/g}$ 。开封种植的 5 种红豆杉中, 东北红豆杉紫杉烷类化合物总含量较高, 针叶中为 456.61 $\mu\text{g/g}$, 枝中为 165.43 $\mu\text{g/g}$ 。可在信阳推广栽培加拿大曼地亚红豆杉, 在开封建立东北红豆杉枝叶药用采集基地, 综合利用可再生资源。

关键词: 河南; 紫杉烷; 红豆杉属; HPLC

中图分类号: S791 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)05-0142-04

Analysis of Taxanes Content of *Taxus* in Henan Region

XU Bo-han¹, DONG Yu-shan², XIONG De-yuan^{1*}

(1. School of Chemistry & Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Henan Academy of Forestry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to lay a foundation for the plantation cultivation of *Taxus* in Henan province, the content of taxanes in *Taxus* from different regions, in different species of *Taxus* and in different parts of *Taxus* was determined by HPLC. The results showed that the content of taxol in *Taxus madia* had no significant difference between Kaifeng and Xinyang. The content of 10-deacetylbaicatin Ⅲ in the needles was higher in Xinyang, which was 170.37 $\mu\text{g/g}$; baicatin Ⅲ content in the branches was higher with 60.95 $\mu\text{g/g}$ in Xinyang. The total content of taxanes was higher in *Taxus cuspidata* in Kaifeng, which was 456.61 $\mu\text{g/g}$ in the needles and 165.43 $\mu\text{g/g}$ in the branches. *Taxus madia* can be cultivated in Xinyang, and *Taxus cuspidata* of which branches and leaves can be used as medication can be cultivated in Kaifeng so as to comprehensively utilize the renewable resources.

Key words: Henan; taxanes; *Taxus*; HPLC

红豆杉 [*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.] 属红豆杉科 (Taxaceae) 红豆杉属 (*Taxus*), 属濒危珍稀物种, 全球有 11 种, 变种较多。我国有中国红豆杉 (*Taxus chinensis* Rehd.)、东北红豆杉 (*T. cuspidata* Sieb. et Zucc.)、云南红豆杉 (*T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu)、西藏红豆杉 (*T. wallichiana* Zucc.) 4

个种和南方红豆杉 (*T. chinensis* var. *mairei* Cheng et L. K. Fu) 1 个变种^[1]。1971 年, Wani 等^[2]从短叶红豆杉树皮中分离得到结构新颖的二萜类化合物紫杉醇, 因其具有独特强抗癌活性而备受关注。巴卡亭Ⅲ和 10-DAB 是紫杉醇的同系物, 自身有一定的抗癌活性, 也是半合成紫杉醇的重要原料。从红

收稿日期: 2013-11-25

基金项目: 河南省重点科技攻关计划项目 (122102110080)

作者简介: 徐博涵 (1987-), 女, 河南周口人, 在读硕士研究生, 研究方向: 天然产物的研究与开发。

E-mail: bohan_xu2012@163.com

* 通讯作者: 熊德元 (1965-), 男, 广西兴安人, 教授, 博士, 主要从事天然产物提取及有机精细化学品合成方面的研究。

E-mail: dyxiong@gxu.edu.cn

豆杉枝叶中提取紫杉烷类化合物,利用其枝叶可再生性,为解决红豆杉资源稀缺问题开辟途径。

开发人工种植红豆杉林势在必行,合理高效利用培育基地、选择优势种源至关重要。紫杉烷类化合物为红豆杉属植物中的次生代谢产物,存在种属、地域、部位等特异性^[3],不能直接照搬其他地区红豆杉的研究结果来指导研究地区的资源培育与利用。本研究采用 HPLC 法考察了加拿大曼地亚红豆杉中紫杉烷类化合物在开封、信阳地区间的含量差异及开封地区不同品种红豆杉中紫杉烷类化合物含量的差异,为河南省境内红豆杉合理引种栽培提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 研究区概况

开封市地处豫东平原边缘,黄河下游冲击扇南面,地势平坦,以潮土为主,成土母质为黄河冲积物,为温带大陆性季风气候^[4],四季分明,光热、水资源充足,年平均气温 14.3℃,年平均降水量为 635.3 mm;信阳鸡公山自然保护区位于豫鄂两省交界处、北亚热带向暖温带过渡带上,是我国真正的南北气候分界线,具有典型的季风气候和山地气候特征,年平均气温 15.2℃,年平均降水量 1 118.7 mm,属北亚热带温暖湿润气候,以黄棕壤土为主^[5]。

1.2 样品材料的采集

试验材料为 5 个红豆杉品种(树龄约 15 a)的 1~2 年生枝和针叶,于 2012 年 11 月取样。枝叶冲洗数遍,室内阴干,枝、针叶分开粉碎备用,样品来源见表 1。

表 1 样品来源

采集地点	品种
开封市(河南上禾红豆杉科技开发有限公司)	加拿大曼地亚红豆杉
	美国曼地亚红豆杉绿星
	美国曼地亚红豆杉紫科
	东北红豆杉
信阳鸡公山	中国红豆杉
	加拿大曼地亚红豆杉

1.3 试剂与仪器

10-DAB、巴卡亭Ⅲ、紫杉醇购自上海金和生物技术有限公司,含量≥98%;Waters600E 高效液相色谱分析仪、Waters Caplc 2487 双λ吸光度检测器均购自沃特世科技(上海)有限公司。

1.4 方法

1.4.1 样品制备 精确称量粉碎后样品 10 g,置于

250 mL 具塞三角瓶中,首次加入 100 mL 甲醇,超声浸提 1 h,取上清液,复加 2 次甲醇,每次 50 mL,超声浸提 30 min,合并 3 次滤液,抽滤后于 50℃减压浓缩。浓缩膏用适量甲醇溶解,置于 250 mL 分液漏斗中,加水适量,石油醚、氯仿各萃取 3 次,50 mL/次。合并氯仿溶液,于 50℃减压浓缩至干,用色谱级甲醇溶解定容至 25 mL,过 0.22 μm 滤膜,用于 HPLC 分析^[6-7]。

1.4.2 对照品溶液的制备 准确称取 3 种对照品各 25 mg,用色谱级甲醇溶解定容于 25 mL 容量瓶中,得到 1 mg/mL 标准母液。精确吸取标准母液 10、30、50、100、200、500、1 000、1 500 μL 于 10 mL 容量瓶并定容至刻度,配成 1、3、5、10、20、50、100、150 μg/mL 的标准溶液,0.22 μm 滤膜过滤,用于绘制标准曲线。

1.4.3 色谱条件 色谱柱:Eclipse Plus Phenyl-Hexyl(4.6 mm×250 mm,5 μm);柱温:25℃;检测波长:227 nm;流动相:A 为 0.1%乙酸水溶液,B 为 0.1%乙酸乙腈溶液;洗脱方式:梯度洗脱(0~50 min,30%~60% B);流速:1 mL/min;进样量:20 μL。

1.5 数据处理

利用 SPSS 17.0 及 Excel 2003 对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 3 种紫杉烷类化合物标准曲线

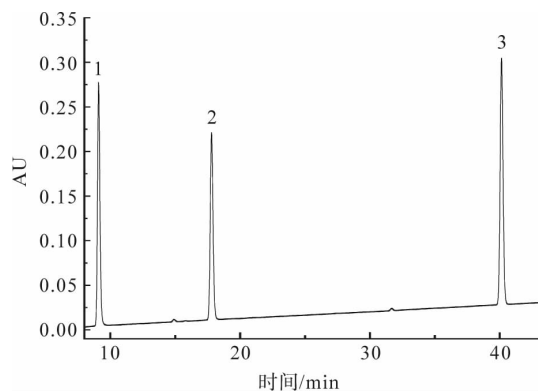
将 1.4.2 配制的标准溶液按色谱条件依次进样,以对照品质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行回归分析,结果见表 2。10-DAB、巴卡亭Ⅲ、紫杉醇在 1~150 μg/mL 线性关系良好。

表 2 3 种紫杉烷类化合物标准曲线

紫杉烷类化合物	回归方程	R^2
10-DAB	$y_1 = 34\ 984x_1 + 11\ 934$	0.999 9
巴卡亭Ⅲ	$y_2 = 31\ 590x_2 + 1\ 390.8$	0.999 8
紫杉醇	$y_3 = 43\ 319x_3 + 12\ 329$	0.999 9

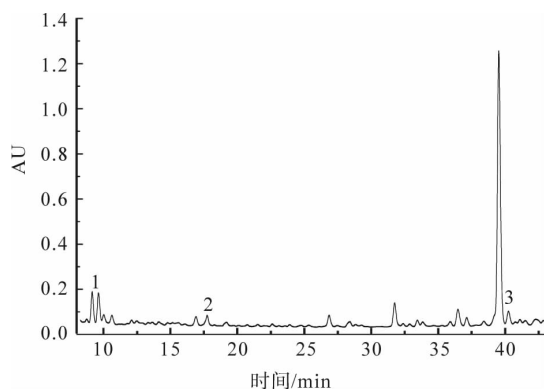
2.2 3 种紫杉烷类化合物测定结果

2.2.1 对照品、样品测定结果 3 种对照品色谱见图 1,样品溶液色谱见图 2。在拟定色谱条件下,3 种对照品峰型较好,样品中 3 种紫杉烷类化合物与其他物质分离效果满足定量分析要求。



1:10-DAB; 2:巴卡亭Ⅲ; 3:紫杉醇

图 1 3 种对照品色谱图



1:10-DAB; 2:巴卡亭Ⅲ; 3:紫杉醇

图 2 样品溶液色谱图

2.2.2 精密度 取 $100 \mu\text{g/mL}$ 的标准溶液进样 $20 \mu\text{L}$, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 10-DAB、巴卡亭Ⅲ、紫杉醇的 RSD 分别为 0.14% 、 0.15% 、 0.20% , 说明本测定方法精密度较好, 满足分析要求。

2.2.3 稳定性 将制备的信阳加拿大曼地亚红豆杉针叶样品于 1、2、4、8、16、24 h 进样, 测定 10-DAB、巴卡亭Ⅲ、紫杉醇的峰面积, 其 RSD 分别为 0.16% 、 0.90% 、 0.33% , 说明供试样品溶液在 24 h 内稳定性较好, 满足分析要求。

2.2.4 加标回收率 准确称取信阳加拿大曼地亚红豆杉针叶样品 10 g , 共 6 份, 分别加入 1 mg/mL 10-DAB 1.5 mL 、 1 mg/mL 巴卡亭Ⅲ 0.5 mL 、 1 mg/mL 紫杉醇 2 mL , 按 1.4.1 方法制备样品, 测定紫杉烷类化合物的峰面积。10-DAB 平均回收率为 95.50% , RSD 为 1.58% ; 巴卡亭Ⅲ 平均回收率为 97.65% , RSD 为 0.84% ; 紫杉醇平均回收率为 97.66% , RSD 为 0.88% , 满足分析要求。

2.2.5 信阳、开封两地加拿大曼地亚红豆杉紫杉烷类化合物含量比较 对试验数据进行独立样本 t 检验(表 3), 结果表明, 信阳地区针叶、枝中 10-DAB、巴卡亭Ⅲ的含量均比开封地区高, 而针叶及枝中的紫杉醇含量两地区间差异均不显著, 信阳地区针叶、枝中 3 种紫杉烷类化合物总含量均较开封地区高。

表 3 信阳、开封两地加拿大曼地亚红豆杉紫杉烷类化合物含量比较 $\mu\text{g/g}$

部位	地区	10-DAB	巴卡亭Ⅲ	紫杉醇	合计
针叶	信阳	170.37aA	55.60aA	174.43aA	400.40aA
	开封	89.57bB	38.50bB	175.50aA	303.56bA
枝	信阳	122.57aA	60.95aA	40.46aA	223.98aA
	开封	55.97bB	36.79bB	41.91aA	134.67bB

注: 同列数据后不同小、大写字母表示同一部位不同地区间差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$)。

2.2.6 开封地区不同品种红豆杉紫杉烷类化合物含量比较 对试验数据进行单因素方差分析(表 4), 结果表明, 针叶中 10-DAB 在美国曼地亚绿星中含量最高, 巴卡亭Ⅲ和紫杉醇在东北红豆杉中含量最高; 枝中 10-DAB 在美国曼地亚紫科中含量最高, 巴卡亭Ⅲ在中国红豆杉中含量最高, 紫杉醇在东北红豆杉中含量最高。针叶、枝中 3 种化合物总含量均在东北红豆杉中最高, 中国红豆杉针叶中 3 种化合物总含量最低, 枝中 3 种化合物总含量在美国曼地亚红豆杉绿星中最低。

表 4 开封地区不同品种紫杉烷类化合物含量比较 $\mu\text{g/g}$

部位	紫杉烷类化合物	加拿大曼地亚红豆杉	美国曼地亚红豆杉绿星	美国曼地亚红豆杉紫科	东北红豆杉	中国红豆杉
针叶	10-DAB	89.57cC	171.90aA	118.43bB	61.79dD	25.64eE
	巴卡亭Ⅲ	38.50bcB	30.45cBC	42.58bB	84.72aA	15.74dC
	紫杉醇	175.50bB	77.56cC	178.57bB	310.10aA	37.05dD
	合计	303.57cBC	279.91cC	339.58bB	456.61aA	78.43dD
枝	10-DAB	55.97aA	49.46bB	56.30aA	38.11cC	8.49dD
	巴卡亭Ⅲ	36.79cB	26.20dC	42.51bB	37.93bcB	64.84aA
	紫杉醇	41.91cBC	29.81dC	52.44bB	89.39aA	45.53bcB
	合计	134.67bBC	105.47cD	151.25aAB	165.43aA	118.86cCD

注: 同行不同小、大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$)。

3 结论与讨论

本试验结果表明,总体来看在信阳鸡公山地区栽植的加拿大曼地亚红豆杉紫杉烷类化合物总含量高于开封,这一结果印证了曼地亚红豆杉喜阴、在湿润和温度适中的环境下生长较好的生理特点^[8-9]。植株生理活动受光照、温度、水分、土壤等自然生态因子的直接影响,进而影响其次生代谢产物、生物量等^[10]。信阳鸡公山生态环境多样,各种林层交错分布,利于加拿大曼地亚红豆杉生长及次生代谢产物积累,适合建立经济林。建立经济林不仅对生态环境友好,而且其枝叶作为提取紫杉醇等紫杉烷类化合物的原料,能带动地方经济可持续发展,产生可观的经济效益。开封地区5种红豆杉中,东北红豆杉可作为优势种源大力推广栽培,建立红豆杉枝、叶采集基地,季节对开封地区红豆杉中紫杉烷类化合物含量的影响有待进一步考察。目前紫杉烷物质已发现多种,可作为紫杉醇前体物的三尖杉宁碱、10-脱酰基三尖杉宁碱、7-木糖紫杉醇等^[11]在植株中的含量有待进一步考察。

参考文献:

- [1] 檀丽萍,陈振峰. 中国红豆杉资源[J]. 西北林学院学报,2006,21(6):113-117.
- [2] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, *et al.* Plant anti-tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a

novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. J Am Chem Soc, 1971, 93: 2325-2327.

- [3] 常醉,周志强,夏春梅,等. 天然东北红豆杉枝中紫杉醇和三尖杉宁碱含量变化特征[J]. 北京林业大学学报, 2012, 34(2): 71-77.
- [4] 武继承,龚子同,姚健,等. 河南开封土壤养分变化特征及其持续利用途径研究[J]. 土壤通报, 2001, 32(4): 155-159.
- [5] 刘国顺,王晓云,袁玉霞,等. 鸡公山自然保护区不同林分类型土壤理化性质研究[J]. 林业资源管理, 2012(2): 102-105.
- [6] 赵俊宏,李文锋,樊燕鸽,等. RP-HPLC法测定新乡种植红豆杉树皮中的紫杉醇[J]. 河南科学, 2011, 29(3): 288-290.
- [7] 满瑞林,乔亮杰,倪网东. 曼地亚红豆杉枝条中紫杉醇的超声提取研究[J]. 化学研究与应用, 2008, 20(12): 1637-1640.
- [8] 冯巍,谈锋,谢峻. 曼地亚红豆杉研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(10): 1589-1593.
- [9] 付顺华,史小娟,苗国丽,等. 曼地亚红豆杉中紫杉醇等与产地因子的相关性[J]. 浙江农林大学学报, 2011, 28(2): 227-233.
- [10] 石鹏,赵天忠,吴颖. 自然生态因子对曼地亚红豆杉紫杉醇产量的影响综述[J]. 林业资源管理, 2009(3): 88-91.
- [11] 王昌伟,彭少麟,李鸣光,等. 红豆杉中紫杉醇及其衍生物含量影响因子研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(5): 1583-1590.