

## HPLC 法测定番荔枝科植物中番荔枝素含量

孙 兰, 余竞光\*, 李德宇, 李 进, 杨学东, 杨世林

(中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

**摘要:** 目的 建立番荔枝科植物中抗肿瘤活性成分番荔枝素的 HPLC 含量测定方法。方法 Squamostatir B (1), squamocin (2) 和 annonin VI (3) 为标准品。色谱柱: 反相  $C_{18}$  柱; 流动相: 甲醇-水 (90:10); 流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长: 220 nm。结果 进样量在 2.3 - 13.8  $\mu\text{g}$  有良好的线性关系。(1), (2) 和 (3) 的回收率分别为 100.3%, 100.3% 和 100.0%。结论 本法快速、简便、灵敏和分离度好, 适用于番荔枝科植物中抗肿瘤活性成分番荔枝素的含量测定。

**关键词:** 番荔枝科; 番荔枝属; 番荔枝素; HPLC

中图分类号: R917; TQ460.72

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)09-0683-03

番荔枝素 (annonaceous acetogenins 或称 polyketides) 是番荔枝科 (Annonaceae) 植物所含的抗肿瘤活性成分。1982 年发现第一个化合物, 至今已报告 400 多个类似物。我国番荔枝科植物资源丰富, 其中番荔枝属 (*Annona* L.) 植物的种子含有丰富的番荔枝素, 有望从中开发抗肿瘤新药。该类化合物的定量分析方法尚未见报道。本文以番荔枝属 4 种及不同产地的

7 种植物种子样品, 即 4 个产地 (汕头市, 深圳市, 珠海市和阿拉伯联合酋长国) 的番荔枝 (*A. squamosa*)、圆滑番荔枝 (*A. glabra*)、刺果番荔枝 (*A. muricata*) 和牛心番荔枝 (*A. reticulata*) 等, 探索了番荔枝素的含量测定方法。本法既适用于分析, 也可用于制备分离。番荔枝素的结构如图 1 所示。

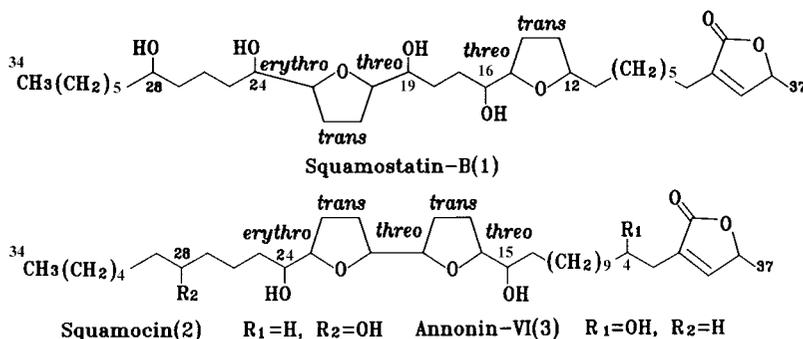


Figure 1 Chemical structures of squamostatir B (1), squamocin (2) and annonin VI (3)

## 材 料 与 方 法

**仪器** 高效液相色谱仪 洗脱液泵: Waters 600E, 进样器: U6K-7725, 检测器: Waters 2487, 色谱处理器: Waters Millennium 32。

**试剂 对照品** squamostatir B (1), squamocin (2) 和 annonin VI (3) 为本实验室制备<sup>[1-3]</sup>。甲醇 (色谱纯, Fisher), 重蒸馏水 (实验室制备)。

**色谱条件** 色谱柱: Dikma Diamonsil  $C_{18}$  (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇-水 (90:10); 流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长: 220 nm; 柱温: 20  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 结 果 与 讨 论

## 1 标准曲线及线性范围

精密称取对照品 squamostatir B 3.86 mg, squamocin 8.66 mg 和 annonin VI 3.96 mg, 分别用甲醇定容于 10 mL 量瓶内, 各精密吸取 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 和 1.6 mL 于 2 mL 量瓶中, 甲醇定容。制成不同浓度的标准溶液, 依次取 20  $\mu\text{L}$  进样, 作 HPLC 分析。以峰面积对进样量回归处理, 3 种番荔枝素对照品的峰面积与进样量均呈良好的线性关系。

收稿日期: 2001-02-08。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29572087)。

作者简介: 孙 兰 (1961-), 女, 主管技师;

余竞光 (1937-), 男, 教授。

\* 通讯作者 Tel: (010) 62899728, Fax: (010) 62896313,

E-mail: yujingguang@163.com

**Table 1 The regression equation of annonaceous acetogenins**

Acetogenin	Regression equation	$r$	Linearity range / $\mu\text{g}$
Squamostatir B	$Y = 5.76 \times 10^5 X + 2.92 \times 10^4$	0.9994	2.3 - 6.2
Squamocin	$Y = 6.17 \times 10^5 X + 4.95 \times 10^4$	0.9998	5.2 - 13.8
Annonir VI	$Y = 4.76 \times 10^5 X - 2.54 \times 10^4$	0.9995	2.3 - 6.3

**2 提取条件优化**

比较了甲醇、95%乙醇、二氯甲烷和乙酸乙酯等4种提取溶剂。结果表明生药以甲醇提取,番荔枝素提取率最高,且样品中杂质干扰较少,所以选用甲醇为提取溶剂。为了优化提取条件,以超声时间 A (10, 20, 30 min),提取次数 B(1, 2, 3 次)和溶剂用量 C(10, 15, 20 倍量 mL)为3个因素,设计  $L_9(3^4)$  正交实验。

样品溶液制备:精密称取汕头产番荔枝 (*A. squamosa*) 种子粉末(过 60 目) 2 g,根据  $L_9(3^4)$  正交表的要求,加入甲醇 C 量,超声 A min,提取 B 次。提取液过滤,弃去残渣,蒸干滤液后用甲醇定容于 10 mL 量瓶内,经微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ ) 过滤,弃去初滤液,取续滤液 10  $\mu\text{L}$  进行 HPLC 分析。

正交实验结果的方差分析表明,3个因素中提取次数对番荔枝素提取率影响最大,其次是超声时间和溶剂用量。试验表明,样品量 2 g 时,用 15 倍量甲醇,超声 20 min,提取 2 次的条件较为理想,提取率最高。

在以上试验的基础上,进一步对超声提取前溶

剂的浸泡时间进行了试验。精密称取 2 g 样品 5 份,加 15 倍量甲醇,分别浸泡 2, 4, 6, 8 和 10 h,超声 20 min,提取 2 次,按前述处理及 HPLC 分析。结果表明,浸泡 4 h 与浸泡 6 h 或更长时间无显著差异,故选取浸泡 4 h。综上所述,样品提取的最佳条件为 15 倍样品量甲醇,浸泡 4 h,超声 20 min 和提取 2 次。

**3 精密度和重复性**

在上述色谱条件下以 squamocin 标准液,连续进样 6 次,每次 10  $\mu\text{L}$  进行 HPLC 分析,测定峰面积的 RSD 为 0.4%。精密称取番荔枝种子 2 g 样品 6 份,按照“提取最优化条件”进行样品处理和分析。squamostatir B RSD 为 1.4%, squamocin RSD 为 0.3%,annonir VI RSD 为 1.2%。

**4 加样回收率**

精密称取 3 种已知番荔枝素含量的番荔枝种子样品,6 份,每份 1 g,加入一定量的 squamostatir B, squamocin 和 annonir VI 标准品。按照“提取最优化条件”进行样品处理和 HPLC 分析。结果, squamostatir B 回收率为 100.3%, RSD 为 1.4%; squamocin 回收率为 100.3%, RSD 为 1.1%;annonir VI 回收率为 100.0%, RSD 为 1.2%。

**5 样品分析**

番荔枝属植物 4 种,收集不同产地的 7 个样品,每个样品平行测定 3 次,以“提取最优化条件”即 15 倍样品量的甲醇,浸泡 4 h,超声 20 min,提取 2 次处理和进行 HPLC 分析。结果见表 2。色谱图见图 2。

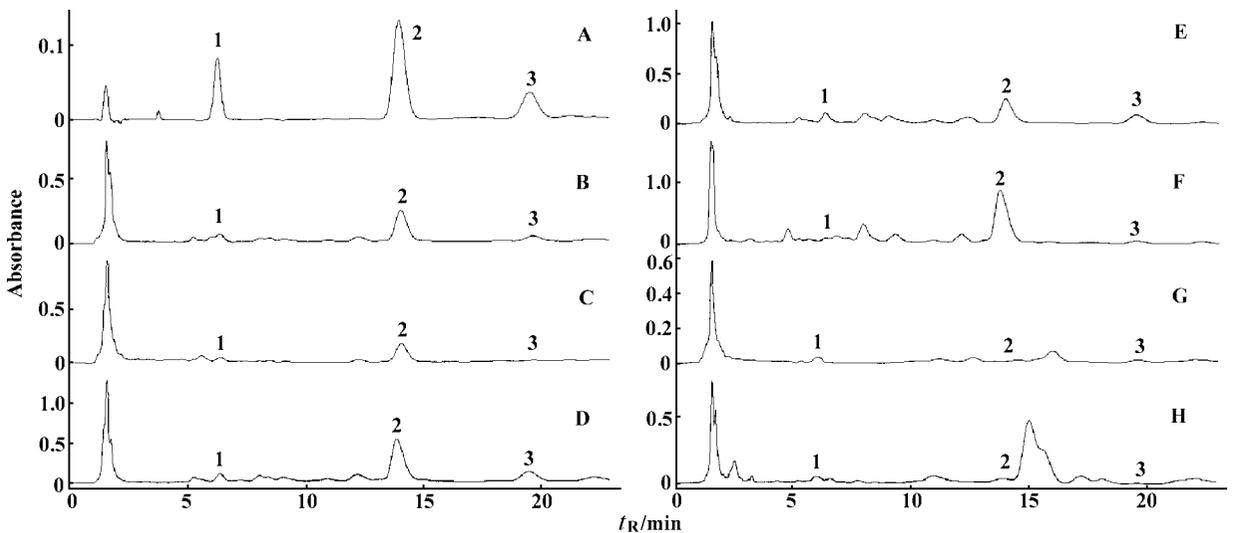


Figure 2 Chromatography of samples from the *Annona* sp. A. Standard sample : 1. Squamostatir B ( $t_R$  6.2 min) ; 2. Squamocin ( $t_R$  14.0 min) ; 3. Annonir VI ( $t_R$  19.5 min) ; B. *Annona squamosa* (Shantou) ; C. *A. squamosa* (Shenzhen) ; D. *A. squamosa* (Zhuhai) ; E. *A. squamosa* (The United Arab Emirates) ; F. *A. glabra* (Hainan) ; G. *A. reticulata* (Yunnan) ; H. *A. muricata* (Hainan)

**Table 2 Content of annonaceous acetogenins in sample of *Annona* sp.**

Sample	(origin)	Content of acetogenins / %		
		Squamostatirin B	Squamocin	Annonirin VI
<i>A. squamosa</i>	(Shantou)	0.10	0.68	0.15
	(Shenzhen)	0.16	1.47	0.47
	(Zhuhai)	0.12	0.65	0.04
	(The United Arab Emirates)	0.16	0.67	0.31
<i>A. glabra</i>	(Hainan)	0.08	3.19	0.20
<i>A. muricata</i>	(Hainan)	0.07	0.04	0.01
<i>A. reticulata</i>	(Yunnan)	0.06	0.02	0.04

## 讨 论

番荔枝种子中含油脂量很高,经石油醚脱脂处理对番荔枝素提取和处理较为方便,但不脱脂样品的番荔枝素含量较脱脂样品高,说明了石油醚脱油脂时也能提出一部分番荔枝素。

不同产地的 4 个番荔枝(*A. squamosa*) 中 3 种番荔枝素的含量较高,各含量略有不同。但不同种植物的其他 3 种样品番荔枝素含量差异较大,特别是

*A. muricata* 和 *A. reticulata* 中 3 种番荔枝素含量均小于 0.07%, 显然后两种植物的化学成分与 *A. squamosa* 不一样,这与我们以前关于其化学成分研究结果<sup>[3-5]</sup>是一致的。

## REFERENCES:

- [1] Yu JG, Lu XZ, Sun L, et al. Squamostatirin B, a new polyketide of the seeds from *Annona squamosa* (Annonaceae) [J]. *Chin Chem Lett*, 1993, 4(5): 423 - 426.
- [2] Yu JG, Lu XZ, Sun L, et al. Studies on the chemical constituents of the seeds from *Annona squamosa* [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1994, 29(6): 443 - 448.
- [3] Yu JG, Gui HQ, Sun L, et al. Studies on the chemical constituents of the seeds from *Annona muricata* [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1997, 32(6): 431 - 437.
- [4] Li DY, Yu JG, Sun L, et al. Muricatenol, a linear acetogenin from *Annona muricata* (Annonaceae) [J]. *Chin Chem Lett*, 2000, 11(3): 239 - 242.
- [5] Liu D, Yu JG, Sun L, et al. Studies on the chemical constituents of the seeds from *Annona reticulata* [J]. *Nat Prod Res Dev* (in Chinese), 1998, 10(2): 1 - 3.

## DETERMINATION OF ANNONACEOUS ACETOGENINS IN ANNONACEAE PLANTS BY HPLC

SUN Lan, YU Jing-guang, LI De-yu, LI Jin, YANG Xue-dong, YANG Shi-lin

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

**ABSTRACT:** AIM To develop a method for analysis of antitumor annonaceous acetogenins in Annonaceae plants by HPLC. **METHODS** Squamostatirin B (1), squamocin (2) and annonirin VI (3) were used as standard substances. Chromatography column was a Rp-18; the mobile phase was methanol-water (90:10); the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the detecting wavelength was 220 nm. **RESULTS** A linear range was obtained from 2.3 to 13.8 µg with a good correlation. The recoveries of (1), (2) and (3) were 100.3%, 100.3% and 100.0%, respectively. **CONCLUSION** This method was developed for the analysis of acetogenins by HPLC for the first time. The method is rapid, accurate and suitable for the analysis of the antitumor acetogenins in Annonaceae plants.

**KEY WORDS:** Annonaceae; *Annona* L; annonaceous acetogenins; HPLC