

基于 FTIR 的曼地亚和南方红豆杉不同部位紫杉醇含量分析与评价

孔德鑫¹, 黄夕洋^{1*}, 李 锋^{1,3}, 蒋水元¹, 黄庶识², 李 虹¹

1. 中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006

2. 广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530003

3. 广西科学院, 广西 南宁 530003

摘 要 运用 FTIR 技术, 结合外标法、二阶导数和曲线拟合方程, 研究曼地亚和南方红豆杉红外光谱特征及其不同部位间紫杉醇含量的差异。结果显示: (1)向原药材中添加紫杉醇量 ≥ 0.0045 mg 时, 在 1516, 1371, 1244, 1109 和 773 cm^{-1} 等处的吸收峰明显增强, 且二阶导数图谱“指纹”区上述等处的峰强随添加紫杉醇浓度的增加而升高; (2)对 1058 宽峰运用 Gaussian 函数曲线拟合发现, 曼地亚红豆杉拟合出 8 个子峰而南方红豆杉拟合出 7 个子峰; (3)二阶导数和曲线拟合方程分析表明, 两种红豆杉紫杉及其不同部位紫杉醇含量均存在一定差异, 具体而言, 曼地亚红豆杉超过南方红豆杉; 不同部位比较时, 曼地亚红豆杉以叶片中含量最高而南方红豆杉根中含量最高。所以, 上述方法, 可以快速分析评价两种红豆杉及其不同部位紫杉醇含量的差异。

关键词 曼地亚红豆杉; 南方红豆杉; 紫杉醇; 红外光谱; 曲线拟合; 二阶导数

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)03-0656-05

引 言

红豆杉属(*Taxus*)植物为常绿乔木或灌木, 该属植物含有紫杉醇, 是应用前景非常广阔的抗癌药, 1992 年被美国 FDA 批准为治疗卵巢癌的特效药而上市, 1994 年 4 月被批准为治疗晚期乳腺癌, 它对肺癌也有较好的疗效^[1,2]。然而, 红豆杉属植物对环境要求较严格, 自然更新能力弱, 生产上存在资源过度开发导致资源破坏严重等问题, 曼地亚红豆杉(*Taxus media*)因体内紫杉醇类化合物质量分数较高, 而南方红豆杉(*Taxus mairei*)因其生物量增长较快的优点, 两种红豆杉在生产和应用上均受到研究者的青睐^[3]。目前, 关于红豆杉的研究, 除以红豆杉前体物质人工合成紫杉醇外, 大部分研究主要集中在用高效液相色谱测量不同类型、不同产地南方红豆杉和曼地亚红豆杉中紫杉醇含量来评价药材质量的优劣^[4-7]。这些方法虽然精确, 但是前处理比较复杂、耗时长, 很难应用于红豆杉药材的快速评价。所以, 运用新的研究技术来研究其药材质量评价方法, 对红豆杉产业的快速发展有重要意义。近年来, 傅里叶变换红外光谱方法由于具有准确、简便、快速、经济的特点, 已广泛应用于中药及中药

材质量分析研究^[8-10], Gaussian 函数拟合, 较为成功地弥补了由于仪器采样率低而引起的谱线失真, 使测量光谱更接近实际光谱, 达到精确测量的目的, 在生物领域研究中受到高度重视^[11]。本研究利用 FTIR 技术, 结合外标法和 Gaussian 函数拟合方法研究曼地亚红豆杉和南方红豆杉的红外光谱特征, 并判断两种红豆杉不同部位紫杉醇的含量, 以求为两种红豆杉的鉴别及其药材质量评价提供快速而简便的研究方法, 为合理开发利用两种红豆杉提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与药品

仪器: Nicolet FTIR 5700, DTGS 检测器, 电子天平 XSI05DU(梅特勒-托利多仪器公司); 软件: Nicolet OMNIC 7.3, Sigmaplot11.0, Origin8.0; 药品: KBr 光谱纯(天津市光复精细化工研究所), 紫杉醇(购于中国生物药品鉴定所)。

1.2 材料来源

曼地亚和南方红豆杉试验材料于 2009 年 10 月采自广西资源县红豆杉栽培基地, 以上试验材料均经广西植物研究所韦发南教授鉴定为红豆杉属(*Taxus*)植物全株。分别取上述

收稿日期: 2010-04-28, 修订日期: 2010-08-13

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0537017-11)资助

作者简介: 孔德鑫, 1980 年生, 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所助理研究员 e-mail: kdexin367@163.com

* 通讯联系人 -mail: xiyang0687@163.com

植物的根皮、茎皮、叶用于 FTIR 光谱测定。

1.3 样品制备与试验方法

样品在 55 °C 干燥 48 h, 粉碎过 200 目, 每个样作 9 个重复, 各样品称 1.0 mg 与溴化钾(碎晶)200 mg 混合研磨充分均匀, 压制成厚度约 1 mm 的透明锭片, 将锭片放入红外光谱仪测定, 每个片随机扫三个不同的点, 再取其平均谱图作为最后的样品谱图。测试条件: 光谱范围 4 000~400 cm^{-1} ; 光谱分辨率 4 cm^{-1} ; 扫描次数 32 次, 扫描时扣除 H_2O 和 CO_2 的干扰。

2 结果与讨论

2.1 外加不同浓度紫杉醇对曼地亚红豆杉红外光谱特征的影响

去掉受水分影响比较大的区域, 故本研究拟只分析

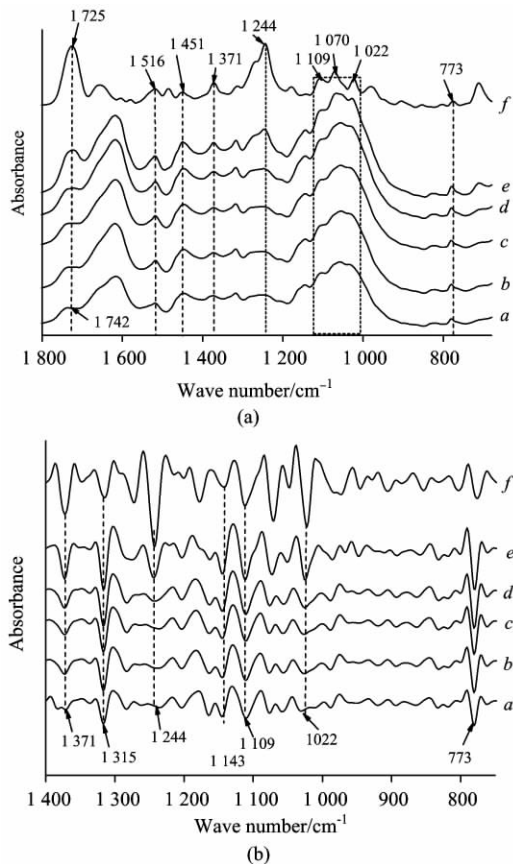


Fig 1 Changes of IR spectra and second derivative spectra after adding different intensity of standard paclitaxel sample to *T. media*

(a): IR spectra; (b): Second derivative spectra

$a(a')$: *T. media* + 0 μL standard paclitaxel sample ($0.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); $b(b')$: *T. media* + 2.5 μL standard paclitaxel sample ($0.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); $c(c')$: *T. media* + 5 μL standard paclitaxel sample ($0.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); $d(d')$: *T. media* + 10 μL standard paclitaxel sample ($0.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); $e(e')$: *T. media* + 50 μL standard paclitaxel sample ($0.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); $f(f')$: 40 μL standard paclitaxel sample ($0.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

1 800~700 cm^{-1} 波段各样品的光谱特征。如图 1 所示, 红豆杉原药材(图 1a)在 1 516, 1 451, 1 371, 1 244 和 773 cm^{-1} 等处与紫杉醇标准品(图 1f)有明显的共同吸收峰, 但是, 向原药材中添加不同浓度的紫杉醇, 曼地亚红豆杉中 1 516, 1 451, 1 371, 1 244 和 773 cm^{-1} 等处的吸收强度变化不明显; 只有外加 50 μL ($0.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 相当于 0.004 5 mg 紫杉醇标准品时, 上述吸收峰才明显增强。产生这种现象是因为曼地亚红豆杉原药材紫杉醇的含量不足 0.1%, 所以, 在药材的整体红外图谱中不能够完全反应紫杉醇的特征吸收。在红外“指纹区”, 应用二阶导数分析表明, 原药材与紫杉醇标准品在 1 371, 1 315, 1 244, 1 143, 1 109, 1 070, 1 022 和 773 cm^{-1} 等处均有良好的对应峰(每个样品的差异不超过 $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$ 范围), 而且, 在 1 371, 1 315, 1 244, 1 143, 1 106, 1 070, 1 022 和 773 cm^{-1} 等处附近的光谱吸收强度, 随着添加紫杉醇浓度的增加而增加。说明, 二阶导数图谱中 1 315, 1 244, 1 143, 1 106, 1 070, 1 022 和 773 cm^{-1} 等峰位置的峰强可以反应紫杉醇含量的高低。

2.2 曼地亚和南方红豆杉红外光谱表征比较分析

图 2 为曼地亚和南方红豆杉的一维红外光谱图。由图知, 在 1 800~700 cm^{-1} 波段范围, 两种红豆杉的红外振动比较相似。通过相关性系数分析表明, 二者的相关性系数为 0.994, 表明两种红豆杉的主要化学成分构成较相似。具体到红外光谱图中, 主要分二段: 1 800~900 cm^{-1} ; 900~400 cm^{-1} 讨论。第一波段范围内出现了 10 个(组)吸收峰, 主要吸收峰归属为: 1 740 cm^{-1} 附近的酯类 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动^[12]; 1 619 cm^{-1} 附近羧酸 COO^- 的反对称伸缩振动或者芳环 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动; 1 375 和 1 247 cm^{-1} 附近萜类骨架振动^[8]; 1 059 cm^{-1} 附近的吸收峰宽而强, 是苷类物质 $\text{C}-\text{OH}$ 的弯曲振动^[12]。第二波段范围内的吸收峰较少、强度较低, 主要是分子的骨架振动和变角振动。由此可以推测出, 红豆杉中含有较多的 $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$ 基团, 与红豆杉中紫杉醇的结构相吻合。

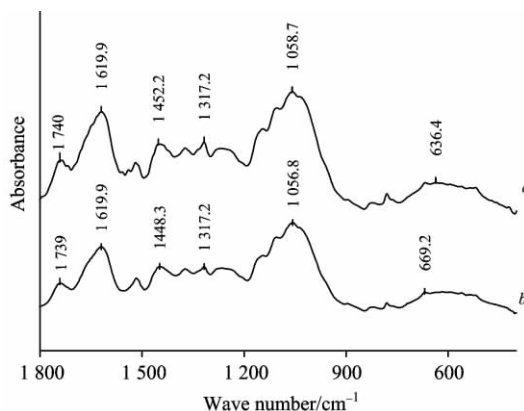


Fig 2 FTIR spectra of *T. media* and *T. mairei*
a: *T. media*; b: *T. mairei*

1 200~900 cm^{-1} 波段的吸收光谱重叠严重, 较难区分曼地亚和南方红豆杉间化学成分差异, 因此, 对 1 058 宽吸收峰运用 Gaussian 函数进行曲线拟合, 其结果如图 3 所示, 曼地亚红豆杉拟合出八个子峰, 分别为 1 167, 1 142, 1 106,

1 068, 1 037, 1 011, 986 和 956 cm^{-1} ; 南方红豆杉拟合出七个子峰, 分别为 1 167, 1 142, 1 106, 1 065, 1 028, 998 和 960 cm^{-1} 。比较各吸收子峰的峰面积发现(表 1), 与紫杉醇含量相关的特征吸收峰 1 142, 1 106 和 1 068 cm^{-1} 附近的峰面积均以曼地亚红豆杉高, 由此表明, 紫杉醇含量曼地亚红豆杉要高于南方红豆杉。

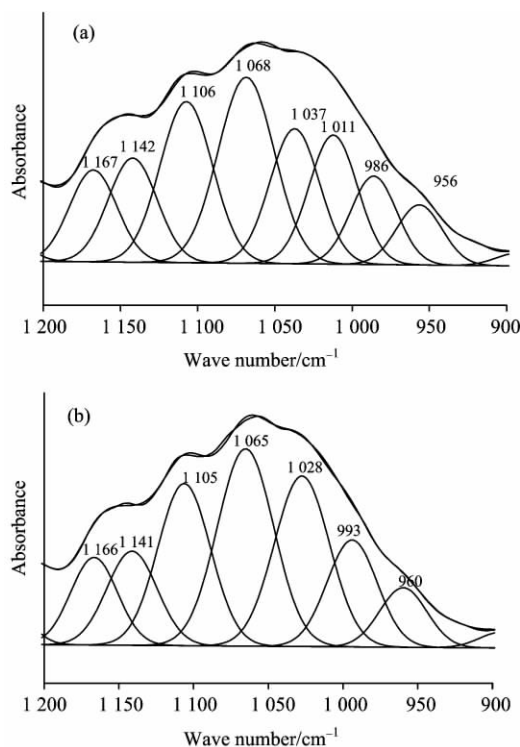


Fig 3 Curve fitting of *T. media* and *T. mairei* among 1 200~900 cm^{-1}

(a): *T. media*; (b): *T. mairei*

Table 1 Relative decomposed band areas between *T. media* and *T. mairei* after curve fitting under 1 200~900 cm^{-1}

曼地亚红豆杉吸收峰	吸收波数	吸收峰面积	南方红豆杉吸收峰	吸收波数	吸收峰面积
1	956	8.28	1	—	—
2	986	12.39	2	959	8.10
3	1 012	19.03	3	993	15.47
4	1 037	20.35	4	1 028	27.14
5	1 068	32.08	5	1 065	31.79
6	1 107	25.74	6	1 106	24.59
7	1 142	15.48	7	1 141	13.65
8	1 167	13.25	8	1 166	11.76

2.3 曼地亚红豆杉不同部位的红外光谱特征及其紫杉醇含量比较分析

曼地亚红豆杉不同部位主要化学成分组成虽然复杂, 但是, 高分辨率的二阶导数图谱(图 4)仍显示出一些被掩盖的特征吸收峰, 不同部位间化学成分差异, 具体到图谱中是 1 650~1 440 cm^{-1} 范围内苯环骨架的伸缩振动峰, 即: 图 4b 在 1 576, 1 557 和 1 538 cm^{-1} 等处有中强峰吸收, 而在图 4a

和 c 中则没有明显吸收峰; 图 4a 和 b 在 1 163 和 1 144 cm^{-1} 等处均呈双峰吸收, 而图 4c 只在 1 159 cm^{-1} 处出现单吸收峰。表明, 曼地亚红豆杉不同部位糖、苷类等化学成分组成有较大差异。在二阶导数处理基础上, 应用高斯曲线拟合方程分析得出, 1 800~900 cm^{-1} 范围内曼地亚红豆杉不同部位与紫杉醇相关的特征峰吸收面积有较大差异, 如表 2 所示, 在 1 375, 1 315, 1 244, 1 142, 1 107 和 1 069 cm^{-1} 等处峰面积比较, 以叶片最高、根、茎次之且服者相差不大。这表明曼地亚红豆杉以叶片中紫杉醇的含量最高。此结论与前人报道结果一致^[5,6]。

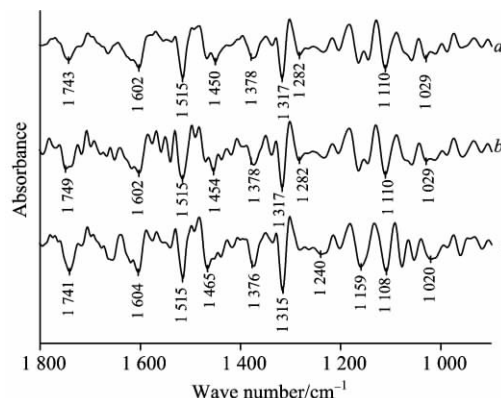


Fig 4 Second derivative spectra of different parts of *T. media*

a: Root; b: Stem; c: Leaf

Table 2 Main relative decomposed band areas from different parts of *T. media* after curve fitting

波数	吸收峰面积		
	根	茎	叶
957	7.31	8.30	12.14
1 013	18.17	19.03	34.20
1 069	30.60	30.79	32.18
1 107	23.41	25.74	28.74
1 142	14.73	15.49	24.35
1 166	12.46	13.25	22.80
1 244	14.93	14.93	19.05
1 315	12.17	12.97	16.21
1 375	14.01	9.82	16.86
1 441	11.23	10.15	13.03

2.4 南方红豆杉不同部位的红外光谱特征及其紫杉醇含量比较分析

图 5 为南方红豆杉不同部位二阶导数图谱, 由图可知, 南方红豆杉不同部位红外光谱图的峰型变化较相似。具体到图谱中, 差异性主要是峰吸收强度的差异仅少量峰位置发生飘逸。如: 图 5a 和 b 中 1 745 cm^{-1} 附近的中强吸收峰, 在图 5c 中飘逸到 1 737 cm^{-1} 附近且显示强吸收峰。图 5a 和 b 中 1 658, 1 559 和 1 464 cm^{-1} 附近的弱吸收峰, 在图 5c 中表现强吸收峰; 图 5a 中 1 166 和 1 146 cm^{-1} 附近的双峰吸收, 在图 5b 和 c 中出明显的一强一弱的吸收峰。说明南方红豆杉不同部位主要化学成分种类比较相似, 但是, 蛋白质和酯类物

质在叶片中含量相对于根和茎要丰富。1 800~900 cm⁻¹ 波段,运用高斯曲线拟合方程分析显示(表 3),与紫杉醇含量相关的特征峰在 1 514, 1 443 和 1 245 cm⁻¹ 等处的吸收峰面积以根部最高,叶片次之,茎部最少。这表明,南方红豆杉不同部位紫杉醇含量以根部最高,叶片次之,茎中最低。与前人用 HPLC 报道结果相似^[7]。

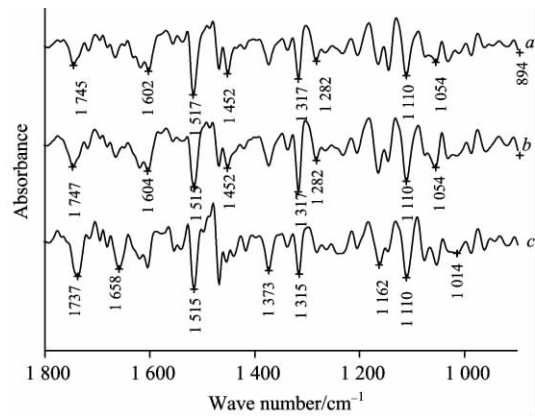


Fig 5 Second derivative spectra of different parts of *T. mairei*
a: Root; b: Stem; c: Leaf

3 结 论

本文运用红外光谱技术,结合外标法、二阶导数及曲线拟合方程,对曼地亚和南方红豆杉的红外光谱特征以及其不同部位紫杉醇的含量进行比较分析。外标法分析时,向原药材中添加少量紫杉醇标准品时,曼地亚红豆杉的红外光谱变化不明显,当添加量≥0.004 5 mg 时,药材(图 1a)在 1 516, 1 371, 1 244, 1 109 和 773 cm⁻¹ 等处的吸收峰明显增强。通

Table 3 Main relative decomposed band areas from different parts of *T. mairei* after curve fitting under 1 800~900 cm⁻¹

波数	吸收峰面积		
	根	茎	叶
987	10.35	15.47	12.04
1 107	20.87	24.59	19.57
1 143	14.14	13.65	13.62
1 168	11.32	11.76	11.89
1 245	10.82	10.05	10.51
1 316	10.72	10.61	10.16
1 376	12.39	12.73	13.46
1 443	10.37	8.98	9.43
1 514	8.95	7.75	7.97
1 617	16.25	15.95	15.29
1 727	5.79	6.06	7.39

过二阶导数处理后,原药材在红外“指纹区”1 371, 1 315, 1 244, 1 143, 1 106, 1 070, 1 022 和 773 cm⁻¹ 等处的峰强变化可以反应紫杉醇含量的变化,所以,可以把 1 371, 1 315, 1 244, 1 143, 1 106, 1 070, 1 022 和 773 cm⁻¹ 等处的吸收峰特征作为评价红豆杉药材紫杉醇含量的依据;对 1 058 宽吸收峰运用 Gaussian 函数进行曲线拟合,曼地亚红豆杉拟合出 8 个子峰而南方红豆杉只拟合出七个子峰。此外,上述方法分析表明,两种红豆杉及其不同部位紫杉醇含量均存在一定差异,紫杉醇含量总体上,曼地亚红豆杉超过南方红豆杉;不同部位紫杉醇含量,曼地亚红豆杉以叶片中含量最高而南方红豆杉根中含量最高。所以,运用 FTIR 技术结合外标法、二阶导数和曲线拟合方程,可以快速分析评价两种红豆杉及其不同部位紫杉醇含量的差异。此研究结果将为红豆杉药材质量的快速评价提供了新的检测方法,为红豆杉药材的综合利用提供了新参考。

References

[1] KAN Chang-rong, CUI Jiong-mo, WANG Ji-wen, et al(阚常榕, 崔炯漠, 王继文, 等). Modern Chinese Medicine(中国现代中药), 2009, 11(2): 27.

[2] HUANG Xi-yang, LI Cui-lan, LI Feng, et al(黄夕洋, 李翠兰, 李 锋, 等). Guihaia(广西植物), 2009, 29(6): 842.

[3] LIU Ke-hui, YU Fang-ming, PENG Shao-lin, et al(刘可慧, 于方明, 彭少麟, 等). Ecology and Environmental Sciences(生态环境), 2007, 16(2): 309.

[4] LI Nai-wei, PENG Feng, FENG Xu(李乃伟, 彭 峰, 冯 煦). Journal of Plant Resources and Environment(植物资源与环境学报), 2008, 17(2): 28.

[5] WANG Zhi-gang, ZHOU Chun-shan, YAN Jia-liang, et al(王志刚, 周春山, 颜家良, 等). Applied Chemical Industry(应用化工), 2007, 36(1): 84.

[6] LIU Xiang-qian, ZHANG Xiao-dan, ZHU Yu-lin, et al(刘向前, 张晓丹, 朱育林, 等). Journal of Chinese Medicinal Materials(中药材), 2008, 31(10): 1498.

[7] SU Ying-juan, WANG Ting, LI Xue-yan, et al(苏应娟, 王 艇, 李雪雁, 等). Natural Product Research and Development(天然产物研究与开发), 2001, 13(2): 20.

[8] HUANG Qiao-wen(黄巧文). Strait Pharmaceutical Journal(海峡药学), 2008, 20(12): 151.

[9] ZHOU Xiang-ping, LIU Gang, SHI You-ming, et al(周湘萍, 刘 刚, 时有明, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(3): 594.

[10] XU Rong, SUN Su-qin, LIU You-gang, et al(徐 荣, 孙素琴, 刘友刚, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学),

2009, 37(2): 221.

[11] SHI You-ming, LIU Gang, ZHOU Xiang-ping, et al(时有明, 刘 刚, 周湘萍, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2008, 36(8): 1105.

Analysis and Evaluation of Taxol Contents in Different Parts between *Taxus media* and *Taxus mairei* Based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy

KONG De-xin¹, HUANG Xi-yang^{1*}, LI Feng^{1,3}, JIANG Shui-yuan¹, HUANG Shu-shi², LI Hong¹

1. Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

2. Lab of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China

3. Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China

Abstract In the present study, combined with external standard method, second derivative as well as curve-fitting equation, the infrared spectroscopy techniques were applied to research the discrepancy of paclitaxel content among different parts of them respectively as well as the differences of infrared spectral character between *Taxus Media* (*T. Media*) and *Taxus Mairei* (*T. Mairei*). The results showed: (1) The band around 1 516, 1 371, 1 244, 1 109 and 773 cm^{-1} was markedly enhanced when paclitaxel standard sample was added by more than 0.004 5 mg to original traditional Chinese materials, in addition, in infrared fingerprint area, the second derivative spectra show that there was good corresponding peak between traditional Chinese materials and standard paclitaxel sample around 1 371, 1 315, 1 244, 1 143, 1 106, 1 070, 1 022 and 773 cm^{-1} , furthermore, the intensity of above character band would increase accompanying with increased standard paclitaxel sample. So, the band character around 1 371, 1 315, 1 244, 1 143, 1 106, 1 070, 1 022 and 773 cm^{-1} could be used to evaluate paclitaxel content of *T. media* and *T. mairei*; (2) Around 1 800~700 cm^{-1} , IR spectral features suggest that two kinds of Chinese yew had quite similar infrared vibration character, but when Gaussian function was applied to decompose the band around 1 058 cm^{-1} , the result demonstrated that the *T. media* were decomposed with 8 while *T. mairei* were only decomposed with 7 component bands. (3) Second-derivative and curve-fitting equation analysis demonstrated that there were certain differences of paclitaxel content between *T. media* and *T. mairei* as well as different parts of them. Specifically, the paclitaxel content of *T. media* was higher than *T. mairei*, while the paclitaxel content in leaf of *T. media* was highest, on the contrary, the paclitaxel content in root of *T. mairei* was highest when comparing the content among the different parts of *T. media* and *T. mairei* respectively. Therefore, above methods could be quickly analyze and evaluate the differences of paclitaxel content between *T. media* and *T. mairei* as well as the different parts of them.

Keywords *Taxus media*; *Taxus mairei*; Paclitaxel; Fourier transform infrared spectroscopy; Curve-fitting analysis; Second derivative analysis

(Received Apr. 28, 2010; accepted Aug. 13, 2010)

* Corresponding author