

Determination of Ferulic Acid in Serum after Oral Administration of TCM Preparations

Huang Xi, Ren Ping, Zhang Li, *et al.* (Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract A new method for the determination of ferulic acid in serum samples after oral administration of TCM by HPLC has been developed. Serum samples containing ferulic acid (FA) and internal standard coumarin (IS) were first treated in boiling water-bath to deproteinate, and the FA and IS in the supernatant analysed by 2D, 3D HPLC and spectrometry, on C_{18} column (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m,) with MeOH:HOAc:H₂O (38 : 0.3 : 61.7) as the mobile phase, and detected at 320 nm. Results showed that (1) the minimal detectable limits of blank methanol and serum concentrations of FA were 6 ng and 20.6 ng/mL; (2) the linearity ranged from 33.7 to 2 156.8 ng/mL ($r=0.9993$); (3) the mean recovery was 93.59 $\pm$ 1.93%; and (4) RSD of within day and day to day were less than 8.44%. In a pilot study, serum samples collected from healthy volunteers following oral administration of a decoction of Chuanxiong (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) gave a concentration-time curve of FA with accurate and reproducible results.

Key words determination of serum ferulic acid by HPLC

固相萃取结合 HPLC 法快速测定紫杉醇的含量

大连理工大学生化工程研究所(110612)

张志强* 田桂莲

中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室

韦新桂 苏志国

摘要 采用 γ - Al_2O_3 固相萃取和 HPLC 法对云南红豆杉和东北红豆杉培养细胞中的紫杉醇进行了定量分析。红豆杉浸膏粗品经 γ - Al_2O_3 固相萃取柱后,可直接上高效液相色谱柱。 C_{18} HPLC 的最佳条件是:甲醇-乙腈-水(25:45:30)为流动相,227 nm 紫外检测。该法简单、快速、准确、适应性强,对紫杉醇的检测范围在 0.4~19.2 μ g。

关键词 固相萃取 HPLC 紫杉醇

紫杉醇(paclitaxel)是一种从红豆杉植物中获得的具有独特疗效的抗癌天然植物产物,现已被多个国家批准应用于临床治疗卵巢癌和乳腺癌等。关于紫杉醇的 HPLC 分析,国内外已有不少报道^[1~5]。由于红豆杉属植物种类繁多,而这些植物中具有紫杉烷骨架的化合物就有 100 多种,但紫杉醇含量极低,约占固体物 0.010%~0.013%。同时,红豆杉浸膏中往往含有大量的蜡、脂类物质等。这些杂质的存在,严重影响了紫杉醇的准确

定性定量和分析分离所使用色谱柱的寿命。因此,寻找一种快速、精确、灵敏、适应性强的分析方法,无论是对红豆杉细胞培养还是对紫杉醇的大规模分离纯化,都显得尤为重要。固相萃取其突出的优点是能使 HPLC 分析复杂样品时定性定量更准确,并延长色谱柱的使用寿命。同常规的样品预处理方法液液萃取相比,固相萃取具有效率高、选择性好的特点。它不需要大量不互溶溶剂,样品处理步骤简单,样品回收快。固相萃取的主要目的是

* Address: Zheng Zhiqiang, Institute of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian

张志强 男,在读博士,主要研究方向为生物产品的制备与纯化。参加完成国家青年基金资助项目“重组人肿瘤坏死因子的分离纯化”。现正从事国家“九·五”攻关项目“紫杉醇大规模生产”的研究。

样品分析前的富集和净化。经过试验探索,我们选择了 γ - Al_2O_3 固相萃取作为样品的预处理过程,用 C_{18} 柱HPLC对红豆杉粗品中的紫杉醇进行了分离测定。应用该法分析定量云南红豆杉浸膏的结果表明,云南红豆杉中除含紫杉醇以及与紫杉醇性质极为类似的三尖杉宁(cephalomannine)外,还含有另一种与紫杉醇极性相差甚小的未知物质,其在 C_{18} 柱上的停留时间仅稍大于紫杉醇。而分析东北红豆杉培养细胞的甲醇浸膏时,20 min内即可使紫杉醇达到基线分离并准确定量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂: Beckman公司FL-750 HPLC仪。甲醇、乙腈为优级纯,水为重蒸水。紫杉醇对照品购自Sigma公司,纯度>98.7%。红豆杉浸膏由云南张峰植物加工厂提供,紫杉醇含量小于1.0%。东北红豆杉培养细胞系本实验室提供。Sep-Pak C_{18} 柱(1000 mg/6 mL)购自大连化学物理所; γ - Al_2O_3 (层析用,200~300目)是上海新诚精细化学制品有限公司。

1.2 固相萃取(SPE): Al_2O_3 固定相柱(1000 mg/6 mL)是采用血清级聚丙烯柱管,装填 γ - Al_2O_3 自制而成。 C_{18} SPE的操作步骤:往柱中依次加入10 mL乙酸乙酯、甲醇和0.01 mol/L (pH5.0)的乙酸铵水溶液并抽干,最后将液面维持在胶层上1~2 mm高度。将红豆杉浸膏溶解于40%~60%的甲醇-乙酸铵水溶液中。取0.5 mL加到柱中,抽干。分别用20%、60%、75%的甲醇-乙酸铵水溶液(0.01 mol/L)各10 mL过柱。紫杉醇富集在75%的洗脱液中。 Al_2O_3 SPE的操作步骤:依次用甲醇和氯仿各10 mL活化柱,然后将溶于氯仿中的红豆杉浸膏溶液0.5 mL加到柱中,抽干。再分别用100%、98%、95%的氯仿-甲醇各10 mL过柱。紫杉醇集中在95%的氯仿溶液中。萃取过程中流动相速度稳定控制在5~8 mL/min。将含紫杉醇的洗脱部分蒸干,残渣用甲醇溶解定容,经0.5 μm 滤膜

过滤,清液作HPLC分析。

1.3 HPLC色谱条件: C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, Beckman);流动相:甲醇-乙腈-水(25 : 35 : 40 及 25 : 45 : 30);流速:1.4 mL/min,等梯度洗脱;检测:UV227 nm;室温。

1.4 标准溶液配制:精确称取紫杉醇标准品5.0 mg,用甲醇溶解于5 mL的容量瓶中并定容,摇匀待用。

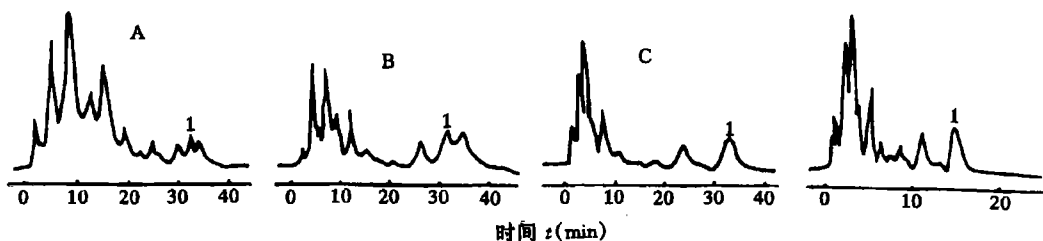
2 结果与讨论

2.1 固相萃取柱的选择:图1-A~C分别为浸膏二氯甲烷-水(1 : 1)液-液萃取、Sep-Pak C_{18} 柱及 γ - Al_2O_3 柱固相萃取样品的HPLC分析图。从对图1-A和图1-B、C的比较可以看出,固相萃取更能有效地去除浸膏中大量的杂质。HPLC分析中,不能使紫杉醇达到基线分离的原因主要是由于三尖杉宁碱和另一种比紫杉醇停留时间稍长的未知物质的存在。收集这种未知物质作元素分析,得知其分子量与紫杉醇的相同。我们推测这种未知物质可能是紫杉醇的异构体7-差向紫杉醇(7-epipaclitaxel)^[4~6]。而图1-C显示,浸膏经 γ - Al_2O_3 柱萃取,其中的这种未知物质被完全去除。这给分析带来了很大的方便。在甲醇-乙腈-水(25 : 35 : 40)条件下,紫杉醇在柱上的停留时间为32 min。

2.2 γ - Al_2O_3 柱萃取后样品的分析:确定 γ - Al_2O_3 固相萃取柱后,为加快分析速度,我们对流动相组成进一步优化。当洗脱剂增加到甲醇-乙腈-水=25 : 45 : 30时,紫杉醇在 C_{18} HPLC柱上停留时间由32 min减少到15 min,且紫杉醇能达到基线分离。

2.3 线性范围及精密度:在甲醇-乙腈-水为25 : 45 : 30流动相组成条件下,紫杉醇的峰面积(X)与进样量(Y)在19.2 μg 的范围内呈线性关系。回归方程为 $Y=0.00232 X-0.0227$, $r=0.9996$,最小检测限为0.4 μg 。

用此方法对东北红豆杉培养细胞的甲醇浸膏进行测定,结果同样令人满意(图2)。



流动相: 甲醇-乙腈-水 (25 : 35 : 40), 图 A~C 分别为样品经液/液萃取、 C_{18} 及 Al_2O_3 柱固相萃取后的 HPLC, 峰 1 为: cephalomannine, 峰 2 为: paclitaxel, 其停留时间: 32 min, 峰 3 为: 7-epitaxol

图 1 云南红豆杉浸膏 HPLC 分析

峰 1 为: paclitaxel, 其停留时间: 15 min

图 2 红豆杉培养细胞浸膏氧化铝萃取后 HPLC 图

参考文献

- 1 Harvey S D, *et al.* J Chromatogr, 1991, 587, 300
- 2 Kopycki W J, *et al.* J of Liq Chromatogr, 1994, 17, 2569
- 3 Yungi Wu, *et al.* J Liq Chromatogr, 1997, 20, 314
- 4 Lillian K S, *et al.* Anal Chem, 1997, 69, 2008
- 5 王文芝. 色谱, 1997, 15(3), 254
- 6 Dauh-Rurng Wu, *et al.* J Chromatogr A, 1995, 702, 233

(1998-04-23 收稿)

Determination of Paclitaxel in Yew (*Taxus*) by γ - Al_2O_3

Solid-phase Extraction and RP-HPLC

Zhang Zhiqiang, Wei Xingui, Tian Guilian, *et al.* (Institute of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

Abstract A new RP-HPLC method for the determination of paclitaxel in *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu and the callus cultures of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. is described. The crude extract may be fractionally partitioned using γ - Al_2O_3 solid-phase extraction, this fraction can then be assayed directly by means of HPLC on a C_{18} column with methanol : acetonitrile : water (25 : 45 : 30) as mobile phase and UV detector at 227 nm. The calibration curve was linear between the peak area and the amount of paclitaxel over the range of 0.4~19.2 μ g with a correlation coefficient of 0.9996.

Key words solid-phase extraction RP-HPLC paclitaxel

胶束电动毛细管电泳法测定柑橘属 药材中柚皮苷和橙皮苷的含量

湖南省中医药研究院中药研究所(长沙 410013) 杨 瑛* 王实强 彭源贵

摘要 建立了一种测定芸香科柑橘属药材中柚皮苷及橙皮苷含量的新方法,即以苯甲酸钠为内标物,采用胶束电动毛细管电泳法,可将上述药材中柚皮苷、橙皮苷和内标物较好分离。加样回收率柚皮苷为 98.5%,橙皮苷为 96.7%。该方法简便、准确、重现性好,可作为柚皮苷和橙皮苷的含量控制方法。

关键词 胶束电动毛细管电泳法 芸香科柑橘属 中药材 柚皮苷 橙皮苷

芸香科柑橘属药用植物来源广泛,1995 年版药典收载的中药材主要有 6 种,即化橘

* Address: Yang Ying, Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Changsha

杨 瑛, 1986 年湖南中医学院中药系毕业, 学士学位, 助理研究员。主要从事中药新药的制剂工艺和质量标准的研究工作。曾负责卫生部四类新药“八珍胶囊”的制剂学研究, 三类新药“烧伤净软膏”的质量标准研究等。参与部、省级科研课题多项, 获得省厅级中医药科技进步奖三项。在国家级及部省级杂志上发表论文多篇。