

HPLC 法测定东北红豆杉枝叶中 10-脱乙酰巴卡亭 III 的含量

杜智敏¹, 陈瑞玲¹, 刘福清², 杨宝峰^{3*}

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院临床药学药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 大庆市龙南医院 药剂科, 黑龙江 大庆 163453; 3. 哈尔滨医科大学 药理学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 目的 测定东北红豆杉枝叶中 10-脱乙酰巴卡亭 III (10-deacetylbaccatin III, 10-DAB III) 的含量。方法 采用 RP-HPLC 法。C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-乙腈-水 (20:30:50) 作为流动相, 检测波长为 233.9 nm。结果 10-DAB III 在 0.004 75~0.038 μg 与峰面积线性关系良好 ($r=0.999\ 0$), 平均回收率为 100.5%, RSD 为 2.0%。结论 方法操作简便、灵敏度高、专属性强, 可用于红豆杉枝叶中 10-DAB III 的质量控制。

关键词: 东北红豆杉; 10-脱乙酰巴卡亭 III; 高效液相色谱

中图分类号: R 286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)04-0398-02

Determination of 10-deacetylbaccatin III in *Taxus cuspidata* branches and leaves by HPLC

DU Zhimin¹, CHEN Rui-ling¹, LIU Fu-qing², YANG Bao-feng³

(1. Institute of Clinical Pharmacology and Pharmacy, The Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China; 2. Department of Pharmacy, Daqing Longnan Hospital, Daqing 163453, China; 3. Department of Pharmacology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Key words: *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.; 10-deacetylbaccatin III (10-DAB III); HPLC

紫杉醇作为红豆杉中的活性成分已得到广泛的研究开发,但其主要存在于树皮中,且并非唯一的抗癌活性成分。主要存在于红豆杉枝叶中的紫杉烷萜类化合物,不但自身有抗癌活性,而且可作为合成紫杉醇或其类似物的前体。因此对红豆杉资源中紫杉烷萜类评价分析具有重要意义。10-脱乙酰巴卡亭 III (10-deacetylbaccatin III, 10-DAB III) 为有抑制肿瘤作用的紫杉烷萜类化合物,有文献报道,利用它可合成比紫杉醇具有更高抗癌活性的 taxotere^[1]。本实验采用 HPLC 法对东北红豆杉 *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. 枝叶中 10-DAB III 含量进行测定,用于其质量控制并为新药研究开发提供依据。

1 仪器与试剂

Waters 600 型 HPLC 色谱仪 (Waters 600 泵, Waters 996 二极管阵列检测器), KQ 2200E 医用超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 电子分析天平 (日本岛津), 电热恒温水浴锅 (北京科学仪器厂)。

10-DAB III 对照品 (Sigma 公司产品, 纯度 > 95%), 东北红豆杉枝叶提取物 (黑龙江省红豆杉科技开发有限公司), 甲醇 (优级纯), 乙腈 (色谱纯), 二氯甲烷 (分析纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-水 (20:30:50), 检测波长为 233.9 nm, 流速为 0.8 mL/min, 柱温为 32 °C, 进样量为 10 μL。

2.2 对照品储备液的制备: 精密称取 10-DAB III 对照品 500 μg 于 10 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并定容, 即得对照品储备液 (47.5 μg/mL)。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取样品粉末 80 mg 于 250 mL 三角瓶中, 加入甲醇-二氯甲烷 (1:1) 50 mL 浸泡 24 h, 超声提取 40 min, 滤过, 残渣以甲醇冲洗 3 次, 合并滤液, 30 °C 水浴浓缩, 加入二氯甲烷-水 (1:1) 50 mL 萃取, 水层再以二氯甲烷萃取两次, 合并滤液于 30 °C 水浴挥干溶剂, 用 10 mL 甲醇溶解, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.4 方法的专属性: 在拟定的色谱条件下, 分别取对照品溶液和供试品溶液进样测定, 得到特征峰, 与杂质分离良好, 无干扰, 见图 1。

2.5 标准曲线及线性范围: 将对照品储备液依次稀释成 38, 28.5, 23.75, 19, 14.25, 9.5, 4.75 μg/mL 溶液, 每次进样 10 μL。以进样量对峰面积进行回归, 得方程: $Y = -9\ 162.057\ 4 + 4\ 740.329\ 6 X$, $r = 0.999\ 0$ 。可见 10-DAB III 在 0.004 75~0.038 μg 与

* 收稿日期: 2003-06-10

作者简介: 杜智敏 (1956—), 女, 哈尔滨人, 主任药师, 硕士研究生导师, 从事新药开发和人体生物利用度与药动学研究。

Tel: (0451) 86605353

* 通讯作者

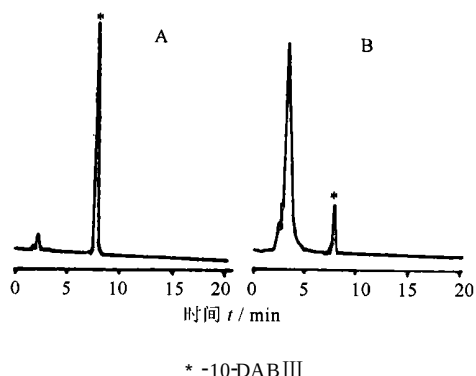


图1 10-DAB III对照品(A)和东北红豆杉枝叶提取物的HPLC图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of 10-DAB III reference substance (A) and *Taxus cuspidata* branches and leaves extract (B)

峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验: 取 $14.25 \mu\text{g/mL}$ 10-DAB III对照品溶液, 连续进样6次, 测定峰面积, 计算浓度, 结果浓度RSD为0.66% ($n=6$)

2.7 稳定性试验: 取供试品溶液1份, 每隔1h测定1次, 考察供试品溶液中10-DAB III含量变化。结果含量RSD为0.92% ($n=6$), 表明供试品溶液在5h内稳定。

2.8 重现性试验: 精密称取同一批样品6份, 平行制备6份供试品溶液, 进样测定, 10-DAB III含量为0.4233%, RSD为0.80% ($n=6$)。

2.9 回收率试验: 精密称取9mg样品粉末4份, 分别加9.5, 19, 28.5 $\mu\text{g/mL}$ 10-DAB III对照品溶液, 各1mL, 另一份做空白, 平行制备4份供试品溶液, 进样测定, 每份测3次, 结果平均回收率为100.5%, RSD为2.0% ($n=4$)。

2.10 样品的测定: 精密称取1批样品3份, 制备供

试品溶液, 进样测定, 结果10-DAB III的含量为0.4561% ($n=3$)。

3 讨论

3.1 本实验对检测波长、流动相系统、提取方法进行考察, 建立了HPLC测定东北红豆杉枝叶提取物中10-DAB III含量的方法。该方法简便、灵敏度高、专属性强, 未见报道。可用于红豆杉提取物中紫杉烷萜类10-DAB III的质量控制。

3.2 检测波长的选择: 10-DAB III对照品甲醇溶液在200~400nm波长中最大吸收波长在233.9nm, 故选233.9nm作为最大检测波长。

3.3 流动相的选择: 实验中选择了多种流动相体系, 包括不同配比的甲醇-水, 甲醇-乙腈-水, 乙腈-水等效洗脱及梯度洗脱, 结果以甲醇-乙腈-水(20:30:50)等效洗脱和乙腈-水梯度洗脱的分离效果较好, 但后者的重现性较差, 因此选甲醇-乙腈-水(20:30:50)作为流动相等效洗脱。

3.4 提取方法的选择: 实验中采用文献报道的提取方法^[2]将样品以甲醇-二氯甲烷研磨, 冷浸, 超声提取, 用水-二氯甲烷萃取。但测定结果的重现性差, 可能由于研磨后倾入冷浸容器的过程易造成误差。因此, 本实验采用甲醇-二氯甲烷冷浸24h后超声提取40min, 再以水-二氯甲烷萃取。本方法提取效果与前者相当, 且重现性好。

References:

- [1] Bissery M C, Guenad D, Voegelin G, *et al* Experimental antitumor activity of taxotere, a taxol analogue [J]. *Cancer Res*, 1991, 51 (18): 4845.
- [2] Gao S L, Zhu D N, Zhou R H, *et al* Content of the taxol and brevifolol in species of *Taxus* L. from east Asia and north America [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1995, 26(1): 8.

茜草提取工艺的研究

谭朝阳, 尤昭玲*

(湖南中医学院 中西医结合系, 湖南 长沙 410007)

摘要: 目的 优选茜草的最佳提取工艺。方法 比较渗漉法、浸渍法、加热回流法3种提取方式, 并采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以大叶茜草素含量和干浸膏收率为指标, 对影响茜草的乙醇加热回流提取工艺的因素水平进行了研究。结果 茜草的最佳提取工艺为用10倍量70%乙醇加热回流提取3次, 每次1h。提取次数影响差异具有显著性。结

* 收稿日期: 2003-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271633); 国家中医药管理局新药开发专项基金项目(01X046B)

作者简介: 谭朝阳(1970—), 男, 湖南郴州人, 1992年毕业于武汉大学生物化学专业后, 在湖南省药品检验所从事中药新药研究和质量分析, 1999年获湖南中医学院中药学硕士学位, 现为湖南中医学院2001级在读博士, 研究方向为: 妇产科中药新药研究与中药质量分析。Tel: (0731) 2290699 E-mail: tom tzy@mail china com