

应用单一组份作为质量控制指标的方法更科学、更准确。

3.2 由图2知留坝西洋参提取液中3个特征强峰的比值为1 0.54 1.13, 实验中还考察了吉林靖宇、北京怀柔、美国加拿大西洋参, 发现3个特征强峰的比值分别为1 2.35 1.54、1 0.79 0.51、1 1.10 1.08、1 1.27 1.62, 且总离子流图中不具备峰3位附近的组峰。实验共考察了7月份采集的4年生留坝西洋参主根10批, 批间3强峰RSD在1.60%~2.86%内。可见, 所建立的留坝西洋参药材的特征对应图, 能反映该药材的主根部位特征, 可用于该部位留坝西洋参药材的真伪鉴别。不同部位、不同采收季节该西洋参药材化学物质及其相关特征性的研究正在进行中, 结果将另文报道。

致谢: Agilent 科技有限公司 Donation 计划提

供所用仪器设备。

References:

- [1] Meng X Y, Li X G, Yu Y. Chemical constituents of flower buds of *Panax quinquefolium* L. cultivated in China [J]. *J Jilin Univ Agric* (吉林农业大学学报), 2000, 22(3): 1-8.
- [2] Tang J, Lu J. Application of HPLC/ELSD on quantitative determination of pseudoginsenoside F₁₁ in root of *Panax quinquefolium* L. [J]. *J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1999, 19(4): 241-243.
- [3] Li W K, Fitzloff F. HPLC with evaporative light scattering detection as a tool to distinguish Asian ginseng (*Panax ginseng*) and north American ginseng (*Panax quinquefolium*) [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2002, 25 (1): 17-27.
- [4] Zhou Y, Mo W J, Liu S Y. Application of ESI/MS/MS for the rapid determination of ginsenosidic mixture [J]. *Chem Bull* (化学通报), 1998 (2): 27-40.
- [5] Richard B. van Breemen et al. Determination of ginsenosidic mixture by HPLC-ESI/MS [J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res* (特产研究), 1997 (4): 48-52.

东北红豆杉枝叶 HPLC 指纹图谱研究

杜智敏¹, 陈瑞玲¹, 杨宝峰^{2*}

(1. 哈尔滨医科大学附属二院临床药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 哈尔滨医科大学 药理学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 目的 研究东北红豆杉枝叶中 HPLC 指纹图谱, 以便完整地反映东北红豆杉枝叶内在化学信息, 全面评价东北红豆杉内在质量。方法 采用高效液相色谱法分析东北红豆杉枝叶乙醇提取物。结果 建立了东北红豆杉指纹图谱, 对10批不同采收时间的东北红豆杉枝叶进行了指纹图谱分析, 得出主要共有峰相对保留时间, 相对峰面积作为东北红豆杉枝叶指纹谱相关技术参数。结论 东北红豆杉枝叶指纹图谱可用于评价其药材质量。

关键词: 东北红豆杉; HPLC 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R 282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0106-03

Analysis of *Taxus cuspidata* twigs and leaves by HPLC-FPS

DU Zhi-min¹, CHEN Rui-ling¹, YANG Bao-feng²

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

Abstract Objective To study the HPLC fingerprints (HPLC-FPS) *Taxus cuspidata* twigs and leaves (TCTL) for reflecting the internal chemical information and evaluating its internal quality of TCTL.

Methods HPLC was used to analyze the alcohol extracts of TCTL. **Results** The fingerprint of TCTL was established. HPLC-FPS of ten batches of *T. cuspidata* samples collected at different time were analysed and established. The correlation technical parameters of *T. cuspidata* were obtained, i.e. the main common peak with relative retention time and relative peak area. **Conclusion** The fingerprint can be used to evaluate the quality of TCTL.

Key words: *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.; HPLC-FPS; HPLC

紫杉醇作为疗效确切的抗肿瘤药物, 美国FDA

已于1992年正式批准上市。但紫杉醇在树木中含量

* 收稿日期: 2004-03-16

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

* 通讯作者 Tel: (0451) 86605353

很低,且生产紫杉醇的主要原料是红豆杉植物的树皮,这样会导致树木的死亡。我国东北红豆杉资源丰富,枝叶繁茂易于栽培。为合理开发植物资源,扩大药用部位,对东北红豆杉枝叶的化学成分及药理作用研究表明东北红豆杉枝叶中除含紫杉醇外,还含有较高的 cephalomannine、10-deacetylbaccatin III 等紫杉烷二萜类成分;其枝叶提取物二氯甲烷部分对人卵巢、结肠癌和人口腔上皮癌细胞株有明显抑制作用^[1]。临床上,以“达克素”为代表的东北红豆杉总提取物制剂疗效确切,而紫杉醇的含量却很低,且副作用很小。对红豆杉提取物制剂进行质控,仅以紫杉醇一种或几种成分为标准的含量测定显然难以准确、全面地评价其质量。笔者对东北红豆杉枝叶指纹图谱进行研究,以期为进一步提高质量,建立控制方法提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器:高效液相色谱仪(Waters 600E 泵、PDA 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)。

1.2 试药:乙腈(色谱纯,上海陆都化学试剂厂);甲醇(优级纯,北京化学试剂厂);蒸馏水(二重蒸馏水,本院制剂室制);其余试剂均为分析纯。10-deacetylbaccatin III (10-DAB III)对照品(Sigma 公司产品)。

1.3 药材:东北红豆杉枝叶产于黑龙江省哈尔滨市,本实验样品为黑龙江红豆杉科技开发公司提供的醇提取物,出膏率固定在一定范围。样品采收时间及编号:021005(1)、021026(2)、021117(3)、021130(4)、021229(5)、020205(6)、020301(7)、020311(8)、020219(9)、020429(10)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A (50% 乙腈) B (15% 乙腈), 梯度洗脱 0 100 $\xrightarrow{0\sim 15\text{ min}}$ 10 90 $\xrightarrow{15\sim 20\text{ min}}$ 25 75 $\xrightarrow{20\sim 40\text{ min}}$ 40 60 $\xrightarrow{40\sim 60\text{ min}}$ 50 50 $\xrightarrow{60\sim 80\text{ min}}$ 100 0; 体积流量:0.8 mL/min; 柱温:室温(25.5 °C); 检测波长:227 nm; 分析时间:80 min。

2.2 供试品溶液的制备:精密称取干燥至恒重的样品粉末 100 mg, 以 150 mL 二氯甲烷超声溶解, 滤过, 滤液以 150 mL 水萃取, 水层再以二氯甲烷萃取 2 次, 收集二氯甲烷层, 于 30 °C 水浴挥干溶剂, 残渣以 5 mL 甲醇溶解, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 制成供试

品溶液。

2.3 精密度的试验:取同一供试品溶液连续进样 5 次, 按上述色谱条件, 考察指纹图谱的精密度的结果, 各色谱峰相对保留时间稳定, 主要共有峰相对峰面积 RSD < 5%, 表明精密度良好。

2.4 重现性的试验:按样品溶液制备方法处理同一样品 5 份, 按上述色谱条件测定, 结果各色谱峰相对保留时间稳定, 主要共有峰相对峰面积 RSD < 5%, 表明实验方法的重复性良好。

2.5 稳定性的试验:取同一供试品溶液分别在 0、2、4、8、16 h 按上述色谱条件测定, 结果各色谱峰相对保留时间稳定, 主要共有峰相对峰面积 RSD < 5%, 表明样品溶液在 16 h 内稳定。

2.6 指纹图谱的测定

2.6.1 洗脱时间的确定:在选择指纹图谱的洗脱时间时, 记录了 120 min 的色谱峰。发现 80 min 之后指纹图谱中基本没有色谱峰出现。故将指纹图谱的洗脱时间初定为 80 min。

2.6.2 参照峰的选择:在东北红豆杉枝叶的指纹图谱中, 3 号峰所占的比例最大, 且较稳定, 因此选定 3 号峰为参照峰(S)。

2.6.3 不同采收时间指纹图谱的测定:精密称取干燥至恒重的样品(1) 100 mg, 按 2.2 项下方法制备供试品试液, 分别按 2.1 项下的色谱条件进行检测, 色谱图见图 1。

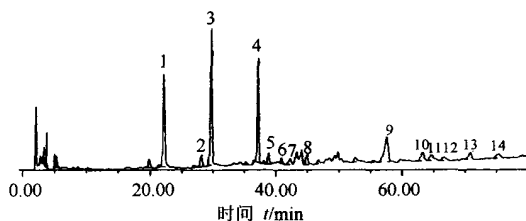
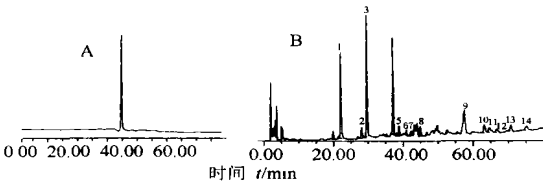


图1 东北红豆杉指纹图谱特征峰

Fig. 1 Fingerprint characteristic peak of *T. cuspidata*

2.6.4 指纹图谱色谱峰的标定:称取 10-DAB III 对照品适量, 加入甲醇稀释成对照品溶液, 供 HPLC 进样测定, 按 2.1 项下条件进行实验, 色谱图见图 2。通过对照品与样品图比较, 对样品图中色谱峰进行标定, 样品色谱图中 8 号峰为 10-DAB III 的色谱峰。

2.6.5 指纹图谱的技术参数:通过对 10 个不同采收时间东北红豆杉枝叶指纹图谱的测定, 比较其色谱图, 确定了 14 个色谱峰为各采收时间样品的共有峰, 其中峰面积大于或等于 5% 总峰面积的峰有 4 个, 分别为 1、3、4、9 号。对各指纹图谱中共有峰的相对保留时间/相对峰面积进行统计, 计算结果见表 1。



A-10-DAB III对照品 B-样品
A-reference substance of 10-DAB III B-sample

图 2 指纹图谱特征峰的标定

Fig. 2 Marker of fingerprint characteristic peak of *T. cuspidata*

表 1 指纹图谱共有峰相对保留时间/相对峰面积

Table 1 Relative retention time/relative area of common peaks in samples' fingerprints

峰号	相对保留时间/相对峰面积									
	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10
1	0.734/0.497	0.733/0.655	0.734/0.705	0.734/0.638	0.732/0.638	0.734/0.632	0.733/0.664	0.733/0.578	0.733/0.711	0.733/0.648
2	0.914/0.100	0.915/0.112	0.915/0.111	0.911/0.114	0.915/0.102	0.915/0.119	0.916/0.111	0.911/0.100	0.915/0.109	0.914/0.113
3	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
4	1.230/0.72	1.229/0.784	1.229/0.627	1.229/0.820	1.230/0.673	1.229/0.704	1.231/0.679	1.231/0.667	1.229/0.680	1.230/0.673
5	1.280/0.070	1.280/0.093	1.279/0.083	1.282/0.091	1.281/0.070	1.278/0.097	1.281/0.083	1.282/0.076	1.279/0.080	1.282/0.086
6	1.341/0.046	1.342/0.065	1.343/0.041	1.343/0.052	1.340/0.047	1.340/0.051	1.344/0.053	1.344/0.051	1.345/0.054	1.345/0.050
7	1.407/0.054	1.406/0.070	1.406/0.061	1.405/0.070	1.406/0.054	1.405/0.074	1.405/0.062	1.408/0.054	1.407/0.057	1.408/0.076
8	1.504/0.075	1.504/0.104	1.504/0.071	1.504/0.099	1.504/0.082	1.502/0.092	1.504/0.072	1.507/0.065	1.504/0.069	1.056/0.093
9	1.946/0.497	1.947/0.627	1.946/0.417	1.947/0.661	1.946/0.449	1.946/0.568	1.946/0.408	1.946/0.388	1.947/0.374	1.947/0.425
10	2.136/0.121	2.137/0.157	2.132/0.117	2.137/0.169	2.132/0.135	2.137/0.155	2.136/0.102	2.137/0.097	2.134/0.092	2.135/0.138
11	2.180/0.069	2.184/0.097	2.177/0.089	2.184/0.107	2.177/0.108	2.178/0.070	2.182/0.054	2.182/0.078	2.180/0.097	2.175/0.100
12	2.148/0.070	2.251/0.052	2.245/0.059	2.251/0.049	2.245/0.048	2.246/0.055	2.251/0.051	2.251/0.028	2.245/0.036	2.248/0.115
13	2.420/0.055	2.424/0.088	2.419/0.085	2.424/0.093	2.419/0.065	2.419/0.092	2.419/0.094	2.422/0.061	2.419/0.078	2.419/0.110
14	2.530/0.148	2.535/0.072	2.533/0.075	2.535/0.170	2.530/0.160	2.533/0.141	2.533/0.083	2.535/0.061	2.530/0.077	2.530/0.181

3 讨论

3.1 供试液制备方法的选择: 精密称取干燥至恒重的供试品粉末 4 份, 每份 100 mg, 分别以如下方法处理。

方法 1: 以 150 mL 甲醇超声溶解, 滤过; 方法 2: 以 150 mL 二氯甲烷超声溶解, 滤过, 滤液加入 150 mL 水萃取, 水层再以二氯甲烷萃取 2 次, 收集二氯甲烷层; 方法 3: 以 150 mL 醋酸乙酯超声溶解, 滤过, 滤液加入 150 mL 水萃取, 水层再以醋酸乙酯萃取 2 次, 收集醋酸乙酯层; 方法 4: 以 150 mL 石油醚溶解, 滤过, 滤液加入 150 mL 水萃取, 水层再以石油醚萃取 2 次, 收集石油醚层。

溶液于 30℃ 水浴挥干, 残渣以 5 mL 甲醇溶解, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 供 HPLC 色谱仪进样。结果

表明, 各采收时间样品中共有峰的相对保留时间非常接近, RSD 在 0.061%~0.311%, 进一步证明了各共有峰选择的准确性。技术参数: 共有峰相对保留时间: 1 (0.733±0.001)、2 (0.914±0.001)、3 (1)、4 (1.230±0.001)、5 (1.280±0.002)、6 (1.343±0.003)、7 (1.406±0.002)、8 (1.504±0.003)、9 (1.946±0.001)、10 (2.135±0.003)、11 (2.180±0.005)、12 (2.248±0.003)、13 (2.420±0.004)、14 (2.532±0.003)。大于 5% 共有峰相对面积: 1 (0.614±0.07)、3 (1)、4 (0.711±0.04)、9 (0.418±0.18)。

表明, 方法 1 色谱重叠严重, 无法辨认, 方法 3、4 色谱峰丢失较多, 方法 2 所得图谱的色谱峰数量较多, 分离度和重现性较好, 因此采用方法 2 的制备方法。

3.2 10 个不同采收时间的东北红豆杉枝叶指纹图谱中, 主要峰群的整体图貌基本一致, 但各成分含量的相对比值有较大差别。

3.3 本实验目前只获得 10 个不同采收时间样品, 采用 HPLC 法, 进行指纹图谱分析, 所获得的信息显然是不全面的, 只能作为东北红豆杉质量评价的一个参考, 收集更多有代表性的样品进行测定, 获得更全面的信息, 能使东北红豆杉质量评价更为完善。

References

[1] Tong X J, Wang W S, Zhou J Y. Studies on the chemical constituents of leaves and twigs of *Taxus cuspidata* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1994, 29(1): 55-60.