

维药红豆杉质量控制研究及建议

严丽¹, 谢莉¹, 冯春蕾¹, 于新兰^{1*}, 吴光翠¹, 张金魁², 林鹏程² (1. 新疆维吾尔自治区药品检验研究院, 中药(维药)质量控制重点实验室, 乌鲁木齐 830054; 2. 青海民族大学药学院, 西宁 810007)

摘要 目的: 研究维药红豆杉药材的质量控制方法并对质量标准提出建议。方法: 采用硅胶G薄层色谱板, 以紫杉醇、10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ和红豆杉对照药材为对照, 建立薄层色谱鉴定方法; 依照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则相关规定对红豆杉药材的水分、总灰分、酸不溶性灰分进行检查, 测定其醇溶性浸出物的含量; 采用高效液相色谱法建立红豆杉特征性成分紫杉醇的含量测定方法。结果: 建立的红豆杉薄层色谱专属特征显著。药材水分含量为4.3%~7.0%, 总灰分为2.4%~5.4%, 酸不溶性灰分为0.2%~1.8%, 醇溶性浸出物含量为14.0%~35.4%。紫杉醇含量在6.70~80.44 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($r=0.9998$) 线性关系良好, 加样回收率平均为99.3%。15批红豆杉药材中紫杉醇含量为0.003%~0.024%。结论: 建立的红豆杉质量控制方法简便、重复性和专属性良好, 研究结果可为红豆杉质量控制及标准的制修订提供一定参考。

关键词: 红豆杉; 质量标准; 薄层色谱; 高效液相色谱; 紫杉醇、10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)03-0321-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.03.010

Research and Suggestions on Quality Control of Uygur Medicine *Taxus Chinensis* Herba

Yan Li¹, Xie Li¹, Feng Chunlei¹, Yu Xinlan^{1*}, Wu Guangcui¹, Zhang Jinkui², Lin Pengcheng² (1. Xin Jiang Institute of Drug Control, Key Laboratory of Quality Control of Traditional Chinese Medicine (Uygur Medicine), Urumqi 830054, China; 2. College of Pharmacy, Qinghai Minzu University, Xining 810007, China)

Abstract Objective: To study the quality control methods of the medicinal materials of *Taxus chinensis*, a Uygur medicine, and put forward suggestions on quality standards. **Methods:** The TLC identification method was established with silica gel G thin layer plate, paclitaxel, 10-deacetylbatatine III and *Taxus chinensis* were used as the control substance. According to the four general principles of The *Chinese Pharmacopoeia* (2020 edition), the water content, total ash content and acid insoluble ash content of *Taxus chinensis* were examined, and the content of alcohol-soluble extract was determined. A HPLC method was established for the determination of taxol, the characteristic component of *Taxus chinensis*. **Results:** The established TLC features of *Taxus chinensis* were significant. The medicinal materials contents of water, total ash, acid insoluble ash and alcohol soluble extract ranged from 4.3% to 7.0%, 2.4% to 5.4%, 0.2% to 1.8%, 14.0% to 35.4%. The linear relationship of paclitaxel

基金项目: 青海省自然科学基金项目-面上项目(编号 2019-ZJ-905)

作者简介: 严丽 Tel: 18160606077; E-mail: 843392361@qq.com

通信作者: 于新兰 Tel: 13999298568; E-mail: 69820635@qq.com

content was 6.70-80.44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9998$), and the average recovery was 99.3%. The content of paclitaxel in 15 batches of *Taxus chinensis* was 0.003%-0.024%. **Conclusion:** The established quality control methods of *Taxus chinensis* was simple repeatability and specificity. The results of the study could provide some reference for the quality control and standard establishment of *Taxus chinensis*.

Keywords: *Taxus Chinensis* Herba; quality standard; TLC; HPLC; paclitaxel; 10-deacetylbaicatin III

红豆杉为红豆杉科植物喜马拉雅红豆杉 *Taxus wallichiana* Zucc. 的干燥枝及叶, 是维吾尔医学常用药材, 又称西藏红豆杉、云南红豆杉, 具有消除异常体液、强心助食健脑、爽神悦志、温胃益肝等功效, 临床多用于神经衰弱、心悸气短、咳嗽气喘、食欲不振、消化不良等^[1]。文献报道, 红豆杉主要含有紫杉烷类化合物(紫杉烷类二萜及其二萜生物碱等)^[2-3]、非紫杉烷类化合物(吴茱萸次碱、黄酮类化合物及山柰素等)^[4]及紫杉醇的结构类似物(羟基巴卡亭等)^[5]等成分。现代药理研究显示, 红豆杉中所含的紫杉醇具有显著的抗肿瘤活性作用, 能有效抑制多种癌细胞的生长, 临床上常与其他药物联合使用从而抑制肿瘤细胞的增殖^[6-8]。

红豆杉质量标准收载于《卫生部药品标准·维吾尔药分册》^[1], 该标准仅收载了性状、显微鉴别, 缺乏薄层色谱(Thin Layer Chromatography, TLC)鉴别和专属性成分的含量测定。目前, 对红豆杉药材的生药学研究较少^[9-16], 这些研究进行了性状、显微鉴别和薄层色谱鉴别; 王欢等^[15]对紫杉醇成分进行了定量分析, 但使用的液相色谱-质谱联用技术普及性尚待提高; 其中吴孟华等^[16]还建立了10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ的含量测定方法, 但该成分只是红豆杉有效成分紫杉醇的前体成分, 该研究并未对紫杉醇进行质量控制; 此外, 这些研究缺乏对红豆杉药材的水分、总灰分、醇溶性浸出物等项目的结果和数据。本研究依照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则相关要求, 对红豆杉的质量控制进行了较为全面的研究, 包括水分、总灰分、醇溶性浸出物的测定, 建立了同时控制紫杉醇、10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ和红豆杉对照药材的薄层色谱鉴别方法, 采用高效液相色谱(High Performance

Liquid Chromatography, HPLC)法建立了红豆杉药材有效成分紫杉醇的含量测定方法, 首次建立了完备、专属的红豆杉质量方法, 并提出了质量标准建议, 以期对红豆杉药材的质量控制提供合理的参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT高效液相色谱仪(岛津公司); BX-51TF生物显微照相系统(OLYMPUS公司); AZ100 多功能变焦显微镜(Nikon公司); HM525 NX 冷冻切片仪(Thermo Fisher公司); MFLC-7/10D高温炉(武汉晟睿明科学仪器有限公司); GZX-9140 MBE数显鼓风干燥箱(上海博迅医疗器械设备公司); CAMAG REPROSTAR3薄层色谱成像系统(卡玛公司); KLZ-UP超纯水仪(台湾艾柯成都康宁实验专用纯水设备厂)。KUDOS SK7210LHC型超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 药物与试剂

甲醇、乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 环己烷、乙酸乙酯、正己烷、二氯甲烷、三氯甲烷、三乙胺、甲酸、冰醋酸等试剂均为分析纯; 硅胶G薄层预制板(烟台市化学工业研究所); 对照品紫杉醇(批号100382-200301)和三尖杉宁碱(批号100926-201503)购于中国食品药品检定研究院; 10-脱乙酰巴卡丁Ⅲ(批号D807089)购于海麦克林公司; 红豆杉对照药材(批号20200609)为自制。

15批红豆杉样品经新疆维吾尔自治区药品检验研究院苏来曼·哈力克主任药师鉴定为红豆杉科植物喜马拉雅红豆杉 *Taxus wallichiana* Zucc. 的干燥枝及叶。具体信息见表1。

表1 红豆杉药材信息表

编号	产地	供样单位	批号
1	巴基斯坦	新疆恩萨尔维吾尔药业有限公司	20170504
2	巴基斯坦	新疆恩萨尔维吾尔药业有限公司	20170420
3	巴基斯坦	新疆买提牙孜生物科技有限公司	20170902
4	巴基斯坦	新疆买提牙孜生物科技有限公司	20170901
5	巴基斯坦	喀什市库尔班江调料店	20171003
6	巴基斯坦	新疆恩萨尔维吾尔医饮片药业有限公司	HDS-YP-170504
7	巴基斯坦	新疆恩萨尔维吾尔医饮片药业有限公司	HDS-YP-180202
8	巴基斯坦	新疆恩萨尔维吾尔医饮片药业有限公司	HDS-YP-180411
9	巴基斯坦	新疆麦迪森维药有限公司饮片厂	Q30036101
10	巴基斯坦	新疆麦迪森维药有限公司	Q30036102
11	巴基斯坦	新疆麦迪森维药有限公司	Q30036103
12	巴基斯坦	新疆恩萨尔维吾尔医饮片药业有限公司	20180512
13	巴基斯坦	新疆恩萨尔维吾尔医饮片药业有限公司	20190321
14	巴基斯坦	新疆恩萨尔维吾尔医饮片药业有限公司	20190615
15	巴基斯坦	新疆恩萨尔维吾尔医饮片药业有限公司	20190819

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备

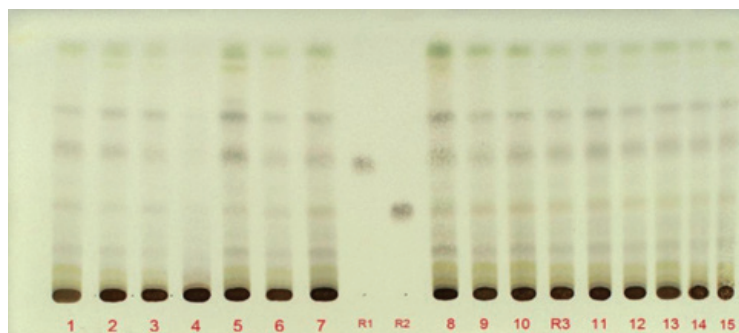
取红豆杉药材粉末1 g, 置具塞试管中, 加入甲醇3 mL超声处理20 min, 静置, 取上清液作为供试品溶液。

2.1.2 对照药材和对照品溶液的制备

取红豆杉对照药材1 g, 同“2.1.1”项方法制成对照药材溶液。再取紫杉醇对照品、10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ对照品, 加甲醇分别制成每1 mL各含0.5 mg的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.3 色谱条件

按照《中华人民共和国药典》2020年版通则(0502)试验。吸取供试品和对照药材溶液各5~8 μ L、对照品溶液各2 μ L, 分别点于同一硅胶G薄层色谱板上, 以环己烷-二氯甲烷-甲醇-三乙胺(4:3:0.5:1, v/v)为展开剂展开, 取出, 晾干。喷以2%香草醛硫酸溶液, 在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。日光下, 供试品色谱中, 在与对照药材及对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点, 见图1。



1~7. 样1~7#; 8~15. 样8~15#; R1. 紫杉醇; R2. 10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ; R3. 对照药材。

图1 15批红豆杉样品 TLC 图

2.2 检查

取15批药材粉末过二号筛,精密称定,按照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则测定水分(烘干法,0832)、总灰分及酸不溶性灰分(2302)、醇溶性浸出物(热浸法,2201),对15批红豆杉药材进行测定,每批样品平行测定2份。

由结果可得,15批红豆杉药材水分含量为4.3%~7.0%,平均值为5.5%;总灰分含量为2.4%~5.4%,平均值为3.8%;酸不溶性灰分为0.2%~1.8%,平均值为0.8%;醇溶性浸出物含量为14.0%~35.0%,平均值为25.9%($n=15$)。若按照均值的120%设限,建议红豆杉药水分应不得过7.0%、总灰分应不得过5.0%、酸不溶性灰分应不得过1.0%、醇溶性浸出物应不得少于20.0%。

2.3 含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备

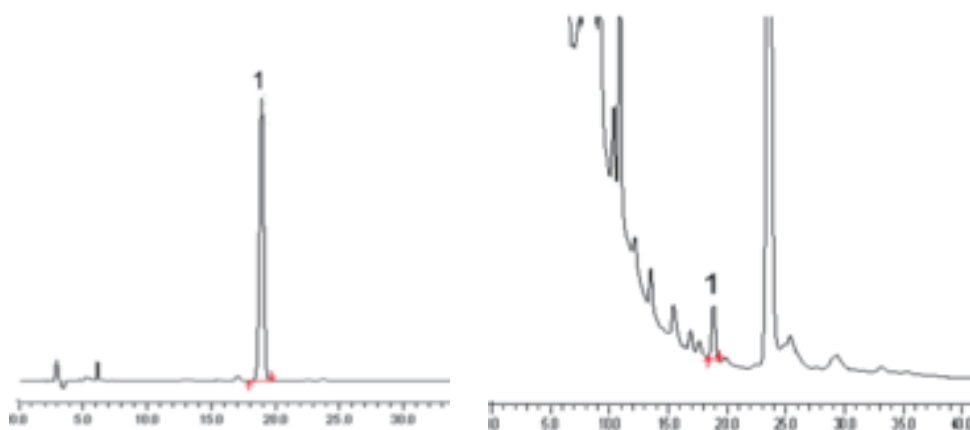
取药材粉末(过3号筛)约2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称量,超声处理30 min,放至室温,再称量,用甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.2 对照品储备液的制备

精密称取紫杉醇对照品0.01342 g,置50 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得0.2681 mg·mL⁻¹储备液。

2.3.3 色谱条件

CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm);流动相为甲醇-乙腈-水(23:36:41),检测波长227 nm,柱温30℃,进样量10 μL。HPLC色谱图见图2。



A: 对照品; B: 供试品; 1: 紫杉醇。

图2 供试品和对照品溶液的HPLC图

2.3.4 线性关系

精密吸取“2.3.2”项对照品储备液,制成紫杉醇为6.70、13.41、26.81、40.22、53.63、67.03、80.44 μg·mL⁻¹的系列浓度作为对照品标准工作液,按照“2.3.3”项色谱条件各进样10 μL,测定峰面积,以浓度(x , μg·mL⁻¹)为横坐标,峰面积 y 为纵坐标进行回归,得到回归方程: $y=23192x-22899$ ($r=0.9998$)。结果表明,紫杉醇成分在6.70~80.44 μg·mL⁻¹范围内,有良好的线性关系。

2.3.5 仪器精密度试验

取“2.3.4”项40.22 μg·mL⁻¹的紫杉醇对照品,按照“2.3.3”项色谱条件连续进样5次,记录

峰面积。结果紫杉醇的RSD($n=5$)为0.65%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验

取红豆杉药材粉末适量,按“2.3.1”项方法制备供试品溶液6份,按“2.3.3”项色谱条件进样测定,记录峰面积。结果紫杉醇峰面积RSD($n=6$)为2.7%,本测定方法的重复性良好。

2.3.7 稳定性试验

取红豆杉药材粉末适量,按“2.3.1”项方法制备供试品溶液,室温下放置,于0、2、4、6、8、12、24 h进样,记录峰面积。结果紫杉醇峰面积RSD为2.7%,表明供试品溶液在室温下24 h内稳定。

2.3.8 加样回收试验

取已知含量的红豆杉药材粉末6份,每份各2.0 g,精密称定,按重复性结果计算出来的紫杉醇含量,分别加入100%紫杉醇对照品各6份,按“2.3.1”项方法平行制备供试品溶液,按照“2.3.3”项色谱条件进样测定,并计算回收率,结果见表3。由表3可知加样回收率($n=9$)为99.3%,其($n=9$)RSD为2.5%,符合《中华人民共和国药典》2020年版第四部要求。

2.3.9 供试品的测定

精密称取15批红豆杉药材粉末,按“2.3.1”项方法制备供试品溶液,按照“2.3.3”项色谱条件进样测定,使用外标法计算红豆杉药材中紫杉醇的含量。结果15批红豆杉药材中除4号样品(批号20170901)紫杉醇含量仅为0.0030%,其他均在0.010%~0.024%,平均值为0.010%($n=15$)。故建议将红豆杉药材中紫杉醇含量暂定为0.010%。

3 讨论

3.1 指标成分的选择

红豆杉主要含有紫杉烷类化合物、非紫杉烷类化合物、及紫杉醇的结构类似物,其中紫杉醇是抗肿瘤的主要活性成分,能有效抑制各种癌细胞的增殖,而10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ是合成紫杉醇和多烯紫杉醇的前体产品,故选择紫杉醇和10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ为TLC鉴别的测定指标。在前期预实验中相同TLC条件下,样品中10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ斑点较紫杉醇并不显著,且紫杉醇为红豆杉药材主要的药效成分,因此只选择紫杉醇为含量测定指标进行对样品定量分析。

3.2 TLC色谱方法的考察

有文献报道,红豆杉中含有三尖杉宁碱可用于合成紫杉醇,但在预试验中发现三尖杉宁碱与样品无稳定对应的斑点,故放弃该对照品。此外,本试验还考察了10种不同展开剂(二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸、甲醇-三氯甲烷、环己烷-二氯甲烷-甲醇-三乙胺)等;显色剂(5%硫酸乙醇溶液、5%香草醛硫酸溶液、2%香草醛硫酸溶液)、点样量(2、5、10 μL)、薄层色谱板厂家(青岛海洋、烟台江友、烟台市化学工业研究所)等条件,最终确立了该鉴别方法。

3.3 浸出物测定方法的考察

前期预试验中先以水和乙醇为溶剂,分别进

行冷浸法、热浸法提取,结果采用乙醇为溶剂,热浸法浸出物的含量较高。随后又考察50%、70%、95%乙醇水溶液为溶剂,采用热浸法提取,发现50%乙醇水溶液为提取溶剂时,浸出物的量最高。因此,确定热浸法,50%乙醇水溶液为提溶剂,并对15批红豆杉药材浸出物的含量进行测定。

3.4 HPLC测定方法的考察

经HPLC测定发现,样品中紫杉醇的含量很低,可能是因为红豆杉由于其基原不同,所含的紫杉醇含量不同,在其根、茎皮和枝叶中可提取很少量,天然紫杉醇主要是从新鲜的红豆杉树皮中提取,然而红豆杉的资源情况比较复杂,天然资源较少,大部分列入为国家濒危植物一级保护品种,人工栽培数量较小,故本试验中红豆杉药材的紫杉醇含量很低。本实验还对不同柱温(25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)、色谱柱(CAPCELL PAK C_{18} 、Insert Sustain AQ-G8、Insert Sustain AQ-G8)、提取时间(20、30、40 min)等条件进行考察,最终确定样品的提取和测定方法。

3.5 样品和对照药材

红豆杉是维吾尔医常用药材,目前在新疆等民族地区使用较多,而这些地区的维吾尔医疗机构使用的红豆杉基本上都进口自巴基斯坦等国,因此本研究所用样品均为国外产地。未来将收集国内产地的红豆杉,进行下一步的研究。

本研究来源于国家药典委员会标准提高项目,根据项目要求本研究使用的对照药材是按照中国食品药品检定研究院对照药材相关技术指南和规程来制备和标定的,因此可保证该对照药材的准确性和科学性。

3.6 该质量控制研究对监管的意义

近年来,随着国家对民族医药的关注度和研发投入的提高,以及民族医药独特而有效的临床疗效,全社会对民族医药的接受度越来越高。但是民族医学理论体系的现代化水平还不高,民族药质量标准极为落后的现状很大程度上制约了民族医药的进一步推广和应用。以红豆杉为例,该药材虽已收载于法定标准:《卫生部药品标准·维吾尔药分册》,但该标准颁布于1998年,仅有性状和显微鉴别项,其专属性、标准化程度和现代化程度都较低,本研究增加了专属的质量控制方法,增加了更多的检查项,从而大幅提高了质量标准的整体技术

水平,有力地保障了市场上该药材的整体质量,为提升维吾尔医药的监管水平和促进维吾尔医药的发展提供了技术支持。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准维·吾尔药分册[S]. 1998: 32.
- [2] 杨春, 汪俊松, 孔令义. 加拿大红豆杉化学成分的研究进展及前景探讨[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1160-1173.
- [3] 孟爱平, 李娟, 濮社班. 红豆杉属植物化学成分及药理作用研究新进展[J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(2): 47-51.
- [4] 王楷婷, 李春英, 倪玉娇, 等. 红豆杉的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 黑龙江医药, 2017, 30(6): 1196-1199.
- [5] 程奇蕾, 梁敬钰. 云南红豆杉的化学成分研究及1-去羟基巴卡亭Ⅵ的结构修饰[J]. 海峡药学, 2008(10): 84-86.
- [6] 王楠楠, 黄飞华. 红豆杉有效成分及其药理作用研究进展[J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(8): 621-623.
- [7] 朱雯婷, 陈亦清, 刘晓敏, 等. 褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌SKOV3细胞增殖抑制及凋亡作用的相关机制研究[J]. 中南药学, 2021, 19(8): 1519-1523.
- [8] 张静芳. 贝伐珠单抗联合紫杉醇与卡铂化疗方案治疗晚期卵巢癌患者的临床效果[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(12): 124-127.
- [9] 林仕榕, 赵秀贞, 高水英. 三尖杉(粗榧科)和长叶榧(红豆杉科)的生药鉴别[J]. 武夷科学, 1984, 4: 51-53.
- [10] 王冰, 郑红月, 肖晶, 等. 东北红豆杉的生药鉴定[J]. 中草药, 1998(4): 267-269.
- [11] 王晓丽, 欧阳贤明, 王晓多. 红豆杉的生药学初探[J]. 贵阳医学院学报, 2000(2): 137-138, 141.
- [12] 符德欢, 李学芳, 赵彩肖, 等. 三种栽培红豆杉的生药学研究[J]. 云南中医学院学报, 2011, 34(4): 39-44.
- [13] 姚晓. 南方红豆杉枝叶紫杉烷类成分的生物转化研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [14] 金卓, 康帅, 张继. 南方红豆杉的生药学再研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(2): 164-166.
- [15] 王欢. 山东威海红豆杉的生药学研究以及水提液安全性评价[D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [16] 吴孟华, 彭依航, 马志国, 等. 红豆杉的生药学研究[J]. 中药材, 2021, 44(12): 2808-2812.

(收稿日期 2022年7月7日 编辑 肖妍)