

## 改进的 HPLC 法测定红豆杉植物和细胞培养物中紫杉醇的含量

黄巧明

(梅雁生物工程研究所, 广东 梅州 514731)

**Determination of taxol content in plant and cell cultures of *Taxus* spp. by improving HPLC method** HUANG Qiao-ming (Meiyan Institute of Biotechnology, Meizhou 514731, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2002, 11(1): 53-54

**Abstract:** Taxol content from the branches and leaves of *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemeé et Lévl.) Cheng et L. K. Fu and its cell cultures was analyzed by using Nova-Pak C<sub>18</sub> column and improving the proportion of mobile phase (methanol/acetonitrile/water) and modifying column temperature at a wavelength of 227 nm. The improved HPLC method is celerity, nicety and delicacy. The lowest detectable quantity of taxol could reach 0.005 µg.

**关键词:** HPLC; 紫杉醇; 南方红豆杉; 中国红豆杉; 细胞培养物

**Key words:** HPLC; taxol; *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemeé et Lévl.) Cheng et L. K. Fu; *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.; cell cultures

中图分类号: S567.1<sup>+</sup>9; O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2002)01-0053-02

紫杉醇(Taxol)是一种新型的抗癌药物。由于紫杉醇在红豆杉属(*Taxus* L.)植物中的含量很低,而且运用植物细胞培养技术生产紫杉醇仍处实验阶段,因此,对于紫杉醇含量甚微的样品,寻找一种精确、灵敏、快速的检测方法就显得尤为重要。本实验采用改进的 HPLC 法对南方红豆杉[*Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemeé et Lévl.) Cheng et L. K. Fu]枝和叶,以及中国红豆杉[*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.]细胞培养物中的紫杉醇含量进行了测定。

### 1 实验方法

#### 1.1 实验材料

南方红豆杉枝和叶取自广东梅县人工栽培的 4 年生植株,细胞培养物(细胞和培养液)由梅雁生物工程研究所培养并提供。

Waters HPLC 系统;2487 双波长紫外吸收检测器,515 高压泵,柱温箱。IBM 计算机,WDL-95 色谱工作站(大连化学物理研究所)。

样品提取用甲醇、二氯甲烷和正己烷(广州化学试剂厂)均为分析纯,HPLC 系统用色谱级试剂甲醇、乙腈(浙江黄岩化工实验厂),水为纯净水。紫杉醇标准品购于 SIGMA 公司,纯度 98%。

#### 1.2 色谱条件比较试验

参照甘炳远等及熊杰等的方法<sup>[1,2]</sup>,以不同流动相(甲醇、乙腈、醋酸铵和水)和柱温(25℃、30℃和 35℃)组成 5 组色谱条件进行比较试验(表 1)。

#### 1.3 样品的预处理以及制备

1.3.1 红豆杉枝和叶样品的制备 精确称取广东梅县地区栽培的 4 年生南方红豆杉枝和叶干粉 18 g,加 100 mL 的甲醇浸泡 24 h 以上,然后用超声波振荡 15 min,干粉用滤纸过滤,滤液加 100 mL 蒸馏水和 200 mL 正己烷萃取 3 次,去除正己

烷溶液(蜡质、色素等杂质部分),然后再加 200 mL 二氯甲烷萃取 3 次,收集二氯甲烷溶液减压浓缩至干,甲醇溶解洗脱并定容 250 mL 摇匀,用 0.45 µm 滤膜过滤,得红豆杉枝和叶样品制备液。

1.3.2 红豆杉细胞及培养液样品的制备 精确称取中国红豆杉冻干细胞粉 0.25 g,加 20 mL 甲醇浸泡 24 h 以上,然后用超声波振荡 15 min,细胞用滤纸过滤,滤液减压浓缩至干,加 10 mL 二氯甲烷和 10 mL 蒸馏水萃取 3 次,收集二氯甲烷溶液浓缩至干,用甲醇溶解洗脱并定容 10 mL。准确量取培养液 5 mL,直接加 5 mL 二氯甲烷萃取 3 次,收集二氯甲烷溶液浓缩至干,用甲醇溶解洗脱并定容 5 mL。用 0.45 µm 滤膜过滤得红豆杉细胞及培养液样品制备液。

#### 1.4 样品的测定

取红豆杉枝和叶、细胞及培养液制备液,采用较佳色谱条件进行紫杉醇含量 HPLC 分析,进样量均为 5 µL。

## 2 实验结果

### 2.1 色谱条件选择

色谱条件的比较试验结果见表 1。可以看出,方法 1 保留时间太长;方法 2 保留时间为 14 min,但加入缓冲液容易在柱内或管道中析出盐,增加洗脱难度,分析样品后必须用纯水冲洗整个系统,否则柱会堵塞,缩短柱寿命;方法 4 虽保留时间最短,但分离效果不佳。而方法 3 和 5 不仅分离效果好,而且保留时间短,其中方法 5 尤佳。

因此,实验选择的色谱条件为 Nova-Pak C<sub>18</sub> (3.9mm ×

收稿日期: 2001-04-08

基金项目: 梅雁经济发展公司资助

作者简介: 黄巧明(1967-),女,广东梅县人,大专,助工,主要从事液相色谱分析工作。

表 1 HPLC 法分离紫杉醇的主要色谱条件比较<sup>1)</sup>

Table 1 Comparison of main chromatography conditions in isolation of taxol by HPLC

方法序号 No. of method	流动相 Mobile phase	流速 Flow rate (mL/min)	柱温 Column temperature(°C)	保留时间 Retention time (min)
1	V(甲醇 methanol):V(乙腈 acetonitrile):V(水 water) = 2:3:8.5	1	30	18.5
2	V(乙腈 acetonitrile):V(甲醇 methanol):V(0.1 mol/L 醋酸铵 ammonium acetate) = 21:21:58	1	25	14.0
3	V(甲醇 methanol):V(乙腈 acetonitrile):V(水 water) = 28:27:45	1	30	14.0
4	V(甲醇 methanol):V(乙腈 acetonitrile):V(水 water) = 30:29:41	1	30	8.9
5	V(甲醇 methanol):V(乙腈 acetonitrile):V(水 water) = 29:27:44	1	35	10.5

<sup>1)</sup> 方法 1 和 2 为参考文献[1]和[2]的方法 method 1 and 2 from references [1] and [2]

150mm)色谱柱,流动相:V(甲醇):V(乙腈):V(水) = 29:27:44,柱温 35°C,流速 1 mL/min,检测波长 227 nm,灵敏度 0.05 AUFs。

## 2.2 紫杉醇浓度与峰面积的相关性

取浓度为 0.11、0.055、0.022、0.011 和 0.0055 mg/mL 的紫杉醇标准溶液各 5  $\mu$ L,按上述色谱条件依次进样分析,以测得的峰面积对紫杉醇浓度作图得标准曲线,其回归方程为:

$$Y = (2.797 \times 10^7) X - 42190.852 \quad r = 1.0000$$

紫杉醇在 0.005 ~ 0.7  $\mu$ g 范围内呈良好线性关系,紫杉醇浓度与峰面积间相关性极为显著。

## 2.3 精密度实验

精密量取标准品溶液 5  $\mu$ L 注入色谱仪,重复测定 5 次,紫杉醇标准品的峰面积积分值的 RSD 为 0.52%。

## 2.4 回收率试验

准确量取已知含量的细胞培养液 10 mL,精密加入 0.035 52 mg 紫杉醇标准品,按样品制备及测定方法进行定量分析,测得加样回收率为 97.76% (n=5),RSD 为 2.18%。

## 2.5 样品量的选择

在保证定量准确的前提下,应选择最少的样品量。因为在处理样品时,样品量少不但可以节约溶剂,而且在溶液萃取时,即使产生乳化现象,也较容易分离,同时,选择低的进样量,可延长色谱柱的寿命。本实验检测器处于高灵敏度 (0.05 AUFs) 下工作,最低检出量可达 0.005  $\mu$ g,而有关文献报道一般都在 0.02  $\mu$ g 以上。本实验进样体积统一选择 5  $\mu$ L,以 5  $\mu$ L 的定量环进样,使峰面积更有重现性。如果选择大的进样体积,则会引起涡流现象,致使峰变形。

## 2.6 红豆杉枝和叶、细胞及细胞培养液中紫杉醇的含量

采用方法 3 [流动相为 V(甲醇):V(乙腈):V(水) = 28:27:45,柱温 30°C] 和方法 5 [流动相为 V(甲醇):V(乙腈):V(水) = 29:27:44,柱温 35°C],分别测定南方红豆杉枝和叶以及梅雁生物工程研究所培养的中国红豆杉细胞培养物(细胞和培养液)中的紫杉醇含量,结果见表 2。2 种方法测定同种样品的紫杉醇含量基本一致,而方法 5 却减少约 3.5 min 的分析时间,由于流速仍是 1 mL/min,因此 HPLC 级试剂用量相应减少。由此可见,方法 5 不但加快检测样品的速度,同时,降低 HPLC 检测成本。

表 2 2 种方法测定紫杉醇含量的比较

Table 2 The comparison of taxol contents with two methods

样品名 Sample	方法 3 Method 3 <sup>1)</sup>			方法 5 Method 5 <sup>1)</sup>		
	保留时间 Retention time (min)	含量 Content (%)	RSD (%, n=5)	保留时间 Retention time (min)	含量 Content (%)	RSD (%, n=5)
红豆杉枝和叶 Branches and leaves	14.09	0.002 056	2.92	10.51	0.001 996	2.88
细胞 Cells	14.06	0.053 29	1.86	10.48	0.052 58	2.14
细胞培养液 In medium of cell cultures	14.00	20.533 <sup>2)</sup>	1.53	10.54	20.476 <sup>2)</sup>	1.32

<sup>1)</sup> 方法 3 和 5 分别为流动相 V(甲醇):V(乙腈):V(水) = 28:27:45 和 29:27:44,柱温分别为 30°C 和 35°C Mobile phase of method 3 and 5 is respectively V(methanol):V(acetonitrile):V(water) = 28:27:45 and 29:27:44, column temperature is respectively 30°C and 35°C; <sup>2)</sup> 细胞培养液中紫杉醇的含量单位是 mg/L The content unit of taxol in cell cultures is mg/L

## 参考文献:

[1] 甘烦远,郑光植,彭丽萍,等. 高效液相色谱法测定红豆杉培养细胞中紫杉醇的含量[J]. 色谱,1996,14(4):306-307.

[2] 熊杰,曾道刚,邱玲,等. 云南红豆杉中紫杉醇含量的 HPLC 测定[J]. 药物分析杂志,1997,17(2):123-124.

(责任编辑:宗世贤)