

· 科研简报 ·

高效液相色谱法测定组织培养株中高 三尖杉酯碱的含量

耿莹莹¹, 阙慧卿², 邓思珊², 林绥^{2*} (1. 福建省药品检验所, 福州 350001; 2. 福建省医学科学研究所福建省医学测试重点实验室, 福州 350001)

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号:
1001-2494(2006)03-0238-02

三尖杉为粗榧科粗榧属植物, 枝叶很早就用于治疗恶性肿瘤, 其所含的总生物碱对淋巴肉瘤、肺癌等均有较好疗效。临床上对三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的研究发现, 它们能治疗白血病, 对骨髓性粒细胞白血病疗效显著, 完全抑制或明显抑制率高于 50%。但三尖杉药材资源分布有限, 植株少, 而且三尖杉总生物碱的含量又不高, 为了寻找三尖杉的新药源, 笔者对草本植物的组织培养株进行了质量评价。结果显示, 组织培养株中含有高三尖杉酯碱, 且以草本植物愈伤组织块的培养株含量最高。提示草本植物的组织培养株可能成为中药三尖杉的一种重要代用新药源。

1 仪器、试剂与药品

高效液相色谱仪(美国惠普 HP 1100 型), 紫外扫描仪(UV300 型)。

高三尖杉酯碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 1533-200001)。氨水、氯仿为分析纯, 甲醇为色谱纯。草本植物组织培养株(A, B, E)及三尖杉药材(C, D)(福建省农科院生物技术中心)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性实验

色谱柱: Hypersil BDS(4.0 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 0.000 8 mol·L⁻¹ 碳酸铵溶液-甲醇(42:58); 柱温: 室温。检测波长: 290 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹。进样量: 20 μL。理论板数按样品 B 计算为 1 207。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取高三尖杉酯碱约 3 mg, 用 5 mL 甲醇定容, 制成每 1 mL 含高三尖杉酯碱 0.6 mg 的溶液即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取不同样品粉

末 3 g, 分别置于 50 mL 具塞磨口三角瓶中, 加 1:1 氨水 2 mL, 搅拌均匀后, 用脱脂棉将搅拌用玻璃棒擦净, 并将棉球投入该瓶中, 加氯仿 30.0 mL, 摇匀塞紧, 室温放置 24 h, 过滤, 吸取提取液 15.0 mL, 水浴蒸干, 残留物用甲醇溶解定容为 25 mL, 每个样品平行做 3 份, 备用。

2.3 线性关系考察

精密吸取对照品溶液适量, 用甲醇配制成 0.012, 0.024, 0.048, 0.072, 0.096, 0.12 g·L⁻¹ 的对照品溶液。分别进样 20 μL, 按“2.1”色谱条件测定。以峰面积积分值 x 为横坐标, 质量浓度 ρ 为纵坐标进行线性回归。回归方程为: $\rho = 7\,379.02x - 0.48$, $r = 1.000\,0$, 线性范围 0.012 ~ 0.12 g·L⁻¹。

2.4 仪器精密度实验

精密吸取对照品溶液(每 1 mL 含高三尖杉酯碱 0.06 mg) 20 μL, 重复进样 7 次, 高三尖杉酯碱的峰面积积分值的 RSD 为 1.65%。

2.5 稳定性考察

取供试品溶液分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样 20 μL, 测定峰面积, 结果高三尖杉酯碱峰面积的 RSD 为 0.85%。

2.6 重复性实验

取样品 A 按供试品溶液制备方法制备 5 份供试品, 分别进样测定, 高三尖杉酯碱平均含量为 0.105 mg·g⁻¹, RSD 为 2.03%。

2.7 回收率实验

准确称取已测知高三尖杉酯碱含量的样品 A, 加入高三尖杉酯碱对照品适量, 按“2.2.2”方法制备供试液, 分别进样测定, 高三尖杉酯碱平均回收率为 98.58%, RSD 为 1.78% ($n = 7$)。

2.8 样品的含量测定

各样品供试液过滤, 精密吸取 20 μL, 在“2.1”色谱条件下进样测定, 色谱图见图 1。根据对照品的峰面积和标准曲线求出含量, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 三尖杉枝叶中总生物碱的含量为 0.39%, 主要为三尖杉碱、三尖杉酮碱、乙酰三尖杉碱、脱甲基三尖杉碱、三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱等几种单体生物碱, 其中三尖杉碱占总生物碱的 50% ~ 54%, 所以高三尖杉酯碱的含量很低, 本实验取叶片粉末 3 g,

作者简介: 耿莹莹, 女, 副主任药师 * 通讯作者: 林绥, 女, 研究员

Tel: (0591) 87560373 E-mail: liu sui_syy@sina.com

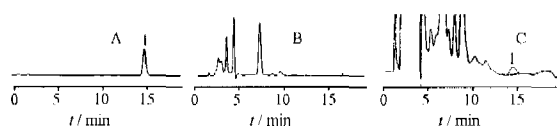


图1 高三尖杉酯碱色谱图

A - 对照品; B - 空白; C - 样品(B); 1 - 高三尖杉酯碱

Fig 1 Chromatogram of homobarringtonine

A - standard reference; B - blank; C - sample; 1 - homobarringtonine

表1 三尖杉及不同组织培养株中高三尖杉酯碱的含量. $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

Tab 1 Contents of homobarringtonine from *Cephalotaxus fortunei* and different tissue culture stock of *Cephalotaxus fortunei*. $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

Samples	1	2	3	Mean
A	0.095	0.108	0.112	0.105
B	0.013	0.016	0.019	0.016
C	-	-	-	-
D	0.009	0.013	0.012	0.011
E	0.003	0.002 5	0.002	0.002 5

注: A - 草本植物组织培养株(冬季)粉末, B - 草本植物愈伤组织块培养株粉末, C - 三尖杉叶片粉末, D - 三尖杉树皮粉末, E - 草本植物组织培养株根部粉末。

Note: A - tissue culture farina of herbaceous plant(winter); B - tissue culture farina of injured herbaceous plant; C - blade farina of *Cephalotaxus fortunei* Hook. f.; D - bark farina of *Cephalotaxus fortunei* Hook. f.; E - root farina of tissue culture of herbaceous plant

其所含的高三尖杉酯碱含量甚微,未在 HPLC 能检测的范围,所以在结果中三尖杉叶片粉末没有高三尖杉酯碱的测定值。

3.2 草本植物组织培养株粉末中高三尖杉酯碱的含量虽然不高,但除培养株根部的含量比三尖杉树皮的低之外,其余的高三尖杉酯碱含量均比药材高,特别是冬季的草本植物组织培养株,其高三尖杉酯碱的含量高达 $0.105 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,比三尖杉树皮的高将近十倍,这可初步为草本植物组织培养株的应用提供依据,为寻找三尖杉新药源提供一个可行性思路。

3.3 高三尖杉酯碱属生物碱,易溶于乙醇、甲醇、氯仿、乙醚,在弱碱性条件下呈游离状态,有文献报道先用 5% 醋酸溶解,再用浓氨水调 pH 为 6 时,用氯仿萃取总生物碱,最后提纯。本实验选择 1:1 的氨水游离高三尖杉酯碱,并用氯仿提取出来,用溶解度较好的甲醇溶解后测定。

3.4 将供试品液进行紫外扫描,高三尖杉酯碱在 290 nm 处有最大吸收,故选用 290 nm 波长来测定,结果灵敏准确,重现性好。

(收稿日期:2005-06-10)

氟尿嘧啶体外抗艾滋病病毒作用

钟文远,范春兰(昆明师范高等专科学校,昆明 650031)

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:

1001-2494(2006)03-0239-02

从分子生物学角度看,在肿瘤和获得性免疫缺陷综合征(艾滋病)的发生中,RNA 逆转录病毒扮演了十分重要的角色。艾滋病毒 HIV-1, HIV-2 和人类 T 细胞白血病病毒 HTLV- I, HTLV- II 在病毒传播途径, T 细胞嗜性, 合胞体形成, 依赖 Mg^{2+} 的逆转录酶, P_{24} 核心蛋白质作用于转录或转录后的病毒编码蛋白等方面有很多相似处。所以,作用于肿瘤的有效药物,如作用机制属于上述的任一环节,则同样也能作用于艾滋病,且有效。笔者在进行一种配合物体外抗艾滋病病毒研究中,发现氟尿嘧啶具有较强的体外抗艾滋病病毒活性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

MTT (Amresco 公司); 阳性对照药物齐多夫定 (AZT, Sigma 公司)。氟尿嘧啶(上海华联制药公司)。药物溶于去离子水中,过滤除菌, 4°C 保存,质量浓度为 $5.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 细胞和病毒

C8166, MT-4 和 HIV-1 III_B/H9 均由英国 Medical Research Council, AIDS Reagent Project 惠赠。按常规方法制备 HIV-1 III_B, 滴定并计算出病毒的半数感染量(TCID₅₀)。病毒贮存液分装后,置 -70°C 保存。细胞和病毒均按常规方法冻存和复苏。

1.3 病毒感染性的滴定

HIV-1 滴定按 Johnson 和 Byington (1990) 所述方法改良进行滴定,简述如下:将 HIV-1 贮存液在 96 孔板上作 4 倍稀释, 10 个梯度, 每梯度 6 个重复孔, 每孔加入 C8166 细胞 $50 \mu\text{L}$ (3×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 每孔终体积 $200 \mu\text{L}$ 。 37°C , 5% CO_2 培养。第 3 天补加新鲜 RPMI-1640 培养基 $100 \mu\text{L}$ 。第 7 天在倒置显微镜下观察每孔中 HIV-1 诱导细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 以每孔是否有合胞体 (syncytium) 的形成进行判断; 按 Reed 和 Muench 方法计算病毒的 TCID₅₀, 及引起细胞出现 CPE 的病毒上清稀释度。

基金项目:云南省自然科学基金资助项目(2001C0054M)

作者简介:钟文远,男,教授 Tel: (0871)5389746 E-mail: zhongwenyuan50712@sina.com