



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113640407 A

(43) 申请公布日 2021.11.12

(21) 申请号 202110849569.5

(22) 申请日 2021.07.27

(71) 申请人 海南医学院

地址 571199 海南省海口市龙华区学院路3号

(72) 发明人 李永辉 徐晗 吴娇霞 吴毓皇
李立言

(74) 专利代理机构 海南汉普知识产权代理有限公司 46003

代理人 李海峰

(51) Int.Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法,包括以下步骤:(1)采用高效液相色谱检测不同浓度的对照品溶液并绘制标准曲线;(2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末,加入乙醇溶液,称定重量,超声,以乙醇溶液补足减失的重量;滤过,取续滤液,水浴蒸干,用氨水复溶,以二氯甲烷萃取,得二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;(3)HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱为固定相;以体积比28~32:68~72的甲醇与0.2~0.3wt%碳酸铵水溶液为流动相。该方法精密、快速、专属性强,可用于海南粗榧枝叶药材的质量控制。

A

CN 113640407

CN

1. 一种海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 绘制标准曲线:取三尖杉碱对照品,制成对照品溶液;取不同浓度的对照品溶液,采用高效液相色谱检测并绘制标准曲线;

(2) 配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末,加入乙醇溶液,称定重量,超声,以乙醇溶液补足减失的重量;滤过,取续滤液,水浴蒸干,用氨水复溶,以二氯甲烷萃取,得二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

(3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱为固定相;以体积比28~32:68~72的甲醇与0.2~0.3wt%碳酸铵水溶液为流动相。

2. 根据权利要求1所述的含量检测方法,其特征在于,检测波长为291nm。

3. 根据权利要求1所述的含量检测方法,其特征在于,色谱柱长度为250mm,内径为4.6mm,粒径为5μm。

4. 根据权利要求1所述的含量检测方法,其特征在于,流动相流速为0.8~1.2mL/min。

5. 根据权利要求1所述的含量检测方法,其特征在于,柱温为30~35℃。

6. 根据权利要求1所述的含量检测方法,其特征在于,每g海南粗榧枝叶粉末使用的乙醇溶液的用量为50~100mL。

7. 根据权利要求1所述的含量检测方法,其特征在于,氨水的浓度为0.5~0.8vt%。

8. 根据权利要求1所述的含量检测方法,其特征在于,乙醇溶液的浓度为50~70vt%。

9. 根据权利要求1所述的含量检测方法,其特征在于,超声时间为20~30min。

10. 根据权利要求1所述的含量检测方法,其特征在于,标准曲线的线性回归方程为Y=1944.5X-55873。

一种海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及药物检测技术领域,具体涉及一种海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法。

背景技术

[0002] 海南粗榧为三尖杉科三尖杉属植物海南粗榧*Cephalotaxus hainanensis* Li 的干燥枝叶。海南粗榧为海南省地产药材,是一种典型的罕见种,收载于《中国植物志》,枝、叶、种子可提取多种植物碱,对治疗白血病及淋巴肉瘤等有一定的疗效。生物碱类、内酯类化合物是海南粗榧的主要化学成分。海南粗榧中分离的生物碱主要有三尖杉碱(*Cephalotaxine*)、三尖杉酯碱(*Harringtonine*)、高三尖杉酯碱(*Homoharringtonine*)、异三尖杉酯碱(*Iso-harringtonine*)和脱氢三尖杉酯碱(*Deoxyharringtonine*)等。

[0003] 相关研究报道^[1]采用反相高效液相色谱法测定三尖杉(*Cephalotaxus fortunei* Hook.f)中三尖杉酯碱,其测定结果显示峰形不够理想且杂质较多,出峰时间也较晚。此外,其检测的是三尖杉酯碱,且原材料是三尖杉(*Cephalotaxus fortunei* Hook.f)。海南粗榧属于三尖杉属的罕见种,其化学成分及含量与其他种有所差异,这些差异可能影响含量检测结果的准确性。

[0004] 目前部分研究主要检测的是酯碱类,鲜见关于海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法。其他三尖杉的检测手段也不完全适用于海南粗榧枝叶。因此有必要提供一种海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法,建立海南粗榧枝叶的质量标准。这对于促进海南粗榧的产业化利用具有重要的意义。

[0005] [1]江慧,胡奎,王凡,刘先福,李俊凯.反相高效液相色谱法测定三尖杉中三尖杉酯碱研究[J].长江大学学报(自科版),2014,11(29):56-58+7。

发明内容

[0006] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法。

[0007] 本发明技术方案主要包括以下内容:

[0008] 一种海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法,包括以下步骤:

[0009] (1)绘制标准曲线:取三尖杉碱对照品,制成对照品溶液;取不同浓度的对照品溶液,采用高效液相色谱检测并绘制标准曲线;

[0010] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末,加入乙醇溶液,称定重量,超声,以乙醇溶液补足减失的重量;滤过,取续滤液,水浴蒸干,用氨水复溶,以二氯甲烷萃取,得二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0011] (3)HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0012] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱为固定相;以体积比28

~32:68~72的甲醇与0.2~0.3wt%碳酸铵水溶液为流动相。

[0013] 优选的,检测波长为291nm。

[0014] 优选的,色谱柱长度为250mm,内径为4.6mm,粒径为5μm。

[0015] 优选的,流动相流速为0.8~1.2mL/min。

[0016] 优选的,柱温为30~35℃。

[0017] 优选的,每g海南粗榧枝叶粉末使用的乙醇溶液的用量为50~100mL。

[0018] 优选的,氨水的浓度为0.5~0.8vt%。

[0019] 优选的,乙醇溶液的浓度为50~70vt%。

[0020] 优选的,超声时间为20~30min。

[0021] 优选的,标准曲线的线性回归方程为Y=1944.5X-55873。

[0022] 本发明所取得的效果:

[0023] 本发明根据海南粗榧枝叶各化学成分的特点,提供一种适用于海南粗榧枝叶三尖杉碱的HPLC检测方法,通过大量实验筛选出最优的样品配制方法以及固定相、流动相组成。

[0024] 采用该方法,三尖杉碱在400~2400ng范围内呈良好的线性关系,方法平均回收率为107.76%,方法精密度的RSD小于3%。海南粗榧枝叶中三尖杉碱的含量范围为0.4085-0.4255mg/g。

[0025] 该方法精密、快速、专属性强,可用于海南粗榧枝叶药材的质量控制。

附图说明

[0026] 图1~图3:实施例1测定结果色谱图。图1为甲醇溶剂,图2为三尖杉碱对照品,图3为供试品。

具体实施方式

[0027] 为了更好理解本发明技术内容,下面提供具体实施例,对本发明做进一步的说明。

[0028] 以下实施例中所使用的设备和材料:

[0029] 岛津公司LC-20A型液相色谱仪(日本岛津公司,包括四元泵、自动进样器、柱温箱、检测器、工作站);SartoriusBSA124S-CW电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);DHG-9053A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);KQ-250DB数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。乙腈(色谱纯,美国Fisher公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。三尖杉碱对照品(成都普瑞法科技开发有限公司,纯度>98%,批号PRF20052141),10批海南粗榧药材采集于海南,经海南医学院田建平教授鉴定确定为三尖杉科三尖杉属植物海南粗榧Cephalotaxushainanensis Li的干燥枝叶。

[0030] 实施例1海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0031] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样2μL、4μL、6μL、8μL、10μL、12μL,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0032] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,

合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0033] (3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0034] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱($250 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(28:72)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.0mL/min;柱温:35°C。

[0035] 实施例2海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0036] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样 $2\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $6\mu\text{L}$ 、 $8\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0037] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0038] (3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0039] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱($250 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(32:68)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.0mL/min;柱温:35°C。

[0040] 实施例3海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0041] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样 $2\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $6\mu\text{L}$ 、 $8\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0042] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0043] (3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0044] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱($250 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(28:72)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.0mL/min;柱温:30°C。

[0045] 实施例4海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0046] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样 $2\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $6\mu\text{L}$ 、 $8\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0047] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,

合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0048] (3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0049] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱($250 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$)为固定相;以甲醇-0.3%碳酸铵水(28:72)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.0mL/min;柱温:35°C。

[0050] 实施例5海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0051] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样 $2\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $6\mu\text{L}$ 、 $8\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0052] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0053] (3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0054] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱($250 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(28:72)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:0.8mL/min;柱温:35°C。

[0055] 实施例6海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0056] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样 $2\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $6\mu\text{L}$ 、 $8\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0057] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0058] (3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0059] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱($250 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(28:72)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.2mL/min;柱温:35°C。

[0060] 实施例7海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0061] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样 $2\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $6\mu\text{L}$ 、 $8\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0062] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.8%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,

合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0063] (3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0064] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱($250 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(28:72)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.0mL/min;柱温:35°C。

[0065] 以上实施例结果显示,三尖杉碱在海南粗榧枝叶供试样品中得到了很好的分离,理论塔板数为6032.315左右,峰形对称,与相邻峰的分离度为3.577以上,溶剂对样品无干扰。

[0066] 本发明还分别对30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇进行了提取溶剂的考察,结果表明50~70%乙醇对海南粗榧药材中三尖杉碱的提取率较高,杂质含量较少,其中70%乙醇提取率最高,故确定70%乙醇为最佳提取溶剂。溶剂用量(20mL、50mL和100mL)的考察结果显示,溶剂用量为100mL时,三尖杉碱含量最高,因此确定最佳溶剂用量为100mL。分别对超声提取时间10min、20min、30min、40min进行了考察,结果表明超声30min时,海南粗榧药材中三尖杉碱的含量最高,故确定超声提取时间为30min。

[0067] 对比例1海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0068] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样 $2\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $6\mu\text{L}$ 、 $8\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0069] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0070] (3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0071] 高效液相色谱条件为:以ODS-C18色谱柱($250 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(28:72)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.0mL/min;柱温:35°C。

[0072] 对比例2海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0073] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样 $2\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$ 、 $6\mu\text{L}$ 、 $8\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0074] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0075] (3) HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0076] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱($250 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(40:60)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.0mL/

min;柱温:35℃。

[0077] 对比例3海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0078] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样2μL、4μL、6μL、8μL、10μL、12μL,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0079] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入甲醇100mL,称定重量,超声30min,以甲醇补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0080] (3)HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0081] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱(250×4.6mm,5μm)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(28:72)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.0mL/min;柱温:35℃。

[0082] 对比例4海南粗榧枝叶的三尖杉碱的含量检测方法

[0083] (1)配制对照品溶液:取三尖杉碱对照品,加甲醇制成对照品溶液(0.2mg/mL);采用序列进样法依次进样2μL、4μL、6μL、8μL、10μL、12μL,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;

[0084] (2)配制供试品溶液:取海南粗榧枝叶粉末(过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,50℃减压干燥,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取2次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,50℃减压干燥,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,即得;

[0085] (3)HPLC检测:取供试品溶液,采用高效液相色谱检测,根据标准曲线计算三尖杉碱含量;

[0086] 高效液相色谱条件为:以phenomenex 00G4444E0型色谱柱(250×4.6mm,5μm)为固定相;以甲醇-0.2%碳酸铵水(28:72)为流动相;检测波长为291nm;流动相流速:1.0mL/min;柱温:35℃。

[0087] 以上对比例结果显示,相对于实施例,三尖杉碱在海南粗榧枝叶供试样品中不能得到了很好的分离,与相邻峰的分离度低于2.0,峰形略差,杂质含量较高,三尖杉碱含量测定结果降低($p < 0.01$)。

[0088] 实施例8线性关系考察

[0089] 以实施例1的色谱条件,取对照品溶液(0.2mg/mL),采用序列进样法依次进样2μL、4μL、6μL、8μL、10μL、12μL,以进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明三尖杉碱在400~2400ng范围内线性关系良好,线性回归方程为 $Y=1944.5X-55873$, $R=0.9998$ 。

[0090] 实施例9精密度考察

[0091] 以实施例1的色谱条件,取本品粉末(201912001,过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入70%乙醇各100mL,静置20min,超声30min,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取两次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加

1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液连续进样8次,记录三尖杉碱的峰面积,并计算RSD值以考察精密度。结果表明:三尖杉碱峰面积的RSD为0.55%,说明仪器精密度良好。

[0092] 实施例10稳定性考察

[0093] 以实施例1的色谱条件,取本品粉末(201912001,过二号筛)约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入70%乙醇100mL,静置20min,超声30min,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取两次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液分别与0h、2h、4h、6h、8h、10h、12h和14h进样,记录三尖杉碱的峰面积,并计算RSD值以考样品稳定性。结果表明:三尖杉碱在14h内稳定,峰面积的RSD为0.18%。

[0094] 实施例11重复性考察

[0095] 以实施例1的色谱条件,精密称取海南粗榧药材粉末6份(20191201,过二号筛),每份约1.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入70%乙醇100mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取两次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液进样,记录三尖杉碱的峰面积,并计算药材中三尖杉碱的含量和RSD,以考察重复性,结果表明该提取方法重复性的RSD为0.894%。

[0096] 实施例12加样回收率考察

[0097] 以实施例1的色谱条件,精密称取海南粗榧药材粉末6份(201912001,过二号筛),每份约0.5g,置250mL具塞三角瓶中,分别精密加入0.02mg/mL的三尖杉碱对照品溶液10.0mL,再加入70%乙醇90mL,称定重量,超声30min,以70%乙醇溶剂补足减失的重量。滤过,取续滤液50mL,水浴蒸干,用0.5%氨水10mL复溶,以二氯甲烷萃取两次,每次10mL,合并二氯甲烷萃取液,水浴蒸干,加1mL无水乙醇复溶,滤过,取续滤液,取续滤液进样,记录三尖杉碱的峰面积,并计算三尖杉碱的加样回收,结果见表1。

[0098] 表1加样回收结果

	称量量 g	加入量 mg	样品含量		测得总量 mg	回收率	平均含量 mg/g	RSD
			mg	mg				
[0099]	0.5013	0.2	0.1998	0.2026	102.77%			
	0.5087	0.2	0.2027	0.2049	103.56%			
	0.5106	0.2	0.2035	0.2110	109.25%			
	0.5055	0.2	0.2014	0.2102	109.51%	107.76%	2.25%	
	0.5036	0.2	0.2007	0.2083	107.93%			
	0.5102	0.2	0.2033	0.2102	108.53%			

[0100] 实施例13不同批次海南粗榧枝叶药材中三尖杉碱的含量测定

[0101] 以实施例1的色谱条件,精密称取不同批次的海南粗榧药材粉末各2份(过二号筛),每份约1.0g,按供试品制备方法项下方法制备供试品溶液,采用序列进样法进样,测定供试品中三尖杉碱峰面积,计算样品中三尖杉碱的含量,结果见表2。

[0102] 表2不同批次海南粗榧药材中三尖杉碱的含量

批号	水分含量%	三尖杉碱含量	
		测定量 mg/g	干燥药材含量 mg/g
[0103]	20191201	7.31%	0.3793
	20191202	7.30%	0.3796
	20191203	6.88%	0.3828
	20191204	7.27%	0.3847
	20191205	7.14%	0.3786
	20191206	6.61%	0.3792
	20191207	6.59%	0.3835
	20191208	7.61%	0.3944
	20191209	6.56%	0.3889
	20191210	6.81%	0.3883

[0104] 根据上述测定结果,海南粗榧中三尖杉碱含量差异较小,范围在0.4085mg/g~0.4255mg/g之间,平均含量为0.4142mg/g。

[0105] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,但并不构成对本发明的限定,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

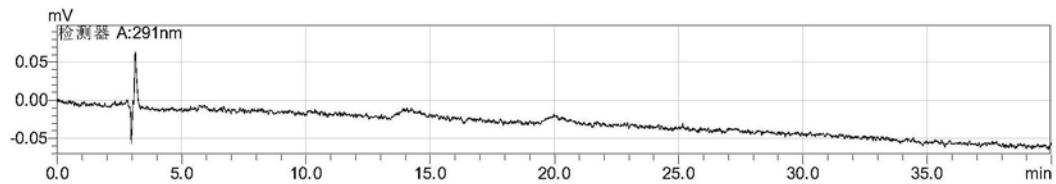


图1

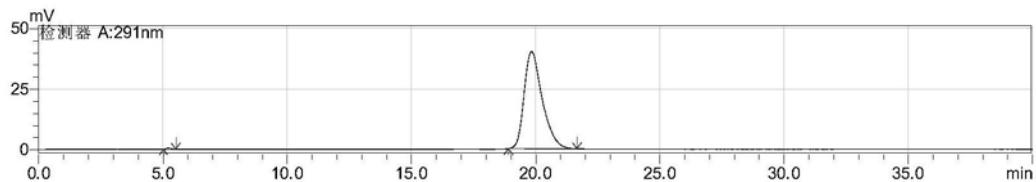


图2

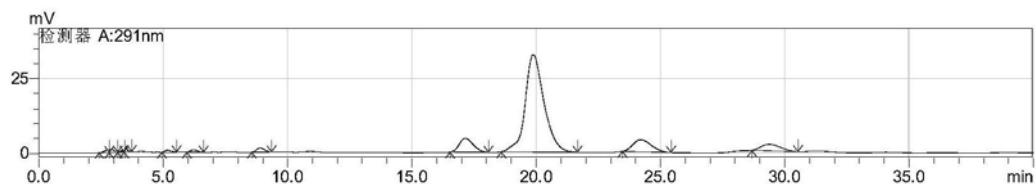


图3