

细薄星芒海绵总萜烯的制备及 Stelletin B 和 Stelletin D 的含量测定

熊巍¹, 王增蕾², 林厚文^{2*}, 李志勇¹, 童耕雷¹, 陈万生²

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 海洋生物技术实验室, 上海 200240; 2. 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 建立测定细薄星芒海绵 *Stelletta tenuis* Lindgren 总萜烯提取物中 Stelletin B 和 D 含量的方法。**方法:** 采用 HPLC-DAD 方法。色谱条件为 YMC Pack-SIL 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为正己烷: 乙酸乙酯(75:25), 分析时间 30 min, 流速 1.0 ml·min⁻¹; 检测波长: 360 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μl。**结果:** 线性回归方程为 Stelletin B: $Y=52\ 181\ 633\ X+957\ 495$ ($r=0.996\ 9$), 线性范围为 2.4~30 μg; Stelletin D: $Y=62\ 636\ 828\ X-451\ 022$ ($r=0.998\ 0$), 线性范围为 2.0~32 μg。精密度、稳定性和重现性试验的 RSD 在 3.07%~4.76% 之间。10 批细薄星芒海绵总萜烯中 Stelletin B 和 Stelletin D 的平均含量分别为 59.93% (RSD=4.48%) 和 30.98% (RSD=2.97%)。**结论:** 该法为测定细薄星芒海绵总萜烯中有效成分提供了快速、准确、有效的方法。

[关键词] 细薄星芒海绵; 总萜烯; 色谱法, 高效液相

[中图分类号] R 284.2

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2006)07-0787-03

Preparation of total isomalabaricanes and determination of Stelletin B and Stelletin D in *Stelletta tenuis* Lindgren by high pressure liquid chromatography

XIONG Wei¹, WANG Zeng-lei², LIN Hou-wen^{2*}, LI Zhi-yong¹, TONG Geng-lei¹, CHEN Wan-sheng² (1. Marine Biotechnology Laboratory, School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a method for determining the contents of Stelletin B and Stelletin D in total isomalabaricanes in different batches of *Stelletta tenuis* Lindgren. **Methods:** A high pressure liquid chromatography (HPLC) method was applied. The column YMC Pack-SIL (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used at room temperature, and the mobile phase was n-hexane: ethyl acetate (75:25) with a flow rate at 1.0 ml·min⁻¹ for 30 min. UV detector wave length was at 360 nm. **Results:** The regression equation were: $Y=52\ 181\ 633\ X+957\ 495$ ($r=0.996\ 9$) for Stelletin B and $Y=62\ 636\ 828\ X-451\ 022$ ($r=0.998\ 0$) for Stelletin D, with the linear range being 2.4-30 μg and 2.0-32 μg, correspondingly. The RSD values for accuracy test, stability test and repeatability test were 3.07%-4.76%. The average contents of Stelletin B and Stelletin D in total isomalabaricanes in different batches of *Stelletta tenuis* Lindgren were 59.93% and 30.98%, respectively. **Conclusion:** This HPLC method provides a fast, accurate and effective way to determine the active contents in total isomalabaricanes from *Stelletta tenuis* Lindgren.

[KEY WORDS] *Stelletta tenuis* Lindgren; total isomalabaricanes; chromatography, high pressure liquid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(7): 787-789]

细薄星芒海绵 (*Stelletta tenuis* Lindgren) 属寻常海绵纲 (*Demospongiae*)、星骨海绵目 (*Astrosporida*)、星芒海绵科 (*Stellettidae*) 星芒海绵属 (*Stelletta*) 动物^[1]。该属多种海绵粗提物均有较强生物活性, 细薄星芒海绵的化学成分近年来才开始研究, 分离出的化合物主要有神经酰胺类、甾体、萜类化合物^[2~6], 并发现具有很强的抗肿瘤、抗病毒等生理活性。

在进一步研究中发现, 由于该海绵中许多生物活性成分结构相似, Stelletin B 和 D 的骨架都是由 3 个环构成的异玛拉巴烷环系, 在 C13 位被 1 个末端为 γ-吡喃酮的 10 碳多烯侧链取代, 难以分离, 且不稳定。国际上尚未有对此类海绵生物活性成分的质量研究报告, 本实验首次采用 HPLC-DAD 方法, 对该海绵总萜烯中主要成分 Stelletin B 和 Stelletin D 进行定量分析, 探讨对其进行质量控制的方法。

1 材料

1.1 实验材料 细薄星芒海绵 (*Stelletta tenuis* Lindgren) 于 2002 年 11 月采于海南三亚西岛附近海域, 潜水 (10~20

[基金项目] 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2002AA628160, 2004628050); 上海市青年科技启明星计划 (02QB14003); 上海市科委中药现代化专项基金 (04DZ19809)。Supported by National High-tech R&D Program (863 Program) (2002AA628160, 2004628050), Shanghai Rising Star Program (02QB14003) and Fund for Modernization of Traditional Chinese Herbs of Shanghai Municipal Government (04DZ19809)。

[作者简介] 熊巍, 硕士。

* Corresponding author. E-mail: franklin67@126.com

m)采集。种属由中科院海洋研究所(青岛)李锦和研究员鉴定,样品标本保存于第二军医大学长征医院海洋药物实验室,编号为HN112021。

1.2 仪器和试剂 Waters 高效液相色谱仪;Waters 1525 泵系统, Waters PAD 2996 二极管阵列检测器,Empower Pro Build1154 工作站。Stellettin B、Stellettin D 对照品均为自制,纯度分别为 98.6% 和 99.4%;所用试剂均为分析纯,购自上海化学试剂公司。

2 方法和结果

2.1 细薄星芒海绵总萜烯提取物的制备 称取细薄星芒海绵干燥样品 60 g,加 1:1(V/V)二氯甲烷/甲醇 2 000 ml 室温超声浸提 5 次,每次 3 h,合并提取液,过滤,减压回收溶剂,得总浸膏,将总浸膏混悬于适量 90% 甲醇,用石油醚 1:1(V/V)萃取 3 次,弃去石油醚层,将甲醇浓度调整至 70%,用四氯化碳 1:1(V/V)萃取 3 次,回收溶剂浓缩至干,经 Sephadex LH20 凝胶柱色谱,流动相为 1:1(V/V)二氯甲烷/甲醇,TLC 检测,展开剂为石油醚:丙酮(7:3),收集合并萜类流份,回收溶剂浓缩至干即得。上述制备过程均应避光。

2.2 色谱条件 YMC 高效液相色谱柱 YMC Pack-SIL 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);;流动相为正己烷:乙酸乙酯(75:25),分析时间 30 min,流速 1.0 ml·min⁻¹;检测波长:360 nm;柱温:室温;进样量:20 μl。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取对照品 Stellettin B 9.0 mg,加乙酸乙酯及少量二氯甲烷溶解,分别使成为 0.12、0.30、0.60、0.90、1.20、1.50 mg·ml⁻¹,0.45 μm 膜过滤,避光置于 4℃ 冰箱保存备用。精密称取对照品 Stellettin D 8.0 mg,加乙酸乙酯溶解,分别使成为 0.10、0.32、0.64、0.96、1.28、1.60 mg·ml⁻¹,0.45 μm 膜过滤,避光置于 4℃ 冰箱保存备用;上述制备过程均应避光。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取总萜烯干粉 15 mg,至 10 ml 容量瓶中,用 5 ml 乙酸乙酯超声溶解,并用乙酸乙酯定容至刻度,摇匀,以 0.45 μm 膜过滤,滤液避光置于 4℃ 冰箱保存备用。上述制备过程均应避光。

2.5 方法学考察^[7,8]

2.5.1 线性关系 取不同浓度对照品溶液各 20 μl 按色谱条件进样,以 Stellettin B 和 Stellettin D 吸收峰面积为纵坐标(Y),对照品溶液浓度(X, mg·ml⁻¹)为横坐标,回归得线性方程,Stellettin B:Y=52 181 633 X+957 495 (r=0.996 9); Stellettin D:Y=62 636 828 X-451 022 (r=0.998 0)。

2.5.2 精密度试验 取浓度为 0.60 mg·ml⁻¹ 的 Stellettin B 对照品溶液,重复进样 5 次,经计算峰面积的 RSD 为 3.07%;取浓度为 0.32 mg·ml⁻¹ 的 Stellettin D 对照品溶液,重复进样 5 次,经计算峰面积的 RSD 为 3.40%。

2.5.3 重复性试验 精密称取细薄星芒海绵总萜烯 15 mg,按 2.4 项下制备,按 2.2 项下色谱条件测定,得 Stellettin B 平均含量为 0.90 mg·ml⁻¹,RSD 为 4.76%;Stellettin D

平均含量为 0.46 mg·ml⁻¹,RSD 为 4.22%。

2.5.4 稳定性试验 样品按 2.4 项下的制备方法处理后,分别在 0、1、4、8、12、16、20 和 24 h 连续测定 8 次,上述测定过程均应严格避光。得 Stellettin B 的吸收峰面积 RSD 为 3.30%,Stellettin D 的吸收峰面积 RSD 为 3.29%。说明 Stellettin B 和 D 在 24 h 内基本稳定。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取细薄星芒海绵总萜烯干粉 10 mg,精密加入 Stellettin B 对照品 3 mg 和 Stellettin D 对照品 6 mg,按 2.4 项下制备,按 2.2 项下色谱条件测定,得其加样回收率分别为 97.1% 和 98.5%。

2.6 样品含量测定结果 测定 10 批样品中 Stellettin B 和 D 的含量,结果表明,10 批样品中 Stellettin B 和 D 的含量差别不大;Stellettin D 的含量为(30.98±2.97)%,Stellettin B 含量为(59.93±4.48)%,色谱图见图 1。

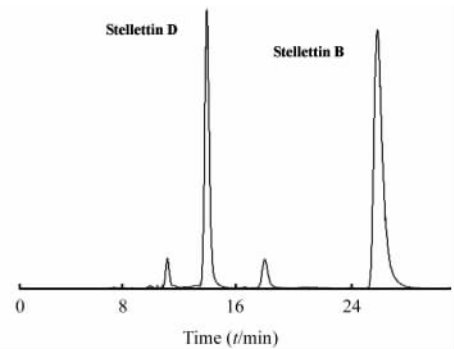


图 1 细薄星芒海绵总萜烯高效液相色谱图

Fig 1 HPLC figure of total isomalabaricanes from *Stelletta tenuis* Lindgren

3 讨论

细薄星芒海绵总萜烯中主要成分的最大紫外吸收波长并不一致,Stellettin B 为 360.5 nm,Stellettin D 为 360.7 nm,综合考虑各种成分的紫外吸收谱和相对含量的高低,最终选取 360 nm 为检测波长。

本实验曾采用 Waters Symmetry^R C₁₈ 及 YMC Pack-ODS A 反相 C₁₈ 分析柱分析,但等度和梯度洗脱效果均较差,换用 YMC Pack-SIL 正相柱以正己烷:乙酸乙酯=75:25 等度洗脱可在 30 min 内使主要成分流出,并且可达到基线分离,在等度洗脱时,曾以其他比例流动相(正己烷为 60%~80%)洗脱,色谱峰分离效果不佳。结果表明,本实验的实验条件可以满足分析要求。每次运行后,应以起始浓度平衡色谱柱至少 20 min,才能确保下次运行时色谱峰的峰形和分离度。

[参考文献]

- [1] 黄宗国. 中国海洋药物种类与分布[M]. 北京:海洋出版社, 1994:135.
- [2] Su JY, Meng YH, Zeng LM, et al. Stellettin A, a new triterpenoid pigment from the marine sponge *Stelletta tenuis* [J]. J

- Nat Prod, 1994, 57: 1450-1451.
- [3] 孟艳辉, 苏镜娉, 曾陇梅. 海绵 *Stelletta tenuiss* (Lindgren) 的化学成分研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1996, 35: 69-72.
- [4] 闫素君, 苏镜娉, 张广文, 等. 星骨海绵 *Stelletta tenuiss* Lindgren 中的甾体化合物[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40: 54-57.
- [5] 邓松之, 刘爱明, 邓福英, 等. 中国南海海绵 *Stelletta tenuiss* Lindgren 中的 24-亚甲基-27-甲基胆甾醇的结构鉴定[J]. 有机化学, 1992, 12: 501-503.
- [6] 张红军, 王旭东, 林厚文, 等. 中国南海细薄星芒海绵抗肿瘤活性成分研究(I)[J]. 药学服务与研究, 2004, 4: 104-106.
- [7] 李 颖, 张 戈, 郭美丽, 等. 红花药材及注射液中羟基黄色素 A 的含量测定[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 587-588.
- [8] 孙胜利, 宓鹤鸣, 娄子洋. 反相高效液相色谱法测定国产血竭中龙血素 A 和 B 的含量[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23: 1366-1368.
- [收稿日期] 2005-10-27 [修回日期] 2006-06-05
[本文编辑] 尹 茶