

## ◆特邀专栏◆

## 响应面法优化南方红豆杉中 10-DAB 提取工艺及其含量测定\*

李玉芝\*\*,宋肖敏婷,裴瑾,曹治兴,陈江,饶华楠

(成都中医药大学药学院,西南特色中药资源国家重点实验室,四川成都 611137)

**摘要:**为探究南方红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *mairi*)中 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ(10-DAB)的最佳提取工艺,本研究以南方红豆杉中 10-DAB 含量为指标,以料液比、提取时间及超声温度为考察因素,采用单因素试验结合响应面法优化 10-DAB 的提取工艺,并采用超高效液相色谱(UPLC)法检测不同采摘部位、不同生长年限及不同采收时节的 10-DAB 含量差异。结果表明,南方红豆杉中 10-DAB 的最佳提取工艺条件为料液比 1:15(g/mL)、提取时间 23 min、超声温度 40 ℃,该工艺条件下 10-DAB 的含量为 1.18%,与理论值相对偏差为 0.42%。UPLC 检测结果表明,南方红豆杉叶的 10-DAB 含量显著高于枝和树皮,且 10-DAB 全年累积含量受季节影响明显,10 月份达到最高值。该研究可为南方红豆杉中 10-DAB 的提取利用提供参考依据。

**关键词:**南方红豆杉;10-DAB;响应面分析;单因素试验;超高效液相色谱法

中图分类号:R284.2 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2023)03-0314-08

DOI:10.13657/j.cnki.gxkxyb.20230829.011

南方红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *mairi*)是红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus*)植物,是红豆杉属分布最为广泛的一种,是我国特有的天然抗癌植物,属于国家一级保护植物<sup>[1,2]</sup>。紫杉醇(Paclitaxel)是南方红豆杉的主要抗癌活性成分,对胃癌、肺癌、血液癌和卵巢癌等癌症的治疗具有显著效果<sup>[3-6]</sup>,但紫杉醇属于次生代谢产物,多从红豆杉属植物的树皮部位获取,含量极低<sup>[7]</sup>,具有水溶性差、口服利用度低、易产生耐药性等缺点,限制了其在临床用药的安全性和有效性。因此,有必要开发利用红豆杉中其余的活

性物质,以满足市场需求。

10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ(10-DAB)是一种具有肿瘤抑制作用的二萜类成分<sup>[8]</sup>。相比于紫杉醇,10-DAB 含量较高且容易获得,是生物合成、人工半合成紫杉醇和多烯紫杉醇的重要前体<sup>[9,10]</sup>。为解决紫杉醇的市场供需矛盾,迄今为止,关于红豆杉中化合物的提取工艺优化已有相关报道,如超临界流体萃取法提取红豆杉枝叶紫杉烷类萃取物的工艺优化<sup>[11]</sup>;超声提取南方红豆杉叶中总黄酮的工艺优化<sup>[12]</sup>;超临界 CO<sub>2</sub> 萃取南方红豆杉中挥发油和 10-DAB 的工艺

收稿日期:2023-02-19

修回日期:2023-03-30

\*四川省科技厅项目(18ZDZX0075)资助。

## 【第一作者简介】

李玉芝(1984-),女,博士,副教授,主要从事中药资源学研究,E-mail:liyuzhi5654@163.com。

## 【\*\*通信作者】

## 【引用本文】

李玉芝,宋肖敏婷,裴瑾,等. 响应面法优化南方红豆杉中 10-DAB 提取工艺及其含量测定[J]. 广西科学院学报,2023,39(3):314-321.

LI Y Z, SONG X M T, PEI J, et al. Response Surface Methodology for Optimization of Extraction Process and Content Determination of 10-DAB in *Taxus wallichiana* var. *mairi* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2023, 39(3): 314-321.

优化<sup>[13]</sup>;热回流法提取曼地亚红豆杉(*T. media*)中总黄酮的工艺优化<sup>[14]</sup>;浸提法提取曼地亚红豆杉枝叶中紫杉醇的工艺优化等<sup>[15]</sup>,而关于超声提取南方红豆杉中10-DAB的工艺优化鲜有报道。超声提取法相较于超临界流体萃取法、热回流提取法、浸提法等方法,具有操作简单、提取效率高、提取温度低、节省时间及溶剂等优点,因此,本研究拟采用超声提取法对南方红豆杉中10-DAB的提取工艺进行优化。孙志鹏等<sup>[16]</sup>和何泉宇等<sup>[17]</sup>对10-DAB含量检测的研究发现,料液比、提取时间及超声温度能涵盖提取方法中的关键变量,故本研究也将这3个参数作为考察的关键参数。

此外,由于超高效液相色谱(UPLC)法具有操作简单、精密度高、重现性好等优点,故本研究拟采用此方法进行含量分析。前期预试验对比分析了王璐娜等<sup>[18]</sup>建立的不同比例流动相(乙腈-水)梯度洗脱的检测方法和闫丹等<sup>[19]</sup>建立的甲醇-乙腈-水(36.5:27.0:36.5,V/V)等度洗脱的检测方法,发现在流动相乙腈-水(53:47,V/V)、流速0.6 mL/min时,10-DAB的色谱峰出峰快、峰形好、与其他峰分离度高,故将此作为本研究中UPLC定量分析10-DAB含量的条件。

综上,本研究拟采用单因素试验结合响应面法对南方红豆杉中10-DAB的提取工艺进行优化,并使用UPLC检测分析不同采摘部位(枝、叶、树皮)、生长年限及采收季节对南方红豆杉中10-DAB含量的影响,旨在为红豆杉资源的综合利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 材料与试剂

于2019年1-12月(每月21日)在四川省金河红豆杉农业科技有限公司的邛崃红豆杉种源基地内,分别采摘6、8、10年生南方红豆杉植株上无病虫害、生长健康且具有代表性的幼嫩及成熟的混合叶片,将其作为研究采收时节及生长年限对10-DAB含量影响的样本;并于5-7月(每月21日),采摘南方红豆杉植株的枝、叶、树皮,作为研究采摘部位对10-DAB含量影响的样本,每组样本量为10株植株,经成都中医药大学裴瑾教授鉴定为南方红豆杉[*Taxus walli-chiana* var. *mairei* (Lemee & H. Léveillé) L. K. Fu & Nan Li]。10-DAB(批号: MUST-18090202,纯度:98%)标准品购于曼斯特(成都)生物科技有限

公司,乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

电热恒温鼓风干燥箱(上海将任实验设备有限公司),数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),超纯水机(四川优普超纯科技有限公司),1290型超高效液相色谱仪[安捷伦科技(中国)有限公司]。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 样品处理

将南方红豆杉样品烘干,粉碎,过65目筛,精密称取粉末2g,加入一定量的甲醇溶剂,在一定的提取时间及超声温度条件下进行超声辅助提取,提取3次,提取液在4000 r/min下离心5 min,合并上清液,减压浓缩,浓缩物用甲醇溶解并定容,置于25 mL容量瓶中,0.22 μm微孔滤膜过滤后即得样品,4℃保存备用。

### 1.2.2 色谱条件

色谱柱 Agilent SBC18 (4.6 × 100 nm, 1.8 μm),流动相为乙腈-水(53:47,V/V),等度洗脱,流速0.6 mL/min,检测波长227 nm,柱温30℃,进样量1 μL。

### 1.2.3 10-DAB标准曲线的绘制

精密称取10-DAB标准品1 mg,用甲醇溶解并定容至1 mL,配制成浓度为1 mg/mL的10-DAB母液,将母液浓度依次稀释成0.80、0.50、0.25、0.10、0.05 mg/mL,0.22 μm微孔滤膜过滤,按照1.2.2节色谱条件检测,记录峰面积,以10-DAB浓度为横坐标(X),各浓度对应的峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得回归方程  $Y = 16.337X + 62.703$  ( $R^2 = 0.9997$ ),表明10-DAB溶液的浓度在0.05-1.00 mg/mL内与峰面积线性关系良好。

### 1.2.4 精密性、重复性、稳定性及加样回收率考察

准确吸取10-DAB标准品溶液,每次进样1 μL,连续6次,考察仪器的精密性,得相对标准偏差(RSD)为0.89%,表明仪器的精密度良好;准确称取同一份样品6份,按上述步骤制样并检测,考察方法的重复性,得RSD为0.59%,表明提取方法的重现性良好;制备样品液后,分别放置0、2、4、8、10、12 h后再检测含量,考察方法所得样品的稳定性,得RSD为0.46%,表明样品在12 h内稳定性良好;称取10-DAB含量已知的样品粉末3份,分别加入一定量的10-DAB标准品,考察加样回收率,得平均加样回收

率为 97.99%, 说明样品损失少, 试验方法可行。

### 1.2.5 单因素试验

精密称取样品粉末 2 g, 选取料液比[1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 (g/mL)]、提取时间(20、30、40、50、60 min)、超声温度(20、30、40、50、60 °C) 3 个因素进行单因素试验, 超声功率为 100 W, 重复提取 3 次, 提取液在 4 000 r/min 下离心 5 min, 合并上清液, 减压浓缩, 浓缩物用甲醇溶解并定容, 置于 25 mL 容量瓶中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得样品。

### 1.2.6 响应面优化

综合单因素试验结果, 以料液比(A)、提取时间(B)、超声温度(C) 3 个因素为自变量, 根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理, 应用 Design-Expert 8.0.6 软件设计 3 因素 3 水平 17 个试验组合的响应面试验, 其中零点试验重复 5 次以估计误差, 以 10-DAB 含量为评价指标。分析因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平 Level	A 料液比/(g/mL) A Solid-liquid ratio/(g/mL)	B 提取时间/min B Extraction time/min	C 超声温度/°C C Ultrasonic temperature/°C
-1	5	20	20
0	15	30	30
1	25	40	40

### 1.2.7 南方红豆杉中 10-DAB 含量的测定

应用 1.2.6 节优化的 10-DAB 最佳提取工艺对不同采摘部位、不同采收时节及不同生长年限的南方红豆杉中的 10-DAB 进行提取, 按照 1.2.2 节的色谱条件进行含量检测, 记录峰面积, 最终用于评价不同采摘部位、采收时节及生长年限的 10-DAB 含量。

### 1.2.8 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 多组之间的数据比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义, 采用 GraphPad Prism 5 软件绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 料液比对 10-DAB 含量的影响

料液比对 10-DAB 含量的影响结果见图 1。随着料液比的增加, 10-DAB 含量呈先上升后下降的趋势, 在料液比为 1:15 (g/mL) 时达到最大值

(1.32%), 随后 10-DAB 含量略有下降。表明当料液比为 1:15 (g/mL) 时, 南方红豆杉中 10-DAB 的溶出量达到饱和, 因此料液比选择 1:15 (g/mL) 为宜。

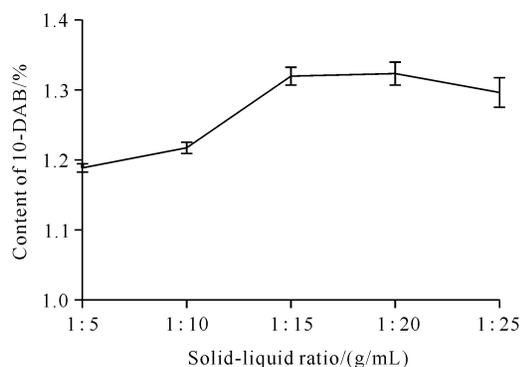


图 1 料液比对 10-DAB 含量的影响

Fig. 1 Effect of solid-liquid ratio on the content of 10-DAB

#### 2.1.2 提取时间对 10-DAB 含量的影响

提取时间对 10-DAB 含量的影响结果见图 2。随着提取时间的增加, 10-DAB 的含量呈先上升后下降再平稳的趋势, 在提取时间为 30 min 时达到最大值(1.12%)。可见含量并不会随时间的延长而持续增加, 为了节约时间和资源, 因此提取时间选择 30 min 为宜。

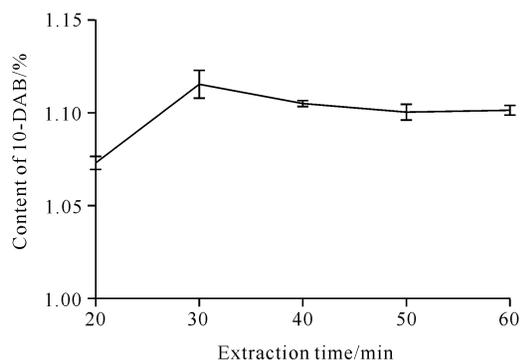


图 2 提取时间对 10-DAB 含量的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on the content of 10-DAB

#### 2.1.3 超声温度对 10-DAB 含量的影响

超声温度对 10-DAB 含量的影响结果见图 3。10-DAB 的含量先随着温度的升高而增加, 在 30 °C 时达到最大值(1.10%), 之后含量骤然下降, 可能是由于 10-DAB 的结构和活性对热较为敏感, 因此超声温度选择 30 °C 为宜。

### 2.2 响应面试验结果与分析

根据表 1 设定的因素与水平, 共设计 3 因素 3 水平的 17 个试验组合, 试验以含量(Y)为指标对整个工艺进行优化, Box-Behnken 试验设计结果如表 2 所示。

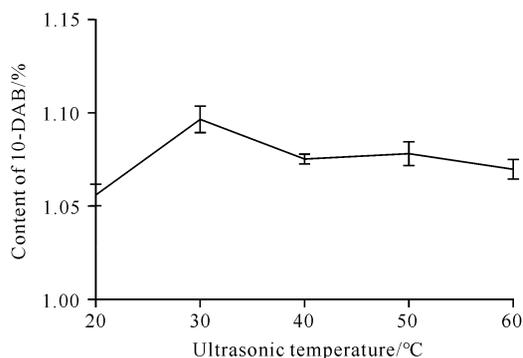


图3 超声温度对10-DAB含量的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic temperature on the content of 10-DAB

表2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken experiments design and results

试验号 Test number	A 料液比/ (g/mL) A Solid- liquid ratio/(g/mL)	B 提取时 间/min B Extraction time/min	C 超声温度/ °C C Ultrasonic tempera- ture/°C	Y 含量/% Y Con- tent/%
1	0	0	0	1.17
2	0	0	0	1.18
3	-1	0	-1	1.13
4	1	0	1	1.16
5	0	1	1	1.19
6	-1	0	1	1.16
7	1	1	0	1.16
8	1	0	-1	1.15
9	0	0	0	1.18
10	-1	-1	0	1.16
11	0	-1	-1	1.16

表3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
Model	4.872E-03	9	5.413E-04	10.31	0.0028***
A	6.504E-04	1	6.504E-04	12.39	0.0097***
B	2.008E-04	1	2.008E-04	3.82	0.0914
C	1.007E-03	1	1.007E-03	19.17	0.0032***
AB	1.123E-04	1	1.123E-04	2.14	0.1870
AC	8.924E-05	1	8.924E-05	1.70	0.2336
BC	1.744E-05	1	1.744E-05	0.33	0.5824
A <sup>2</sup>	2.592E-03	1	2.592E-03	49.37	0.0002***
B <sup>2</sup>	1.850E-05	1	1.850E-05	0.35	0.5715
C <sup>2</sup>	8.648E-05	1	8.648E-05	1.65	0.2402
Residual	3.675E-04	7	5.251E-05		
Misfit term	2.921E-04	3	9.737E-05	5.16	0.0734
Pure error	7.544E-05	4	1.886E-05		
Total	5.239E-03	16			

Note: \*\*\* indicates extremely significant differences ( $P < 0.01$ ).

续表

Continued table

试验号 Test number	A 料液比/ (g/mL) A Solid- liquid ratio/(g/mL)	B 提取时 间/min B Extraction time/min	C 超声温度/ °C C Ultrasonic tempera- ture/°C	Y 含量/% Y Con- tent/%
12	-1	1	0	1.12
13	0	-1	1	1.18
14	0	0	0	1.18
15	0	0	0	1.18
16	0	1	-1	1.16
17	1	-1	0	1.17

应用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中的数据  
进行二次多项式逐步回归拟合分析,得到 10-DAB 的  
含量(Y)对料液比(A)、提取时间(B)、超声温度(C)  
的二次多项回归方程:  $Y = 1.179 + 0.009A - 0.005B + 0.011C + 0.005AB - 0.005AC + 0.002BC - 0.025A^2 - 0.002B^2 - 0.005C^2$ ,  $R^2 = 0.9298$ ,说明考察值与模拟预测值具有紧密联系,模  
型的拟合度好,可用于优化试验设计与结果。进一步  
对方程进行方差分析(表 3),可知回归方程具有显著  
性差异( $P < 0.01$ )。3 个因素对 10-DAB 含量的影响  
排序为  $C > A > B$ ,其中,料液比、超声温度对 10-DAB  
的含量影响极显著( $P < 0.01$ )。交互项 AB、AC、BC  
对 10-DAB 含量的影响不显著( $P > 0.05$ )。回归方程  
的失拟项不显著( $P > 0.05$ ),表明未知因素对实验  
结果的干扰小,模型能充分拟合实验数据。

### 2.3 响应面交互作用分析

采用 Design-Expert 8.0.6 统计软件绘制各影响因素与响应值之间的三维响应面图和二维等高线图(图 4),以此评价试验因素之间的交互强度。响应面曲面直观反映了各因素间的交互作用,由于拟合方程的二次项均为负数,所以绘制出的响应面图开口向下,且具有极大值点。响应曲面越陡,等高线图越趋向椭圆形,表明两者的交互作用越强;等高线越密集,表明该因素对响应面峰值的影响较大。在一定范围内,10-DAB 含量(响应值)会随着各因素数值的增加

而增加,当含量到达最高点后,10-DAB 含量(响应值)会随着各因素数值的增加而减少。料液比与提取时间的交互作用最显著,其响应曲面陡,倾斜角度大,等高线图趋向椭圆形,且料液比的等高线比提取时间的密集,说明料液比对 10-DAB 含量的影响比提取时间更显著[图 4(a)];料液比与超声温度的交互作用次之[图 4(b)];提取时间与超声温度的交互作用最不显著,其响应曲面平缓,倾斜角度小,等高线图趋向圆形[图 4(c)]。综上可知,各因素交互作用的影响顺序为  $AB > AC > BC$ 。

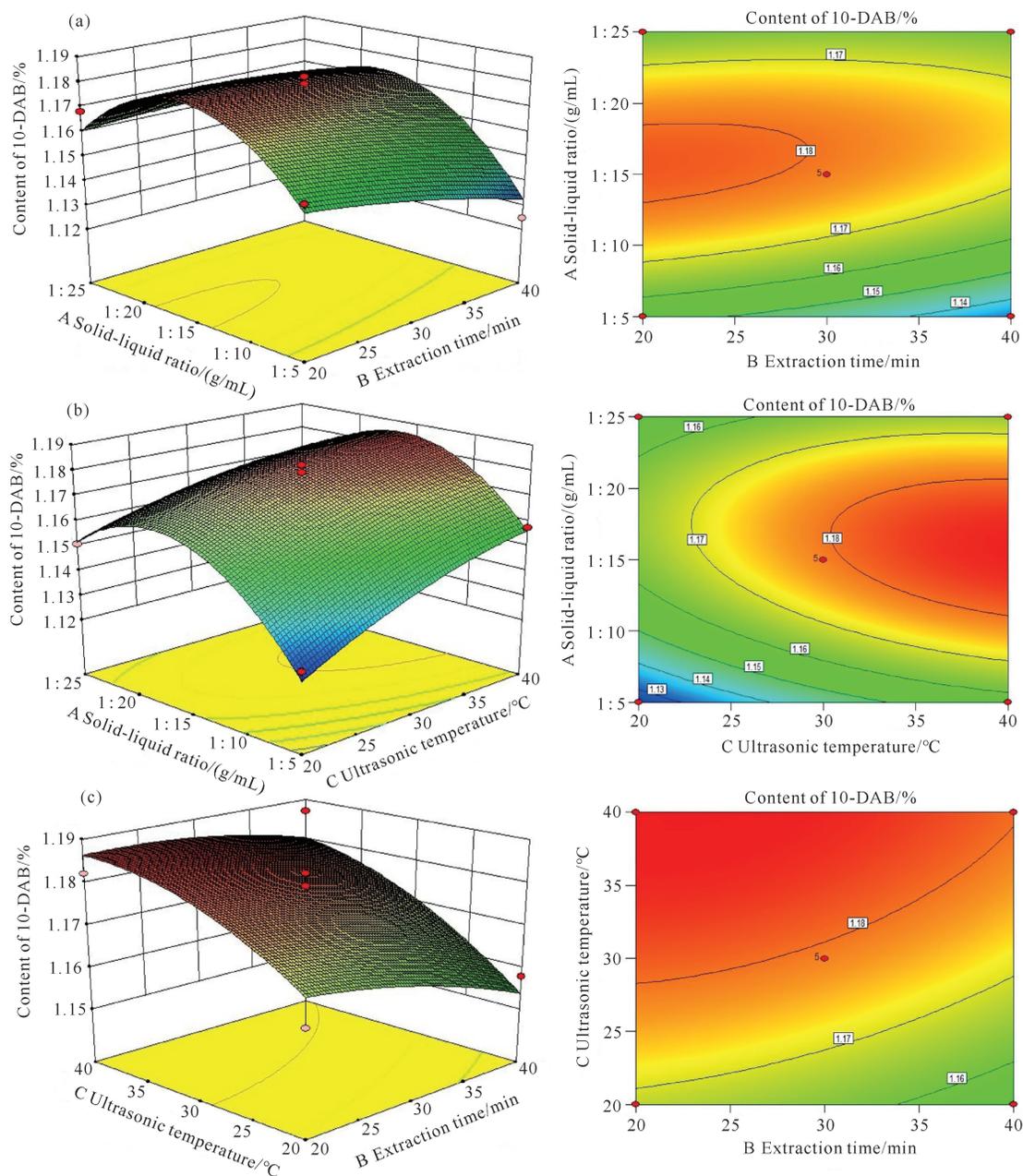


图 4 各因素对 10-DAB 含量影响的响应面图及等高线图

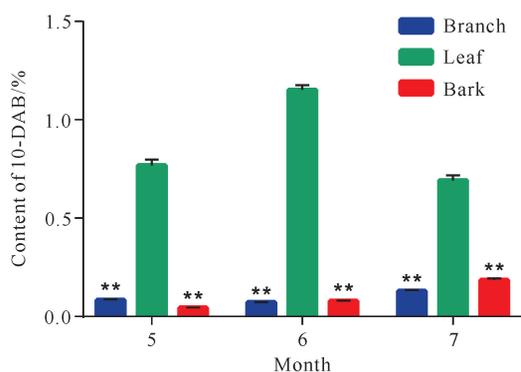
Fig. 4 Response surface diagram and contour line diagram of the effect of various factors on 10-DAB content

## 2.4 优化与验证试验

根据响应面模型和结果分析,得到 10-DAB 的最佳提取条件为料液比 1 : 15.14 (g/mL)、提取时间 23.2 min、超声温度 40 °C。结合实际情况,将最佳提取条件设定为料液比 1 : 15 (g/mL)、提取时间 23 min、超声温度 40 °C,在此条件下进行 3 次平行验证试验,得到 10-DAB 的平均含量为 1.18%,与理论值相近,二者相对偏差率为 0.42%,结果与响应预测值相近,证明试验设计的科学性、所选工艺的稳定性 and 重现性良好。

## 2.5 南方红豆杉中不同部位 10-DAB 含量分析

应用响应面优化后的最佳提取工艺对不同采摘部位、不同采收时节及不同生长年限的南方红豆杉中的 10-DAB 进行提取,并通过 UPLC 进行定量分析,结果如图 5-7 所示。由图 5 可知,南方红豆杉叶中的 10-DAB 含量最高,5-7 月份分别为 0.79%、1.15%、0.69%,与枝、树皮部位差异显著 ( $P < 0.05$ )。由图 6 可知,南方红豆杉叶中 10-DAB 累积易受季节影响,且不同生长年限的南方红豆杉叶 10-DAB 含量变化趋势相近,从 3 月份开始呈波动下降趋势,7 月份含量最低,随后呈逐渐递增的趋势,10、11 月份 10-DAB 累积达到较高水平,之后呈下降趋势。6、8、10 年生的南方红豆杉叶全年含量最高值在 10 月份,分别为 0.77%、1.03%、0.87%。结合当地气候,7、9 月份为雨期和高温季节,南方红豆杉喜阴又怕涝,且易受雨水和温度的影响,故 10-DAB 含量降低幅度较大。此外,由图 7 可知,10-DAB 全年平均含量与南方红豆杉的生长年限有一定关系,但显著性差异不大,其中 8 年生的南方红豆杉叶中的 10-



Compared with the leaf parts, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

图 5 不同采摘部位对南方红豆杉中 10-DAB 含量的影响

Fig. 5 Effects of different picking parts on the content of 10-DAB in *T. wallichiana* var. *mairei*

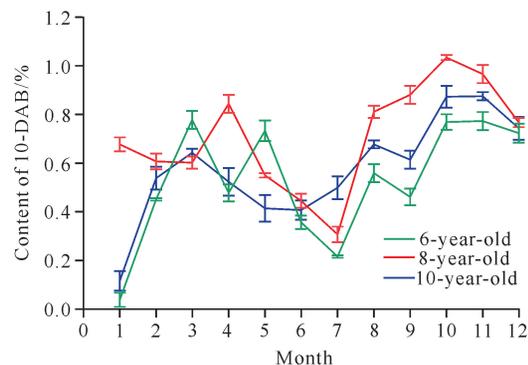


图 6 不同采收时节对南方红豆杉叶中 10-DAB 含量的影响

Fig. 6 Effects of different harvest seasons on the content of 10-DAB in *T. wallichiana* var. *mairei* leaves

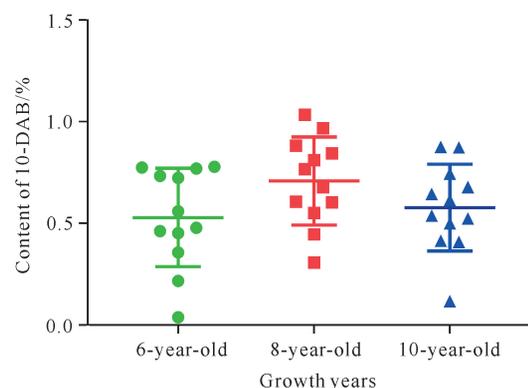


图 7 不同生长年限对南方红豆杉叶中 10-DAB 含量的影响

Fig. 7 Effects of different growth years on the content of 10-DAB in *T. wallichiana* var. *mairei* leaves

DAB 含量最高,其次是 10、6 年生,这可能与 10-DAB 的积累速度和分解速度有关。

## 3 讨论

红豆杉为我国野生濒危植物,被称为植物王国里的“活化石”,拥有极高的药用价值。10-DAB 为红豆杉中的紫杉烷类成分,是紫杉醇的生物合成前体。本研究前期试验发现,南方红豆杉中的紫杉醇含量较低,仅为 0.01% - 0.04%,而 10-DAB 含量远高于紫杉醇,具有非常高的研究价值。

基于单因素试验结果,本研究应用 Box-Behnken 中心组合的试验设计原理建立 3 因素 3 水平的回归方程模型,得到最优的提取工艺参数为料液比 1 : 15 (g/mL)、提取时间 23 min、超声温度 40 °C。此外,江石平等<sup>[13]</sup>在得到的最佳工艺条件下提取的 10-DAB 含量为 0.546%;查冲等<sup>[20]</sup>在得到的最佳工艺条件下提取的 10-DAB 含量为 0.41%。通过比较发现,本研究在最佳提取工艺条件下得到的 10-DAB 含量更高,为 1.18%,表明可从稀缺的红豆

杉资源中最大限度地提取 10-DAB, 并为其生产开发提供理论依据。

虽然已有学者对红豆杉中 10-DAB 的含量变化进行了研究, 但多集中在曼地亚红豆杉、云南红豆杉 (*T. yunnanensis*) 等, 如苏春英<sup>[21]</sup> 检测了曼地亚红豆杉中 10-DAB 的含量变化, 发现 10-DAB 的含量在 4 月份最高, 随后逐渐降低, 到 10 月份左右才基本稳定下来; 李海峰等<sup>[22]</sup> 检测了云南红豆杉生长过程中 10-DAB 的含量变化, 结果显示 10-DAB 在 10 月份达到峰值。而本研究重点检测了南方红豆杉中 10-DAB 的含量变化, 通过对比发现, 本研究中南方红豆杉 10-DAB 的含量变化趋势与云南红豆杉的变化趋势基本一致, 而与曼地亚红豆杉存在差异, 这可能与不同种红豆杉的生长速率及次级代谢产物积累不一致有关。因此, 本研究提出若以 10-DAB 含量为指标进行采收, 可在 10 月份采摘南方红豆杉的叶部位, 此时 10-DAB 含量最高, 且树叶可不断生长, 循环采摘, 故可最大限度地保护南方红豆杉资源, 并促进其可持续开发和综合利用。

本研究初步确定了南方红豆杉中 10-DAB 含量的峰值以及最佳采收时节, 并探索了 10-DAB 的最佳提取工艺, 可用于指导红豆杉中 10-DAB 的高效提取, 缓解紫杉醇的市场需求与药源矛盾突出的现状。本研究虽然发现南方红豆杉中 10-DAB 的含量与其生长年限有一定关系, 但是由于样本数量有限, 仅研究了 6、8、10 年生的南方红豆杉叶中 10-DAB 含量的变化趋势, 存在一定的片面性, 不能说明 10-DAB 含量随红豆杉树龄变化的整体趋势, 并且植物内有效成分积累量受气候、光照、海拔、生物量等一系列因子的影响, 故 10-DAB 积累量及变化趋势的机制还有待进一步研究。此外, 红豆杉中还含有三尖杉宁碱等可用于化学半合成紫杉醇的重要前体物质, 未来也可在其余前体物质的高效提取以及前体物质化学半合成紫杉醇的工艺方面进行深入研究, 以期解决紫杉醇供需矛盾突出的问题。

#### 4 结论

本研究在单因素试验的基础上结合响应面法对南方红豆杉中 10-DAB 的提取工艺进行优化, 得出最佳提取工艺为料液比 1:15 (g/mL)、提取时间 23 min、超声温度 40 °C, 该工艺下 10-DAB 含量为 1.18%。此外, 通过比较不同南方红豆杉样本中的 10-DAB 含量发现, 10 月份采摘 8 年生的红豆杉叶中

的 10-DAB 含量最高。综上, 本研究可为确定红豆杉的最佳采收期和 10-DAB 的最佳提取工艺提供数据支撑, 以期充分保护和利用珍贵的红豆杉资源。

#### 参考文献

- [1] 叶健, 苏恒, 陈立新, 等. 南方红豆杉种质资源及保护措施初探[J]. 南方农业, 2021, 15(27): 92-93.
- [2] 洪伟, 王新功, 吴承祯, 等. 濒危植物南方红豆杉种群生命表及谱分析[J]. 应用生态学报, 2004, 15(6): 1109-1112.
- [3] ZHU L Y, CHEN L Q. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy [J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2019, 24: 40.
- [4] YU D L, LOU Z P, MA F Y, et al. The interactions of paclitaxel with tumour microenvironment [J]. International Immunopharmacology, 2022, 105: 108555.
- [5] SHAHROKH S, SALMANIAN S, SHAHIN M. Recurrent malignant ovarian adenocarcinoma with central nervous system metastasis successfully treated with paclitaxel, carboplatin, capecitabine, and gemcitabine [J]. Baylor University Medical Center Proceedings, 2023, 36(2): 234-236.
- [6] ZHU M X, ZHANG P F, YU S, et al. Targeting ZFP64/GAL-1 axis promotes therapeutic effect of nab-paclitaxel and reverses immunosuppressive microenvironment in gastric cancer [J]. Journal of Experimental Clinical Cancer Research, 2022, 41(1): 14.
- [7] 覃佐东, 李珊, 金志远, 等. 简析紫杉醇的相关研究进展[J]. 科技通报, 2018, 34(4): 15-20.
- [8] 卫强, 孙涛. 红豆杉的抗肿瘤活性成分及其衍生物研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(10): 1664-1675, 1685.
- [9] LIU W C, GONG T, ZHU P. Advances in exploring alternative taxol sources [J]. RSC Advances, 2016, 6(54): 48800-48809.
- [10] 匡雪君, 王彩霞, 邹丽秋, 等. 紫杉醇生物合成途径及合成生物学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4144-4149.
- [11] 李兆慧, 严柳叶, 喻晓雁, 等. 超临界流体萃取红豆杉枝叶紫杉烷类萃取物中紫杉黄酮及单体组分的工艺优化[J]. 中药材, 2016, 39(9): 2062-2067.
- [12] 王俊青, 汪全, 焦阳阳, 等. 响应面法优化南方红豆杉叶总黄酮提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(2): 86-90.
- [13] 江石平, 王昱霁, 赵桂芝, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取南方红豆杉中挥发油和 10-DAB III 的工艺优化[J]. 华西药学杂志, 2023, 38(1): 87-90.

- [14] 李艳艳, 王倩倩, 苏圆圆, 等. 响应面法优化提取曼地亚红豆杉总黄酮及抗氧化活性[J]. 北方园艺, 2021(5): 94-102.
- [15] 陈艳. 曼地亚红豆杉枝叶中紫杉醇的浸提工艺优化与含量测定[D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
- [16] 孙志鹏, 蒲擎宇, 尚鹏程, 等. 云南红豆杉活性成分 10-DAB 累积分布规律[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(5): 1161-1167.
- [17] 何泉宇, 赵柳婷, 李立威. 四种不同品种红豆杉中 10-乙酰巴卡亭Ⅲ的含量测定[J]. 荆楚理工学院学报, 2017, 32(4): 5-8.
- [18] 王璐娜, 王红芳, 宋小飞, 等. 高效液相色谱法同时测定 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ中 4 种有关物质[J]. 海峡药学, 2021, 33(10): 54-57.
- [19] 闫丹, 江敏瑜, 赵凤平, 等. RP-HPLC 法测定幼红豆杉不同部位紫杉醇、10-DAB Ⅲ的含量[J]. 重庆中草药研究, 2017(1): 19-23.
- [20] 查冲, 杜亚填, 刘磊磊, 等. 南方红豆杉枝叶中 10-DAB Ⅲ与紫杉醇 HPLC 检测及检测样的制备[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 140-145.
- [21] 苏春英. 川林曼地亚红豆杉生物量与 10-DAB 含量动态变化研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2017.
- [22] 李海峰, 赵志莲, 刘光明. 云南红豆杉生长过程中 10-去乙酰巴卡亭Ⅲ的含量变化[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2443-2444.

## Response Surface Methodology for Optimization of Extraction Process and Content Determination of 10-DAB in *Taxus wallichiana* var. *mairei*

LI Yuzhi<sup>\* \*</sup>, SONG Xiaominting, PEI Jin, CAO Zhixing, CHEN Jiang, RAO Hua<sup>1</sup>nan

(State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan, 611137, China)

**Abstract:** In order to explore the optimal extraction process of 10-Deacetylbaccatin Ⅲ (10-DAB) from *Taxus wallichiana* var. *mairei* leaves, the content of 10-DAB in *T. wallichiana* var. *mairei* was taken as the index, and the solid-liquid ratio, extraction time and ultrasonic temperature were taken as the investigation factors. The extraction process of 10-DAB was optimized by single factor test combined with response surface method, and the content difference of 10-DAB in different picking parts, different growth years and different harvesting times was detected by Ultra-high Performance Liquid Chromatography (UPLC). The results showed that the optimum extraction conditions of 10-DAB from *T. wallichiana* var. *mairei* were as follows: the solid-liquid ratio was 1 : 15 (g/mL), the extraction time was 23 min, and the ultrasonic temperature was 40 °C. Under these conditions, the content of 10-DAB was 1.18%, and the relative deviation from the theoretical value was 0.42%. The results of UPLC detection showed that the content of 10-DAB in the leaves of *T. wallichiana* var. *mairei* was significantly higher than that in branches and barks, and the annual cumulative content of 10-DAB was obviously affected by the season, reaching the highest value in October. This study can provide a reference for the extraction and utilization of 10-DAB in *T. wallichiana* var. *mairei*.

**Key words:** *Taxus wallichiana* var. *mairei*; 10-DAB; response surface methodology; single factor experiment; UPLC method

责任编辑: 唐淑芬