

UPLC同时测定海南粗榧中3种三尖杉生物碱类化合物

孙化鹏, 王荣香, 丛汉卿, 乔飞*

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质
创制重点开放实验室, 海南儋州 571737)

[摘要] 目的:海南粗榧中主要活性成分为以三尖杉碱为母核的三尖杉酯类生物碱,该研究利用超高压液相色谱(UPLC)建立一种同时测定三尖杉碱、三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱3种化合物含量的检测方法,分析海南粗榧不同组织样品中3种生物碱的代谢分布。**方法:**选用Agilent 1290 II型超高压液相色谱仪,Agilent Infinitylab EC-C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm),流动相甲醇-20 mmol·L⁻¹碳酸铵水溶液,梯度洗脱,洗脱流速0.8 mL·min⁻¹,检测波长291 nm,进样量5 μL,柱温30 ℃。**结果:**在上述色谱条件下,色谱图基线平稳,各目标化合物峰型漂亮,分离度好。同时,对照品线性回归结果表明3种三尖杉生物碱含量与峰面积呈良好的线性关系,方法学考察实验结果表明仪器精密度、方法重复性及回收率均符合定量测定方法要求。**结论:**该方法具有较好的精密度、稳定性和重复性,且该方法检测时间短,12 min可以完成海南粗榧样品中3种三尖杉酯类生物碱的定量检测,操作简单快速、结果准确可靠,可以用于海南粗榧中三尖杉碱、三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的检测分析和质量控制,为深入研究海南粗榧中三尖杉酯类生物碱的代谢累积和时空分布等工作奠定方法学基础,同时也为海南粗榧的药用价值评价提供理论依据。

[关键词] 超高效液相色谱;海南粗榧;三尖杉碱;三尖杉酯碱;高三尖杉酯碱

[中图分类号] R284.1;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0047-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181918

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180712.1049.013.html>

[网络出版时间] 2018-07-16 9:37

Content Determination of Three Cephalotaxus Alkaloids in *Cephalotaxus hainanensis* by UPLC

SUN Hua-peng, WANG Rong-xiang, CONG Han-qing, QIAO Fei*

(Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China,
Ministry of Agriculture, Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical
Agricultural Science, Danzhou 571737, China)

[Abstract] **Objective:** The main active ingredients in *Cephalotaxus hainanensis* include cephalotaxine, harringtonine, homoharringtonine. This study aimed to establish a UPLC method for determination of cephalotaxine, harringtonine and homoharringtonine and analyze their metabolic accumulation and distribution in different tissues in *C. hainanensis*. **Method:** The method was performed on Agilent 1290 II UPLC platform. The suitable conditions of UPLC were Agilent Infinitylab EC-C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm, Agilent Infinitylab), methanol and 20 mmol·L⁻¹ ammonium carbonate aqueous solution as mobile phase, gradient elution at 0.8 mL·min⁻¹, detective wavelength at 291 nm, injection volume of 5 μL, and column temperature at 30 ℃.

[收稿日期] 20170925(014)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630032017083,1630032017076);国家自然科学基金面上项目(31570326)

[第一作者] 孙化鹏,博士,助理研究员,从事药用植物资源工程研究,Tel: 0898-23306675,E-mail: Harper_sun@126.com

[通信作者] *乔飞,博士,研究员,从事植物分子细胞生物学研究,Tel: 0898-23306675,E-mail: fei.qiao@catas.cn

Result: Under the above chromatographic conditions, the chromatogram baseline was stable, and each target compound had a good peak shape and resolution. The results showed a good linear relationship between content and peak area in all three *C. hainanensis* alkaloids. The methodological experiment showed that the instrument precision, method reproducibility and recovery rate all conform to the requirements of quantitative determination.

Conclusion: This determination method has a good precision, stability and repeatability, with the advantages of shorter determination time, simpler operation and more accurate results. All of these three alkaloids could be detected in 12 min. It can be used to determine the contents of cephalotaxine, harringtonine and homoharringtonine in *C. hainanensis*, and establish a foundation for further study of metabolic accumulation in *C. hainanensis*.

[**Key words**] UPLC; *Cephalotaxus hainanensis*; cephalotaxine; harringtonine; homoharringtonine

海南粗榧是三尖杉科三尖杉属孑遗植物,也是我国特有的珍稀药用植物^[1-2]。海南粗榧中主要活性成分为三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱、异三尖杉酯碱和脱氧三尖杉酯碱等多种以三尖杉碱为母核的酯类生物碱^[3-5],对治疗急(慢)性粒细胞白血病、单核细胞白血病、早幼粒细胞白血病等非淋巴型白血病有显著疗效,而且三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱现已投入临床使用且成效显著^[6-8]。1970 年代,相关专家对全国范围内 8 种三尖杉属植物开展的抗癌活性成分研究表明,海南粗榧中三尖杉酯类生物碱含量最高、种类最多(共有 11 种),但因海南粗榧生长速度极慢,生态分布狭窄,加之早期的人为破坏,分布区面积在不断缩小,现在仅呈零星分布,已被列为国家二级重点保护濒危植物^[2]。由于三尖杉酯类生物碱抗癌效果明显,2015 年版《中国药典》已收录高三尖杉酯碱为抗肿瘤药物,并允许其注射液进入临床使用^[9];而美国食品药品监督管理局(FDA)也于 2012 年批准高三尖杉酯碱用于临床治疗慢性粒细胞白血病^[10]。

三尖杉酯类生物碱来源单一且含量较低,仅存在于海南粗榧、中国粗榧、日本粗榧、三尖杉等三尖杉属植物中^[1-2,11],与其相关的分析检测研究报道较少,且多为针对一种或两种目标成分的高效液相色谱法(HPLC);李辉等^[12]建立了中国粗榧中高三尖杉酯碱的超声提取-高效液相色谱检测方法;吴方评等^[13]建立了三尖杉中三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的 SPE-HPLC 检测方法;Li^[14]和 Wickremesinhe^[15]等分别利用 HPLC 检测分析了粗榧悬浮细胞和愈伤中的三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱含量变化,而海南粗榧不同组织中三尖杉酯类生物碱全面、快速、准确地分析检测方法未见报道。本研究拟通过超高压液相色谱(UPLC)建立一种可靠、稳定、灵敏、高效的检测方法,同时测定和分析海南粗榧中三尖杉碱、三

尖杉酯碱和高三尖杉酯碱含量,为开展研究海南粗榧三尖杉酯类生物碱的代谢累积及影响因素等各方面的工作奠定基础,同时也为海南粗榧及其同属植物资源开展药用价值的评价提供依据。

1 材料

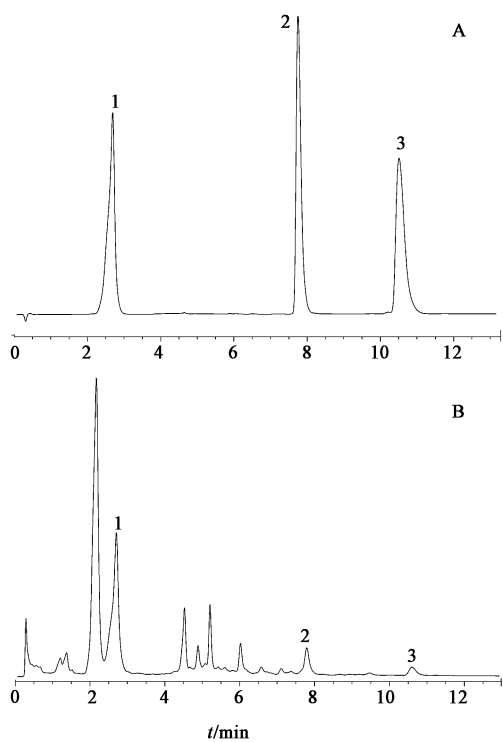
1290 II 型超高压液相色谱仪(美国安捷伦公司,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和 ChemStation 色谱工作站),ME54E 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),明澈-D 型超纯水仪(美国 Millipore 公司),DHG-9240A 型鼓风干燥机(上海精宏实验设备有限公司),KQ-600DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

三尖杉碱(批号 CA20161020),三尖杉酯碱(批号 HT20161022),高三尖杉酯碱(批号 HH20161021)对照品购自南京春秋生物制品有限公司(纯度均 > 98%);甲醇(色谱纯,德国 CNW 公司);甲醇、三氯甲烷、氨水、碳酸铵(分析纯,广州化学试剂厂)。

海南粗榧样品 2017 年 4 月采自海南省尖峰岭国家森林公园,经中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所王祝年研究员鉴定为三尖杉科三尖杉属植物海南粗榧 *Cephalotaxus hainanensis*,全株可入药。叶片、叶柄、小枝均为新鲜样品,树皮样品为海南粗榧自然脱落,60 °C 烘干至恒重,粉碎后备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Infinitylab EC-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm);流动相甲醇(A)-20 mmol·L⁻¹碳酸铵水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 3 min, 25% A; 3 ~ 4 min, 25% ~ 45% A; 4 ~ 13 min, 45% A);流速 0.8 mL·min⁻¹;检测波长 291 nm;进样量 5 μL;柱温 30 °C。在以上色谱条件下,基线平稳,各目标化合物峰型漂亮,分离度好。见图 1。



1. 三尖杉碱; 2. 三尖杉酯碱; 3. 高三尖杉酯碱

图 1 对照品(A)和样品(B)UPLC 色谱

Fig.1 UPLC of reference substances(A) and samples(B)

2.2 样品制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 分别加甲醇配制成质量浓度为 $4.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三尖杉碱, $8.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三尖杉酯碱和 $7.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高三尖杉酯碱对照品溶液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.2.2 样品溶液的制备 精确称取海南粗榧样品粉末 2.0 g , 加甲醇 20 mL 超声提取 45 min , 冷却后过滤, 滤渣回收后再加入甲醇 20 mL , 超声提取 30 min , 冷却后过滤, 合并滤液并 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 减压浓缩至干; 加 0.5% 氨水溶液 20 mL 复溶为混悬液, 等体积三氯甲烷萃取 2 次, 合并三氯甲烷层并 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 减压浓缩至干; 加甲醇 2 mL 复溶, 经 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过即得供试样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系和定量限 精密吸取质量浓度为 $4.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三尖杉碱, $8.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三尖杉酯碱和 $7.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高三尖杉酯碱对照品溶液, 按 1, 5, 25, 125, 625 倍梯度稀释, 得系列对照品溶液。按照 2.1 项下色谱条件进样分析, 以化合物质量 (μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 各成分回归方程分析参数见表 1。

2.3.2 精密度试验 取同一供试样品溶液(小

表 1 3 种成分的线性回归方程、线性范围及相关系数

Table 1 Linear regression analysis parameters of 3 compounds

成分	回归方程	线性范围 / μg	R^2
三尖杉碱	$Y = 927.24X + 5.5373$	0.03 ~ 20.4	1
三尖杉酯碱	$Y = 481.49X + 2.6911$	0.07 ~ 43.0	0.9999
高三尖杉酯碱	$Y = 480.91X + 4.0873$	0.06 ~ 38.0	0.9999

枝), 按照 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 分别记录三尖杉碱、三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱峰面积并计算 RSD, 结果显示 3 种目标化合物峰面积的 RSD 分别为 0.7% , 1.2% 和 1.1% , 表明仪器精密度良好, 符合定量检测要求。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试样品溶液(小枝), 按照 2.1 项下色谱条件分别在 0, 3, 6, 12, 24, 48 h 进样, 分别记录三尖杉碱、三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱峰面积并计算 RSD, 结果显示 3 种目标化合物峰面积的 RSD 分别为 0.9% , 1.0% 和 1.4% , 表明供试样品溶液在 48 h 内稳定, 样品制备符合定量检测要求。

2.3.4 重复性试验 取同一供试样品粉末 6 份(小枝), 按 2.2.2 项下方法制备供试样品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件进样检测, 分别记录三尖杉碱、三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱峰面积并计算含量, 结果显示 3 种目标化合物平均质量分数为 1.368 , 1.615 , $0.106 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其 RSD 分别为 1.3% , 1.4% 和 1.7% , 表明该方法重复性好, 符合定量检测要求。

2.3.5 回收率试验 精确称取同一供试样品粉末 9 份(小枝), 每份 2.0 g , 分别精密加入高、中、低 3 个浓度的对照品溶液, 每个浓度 3 份作为 3 个重复, 按 2.2.2 项下方法制备供试样品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件进样检测, 分别记录三尖杉碱、三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱峰面积并计算回收率。结果见表 2。

2.3.6 样品测定 分别取海南粗榧叶片、叶柄、小枝、树皮(自然脱落)样品粉末 2.0 g , 精密称定, 按 2.2.2 项下方法制备供试样品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件进样检测, 依据外标法计算三尖杉碱、三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱含量, 结果见表 3。三尖杉碱的含量分布为叶片 > 小枝 > 叶柄 > 树皮(自然脱落); 三尖杉酯碱的含量分布为小枝 > 叶柄 > 叶片 > 树皮; 高三尖杉酯碱的含量分布为叶片 > 小枝 > 叶柄, 自然脱落的树皮中也未检出。检测结果表明, 海南粗榧不同样品中 3 种三尖杉生物碱的含量分布均有所不同。

表 2 海南粗榧 3 种成分加样回收率试验 ($n=3$)

Table 2 Recovery test results of three compounds of *Cephalotaxus hainanensis* ($n=3$)

成分	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 值 /%	RSD /%
三尖杉碱	2.736	4.080	6.595	94.6	93.5	1.2
	2.736	3.060	5.550	92.0		
	2.736	2.040	4.650	93.8		
三尖杉酯碱	3.230	4.300	7.180	91.9	93.1	1.1
	3.230	3.225	6.232	93.1		
	3.230	2.150	5.259	94.4		
高三尖杉酯碱	0.212	0.304	0.518	100.6	102.3	1.3
	0.212	0.228	0.445	102.2		
	0.212	0.152	0.370	103.9		

表 3 海南粗榧不同样品中 3 个成分的含量测定

Table 3 Content determination results of different samples of *Cephalotaxus hainanensis* $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品	三尖杉碱	三尖杉酯碱	高三尖杉酯碱
叶片	1.572	0.503	0.187
叶柄	1.226	0.736	0.076
小枝	1.368	1.615	0.106
树皮(自然脱落)	0.044	0.095	-

3 讨论

三尖杉酯类生物碱是目前最有潜力的抗癌自然药源之一,研究表明,海南粗榧是三尖杉属植物中三尖杉酯类生物碱含量最高、种类最多的品种,尤其是三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的含量均为同属植物中最高^[2,5,11],但由于海南粗榧已被列为国家二级重点保护濒危植物,通过砍伐植物获得三尖杉酯类生物碱药品原料来源已被明令禁止。因此,通过组织培养、基因工程、细胞工程等分子生物学方法来探索解决其原料来源已成为当前研究的重点方向,而一种全面、快速、准确、稳定地分析检测建立,对研究分析海南粗榧中三尖杉酯类生物碱的含量和代谢分布具有重要意义。UPLC 是近年来开发的新一代液相色谱技术,因其具有超高效的分离能力及分离速度,能显著提高柱效、改善分离效果^[16-21]。本研究在前期研究的基础上,通过对检测波长、流动相以及进样量和洗脱流速等 UPLC 基本参数的筛选和确定,建立了同时测定海南粗榧中 3 种三尖杉生物碱活性成分的检测方法。

本研究在方法建立过程中,首先对检测波长进

行了选择和确定,全波长扫描分析结果表明三尖杉碱最大吸收波长为 291 nm,三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱最大吸收波长为 291 nm 和 238 nm,而 3 种化合物在 291 nm 处均具有较强吸收,故选择 291 nm 为最终检测波长;其次进行了流动相的筛选,结合参考文献先后考察了乙腈-甲醇-水、乙腈-10 mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液、甲醇-10 mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液、甲醇-20 mmol·L⁻¹碳酸铵水溶液 4 种流动相系统^[14-15],结果表明甲醇-20 mmol·L⁻¹碳酸铵水溶液系统洗脱、分离效果最好,在该流动相系统下,色谱图基线平稳、色谱峰峰型较好且各组分间分离度较好。

本研究通过方法学考察实验并结合海南粗榧不同样品中 3 种三尖杉酯类生物碱的含量测定,进一步验证了该方法具有较好的精密度、稳定性和重复性,且该方法检测时间短,12 min 可以完成海南粗榧样品中 3 种三尖杉酯类生物碱的定量检测,操作简单快速、结果准确可靠,可以用于海南粗榧中三尖杉碱、三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的检测分析和质量控制,为深入研究海南粗榧中三尖杉酯类生物碱的代谢累积和时空分布等工作奠定方法学基础,同时也为海南粗榧的药用价值评价提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:科学出版社,1978.
- [2] 杜道林,符文英. 珍稀濒危植物海南粗榧种群保护生态学 [M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2003.
- [3] Takano I, Yasuda I, Nishijima M, et al. New cephalotaxus alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* [J]. J Nat Prod, 1996, 59(10):965-967.
- [4] Takano I, Yasuda I, Nishijima M, et al. Ester-type cephalotaxus alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* [J]. Phytochemistry, 1997, 44(4):735-738.
- [5] 梅文莉,吴娇,戴好富. 三尖杉属植物化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(3):452-458.
- [6] JIN J, WANG J X, CHEN F F, et al. Homoharringtonine-based induction regimens for patients with de-novo acute myeloid leukaemia: a multicentre, open-label, randomised, controlled phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2013, 14(7):599-608.
- [7] Morita H, Nagakura Y, Hosoya T, et al. Cephalotaxine A, and antiplasmodial activity of *Cephalotaxus* alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia* forma *Fastigiata* [J]. Heterocycles, 2010, 81(2):441-450.

- [8] Powell R G, Weisleder D, Smith J C R. Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*; structure and activity[J]. J Pharm Sci, 2010, 61(8) :1227-1230.
- [9] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015.
- [10] Cortes J, Lipton J H, Rea D, et al. Phase 2 study of subcutaneous omacetaxine mepesuccinate after TKI failure in patients with chronic-phase CML with T315I mutation[J]. Blood, 2012, 120(13) :2573-2580.
- [11] Abdelkafi H, Nay B. Natural products from *Cephalotaxus* sp. : chemical diversity and synthetic aspects [J]. Nat Prod Rep, 2012, 29(8) :845-869.
- [12] 李辉, 胡文彬, 李亚男, 等. 超声提取-高效液相色谱法测定粗榧中高三尖杉酯碱[J]. 理化检验:化学分册, 2009, 45(4) :466-467, 470.
- [13] 吴方评, 金苹, 姚祖福, 等. SPE-HPLC 法测定三尖杉中的三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱[J]. 中成药, 2016, 38(5) :1070-1073.
- [14] LI Y C. Enhanced cephalotaxine production in *Cephalotaxus mannii* suspension cultures by combining glycometabolic regulation and elicitation [J]. Process Biochem, 2014, 49(12) :2279-2284.
- [15] Wickremesinha E R M, Arteca R N. HPLC separation of cephalotaxine, harringtonine and homoharringtonine from callus and root cultures of *Cephalotaxus harringtonia* [J]. J Liq Chromatogr R T, 1996, 19(6) :889-897.
- [16] 李正, 吴德玲, 赵宏芬, 等. UPLC 测定醉鱼草不同部位中 4 种黄酮类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6) :74-77.
- [17] 梁军, 郭信东, 夏永刚, 等. UPLC 同时测定不同产地连翘中 8 种成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11) :68-72.
- [18] 邵军, 陈伟康, 马双成, 等. UPLC 法同时测定裸花紫珠中 5 种类黄酮类成分[J]. 中草药, 2014, 45(10) :1473-1476.
- [19] 田刚, 杨学芳, 李超, 等. UPLC 同时检测小儿豉翘清热颗粒中 9 种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10) :2081-2085.
- [20] 苟燕梅, 钟世红, 古锐, 等. 基于 UPLC 的独一味中 8 种成分测定及其含量影响因素初步研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24) :4807-4813.
- [21] 樊小瑞, 刘梓晗, 冯伟红, 等. 基于 UPLC 技术的吴茱萸定性定量一体化研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(20) :3945-3956.

[责任编辑 顾雪竹]