

[7] 王瑞娜,孙耀志,高松,等. HPLC 波长切换法同时测定安神解虑颗粒中4种成分[J]. 中成药, 2015, 37(5): 991-995.

[8] 秦冬梅,胡丽萍,张跃新. HPLC 同时测定没食子中没食子酸与没食子酸甲酯的含量[J]. 中成药, 2011, 33(2): 353-355.

[9] 王金玲,李亮亮,吕长山. 反相高效液相色谱法测定东北地区6种红树莓果实中鞣花酸含量[J]. 食品科学, 2015, 36(12): 93-96.

[10] 许文,傅志勤,林婧,等. UPLC-MS/MS 法同时测定三叶青中10种黄酮类成分[J]. 药学学报, 2014, 49(12): 1711-1717.

[11] 卢化,张义生,黎强,等. 蕲艾的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房. 2015, 26(9): 1255-1257.

[12] 王瑞娜,孙耀志,高松,等. HPLC 波长切换法同时测定安神解虑颗粒中4种成分[J]. 中成药, 2015, 37(5): 991-995.

[13] 陈晓静,何杰,杨建云,等. RP-HPLC 法同时测定葡萄籽提取物中没食子酸、儿茶素和表儿茶素的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 723-727.

[14] 肖培云,蓝海,李龙星. HPLC 法测定隔山消中没食子酸的含量研究[J]. 大理学院学报, 2009, 8(6): 9-11.

[15] 杨淋,王涛,蓝海. 紫地榆的乙酸乙酯部分和水部分抗粘性放线菌的体外研究[J]. 大理学院学报, 2015, 14(4): 8-11.

SPE-HPLC 法测定三尖杉中的三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱

吴方评, 金苹, 姚祖福, 杨勇, 刘良红
(湖南医药学院, 侗医药研究湖南省重点实验室, 湖南怀化 418000)

摘要: **目的** 采用固相萃取-高效液相色谱 (SPE-HPLC) 法测定三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* Hook. f. 中的三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱。**方法** 三尖杉 90% 乙醇提取液的分析采用迪马 Diamonil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈: 水 (含 0.1 g 十二烷基磺酸钠和 0.1% 磷酸, 42: 58), 等度洗脱; 体积流量为 0.5 mL/min; 检测波长为 291 nm。**结果** 三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱在 2.48 ~ 49.60、2.51 ~ 50.20 μg/mL 范围内线性关系良好, 平均回收率 (*n* = 5) 分别为 95.4%、95.1%, RSD 分别为 1.83%、1.91%。两种成分的含有量在茎中最高, 而在叶中最低。**结论** 该方法可用于测定该植物中的三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱, 效果理想。

关键词: 三尖杉; 三尖杉酯碱; 高三尖杉酯碱; SPE-HPLC

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)05-1070-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.05.022

Determination of harringtonine and homoharringtonine in *Cephalotaxus fortunei* by SPE-HPLC

WU Fang-ping, JIN Ping, YAO Zu-fu, YANG Yong, LIU Liang-hong
(Hunan University of Medicine, Hunan Provincial Key Laboratory of Dong Pharmaceutical Research, Huaihua 418000, China)

ABSTRACT: **AIM** To determine harringtonine and homoharringtonine in *Cephalotaxus fortunei* Hook. F. by solid phase extraction-high performance liquid chromatography (SPE-HPLC). **METHODS** The analysis of 90% ethanol extract of *C. fortunei* was performed on Diamonil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was acetonitrile-water (containing 0.1 g sodium dodecylsulphate and 0.1% phosphate, 42: 58) with isocratic elution, flow rate was 0.5 mL/min and detection wavelength was set at 291 nm. **RESULTS** Harringtonine and homoharringtonine showed good linear relationships within the ranges of 2.48 – 49.60 μg/mL and 2.51 – 50.20 μg/mL, whose average recoveries (*n* = 5) were 95.4% and 95.1% with the RSDs of 1.83% and 1.91%.

收稿日期: 2015-07-28
基金项目: 湖南省怀化市科技局科研项目 (2014-19)
作者简介: 吴方评 (1972—), 男 (侗族), 硕士, 副教授, 从事药物制剂质量控制研究。Tel: 15576513046, E-mail: wfp1013@163.com
1070

respectively. The contents of these two constituents were the highest in stems and the lowest in leaves. **CONCLUSION** This method can be used for the determination of harringtonine and homoharringtonine in this plant with great effect.

KEY WORDS: *Cephalotaxus fortunei* Hook. F.; harringtonine; homoharringtonine; SPE-HPLC

三尖杉属隶属于三尖杉科裸子植物，该科仅三尖杉1属9种，产于亚洲东部至南亚次大陆，在我国分布最为集中^[1]。三尖杉酯碱（HT）和高三尖杉酯碱（HHT）是从三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* Hook. f. 中分离出的具有抗肿瘤活性的生物碱，其中后者对人早幼粒白血病细胞 HL-60 有较强的细胞毒性^[2-5]，过去30年被广泛用于急性、慢性粒细胞性白血病的治疗，取得了较好的效果^[6-8]；前者对 HL-60 和人白血病细胞 K562 也具有凋亡作用^[9-10]。目前，这两种成分主要从三尖杉属植物中分得，而海南粗榧内生真菌细极链格孢 CH1307 发酵后也可得到高三尖杉酯碱^[11]。生物样品中，高三尖杉酯碱的含有量主要通过 HPLC 法进行测定^[12-13]，而三尖杉酯碱与其结构非常相似，但尚无同时测定这两种成分的文献报道。本实验通过固相萃取方法对三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱进行富集，然后采用 HPLC 法同时测定其含有量。

1 材料与试剂

1.1 材料

1.1.1 研究对象 三尖杉样品采自湖南省洪江市雪峰山自然保护区，经湖南医药学院中药现代化研究中心汪冶教授鉴定为三尖杉属植物。

1.1.2 主要仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪，包括四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器及汉化版化学工作站；迪马 Diamonil C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；岛津 AUW120D 电子分析天平；LC-350A 超声波中药处理机；Waters Sep-Pak -C₁₈ 固相萃取小柱。

1.2 主要试剂 高三尖杉酯碱对照品（批号 111533-200403，中国食品药品检定研究院）；三尖杉酯碱对照品（批号 26833-85-2，南京春秋生物工程有限公司，含有量 98% 以上）。乙腈为色谱纯（天津赛福瑞科技有限公司）；乙醇为分析纯（重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂）；其他试剂均为分析纯；水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取三尖杉

酯碱 4.96 mg、高三尖杉酯碱 5.02 mg，置于 10 mL 量瓶中，流动相溶解并定容至刻度，即得 0.496 mg/mL 三尖杉酯碱和 0.502 mg/mL 高三尖杉酯碱对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取三尖杉适量，粉碎，过 100 目筛，精密称取 0.10 g，置于 50 mL 量瓶中，加入 90% 乙醇 40 mL，浸润 10 min，超声提取 45 min，水浴加热挥去乙醇至微干，5 mL 乙醇溶解，蒸馏水定容至刻度，超声处理 10 min，以 5 mL/min 的体积流量通过预处理的 Sep-Park-C₁₈ 固相萃取小柱，5 mL 二次蒸馏水过柱洗涤，5 mL 20% 乙醇淋洗，离心，3 mL 90% 乙醇洗脱，弃去最初的 3 滴，流动相定容至 10 mL，即得。

2.1.3 色谱条件 迪马 Diamonil C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈：水（含 0.1 g 十二烷基磺酸钠和 0.1% 磷酸，42：58）；检测波长 291 nm；体积流量 0.5 mL/min；进样量 10 μL。进样前，对照品和样品溶液用 0.45 μm 针头过滤器过滤。

2.2 结果

2.2.1 系统适应性试验 在“2.1.3”项色谱条件下，三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱对照品溶液及三尖杉供试品溶液分别进样 10 μL 测定，记录色谱图，见图 1。由图可知，两种成分的保留时间分别为 13.255 min 和 15.185 min，理论塔板数大于 6 000，分离度大于 1.5，基线基本分离，峰形对称，表明该条件可用于分析测定。

2.2.2 线性关系的考察 分别精密量取三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱对照品贮备液适量，置于 5 个 10 mL 量瓶中，流动相定容至刻度，分别配制成 2.48、4.96、9.92、24.8、49.60 μg/mL 三尖杉酯碱和 2.51、5.02、10.04、25.10、50.20 μg/mL 高三尖杉酯碱校正液，在“2.1.3”项色谱条件下进样。以质量浓度（μg/mL）为横坐标（X），面积响应值为纵坐标（Y）进行线性回归，得回归方程分别为三尖杉酯碱 $Y = 8.1033X - 5.8502$ （ $r = 0.9994$ ）、高三尖杉酯碱 $Y = 4.7355X + 1.3121$ ，（ $r = 0.9998$ ），表明两种成分分别在 2.48~49.60、2.51~50.20 μg/mL 范围内线性关系良好。

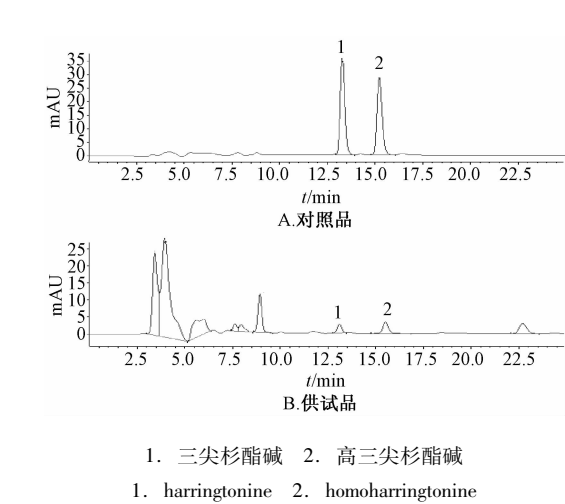


图1 HPLC 色谱图
Fig.1 HPLC chromatograms

2.2.3 检测限和定量限的考察 将三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱对照品溶液逐步稀释后进样测定，以色谱图中信噪比（S/N）为3时的进样量为最低检测限（LOD），为10时的进样量为最低定量限（LOQ）。结果，两种成分的检测限分别为0.001 2、0.001 2 μg，定量限分别为0.012 0、0.012 0 μg。

2.2.4 稳定性试验 取同一供试品溶液，在“2.1.3”项色谱条件下分别于0、1、2、4、8、16、24 h进样10 μL，测得两种成分峰面积RSD分别为3.01%和2.55%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.5 精密度试验 取“2.1.1”项下三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱对照品溶液，进样5次，测得两种成分峰面积RSD分别为2.87%和2.65%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一批次三尖杉样品0.1 g，共5份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.3”项色谱条件下分析，测得两种成分平均含有量分别为0.849 5 mg/g和1.889 7 mg/g，RSD（n=5）分别为2.95%和2.43%，表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收试验 精密称取同批次含有量已知（三尖杉酯碱0.849 5 mg/g、高三尖杉酯碱1.889 7 mg/g）的三尖杉0.1 g，共6份，置于6只50 mL量瓶中，分为3组，每组分别加入三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱贮备液0.5、0.25、0.125 mL，每个质量浓度制备5份，按“2.1.2”项下方法处理，在“2.1.3”项色谱条件下分析，结果见表1和表2。

表1 三尖杉酯碱加样回收试验结果（n=5）

Tab.1 Results of recovery tests for harringtonine (n=5)							
取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %	
0.100 5	0.085 4	0.248 0	0.328 5	94.3	95.4	1.83	
0.100 7	0.085 5	0.248 0	0.328 9	94.6			
0.100 3	0.085 2	0.124 0	0.205 7	95.9			
0.101 7	0.085 4	0.124 0	0.206 2	96.2			
0.101 8	0.086 5	0.062 0	0.144 3	95.1			
0.100 3	0.085 2	0.062 0	0.144 1	96.3			

表2 高三尖杉酯碱加样回收试验结果（n=5）

Tab.2 Results of recovery tests for homoharringtonine (n=5)							
取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %	
0.100 5	0.189 9	0.251 0	0.429 8	94.2	95.1	1.91	
0.100 7	0.190 3	0.251 0	0.430 5	94.3			
0.100 3	0.189 5	0.125 5	0.306 6	95.6			
0.101 7	0.192 2	0.125 5	0.308 3	95.1			
0.101 8	0.192 4	0.062 8	0.247 9	96.2			
0.100 3	0.189 5	0.062 8	0.243 2	95.2			

2.2.8 含有量测定 精密称取不同部位（根、茎和叶）的三尖杉样品，每个部位5份，按“2.1.2”项下方法处理、在“2.1.3”项色谱条件下分析，外标法进行含有量测定，结果见表3。

表3 含有量测定结果（n=5）

Tab.3 Determination results of contents (n=5)			
成分	根/(mg·g ⁻¹)	茎/(mg·g ⁻¹)	叶/(mg·g ⁻¹)
	(RSD/%)	(RSD/%)	(RSD/%)
三尖杉酯碱	0.356 5	0.849 5	—
	(2.30)	(2.75)	(—)
高三尖杉酯碱	0.684 3	1.889 7	0.110 5
	(1.98)	(2.21)	(3.21)

注：—表示未检测出

3 讨论

3.1 流动相及体积流量的选择 实验发现，流动相为乙腈：水（含0.1 g 十二烷基磺酸钠和0.1%磷酸，42：58）、体积流量为0.5 mL/min时峰形对称，出峰时间适宜，三尖杉酯碱与高三尖杉酯碱分离度较大，杂质峰对被检测峰干扰小。

3.2 检测波长的选择 紫外扫描发现，三尖杉酯碱与高三尖杉酯碱在291 nm处均有最大吸收。因此，选择检测波长为291 nm。

3.3 提取方法和提取溶剂的优选 本实验考察了无水乙醇、90%乙醇、50%乙醇、100%甲醇和50%甲醇，发现以90%乙醇为提取溶剂，超声提取45 min后，待测物能提取完全。

3.4 固相萃取条件的优选

3.4.1 吸附材料 由于三尖杉酯碱与高三尖杉酯碱的极性较小,故吸附富集材料选用 C₁₈反相键合硅胶(30 mg),使用前甲醇活化。该材料在水相中对两种成分的保留较好,而在有机相(如乙醇)中保留较差,故本实验用 90% 乙醇超声提取后浓缩至微干,少量乙醇溶解后再用水定容,以保证其能在吸附材料上充分保留。

3.4.2 淋洗溶剂 考察了 10%、20%、30%、50%、70% 和 90% 乙醇对富集物的淋洗效果,发现 10% 和 20% 乙醇不能洗脱三尖杉酯碱与高三尖杉酯碱,而 70% 和 90% 乙醇可以。因此,先用 5 mL 二次蒸馏水淋洗萃取小柱,再用 5 mL 10% 乙醇淋洗以除去杂质,离心,3 mL 90% 乙醇可把两种成分完全洗脱,再用流动相定容。

3.4.3 过柱及洗脱体积流量 体积流量在 5 mL/min 时,既能保证三尖杉酯碱与高三尖杉酯碱的富集,又显示了较高的效率。另外,3 mL 90% 乙醇在 3 mL/min 条件下即能把两种成分完全洗脱。因此,本实验选择 5 mL/min 作为样品富集过柱体积流量,3 mL/min 作为样品洗脱体积流量。

参考文献:

[1] Wu C W, Guo J X. Advances in study on *Cephalotaxus fortunei* and the alkaloids in it[J]. *Foreign Med Sci: Pharm*, 1993, 20(6): 321-325.
[2] 刘佳宁,毕高峰,温培娥,等. HL-60 细胞高三尖杉酯碱诱导后 CD44 表达变化及机制的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(18): 1361-1364.

[3] Ye X J, Lin M F. Homoharringtonine induces apoptosis of endothelium and down-regulates VEGF expression of K562 cells[J]. *Zhejiang Univ Sci*, 2004, 5(2): 230-234.
[4] 杨 铭,杨纯正,马建国,等. 高三尖杉酯碱的临床药理学及其在急性白血病化疗中的意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2000, 27(3): 174-176.
[5] 施 波,韩 锐. 高三尖杉酯碱和异三尖杉酯碱对人急性早幼粒白血病细胞凋亡的诱导作用[J]. *中国医学科学院学报*, 1999, 21(5): 356-340.
[6] 李 林,夏丽娟,蒋 超,等. 三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱诱导人早幼粒白血病细胞的程序性死亡[J]. *药学报*, 1994, 29(9): 667-672.
[7] 田怀平,杨 萍,刘 艳,等. 含高三尖杉酯碱方案治疗急性早幼粒细胞白血病的系统评价[J]. *中国药房*, 2014, 25(16): 1485-1489.
[8] 田怀平,王 芳,陶 荣,等. 高三尖杉酯碱治疗慢性粒细胞性白血病的系统评价[J]. *世界临床药物*, 2015, 36(1): 19-25.
[9] Fang M, Zhang H Q, Xue S B. Apoptosis of HL60 cells induced by harringtonine: membrane blebs, nucleus blebs and chromatin condensation[J]. *Acta Biologica Experimentalis sinica*, 1996, 29(3): 221-233.
[10] 李 荣,刘晓力,杜庆锋,等. 三尖杉酯碱诱导 K562 细胞凋亡的蛋白质组研究[J]. *中华血液学杂志*, 2004, 25(6): 323-327.
[11] 刘 艳,刘四新,李永成,等. 海南粗榧内生真菌细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的发酵条件[J]. *热带生物学报*, 2012, 3(3): 236-242.
[12] 王向军,张旭文,高 渊,等. HPLC 荧光法测定高三尖杉酯碱在大鼠体内的分布[J]. *中国现代应用药理学*, 2010, 27(8): 735-738.
[13] 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): 466-470.