

## 高效液相色谱-质谱联用技术测定毛榛中的紫杉醇含量\*

罗 凡, 费学谦, 汤富彬, 李辛雷

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

关键词: 高效液相色谱-质谱; 紫杉醇; 毛榛

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

### Simultaneous Determination of Paclitaxel in Hazelnut by HPLC-MS/MS

LUO Fan, FEI Xue-qian, TANG Fu-bin, LI Xin-lei

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

**Abstract:** Established method by reverse phase HPLC and electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) analysis and hazelnut extract trace of taxol. Through the research, seven mass spectrum characteristics of taxol compounds were contested, and the taxanes database was initially established. It was found that the paclitaxel contents were  $23.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $4.09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  in leaves and stems respectively. The paclitaxel contents in different parts of hazelnut was slightly different, which were  $0.61$ ,  $0.23$  and  $0.35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  in hazel branch, leaf and leather. With these data it can quickly identify the known paclitaxel compounds in hazelnut extract, and can perform the unknown structure analysis to certain degrees. This analysis method is confirmed sensitive, reliable and fast.

**Key words:** HPLC-MS/MS; paclitaxel; hazelnut

1963年美国化学家 M. C. Wani 和 M. E. Wall 首次从一种生长在美国西部森林中称为太平洋紫杉(Pacific yew)的树皮和木材中分离到了紫杉醇粗提物<sup>[1]</sup>。筛选实验发现,紫杉醇粗提物对离体培养的鼠肿瘤细胞有很高的活性。1971年,他们同其他科学家合作,通过 X-射线分析确定了该活性成分的化学结构——一种四环二萜化合物,并命名为紫杉醇(Taxol)。紫杉醇是红豆杉属(*Taxus* L.)植物中的一种复杂的次生代谢产物,也是目前所了解的唯一可以促进微管聚合和稳定已聚合微管的一种药物<sup>[2]</sup>。同位素示踪表明,紫杉醇仅结合到聚合的微管上,不与未聚合的微管蛋白二聚体反应。细胞接

触紫杉醇后会在细胞内积累大量的微管,这些微管的积累干扰了细胞的各种功能,特别是使细胞分裂停止于有丝分裂期,阻断了细胞的正常分裂。通过临床研究,紫杉醇主要适用于卵巢癌和乳腺癌,对肺癌、大肠癌、黑色素瘤、头颈部癌、淋巴瘤等也均有一定疗效<sup>[3]</sup>。

红豆杉(*Taxus* spp.)是世界上公认的濒临灭绝的天然珍稀植物,是第四纪冰川遗留的古老树种<sup>[4]</sup>,在地球上已有 250 万年的历史。由于在自然条件下红豆杉生长速度缓慢,再生能力差,所以很长时间以来,世界范围内还没有形成大规模的红豆杉原料林基地。近年来,国家一类重点保护植物红豆杉由于

收稿日期: 2011-03-21

基金项目: 中国林科院亚热带林业研究所所长基金(RISF6921);浙江省省院合作林业科技项目(2007SY10)

作者简介: 罗 凡(1980—),女,河北保定人,助理研究员,主要从事林产品开发利用研究。

\* 感谢 Waters 公司金燕工程师和浙江省疾病预防控制中心任一平高级工程师对本文工作给予的大力支持。

可提取抗肿瘤药物成分紫杉醇而倍受关注<sup>[5]</sup>。关于红豆杉中紫杉醇含量的测定越来越多,谢谊等<sup>[6]</sup>利用甲醇-水(60:40)测定了红豆杉中紫杉醇的含量,利用甲醇-水(40:60)测定了10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ(10-DAB)和巴卡丁Ⅲ的含量;李秋云等<sup>[7]</sup>利用紫外检测器,乙腈-水(51:49)作为流动相建立曼地亚红豆杉(*T. madia*)中紫杉醇含量的测定方法。郭娜等<sup>[8]</sup>利用高效液相色谱仪对东北红豆杉(*T. cuspidata* Sieb. et. Zucc.)不同部位中紫杉醇和三尖杉宁碱含量进行测定,发现其中紫杉醇的含量排序为树皮>当年生枝>当年生叶>假种皮;张洁等<sup>[9]</sup>研究紫杉醇的二级质谱裂解规律,对东北红豆杉及其伤愈组织粗提物中的紫杉醇进行HPLC-ESI-MS/MS分离定性。

红豆杉的树皮、枝叶、根部甚至种子均可提取紫杉醇,由于紫杉醇具有独特的抗癌机理<sup>[10-11]</sup>,人们对该药物的需求远远超出其生产能力,于是,近年来红豆杉的替代品成了学者们研究的焦点<sup>[12-16]</sup>。毛榛(*Corylus mandshurica* Maxim.)为桦木科(Betulaceae)榛属(*Corylus* L.)灌木。榛叶可养蚕,木材可用于粗编织、架条和薪材,榛果可药用或食用,其用途十分广泛。毛榛还具药用价值,除了榛子油具有防止动脉粥样硬化,有助于肝脏、肾脏功能的恢复外<sup>[17]</sup>,榛子种仁含有8种人体必需的氨基酸、多种维生素及矿物质,特别是富含硒和紫杉醇,具有防癌抗癌的独特作用<sup>[18]</sup>。本文以东北地区植物毛榛为研究对象,参照从红豆杉中提取紫杉醇的文献资料,建立了利用高效液相色谱-质谱联用技术测定毛榛中紫杉醇含量的方法,此方法步骤简单,重现性好,可为以毛榛为原料开发抗肿瘤药品或保健食品提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

HPLC-Quattro Premier MS 高效液相色谱-四级杆质谱联用仪(美国 Waters 公司,型号 2695,工作站 Empower); Waters XBridge C18 高效液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。Paclitaxol(紫杉醇)标准品购自国家标准物质中心,批号 111534-200202。毛榛树皮、枝叶产地东北,乙腈、甲醇均为色谱纯,购自美国天地试剂有限公司;水由法国 Millipore 公司的 Milli-Q 水纯化系统制备。

### 1.2 主要材料与试剂

1.2.1 样品提取 毛榛样品烘干粉碎,过 40 目筛,

混匀后称取 10 g 样品置于 150 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 甲醇浸提 4 h,分离提取液。重复上述操作 2 次,合并提取液,蒸干浓缩;浓缩液采用 30 mL 甲醇-水溶液(2:1)溶解,并转移至 150 mL 分液漏斗中,加入 30 mL 正己烷萃取脂溶性有机物;随后加入 10 mL 去离子水,以及 30 mL 二氯甲烷萃取。萃取液经真空旋蒸,浓缩液用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中,经过 0.22 μm 滤膜过滤,待测。

1.2.2 标准溶液制备 精确称取紫杉醇标样 10 mg,定溶于 10 mL 甲醇中,配制成紫杉醇标准储备液 1 mg · mL<sup>-1</sup>,密封后存于冰箱中避光保存。

### 1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters XBridge C18 高效液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);洗脱梯度:流动相 A 为甲醇乙腈混合溶液(甲醇+乙腈=1+1),B 为含 0.1% 乙酸铵的水溶液。0~0.5 min, 90% A, 10% B; 3.0~3.5 min, A 相从 90% 升至 100%; 4.5 min 90% A, 10% B。流速为 0.4 mL · min<sup>-1</sup>;进样量 5 μL;柱温 35 °C。

1.3.2 质谱条件 电子轰击(EI)离子源;电子能量 60 eV;传输线温度 275 °C;离子源温度 350 °C;激活电压 3.0 V;质量扫描质荷比(*m/z*)范围 200~1 000。

## 2 结果与分析

### 2.1 质谱条件选择

在高效液相色谱-质谱联用方法中通过质谱分析可以获得相关化合物分子量以及与结构相关的碎片离子的信息,结合液相分析得到的化合物亲脂性的信息,可以快速对化合物进行结构鉴定。

质谱条件的优化:将标准溶液利用流动注射泵分别注入离子源,对其进行全扫描,确定母离子并通过优化离子传输管电压、喷射电压、鞘气压力、辅助气压力使母离子丰度及稳定性最佳;然后对化合物进行子离子扫描得到碎片信息,并对二级质谱碰撞气能量(CE)进行优化,使特征碎片离子的强度达到最大。HPLC-MS/MS 不像单纯色谱分离那样需要达到一定的分离度才能进行准确的定性及定量分析。在高效液相色谱-质谱联用方法中,目标化合物在液相色谱柱中的分离只是粗分离,进入质谱后,由一级质谱选择母离子,将其打碎,再由二级质谱选择碎片离子进行定性定量,因此二级质谱比一级质谱检测更为准确。这样既能有效防止样品中复杂基

质的干扰,又能排除分子量相同而特征碎片离子不同的物质,从而降低检出限并节省大量时间。

先进行母离子扫描,通过调谐仪器各项参数,如不同化合物 ESI 的响应、电离电压、锥孔电压、毛细管电压、射频透镜电压、离子源温度、去溶剂化气温度、去溶剂化气流量、锥孔气流等,找出目标化合物最佳响应参数,发挥仪器最佳检测灵敏度,选择母离子。

表 1 7 种紫杉烷类物质的质谱分析参数

化合物	母离子		子离子		
	质荷比( $m/z$ )	锥孔电压/V	质荷比( $m/z$ )	锥孔电压/V	
巴卡亭Ⅲ	609.6	40	549.7		70
10-脱乙酰基巴卡亭Ⅲ	567.6	55	445.5		70
三尖杉宁碱	855.6	40	591.9	286.6	70
紫杉醇	876.3	40	609.0	509.1	60
7-表紫杉醇	877.3	60	591.9	308.4	80
多烯紫杉醇	831.3	40	550.1	304.0	70
7-表-10-去乙酰基紫杉醇	835.4	40	550.2	308.9	50

注:选取 1~2 个优势离子峰为子离子峰。

从表 2 中可以看出:7 种紫杉烷类物质的准分子离子峰分子量与其分子量分别相差 22.97、23.01、23.70、22.39、23.39、23.42 和 23.53,说明在试验中,7 种物质均产生了  $[M + Na]^+$  离子峰;应用液相

注射器取紫杉醇标液直接质谱进样,摸索其质谱条件。在表 1 所示质谱条件下对紫杉醇实施母离子扫描(MS Scan),发现质荷比( $m/z$ )为 876.3 的离子强度最大,因此选定 876.3 为母离子。进行子离子扫描(Daughter Scan)(表 1)。通过扫描发现,质荷比( $m/z$ )为 609.0 和 509.1 处的离子强度最大,可能为其子离子。

色谱-电喷雾离子化质谱法分析紫杉醇粗品,可以直接得到各组分的准分子离子峰  $[M + Na]^+$ ,从而得出各组分的分子量,易于分析归属,具有较高的可靠性和精密度。

表 2 紫杉烷类化合物的质谱碎片离子

化合物	分子量	碎片离子					
		一级质谱		二级质谱			
		$[M_1]$	$X_1$	$[M_2]$	$X_2$	$[M_3]$	$X_3$
巴卡亭Ⅲ	586.63	609.6	22.97	549.7	59.9		549.7
10-脱乙酰基巴卡亭Ⅲ	544.59	567.6	23.01	445.5	122.1		445.5
三尖杉宁碱	831.90	855.6	23.70	591.9	263.7	286.6	305.3
紫杉醇	853.91	876.3	22.39	609.0	267.3	509.1	99.9
7-表紫杉醇	853.91	877.3	23.39	591.9	285.4		591.9
多烯紫杉醇	807.88	831.3	23.42	550.1	281.2	304.0	246.1
7-表-10-去乙酰基紫杉醇	811.87	835.4	23.53	550.3	285.1	308.2	242.1

注: $[M_1]$ 、 $[M_2]$ 、 $[M_3]$  分别为质谱离子峰; $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  分别为丢失的离子碎片分子量。

紫杉醇的二级质谱数据显示:在实验所选定的条件下,紫杉醇分子产生很多有规律的碎片峰,主要的二级碎片规律与文献报道完全吻合<sup>[9]</sup>。离子峰质荷比( $m/z$ )为 285.4(7-表紫杉醇)以及质荷比( $m/z$ )285.1(7-表-10-去乙酰基紫杉醇)的是生物碱基侧链,因此质荷比( $m/z$ )591.9 和质荷比( $m/z$ )550.3 的离子峰是 7-表紫杉醇和 7-表-10-去乙酰基紫杉醇丢失生物碱基侧链后得到的基峰。丢失的质荷比( $m/z$ )59.9 的离子可能是  $CHCOOH$ ,因此质荷比( $m/z$ )549.7 是巴卡亭Ⅲ在丢失  $CHCOOH$  后得到

的;质荷比( $m/z$ )122.1 对应的离子可能是  $C_6H_5COOH$ ,因此可以判断,质荷比( $m/z$ )445.5 是 10-脱乙酰基巴卡亭脱掉  $C_6H_5COOH$  后的离子峰。表 3 说明了这些碎片离子的产生方式。

## 2.2 分析方法确定

2.2.1 紫杉醇标样、毛榛植物样品色谱图 按照所确定的液相以及质谱方法分别对紫杉醇标样和毛榛植物样品进行分析,图 1、2 为所得到的色谱图。从图中可以看出:该方法可有效去除基质效应,对紫杉醇可以准确性。

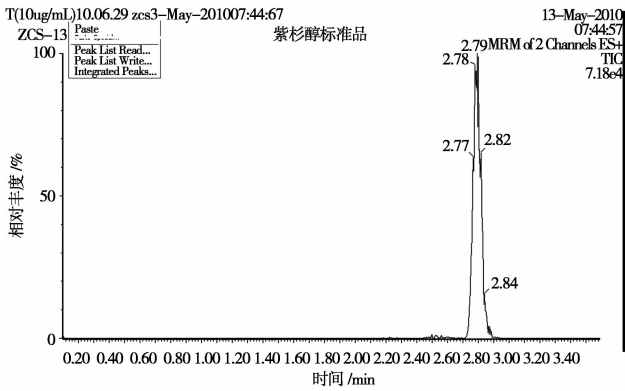


图1 紫杉醇标样的液相及质谱分析谱图

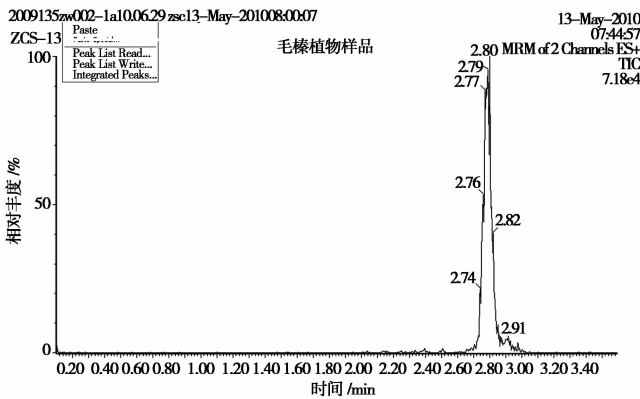


图2 毛榛植物样品的液相及质谱分析谱图

表3 离子选择的质谱条件

参数	母离子扫描	子离子扫描	多反应监控
离子模式	ESI -	ESI -	ESI -
电离电压/kV	2	2	2
锥孔电压/V	20	50	50
萃取锥孔电压/V	2	2	2
RF 透镜电压/V	1	1	1
离子源温度/°C	120	120	120
去溶剂气温度/°C	250	250	250
去溶剂气流量/(L · h <sup>-1</sup> )	650	650	650
锥孔气气流/(L · h <sup>-1</sup> )	50	50	50
低分辨率	15	13	13
高分辨率	15	13	13
离子能量/eV	1	1	1
入口电压/V	50	-2	-2
碰撞电压/eV	2	15	15
出口电压/V	50	2	2
低分辨率	15	15	14
高分辨率	15	15	14
离子能量/eV	1	1	1
放大率	650	650	650
碰撞气流量/(mL · min <sup>-1</sup> )	-	0.3	0.3

### 2.2.2 精密度试验 取 10 μg · mL<sup>-1</sup> 紫杉醇标准

品溶液,重复进样 5 次,测定其峰面积,计算  $RSD$  为 2.04%,表明测定方法具有良好的精密度。

2.2.3 线性曲线 分别精确吸取紫杉醇标准贮备液 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容后摇匀,即得不同浓度的对照品溶液。各进样 5 μL,以峰面积  $Y$  为纵坐标,浓度  $X$  为横坐标绘制标准曲线,回归方程为  $Y = 9.87 \times 103X + 1.503$  ( $R^2 = 1.0000$ ),在 5 ~ 50 mg · L<sup>-1</sup> 浓度范围内线性关系良好。

2.2.4 回收率 将浓度为 0.52 μg · mL<sup>-1</sup> 和 1.04 μg · mL<sup>-1</sup> 的 2 种紫杉醇标准溶液分别加入到样品中,按照下列公式测定分析方法的回收率:

$$R = \frac{(X' - X)}{C \cdot V} \times 100\%$$

$m$

式中: $R$  为分析方法的回收率; $X'$  为加入标样后样品中紫杉醇含量,单位 μg · g<sup>-1</sup>;  $X$  为加标前样品中紫杉醇的含量,单位 μg · g<sup>-1</sup>;  $C$  为加标浓度,单位 μg · mL<sup>-1</sup>;  $V$  为加标体积,单位 mL;  $m$  为样品质量,单位 g。

样品回收率数据列于表 4,两种浓度的回收率分别为 83.3% 和 101.4%,说明该方法测定样品中紫杉醇含量可行。

表4 高效液相色谱-质谱联用方法测定紫杉醇含量的回收率

标号	加标量/(μg · g <sup>-1</sup> )	样品含量/(μg · g <sup>-1</sup> )	加标后含量/(μg · g <sup>-1</sup> )	回收率/%	平均回收率/%
1a	0.52	0.36	0.81	80.56	83.3
1b	0.52	0.36	0.83	86.11	
2a	1.04	0.36	1.43	108.33	101.4
2b	1.04	0.36	1.38	94.44	

### 2.3 红豆杉和毛榛中紫杉醇含量分析

对红豆杉和毛榛中的紫杉醇含量进行了分析,从表 5 可以看出:在红豆杉植物各部分紫杉醇的含量中,枝条和叶片的含量差异显著,分别为 4.09、23.65 μg · g<sup>-1</sup>。这与文献报道同一植株不同部位之间紫杉醇含量的差异不同,一般认为同植株中紫杉醇含量由高到低为树皮 > 树叶 > 木质部<sup>[19]</sup>。这可能由于本文测定的树枝中除树皮之外的干茎所占比例高。毛榛树枝、树叶、树皮中紫杉醇的含量明显小于红豆杉中紫杉醇含量,大约为其 1% ~ 10%<sup>[20]</sup>。Witherup 等<sup>[21]</sup> 曾对北美产 4 种红豆杉的针叶进行了紫杉醇含量的测定,结果表明,针叶中的紫杉醇含量仅 0.001% ~ 0.010%。

表5 红豆杉和毛榛不同部位的紫杉醇含量

项目	含量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	平均含量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	相对标准偏差 (RSD)/%
红豆杉 树枝	4.063	4.09	0.81
	4.110		
树叶	24.043	23.65	2.34
	23.261		
毛榛 树枝	0.631	0.61	5.35
	0.585		
树叶	0.217	0.23	6.23
	0.237		
树皮	0.362	0.35	4.22
	0.341		

### 3 小结

本文利用高效液相色谱-质谱联用技术对毛榛中紫杉烷类物质的化学成分进行了初步研究,结果发现毛榛中主要化学成分与文献报道的红豆杉中紫杉烷类物质基本相同,为毛榛作为红豆杉的替代品种提炼紫杉烷类药物提供了科学依据。应用高效液相色谱-质谱联用技术分析紫杉醇粗品,可以直接得到各组分的准分子 $[M + Na]^+$ 离子峰,从而得出组分的分子量,易于分析归属,具有较高的可靠性和精密度。液相色谱-电喷雾离子化质谱法分离度好,灵敏度高,可快速分析紫杉醇样品中的各组分,该方法对紫杉醇分析、质量监控具有重要参考价值。

### 参考文献:

- [1] 雷雨田. 晚期癌症克星——紫杉醇传奇[J]. 医药世界, 2008(7):42-43
- [2] 唐朝晖,钟德许. 紫杉醇抗肿瘤的分子机制[J]. 中国临床康复, 2006,10(27):125-127
- [3] 王立坤,李宝英,边 丽. 1例罕见紫杉醇诱发严重痛风反应患者的护理[J]. 中国实用护理杂志:上旬版,2007,23(6):57
- [4] 白荣芬,张利萍. 紫杉组培繁育试验初报[J]. 林业实用技术, 2007(1):19-20
- [5] 周志春,余能健. 栽培措施对南方红豆杉紫杉醇含量的影响[J]. 林业科学研究, 2010,23(1):120-124
- [6] 谢 谊,许慧敏,王实强. HPLC法测定不同部位南方红豆杉中紫杉烷类化合物的含量[J]. 湖南中医药大学学报,2009,29(6):26-28
- [7] 李秋云,李 炜,崔 洋. 高效液相色谱法测定曼地亚红豆杉中紫杉醇的含量[J]. 陕西中医学院学报,2009,32(5):64-65
- [8] 郭 娜,周志强,王 洋. 东北红豆杉中紫杉醇及三尖杉宁碱含量测定方法的研究[J]. 林业科技,2009(3):62-64
- [9] 张 洁,段继诚,梁 振,等. 东北红豆杉及其伤愈组织粗提物中紫杉醇的 HPLC-ESI-MS/MS 分析研究[J]. 药科学报, 2006,41(9):863-866
- [10] 梅兴国,鲁明波. 紫杉醇的抗癌作用及治疗其他疾病的潜力[J]. 国外医学:药学分册,1996,23(3):136-140
- [11] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents VI. The Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. Am Chem Soc,1971,93(9):2325-2327
- [12] 邱德有,吴小红,黄璐琦. 木本药用植物红豆杉研究的新进展[J]. 林业科学研究,2009,22(3):439-445
- [13] 李永成,陶文沂. 美丽镰刀菌培养液对东北红豆杉悬浮细胞防御反应及紫杉醇合成的影响[J]. 西北植物学报,2008,28(9):1746-1750
- [14] 严 冰,毕建男,纪 元,等. 一株柏树内生真菌产生抗肿瘤药物紫杉醇[J]. 南开大学学报:自然科学版,2007,40(6):67-70
- [15] 王世伟,马 玺,平文祥,等. 微生物发酵生产紫杉醇研究进展[J]. 微生物学通报,2007,34(3):561-565
- [16] 赵广河,张培正,李大鹏. RP-HPLC法测定榛叶中紫杉醇的研究[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2009,40(3):385-388
- [17] 潘东海,谷会岩,孙慧珍. 毛榛资源利用与开发前景[J]. 中国林副特产,1999(1):41
- [18] 丛金山. 榛子栽培技术[J]. 河北林业科技,2010(4):108
- [19] 王昌伟,彭少麟,李鸣光. 红豆杉中紫杉醇及其衍生物含量影响因子研究进展[J]. 生态学报,2006,26(5):1583-1590
- [20] 高山林,朱丹妮,周荣汗. 东亚和北美产红豆杉属七种植物中紫杉醇及短叶醇的含量[J]. 中国药科大学学报, 1995,26(1):8
- [21] Witherup K M, Look S A, Stasko M W. *Taxus* spp. Needles contain amount of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation [J]. J Nat Prod, 1990, 53(5):1249-1255