

基于 HPLC 指纹图谱和多成分定量研究红豆杉及同属 4 种植物种子质量

薛晓玲¹, 何丽珊³, 张先忠⁴, 胡俊杰^{1,2}, 李娟^{1,2}, 陈科力^{1,2}, 陈新^{1,2*}

1. 湖北中医药大学, 中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430075

3. 湖北省药品监督管理局评审中心, 湖北 武汉 430071

4. 神农架林区生态资源开发利用研究中心, 湖北 神农架林区 442499

摘要: 目的 建立神农架产红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *chinensis* 种子的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法。应用该方法对其他 4 种红豆杉属植物种子（分别为东北红豆杉 *T. cuspidata*、西藏红豆杉 *T. wallichiana*、南方红豆杉 *T. wallichiana* var. *mairei*、曼地亚红豆杉 *T. media*）进行对比分析，并进一步结合化学模式识别方法、对红豆杉和同种近源植物南方红豆杉的种子进行比较分析。方法 红豆杉的标准指纹图谱及含量测定方法用 HPLC 方法建立，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价软件（2012 年版）》分析各样品的相似度；并采用聚类分析（cluster analysis, CA）、主成分分析（principal component analysis, PCA）与正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA）等方法对红豆杉和南方红豆杉种子的指纹图谱进行分析评价。结果 建立了 14 批红豆杉种子样品的 HPLC 对照指纹图谱（R）和 26 批红豆杉属 5 种植物种子样品的指纹叠加图谱，并标定了 16 个共有峰。通过对照品指认出 10-去乙酰巴卡亭Ⅲ、巴卡亭Ⅲ、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱和紫杉醇等 6 个含量较高的紫杉烷类化合物，并建立了同时测定这 6 种主要紫杉烷类成分含量的方法。红豆杉和同属 4 种植物种子的指纹图谱与标准对照指纹图谱（R）的相似度为 0.885~0.995，它们所含的主要紫杉烷类活性成分有极高的相似性。化学模式识别可区分红豆杉和南方红豆杉种子，并筛选出 5 种差异性成分。结论 红豆杉等 5 种同属植物的种子所含的主要活性紫杉烷类化合物有极高的相似性，这些种子可考虑作为同一类型的药材资源进行开发利用。通过建立的指纹图谱结合化学模式识别，能够鉴别红豆杉种子及其近源植物南方红豆杉的种子。

关键词: 红豆杉属；红豆杉；南方红豆杉；指纹图谱；化学模式识别；含量测定；紫杉醇；10-去乙酰巴卡亭Ⅲ；三尖杉宁碱；巴卡亭Ⅲ；7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇；10-脱乙酰紫杉醇

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)12-4410-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.12.023

Based on HPLC fingerprint and comparative study of seeds from *Taxus wallichiana* var. *chinensis* in Shennongjia and four species of *Taxus* plants

XUE Xiaoling¹, HE Lishan³, ZHANG Xianzhong⁴, HU Junjie^{1,2}, LI Juan^{1,2}, CHEN Keli^{1,2}, CHEN Xin^{1,2}

1. Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Key Laboratory of Resource and Chemistry of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430075, China

3. Hubei Provincial Drug Administration Accreditation Center, Wuhan 430071, China

4. Research Center of Ecological Resources Development and Utilization of Shennongjia Forestry District, Shennongjia Forestry District 442499, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint and multi-component content determination method for the seeds of *Taxus wallichiana* var. *chinensis* produced in Shennongjia. This method was applied to compare and analyze the seeds of four other plants from *Taxus* genus (*T. cuspidata*, *T. wallichiana*, *T. wallichiana* var. *mairei*, *T. media*), and further combined with chemical pattern recognition to compare and analyze the seeds of *T. wallichiana* var. *chinensis* and *T. wallichiana* var. *mairei*, a closely related plant.

收稿日期: 2025-02-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82004253); 湖北省中医药重点学科建设项目 (鄂中医通 [2023] 2 号); 湖北省自然科学基金项目 (2023AFD146)

作者简介: 薛晓玲, 女, 在读硕士研究生, 从事中药化学分析与质量研究。E-mail: 1832093790@qq.com

*通信作者: 陈新, 女, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药活性成分分析。E-mail: chenxin30172@hotmail.com

Methods The standard fingerprint and content determination method of *T. wallichiana* var. *chinensis* were established using HPLC method, and the similarity of each sample was analyzed using the *Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation Software* (2012 Edition). And the methods, including cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), were used to analyze and evaluate the fingerprint spectra of seeds between *T. wallichiana* var. *chinensis* and *T. wallichiana* var. *mairei*. **Results** The standard HPLC fingerprint spectra R was established for 14 batches of seed samples of *T. wallichiana* var. *chinensis* produced from Shennongjia, and on the method, the fingerprint overlay spectra of 26 batches of seed samples from five *Taxus* species were collected. And a total of 16 common peaks were calibrated for the 26 batches of seed samples. Six major paclitaxel alkanes with high contents were recognised by the control fingerprints, including 10-deacetylbaccatin III, baccatin III, 7-xylosyl-10-deacetylpaclitaxel, 10-deacetylpaclitaxel, trichothecenes and paclitaxel, and a method was established for the simultaneous determination of the contents of these six major paclitaxel alkanes. The similarity between the fingerprint spectra of the seeds of *Taxus chinensis* and four other plants in the same genus and the standard control fingerprint spectrum R is 0.885—0.995, indicating a high degree of similarity in the main taxane active ingredients they contain. Chemical pattern recognition could distinguish seeds between Shennongjia *T. wallichiana* var. *chinensis* and *T. wallichiana* var. *mairei*, seeds, and screened out five differential components. **Conclusion** The main active paclitaxel alkanes compounds contained in the seeds of these five species of the *Taxus* genus, including *T. wallichiana* var. *chinensis*, have a high degree of similarity, and these seeds can be considered as medicinal resources of the same type for development and utilization. The established fingerprints combined with chemical pattern recognition can be used to identify the seeds of *T. wallichiana* var. *chinensis* from *T. wallichiana* var. *mairei*.

Key words: *Taxus*; *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin; *Taxus wallichiana* var. *mairei* (Lemee & H. Léveillé) L. K. Fu & Nan Li; fingerprint; chemical pattern recognition; UPLC; content determination; paclitaxel; 10-deacetylbaccatin III; baccatin III; 7-xylosyl-10-deacetylpaclitaxel; 10-deacetylpaclitaxel; trichothecenes

红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin 又名紫杉, 属于红豆杉科红豆杉属, 为我国特有树种, 主要分布在甘肃南部、陕西南部、四川、云南东北部及东南部、贵州西部及东南部、湖北西部、湖南东北部、广西北部 and 安徽南部 (黄山), 海拔 1 000~1 200 m 以上的高山上^[1]。红豆杉属植物在全世界共有 11 种, 我国有 4 种和 1 变种, 分别为红豆杉、东北红豆杉、西藏红豆杉、云南红豆杉和南方红豆杉^[1-2]; 另有 1 种曼地亚红豆杉则属于天然杂交品种, 以欧洲红豆杉为父本, 东北红豆杉为母本^[1]。

红豆杉作为新的抗肿瘤药用植物资源, 除了使用树皮外, 近年来临床上主要使用其枝叶, 这导致红豆杉的树皮和枝叶不断遭到砍伐, 造成红豆杉资源的紧缺; 而大面积新种植的红豆杉, 由于生长年限较短, 有效成分积累不足不能采收, 使种植户较长期没有收益。为了挖掘可持续利用的红豆杉资源, 每年高产量的红豆杉种子 (包括假种皮) 越来越受到广泛关注。现代研究表明, 红豆杉种子中含有较丰富的化学成分, 主要包括紫杉烷类^[3]、黄酮类^[4]、多糖类^[5]、酚类、萜类等, 具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、降血压和抗糖尿病等药理作用, 其中紫杉烷类中最重要的成分紫杉醇在临床上被广泛用于乳腺癌、卵巢癌、子宫癌和肺癌等癌症的治疗, 效果显著, 是迄今为止最有效的天然抗癌化合物之一^[6-8]。因此, 开发红豆杉种子的药用资

源, 具有重要的意义。

湖北神农架地区是全国最大的天然林区之一, 该地区包括地理上神农架山脉的延伸部分和历史上曾经同一行政区划所连接的部分, 包括神农架北坡相邻接的竹山、竹溪、房县、保康部分地区, 又称为大神农架地区。这些北坡地区海拔和生态环境与神农架极为接近, 有大量的野生红豆杉分布, 在相邻的低海拔区域也存在和种植了大量的红豆杉树木。该地区红豆杉种子年产量较高, 但并未得到有效利用。虽然部分地区建立了南方红豆杉的质量标准, 如《湖北省中药材质量标准》《浙江省中药材标准》和《广东省中药材标准》等, 但它们主要针对的是其带叶的枝条, 未针对红豆杉属种子进行药材标准的研究; 且这些标准仅以 10-去乙酰巴卡亭 III 作为红豆杉类药材质量检出和评价的指标, 并未考虑紫杉醇及其他有效成分, 但是中药材的化学成分复杂, 单一指标很难满足红豆杉属药材质量评价的客观要求。此外, 市场上流通的红豆杉种子种类繁多, 同属种子在外观形态上较为相似, 尤其是同种不同变种的红豆杉和南方红豆杉种子, 其性状特征极为相似, 需要深入进行形态和化学的比较研究。

本研究通过建立神农架产红豆杉 HPLC 标准指纹图谱, 并与其同属植物种子进行对比分析, 以了解

其相互之间的差异和相似度；并对它们所含以紫杉醇为主的紫杉烷类成分进行含量测定研究，确定分析方法和线性范围，以准确评价每个样品的质量；进而运用聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘判别分析等化学模式识别方法进行差异性分析，探索红豆杉属亲缘关系最近的红豆杉和南方红豆杉种子的区别，以完善红豆杉属种子的质量评价体系，为红豆杉资源的开发利用提供实验参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1290 Infinity II液相色谱系统（美国 Agilent 公司）；Heal Force Smart 超纯水系统（武汉力康生物医疗科技有限公司）；MS105DU 型电子天平（上海梅特勒托利多仪器有限公司）；YS0203 型超声波清洗机（深圳云奕科技股份有限公司）；DHG-9053A 电热恒温鼓风干燥机（上海齐欣科学仪器有限公司）；XMTD-7000（SY）型电热恒温水浴锅（北京市永光明医疗仪器有限公司）；高速中药粉碎机（瑞安市百信制药机械有限公司）。

1.2 材料

10-去乙酰巴卡亭Ⅲ（批号 H11S9X70008）、10-脱乙酰紫杉醇（批号 H22M10X88906）、紫杉醇（批号 J04S11H123510）购于上海源叶生物科技有限公司；巴卡亭Ⅲ（批号 CFS202201）、三尖杉宁碱（批号 CFS202201）、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇（批号 CFS202301）购于武汉天植生物技术有限公司；所有对照品纯度均不低于 98%；色谱级甲醇、乙腈（德国默克公司）；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

26 批药材经湖北中医药大学陈科力教授鉴定，分别为红豆杉科红豆杉属植物红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin、东北红豆杉 *T. cuspidata* Siebold & Zucc.、西藏红豆杉 *T. wallichiana* Zucc.、南方红豆杉 *T. wallichiana* var. *mairei* (Lemee & H. Léveillé) L. K. Fu & Nan Li、曼地亚红豆杉 *T. media* Rehder 的假种皮和种子。药材具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

将样品烘干后粉碎过筛，精密称取不同红豆杉种子（包括假种皮）的粉末，每份样品各 1.0 g，放置于 50 mL 的离心管中，加入 25 mL 的 70%乙醇超声提取 2 h，滤过，取上清液，重复提取 2 次，合并 3 次上清液，水浴蒸干后用甲醇溶解，定容至 10 mL，

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	基原	采集时间	采集地	海拔高度/m
S1	红豆杉	2023-11	湖北神农架	831
S2	红豆杉	2023-11	湖北神农架	800
S3	红豆杉	2023-11	湖北神农架	893
S4	红豆杉	2023-11	湖北神农架	822
S5	红豆杉	2023-11	湖北神农架	830
S6	红豆杉	2023-11	湖北神农架	832
S7	红豆杉	2023-11	湖北神农架	830
S8	红豆杉	2023-11	湖北神农架	839
S9	红豆杉	2023-11	湖北神农架	870
S10	红豆杉	2023-11	湖北神农架	841
S11	红豆杉	2023-11	湖北神农架	851
S12	红豆杉	2023-11	湖北神农架	860
S13	红豆杉	2023-11	湖北神农架	884
S14	红豆杉	2023-11	湖北神农架	836
D1	东北红豆杉	2022-11	吉林长白山	1 121
D2	东北红豆杉	2023-11	吉林长白山	1 010
D3	东北红豆杉	2023-11	吉林长白山	996
X1	西藏红豆杉	2023-11	西藏	未知
X2	西藏红豆杉	2022-11	西藏	未知
X3	西藏红豆杉	2023-11	西藏林芝	3 194
N1	南方红豆杉	2023-11	浙江盘安	380
N2	南方红豆杉	2023-11	福建明溪	447
N3	南方红豆杉	2022-11	浙江杭州	58
N4	南方红豆杉	2023-11	湖南永安	74
M1	曼地亚红豆杉	2022-08	湖北马家庄	695
M2	曼地亚红豆杉	2023-08	湖北房县	830

过 0.22 μm 微孔滤膜，作为供试品溶液备用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取紫杉醇、10-去乙酰巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱、巴卡亭Ⅲ、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰紫杉醇对照品 10 mg，用色谱级甲醇定容至 10 mL 量瓶中，配制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品储备液，4 ℃冰箱中备用。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 ZORBAX RRHD SB-C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；流动相为水（A）-乙腈（B），洗脱梯度为 0~4 min，5%~10% B；4~25 min，10%~30% B；25~30 min，30%~40% B；30~32 min，40%~46% B；32~34 min，46%~48% B；34~37 min，48%~55% B；37~43 min，55%~63% B；43~51 min，63%~71% B；51~57 min，71%~95% B；57~62 min，95% B；62~65 min，95%~5% B；体积流量为 0.2 mL/min；检测波长为 227 nm；柱温为 25 ℃；进样

量为 3 μ L。

2.3.2 精密度试验 取样品粉末 (S1)，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，以 2 号色谱峰为参照峰 (S)，计算得到各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.08\%$ ，相对峰面积的 $RSD \leq 2.96\%$ 。

2.3.3 重复性试验 取样品粉末 (S1)，按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，以 2 号色谱峰为参照峰 (S)，计算得到各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.78\%$ ，相对峰面积的 $RSD \leq 4.80\%$ 。

2.3.4 稳定性试验 取样品粉末 (S1)，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，以 2 号色谱峰为参照峰 (S)，计算得到各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.21\%$ ，相对峰面积的 $RSD \leq 4.64\%$ 。

2.4 指纹图谱的建立和相似度评价

2.4.1 指纹图谱的建立 取 14 批红豆杉种子样品，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，将色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”，将 S1 号的色谱图设为参照图谱，采用中位数法，时间窗宽度设为 0.1 min，通过多点校正进行 Marker 峰匹配，建立 14 批红豆杉样品叠加指纹图谱及标准对照图谱 (R)，见图 1。结果表明 14 批红豆杉药材样品 HPLC 色谱图标定出 16 个共有峰，经对照品指认，其中 5 号峰为 10-去乙酰巴卡亭 III、6 号峰巴卡 III、7 号峰 7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、9 号峰 10-脱乙酰基紫杉醇、10 号峰三尖杉宁碱、11 号峰紫杉醇，混合对照品图谱见图 2。另将表 1 中除红豆杉其他 4 种红豆杉属药材样品 12 批的 HPLC 色谱图与上述 14 批红豆杉药材样品的 HPLC 色谱图进行叠加，得到 26 批样品叠加指纹图谱，见图 3，共标定出 16 个共有峰。

2.4.2 相似度评价 以生成的红豆杉药材对照指纹图谱 R 为标准，对 26 批样品与对照指纹图谱进行相似度分析，见表 2。相似度评价结果为 0.885~0.995，表明不同红豆杉属药材的化学成分差异性不大，根据峰面积的大小初步判断可能在含量上存在差异。

2.5 含量测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 ZORBAX RRHD SB-

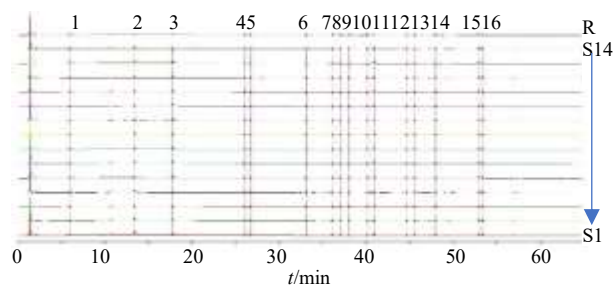
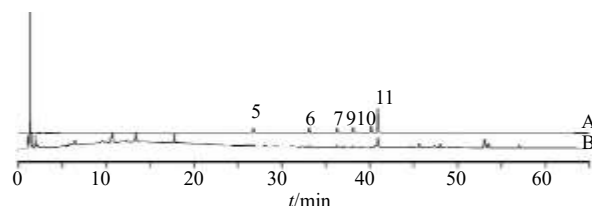


图 1 红豆杉种子样品的叠加谱图及对照谱图

Fig. 1 Overlapping fingerprint of *Taxus wallichiana* var. *chinensis* seed samples and control fingerprint



5-10-去乙酰巴卡亭 III; 6-巴卡亭 II; 7-7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇; 9-10-脱乙酰基紫杉醇; 10-三尖杉宁碱; 11-紫杉醇。
5-10-deacetylbaicatin III; 6-baccatin III; 7-7-*epi*-10-deacetyl paclitaxel; 9-10-deacetyl taxol; 10-cephalomannine; 11-paclitaxel.

图 2 混合对照品 HPLC 图谱 (A) 和红豆杉种子 HPLC 对照指纹图谱 (B)

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed control products (A) and control fingerprint of *T. wallichiana* var. *chinensis* (B)

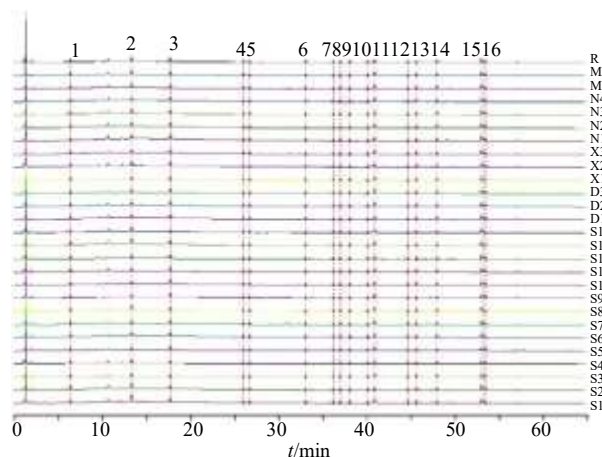


图 3 26 批红豆杉属红豆杉种子样品叠加谱图及对照谱图 (R)

Fig. 3 Overlapping fingerprint of 26 batches of *Taxus* seed samples and control fingerprint

C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m); 流动相为水 (A)-乙腈 (B)，洗脱梯度为 0~2 min, 5%~10% B; 2~4 min, 10%~25% B; 4~18 min, 25%~45% B; 18~25 min, 45%~54% B; 25~27 min, 54%~64% B; 27~30 min, 64%~95% B; 30~31

表 2 26 批红豆杉属种子样品指纹图谱相似度分析结果

Table 2 Similarity of fingerprints of 26 batches of *Taxus* seeds

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.885	S14	0.948
S2	0.916	D1	0.978
S3	0.938	D2	0.991
S4	0.945	D3	0.969
S5	0.923	X1	0.973
S6	0.995	X2	0.991
S7	0.983	X3	0.968
S8	0.948	N1	0.968
S9	0.909	N2	0.988
S10	0.940	N3	0.983
S11	0.979	N4	0.974
S12	0.959	M1	0.987
S13	0.969	M2	0.986

表 3 26 批红豆杉属种子中 6 种成分的回归方程与相关系数

Table 3 Regression equations and correlation coefficients for six components in seeds of 26 batches of *Taxus*

成分	回归方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
10-去乙酰巴卡亭Ⅲ	$Y=16.246 X-3.614 6$	0.999 2	0.8~16	0.025	0.01
巴卡Ⅲ	$Y=17.207 X-1.341 1$	0.999 2	0.8~16	0.02	0.05
7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇	$Y=16.192 X-0.070 9$	0.999 8	0.8~16	0.05	0.03
10-脱乙酰紫杉醇	$Y=19.730 X+0.656 8$	0.999 2	0.8~16	0.05	0.03
三尖杉宁碱	$Y=16.727 X-6.699 8$	0.999 4	1.2~24	0.10	0.05
紫杉醇	$Y=24.962 X+9.100 1$	0.999 9	2.4~48	0.05	0.025

明该方法专属性良好(图 4)。

2.5.4 精密度试验 精密量取“2.5.2”项下对照品溶液,按照“2.5.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,测定并计算色谱峰面积 RSD,10-去乙酰巴卡亭Ⅲ、巴卡Ⅲ、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱、紫杉醇峰面积的 RSD 分别为 0.13%、0.13%、0.30%、0.12%、0.28%、0.12%,结果表明仪器精密度良好。

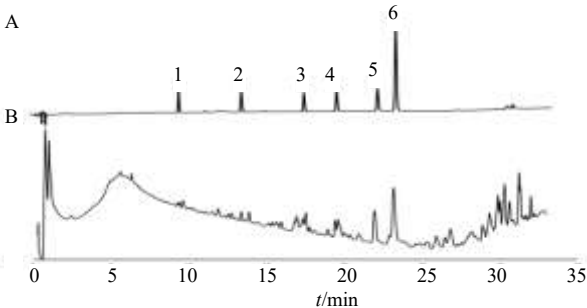
2.5.5 重复性试验 精密称取 6 份样品,各 1.0 g,按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按照“2.5.1”项下色谱条件进样分析,测定并计算色谱峰面积 RSD,10-去乙酰巴卡亭Ⅲ、巴卡Ⅲ、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱、紫杉醇质量分数的 RSD 分别为 0.17%、0.15%、0.12%、0.26%、0.19%、0.29%,结果表明该方法重复性良好。

2.5.6 稳定性试验 将新制备的同一份供试品溶液,在室温条件下放置 0、1、2、4、6、8、12、24 h,按照“2.5.1”项下色谱条件进样分析,测定并计

min, 95% B; 31~33 min, 95%~5% B; 体积流量为 0.3 mL/min; 检测波长为 227 nm; 柱温为 25 ℃; 进样量为 3 μL 。

2.5.2 线性关系考察 精密量取“2.2”项下对照品储备液,用色谱级甲醇按梯度稀释成系列浓度的对照品溶液,按照“2.5.1”项下色谱条件进样分析记录峰面积,以对照品溶液的浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得 10-去乙酰巴卡亭Ⅲ、巴卡Ⅲ、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱、紫杉醇的回归方程、相关系数和线性范围,结果见表 3。

2.5.3 专属性试验 取混合对照品溶液、供试品溶液、甲醇溶液,按照“2.5.1”项下色谱条件进样分析,测得两者在相应保留时间处有相同色谱峰,表



1-10-去乙酰巴卡亭Ⅲ; 2-巴卡亭Ⅲ; 3-7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇; 4-10-脱乙酰紫杉醇; 5-三尖杉宁碱; 6-紫杉醇。
1-10-deacetylbaccatine III; 2-baccatin III; 3-7-epi-10-deacetyl paclitaxel; 4-10-deacetyltaxol; 5-cephalomannine; 6-paclitaxel.

图 4 混合对照品 (A) 和供试品溶液 (B) HPLC 图谱
Fig. 4 Chromatograms of methanol solution (A) and mixed control (B)

算色谱峰面积 RSD,10-去乙酰巴卡亭Ⅲ、巴卡Ⅲ、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱、紫杉醇面积的 RSD 分别为 0.01%、0.02%、0.12%、0.01%、0.14%、0.03%。

2.5.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的 9 份样品,各 1.0 g,分别加入相当于样品中各成分含量

的 80%、100%、120% 的对照品溶液, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样分析, 计算平均加样回收率及 RSD 值。结果如下: 10-去乙酰巴卡亭Ⅲ、巴卡亭Ⅲ、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱、紫杉醇的平均加样回收率为 107.82%、108.20%、99.79%、104.78%、100.25%、100.57%; RSD 分别为 0.10%、0.05%、0.04%、0.07%、0.04%、0.04%, 表明方法的准确度良好。

表 4 26 批红豆杉药材中 6 种成分平均含量测定结果

Table 4 Results of average content of six components in seeds of 26 batches of *Taxus*

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	10-去乙酰巴卡亭Ⅲ	巴卡亭Ⅲ	7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇	10-脱乙酰紫杉醇	三尖杉宁碱	紫杉醇
S1	0.024	0.004	0.025	0.010	0.149	0.082
S2	0.045	0.011	0.016	0.021	0.090	0.122
S3	0.030	0.011	0.010	0.033	0.046	0.109
S4	0.053	0.007	0.008	0.035	0.093	0.171
S5	0.051	0.010	0.044	0.036	0.197	0.240
S6	0.013	0.028	0.038	0.036	0.095	0.163
S7	0.051	0.013	0.062	0.043	0.203	0.195
S8	0.058	0.011	0.011	0.070	0.166	0.247
S9	0.051	0.009	0.020	0.060	0.124	0.148
S10	0.043	0.010	0.036	0.085	0.123	0.182
S11	0.057	0.002	0.021	0.042	0.144	0.107
S12	0.009	0.010	0.030	0.105	0.263	0.225
S13	0.052	0.014	0.062	0.073	0.236	0.218
S14	0.038	0.014	0.033	0.064	0.141	0.198
D1	0.029	0.027	0.034	0.024	0.125	0.204
D2	0.037	0.011	0.040	0.052	0.181	0.203
D3	0.030	0.022	0.031	0.075	0.134	0.221
X1	0.034	0.012	0.025	0.038	0.108	0.161
X2	0.032	0.026	0.022	0.022	0.095	0.189
X3	0.027	0.016	0.025	0.064	0.135	0.227
N1	0.029	0.024	0.030	0.026	0.123	0.209
N2	0.037	0.017	0.030	0.048	0.146	0.205
N3	0.036	0.020	0.029	0.077	0.134	0.173
N4	0.037	0.028	0.028	0.125	0.145	0.252
M1	0.021	0.027	0.046	0.022	0.101	0.264
M2	0.110	0.007	0.182	0.011	0.164	0.097

2.6.1 聚类分析 (cluster analysis, CA) 将 18 批药材 (表 1 中 14 批红豆杉和 4 批南方红豆杉) 指纹图谱的 16 个共有峰峰面积为变量, 导入 SPSS 25.0 软件, 采用组间连接法, 结合平方欧式距离为度量标准进行系统聚类分析, 结果见图 5-A。当欧氏距离=25 时, 18 批药材样品可聚为 2 类, S1~S14 (红豆杉) 聚为一类, N1~N4 (南方红豆杉) 聚为一类。

2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 主成分分析是在尽可能保持原有数据信息

2.5.8 样品含量测定 精密称取 26 批样品, 各 1.0 g, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样分析, 按外标法计算各成分的含量, 测定结果见表 4。

2.6 化学模式识别

因红豆杉与南方红豆杉为同种近缘植物, 其种子不但在化学成分上差异性很小, 且在药材性状及显微特征上也极其相似不易鉴别, 所以选取南方红豆杉进一步进行化学模式识别的探索研究。

的前提下, 通过降维处理达到简化指标的计量学方法^[9]。使用 SPSS 25.0 软件, 以 14 批红豆杉和 4 批南方红豆杉药材的 16 个共有峰面积为变量, 对其标准化处理后进行主成分分析, 以主成分特征值>1 作为标准, 提取出 5 个主成分, 方差贡献率分别为 29.286%、19.138%、15.266%、9.124%、7.620%, 累积方差贡献率为 80.434%, 表明这 5 个主成分可反映原始指纹图谱 16 个共有峰的大部分信息, 特征值和贡献率结果见表 5。因子载荷矩阵反映了各主成分与 16 个共有峰即原始变量之间的相关系数,

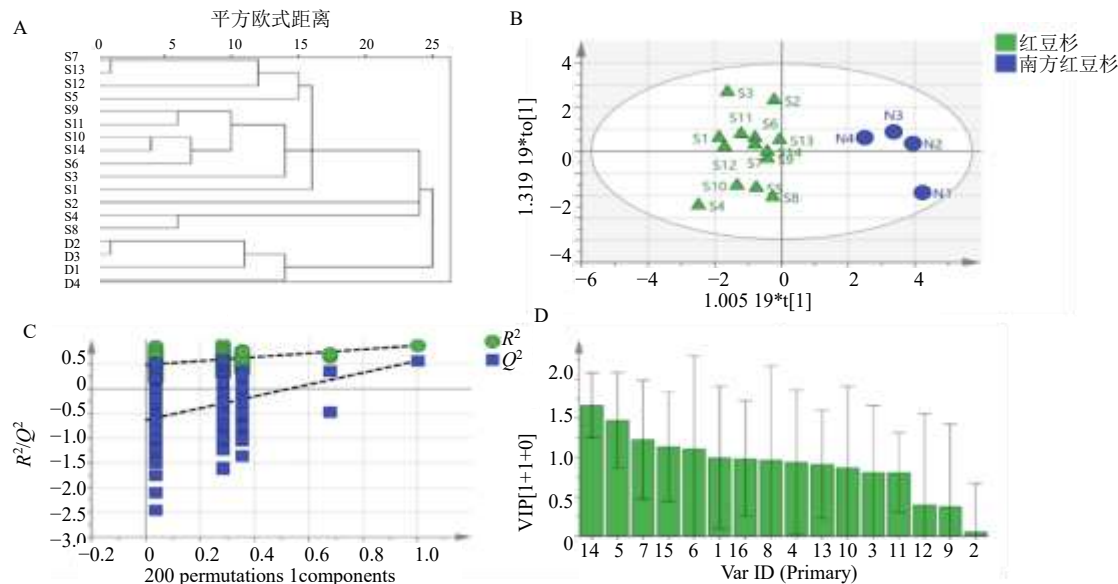


图 5 红豆杉种子和南方红豆杉种子聚类分析 (A)、PCA (B)、OPLS-DA (C) 及 VIP 值图 (D)
Fig. 5 Cluster analysis (A), PCA (B), OPLS-DA (C) and VIP value plots (D) of seeds of *T. wallichiana* var. *chinensis* and *T. wallichiana* var. *mairei*

表 5 红豆杉种子和南方红豆杉种子的特征值和累积方差贡献率

Table 5 Eigenvalues and cumulative variance contributions for seeds of *T. wallichiana* var. *chinensis* and *T. wallichiana* var. *mairei*

因素	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.686	29.286	29.286
2	3.062	19.138	48.424
3	2.443	15.266	63.690
4	1.460	9.124	72.814
5	1.219	7.620	80.434

结果见表 6，主成分 1 主要与色谱峰 5、6、7、10、14、15、16 的相关，主成分 2 主要与色谱峰 2、8、13 相关，主成分 3 主要与色谱峰 3、4 相关，主成分 4 主要与色谱峰 1、9、11 相关，主成分 5 主要与色谱峰 12 相关。

2.6.3 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)

为了能够更直观体现不同样品之间的差异，筛选出对组间差异贡献率较大的成分，使用 SPSS 25.0 软件对 14 批红豆杉和 4 批南方红豆杉药材的共有峰面积进行标准化处理，将标准化后的共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1，采用有监督模式的 OPLS-DA 模型对 18 批红豆杉药材样品进行判别分析，OPLS-DA 得分图见图 5-C，由图中可看出 2 类药材样品聚类较好，分离较显著，经过 200 次置换检验， Q^2 回归线与纵轴的相交点为负值，说明模型不存在过

表 6 红豆杉种子和南方红豆杉种子的因子载荷矩阵

Table 6 Factor load matrix for seeds of *T. wallichiana* var. *chinensis* and *T. wallichiana* var. *mairei*

共有峰	载荷				
	1	2	3	4	5
1	-0.552	0.301	0.275	0.441	-0.276
2	-0.002	0.802	0.173	0.367	0.060
3	0.482	-0.334	0.564	-0.068	-0.068
4	-0.561	0.313	0.380	-0.127	0.263
5	0.774	0.079	-0.137	0.110	0.399
6	0.516	-0.339	-0.554	-0.082	0.423
7	0.642	0.422	-0.373	-0.139	-0.357
8	0.574	0.587	0.083	0.209	-0.106
9	-0.062	0.157	-0.869	0.297	-0.143
10	0.428	-0.689	0.331	0.354	-0.179
11	0.475	-0.098	-0.172	0.667	-0.030
12	0.178	0.237	0.468	0.241	0.620
13	0.310	0.607	-0.018	-0.535	-0.060
14	0.908	0.141	-0.013	-0.087	0.128
15	0.678	0.497	0.417	-0.060	-0.241
16	0.635	-0.525	0.338	-0.120	-0.271

拟合，模型验证有效，结果见图 5-C。变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值是筛选差异性化合物的重要指标，成分 VIP 值越大，表明该成分对组间差异的影响越大^[10]。VIP 的得分结果见图 5-D，以 VIP 值>1 为筛选标准，筛选出 5 个差异性成分，分别为峰 14、5、7、15、6，这可能是导致红豆杉种子和南方红豆杉种子产生差异的主要成分。

3 讨论

3.1 红豆杉属植物种子 HPLC 指纹图谱的建立

本研究建立了红豆杉种子的 HPLC 对照指纹图谱,共指认了 16 个共有峰,通过与混合对照品色谱图比对,确认了其中以紫杉醇为主的 6 种紫杉烷类化合物,能够较为全面的反映红豆杉药材的内在质量。在进行指纹图谱相似度分析时发现,除红豆杉种子 S1 的相似度为 0.885 外,红豆杉其余批次与其他同属植物种子样品的相似度均 >0.9 ,26 批红豆杉属植物种子的相似度在 0.885~0.995,这表明它们所含的主要紫杉烷类活性成分具有较高的相似性,它们可以考虑作为同一类新的种子类药材资源进行开发利用;而所建立的红豆杉的指纹图谱也可用于其他同属植物种子的分析。

3.2 红豆杉属植物种子所含主要紫杉烷类化合物的含量测定

根据相关文献报道,紫杉醇具有良好的抗癌效果,而其他与紫杉醇结构相似的紫杉烷类化合物可作为半合成原料,通过化学结构修饰改造,能得到紫杉醇甚至药效更好的抗癌化合物^[11-12]。因在 4 种红豆杉属植物种子中发现的 10-去乙酰巴卡亭Ⅲ、巴卡亭Ⅲ、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱等 5 个主要紫杉烷类化学成分都是合成紫杉醇的重要前体化合物^[12-13],因此选择紫杉醇和这 5 种紫杉烷类化合物作为有效成分含量测定的指标,用于红豆杉属 5 种植物种子的药材质量控制。本实验建立了含量测定方法,确定了每个成分测定的回归方程和线性范围(表 4),并对 26 个样品的 6 个成分进行了测定(表 3、图 5)。测定结果表明红豆杉属植物种子的样品间有效成分含量存在较明显差异,如红豆杉种子中 S12、S13 的总紫杉烷类成分含量明显高于其他批次,而 S5、S8 紫杉醇的含量较高,造成差异的原因可能是种植区域的差异或海拔高低等原因。由测定结果可以明确了解不同样品质量的差异。

3.3 指纹图谱和含量测定条件的选择

本实验在供试品制备时,分别考察了不同提取溶剂(水、50%乙醇、60%乙醇、70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、100%乙醇)、不同料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)、不同提取时间(0.5、1、1.5、2 h)、不同提取次数(1、2、3 次),根据分离度及含量测定结果选择提取溶剂(50%、60%、70%乙醇)、料液比(1:15、1:20、

1:25)、提取时间(1、1.5、2 h)、提取次数(1、2、3 次)进行正交试验分析,最终选择供试品的制备方法为提取溶剂 70%,料液比 1:25,超声提取 3 次,每次 2 h。在进行含量测定和指纹图谱时,色谱条件分别考察了不同流动相(乙腈-水、甲醇-水、0.1%甲酸水-乙腈)、不同柱温(25、30、35 ℃)、不同进样量(1、2、3 μL)、不同体积流量(0.1、0.2、0.3 mL/min),并对供试品溶液进行了全波长扫描,并同时考虑到基线是否平稳,色谱峰信息是否全面,确定了在检测波长 227 nm 下基线较为平稳,色谱峰信息较为全面。因此含量测定最终的色谱条件为流动相乙腈-水、柱温 25 ℃、进样量 3 μL 、体积流量 0.3 mL/min;指纹图谱最终的色谱条件为流动相乙腈-水、柱温 25 ℃、进样量 3 μL 、体积流量 0.2 mL/min,在以上色谱条件下,含量测定的有效成分色谱峰和指纹图谱的色谱峰分离效果最佳,且峰形较好,能够满足含量测定和指纹图谱的建立要求。

3.4 红豆杉与南方红豆杉种子的化学模式识别

因红豆杉与南方红豆杉为同物种近源植物,所以它们的种子在外观形态及显微特征上极为相似,本研究在指纹图谱分析的基础上,利用化学模式识别方法对其进行了对比分析,CA 分析结果说明两者具有一定差异并聚类分为了 2 类;PCA 结果中 5 个主成分的累积方差贡献率为 80.434%。OPLS-DA 初步筛选出了 5 个差异性成分,分别为峰 14、5、7、15、6,表明这 5 个成分在此 2 种药材中起到重要的作用。本研究后续将通过液质联用分析等手段对未确定的质量差异性成分进行鉴定。

综上,本研究通过色谱条件优化及方法学考察建立了红豆杉种子 HPLC 指纹图谱和多指标含量测定方法,该方法简单且准确度高,能够为红豆杉种子及其同属植物种子的鉴别、质量标准的建立及质量控制提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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 (第七卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 56.
- [2] 檀丽萍, 陈振峰. 中国红豆杉资源 [J]. 西北林学院学报, 2006, 21(6): 113-117.
- [3] Nižnanský L, Osinová D, Kuruc R, *et al.* Natural taxanes: From plant composition to human pharmacology and toxicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15619.

- [4] Wei Q, Li Q Z, Wang R L. Flavonoid components, distribution, and biological activities in *Taxus*: A review [J]. *Molecules*, 2023, 28(4): 1713.
- [5] Zhao C J, Li Z, Li C Y, *et al.* Optimized extraction of polysaccharides from *Taxus chinensis* var. *mairei* fruits and its antitumor activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 75: 192-198.
- [6] Gao X Y, Zhang N, Xie W D. Advancements in the cultivation, active components, and pharmacological activities of *Taxus mairei* [J]. *Molecules*, 2024, 29(5): 1128.
- [7] 孟爱平, 李娟, 濮社班. 红豆杉属植物化学成分及药理作用研究新进展 [J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(2): 47-51.
- [8] Shao F J, Wilson I W, Qiu D Y. The research progress of taxol in *Taxus* [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2021, 22(3): 360-366.
- [9] 李惠敏, 李凤超, 高必兴, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及化学模式识别对比研究曲花紫堇及同属药材 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1709-1716.
- [10] 王娜, 程璐, 王浩, 等. 茯神指纹图谱结合化学模式识别和多指标成分定量研究 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 279-286.
- [11] 杨春, 孔令义, 汪俊松. 加拿大红豆杉中紫杉烷类成分的研究进展及药源危机解决方法探讨 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 1961-1971.
- [12] 吴长桥, 蒋路园, 杨艳芳, 等. 红豆杉属植物中紫杉烷化合物含量比较与分析 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 538-543.
- [13] 崔海超, 郑文艺, 张智慧, 等. 不同红豆杉属植物中 7 种紫杉烷类化合物的 HPLC 检测与分析 [J]. 森林工程, 2022, 38(4): 118-124.

[责任编辑 时圣明]