

HPLC-MS 识别苦木中苦参碱和氧化苦参碱

刘丽娜, 孙磊, 程显隆, 田金改, 金红宇*
(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] 目的: 利用高效液相色谱-串联质谱联用分析和鉴定苦木中苦参碱及氧化苦参碱。方法: 采用高效液相色谱-电喷雾/四极杆-飞行时间串联质谱, 通过与对照品保留时间、准确分子量及其一级、二级质谱比对, 进行成分鉴定, 并建立了高效液相色谱-串联四级杆质谱联用测定苦木中苦参碱与氧化苦参碱的定量方法研究。结果: 苦木中含有微量的苦参碱及氧化苦参碱成分, 建立的方法专属、灵敏, 可作为苦木中苦参碱及氧化苦参碱的识别依据。结论: 首次以 LC-MS 鉴别出了苦木中苦参碱与氧化苦参碱。不同产地不同部位的苦木药材中苦参碱与氧化苦参碱含量差别较大。

[关键词] 苦木; 苦参碱; 氧化苦参碱; 超高效液相色谱-电喷雾四级杆飞行时间串联质谱; 高效液相色谱-串联四级杆质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0110-04

Identification of Matrine and Ammothamnine in Picrasmae Lignum by High Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass spectrometry

LIU Li-na, SUN Lei, CHENG Xian-long, TIAN Jin-gai, JIN Hong-yu*
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** Identification of matrine and ammothamnine in picrasmae lignum by high performance liquid chromatography /Tandem Mass spectrometry. **Method:** Two alkaloids in picrasmae lignum were analyzed by HPLC-ESI/Q-TOF MS/MS. According to the accurate molecular weight, retention time and MSn data by compared with reference substances, the chemical structures were identified. After that, quantitative method was built based on the techniques of LC-Q-Q-Q. **Result:** Two trace components were identified in picrasmae lignum. The method is specific, sensitive and can be used as the identification of matrine and oxymatrine in picrasmae lignum. **Conclusion:** It was the first time to report the identification of Matrine and ammothamnine in picrasmae lignum by LC-MS. The content of matrine and ammothamnine in picrasmae lignum vary greatly with the different part and the area of produce.

[Key words] picrasmae lignum; matrine; ammothamnine; HPLC-ESI/Q-TOF MS/MS; LC-Q-Q-Q

苦木原植物系苦木科植物苦木 *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn^[2]。20 世纪七八十年代日本学者和中国学者对苦木的化学成分研究较多, 证明其主要含有生物碱和苦味素类化合物, 其次为三

萜、甾醇、皂苷、香豆素、醌类等^[1]。生物碱主要为铁屎米酮类生物碱、 β -carboline 类生物碱及二聚体生物碱^[3]。

因苦木与苦参有相似的功效, 作者对两者进行了对比研究, 参照 2010 年版《中国药典》山豆根项下薄层鉴别^[2] (鉴别苦参碱与氧化苦参碱) 对苦木进行研究, 发现在与苦参碱与氧化苦参碱对照品色谱相应的位置上, 显相同的较微弱的橙黄色斑点, 表明苦木中可能存在苦参碱及氧化苦参碱。虽然目前对苦木的化学成分已有一定的研究, 但目前尚未见苦木中苦参碱与氧化苦参碱成分的报道。

HPLC-Q-TOF 液质联用仪因其具有高分辨率功

[收稿日期] 20110531(002)

[第一作者] 刘丽娜, 硕士研究生, Tel: 010-67095424, E-mail: killn@163.com, 从事中药及天然药物质量标准研究

[通讯作者] * 金红宇, 副研究员, 主任药师, Tel: 010-67095424, E-mail: jhyu@nicpbp.org.cn, 从事中药及天然药物质量控制研究

能,并能给出化合物二级结构信息而成为复杂体系分析化合物结构的良好平台。高效液相色谱与串联四级杆质谱联用技术,具有较高的灵敏度及高度的选择性,适用于微量成分分析。

本实验利用高效液相色谱-串联质谱联用技术,来分析和鉴定苦木中苦参碱与氧化苦参碱。

1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC/XEVO Q-TOF MS(美国 Waters 公司),ES 源。数据由 MassLynx™ MS Informatics 工作站采集和分析。安捷伦 1200 高效液相色谱仪-安捷伦 6410B 三重四级杆串联质谱仪(美国安捷伦公司),ESI 源,数据由 Masshunter 工作站采集和分析;Milli-Q 超纯水处理系统。

甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 J. T. BAKER 公司),乙酸铵为色谱纯(美国 Sigma 公司),甲酸为色谱纯(Fluak),水为高纯水,苦参碱对照品(批号 110805-200508)、氧化苦参碱对照品(批号 110780-200506)及苦木对照药材由中国样品生物制品检定所提供,苦木药材由某药材公司提供。

2 方法

2.1 HPLC-Q-TOF 液质联用鉴定试验色谱与质谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm × 50 mm,1.7 μm);以 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(甲酸调节 pH 3.0)(A)-甲醇(B)为流动相,梯度洗脱程序(0~4 min,10%~30% B;4~7 min,30%~10% B,7~12 min,10% B);流速 0.3 mL·min⁻¹;进样量 10 μL。

电喷雾正离子模式检测;源温度 120 °C;脱溶剂温度 625 °C,喷雾气体流量 600 L·h⁻¹,锥孔气流量 50 L·h⁻¹。ES 源电压 3.0 kV,取样锥孔电压 30 V,温度 120 °C,喷雾器 35 psi,气体流速(N₂)9 L·min⁻¹。四极杆扫描范围 *m/z* 100~1 000,碰撞室能量 55 V。

2.2 HPLC-Q-Q-Q 液质联用定量实验色谱质与谱条件 色谱柱:Mecherey-Nagel Nucleosil 100-5 C₁₈ AB(4.6 mm × 250 mm,5 μm),以甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵(甲酸调节 pH 至 3.0)(80:20)为流动相,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,分析时间 12 min。

质谱采用 ESI 正离子多反应监测(MRM)模式检测 ESI 源电压 4.0 kV,温度 300 °C,喷雾器 35 psi,气体流速(N₂)9 L·min⁻¹,检测离子对及有关参数见表 1。

2.3 对照品溶液的制备 取苦参碱与氧化苦参碱对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含

表 1 检测离子对及有关参数

名称	锥孔电压 /V	定量离子对 ^{a)}	定性离子 ^{a)}
苦参碱	190	249.3→148.2(40)	249.3→150.2(40)
氧化苦参碱	215	265.3→205.2(35)	265.3→205.2(35)

注:^{a)}圆括号内给出碰撞能量(eV)。

苦参碱与氧化苦参碱各 0.2 μg 的对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备^[2] 取供试品粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入三氯甲甲醇-浓氨试液(40:10:1)混合溶液 50 mL,密塞,称定质量,放置 30 min,超声处理 30 min,再称定质量,用三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(40:10:1)混合溶液补足缺失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,40 °C 减压回收溶剂至干,残渣加甲醇适量使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

3 结果

3.1 苦参碱与氧化苦参碱的 HPLC-Q-TOF 液质联用鉴别 利用飞行时间质谱的高分辨率,获得化合物的精确相对分子质量后结合计算机软件给出可能的分子式来鉴定化合物,是近些年新兴的技术。利用 MassLynx 软件处理,计算机给出保留时间为 1.86 min 的化合物最可能的分子式为 [C₁₅H₂₅N₂O]⁺,其理论相对分子质量为 249.196 7,实测值为 249.198 5,这与苦参碱的分子式一致;保留时间为 2.73 min 的化合物最可能分子式为 [C₁₅H₂₅N₂O₂]⁺,其理论相对分子质量为 265.191 6,实测值为 265.195 9,这与氧化苦参碱的分子式一致。

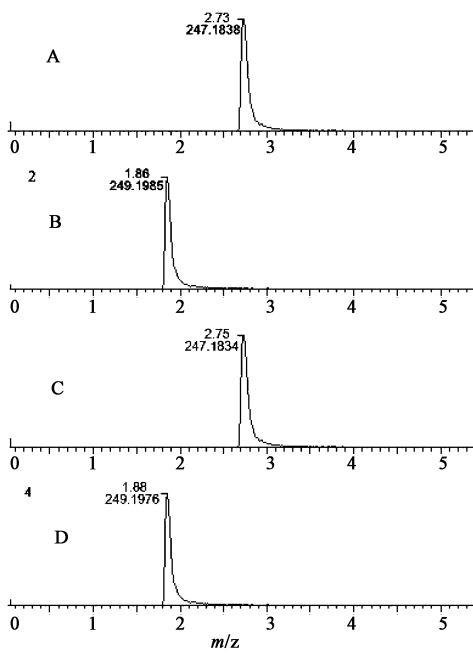
供试品溶液中可检出与苦参碱与氧化苦参碱对照品保留时间、准确质量数及一级质谱、二级质谱碎片离子完全一致的色谱峰。见图 1。

苦参碱与氧化苦参碱的碎片信息与文献^[4]报道的电喷雾串联质谱分析中苦参碱与氧化苦参碱的裂解规律是一致的,亦佐证了我们的研究结果。

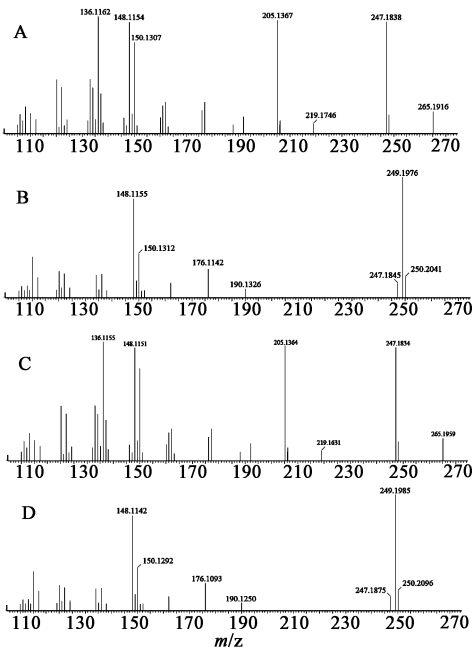
3.2 苦木中苦参碱与氧化苦参碱的测定

3.2.1 检出限与定量限 将混合标准品溶液适当稀释后制得一系列不同质量浓度的对照品溶液,进样分析,以信噪比 S/N=3 作为检出限,S/N=10 作为量限,苦参碱的定量限为 70.42 pg,检出限为 21.12 pg;氧化苦参碱的定量限为 11.66 pg,检出限为 3.50 pg。

3.2.2 线性关系 将苦参碱与氧化苦参碱混合对照品溶液适当稀释后制得一系列不同质量浓度的对照品溶液,进样分析,测定各色谱峰峰面积(Y)对对



(A, B. 氧化苦参碱与苦参碱对照品;
C, D. 苦木药材中苦参碱与氧化苦参碱)
图 1 苦参碱与氧化苦参碱的 TIC 质谱图



(A, B. 氧化苦参碱与苦参碱对照品二级质谱图;
C, D. 苦木药材中苦参碱与氧化苦参碱二级质谱图)
图 2 苦参碱与氧化苦参碱的二级质谱图

照品浓度 ($X, \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行回归, 得到的标准曲线。结果表明, 苦参碱在 $0.07 \sim 10 \text{ ng}$ 线性关系良好, $r = 0.9993$; 氧化苦参碱 $0.02 \sim 10 \text{ ng}$ 线性关系良好, $r = 0.9996$ 。标准曲线方程为:

$$\text{苦参碱 } Y = 3.19 \times 10^{-5} X - 0.1274$$

$$\text{氧化苦参碱 } Y = 5.92 \times 10^{-5} X + 0.0966$$

3.2.3 精密度试验 将混合对照品溶液 (苦参碱与氧化苦参碱质量浓度均为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 连续进样 6 次, 计算各色谱峰峰面积值的相对标准偏差, 结果精密度良好, 苦参碱和氧化苦参碱的 RSD 分别为 1.03%, 1.74%, 表明精密度良好。

3.2.4 样品测定 按建立的方法分别对收集的样品进行了含量测定, 结果见表 2。

样品	部位	苦参碱	氧化苦参碱
广西河池 (101106)	枝	0.0758	0.0711
对照药材 (121017-201004)	枝	0.0907	0.0402
广西翁源 (101104)	枝	0.3151	0.1767
贵州 (101123)	枝	26.1535	21.8084
湖南 (100610)	心材	43.7875	66.5936
越南 (101021)	枝	0.0166	0.1518
越南 (101104)	枝	0.0992	0.1054
安国药市 (201004)	叶子	ND	ND
安国药市 (201004)	心材	0.1786	0.1895
越南 (101022)	叶子	ND	0.0820

4 讨论

本文利用高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱联用技术, 通过与对照品保留时间、准确分子量及其一级、二级质谱比对, 证实了苦木中存在苦参碱与氧化苦参碱。

考虑到高效液相色谱法-三重四级杆联用在定量方面的优越性, 故采用 HPLC-Q-Q-Q 对苦木中苦参碱与氧化苦参碱进行进一步定量分析。同时也佐证了苦木中苦参碱与氧化苦参碱的存在。结果表明, 除越南 (叶子) 未检出苦参碱、对照药材 (叶子) 未检出苦参碱及氧化苦参碱外, 其他各批次样品中均有不同含量的苦参碱及氧化苦参碱成分检出, 但一般处于较微量水平。

检测的样品为目前市场流通使用的苦木药材, 其药用部位不同, 产地不同, 苦参碱及氧化苦参碱的含量也各异。在枝及心材类的苦木样品中, 均可检出苦参碱及氧化苦参碱。而两批叶子类的苦木样品则只有一批检出微量氧化苦参碱, 其他成分含量则在检出限以下。

苦参碱类生物碱是以苦参碱为代表的化学结构相似的一类生物碱。它们广泛存在于豆科植物苦参、苦豆子、山豆根中, 是这几种常用中草药的活性成分^[5], 这一类生物碱主要还包括氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱和槐胺碱等^[6]。尚未见苦木科植物中分离到此类生物碱成分的报道, 苦木

HPLC 测定荆菊感冒片中牛蒡苷的含量

廖晓鸣¹, 郑丹², 宋志娟², 马仁强^{2*}

(1. 深圳市康哲药业有限公司, 广东 深圳 518057;
2. 广州博济医药生物技术有限公司, 广州 510620)

[摘要] 目的: 建立荆菊感冒片中牛蒡苷的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 以 VARIAN Microsorb 100-5 C₁₈ 柱为分析柱, 甲醇-水(40:60)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 280 nm。结果: 牛蒡苷在 0.042 8~0.856 g·L⁻¹ 线性关系良好, $r=0.999\ 9$; 平均加样回收率为 100.2%, RSD 1.45% ($n=6$)。结论: 该方法简便、快速、准确, 可用于测定荆菊感冒片中牛蒡苷的含量。

[关键词] 荆菊感冒片; 牛蒡苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0113-03

Determination of Arctiin in Jingju Ganmao Tablets by HPLC

LIAO Xiao-ming¹, ZHENG Dan², SONG Zhi-juan², MA Ren-qiang^{2*}

(1. Shenzhen Kangzhe Pharmaceutical Co., Ltd, Shenzhen 518057, China;

2. Guangzhou Boji Medicinal and Biological Technology Co. Ltd, Guangzhou 510620, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method to determine arctiin in Jingju Ganmao tablets. **Method:** The determination was conducted by HPLC using a VARIAN Microsorb 100-5 C₁₈ column. The mobile phase consisted of CH₃OH:H₂O (40:60) with flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 280 nm. **Result:** This method had good resolution and good linear relationship between 0.042 8-0.856 g·L⁻¹. The average recovery of arctiin was 100.2% and RSD was 1.45% ($n=6$). **Conclusion:** This method is simple, quick and accurate. It can be used for quantity control of Jingju Ganmao tablets.

[Key words] Jingju Ganmao tablet; arctiin; HPLC

荆菊感冒片由荆芥、金银花、牛蒡子、淡豆豉、连翘、淡竹叶、桑叶、菊花等 13 味中药组成, 具有疏风清热, 发表解肌的作用, 用于伤风感冒, 身热恶寒, 头

痛鼻塞。荆菊感冒片原标准收载于部颁标准, 未有含量测定项, 不利于产品的质量控制。牛蒡子为荆菊感冒片中主要药物, 据《中国药典》2010 年版一

[收稿日期] 20110324(003)

[通讯作者] * 马仁强, 主管药师, 从事新药开发工作, Tel:020-89883484, E-mail:pony213@163.com

中是否还含有其他苦参类生物碱待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 吴征镒, 周太炎, 肖培根. 新华本草纲要[M]. 上海: 科学技术出版社, 1988:75.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010:186, 25.
- [3] 陈猛. 苦木生物碱活性成分的研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2007:1.
- [4] 陈怀侠, 韩凤梅, 杜鹃, 等. 苦参生物碱电喷雾质谱分

- 析[J]. 分析化学研究简报, 2006, 32(2):205.
- [5] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986:700.
- [6] Akira Ueno A, Kunio Morinaga, Seigo Fukushima, et al. Studies on the lupin alkaloids. VII. isolation and structure of (-)- Δ^7 -dehydrosophoramine[J]. Chem Pharm Bull, 1978, 26(6):1832.

[责任编辑 蔡仲德]