

UPLC-MS-MS 测定麝宁搽剂中苦参碱与氧化苦参碱

朱平川¹, 岑卫健¹, 范晓苏², 莫祺红^{3*}

(1. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学, 南宁 530004;

2. 广西大学化学化工学院, 南宁 530004; 3. 广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530004)

[摘要] 目的: 建立同时测定麝宁搽剂中的苦参碱与氧化苦参碱 2 种有效成分含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS-MS)分析方法。方法: 采用 C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.1% 甲酸的水溶液为流动相, 流速 0.30 mL·min⁻¹。在电喷雾电离(ESI)正离子模式下, 采用多重反应监测模式(MRM)进行检测。结果: 苦参碱与氧化苦参碱的线性范围分别为 0.000 5 ~ 0.6, 0.000 4 ~ 0.5 mg·L⁻¹; 检出限分别为 0.2, 0.2 μg·L⁻¹; 2 种成分的加样回收率为 95.8% ~ 98.6%, RSD 均 < 1.9%。结论: 该方法简便、准确、快速、高灵敏度, 已成功地用于实际的样品分析。

[关键词] 麝宁搽剂; 苦参碱; 氧化苦参碱; 超高效液相色谱-串联质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0051-04

[doi] 10.11653/syfy2014060051

Simultaneous Determination of Matrine and Oxymatrine in Xianning Linimentum by UPLC-MS-MS

ZHU Ping-chuan¹, CEN Wei-jian¹, FAN Xiao-su², MO Qi-hong^{3*}

(1. State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical

Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

3. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

[Abstract] **Objective:** A method for simultaneous determination of matrine and oxymatrine in Xianning Linimentum was established by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-

[收稿日期] 20131007(007)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(桂科自 0832034)

[第一作者] 朱平川, 硕士, 实验师, 从事色谱及质谱联用技术研究, Tel: 0771-3237092, E-mail: zhupingchuan12@163.com

[通讯作者] * 莫祺红, 硕士, 高级实验师, 从事生物开发研究, Tel: 0771-3270736, E-mail: 18978962025@163.com

[7] 王春玲, 赖小平, 吴安国. 和厚朴酚联合青蒿素对 CNE-2 细胞增殖和凋亡的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 157.

[8] 李兰芳, 郭淑英, 张畅斌, 等. 青蒿有效部位及其成分的解热作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12): 65.

[9] 王满元, 杨岚, 张东. 高效液相色谱法测定不同来源青蒿中青蒿乙素的含量[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(22): 1698.

[10] 杨岚, 王满元, 张东, 等. 青蒿药材中东莨菪内酯的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(10): 10.

[11] 张东, 杨岚, 杨立新, 等. 野生及栽培青蒿挥发油成分的气相色谱-质谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 33.

[12] 孙景灿, 曾建立, 赵兵, 等. 反相高效液相色谱法测定青蒿中青蒿酸的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 22(5): 846.

[13] 黄敬坚, 夏志强, 吴莲芬. 青蒿化学成分的研究 I. 11R(-)-双氢青蒿酸的分离和结构鉴定[J]. 化学学报, 1987, 45(6): 609.

[责任编辑 顾雪竹]

MS-MS). **Method:** The UPLC separation was performed on C_{18} column (2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μ m) by using methanol and water containing 0.1% formic acid as mobile phase with the gradient elution at a rate of 0.30 mL \cdot min⁻¹. The analytes were detected by tandem mass spectrometry under the positive ion mode with the ESI source and carried out in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Result:** Under the optimum conditions, the calibration curves were linear in the range of 0.000 5-0.6 mg \cdot L⁻¹ for matrine, 0.000 4-0.5 mg \cdot L⁻¹ for oxymatrine. The detection limits were 0.2, 0.2 μ g \cdot L⁻¹ respectively. The average recoveries of the three effective components were between 95.8% and 98.6% with all relative standard deviations not more than 1.9%. **Conclusion:** The developed method is simple, rapid and accurate, and suitable for the quality control of the two components in Xianning Linimentum.

[**Key words**] Xianning Linimentum; matrine; oxymatrine; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS)

苦参为豆科植物苦参的干燥根,具有清热燥湿、杀虫、利尿的功效^[1]。苦参的主要有效成分为苦参碱和氧化苦参碱,具有抗炎、镇痛、解热、镇静、抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用^[2]。

癣宁搽剂由苦参、土荆皮、关黄柏、白鲜皮及樟脑等多味药组成,具有清热除湿、杀虫止痒、抗真菌的功效,主要用于皮肤瘙痒等皮肤癣症。其中苦参碱与氧化苦参碱是其主要的药效成分。文献报道对苦参碱和氧化苦参碱的测定方法多为高效液相色谱法^[3]、毛细管电泳法^[4]、气相色谱法^[5]及薄层扫描法^[6],但采用超高效液相色谱串联质谱法同时测定癣宁搽剂中的苦参碱和氧化苦参碱这 2 种物质含量的分析方法尚未见有报道。

液相色谱-质谱联用技术具有专属灵敏、快速等特点,是中药成分分析中定性和定量分析的有力工具^[7-11],超高效液相色谱是一种新的液相色谱技术,更适合药物复方制剂复杂样品的分析^[12-13],本文建立了色谱质谱联用法同时测定这 2 种物质含量的分析方法,已成功地用于实际样品的分析。

1 材料

1290 Infinity LC System, 6460 Triple Quad 型 LC-MS(美国 Agilent 公司), Synthesis A10TM 型超纯水系统(美国 Millipore 公司), Eppendorf Centrifuge 5810R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), KQ2200DV 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), ME 215S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, Fisher 公司), 对照品苦参碱、氧化苦参碱(中国药品生物制品检定所), 实验用水为超纯水, 癣宁搽剂(广西盈康药业有限公司, 批号分别为 120804, 120705, 120708)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm,

1.8 μ m); 以含甲醇(A)-0.1% 甲酸的水(B)为流动相, 梯度洗脱程序: 0 ~ 5 min, 95% ~ 70% B; 5 ~ 6 min, 70% ~ 0% B; 6.0 ~ 8.0 min, 0% B; 8.0 ~ 10 min, 0% ~ 95% B; 10 ~ 12 min, 95% B, 流速 0.30 mL \cdot min⁻¹。

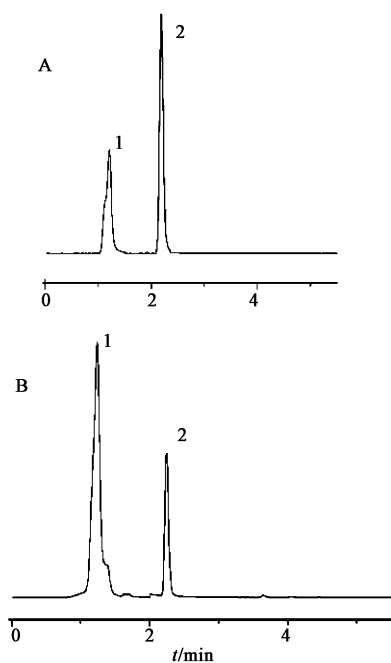
2.2 质谱条件 采用电喷雾电离源(ESI)正离子模式, 多重反应检测模式(MRM 模式), 苦参碱与氧化苦参碱 m/z 分别选择 249.1/148.1, 265.1/205.1 为特征离子对。雾化气氮气, 压力 2.8×10^5 Pa; 鞘气氮气, 温度 360 $^{\circ}$ C, 流速 12 L \cdot min⁻¹。干燥气氮气, 温度 350 $^{\circ}$ C, 流速 10 L \cdot min⁻¹。毛细管的电压 4 000 V, 喷嘴电压 0 V。裂解电压, 苦参碱 130 V, 氧化苦参碱 110 V; 碰撞电压, 苦参碱 45 V, 氧化苦参碱 35 V。

2.3 对照品储备液 准确称取苦参碱、氧化苦参碱对照品各 10.0 mg, 分别用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 配成 1.00 g \cdot L⁻¹ 储备液, 于 4 $^{\circ}$ C 下保存, 使用前用甲醇稀释到所需的浓度。

2.4 供试品溶液 准确量取癣宁搽剂 1 mL, 置于 1.5 mL 的 EP 管中, 于 12 000 r \cdot min⁻¹ 下离心 10 min, 将上清液置于另一个 1.5 mL 的 EP 管中, 用甲醇稀释 500 倍, 经 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤, 即为供试样品, 进样 1 μ L, 结果见图 1。

2.5 线性关系及检出限 精密吸取 2 种对照品储备液, 甲醇溶液稀释, 配制一系列不同质量浓度的对照品溶液, 混合, 在优化的实验条件下测定, 重复 3 次。以被测组分质量浓度为横坐标, 峰面积的平均值为纵坐标进行线性回归, 以信噪比(S/N)等于 3 为标准, 测得 2 种待测组分的检出限, 见表 1, 从表中可看出, 各化合物的响应值与浓度间均呈现良好的线性关系。

2.6 精密度试验 取同一批次待测样品, 按 2.4 项



1. 苦参碱;2. 氧化苦参碱

图1 对照品(A)和样品(B)的MRM

表1 2种组分的线性方程、相关系数、线性范围及检出限

化合物	线性方程	r	线性范围 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	检出限 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
苦参碱	$Y = 2.7 \times 10^5 X + 750.53$	0.999 8	0.000 5 ~ 0.6	0.2
氧化苦参碱	$Y = 4.3 \times 10^5 X + 985.42$	0.999 9	0.000 4 ~ 0.5	0.2

下方法制备,在优化的实验条件下连续进样6次测定,RSD 0.81% ~ 1.5%,表明该方法有较好的精密度。

2.7 稳定性 取同一批次样品,按2.4项下的方法制备,在优化后的实验条件下,分别于0,2,4,6,8,10 h进样测定,RSD 1.2% ~ 1.9%,结果表明供试品溶液在10 h内稳定。

2.8 重复性 同一批次待测样品随机取6份,按2.4项下的方法制备,在优化的实验条件下分析,RSD 1.2% ~ 2.5%,表明供试样品重复性良好

2.9 加样回收率试验 精密量取已知含量(苦参碱 $43.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,氧化苦参碱 $29.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)样品1 mL共9份,每组3份,按2.4项下的方法制备,将供试样品稀释500倍来进行试验,加入高、中、低3个质量的混合对照品。在最优化实验条件下分析。见表2。

2.10 样品分析 分别精密称取不同批次的样品,按2.4项下的方法制备,按上述优化好的条件进行测定,计算得到样品中2种组分的含量,结果见表3。

表2 2种组分在样品中的加标回收率($n=3$)

样品	样品值 / μg	加入值 / μg	测得值 / μg	回收率 /%	RSD /%
苦参碱	0.086 8	0.040	0.125 0	98.6	1.5
		0.080	0.161 0	95.8	1.5
		0.120	0.201 0	97.1	1.2
氧化苦参碱	0.015 9	0.008	0.023 1	96.7	1.5
		0.015	0.030 2	97.7	1.9
		0.020	0.034 8	96.9	1.5

表3 麝宁搽剂中苦参碱、氧化苦参碱测定 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

批次	苦参碱	氧化苦参碱
120804	43.4	29.5
120705	43.2	29.4
120708	43.9	29.8

3 讨论

3.1 色谱条件的优化 考察了甲醇-水和乙腈-水流动相体系,结果表明使用甲醇-水体系时灵敏度高,且分离效果更好。流动相中不添加甲酸时,苦参碱与氧化苦参碱二个物质峰有严重的拖尾,在此基础上,进一步比较2种物质在不同浓度甲酸水(0.1%,0.2%,0.3%,0.4%)条件下的灵敏度,结果表明0.1%甲酸水时灵敏度最高。

3.2 质谱条件的优化 对比了正离子和负离子检测模式,发现在实验条件下采用正离子模式检测各物质的检测灵敏度较高。在MRM模式下,对选定的各待测物的母离子和定量离子进行各种参数的优化,结果见2.2项所述。

3.3 色谱与质谱行为 在选定的色谱质谱条件下,被测组分间可获得良好的分离,色谱图见1。根据峰的保留时间及质谱信息进行定性,二级质谱特征离子图谱见图2。从图2中,可以看出苦参碱与氧化苦参碱的分子离子峰均为 $[M+H]^+$;从该图中选出各物质响应最强且稳定的子离子作为定量离子,分别对苦参碱 m/z 148.1,氧化苦参碱 m/z 205.1的碎片离子进行监测。在采用MRM正离子模式进行LC-MS-MS分析时,苦参碱与氧化苦参碱 m/z 分别选择249.1/148.1、265.1/205.1为特征离子对。

4 结论

采用UPLC-MS-MS技术建立了同时测定麝宁搽剂中的苦参碱与氧化苦参碱2种药效成分含量的分析方法。实验结果表明,该方法灵敏度高、定量能力强、准确度高、快速、简单。该方法的建立有利于

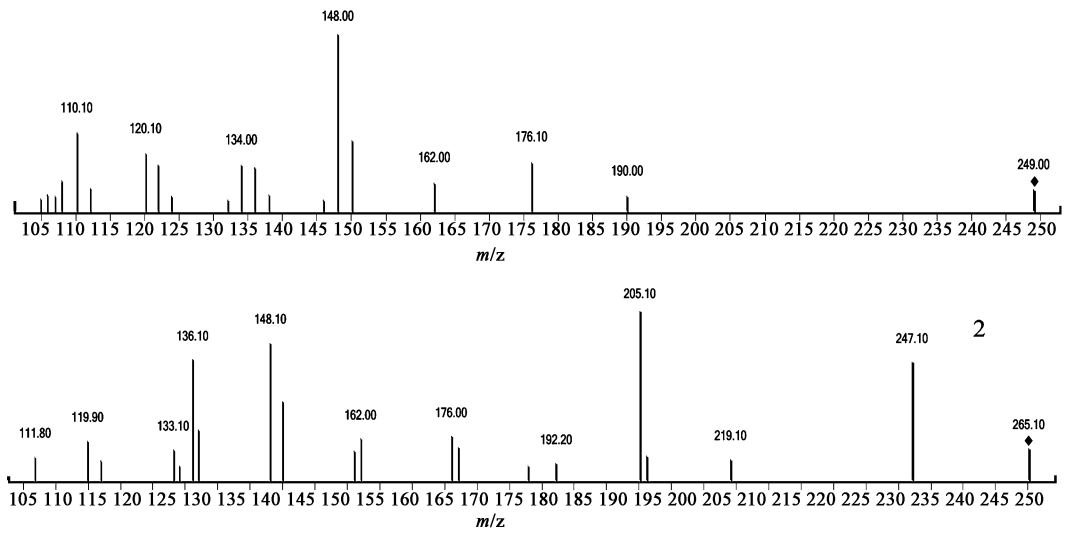


图 2 2 种标准品的二级质谱图

进一步完善麝香搽剂及其类方的质量控制及药代动力学、药物疗效等相关研究。

[参考文献]

[1] 王俊学, 王国俊. 苦参碱及氧化苦参碱的药理作用及临床应用[J]. 肝脏, 2000, 5(2): 116.

[2] 罗明, 贺平, 吴孟超, 等. 高效毛细管电泳法测定苦参碱和氧化苦参碱[J]. 中草药, 1999, 30(4): 261.

[3] 田娟, 王智民, 王维皓. HPLC 测定苦参药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 23.

[4] 张国庆, 吕磊, 赵亮, 等. 优化的高效毛细管电泳法测定肝力保胶囊中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(1): 108.

[5] 侯伟雄, 陈静君, 李思华. 气相色谱法测定妇炎平泡腾片中苦参碱的含量[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(3): 254.

[6] 毛艳, 贺金华, 黄华, 等. 苦豆子片定性定量方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 81.

[7] 胡紫艳, 陈云, 孙莉莉, 等. LC-MS-MS 法测定比格犬

血浆中的磷酸可待因[J]. 华西药理学杂志, 2012, 27(4): 428.

[8] 陈佩东, 徐丹洋, 李芳, 等. UPLC-MS 法分析黄芩炮制前后化学成分变化[J]. 中成药, 2012, 35(4): 784.

[9] 覃莎, 王锦, 徐远金. 超高效液相色谱-串联质谱同时测定加味左金丸中的 9 种有效成分[J]. 色谱, 2012, 30(11): 1153.

[10] 侯宏卫, 熊巍, 郜娜, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定尿液中的 4 种巯基尿酸[J]. 色谱, 2011, 29(1): 31.

[11] 张子建, 孙冬晓, 王婧, 等. LC-MS-MS 法同时测定口炎清颗粒中 8 种成分[J]. 中成药, 2013, 35(5): 952.

[12] 张亚中. 基于超高效液相-四级杆-飞行时间串联质谱的白花蛇舌草注射液主成分分析[J]. 中草药, 2013, 44(7): 829.

[13] 赵燕华, 林妮妮, 郭磊, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-质谱联用技术检测大鼠血浆中 T-2 毒素及其主要代谢产物[J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1852.

[责任编辑 顾雪竹]