

超高效液相色谱-串联质谱法分析贝母药材中5种生物碱

王文文¹, 杨飞¹, 杨中¹, 范蕊¹, 李芳¹, 曹雪琴^{1,2*}

(1. 新疆维吾尔自治区分析测试研究院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院 新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要:建立了贝母药材中贝母辛、西贝母碱、贝母素乙、贝母素甲和西贝母碱苷的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法。样品经碱化甲醇-三氯甲烷提取,用Acquity UPLC BEH C₁₈色谱柱分离,乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相梯度洗脱,多反应监测(MRM)模式检测,外标法定量。结果表明,5种生物碱在0.000 5~0.05 mg/L范围内线性良好($r > 0.999$),在1.0、2.5、5.0 mg/kg加标水平下,回收率为78.6%~93.1%,相对标准偏差不大于8.6%。5种生物碱的检出限(LOD)为0.03 mg/kg,定量下限(LOQ)为0.1 mg/kg。该方法操作简便,灵敏度高,准确可靠,适用于贝母中上述5种生物碱的同时测定。

关键词: 贝母; 生物碱; 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)

中图分类号: O657.7; R914.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2019)04-0461-05

Determination of 5 Alkaloids in Fritillaria by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WANG Wen-wen¹, YANG Fei¹, YANG Zhong¹, FAN Rui¹, LI Fang¹, CAO Xue-qin^{1,2*}

(1. Xinjiang Uygur Autonomous Region Academy of Instrumental Analysis, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China)

Abstract: A method of ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed for the simultaneous determination of five alkaloids, including peimisine, sipeimine, peiminine, peimine and sipeimine-3 β -D-glucoside in Fritillaria. Samples were extracted with alkaline methanol-chloroform, and separated on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column using acetonitrile solution containing 0.1% formic acid as mobile phase by gradient elution. The target compounds were determined by UPLC-MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) mode, and then quantified by external standard method. The calibration curves showed good linearities in the range of 0.000 5-0.05 mg/L with correlation coefficients (r) greater than 0.999. Recoveries for the five alkaloids at three spiked levels (1.0, 2.5, 5.0 mg/kg) ranged from 78.6% to 93.1%, with relative standard deviations (RSD) not more than 8.6%. The limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) were 0.03 mg/kg and 0.1 mg/kg, respectively. The established method was simple, sensitive, accurate and reliable, and could be applied in the simultaneous determination of the five alkaloids in Fritillaria.

Key words: Fritillaria; alkaloid; ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

贝母属于百合科(Liliaceae)贝母属(Fritillaria)多种植物的干燥鳞茎,是中国、日本和土耳其传统民间药物的原材料,临床上常用于止咳化痰。2015版《中国药典》共收载川贝母、平贝母、浙贝母、伊贝母、湖北贝母5种贝母^[1]。其中以浙贝母和川贝母在临床上应用最为广泛^[2]。贝母属植物中的化学成分可分为水溶性非生物碱类和生物碱类^[3]。生物碱类为甾体生物碱,是贝母类药物的指标性成分,其含量和结构类型在不同的贝母属中也有所不同^[4]。如:浙贝母的主要药效成分为贝母素甲和贝母素

收稿日期: 2018-09-20; 修回日期: 2018-11-12

基金项目: 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(KYGY2016198)

* 通讯作者: 曹雪琴, 在读博士, 助理研究员, 研究方向: 食品安全检测与天然产物, E-mail: caoxueqin8095@163.com

乙, 伊贝母的主要药效成分为西贝母碱苷和西贝母碱。根据结构类型, 甾体生物碱又分为甾体生物碱和异甾体生物碱^[5]。川贝母、伊贝母、浙贝母的主要成分为异甾体生物碱, 湖北贝母和平贝母的主要成分为甾体生物碱^[6-7]。现代药理学研究证明, 贝母中生物碱具有止咳、抗炎、祛痰、抗胆碱活性等药理活性, 其单体成分为贝母辛、西贝母碱、贝母素乙、贝母素甲和西贝母碱苷等^[8-11]。上述5种生物碱是贝母药材的指示性成分, 也是贝母药材药效评价和质量控制的依据。

目前生物碱的测定方法主要有比色法、两相滴定法、非水滴定法、薄层色谱法、高效液相色谱-蒸发光散射器(HPLC-ELSD)法^[12-14]等。2015版药典中, 分别采用紫外分光光度法测定川贝母中西贝母以及平贝母中贝母素乙; HPLC-ELSD法测定伊贝母中西贝母碱、西贝母碱苷, 浙贝母中贝母素甲、贝母素乙, 以及湖北贝母中贝母素乙。刘玉明等^[15]采用HPLC-ELSD法同时测定新疆贝母中贝母辛和贝母素乙含量。由于贝母中的生物碱对紫外吸收很弱, 因此文献多采用HPLC-ELSD法, 但该法灵敏度较低, 干扰因素较多^[16-22]。部分研究者采用液相色谱-串联质谱法、气相色谱法测定贝母中的生物碱。Zhou等^[23]采用液相色谱-电喷雾四极杆飞行时间串联质谱法(LC-ESI-QTOF-MS/MS)可分析贝母属中41种生物碱。Li等^[24]采用气相色谱法测定贝母中7种生物碱的活性。

目前文献报道中多以单种贝母中主要药效成分的同时测定为主, 对于不同品种贝母中西贝母碱、西贝母碱苷、贝母素甲、贝母素乙和贝母辛5种药效成分的同时测定鲜有报道。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法测定了伊贝母、川贝母、浙贝母中上述5种生物碱, 以期对不同品种贝母中此5种有效成分的同时测定提供简便方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters Xevo TQ-MS型超高效液相色谱-串联质谱仪(美国Waters公司), 配有电喷雾离子源; Milli-Q超纯水器(美国Millipore公司); 高速离心机(德国Sigma公司); 涡旋混合器(德国IKA公司)。

贝母辛、西贝母碱、贝母素乙、贝母素甲和西贝母碱苷均为对照品, 纯度均 $\geq 98\%$, 由中国食品药品检定所提供; 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国Merck公司); 三氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲酸(色谱纯, 美国Tedia公司); 实验用水由Milli-Q超纯水系统制备。实验用贝母药材(包括伊贝母、川贝母、浙贝母)购自中药店。

1.2 标准溶液配制

分别精密称取5种对照品各10.0 mg, 用甲醇溶解并定容至50.00 mL, 配制成0.20 mg/mL的标准储备溶液, 储存于棕色玻璃瓶中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。用初始流动相将标准储备溶液配制成适当质量浓度的混合标准工作溶液, 现用现配。

1.3 色谱与质谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量: 3.0 μL ; 流动相: A为乙腈, B为0.1%甲酸溶液; 洗脱程序: 0~2.0 min, 5%~55% A; 2.0~4.5 min, 55%~95% A; 4.5~6.0 min, 95% A; 6.0~8.0 min, 95%~5% A。

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(MRM); 毛细管电压: 2.8 kV; 离子源温度: $150\text{ }^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气(N_2)温度: $500\text{ }^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气流量: 1 000 L/h; 锥孔气流量: 50 L/h; 碰撞气(Ar)流量: 2.5 L/h。

表1 5种化合物的质谱参数
Table 1 MS parameters of 5 compounds

Analyte	Parent ion(m/z)	Product ion(m/z)	Cone voltage(V)	Collision energy(eV)
Peimisine(贝母辛)	428.4	109.2*, 114.1	70	26, 22
Sipeimine(西贝母碱)	430.4	412.4*, 138.1	44	48, 33
Peiminine(贝母素乙)	430.3	412.4*, 396.4	68	54, 30
Peimine(贝母素甲)	432.4	112.2*, 414.6	74	28, 25
Sipeimine-3 β -D-glucoside(西贝母碱苷)	592.4	138.1*, 96.0	52	74, 62

* quantitative ion

1.4 样品前处理

贝母药材用研钵磨成粉末后过4号筛(孔径为 $250 \pm 9.9 \mu\text{m}$), 取样品粉末约1.0 g, 精密称定, 置于150 mL锥形瓶中, 加1 mL氨水浸润1 h, 精密加入25 mL三氯甲烷-甲醇(4:1, 体积比)混合溶液, 混匀, 称重。置于85 °C水浴中索氏抽提加热回流2 h, 冷却, 用三氯甲烷-甲醇(4:1)补重, 过滤, 取5.0 mL滤液于40 °C旋转蒸发至干, 用甲醇定容至5.0 mL。经0.22 μm 微孔滤膜过滤, 进样分析。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

2.1.1 质谱条件的优化 在一级质谱全扫描模式下同时采集正、负离子信号, 结果发现目标物在正离子模式下的响应值较好, 特征母离子均为 $[M+H]^+$ 。在正离子监测模式下, 分别对毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量和选择离子等质谱参数进行优化, 选取所得丰度较高的两个子离子作为特征离子。然后在子离子扫描模式下, 选择响应最高的子离子作为定量离子, 响应次高的子离子作为定性离子, 并在MRM模式下对目标物的碰撞能量进行优化。5种目标物的质谱参数见表1。

2.1.2 色谱条件的优化 采用UPLC常用的BEH C_{18} 色谱柱, 考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、甲醇-0.1%甲酸溶液作为流动相对色谱分离和质谱电离的影响。结果发现, 采用甲醇-水、乙腈-水作为流动相对信号强度的影响不大, 但乙腈作为流动相时目标化合物的峰形更尖锐, 并且在流动相中添加少量甲酸, 能提高目标化合物的离子化效率, 增强信号强度, 得到较好的峰形。因此选用乙腈-0.1%甲酸溶液作为流动相。5种化合物的MRM色谱图如图1所示。

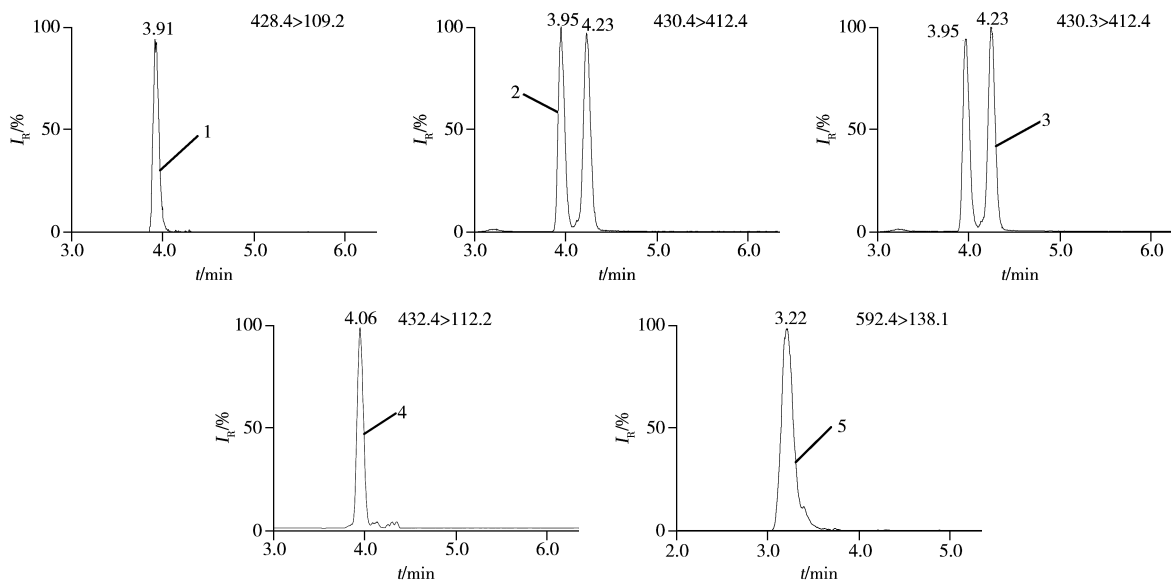


图1 5种化合物的MRM色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of five compounds

1: peimisine, 2: sipeimine, 3: peimine, 4: peimine, 5: sipeimine-3 β -D-glucoside

2.1.3 样品预处理条件的优化 贝母中生物碱的提取方法主要有溶剂提取法、煎煮法、浸渍法、渗漉法、回流法等^[25]。考察了本实验室常用的浸渍法和索氏抽提法的提取效果。结果表明, 提取率随着提取时间的延长而升高, 提取时间为2 h时, 索氏抽提法的提取率达到最高(为0.05%), 此时浸渍法的提取率为0.03%。延长浸渍法的提取时间和增加溶剂用量可达到与索氏抽提法相近的提取率, 但浸渍时间较长, 溶剂用量相对较大, 因此选用索氏抽提法。

2.2 样品的稳定性

取供试样品和20 $\mu\text{g/L}$ 的混合对照品溶液分别于0、4、8、10、12、24 h进样测定, 进样量为3.0 μL 。结果表明, 供试样品和对照品在24 h内具有良好的稳定性, 相对标准偏差(RSD)均不大于1.3%。

2.3 线性关系、检出限与定量下限

用初始流动相将1.0 mg/L的混合对照品溶液稀释至质量浓度为0.000 5、0.001、0.005、0.01、

0.05 mg/L, 采用本方法进行测定, 以对照品溶液的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归。采用对照品溶液, 以特征定量离子对色谱峰的信噪比(S/N) ≥ 3 作为检出限(LOD), $S/N \geq 10$ 作为定量下限(LOQ)。结果表明, 5种生物碱均在0.000 5~0.05 mg/L范围内线性关系良好, 相关系数(r)大于0.999, LOD为0.03 mg/kg, LOQ为0.1 mg/kg(见表2)。

表2 5种生物碱的线性方程、相关系数(r)、检出限、定量下限、加标回收率和相对标准偏差($n=6$)
Table 2 Regression equations, correlation coefficients(r), LODs, LOQs, recoveries and RSDs of 5 alkaloids($n=6$)

Analyte	Regression equation	r	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Added (mg/kg)	Recovery(%)	RSD(%)
Peimisine	$Y=870.15X-103.45$	0.999 5	0.03	0.1	1.0, 2.5, 5.0	80.2, 85.6, 90.1	8.2, 7.9, 6.1
Sipeimine	$Y=8\ 672.1X+19\ 106$	0.999 8	0.03	0.1	1.0, 2.5, 5.0	79.1, 88.3, 92.3	8.1, 7.3, 5.9
Peiminine	$Y=1\ 676.3X+6\ 576.1$	0.999 1	0.03	0.1	1.0, 2.5, 5.0	81.3, 89.2, 93.1	8.3, 7.6, 6.3
Peimine	$Y=807.65X+992.97$	0.999 8	0.03	0.1	1.0, 2.5, 5.0	78.6, 90.3, 92.8	8.4, 7.1, 5.5
Sipeimine-3 β -D-glucoside	$Y=971.29X+3\ 610.4$	0.999 4	0.03	0.1	1.0, 2.5, 5.0	81.2, 84.6, 91.4	8.6, 8.2, 6.3

2.4 回收率与相对标准偏差

取已知含量的川贝母1号样品3份, 分别添加1.0、2.5、5.0 mg/kg 3个浓度水平的混合对照品溶液, 采用本方法进行前处理和进样分析($n=6$)。由表2可知, 5种生物碱的回收率为78.6%~93.1%, RSD不大于8.6%, 说明该方法的精密度和准确度较高。

2.5 实际样品的检测

采用建立的方法分别对9批贝母药材进行测定。由表3可知, 不同品种贝母中5种生物碱的含量差异较大。贝母辛在伊贝母中含量总体相对较高, 川贝母中次之。西贝母碱在川贝母2号样品中含量最高, 浙贝母中则未检出。贝母素乙在伊贝母和川贝母中均未检出; 贝母素甲在浙贝母中含量最高, 川贝母中未检出。西贝母碱昔在伊贝母中含量最高, 浙贝母中未检出。其中西贝母碱昔的含量多数高于其他4种生物碱。购自不同药店的同种贝母中生物碱含量也略有差别, 这可能与贝母产地有关。

表3 贝母药材中5种生物碱的含量
Table 3 Contents of five alkaloids in Fritillaria samples $w/(mg \cdot kg^{-1})$

Sample	Peimisine	Sipeimine	Peiminine	Peimine	Sipeimine-3 β -D-glucoside
Fritillariae Pallidiflorae Bulbus No. 1(伊贝母1号)	105	273	-*	18.0	2.55×10^3
Fritillariae Pallidiflorae Bulbus No. 2(伊贝母2号)	98.1	181	-	10.2	3.41×10^3
Fritillariae Pallidiflorae Bulbus No. 3(伊贝母3号)	37.3	221	-	-	5.60×10^3
Fritillariae Cirrhosae Bulbus No. 1(川贝母1号)	12.5	250	-	-	-
Fritillariae Cirrhosae Bulbus No. 2(川贝母2号)	53.1	600	-	-	300
Fritillariae Cirrhosae Bulbus No. 3(川贝母3号)	32.4	180	-	-	110
Fritillariae Thunbergii Bulbus No. 1(浙贝母1号)	-	-	254	541	-
Fritillariae Thunbergii Bulbus No. 2(浙贝母2号)	7.08	-	85	245	-
Fritillariae Thunbergii Bulbus No. 3(浙贝母3号)	10.0	-	112	365	-

* no detected

3 结论

本文建立了同时测定贝母药材中贝母辛、西贝母碱、贝母素乙、贝母素甲和西贝母碱昔的超高效液相色谱-串联质谱方法。在优化实验条件下, 上述5种生物碱在0.000 5~0.05 mg/L范围内线性良好, 检出限均为0.03 mg/kg, 定量下限均为0.1 mg/kg。本方法简便快捷, 灵敏度高, 可以满足贝母药材中此5种成分的同时检测要求。

参考文献:

- [1] State Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part I)*. Beijing: China Medical Science and Technology Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部). 北京: 中国医药科技出版社), 2005.
- [2] You Y. *Jiangsu J. Tradit. Chin. Med.* (游燕. 江苏中医药), 2010, 42(2): 57-58.

- [3] Cao X W. *Studies on the Chemical Constituents from the Bulbus Fritillariae Cirrhosae and Quality Assessment of Fritillaria Species*. Beijing: Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences(曹新伟. 川贝母的化学成分研究与贝母属药用植物质量评价. 北京: 中国协和医科大学), **2008**.
- [4] Lin G, Li P, Li S L, Chan S W. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 935(1): 321-338.
- [5] Xiao P G, Jiang Y, Li P, Luo Y B, Liu Y. *Acta Phytotaxonomica Sinica*(肖培根, 姜艳, 李萍, 罗毅波, 刘勇. 植物分类学报), **2007**, (4): 473-487.
- [6] Zhang P G. *Study on Active Ingredients and Histochemistry of Eight Medicinal Plants of Fritillaria L. from Xinjiang, China*. Urumqi: Xinjiang Medical University(张鹏葛. 新疆贝母属8种药用贝母组织化学及活性成分研究. 乌鲁木齐: 新疆医科大学), **2016**.
- [7] Shen L R, Li R H, Wang T L. *Journal of Pharmaceutical Practice*(沈立茹, 李瑞宏, 王太亮. 药学实践杂志), **2016**, 34(4): 351-353.
- [8] Tong Z Y, Yan X Y. *Journal of Military Surgeon in Southwest China*(童志远, 颜晓燕. 西南军医), **2009**, 11(2): 260-261.
- [9] Xu H B, Sun X B, Wen F C, Zhou J H, Ding T, Sun L W, Li Y. *China J. Chin. Mater. Med.* (徐惠波, 孙晓波, 温富春, 周继胡, 丁涛, 孙利雯, 李瑛. 中国中药杂志), **2000**, 25(7): 391-394.
- [10] Li P, Ji H, Xu G J, Xu L S. *J. China Pharm. Univ.* (李萍, 季晖, 徐国钧, 徐珞珊. 中国药科大学学报), **1993**, 24(6): 360-362.
- [11] Yu Y, Zhu Y E. *Chin. Pharm. J.* (俞滢, 朱亚尔. 中国药学杂志), **2006**, 41(13): 1026-1028.
- [12] Hong M, Ma Y, Li X F, Jiang Y J. *China J. Chin. Mater. Med.* (洪梅, 马彧, 李秀芬, 姜元甲. 中国中药杂志), **2006**, 31(12): 1032-1033.
- [13] Jiang Y, Li P. *Chin. J. Pharm. Sci.* (姜艳, 李萍. 中国药学杂志), **2005**, 40(16): 1257-1259.
- [14] Zeng L J, Lin G, Li P. *Tradit. Chin. Med. Clin. Pharmacol.* (曾令杰, 林鸽, 李萍. 中药新药与临床药理), **2003**, 14(1): 37-38.
- [15] Liu Y M, Lu X, Jiang Y H, Liu Q H, Gao J G. *J. Chin. Med. Mater.* (刘玉明, 路熹, 蒋玉虎, 刘庆华, 高继光. 中药材), **2014**, 37(5): 826-828.
- [16] Zhang C L, Li Q Y, Sun G Y. *J. Chin. Med. Mater.* (张春丽, 李秋怡, 孙国英. 中药材), **2009**, 32(8): 1315-1316.
- [17] Shen L R, Pei L, Cao W W, Zhang A B, Li B J. *Central South Pharmacy*(沈立茹, 裴璐, 曹薇薇, 张爱兵, 李保军. 中南药学), **2017**, 15(12): 1765-1767.
- [18] Peng W, Wang L S. *Chinese Pharmacist*(彭玮, 王利斯. 中国药师), **2017**, 20(8): 1486-1488.
- [19] Zeng R X, Liu L L, Chen L H, Zhao Y, Yi W J. *J. Jiangxi College Tradit. Chin. Med.* (曾荣香, 刘丽丽, 陈丽华, 赵益, 衣文娇. 江西中医药大学学报), **2009**, 21(5): 51-52.
- [20] Zhang D J, Zhang A W, Wang L J. *J. Chin. Inst. Food Sci. Technol.* (张东杰, 张爱武, 王丽杰. 中国食品学报), **2009**, 9(2): 194-199.
- [21] Du W F, Jia Y Q, Zhang Y X, Zhang H, Jiang D J, Ge W H. *Chin. J. Pharm. Anal.* (杜伟锋, 贾永强, 张焱新, 张浩, 姜东京, 葛卫红. 药物分析杂志), **2015**, 35(4): 675-678.
- [22] Lin L J, Zhong Y Z, Lei X, Ou B X, Lin H. *J. Guangdong Pharm. Univ.* (林丽君, 钟燕珠, 雷旭, 区炳雄, 林华. 广东药学院学报), **2016**, 32(4): 458-461.
- [23] Zhou J L, Xin G Z, Shi Z Q, Ren M T, Qi L W, Li H J, Li P. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217(45): 7109-7122.
- [24] Li S L, Li P, Lin G, Chan S W, Ho Y P. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 873(2): 221-228.
- [25] Ye Y H, He J, Ying Y B, Zhang E H, Ma Y X, Zhang W X. *J. Gannan Med. Univ.* (叶耀辉, 贺瑾, 应亚宾, 张恩慧, 马越兴, 张文雪. 赣南医学院学报), **2013**, 33(4): 629-634.

(责任编辑: 丁 岩)