

高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定肿节风中异秦皮啶的含量

肿节风为金粟兰科植物草珊瑚(*Sarcandra glabra* Thunb Nakai)的干燥全株。为《中国药典》2000年版一部收载品种。味苦、辛，性平，具清热凉血、活血消斑、祛风通络等功效，用于治疗血热紫斑、紫癜，风湿痹痛，跌打损伤等症。肿节风具有抗菌消炎、抑制流感病毒、抗肿瘤、促进骨折愈合及镇痛等多种活性，临床应用广泛，其主要化学成分为有机酸、倍半萜、黄酮及香豆素类化合物[1]。现行肿节风药材质量标准的含量测定采用高效液相色谱法测定异秦皮啶含量[2]，其它测定方法报道较少。高效液相色谱-质谱联用技术因其检测灵敏度高、选择性好，在药物分析领域得到越来越广泛的应用，本文建立了异秦皮啶的高效液相色谱-电喷雾串联质谱含量测定方法，实验结果表明该方法快速、选择特异性高，检测灵敏度远高于高效液相色谱法。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

API 2000 HPLC-MS/MS联用仪(美国Applied Biosystems公司)，配有ESI(电喷雾电离源)离子源，Analyst 1.3.2数据处理系统；PE200四元梯度泵。色谱柱：Aglient ZORBAX Extend C18柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m)，Milli-Q纯水器；异秦皮啶对照品(批号：110837-200304，含量测定用，中国药品生物制品检定所)，甲醇(Merck，色谱纯)。肿节风药材，购于广州致信药业有限公司，经本校中药鉴定教研室刘传明讲师鉴定为金粟兰科植物草珊瑚*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai的干燥全株。清热消炎宁胶囊(广州敬修堂，批号051205, 051208, 051210)

1.2 HPLC-ESI-MS/MS测定条件

液相色谱条件：流动相为A：乙腈，B：0.1%甲酸水溶液，A：B(35：65，v/v)，流速：300 μ l/min；柱温为室温，紫外检测波长344 nm。

质谱条件：将浓度为0.484 μ g/ml异秦皮啶标准品(M_r 222)进行ESI源正离子(+Q1)质谱扫描(图1)，由图1可见有较强的[M+H]⁺峰及[M+Na]⁺峰，选取一级质谱中信号较强的[M+H]⁺峰(M_r 223)进行子离子扫描，产生稳定的162, 107, 190等系列子离子，以信号最强的223/162为离子对进行MRM方式质谱检测，优化后的MRM条件为：去簇电压DP=44.8V，聚焦电压FP=344.2V，入口电压EP=10V，碰撞能CE=16V，温度TEM=350 $^{\circ}$ C，雾化气Gas1=30psi，辅助气Gas2=40psi。

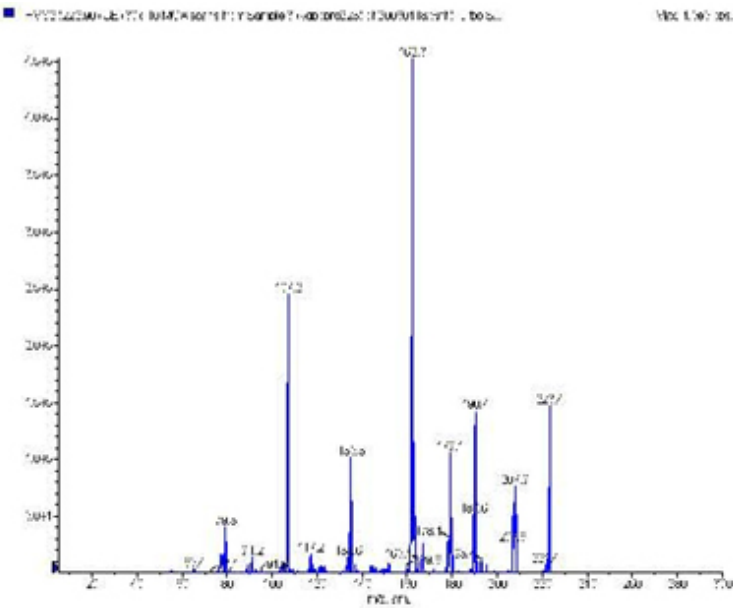
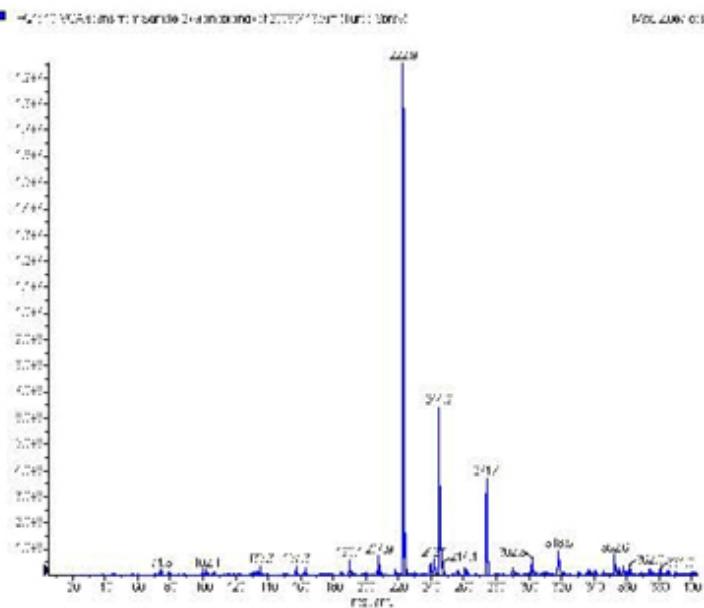


图1 异秦皮啶对照品电喷雾质谱图及子离子扫描图
Fig.1 ESI full scan mass spectrum of isofraxidin and MS2 spectrum

1.3 样品制备

肿节风药材约2g，加水50ml，超声萃取30min，过滤，滤液以乙酸乙酯萃取2次，每次25ml，合并有机相，水浴蒸干，残渣加1ml甲醇溶解，0.45 μ m滤膜过滤，得肿节风药材供试液，稀释至适当浓度，取10 μ l进样。

清热消炎宁胶囊约1g，加三氯甲烷20ml，超声30min，过滤，水浴蒸干，残渣加1ml甲醇溶解，0.45 μ m滤膜过滤，得清热消炎宁胶囊供试液，稀释至适当浓度，取10 μ l进样。

1.4 标准曲线

精密称取异秦皮啶对照品4.84mg，溶于10ml甲醇中配成0.484mg/ml的标准储备液，分别取上液10，20，40，60，80，100，200 μ l用甲醇定容至10ml，得浓度范围484-9680ng/ml的标准液，依次进样，异秦皮啶保留时间为6.60min，将所得峰面积(A)与浓度(C)进行线性回归，得标准曲线方程为 $A=23C+7.06e \times 103$ ($r=0.9996$, C: ng/ml)，线性范围：484-9680 ng/ml。

2 结果

2.1 样品测定

将肿节风药材供试液、清热消炎宁胶囊供试液按1.2项下条件进行检测，将峰面积代入标准曲线方程计算样品浓度，结果清热消炎宁胶囊中异秦皮啶含量为0.1438g/g，肿节风药材中异秦皮啶含量为0.1273g/g。异秦皮啶对照品及供试样品选择离子流图见图2。

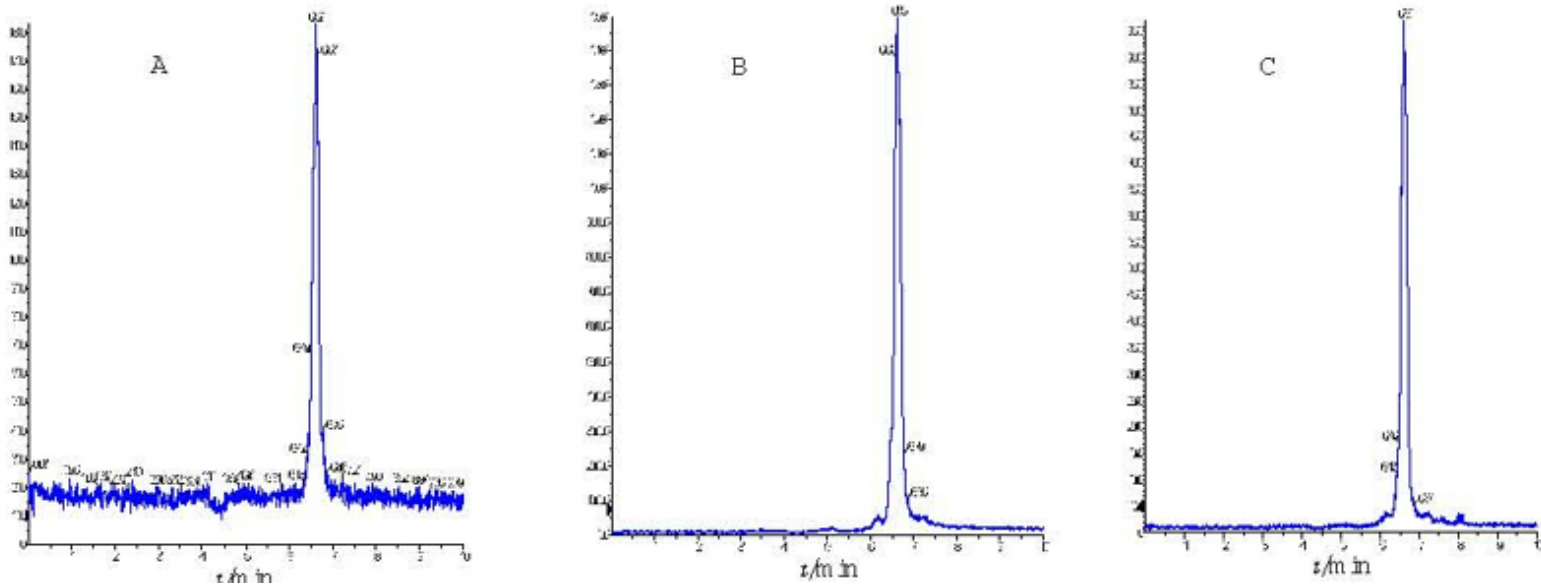


图2 异秦皮啉对照品及供试样品选择离子流图
 Fig.2 Ion chromatogram of the standard and testing samples
 A: Isofraxidin(standard); B: Extract of Qingrexiaoyanning capsules; C: Extract of *Sarcandra glabra*

2.2 精密度考察

将同一样品在一日内0、2、4、6、8 h连续测定5次，峰面积RSD为2.65%，保留时间RSD为0.96%。

2.3 回收率

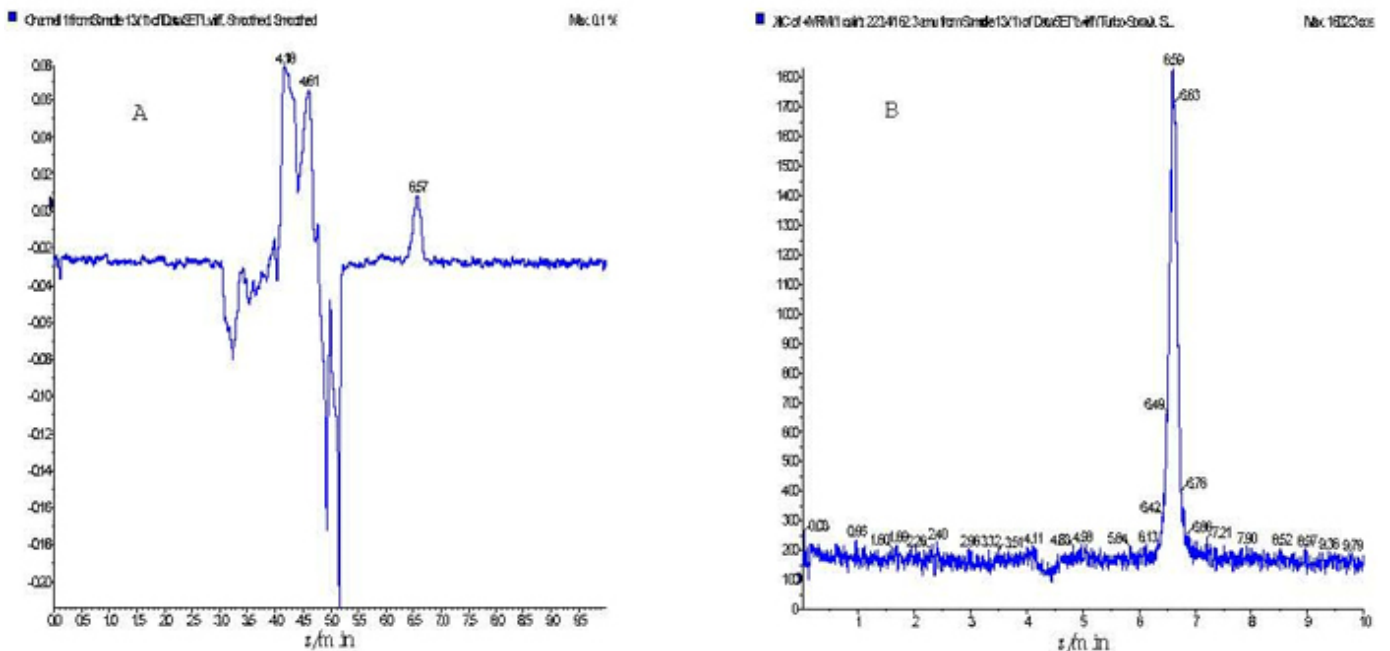
精密量取清热消炎宁胶囊供试液6份，每份100 μ l，分为2组，分别置于2ml量瓶中，第一组各加入异秦皮啉标准液(968ng/ml)1ml，第二组各加入异秦皮啉标准液(3872 ng/ml)1ml，甲醇定容至刻度，按1.2项下条件测定并计算回收率。平均回收率为96.7%，RSD为4.49%(n=6)。

2.4 最低检测限

在所选条件下，以信噪比等于3计，测得异秦皮啉的最低检测限为1ng/ml。

2.5 高效液相色谱-紫外检测图谱与高效液相色谱-质谱联用检测图谱

将标准品与样品进行液质联用分析的同时进行紫外检测，如图3为484ng/ml标准液的离子流图及紫外色谱图。



3 讨论

多反应监测技术是利用LC-MS/MS进行定量分析最常用的技术,对于待测物,在一级质谱中,选定母离子,然后通过碰撞诱导裂解产生该化合物的某一特征子离子,这一特征子离子在二级质谱中得以检测,只有当一级质谱中选定的母离子在二级检测器上检测到了特征子离子时,才能检测到信号,因而特异性很高,对分离条件的要求不高,能排除复杂本底中其它成分的干扰。本文选取异秦皮啶223/162为母离子/子离子对,作为质谱检测时的检测信号,排除了其它信号干扰,峰形好,检测灵敏度高,与紫外检测相比,如图3,484ng/ml标准液进行HPLC/MS/MS检测时信噪比为107.9,而HPLC/UV检测时信噪比<3,HPLC/MS/MS最低检测限达到1ng/ml,HPLC/UV检测已不能检出。因此用HPLC/MS/MS法进行异秦皮啶的含量测定,方法精密度、稳定性好,而且快速、灵敏度高,对于含量较低的样品尤其优势。

参考文献:

- [1]王爱琴,马锡荣. 肿节风有效成分的初步研究[J]. 中草药, 1979, 10(4): 8-9.
- [2]王钢力,姚令文,林瑞超. HPLC法测定肿节风注射液中反丁烯二酸和异秦皮啶的含量[J]. 中草药, 2005, 36(2): 216-7.