

HPLC-ESI-MS 联用法测定保健品中荷叶碱的含量

丁芳林, 彭书练*

(1. 湖南生物机电职业技术学院, 湖南长沙 410127; 2. 湖南省农产品加工研究所, 湖南长沙 410125)

摘要 [目的] 建立含荷叶碱类保健食品中高效液相色谱-电喷雾质谱(HPLC-ESI/MS)检测方法。[方法] 色谱柱为 Spherigel-G 18 柱(5 μm , 4.6 mm \times 250.0 mm); 流动相, A: 0.1% 三乙胺水溶液, B: 乙腈, 梯度洗脱; 检测波长 278 nm。[结果] 荷叶碱在 0.17 ~ 21.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内线性关系良好, $r = 0.9996$; 最低检测限为 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($S/N = 3$); 最低定量限为 0.30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($S/N = 10$); 3 种样品的平均回收率为 96.66% ~ 98.57%, RSD 2.52%。[结论] 该方法具有流动相简单、分析时间短, 且不要对样品进行衍生, 操作简便, 定量准确, 抗干扰能力强等优点。

关键词 HPLC-ESI/MS; 荷叶碱; 保健食品

中图分类号 O657.7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)24-10301-02

Determination of Nuciferine Content in Health Food by HPLC-ESI/MS

DING Fanglin et al (Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha, Hunan 410127)

Abstract [Objective] The aim of this paper was to establish a high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry (HPLC-ESI/MS) method to determine nuciferine. [Method] Column was Spherigel-G 18 column (5 μm , 4.6 \times 250.0 mm). The mobile phases was 0.1% $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ (A)-acetonitrile (B), gradient elution. The UV detector was at 278 nm. [Result] The calibration curves were linear in the ranges 0.17 - 21.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for nuciferine ($r = 0.9996$). The average recovery rate was 96.66% - 98.57%, RSD 2.52% ($n = 3$). Determination minimum was 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($S/N = 3$). Quantification minimum was 0.30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($S/N = 10$). [Conclusion] The proposed method had the advantages of easy operation, without derivation, less analysis time, good precision and accuracy.

Key words HPLC-ESI/MS; Nuciferine; Health food

荷叶是睡莲科莲属植物莲(*Nelumbo nucifera Gaertn.*)的干燥叶。传统医学认为, 荷叶性辛凉, 味苦涩、微咸, 具有清暑利湿、升发清阳、清心去热、止血利尿等作用^[1]。荷叶已广泛应用于各种中成药制剂和降脂保健品中, 目前, 荷叶入药的制剂主要有 5 类, 化湿降脂药: 如血脂宁、脂脉康胶囊、通脉降脂片、荷丹片等; 健胃消食药: 如醒脾开胃颗粒等; 止血药: 如荷叶丸等; 清热消痈药: 如通便消痈胶囊等; 祛暑清热药: 如暑热感冒颗粒等^[2]。

近年来, 以荷叶为主要成分的降脂减肥食疗制品的应用越来越广泛, 现已开发出以荷叶为主要成分的减肥茶和降脂胶囊^[3], 主要用于减肥及冠心病、高血压病、糖尿病、脑血管疾病的预防。荷叶碱的测定方法主要有高效液相色谱法等^[4-5], 随着液相色谱-电喷雾质谱(HPLC-ESI/MS)技术的快速发展, HPLC-ESI/MS 法的高精确度和灵敏性已经在很多应用中得到了证明, 该技术在食品和药品功能成分检测中的应用也越来越广泛^[6-7]。笔者建立了 HPLC-ESI/MS 法测定保健食品和减肥食品中的荷叶碱的灵敏、快捷的方法, 以控制其质量。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 仪器: 高效液相色谱-质谱联用仪(Waters, 美国), 由 Waters 2695 液相分离单元, 2487 双波长紫外检测器, Micross ZQ 2000 质谱组成; 高效液相分离单元包括 1 个低压梯度泵、柱恒温箱、自动进样器和 1 个 20 μl 的定量环; 质谱包括 ESI 电离源和 4 级杆质量分析器, 所有的操作和数据采集通过 Masslynx^{4.0} 工作站控制; KQ 3200 B 超声清洗机(昆山超声仪器有限公司); pH3 酸度计(上海雷磁仪器厂)。

试剂: 荷叶碱标准品(中国药品生物制品检定所); 色谱纯乙腈(Sigma 公司), 三乙胺(上海三浦化工有限公司), 超纯

水, 其他试剂均为分析纯试剂。降脂胶囊、荷叶减肥茶和降脂减肥茶 市场购得。

1.2 实验方法

1.2.1 液相色谱条件。 色谱柱: Spherigel G 18(5 μm , 4.6 mm \times 250.0 mm, 大连江申分离科学科技公司); 流动相, A: 0.1% 三乙胺水溶液(用甲酸调 pH 值为 10.50), B: 乙腈, 进行梯度洗脱, 梯度条件见表 1; 流速: 1 ml/min ; 检测波长: 278 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积为 10 μl 。

表 1 梯度洗脱时间程序

Table 1 Process of gradient elution times

时间 min	0.5% 三乙胺 A	乙腈 B
Time	triethylamine	Acetonitrile
0	0.60	0.40
10	0.20	0.80
13	0.20	0.80
15	0.10	0.90
20	0.60	0.40

1.2.2 质谱条件。 用电喷雾离子化正离子采集模式(ESI⁺), 毛细管电压 3.8 kV, 锥孔电压 25.0 V, 萃取电压 5.0 V, 源温度 105 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气流速 250 L/h, 锥孔反吹气流速 50 L/h; 质谱全扫描范围(m/z) 150 ~ 600 amu, 选择离子记录(SIR) 为 m/z : 296; 由 DAD 流出的溶液经过 3 通阀分流, 以 0.2 ml/min 进入到 MS 电离源。

1.2.3 荷叶碱标准溶液的配制。 取 5.3 ng 荷叶碱标准品用甲醇配成对照溶液于 10 ml 容量瓶中定容, 作为母液。取该溶液逐渐稀释得到最终浓度分别为 0.17、0.53、2.65、5.30、10.60、21.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准系列溶液。每个浓度的样品分析 3 次, 所得色谱峰面积的平均值对浓度作曲线, 得到荷叶碱的回归方程。

1.2.4 样品处理。 取降脂胶囊 10 颗, 去壳、碾碎、混匀, 称取 0.5 g, 精密称定(或减肥茶准确称取 1.0 g)。用 10 ml 甲醇超

作者简介 丁芳林(1965-), 男, 湖南醴陵人, 硕士, 副教授, 从事化学教学及天然产物的提取与分析工作。* 通讯作者, E-mail: www.hifst.com@163.com。

收稿日期 2008-02-19

声提取10 min,离心后取出上清液,残渣再用10 ml 甲醇提取1次,合并提取液,用甲醇将提取液定容于25 ml 容量瓶,取样液过0.45 μm膜,滤液直接进色谱系统分析,进样量为10 μl。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择 在使用水-乙腈,0.1%的甲酸水溶液-乙腈,0.1%的氨水溶液-乙腈,甲醇-水,甲醇-乙酸等流动相组合对荷叶碱进行洗脱,荷叶碱不保留或峰形很不对称,或峰形变宽,或严重拖尾。采用0.1%的三乙胺和乙腈作流动相时,荷叶碱的峰形对称,且保留时间较短。在流动相pH值选择上,考察了pH值9.50、10.00、10.50、11.00和11.30时荷叶碱的SIR响应情况,最后确定pH值为10.50。所以实验选择0.1%三乙胺pH值为10.50)和乙腈作流动相。

2.2 质谱条件的优化 实验比较了ESI正、负离子模式下质谱响应情况,结果表明,在ESI⁺模式下,荷叶碱的质谱响应较好,因此选用ESI⁺模式。其他质谱参数的优化,主要是调节锥孔电压,锥孔电压对被分析物的影响较大,实验考察了锥孔电压分别为10、20、25、30、40、50 V时被分析物的碎片和响应:在较低电压下,被分析物倾向于形成氢化离子[M+H]⁺,而在较高锥孔电压下,被分析物容易碎裂,形成各种碎片离子;随着锥孔电压的增加,质谱响应有一定提高,但当锥孔电压增加到一定程度,质谱响应反而下降,且氢化离子[M+H]⁺消失,仅出现碎片离子,因此实验选用25 V的锥孔电压。进一步对毛细管电压、萃取电压、射频电压、源温度、脱溶剂温度、脱溶剂气流速等进行微小调节,强化被分析物的响应,最后确定质谱参数。

2.3 线性关系和最低检出限、定量限 按照“1.2.3”所述制作荷叶碱的校正曲线,得到线性方程为:Y=14 597 X+761, r=0.9996。结果表明,荷叶碱在0.17~21.20 μg/ml呈良好的线性关系。将标准溶液逐渐稀释,以信噪比S/N=3时的进样量作为检出限,得紫外检测限0.01 μg/ml。以信噪比S/N=10时测得最低定量限为0.30 μg/ml(S/N=10)。

2.4 精密度实验 取2.5 μg/ml对照品溶液,按上述色谱条件测定,每次进样10 μl。重复进样6次,结果峰面积积分值的RSD为0.54%,说明方法的重现性良好。

2.5 稳定性考察 精密吸取按“1.2.4”方法制备的供试品溶液(贮于室温20℃)10 μl,分别在2.5、8、12、21 h进样测定荷叶碱的峰面积。在21 h内其RSD值为2.18%。说明目标物在21 h内稳定。

2.6 回收率的考察 取已知含荷叶碱0.052 ng/g的降脂胶囊,含荷叶碱0.224 ng/g荷叶减肥茶和含荷叶碱0.431 ng/g的“降脂宁颗粒”作标准,加入标准品进行回收实验。每个样品平行处理3份,按照样品测定的方法进行分析,求算平均回收率,求得荷叶碱平均回收率分别为97.28%、96.66%、98.57%(n=3),RSD在1.24%~2.52%。

2.7 标准品的HPLC-ESI/MS分析 荷叶碱的分子式为C₁₉H₂₁NO₂,分子量为295。以流动注射的方式考察了荷叶碱最优的电离条件,在实验条件下,得到了标准品质谱图(图1)和选择离子流图(图2)。荷叶碱的保留时间为12 min左右;图1中m/z 296是荷叶碱分子加氢后形成的准分子离子[M+H]⁺,m/z 265为断裂碳氧键形成的碎片离子。

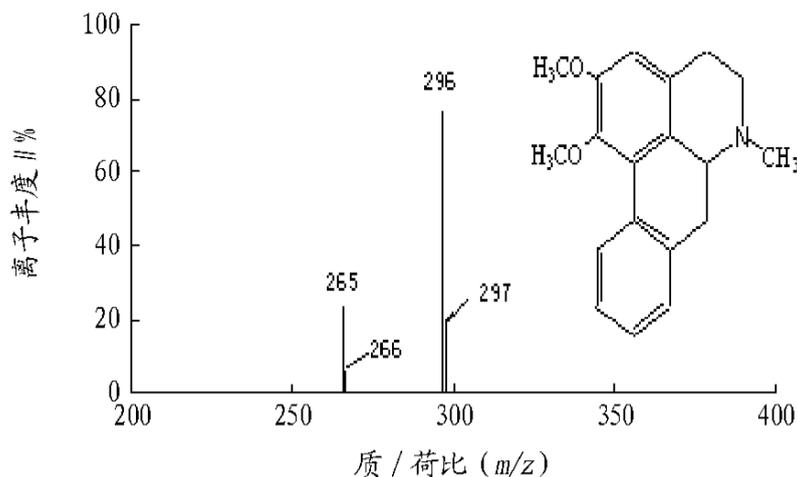


图1 荷叶碱标准品质谱图(锥孔电压为20 V)

Fig.1 Mass spectrogram of nufefine standards (cone voltage was 20 V)

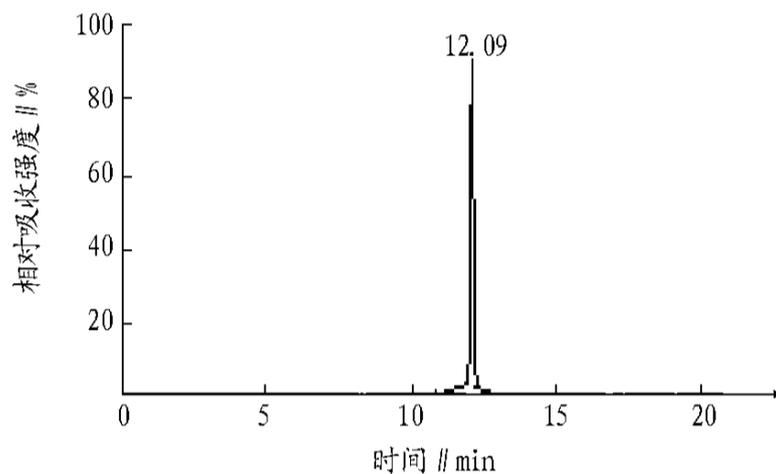


图2 标准样品选择离子流图(SIR)

Fig.2 The selected ion current of standard samples

2.8 样品的测定 按照“1.2.1~1.2.4”条件,测定降脂胶囊、降脂宁颗粒和荷叶减肥茶中荷叶碱的含量,测定结果见表2。所得的样品选择离子流图见图3。

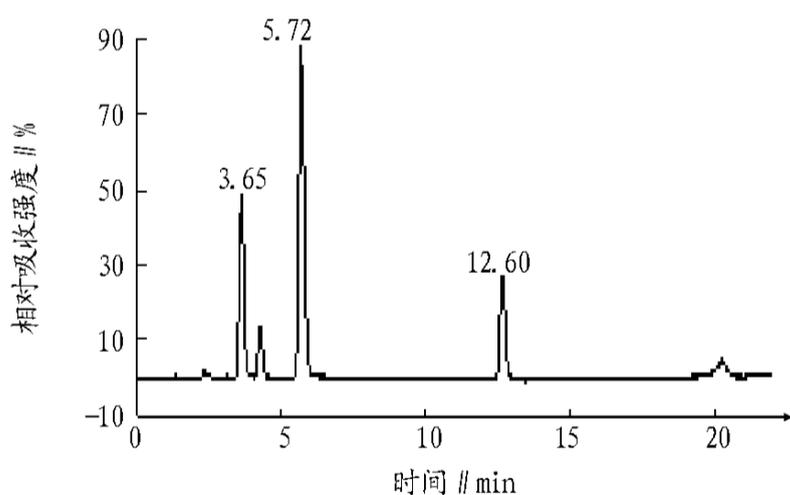


图3 样品降脂宁颗粒选择离子流图(SIR)

Fig.3 The selected ion current of Jangzhining granule samples
表2 3种保健品的荷叶碱含量(n=3)

Table 2 Content of nufefine in three kinds of health products

样品	荷叶碱含量 ng/g	平均值 ng/g	RSD %
Sample	Content of nufefine	Mean	
降脂胶囊	0.052	0.052	1.92
Lipid-lowering capsule	0.051		
荷叶减肥茶	0.053	0.224	2.29
Lotus-leaf fat-reducing tea	0.228		
降脂宁颗粒	0.230	0.431	0.46
Jangzhining tablet	0.433		
	0.429		
	0.431		

杞等共计 12 份材料构成一支; 黑叶麻叶和 9601 构成一支; 宁杞 2 号、白花、宁夏黄叶及 88028 等构成一支。该结

果表明通过 ITS 序列能将不同亲缘关系的宁夏枸杞种质区分开来。

表 2 18 份枸杞属宁夏枸杞资源 ITS 区序列特征

Table 2 The character of ITS sequence of 18 *Lycium barbarum* resources

序列 Sequence	保守位点 % Conserved sites	变异位点 % Variable sites	信息位点 % Information sites	Singleton 位点 % Singleton sites	S/ sv
ITS1	121/ 255(47.5)	134/ 255(52.5)	25/ 255(9.8)	109/ 255(42.7)	37/ 24
ITS2	165/ 225(73.3)	60/ 225(26.7)	2/ 225(0.9)	58/ 225(25.8)	30/ 9
Ttd	286/ 480(59.6)	194/ 480(40.4)	27/ 480(5.6)	167/ 480(34.8)	67/ 33

3 讨论

3.1 18 份宁夏枸杞种质间的遗传多样性 由于 18 份种质同属于宁夏枸杞种, 在遗传多样性鉴定评价过程中, 植物学或农艺性状易受环境和栽培措施的影响不易鉴别, 细胞学性状多态性不丰富, 而同工酶性状有器官特异性且受生长发育阶段的影响, 以致这些方法在评价时都有一定局限性。分子标记方法的出现为生物资源鉴定评价提供了新的途径。该研究利用真核细胞中 18S, 5.8S, 28S RNA 基因的保守区序列, 自行设计引物成功扩增出整个 ITS 区, 并完成了扩增产物的 DNA 碱基序列的测定, 得到 18 份宁夏枸杞种质材料 ITS 区的完整序列。基于 ITS 序列分析得出 18 份种质整个转录间隔区(ITS1 + ITS2) 对位排列后总长度为 480 bp, 共有 194 个变异位点, 占 40.4%, 说明在遗传多态性检测中较形态学标记、同工酶标记表现出一定的优越性。同时根据聚类图可将 18 份种质分为 3 大类群, 可以较为清晰地看出种质间的亲缘关系。上述结果表明 ITS 分子标记可作为研究枸杞不同种质间遗传多样性的方法之一。

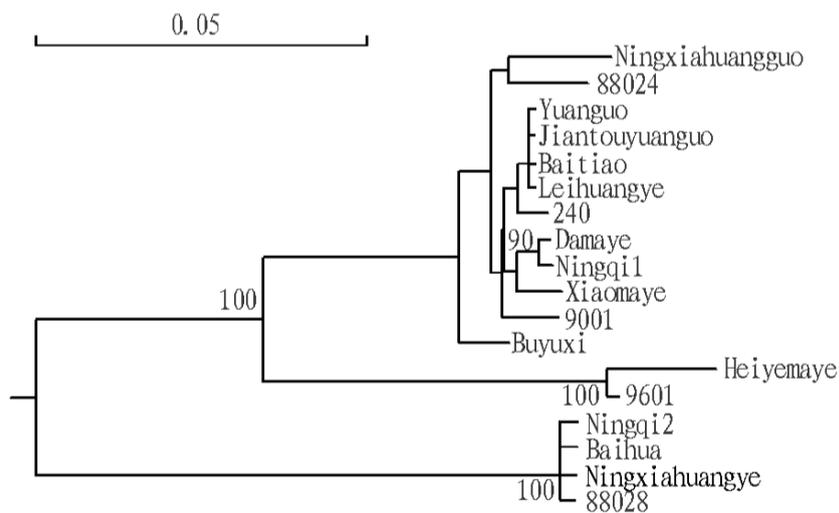


图 1 NJ 聚类图

Fig.1 NJ clustering chart

(上接第 10302 页)

3 结论

采用高效液相色谱-电喷雾质谱联用的方法测定保健食品中荷叶碱的含量, 具有流动相简单、分析时间短, 且不要对样品进行衍生, 操作简便, 定量准确, 抗干扰能力强等优点, 可用于含荷叶碱类保健食品的质量控制。

参考文献

[1] 钟先锋, 黄桂东. 荷叶成分及功能的研究进展[J]. 食品与机械, 2006(7): 138-139.

3.2 18 份宁夏枸杞种质的亲缘关系 由于枸杞种质资源较为丰富、起源驯化途径多样、栽培历史悠久、属内种间(渗透)杂交现象普遍, 加之地方品种本身并无科学命名, 导致品种资源类型多且名称较乱, 因此有必要开展枸杞种质资源的鉴定评价。基于 ITS 序列研究表明, 宁杞 1 号、大麻叶、小麻叶聚在一起, 同时与尖头圆果、圆果、白条、类黄叶自展支持率达到 90%, 很好地证实宁杞 1 号是从传统宁夏枸杞种大麻叶优系中选优得来的事实, 说明 ITS 是研究宁夏枸杞种质材料遗传背景的主要手段之一; 宁杞 1 号、宁杞 2 号等不同品种之间在 ITS 序列之间的差异比较明显, 变异位点较为丰富, 说明基于 ITS 序列差异可以在品种鉴定中给出 DNA 水平的鉴定标准; 9001 是三倍体, 与宁杞 1 号具有亲缘关系, 说明基于 ITS 序列对种质多倍化起源分析是有效的。总之, 该研究结果表明基于 ITS 序列的遗传多样性分析有助于目前较为混乱的枸杞资源的整理及分类, 以加大对该资源的利用及促进其大面积种植。

参考文献

[1] 袁宝财, 达海莉, 李晓瑞. 宁夏枸杞的生物学特性及开发利用前景[J]. 河北林果研究, 2001, 16(2): 151-153.
 [2] 汪小全, 洪德元. 植物分子系统学近五年的研究进展概况[J]. 植物分类学报, 1997, 35(5): 465-480.
 [3] CHENG KT, CHANG HC, HUANG H, et al. RAPD analysis of *Lycium barbarum* medicine in Taiwan market[J]. Bot Bull Acad Sin, 2000, 41: 11.
 [4] SH Z G, AN W, FAN Y F, et al. Preliminary studies on identification of *Lycium* Linn. germplasm resources by rrDNA ITS sequencing[J]. Agricultural Science and Technology, 2008, 9(1): 35-36.
 [5] SH Z G. A new method of identification on edible *Lycium* Linn. Germplasm Resources—rrDNA ITS sequencing[J]. Agricultural Science and Technology, 2008, 9(2): 58-59, 105.

[2] 朱秀萍, 徐翔. 荷叶生物碱研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(6): 459-461.
 [3] 胡榴燕. 荷叶的功能成分提取测定及药用研究进展[J]. 浙江中医杂志, 2006(11): 678-679.
 [4] 范成太, 闫克里, 赵丽, 等. 高效液相色谱法测定降脂宁颗粒中药材荷叶中荷叶碱的含量[J]. 中国药物与临床, 2007(12): 950-951.
 [5] 毛燕妮, 蒋建勤. 高效液相色谱法测定荷叶与荷梗中荷叶碱的含量[J]. 海峡药学, 2007(3): 41-43.
 [6] 郭伟, 张春晖, 周明超. 液相色谱-电喷雾质谱测定肉类中的磺胺类药物[J]. 食品与机械, 2006, 22(4): 84-87.
 [7] 陈光英, 朱国元, 李国英, 等. 苦味叶下珠中多酚类成分的 HPLC-MS/MS 研究[J]. 中成药, 2006, 28(1): 100-101.