

液相色谱-串联质谱法快速测定蛇足石杉中的石杉碱甲

李东芹, 孙玲 (华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要 [目的]利用液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)技术建立一种快速测定蛇足石杉中石杉碱甲含量的分析方法。[方法]采用 Shim-pack VP-ODS(150 L×2.0 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇与 0.1% 乙酸水溶液, 梯度洗脱 15 min, 流速为 0.3 mL/min, 柱温保持在 40 ℃, 在质谱正离子模式下用多反应离子监测(MRM)模式来进行定量测定。[结果]在 4.38~70.00 μg/L 的浓度范围内线性良好($r=0.9989$), 回收率为 96.0%~102.3%, RSD 为 2.18%; 重现性好, 变异系数为 1.50%; 定量检出限为 0.438 μg/L。[结论]该方法快速灵敏、结果准确、重现性好, 对批量检测分析蛇足石杉中石杉碱甲含量有积极的参考意义。

关键词 液相色谱-串联质谱; 快速测定; 石杉碱甲; 蛇足石杉

中图分类号 R 284 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)26-0165-02

Rapid Determination of Huperzine A in *Huperzia serrata* by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

LI Dong-qin, SUN Ling (National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract [Objective] A method for the rapid determination of Huperzine A in *Huperzia serrata* was established by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). [Method] Shimadzu shim-pack VP-ODS column (150 L×2.0 mm, 5 μm) was used, the mobile phases were methanol and 0.1% acetum buffer eluting gradiently in 15 min with total flow rate at 0.3 mL/min. The column temperature was kept at 40 ℃. The huperzine A was detected by using multiple reaction monitoring (MRM) in ESI positive mode of Mass spectrometer. [Result] There was a good linear relationship within the range of 4.38~70.00 μg/L ($r=0.9989$). The recovery was 96.0%~102.3%, with RSD 2.18%. The reproduction quality was well with CV 1.50%. The quantitative determination limit was 0.438 μg/L. [Conclusion] The method is rapid, sensitive, accurate and reproducible. It has positive reference significance value for mass detection and analysis of the content of Huperzine A in *Huperzia serrata*.

Key words HPLC-MS/MS; Rapid analysis; Huperzine A; *Huperzia serrata*

蛇足石杉, 又名千层塔, 为石杉科多年生蕨类植物, 民间多用来治疗跌打损伤、毒蛇咬伤和烧烫伤等。20 世纪 80 年代, 中国医药研究工作者从蛇足石杉中分离出强生物活性的石杉碱甲, 并引发其药用价值的研究高潮^[1]。石杉碱甲是一种高效乙酰胆碱酯酶抑制剂, 具有开发记忆效率的功能。临床用于治疗老年痴呆症具有确切的疗效^[2-3], 还有文献报道可用于重症肌无力的治疗^[4-5]。由于人工合成很难得到纯化学活性的石杉碱甲, 因此从石杉科植物中提取还是其主要来源。目前为止, 石杉中石杉碱甲基本都是用高效液相色谱法^[6-8]来测定, 液质联用法鲜见报道, 有少量血浆中石杉碱甲液质分析的报道^[9-10]。液相色谱法耗时长、试剂用量大、灵敏度低、易受其他物质干扰, 对前处理工作要求较高, 分析误差大。受前人研究的启发^[11-12], 笔者建立了蛇足石杉中石杉碱甲的液相色谱-串联质谱方法, 样品经液相色谱分离后进入质谱仪, 用石杉碱甲的特征离子对 243.2 > 210.1 来进行定量测定, 为批量定量分析石杉碱甲提供了更好的选择。

1 材料与方 法

1.1 仪器 API 4000 Qtrap 串联三重四级杆线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司); LC-20AD 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); 氮吹仪(OA-SYS, N-EVP™ 111 型); Millipore 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试材 甲醇(色谱纯); 超纯水; 石杉碱甲(含量 ≥ 98%, $M_w=242.3$); 乙酸(色谱纯); 1 mL 医用注射器; 0.22 μm 微孔滤头(上海安普)。蛇足石杉采自安徽, 为华中农业大学植科

院姚明镜老师提供。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备。精确称量 0.4 g 左右的样品, 加氨水润湿后用适量体积氯仿萃取 3~4 次, 每次约 8 h。汇总萃取液, 用氮吹仪吹干, 用甲醇溶解后定容到 25 mL。再用 1 mL 医用注射器与 0.22 μm 过滤头过滤后移入自动进样器样品瓶。

1.3.2 标准溶液制备。精密称取石杉碱甲粉末 1.4 mg, 甲醇溶解后定容至 50 mL, 作为标准储备液。取适量的储备液, 用纯甲醇逐步稀释成浓度为 70.000、35.000、17.500、8.750、4.375 μg/L 系列梯度的标准溶液, 依次移入液相色谱自动进样器样品瓶。

1.3.3 定量检测条件。

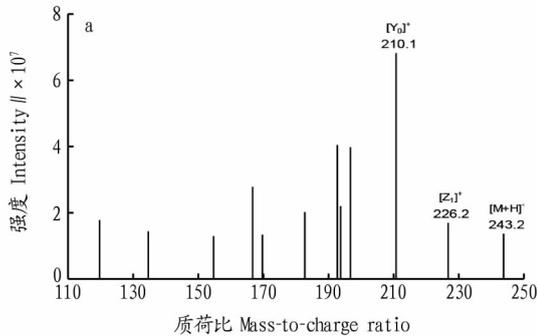
1.3.3.1 色谱条件。岛津 Shim-pack VP-ODS(150 L×2.0 mm, 5 μm) 色谱柱, 样品室温度为室温; 流动相: A 为 0.1% 的乙酸水溶液, B 为甲醇; 流速为 0.3 mL/min。梯度洗脱条件: A:B, 0 min 为 0:100(V/V), 10 min 为 20:80(V/V), 10.01 min 为 0:100(V/V), 15 min 为 0:100(V/V), 柱温箱温度为 40 ℃, 进样量为 10 μL。

1.3.3.2 质谱条件。采用电喷雾(ESI)离子源, 在正离子电离模式下选用多反应离子监测(MRM)扫描模式进行测定。电喷雾电压 5 500 V; 离子源温度 500 ℃; 离子源辅助气 GS1/GS2 气流均为 50 L/h。

2 结果与分析

2.1 质谱解析 将浓度为 100 μg/L 的石杉碱甲标准品通过针泵注射器直接进入质谱分析, 先利用 Q1 全扫描确定石杉碱甲的母离子为 243.2(M+1); 再在一定能量下进行二级质谱分析(子离子扫描), 得到石杉碱甲的碎片离子信息(图

1a);选择丰度较大的子离子 210.1 与母离子 243.2 组成多反应监测(MRM)离子对进行定量分析。为了确保离子对 243.3 > 210.1 灵敏度高与信号稳定,分别对解簇电压(DP)、入口电压(EP)、碰撞能量(CE)和碰撞出口电压(CXP)等质



谱参数进行优化,优化后各参数分别为 DP 为 70 V、EP 为 10 V、CE 为 40 V、CXP 为 13 V。

图 1b 为石杉碱甲在“1.3.3.2”质谱条件下的选择离子流图,其色谱保留时间在 1.46 min。

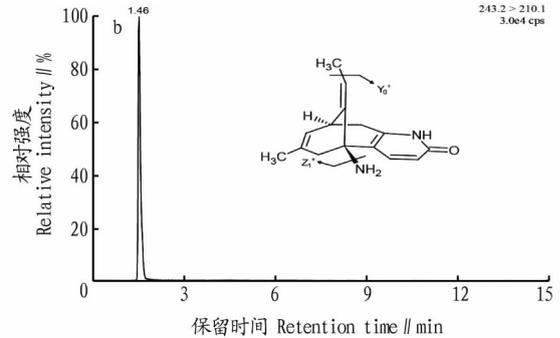


图 1 石杉碱甲的二级质谱图(a)和总离子流图(b)

Fig.1 Secondary mass spectrum(a) and total ion current map(b) of Huperzine A

2.2 标准曲线方程和检出限 将“1.3.2”项配制好的石杉碱甲系列标准溶液按由稀到浓的顺序依次放入自动进样器样品架,在“1.3.3”项试验条件下进行联机分析。以标准溶液浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,进行线性回归分析,得到线性方程为 $y = 11\ 100x + 2\ 490$ ($r = 0.998\ 9$),表明在浓度为 4.375~70.000 $\mu\text{g/L}$ 线性良好。

将标准溶液逐步稀释至 11.750、0.875、0.438、0.146 $\mu\text{g/L}$,在“1.3.3”项试验条件下逐一分析,最终确定该方法的定量检出限为 0.438 $\mu\text{g/L}$,信噪比 S/N 为 10。

2.3 精密度试验 将精确浓度为 17.5 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液,重复进样 5 次,测定结果分别为 18.2、18.1、17.9、17.7、18.4 $\mu\text{g/L}$ 。经计算得 5 次测定结果的变异系数为 1.5%,精密度良好。

2.4 回收率试验 精确称量已知石杉碱甲含量的蛇足石杉样品,分别加入 10、30、50 $\mu\text{g/L}$ 浓度水平的石杉碱甲标准溶液,按“1.3.2”方法进行样品制备,每个浓度进行 3 个样本分析,与标准曲线同时测定,考察样品回收率。结果发现(表 1),在这 3 个浓度下,石杉碱的回收率为 96.0%~102.3%,相对标准偏差(RSD)为 2.18%。

表 1 石杉碱甲的回收率及 RSD

Table 1 The recovery and RSD of Huperzine A

石杉碱甲 质量浓度 Mass concentration of huperzine A $\mu\text{g/L}$	回收率 Recovery // %				RSD %
	样品 1 Sample 1	样品 2 Sample 2	样品 3 Sample 3	平均回收率 Average recovery %	
10	98.9	100.6	102.3	100.6	2.18
30	101.7	98.3	97.7	99.2	
50	99.2	96.7	96.0	97.3	

2.5 方法应用 分别称取蛇足石杉的全株、叶、茎、根,按“1.3.1”项方法进行前处理,在“1.3.3”项试验条件下测定,通

过线性方程分别计算得到其石杉碱甲的含量分别为 5.331 4、1.798 2、0.570 3、0.292 0 $\mu\text{g/g}$ 。

3 小结与讨论

与以往常用的液相色谱检测方法相比,该研究建立的液相色谱-质谱联用法具有分析速度快、灵敏度高、选择性好等特点。它将色谱的高分离能力和质谱的高灵敏检测能力相结合,实现优势互补,因而大大提高了检测的灵敏度和选择性。样品前处理操作简单,试剂用量少,既经济又环保。该方法可为开发和利用蛇足石杉这一药用植物资源提供有力的技术支持和帮助。

参考文献

- [1] 许明,宋新波,张丽娟.石杉碱甲的研究进展[J].药物评价研究,2010,33(6):442-446.
- [2] 陈作毅,张君诚.石杉碱生物合成与代谢途径研究进展[J].中华中医药杂志,2013,28(6):1815-1818.
- [3] 王洪新,王键.石杉碱甲的研究进展[J].中国野生植物资源,2001,20(6):4-7,10.
- [4] 钟开位,张潮林.HPLC 法测定石杉碱甲缓释片中石杉碱甲的含量[J].广东药学院学报,2010,26(1):70-72.
- [5] 余红英,孙远明,杨跃进.中草药蛇足石杉的研究进展[J].中草药,2001,32(3):279-281.
- [6] 江锦花,叶美土.高效液相色谱法测定石杉碱乙含量[J].黑龙江医药,2002,15(6):434-435.
- [7] 顾月华,吴庆庆.高效液相色谱法测定蛇足石杉中石杉碱甲的含量[J].中国药理学通报,2005,21(8):1017-1018.
- [8] 黄静,杨理明,李齐激,等.HPLC 法测定台江产千层塔中的石杉碱甲的含量[J].贵州医药,2007,31(7):644-645.
- [9] 刘骁,李瑞,王小林,等.用高效液相色谱-质谱-质谱法测定小鼠血浆和大脑中的石杉碱甲及药动学[J].复旦学报(医学版),2006,33(2):247-250.
- [10] 李芸霞,蒋学华,兰轲,等.LC-MS/MS 测定人血浆中石杉碱甲的浓度及相对生物利用度[J].中国药理学杂志,2009,44(3):221-225.
- [11] 张敬彩,魏杰,钟虹敏,等.高效液相色谱法定量测定中药千层塔提取物中的石杉碱甲[J].色谱,2013,31(1):79-82.
- [12] WANG M Y, LU J, XU Y T, et al. Role of p-glycoprotein and bcpr in the distribution of huperzine a to the brain in mice[J]. Drug metabolism and pharmacokinetics, 2017, 32(1):64.