

文章编号: 1674-8085(2019)04-0092-04

LC-MS/MS 法测定毛曼陀罗中莨菪碱、东莨菪碱 和山莨菪碱的含量

陈 静¹, 张 凤², 张 锐¹, 李 卿², *范惠珍¹

(1. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西, 宜春 336000; 2. 第二军医大学长征医院药材料, 上海 20003)

摘要: **目的** 建立 LC-MS/MS 测定毛曼陀罗中莨菪碱、东莨菪碱和山莨菪碱含量的方法。**方法** 利用盐酸与浓氨水和三氯甲烷提取毛曼陀罗根部中的生物碱, 以乙腈-(0.05%甲酸)水溶液 = 68: 32 为流动相; Agilent ZORBAX SB-C18 (2.1 mm×100 mm, 3.5 μm) 的色谱柱; 柱温 25 ℃; 流速 0.3 mL/min; 进样量: 2 μL。**结果** 莨菪碱、东莨菪碱和山莨菪碱在分别为 1~200 ng/mL; 1~1000 ng/mL; 1~1000 ng/mL 的范围内有良好的线性关系。线性方程依次为: $Y = 813.8904X + 2165.3000 (r^2 = 0.9922)$; $Y = 714.1221X + 517.4311 (r^2 = 0.9892)$; $Y = 872.9971X + 1024.4247 (r^2 = 0.9952)$; 平均加样回收率分别为 97.17%、97.2%、92.68%, RSD 分别为 1.02%、1.31%、1.41%。通过对 12 批曼陀罗根中莨菪碱、东莨菪碱和山莨菪碱的测定, 其浓度范围分别为 1~20 ng/mL; 1~18 ng/mL; 1~19 ng/mL。**结论** 该方法简单、灵敏度高、稳定性好可用于毛曼陀罗中莨菪碱、东莨菪碱和山莨菪碱含量的测定。

关键词: 莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱、曼陀罗

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2019.04.018

DETERMINATION OF HYOSCYAMINE, SCOPOLAMINE AND ANISODAMINE IN *DATURA INNOXIA* BY LC-MS/MS

CHEN Jing¹, ZHANG Feng², ZHANG Rui¹, LI Qing², *FAN Hui-zhen¹

(1. College of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, China;

2. Department of pharmaceutical Materials, Changzhong Hospital of The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract Objective: To establish a LC-MS/MS method for the determination of hyoscyamine, scopolamine and anisodamine in *Datura innoxia*. **Methods:** The alkaloids were extracted with hydrochloric acid, ammonium hydroxide and chloroform. The chromatographic column was Agilent ZORBAX SB-C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 μm), the moving phase was composed of acetonitrile and 0.05% formic acid solution with the ratio of 68:32, the column temperature was 25 ℃, the flow rate was 0.3 mL / min and the injection amount was 2 μL. **Results:** The linear ranges of hyoscyamine, scopolamine and anisodamine were 1 ng/mL ~ 200 ng/mL, 1 ng/mL ~ 1000 ng/mL and 1 ng/mL ~ 1000 ng/mL respectively. The linear equations were $Y = 813.8904X + 2165.3000 (R^2 = 0.9922)$, $Y = 714.1221X + 517.4311 (R^2 = 0.9892)$, $Y = 872.9971X + 1024.4247 (R^2 = 0.9952)$ respectively. The average recoveries were 97.17%, 97.2%, 92.68%, and RSD were 1.02 %, 1.31% and 1.41% respectively. **Conclusion:** The method is simple, sensitive and stable for the determination of hyoscyamine, scopolamine and anisodamine.

Key words: hyoscyamine; scopolamine; anisodamine; *Datura innoxia*

收稿日期: 2019-01-09; 修改日期: 2019-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31770329, 81303160)

作者简介: 陈 静(1991-), 女, 安徽亳州人, 硕士生, 主要从事临床药学方向(E-mail:1398469051@qq.com);

张 凤(1983-), 女, 安徽合肥人, 主管药师, 主要从事临床药学方向(E-mail:276117077@qq.com);

张 锐(1991-), 女, 河南开封人, 硕士生, 主要从事临床药学方向(E-mail:1562108068@qq.com);

李 卿(1982-), 女, 浙江余姚人, 副教授, 主要从事中药药效物质方向(E-mail:qli@smmu.edu.cn);

*范惠珍(1965-), 女, 江西宜春人, 教授, 硕士生导师, 主要从事消化道肿瘤研究与治疗(E-mail:fanfanyc@163.com).

曼陀罗亦称“风茄儿”，为茄科曼陀罗属，一年生草本植物。它是一种历史悠久的药用植物，分布广泛，可用于治疗关节痛、哮喘、咳嗽、胃肠痉挛、神经性偏头痛、止痛、痛风、烫伤、溃疡、狂躁、癫痫症、抑郁症、风湿症、抽搐、跌打损伤等症。生物碱莨菪烷类是曼陀罗中的主要化学成分。也是其主要的毒性以及活性成分^[1]，并且活性比较高。其中莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱等生物碱具有解痉阵痛、止咳平喘、麻醉镇静的功效^[2]，并可用于缓解内脏绞痛^[3]，但对人有剧毒，中毒多见于儿童误食曼陀罗、莨菪等植物的花果所致^[4]。曼陀罗中毒的主要表现有口渴舌燥、发音嘶哑、颜面潮红、头晕恶心、呕吐、烦躁不安、语无伦次、瞳孔散大、视物模糊、抽搐痉挛等^[5]症状。

曼陀罗具有多种生物活性，可广泛应用于医学、农林业中。随着对其药理作用的不断研究，发现其诸多的药用价值，让莨菪碱更广泛地在临床上与医学上应用，也使其需求量迅速地增长^[2]。已经有研究利用曼陀罗毛状根部生产生物碱的报道^[6]，曼陀罗成分复杂繁多，使用传统的方法 TLC、HPLC、GC-MS 等把莨菪碱类完全分离是非常困难的。本研究建立 LC-MS/MS 方法对曼陀罗中的莨菪碱、东莨菪碱和山莨菪碱的含量进行测定，结果显示，该方法简便，灵敏度、重复性好，用时较短，可用于其含量的测定，值得进一步推广。

1 实验材料

1.1 仪器

安捷伦 1200 液相色谱-G6410A 三重四级杆串联质谱联用仪 (Agilent, 美国), 包含 G1311A 输液泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, DAD 检测器, G1314BVWD 检测器, MassHunter 软件控制系统及数据处理工作站 (Agilent, 美国); labnet 定时可调速旋涡混合器 (labnet, 美国); 超声仪 (SK7200H 型, 上海科导超声仪器有限公司); Eppendorf 移液器 (100、200、1000 μL , 德国); 容量瓶。

1.2 药材及试剂

标准品: 莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱、华法林 (上海锐生物科技有限公司) 纯度 98%。

待测物: 曼陀罗的毛状根部 (12 个不同批次) (上海长征医院药材科李卿副教授提供), 甲醇 (Merck, 德国)、甲酸 (Merck, 德国)、乙腈 (Merck, 德国)、水 (屈臣氏)、盐酸 (上海裕纳有限公司)、浓氨水 (分析纯)。

2 方法与结果

2.1 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI): 正离子; 毛细管电压: 4000 V; 截取锥电压: 60 V; 气体温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 气体流速: 10 L/min。待测物以及内标华法林的 MRM 模式参数如表 1。

表 1 质谱条件

化合物/参数	Precursor Ion	Product Ion	F 值	CE 值	Polarity
莨菪碱	290.3	124.2	155	26	Positive
东莨菪碱	304.2	138.2	90	25	Positive
山莨菪碱	306.2	140.2	200	27	Positive
华法林	309	163	103	14	Positive

2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18(2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μm), 流动相: 乙腈-(0.05%甲酸)水溶液 = 68:32; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 2 μL ; 单针时间: 3 min

2.3 供试品溶液的制备

精密称取 50 mg 用蒸馏水冲洗干净并且用滤纸吸去多余水分, 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘至恒重的毛状根样品, 研磨成干粉; 加入 10 mL 盐酸, 超声 30 min, 冷却、过滤, 再用 10 mL 盐酸分三次洗涤滤渣; 与上述过滤液合并, 用浓氨水调节 pH=9, 超声 45 min; 再加 6 mL 三氯甲烷, 充分振荡; 冷冻干燥 (20 $^{\circ}\text{C}$, 2000 rpm) 残留物溶于 2 mL 三氯甲烷中 (有黄色不容物, 超声 3 min) 12000 rpm 离心 5 min, 吸取上清液 20 μL 用甲醇稀释 10 倍, 备用。

2.4 对照品溶液的制备

2.4.1 标准品母液的配制

分别精密称取 莨菪碱 0.9 mg、东莨菪碱 0.64 mg、山莨菪碱 0.88 mg, 用甲醇定容至 2 mL, 作为标准品母液, 备用。

2.4.2 线性溶液的配制

将标准品莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱母液用甲醇稀释成浓度分别 1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000 的混标溶液, 备用。

2.4.3 内标的配制

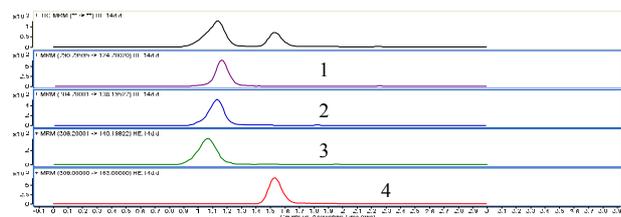
精密取适量标准品华法林用甲醇溶解配制成 10 ng/mL, 备用。

2.5 线性关系的建立

按照上述 2.1 与 2.2 的色谱条件下进行测定, 对 2.4.2 下的浓度梯度进行测定, 以峰面积为纵坐标(Y), 浓度为横坐标(X)绘制标准曲线。结果显示, 各成分在各自范围内线性关系良好, 莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱的线性回归方程分别是 $Y = 813.8904X + 2165.3000$ ($R^2 = 0.9922$)、 $Y = 714.1221X + 517.4311$ ($R^2 = 0.9892$)、 $Y = 872.9971X + 1024.4247$ ($R^2 = 0.9952$), 分别在 1~200、1~1000、1~1000 ng/mL 范围内线性关系良好。

2.6 专属性的实验

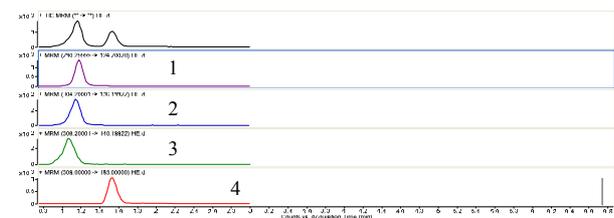
取适量供试品、对照品、阴性对照溶液各 1 份, 按上述 2.1 与 2.2 的色谱条件下进行测定。在同一检测条件下, 阴性对照无明显干扰, 对照品与供试品在相同的出峰时间分别出现了莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱色谱峰, 出峰时间均在 1 min 左右, 用时比较短, 分离度高。各成分的色谱图如图 1、图 2、图 3:



(1 为莨菪碱、2 为东莨菪碱、3 为山莨菪碱、4 为华法林)

图 1 样本的色谱图

Fig.1 Chromatogram map of the sample



(1 为莨菪碱、2 为东莨菪碱、3 为山莨菪碱、4 为华法林)

图 2 混标的色谱图

Fig.2 Chromatogram map of the scopolamine

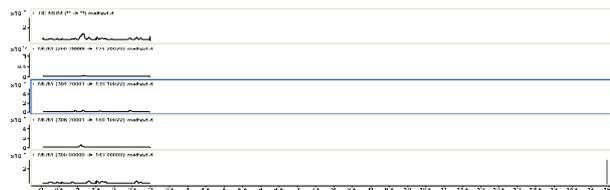


图 3 为阴性对照色谱图

Fig.3 Chromatogram map of blank

2.7 回收率实验

精密称取 6 份相同量的供试品, 分别加入相同量的对照品, 按上述 2.3 的方法制备供试品, 按照 2.1 与 2.2 的测定条件下进行测定, 记录各待测成分的峰面积。实验的结果表明, 6 份供试品中莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱的平均加样回收率分别为: 97.17%; 97.20%; 92.68%; RSD 分别为 1.02%、1.31%、1.41%。RSD ≤ 2 , 说明样本的处理过程影响小, 测定方法的准确度高, 结果见表 2。

表 2 三种成分加样回收率的测定结果

Table 2 The results Of 3 samples recovery test

成分	样品含量 (ng/mL)	加入量 (ng/mL)	测得量 (ng/mL)	加样回收率(%)	平均加样回收率(%)	RSD (%)
莨菪碱	9.70	11	19.99	96.57	97.17	1.02
	9.51	11	19.90	97.03		
	9.70	11	19.92	96.23		
	10.11	11	20.68	97.96		
	10.12	11	20.64	97.73		
	10.41	11	20.87	97.48		
东莨菪碱	8.30	9	16.91	97.75	97.20	1.31
	8.45	9	17.21	98.62		
	8.34	9	16.60	95.73		
	8.50	9	16.61	94.91		
	8.23	9	16.68	96.80		
	8.21	9	17.10	99.36		
山莨菪碱	7.80	8.50	14.54	89.20	92.68	1.41
	7.75	8.50	14.59	89.78		
	7.60	8.50	15.12	93.91		
	8.02	8.50	16.00	96.85		
	8.00	8.50	15.48	93.81		
	8.12	8.50	15.38	92.54		

2.8 重复性实验

同一环境下, 同一个操作人员, 取 6 份供试品, 分别加入相同量的对照品, 按上述 2.1.1 的方法制备供试品, 在上述 2.2 与 2.3 的色谱条件下进行测定, 记录各待测成分的峰面积。一份供试品连续进样 6 次, 分别记录供试品莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱的峰面积。RSD 分别为 1.38%、1.31%、1.21%。说明该实验方法的重复性比较好。

2.9 稳定性实验

相同条件下, 同一个操作人员, 取同一份供试品, 按上述 2.1.1 方法制备供试品溶液, 在上述 2.2 与 2.3 的色谱条件下进行测定, 在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录峰面积, 结果表明供试品中的 3 种

成分性质在 24 h 内性质稳定, $RSD \leq 2$, 说明该方法对 24 h 内的供试品测定是稳定的, 结果如表 3。

表 3 稳定性实验的结果 (ng/mL)

Table 3 The results of stability experiments

成份	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	平均 RSD%
莨菪碱	10.98	10.99	10	10.96	10.99	11	1
东莨菪碱	7.47	7.04	8.66	7.87	8.57	7.95	0.99
山莨菪碱	9.00	8.61	9.03	8.42	8.99	8.98	0.99

2.10 样本测定的结果

采用上述建立的 LC-MS 含量测定方法, 测定 12 份不用批次的供试品毛曼陀罗中三种成份的含量, 按照上述 2.3 方法进行处理, 在上述 2.1 与 2.2 的色谱条件下进行测定, 每份供试品重复进样 3 次, 其平均值作为曼陀罗中莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱的含量, 结果见表 4。

表 4 曼陀罗中 3 种成分的浓度分别为 (ng/mL)

Table 4 The contents of various compounds in 3 mandola

样品编号	莨菪碱	东莨菪碱	山莨菪碱
HB5	15.27	13.41	13.12
HB10	19.40	13.92	14.61
HB50	15.19	13.93	12.16
HB100	10.70	8.41	8.82
HB200	18.86	17.18	18.26
HB500	15.59	13.61	14.84
HB1000	9.98	8.44	8.32
HB1100	51.19	51.93	52.16
HB1200	105.70	105.41	105.82
HB1500	211.86	208.18	209.26
HB1700	551.59	513.61	507.84
HB2000	950.98	839.44	842.32

3 讨论

曼陀罗中莨菪碱含量的测定方法目前有酸碱滴定法^[8]、反相离子对液相色谱法(GC-MS)^[9]、高效液相色谱法(HPLC)^[10]和气相色谱-质谱法(GC-MS)^[11]等。近年来, 医疗行业主要采用高效液相色谱法(HPLC)测定曼陀罗中莨菪碱的含量, 但是此方法的灵敏度比较差^[7], 对流动相的要求比较繁琐^[12]。本研究建立 LC-MS/MS 方法用于测定曼陀罗毛根部莨菪碱的含量, 该方法不仅灵敏度好, 流动相仅是采用等度的乙腈-(0.05%甲酸)水溶液 = 68:32, 出峰时间短, 实验用时较少, 操作简单, 并且灵敏度高。

莨菪碱类为典型的生物碱类, 按传统的生物碱的提取方法, 色谱图出现杂峰较多且分离度不好。本实验采用了酸提取, 提取回收率比较高, 由于酸提取后过滤困难, 因此本实验又分别试了甲醇和三氯甲烷, 再进行提取过滤, 结果三氯甲烷提取回收率高于甲醇, 故选择三氯甲烷作为再提取过滤的溶

媒。本试验采用盐酸、浓氨水、三氯甲烷的萃取方法进行提取, 不仅提取回收率高, 色谱图也比较简单, 该方法适合用于曼陀罗中生物碱的提取与分离。

本实验采用的是色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C18(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm), 对酸性、碱性化合物都表现出很好的分离性能, 且分离度比较高。采用此色谱柱不仅出峰时间比较早且峰型好, 没有出现拖尾及裂峰等现象。由于上述样本处理中采用了甲醇对样本进行稀释, 为了避免溶剂效应, 标准品以及内标均采用甲醇进行溶解。

本研究建立的 LC-MS/MS 的方法能够很好的将曼陀罗中的莨菪碱、东莨菪碱和山莨菪碱提取与分离, 此方法操作简单且重复性好, 回收率高, 可以用于曼陀罗中莨菪碱、东莨菪碱和山莨菪碱含量的测定。

参考文献:

- [1] 李建文, 林彬彬, 王国凯, 等. 曼陀罗种子化学成分的研究[J]. 中国药理学杂志, 2012, 37(3): 319-322.
- [2] 邓朝晖, 罗充, 刘彬, 等. 罗曼陀罗药用价值的开发和利用[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2499-2502.
- [3] 王凤英, 孙一铭, 张鸿, 等. 白花曼陀罗植株再生及快繁体系的建立[J]. 中药材, 2014, 37(2): 179-182.
- [4] 杨玉林, 温忆敏, 芮振荣, 等. 气相色谱-质谱联用技术分析毒样品中四种生物碱[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(3): 272-273.
- [5] 邢慧敏, 振新, 刘静, 等. 一起有曼陀罗引起食物中毒的调查分析[J]. 职业与健康, 2001, 17(9): 52.
- [6] Moyano, Fomas, Pa Lazan J, et al. Effect of A grobacterium hizogenes T-DNA on alkaloid .pro-duction in Solanaceae plants [J]. Phytochemistry, 1999, 5 (21): 287-1292.
- [7] 秦国富, 李恒新, 李永波, 等. 液液萃取-气相色谱-质谱联用法同时测定曼陀罗中的消旋山莨菪碱、东莨菪碱与莨菪碱[J]. 中国卫生检验志, 2014, 26(4): 351-354.
- [8] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2000: 219.
- [9] 于霖汇, 杨德柱, 胡淑贤. 反相高效液相色谱法测定洋金花中东莨菪碱的含量 [J]. 中成药, 1992, 14(8): 35.
- [10] 何执静, 何执宁, 王金凤. 高效液相色谱法测定洋金花药材中东莨菪碱的含量[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(13): 174-176.
- [11] 褚建新, 谢瑜, 卓晓聪, 等. 东莨菪碱的 GC/MS 检验[J]. 法医学杂志, 2006, 22 (4): 285-287 .
- [12] 薛培凤, 陈玉荣, 青梅. HPLC 测定蒙药曼陀罗子中东莨菪碱的含量[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(2): 164-167.