

三重四级杆液质联用法测定金樱子中白桦脂酸

朱根华¹, 万彦婷², 卢珂³, 严志宏^{1*}, 管咏梅¹, 熊瀚海¹

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;
2. 武警江西总队医院, 南昌 330001; 3. 浙江省肿瘤医院放疗科, 杭州 310022)

[摘要] 目的:建立金樱子中白桦脂酸含量测定方法。方法:采用三重四级杆液质联用(HPLC-MS-MS)法,色谱柱 Diamonsil C₁₈(2)(2.1 mm × 150 mm, 3 μm),流动相甲醇-0.2%的甲酸溶液(84:16),流速 0.3 mL·min⁻¹。柱温 30 ℃,质谱采用大气压电喷雾离子源,选择性离子流模式(负离子)。结果:白桦脂酸的平均样回收率为 98.3% (RSD 2.6%)。结论:该方法快速简便,灵敏度高,重复性好,可用于金樱子的质量控制。

[关键词] 金樱子;白桦脂酸;液质联用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)05-0055-03

Content Determination of Betulinic Acid in *Rosae Laevigata Michx* by HPLC-MS/MS

ZHU Gen-hua¹, WAN Yan-ting², LU Ke³, YAN Zhi-hong^{1*}, GUAN Yong-mei¹, XIONG Han-hai¹

(1. Jiangxi College of TCM, Nanchang 330004, China; 2. Chinese People's Armed Police Forees Hospital, Nanchang 330001, China; 3. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-MS/MS method for determination of the content of Betulinic Acid in *Rosae Laevigata michx*. **Method:** Chromatography was performed on a 3 μm Diamonsil C₁₈(2) column with the column temperature at 30 ℃, and the sample size at 10 μL. The mobile phase composition was methanol-water (0.2% formic acid) (84:16). The flow rate was 0.30 mL·min⁻¹. **Result:** The betulinic acid had a good linearity relationship ($r = 0.9993$, $n = 6$) between 4.8-230.4 ng·mL⁻¹. The average recovery of betulinic acid in *Rosae laevi-*

[收稿日期] 20101108(017)

[基金项目] 十一五重大新药创制基金资助项目(2009ZX09310-005);江西省科技支撑计划基金项目(2008)212)

[通讯作者] * 严志宏, 讲师, 主要研究方向, 中药分析, Tel:0791-7118768, E-mail:yanzhihong03@yahoo.com.cn

3.3 色谱柱的选择 经紫外全波长扫描显示荆芥内酯在 pH > 9 的条件下酯键被破坏, 碱破坏产物在 pH < 9 的条件又会环合, 所以碱破坏试验需将流动相 pH 调至 9.0 以上。为了达到强力破坏验证方法专属性是否良好的效果, 同时又保护色谱柱不受高 pH 条件的损害, 故选择对高 pH 值耐受性比较出色的 Waters XTerra® MS C₁₈ 色谱柱进行破坏性试验研究。该色谱柱不仅在流动相 pH 为 10.0 时获得较高的色谱性能, 也缩短了色谱柱的冲洗时间, 加快了分析周期。

[参考文献]

- [1] 丁安伟, 张丽, 丁婕. 荆芥内酯及其提取工艺和用途. 中国 ZL01108186.4 [P] 2004-11-10.
- [2] 张敏. 荆芥内酯聚乳酸乙醇酸纳米粒冻干粉末的药效学及药代动力学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2007.
- [3] 荔霞, 刘永明, 王胜义, 等. 中药新药质量标准研究进展 [J]. 安徽农业科学 2010, 38(8): 4361.
- [4] 霍秀敏, 张玉琥. 新药的质量研究和质量标准的建立 [J]. 中国新药杂志 2006, 15(20): 1708.

[责任编辑 顾雪竹]

gata michx was 98.3% (RSD 2.6%). **Conclusion:** This method is simple, accurate and reproducible.

[Key words] *Rosae laevigata*; betulinic acid; HPLC-MS-MS

金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 是蔷薇科蔷薇属植物的干燥成熟果实, 分布于华东, 中南, 西南等地^[1]。性平, 味酸、甘涩, 具有固精缩尿、涩肠止泻、止咳平喘功能^[2]。主要有效成分有白桦脂酸, 具有抗炎抑菌、降血脂及抗疟疾等活性。对黑素瘤、神经外胚层及脑肿瘤等多种肿瘤有强烈的毒杀效应, 且对正细胞无杀伤力, 为治疗艾滋病、肿瘤的新药。本实验采用三重四级杆质谱联用测定金樱子中白桦脂酸含量。

1 试剂及仪器

安捷伦 Agilent1200 RRLC-6410QQQ 三重四级杆液质联用仪(高压双泵、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子源); Agilent Masshunter 色谱工作站; KQ-300DE 超声波清洗器(功率 150 W; 工作频率 40 kHz; 昆山市超声仪器有限公司); BT224S 赛多利斯 1/万天平(德国), 白桦脂酸对照品(批号 BH20100305, 天津马克生物技术有限公司; 经归一化法测定含量为 98.35%)。4 种不同产地金樱子为江中饮片厂提供。江西南昌和江西九江的金樱子为自己采摘。金樱子药材均经江西中医学院药学院龚千峰教授鉴定为蔷薇科蔷薇属植物金樱子 *R. laevigata* 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 液相色谱条件: Diamonsil C₁₈(2) 型色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3 μm); 流动相甲醇-0.2% 甲酸溶液(84:16); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

质谱条件: 干燥气流速 8 L·min⁻¹, 喷雾器 30 psi, 气体温度 350 °C, 电离方式 ESI 负极模式, 单反应监测离子 *m/z* 455.5, 累积时间 300 ms, 碎裂电压 120 伏。在上述仪器条件下测定。得到白桦脂酸标准溶液及金樱子样品的总离子流图见图 1。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取白桦脂酸对照品 4.80 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得对照品贮备液。分别取该贮备液 0.010, 0.020, 0.060, 0.120, 0.240, 0.480 mL, 分置 6 个 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶液配制浓度分别为 4.80, 9.60, 28.80, 57.60, 115.20, 230.40 ng·mL⁻¹

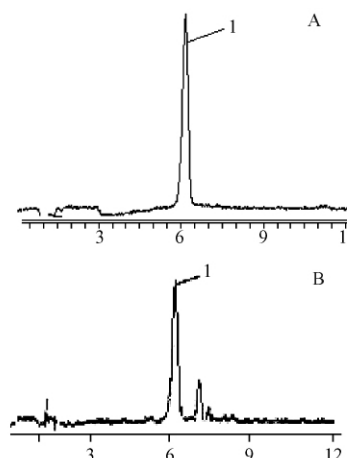


图 1 金樱子总离子流图
A. 对照品; B. 金樱子样品; 1. 白桦脂酸

的系列对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取经干燥的金樱子粉末(过 100 目筛)约 0.005 00 g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密加入 85% 甲醇 10 mL, 称定质量, 超声提取 1 h, 放冷, 称重, 用 85% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.3 线性关系考察 取 2.2 项下溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱质谱条件进样, 测定峰面积。以白桦脂酸的浓度(*X*)为横坐标, 峰面积(*Y*)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 78.11X + 483.29$ ($r = 0.9993$)。结果表明, 白桦脂酸在 4.80 ~ 230.40 ng·mL⁻¹ 线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密吸取金樱子药材(产地: 江西樟树)供试品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱质谱条件, 连续进样 5 次, 结果白桦脂酸的平均质量分数 0.285%, RSD 2.0%, 仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 用同一批金樱子药材(产地: 江西樟树)平行制备 5 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定。白桦脂酸的平均质量分数为 0.288%, RSD 1.8%, 说明该方法的重复性符合要求。

2.6 稳定性试验 取新制备的金樱子药材(产地: 江西樟树)供试品溶液, 按 2.1 项下色谱质谱条件, 分别在第 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 测定。白桦脂酸的平均为 0.286%, RSD 2.2%, 表明供试品溶液在

24 h 内稳定。

2.7 回收率试验 取已知含量的金樱子药材(产地:江西樟树)粉末5份,每份约0.005 00 g,各精密加入白桦脂酸对照品贮备液0.5 mL,按2.2.2项下方法制备溶液,按2.1项下色谱质谱条件测定,计算回收率,结果白桦脂酸平均回收率98.3%,RSD 2.6%。

2.8 最小检测限的测定 取白桦脂酸对照品溶液,分别稀释至不同的浓度,按2.1项下色谱质谱条件,分别使用单反应监测白桦脂酸在负离子模型下 m/z 455.5 的分子离子峰,测定白桦脂酸的最小检测限($S/N=3$)。结果测出的值为5 pg;证明HPLC-MS/MS法对白桦脂酸的检测灵敏度远远优于一般的HPLC-UV法和HPLC-ELSD法^[3]。

2.9 样品测定 分别吸取2个不同浓度的对照品溶液10 μ L和不同产地金樱子药材供试品溶液10 μ L,注入高效液相色谱仪,按2.1项下色谱条件,分别测定吸收峰面积,计算样品中白桦脂酸的含量。市售4种不同产地和自采的2种药材中白桦脂酸的含量测定结果详见表1。

表1 金樱子药材中白桦脂酸 %

药材产地	白桦脂酸
湖南浏阳	0.037 3
湖北黄冈	0.032 1
广西玉林	0.022 5
江西樟树	0.028 8
江西南昌	0.027 1
江西九江	0.022 8

3 讨论

在供试品溶液制备过程中,笔者分别对无水乙醇、甲醇、90%甲醇、85%甲醇、80%甲醇等不同的提取溶媒进行优选,最后根据提取效果选择了85%甲醇作为提取溶媒;对超声处理、回流、冷浸等不同的提取方法进行优选,最终选择超声提取作为供试品溶液的提取方法。在质谱条件优化的过程中,通过正、负离子检测模式、不同离子源等不同质谱条件进行比较,发现大气压电喷雾源负离子模式灵敏度高,噪音小,最后选择负离子模式检测样品。

对6个不同来源的金樱子样品中白桦脂酸含量进行比较,其中湖南浏阳金樱子中白桦脂酸含量普遍高于江西、湖北、广西各地的药材,而江西不同产地的含量也有一定的差异。可见对不同产地来源的金樱子药材中白桦脂酸进行评价和鉴定是很有必要的。本方法药材和试剂用量少,简便、准确、灵敏度高、选择性好,可作为药材品质评价指标之一;也可作为金樱子中的白桦脂酸在体内药代方面的研究提供参考。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》委员会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:233.
- [2] 王进义,张国林,程东亮,等. 中药金樱子的化学成分[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(1):21.
- [3] 陈宝林,杨昕,杨光. HPLC-蒸发光散射检测法测定不同产地酸枣仁中白桦脂酸的含量[J]. 中国药房,2007,18(12):923.

[责任编辑 顾雪竹]