

液相色谱-电喷雾质谱联用研究不同产地吴茱萸中生物碱成分

张雪琴^{1,2} 周欣^{*}¹ 王道平¹ 郝小江^{1,3}

¹(中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002) ²(贵州大学精细化工中心, 贵阳 550025)

³(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 采用液相色谱-电喷雾串联质谱分离鉴定了吴茱萸药材中 5 种生物碱成分。分析比较了不同产地吴茱萸药材中生物碱的种类, 同时采用高效液相色谱测定了不同产地药材中吴茱萸次碱的含量。方法简单, 快速, 灵敏, 结果令人满意。

关键词 高效液相色谱, 液相色谱-质谱联用, 吴茱萸碱, 吴茱萸次碱, 羟基吴茱萸碱, 吴茱萸酰胺甲, 吴茱萸酰胺

1 引言

中药吴茱萸 (*Fructus Evodiae*) 为芸香科植物吴茱萸 (*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.), 石虎 (*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode.) Huang) 或疏毛吴茱萸 (*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *badianieri* (Dode.) Huang) 的干燥未成熟果实, 具有温中, 止痛, 理气, 燥湿, 疏肝, 散寒, 止呕等多种功效, 临床用于治疗胃腹冷痛, 高血压, 肝郁肋痛, 寒疝疼痛, 神经性皮炎, 口腔溃疡, 疝疮等^[1]。其主要活性成分为吴茱萸生物碱。到目前为止, 对吴茱萸生物碱的测定方法研究较多的有薄层扫描, 毛细管电泳及高效液相色谱法等^[2~4], 这几种测定方法对吴茱萸中的两种主要生物碱(吴茱萸碱和吴茱萸次碱)提供了较为满意的定性定量信息, 但对另一些没有标准物质的生物碱成分却显得无能为力。而液-质联用技术具有极强的定性能力, 可有效的分析复杂混合物的单个和多个组分。本实验除采用 RP-HPLC 对吴茱萸次碱进行含量测定外, 还采用 LC-ESI-MS 联用法, 通过色谱保留时间和相应的质谱信息对不同产地中药吴茱萸中的各种生物碱成分进行定性分析, 为控制吴茱萸的质量, 保证药效提供了部分科学依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试药

HP 1100 高效液相色谱仪; DAD 二极管阵列检测器; HP1100 液相色谱-质谱联用仪; HP1100H PLC / MS 色谱工作站。吴茱萸次碱标准品购自中国药品生物制品检定所(批号 0801-9702), 生品吴茱萸产于广西、福建、云南、四川、贵州桐仁、贵州江口、贵州清镇(均由本实验室研究生莫善列收集提供)。乙腈为色谱纯, 四氢呋喃为分析纯, 工业用氯仿经重蒸提纯, 超纯水。

2.2 色谱质谱条件

2.2.1 液相条件 色谱柱: Hypersil ODS2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (大连依利特公司, 产品号: 13120520183); 流动相: 乙腈 (A)-水 (B) (55:45); 流速: 1.0 mL/min; 柱压: 12 MPa; 柱温: 25℃; 检测波长: 225 nm。

2.2.2 质谱条件 电离方式 APPI-ESI, m/z 扫描范围: 50~800 amu, 干燥气为 N₂, 干燥气温度: 350℃; 干燥气流速: 10 L/min, 雾化器压力: 0.14 MPa, 毛细管电压: 4000 V, 碰撞诱导解离电压: 70 V; 液相分流比: 1:3。

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液的配制 精密称取吴茱萸次碱标准品 0.70 mg, 四氢呋喃溶解后定容 10 mL。

2.3.2 样品的处理 精密称取 9 种吴茱萸药材干燥粉末(过筛), 置索氏提取器中, 用浓氨水润湿, 氯仿索氏提取 5 h, 用无水乙醇、四氢呋喃转入 25 mL 的容量瓶定容, 摆匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 备用。

2003-04-07 收稿; 2003-12-01 接受

3 结果与讨论

3.1 标准曲线

精密吸取吴茱萸次碱对照品溶液 0.2、0.5、1.2、8、16 和 20 μL 注入色谱仪进行测定, 得吴茱萸次碱的回归方程为 $Y = 5.51152X - 2.82020$ ($r = 0.99998$, $n = 7$); 线性范围为 14~1400 ng

3.2 方法的重现性、稳定性、精密度和回收率

重现性实验: 取平行处理的 5 个样品供试液进行独立测定, 得吴茱萸次碱的 RSD 为 0.63%。稳定性实验: 取同一供试品溶液, 每隔 1 h 重复测定一次, 共测 9 次, 得吴茱萸次碱的 RSD 为 2.17%。仪器精密度实验: 精密吸取吴茱萸次碱对照品溶液 2 μL, 重复进样 6 次, 测定其吸收峰面积, 结果吴茱萸次碱的 RSD 为 1.01%。回收率实验: 称取吴茱萸干燥粉末(过 0.30 mm 粒径筛), 按样品测定项方法测定吴茱萸次碱含量后, 再称取吴茱萸样品 6 份, 将其分为 3 组, 吴茱萸次碱对照品加入量一组与样品中含量接近, 另两组分别为样品中含量的 80% 和 120%; 制备 6 份供试液, 同法测定, 求得吴茱萸次碱的加样回收率: 80% 加样回收率为 99.0% 和 98.0%; 100% 加样回收率为 95.8% 和 100.0%; 120% 加样回收率为 98.7% 和 100.5%。平均回收率为 98.7%; RSD 为 1.7%。

3.3 HPLC 测定不同产地吴茱萸药材中吴茱萸次碱的含量

采用上述测定方法对不同产地的吴茱萸药材进行测定, 结果见表 1。

表 1 不同产地吴茱萸药材中吴茱萸次碱的含量 (%)

Table 1 The content of nitaecarpine in evodia rutaecarpa from nine different habitats

产地 Habitat	吴茱萸次碱含量 Content of nitaecarpine (%)	产地 Habitats	吴茱萸次碱含量 Content of nitaecarpine (%)	产地 Habitats	吴茱萸次碱含量 Content of nitaecarpine (%)
四川 Sichuan	0.309	江口 Jiangkou	0.274	桐仁 Tongren	0.118
福建 Fujian	0.081	清镇 Qizhen	0.079	云南昭通大吴萸 Yunnan Zhaotong(big)	0.137
广西(8月份) Guangxi(August)	1.449	广西(7月份) Guangxi(July)	0.396	云南昭通小吴萸 Yunnan Zhaotong(small)	0.167

3.4 LC-ESI-MS 分析

取 2.3 中制备的供试液按 2.2 条件进行 HPLC-ESI-MS 分析, 通过对样品进行全扫描, 获得了样品的总离子流图及相应的色谱图(见图 1)。由图 1 可知, LC-MS 总离子流图中有 5 个峰, 其相应的质谱图见图 2。

由图 2a 可观察到 m/z 134、161、308、330 和 637 离子, m/z 308 和 330 分别为吴茱萸酰胺(分子量 307)的氢离子化峰和钠离子化峰, 即 $[M^+ + H]$ 和 $[M^+ + Na]$, m/z 637 为双分子离子的钠离子化峰, 即 $[2M^+ + Na]$, m/z 134 为母离子失去碎片后, 继续丢失 CH_3NHCH_2 得到的, 即 $[M^+ - C_9H_8N - CH_3NHCH_2]$, m/z 161 为母离子丢失碎片后失去一个 CH_3 和一分子 H_2 得到的, 即 $[M^+ - C_9H_8N - CH_3 - H_2]$ 。图 2b 中可观察到的离子有 m/z 134、171、304、326 和 629, m/z 304 和 326 分别为吴茱萸碱(分子量 303)的氢离子化峰和钠离子化峰, 即 $[M^+ + H]$ 和 $[M^+ + Na]$, m/z 629 为双分子离子的钠离子化峰, 即 $[2M^+ + Na]$, m/z 171 是母离子丢失碎片后得到的, 即 $[M^+ - C_8H_7NO]$, m/z 134 为母离子丢失碎片得到的, 即 $[M^+ - C_{11}H_{10}N_2]$ 。图 2c 中的碎片离子有 m/z 144、304、320 和 342, m/z 320 和 342 分别为羟基吴茱萸碱(分子量 319)的氢离子化峰和钠离子化峰, 即 $[M^+ + H]$ 和 $[M^+ + Na]$, m/z 304 是由母离子丢失 CH_4 得到的, 即 $[M^+ - CH_4]$, m/z 144 是从母离子上丢失碎片得到的, 即 $[M^+ - C_9H_8N_2O_2]$ 。图 2d 中的碎片离子 m/z 288 为吴茱萸次碱(分子量 287)的氢离子化峰, 即 $[M^+ + H]$ 。图 2e 中的碎片离

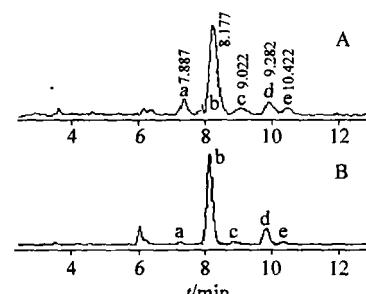


图 1 吴茱萸生物碱的总离子流图(A)及相应的色谱图(B)

Fig. 1 Total ion Chromatogram of alkaloids in evodia rutaecarpa (A) and the corresponding Chromatogram (B)

a 吴茱萸酰胺 (evodiamide); b 吴茱萸碱 (evodiamine); c 羟基吴茱萸碱 (hydroxyevodiamine); d 吴茱萸次碱 (nitaecarpine); e 吴茱萸酰胺甲 (Goshuyuanide)。

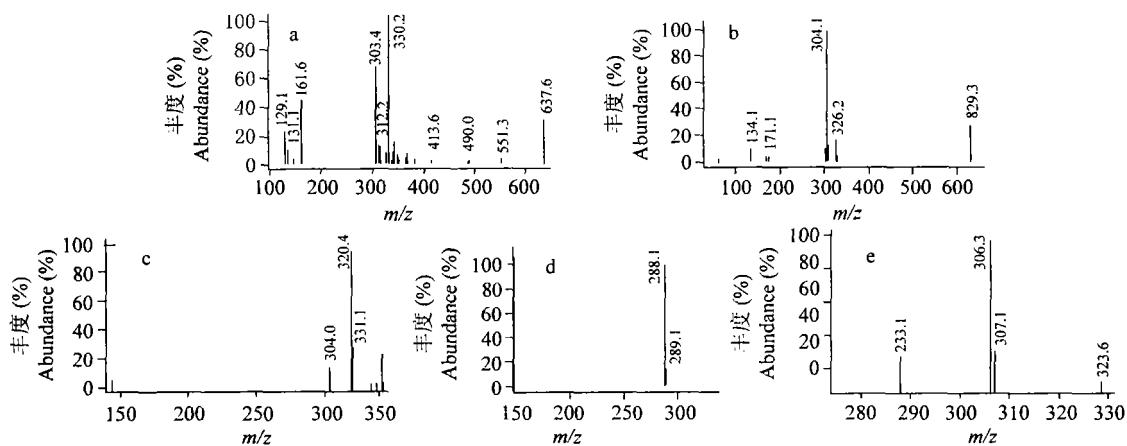
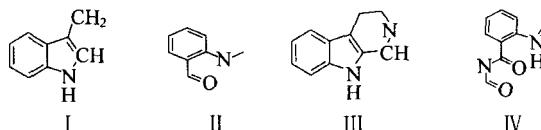


图2 吴茱萸中5种生物碱成分的质谱图

Fig. 2 Mass chromatograms of five alkaloids in evodia rutaecarpa

a 吴茱萸酰胺 (evodiamide); b 吴茱萸碱 (evodiamine); c 羟基吴茱萸碱 (hydroxyevodiamine); d 吴茱萸次碱 (rutaric acid); e 吴茱萸酰胺甲 (Goshuyuanide)。

子有 m/z 288和 m/z 306 吴茱萸酰胺甲 (分子量 305) 的氢离子化峰, 即 $[M^+ + H]$, m/z 288为母离子丢失一分子 H_2O 后得到的。~ 碎片结构如下。



采用标样对比法对吴茱萸次碱进行进一步确认, 结果样品中吴茱萸次碱的保留时间和标准品一致, 结合文献 [5] 提供的生物碱质谱数据得出的定性结果示于表 2。对 9 个不同产地的吴茱萸药材中生物碱的种类和各种生物碱相对含量 (以相对吴茱萸次碱的色谱峰面积比表示), 结果见表 3。

表2 5种生物碱在LC-MS的TLC中的保留时间

Table 2 R ention time of five alkaloids in TLC

生物碱 Alkaloids	保留时间 (min) R ention time	生物碱 Alkaloids	保留时间 (min) R ention time	生物碱 Alkaloids	保留时间 (min) R ention time
吴茱萸酰胺 Evodiamide	7.367	羟基吴茱萸碱 Hydroxyevodiamine	9.023	吴茱萸酰胺甲 Goshuyuanide	10.428
吴茱萸碱 Evodiamine	8.172	吴茱萸次碱 Rutaric acid	9.867	-	-

表3 不同产地吴茱萸药材中生物碱的分析结果

Table 3 Analysis result of alkaloids in *Evodia rutaecarpa* from different habitats

产地 Habitat	吴茱萸次碱 Rutaric acid	吴茱萸酰胺 Evodiamide	吴茱萸碱 Evodiamine	羟基吴茱萸碱 Hydroxyevodiamine	吴茱萸酰胺甲 Goshuyuanide
广西(8月份) Guangxi (August)	1154.09(1.00)	186.41(0.16)	5566.95(4.82)	312.14(0.27)	228.52(0.20)
广西(7月份) Guangxi (July)	1663.00(1.00)	362.06(0.22)	8938.06(5.37)	622.07(0.37)	508.36(0.31)
云南昭通大吴萸 Yunnan Zhaotong (big)	1806.55(1.00)	29.68(0.016)	1405.36(0.78)	44.83(0.024)	50.62(0.028)
云南昭通小吴萸 Yunnan Zhaotong (small)	1457.46(1.00)	39.86(0.027)	1668.45(1.14)	80.23(0.055)	71.59(0.049)
福建 Fujian	681.75(1.00)	-	1082.32(1.59)	91.19(0.13)	82.12(0.12)
桐仁江口 Tongren Jiangkou	1244.22(1.00)	-	4788.56(3.85)	181.68(0.15)	90.27(0.07)
四川 Sichuan	3829.51(1.00)	12.25(0.003)	4354.45(1.14)	283.95(0.074)	71.52(0.019)
桐仁 Tongren	2392.02(1.00)	-	3229.78(1.35)	221.18(0.092)	82.89(0.035)
清镇 Qingzhen	1184.09(1.00)	19.27(0.016)	1513.89(1.28)	166.25(0.14)	43.74(0.037)

注 (note): 表格中数据是以各种生物碱的峰面积和相对于吴茱萸次碱的峰面积比, 即峰面积 (相对峰面积比) (the data in table are peak area of alkaloids and those in parenthesis are the peak area ratios of alkaloids relative to the rutaecarpines)

3.5 讨论

(1) LC/MS分析对供试液要求比较苛刻, 经HPLC比较发现, 氯仿索氏提取比较完全, 且杂质无明显增多; (2)由于ESI是一种高效的“软”离子化方式, 可以得到高丰度的准分子离子峰, 但其碎片离子峰少且弱, 给分析带来困难。如果条件许可, 进行HPLC/MS/MS分析则可得到更多的结构信息, 分析结果也就会更具说服力; (3)不同产地吴茱萸药材中生物碱的种类差异不大, 但是总生物碱的含量却存在明显差异。生物碱是中药吴茱萸中的主要活性成分。因此, 采取适当的方法控制中药吴茱萸的质量, 保证中成药的药效是非常必要的。

References

- 1 Jiangsu New Medical College (江苏新医学院). *Great Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大词典). First Part(上册). Shanghai (上海): Publishing Agency of Science and Technology of Shanghai (上海科学技术出版社), 1977: 1119
- 2 Zhao Dongmei(赵冬梅), Zhang Ying(张英), Bi Kaishun(毕开顺). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (药物分析杂志), 1999, 19(1): 16~18
- 3 Li Qinyun(李琴韵), Hong Xiaokun(洪筱坤), Wang Zhihua(王智华), Wei Hong(卫红), Wang Zhiwei(王志伟). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (药物分析杂志), 2000, 20(6): 370~372
- 4 Liu Yanwen(刘焱文), Chen Shuhe(陈树和), Lu Xizhen(卢喜珍), Xia Xi(夏曦), Ye Congjin(叶丛进). *Chinese Journal of Hospital Pharmaceutical* (中国医院药学志), 1996, 16(8): 361~362
- 5 Tang Yuanqing(唐元清), Feng Xiaozhang(冯孝章), Huang Liang(黄量). *Acta Pharmaceutical Sinica* (药学学报), 1996, 31(2): 151~155
- 6 Zhen Pan(甄攀), Yang Fengzhen(杨凤珍). *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2000, 25(8): 504~505

Analysis of Alkaloids in *Evodia Rutaecarpa* from Different Habitats by Liquid Chromatography Mass Spectrometry

Zhang Xueqin^{1,2}, Zhou Xin^{1*}, Wang Daoping¹, Hao Xiaojiang^{1,3}

¹(The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province,

Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002)

²(Fine Chemical Industry Center, Guizhou University, Guiyang 550025)

³(Kunming Institute of Botany, Kunming 650204)

Abstract A liquid chromatography-electrospray ionization (ESI) tandem mass spectrometry was used to separate and identify five alkaloids in *Evodia rutaecarpa*. The type and content of alkaloids in *Evodia rutaecarpa* from nine different habitats were analysed and compared. The quantitations of rutaecarpine in *Evodia rutaecarpa* from nine different habitats were also performed by high performance liquid chromatography. The method is simple, quick and sensitive, the result is satisfactory.

Keywords High performance liquid chromatography, liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, *Evodia rutaecarpa*, evodiamine, hydroxyevodiamine, goshuyuanide-, evodianide

(Received 7 April 2003; accepted 1 December 2003)