

### 3 讨论

本研究对多种流动相进行了考察,结果表明以乙腈洗脱,色谱峰的峰形较甲醇好,考虑到绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸 3 种成分均带有酚羟基,具有一定的酸性,未解离的羟基与固定相作用较强,导致拖尾。在水相中加入 0.1 %甲酸,消除峰拖尾现象。确定流动相两相为乙腈(A)和 0.1 %甲酸溶液(B)。当乙腈(A)为 20 %, 0.1 %甲酸溶液(B)为 80 %等度洗脱时,结果表明异嗪皮啶和迷迭香酸与杂质峰能够较好的分离,但绿原酸与杂质无法分离,参考文献<sup>[10]</sup>的研究设定上述梯度洗脱条件,能保证绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸 3 种成分均能达到较好的分离效果。

分别考察了以水、甲醇、50 %甲醇为提取溶剂。结果表明以水为提取溶剂时杂质峰较多,未达基线分离;以甲醇为提取溶剂时各成分对称因子不佳,理论板数较低;以 50 %甲醇为提取溶剂时,能较好地分离各物质成分,基线噪音小,峰形好,故选择 50 %甲醇为提取溶剂。超声时间的选择,比较了 20, 30, 45, 60 min 的提取率,结果表明 30, 45, 60 min 的提取率基本不变。因此,最终选择采用 50 %甲醇超声提取 30 min 为本试验的提取条件。

本试验采用 HPLC 同时测定肿节风提取物中绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸 3 个成分的含量,方法简便,结果准确可靠,可为本课题组肿节风提取物促

骨髓巨核细胞增殖的效应成分研究提供质控评价。同时,可作为肿节风提取物及其中成药质量控制的参考依据。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(20 卷 1 分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 79-80.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 486.
- [3] 连晓媛. 含有肿节风提取物黄酮有效部位的注射液及其用途[P]. 中国, 20061004920.9, 2006-10-04.
- [4] 张洁. 绿原酸在制备具有增加骨髓细胞功效的药物中的用途[P]. 中国, 200680024175.X. 2010-08-25.
- [5] 连晓媛. 迷迭香酸的制备方法和应用[P]. 中国, 200710067381.5. 2011-03-02.
- [6] 连晓媛. 一种植物肿节风有效部位总多酚及其制备方法和应用[P]. 200610050821.1. 2010-06-16.
- [7] 范催生. 肿节风黄酮类香豆素类总提取物及其药物组合物和用途[P]. 03100053.3. 2004-07-28.
- [8] 徐国良, 肖兵华, 陈奇. 肿节风及其分离部位对免疫性血小板减少性紫癜小鼠血小板的影响[J]. 中国实验方剂学, 2005, 11 (4): 33-36.
- [9] 徐国良, 肖兵华, 邹胡斌. 大孔吸附树脂分离肿节风中总黄酮的研究[J]. 中草药, 2006, 37(7): 1014-1017.
- [10] 曾建伟, 林培玲, 谢勇, 等. HPLC 法同时测定草珊瑚中富马酸、异嗪皮啶和迷迭香酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1417-1419.

(编辑: 宋威)

## 4 种含苍耳子的复方颗粒中毒性成分苍术苷的含量测定

陈璐璐, 朱雅玲, 杨柳, 曾星, 李玲玲, 许怡瑜 (广州中医药大学第二附属医院, 广东省中医药科学院, 广东 广州 510120)

**摘要:** **目的** 建立苍耳子复方颗粒剂中毒性成分苍术苷的快速高分离度液相色谱-串联质谱 (RRLC-MS/MS) 含量快速检测方法。**方法** 将处理后的样品中加入内标氯霉素, 运用超高效液相-质谱联用仪, 采用多反应离子监测(MRM)在负离子检测模式下测定苍术苷的含量。**结果** 苍术苷在 0.505~505 ng·mL<sup>-1</sup> 浓度范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系 ( $r=0.9993$ ); 平均回收率为 95.38 %, RSD=6.265 % ( $n=6$ )。**结论** 本研究所建立的含量测定方法快速、准确、稳定, 可为苍耳子复方制剂中毒性成分苍术苷的检测提供快速准确的定量分析方法。

**关键词:** RRLC-MS/MS; 苍耳子; 复方颗粒; 毒性成分; 苍术苷

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0297-04

**收稿日期:** 2012-12-31

**作者简介:** 陈璐璐, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量评价。Email: chenlulu871204@qq.com。通讯作者: 杨柳, 女, 研究员, 主要从事中药活性成分及质量评价研究。Email: yangliume@yahoo.com.cn。

**基金项目:** 科技部重大新药创制专项(2008ZX09312-021, 2012ZX09303009-003)。

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.024

## RRLC-MS/MS Method for the Quantitation of Toxic Component Atractyloside in Compound Granula Containing Fructus Xanthii

CHEN Lulu, ZHU Yaling, YANG Liu, ZENG Xing, LI Lingling, XU Yiyu (The Second Afiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Provincial Academy of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To develop the quantitative method for atractyloside, a toxic component in Compound Granula containing Fructus Xanthii by RRLC-MS/MS. **Methods** Using chloramphenicol as internal standard, atractyloside was determined by RRLC-MS/MS. ESI was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) negative mode. **Results** The linear range of atractyloside was 0.505~505 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.9993$ ), and the average recovery was 95.38% with RSD being 6.256 % ( $n=6$ ). **Conclusion** The established method is rapid, accurate and reliable, and can be used to determine atractyloside in Chinese herbal compound preparations containing Fructus Xanthii.

**Keywords:** RRLC-MS/MS; Fructus Xanthii; Compound Granula; Toxic component; Atractyloside

苍耳子是历代治疗鼻渊和头痛的首选药物,已有几千年的临床应用历史,多部古代中医药著作均有记载,但根据本草记载和国内外大量的病例报道苍耳子具有较强的毒性,过量使用和长期服用可导致中毒,甚至死亡。苍耳子中毒的临床表现为致命性的广泛肝坏死,并伴有低血糖及肾衰竭<sup>[1-4]</sup>。因服用含苍术苷的传统草药而导致中毒甚至死亡的事件在北非地区和地中海国家常见报道<sup>[5-6]</sup>,我国也有不少苍耳子中毒的临床案例<sup>[7-8]</sup>。苍耳子在中成药复方制剂中应用频率很高,《中国药典》(2010版)收录的苍耳子复方制剂多达11种,包括中医临床常用的通窍鼻炎片、鼻渊舒等,而收入部颁标准的制剂则达到39种,几乎涉及所有的鼻炎用药。然而,即便是应用如此之广,含苍术苷及其衍生物的毒性中药及其制品的质量控制却仍未引起我们足够的重视。植物化学和现代药理学的研究表明,苍耳子中含有一类天然植物毒素苍术苷及其衍生物。苍术苷属贝壳杉烯糖苷类(kaurene glycoside)化合物,其水溶性强,采用亲水相色谱柱用高有机流动相以反相模式分离能获得较好的分离度,分离效率高。本文建立4种苍耳子复方颗粒中毒性成分苍术苷的RRLC-MS/MS快速定量测定方法,为苍耳子中成药制剂的安全使用和质量控制方法提供科学依据。

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** Agilent 6460 RRLC-MS/MS 快速液相色谱串联三重四级杆质谱仪,配有SL二元梯度泵、SL柱温箱、SL自动进样器以及Agilent Mass Hunter工作

站软件,美国Agilent公司;AL104-1C电子天平(万分之一),瑞士Mettler Tolido公司;AB135-S电子天平(十万分之一)。Branson8510型超声波清洗仪,美国Branson公司。

**1.2 药品与试剂** 辛芩颗粒、鼻咽清毒颗粒、通窍鼻炎颗粒和鼻渊通窍颗粒均购自广东省中医院药房;苍术苷对照品,美国Sigma公司,批号:029H06461,纯度经HPLC检测 $\geq 98\%$ ;氯霉素,购自中国药品生物制品检定所,批号:130555-200923。乙腈和乙酸铵均为HPLC级,美国Fisher公司;其他化学试剂均为分析纯,广州化学试剂厂;超纯水经Milli-Q系统纯化制备。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱和质谱条件** 色谱柱:Agilent Zorbax RX-SIL (2.1 mm×150 mm, 5 μm);流动相:乙腈-10 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵溶液(85:15);流速:0.2 mL/min;柱温:35℃。进样量:5 μL。电喷雾(ESI)源;采用多反应离子监测(MRM)进行负离子检测,用于定量分析的离子为 $m/z$  725.1→645.2;干燥气温度:325℃;干燥气流速:6 L·min<sup>-1</sup>;雾化气:30 psi;毛细管电压:3000 V;喷嘴电压:1500 V;鞘气温度:350℃;鞘气流速:11 L·min<sup>-1</sup>。

**2.2 对照品、内标及供试品溶液的制备** 取苍术苷对照品约5 mg,精密称定质量,置量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得1.01 mg·mL<sup>-1</sup>的苍术苷标准品储备液;取氯霉素约10 mg,精密称定质量,置量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,

制得  $0.504 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的氯霉素内标工作液；取中成药颗粒剂研磨成粉末，混合均匀，精密称取  $0.2 \text{ g}$  置于锥形瓶中，加入  $20\%$  甲醇溶液  $50 \text{ mL}$ ，超声  $1 \text{ h}$ ，摇匀，取适量  $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $3 \text{ min}$ ，精密量取  $500 \mu\text{L}$  上清液，加入  $50 \mu\text{L}$  内标工作液和  $50\%$  乙腈  $450 \mu\text{L}$ ，过滤后待测。

**2.3 质谱和色谱分析** 采用自动进样方式对质谱条件

进行优化，在 ESI 正离子和负离子模式下进行全扫描以比较和优化待测化合物电离模式。结果表明，在 ESI 负离子模式下，待测物能获得更好的质谱响应。为了获得检测的高灵敏度，研究还对干燥气、雾化气、鞘气以及电压等质谱参数进行了优化，优化的参数详见质谱条件所示。以优化的质谱和色谱条件获得的质谱扫描图及质量色谱图见图 1 和图 2。

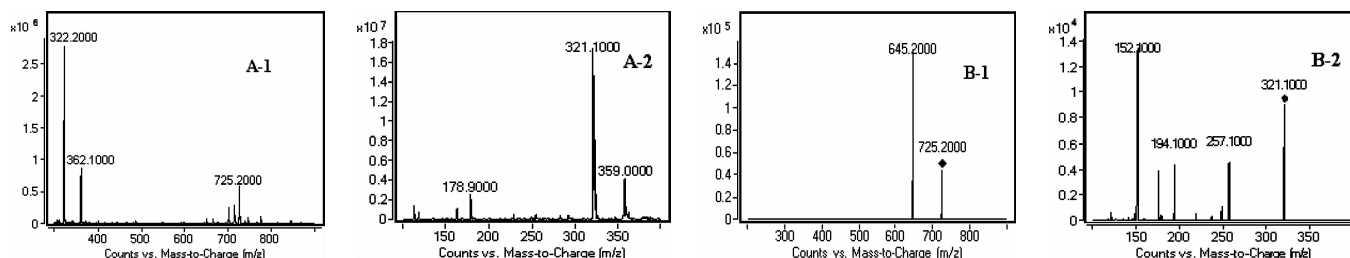
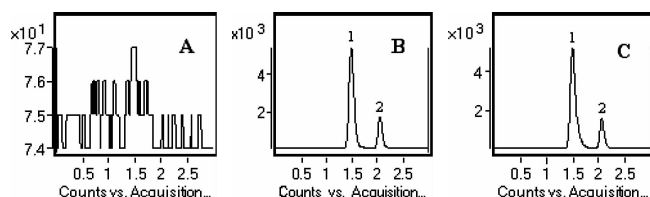


图 1 (A)苍术苷(A-1)及内标物(A-2)的全扫描质谱图；(B)苍术苷(B-1)及内标物(B-2)的子离子扫描质谱图

Figure 1 (A)Full scan mass spectrum of reference standard of atractyloside (A-1)and internal standard (IS,A-2); (B)Production scan MS/MS spectrum of reference standard of atractyloside(B-1)and IS(B-2)



1. 苍术苷；2. 内标物

图 2 (A)溶剂的 MRM 色谱图；(B) $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  苍术苷标准品的 MRM 色谱图；(C) 含苍耳子的复方颗粒剂中苍术苷的 MRM 色谱图

Figure 2 Representative MRM chromatograms of (A) blank solvent, (B)attractyloside standard at the concentration of  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and (C)attractyloside in Compound Granula containing Fructus Xanthii

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性范围考察** 取苍术苷标准品储备液，逐级稀释，同时加入内标溶液(各浓度水平等量)，制得含苍术苷  $0.505, 1.01, 2.02, 5.05, 10.1, 20.2, 50.5, 101, 202$  和  $505 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，内标  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合标准品溶液，按照上述色谱和质谱条件进行检测。以苍术苷峰面积与内标峰面积的比值作为纵坐标( $Y$ )，苍术苷质量浓度为横坐标( $X$ )，绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程： $Y = 0.0924X - 0.0073$ ， $r = 0.9993$ ，苍术苷浓度在  $0.505 \sim 505 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内，线性关系良好，检测限和定量下限分别是  $0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.017 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.4.2 精密度试验** 取低、中、高 3 个浓度分别为  $1, 20$  和  $400 \text{ ng/mL}$  的质控溶液进行日内和日间精密

度考察。日内精密性，连续进样 6 次；日间精密性，连续 3 d 采用同法测定，计算其含量的相对标准偏差(RSD)。日内和日间精密性考察的 RSD 值低、中、高 3 个浓度分别为： $1.716\%$ 、 $4.068\%$ 、 $1.551\%$  和  $5.805\%$ 、 $5.862\%$ 、 $5.892\%$ 。

**2.4.3 重复性试验** 取同一批颗粒剂成药样品 6 份，按供试品制备方法制备，并依上述色谱和质谱条件测定样品中苍术苷的含量，同批样品中苍术苷的平均含量为  $103.5 \text{ ng/mL}$ ，RSD 为  $4.873\%$  ( $n=6$ )。

**2.4.4 稳定性试验** 取上述供试品溶液，分别于  $0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 \text{ h}$  进样测定，考察稳定性，其测定结果的 RSD 值为  $4.998\%$  ( $n=7$ )，表明样品溶液  $24 \text{ h}$  内稳定。

**2.4.5 加样回收率试验** 取已测知含量的颗粒剂成药样品 6 份，分别精密加入等同于成药样品含量的苍术苷化学对照品，按供试品溶液制备方法提取和制备，依上述色谱和质谱条件测定并计算加样回收率，结果见表 1。

**2.5 样品含量测定** 将样品按供试品溶液制备方法提取和制备，测定结果见表 2。

## 3 讨论

苍术苷是苍耳子药材的主要毒性成分，由于其结构特殊，具有强亲水性和弱紫外吸收，对其检测和分析目前还没有很好的方法。本研究建立了中药苍耳子复方颗粒剂中毒性成分苍术苷的 RRLC-MS/MS 检测方法，样品前处理简单，方法稳定、灵

表 1 复方颗粒剂中苍术苷的加样回收率试验

Table 1 Recoveries for the assay of atractyloside in Compound Granula

| 已知含量 / $\mu\text{g}$ | 加入量 / $\mu\text{g}$ | 测得量 / $\mu\text{g}$ | 回收率 / % | RSD / % |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------|---------|
| 5.175                | 5.200               | 10.10               | 94.71   | 6.27    |
| 5.175                | 5.200               | 9.85                | 89.81   |         |
| 5.175                | 5.200               | 10.27               | 97.98   |         |
| 5.175                | 5.200               | 10.64               | 105.10  |         |
| 5.175                | 5.200               | 9.78                | 88.64   |         |
| 5.175                | 5.200               | 10.22               | 96.02   |         |

注：回收率 = (加入量 - 已知含量) / 加入量  $\times$  100 %

表 2 复方颗粒剂中苍术苷的含量测定( $n=3$ )

Talbe 2 Contents of atractyloside in Compound Granula containing Fructus Xanthii( $n=3$ )

| 样品     | 产地 | 批号         | 含量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ |
|--------|----|------------|--------------------------------------|
| 辛芩颗粒   | 四川 | 111007     | 69.7                                 |
| 鼻咽清毒颗粒 | 广东 | 1045       | 141.7                                |
| 通窍鼻炎颗粒 | 四川 | 111004     | 358.2                                |
| 鼻渊通窍颗粒 | 山东 | 0021110051 | 50.4                                 |

敏、准确，3 min 即可完成一个样品的测定，0.2 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> 的较低流速也使得有机溶剂用量非常少，不仅方便、快捷，也十分经济环保，可适用于含苍耳子的中成药制剂毒性成分苍术苷的含量测定。

研究对提取条件进行了优化，比较了不同提取方法(超声和回流)，不同提取溶媒(50 %甲醇、20 % 甲醇以及纯水)，不同提取时间(0.5, 1, 2 h)苍术苷的提取效率，结果显示，采用 20 % 甲醇超声提取 1 h 提取率最高，结果稳定，重现性好。

在色谱条件优化中，考察了流速(0.2~0.4 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>)，柱温(30  $^{\circ}\text{C}$ ，35  $^{\circ}\text{C}$ ，40  $^{\circ}\text{C}$ )对色谱行为的影响，研究了乙腈 / 水流动相系统中加入不同缓冲盐(乙酸铵、甲酸铵、乙酸、甲酸)对色谱行为及质

谱响应的影响，结果表明，采用乙腈 -10 mmol 乙酸铵(85 : 15)为流动相，流速 0.2 mL / min，柱温设置在35  $^{\circ}\text{C}$ 时目标化合物峰形对称、保留时间稳定。

在质谱条件的优化过程中，考察了干燥气流速(3~6 L $\cdot$ min<sup>-1</sup>)，雾化气压力(30~40 psi)，毛细管压力(2500~ 4000 psi)等质谱条件的影响，比较了 ESI 正负离子模式下目标化合物的质谱响应，结果表明，3 L $\cdot$ min<sup>-1</sup> 干燥气流速可以达到要求，30 psi 雾化气压力及 3000 psi 毛细管压力较合适，ESI 负离子模式下，目标化合物的选择性好且灵敏度高。

参考文献：

[1] 王秀娟, 许利平, 王敏. 常用中药及复方制剂的肝毒性[J]. 首都医科大学学报, 2007, 28(2): 220-224.

[2] Bouziri A, Hamdi A, Menif K, et al. Hepatorenal injury induced by cutaneous application of *Atractylis gummifera* L[J]. Clin Toxicol(Phila), 2010, 48: 752-754.

[3] Obatomi DK, Blackburn RO, Bach PH. Effects of the calcium channel blocker verapamil and sulphhydryl reducing agent dithiothreitol on a-tractyloside toxicity in precision-cut rat renal cortical and liver slices[J]. Food Chem Toxicol, 2001, 39: 1013-1021.

[4] Obatomi DK, Bach PH. Atractyloside nephrotoxicity: in vitro studies with suspensions of rat renal fragments and precision-cut cortical slices[J]. In Vitro Mol Toxicol, 2000, 13: 25-36.

[5] Daniele C, Dahamna S, Firuzi O, et al. *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review [J]. J of Ethnopharmacol, 2005, 97: 175-181.

[6] Zaim N, Guemouri L, Lamnaouer D, et al. Study of four cases of poisoning by *Atractylis gummifera* L. in morocco[J]. Therapie, 2008, 63(1): 49-54.

[7] 徐宁, 黄留业, 李绥军. 大剂量苍耳子中毒致急性肝功损害 1 例 [J]. 滨州医学院学报, 2010, 33(3): 191.

[8] 李秀婷. 儿童苍耳子中毒 12 例抢救体会[J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(7): 746-747.

(编辑：宋威)

温郁金和桂郁金红外光谱的 SIMCA 聚类鉴别方法研究

郭 昊<sup>1</sup>, 杜伟锋<sup>1</sup>, 蔡宝昌<sup>1,2</sup>, 丛晓东<sup>1</sup>, 葛卫红<sup>1</sup>(1. 浙江中医药大学中药炮制技术中心, 浙江 杭州 311401; 2. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210049)

摘要：目的 以温郁金和桂郁金的红外光谱为聚类分析对象，研究红外光谱结合(Soft independent modeling of classanalogy, SIMCA)聚类分析法对温郁金和桂郁金进行识别与分类的可行性。方法 以 4000~650 cm<sup>-1</sup> 范围

收稿日期：2012-12-13  
作者简介：郭昊，女，硕士研究生，主要从事中药炮制及质量标准研究。Email: guohao0223@163.com。通讯作者：杜伟锋，男，助理研究员，主要从事中药炮制及质量标准研究。Email: duweifeng\_200158@sohu.com。  
基金项目：卫生部科学研究基金(WKJ2010-2-019)；浙江省中医药科学研究基金计划(2012ZB032)；浙江省教育厅科研计划(Y201224449)。