

模型,可快速准确测定国产血竭龙血素 A、龙血素 B 的百分含量。

由实验结果知,样品间 HPLC 测定值相差较大,这可能与样品间差异有关。龙血素 B 大部分样品的百分偏差都在 1%~5% 之间。国家药品监督管理局国家标准颁布件 WS3-028(Z-016)-99(Z)中要求龙血素 B 含量不低于 0.4%,47 个样品均符合要求,但若再增大样本量,模型可能会更为准确。

中药的质量问题一直是中药研究的热点。中药的成分复杂,分析过程繁琐,近红外分析方法能快速有效测定出中药中的指标性成分含量,对提高制剂的质量标准有一定的意义。

参考文献:

- [1] 杨晓宇,姚琳. 龙血竭的药理作用及临床应用[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(2): 265-266.
- [2] 邓家刚,黄海滨,农毅清,等. 龙血素 B 的药效学实验研究[J]. 广西中医药, 2004, 27(1): 44-46.
- [3] 许佳,金红宇,孙磊. 替代对照品法测定龙血竭原料中龙血素 A 和 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2058.
- [4] 李忠琼,向东. HPLC 测定龙血竭中龙血素 A 和龙血素 B 的含量[J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(4): 348-349.
- [5] 孙胜利,宓鹤鸣,姜子洋. 反相高效液相色谱法测定国产血竭中龙血素 A 和 B 的含量[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(12): 1366-1368.
- [6] 王磊磊,陈聪,周旻,等. 近红外漫反射光谱法测定川藏道地药材蕲蒿子中黑芥子苷含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(10): 2673-2676.
- [7] 黄倩倩,潘瑞乐,魏建和,等. 近红外漫反射光谱法测定黄芩中总黄酮及黄芩苷的含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(9): 2425-2428.
- [8] 孙通,应义斌,刘魁武,等. 梨可溶性固形物含量的在线近红外光谱检测[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(11): 2536-2539.
- [9] 谢丽娟,刘东红,张宇环,等. 近红外光谱技术定量测定杨梅汁可溶性固形物[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(7): 1332-1335.
- [10] 陈建波,周群,彭新华,等. 基于黄芪注射液红外光谱指纹特征提取与黄芪甲苷的定量分析[A]. 中国光学学会、中国化学学会第十五届全国分子光谱学术报告会论文集[C]. 中国光学学会、中国化学学会, 2008, 28(10): 103-104.
- [11] 黄珺,袁洪福,宋春风,等. 近红外漫反射光谱法快速测定天然纤维素清洁浆料 α -纤维素含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(1): 60-64.
- [12] 孙素琴,周群,秦竹,等. FT-IR 和 FT-Raman 与中药的质量控制[J]. 光散射学报, 2003, 15(3): 203-207.

(编辑: 邓响潮)

液-质联用测定不同产地独活中蛇床子素和欧前胡素的含量

顿珠次仁¹, 朱根华², 邹志琴², 严志宏², 黄秀珍²(1. 西藏藏医学院, 西藏 拉萨 850000; 2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 建立不同产地独活中蛇床子素和欧前胡素含量的测定方法。**方法** 采用液相色谱-质谱联用(液-质联用)方法,测定 4 种不同产地独活中蛇床子素和欧前胡素的含量。液相色谱条件: 甲醇-水(体积比, 85:15)作流动相,流速为 0.3 mL·min⁻¹,柱温 30℃,进样量 5 μ L。质谱条件: 电喷雾离子源(ESI),阳离子模式,多反应监测(MRM)方式检测。采用外标法测定蛇床子素和欧前胡素的含量。**结果** 不同产地独活中蛇床子素含量范围为 1.11~5.02 μ g·g⁻¹,欧前胡素的含量范围 0.85~9.54 μ g·g⁻¹。**结论** 不同产地独活中蛇床子素和欧前胡素的含量存在一定的差异。该法可为不同地区独活中药材的质量控制提供参考标准。

关键词: 独活; 蛇床子素; 欧前胡素; 液-质联用

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-00105-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.026

Determination of Osthole and Imperatorin in Radix Angelicae Pubescentis from Different Habitats by HPLC-MS/MS

DUNZHU Ciren¹, ZHU Genhua², ZOU Zhiqin², YAN Zhihong², HUANG Xiuzhen² (1. Traditional Tibetan Medicine

收稿日期: 2014-09-24

作者简介: 顿珠次仁,男,硕士,讲师,研究方向: 藏药中药成分分析研究, Email: duncila@21cn.com。通讯作者: 严志宏,讲师,研究方向: 药物分析技术研究。Email: yanzhihong03@126.com。

基金项目: 江西中医药大学校基金——道地药材及特色中药资源研究专项(2012ZR022)。

College, Lhasa 850000 Tibet, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of osthole and imperatorin in *Radix Angelicae Pubescentis* from different habitats. **Methods** High performance liquid chromatography–mass spectrometry/ mass spectrometry (HPLC–MS/MS) was used for the determination of osthole and imperatorin in *Radix Angelicae Pubescentis* from four habitats. Chromatographic analysis was carried out on a C_{18} column ($3.5\ \mu\text{m}$, $10\ \text{cm} \times 2.1\ \text{mm}$) with methanol–water (v/v being $85:15$) as mobile phase. The flow rate was $0.3\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, column temperature was $30\ ^\circ\text{C}$, and injection volume was $5\ \mu\text{L}$. The condition of mass spectrometry was as follows: electrospray ionization (ESI) in cationic mode, and multiple reaction monitoring (MRM) detection mode. Finally, external standard method was used for the determination of osthole and imperatorin in *Radix Angelicae Pubescentis*. **Results** The content of osthole was in the range of $1.11 \sim 5.02\ \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and that of imperatorin was in the range of $0.85 \sim 9.54\ \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion** The contents of osthole and imperatorin in *Radix Angelicae Pubescentis* from different habitats vary, which may provide the reference standard for quality control of *Radix Angelicae Pubescentis*.

Keywords: *Radix Angelicae Pubescentis*; Osthole; Imperatorin; High performance liquid chromatography–mass spectrometry/ mass spectrometry (HPLC–MS/MS)

独活为伞形当归属植物重齿毛当归的干燥根。性味辛、苦，微温，归肝、肾、膀胱经，其功能主治祛风除湿，散寒止痛。主要用于治疗风寒湿痹，腰膝疼痛，少阴伏风头痛，头痛齿痛等症^[1]。独活是一味常用中药，始载于《神农本草经》，列为上品。主产于四川、湖北、安徽等地。目前，独活在全国范围内广泛栽培，不同产地的独活药材饮片在全国各地流通。药理研究表明，蛇床子素 (Osthole) 具有解痉、降血压、抗心律失常、增强免疫功能及广谱抗菌作用，临床用于温肾壮阳，燥湿，祛风，杀虫；外治外阴湿疹，妇人阴痒，滴虫性阴道炎^[2-5]。欧前胡素 (Imperatorin) 具有抗菌、平喘及抗过敏等作用^[6-8]。蛇床子素和欧前胡素均属香豆素类成分，其结构式如图 1 所示。有文献报道^[9-13]，采用液相色谱法 (HPLC) 和气相色谱法 (GC) 检测独活属中蛇床子素和欧前胡素的含量，但还未见关于液相色谱–质谱联用 (液–质联用，HPLC–MS/MS) 检测独活中蛇床子素和欧前胡素含量的报道。本研究采用 HPLC–MS/MS 法测定 4 个主要产地独活中蛇床子素和欧前胡素成分的含量。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 色谱系统，包括二元梯度泵，自动进样器，柱温箱，美国捷伦科技有限公司；质谱系统为 AB SCIEX Q-TRAP 4500，连 PEAK SCIENFIC 氮气发生器，工作站为 Analyst 1.6.1，美国 AB SCIEX 公司；双蒸水仪，SZ-93A 上海亚荣生化仪器厂；万分之一电子分析天平、水浴锅、超声波清

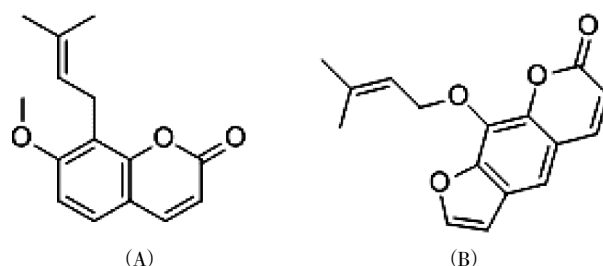


图 1 蛇床子素 (Osthole) (A) 和欧前胡素 (Imperatorin) (B) 的结构式

Figure 1 The structural formula of Osthole (A) and Imperatorin (B)

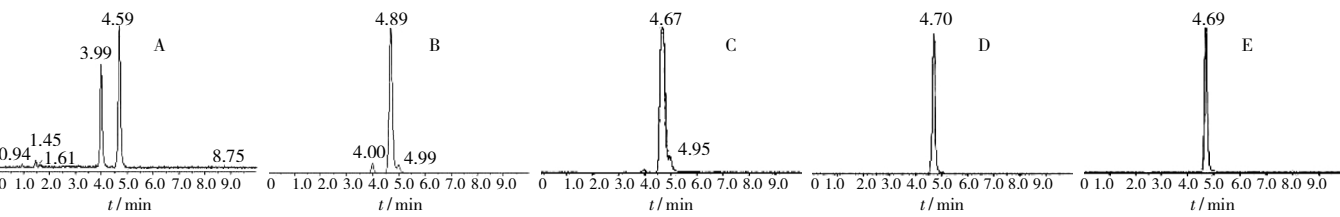
洗器，昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂及药材 蛇床子素 (批号：110822–201308) 和欧前胡素 (批号：110826–201214) 对照品，中国药品生物制品检定研究院；甲醇，美国 HPLC/Spectro Tedia 公司；超纯水，自制。四川独活、湖北独活、甘肃独活、陇西独活 4 个不同产地的独活，均购自南昌开心人大药房，经江西中医药大学龚千锋教授鉴定均为独活药材。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱：Ultimate[®] XB- C_{18} ($3.5\ \mu\text{m}$, $10\ \text{cm} \times 2.1\ \text{mm}$)，柱温： $30\ ^\circ\text{C}$ ，流动相：甲醇–水 ($v/v\ 85:15$)；等度洗脱：0~10 min，流速： $0.30\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；进样体积： $5\ \mu\text{L}$ 。在上述色谱条件下，供试品和对照品中蛇床子素和欧前胡素液–质分析图谱见图 2。

2.2 质谱条件 离子源为 ESI，正离子检测 (+)，检测



A. 对照品; B. 湖北独活; C. 四川独活; D. 陕西独活; E. 甘肃独活

图 2 蛇床子素、欧前胡素的液-质分析图谱

Figure 2 HPLC-MS/MS chromatograms of Osthole and Imperatorin

方式为多反应监测(MRM)方式;质谱条件具体为:气帘气(CUR)25 psi,碰撞气(CAD)Medium。电喷雾电压(Is)5500 V,离子源温度(TEM)500 ℃,雾化气(GS1)55 psi,辅助加热气(GS2)60 psi。驻留时间100 ms;各分析物MRM参数见表1。图3所示为蛇床子素一级、二级质谱图(A),欧前胡素一级、二级质谱图(B)。

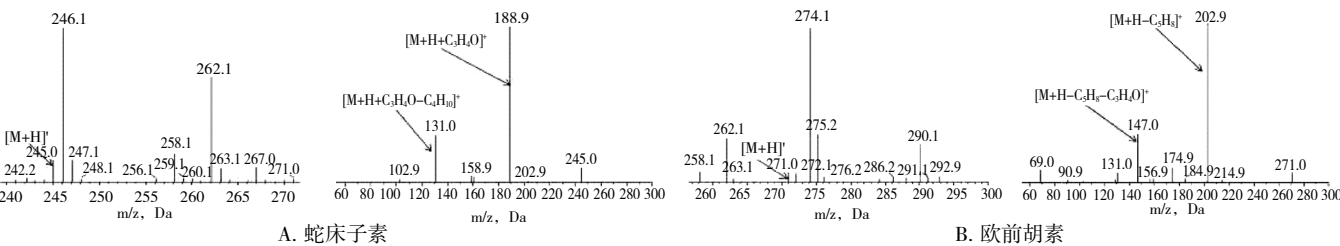


图 3 蛇床子素及欧前胡素一级、二级质谱图

Figure 3 Primary and secondary mass spectrogram of Osthole(A) and Imperatorin(B)

2.3 供试品溶液制备 将四川独活、湖北独活、甘肃独活、陇西独活药材分别打粉、过9号筛,精密称取四川独活(1.0208 g)、湖北独活(1.0271 g)、甘肃独活(1.0289 g)、陇西独活(1.0254 g)粉末。将10倍量的甲醇倒入装有药材的圆底烧瓶,80 ℃加热回流1 h,冷却取出上清液,重复3次。将3次得到的上清液汇集进行旋蒸,得到4种独活的甲醇溶解物(<10 mL),然后分别加甲醇溶解至100 mL容量瓶中定容,一份再稀释500倍即得测试样品,分别检测。

2.4 对照品溶液制备 精密称取蛇床子素、欧前胡素对照品各4 mg,分别放置于100 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释定容至刻度,摇匀;精密量取1 mL置100 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.5 线性关系考察 分别将蛇床子素(400 ng·mL⁻¹)、欧前胡素(400 ng·mL⁻¹)溶液混合、用甲醇稀释至100, 50, 25, 12.5, 6.25 ng·mL⁻¹,浓度从低到高依次注入液-质色谱仪,记录峰面积。以峰面积(Y)对质量浓度(X, ng·mL⁻¹)绘制标准曲线,回归方程、线性范围和相关系数见表2。

表 1 欧前胡素和蛇床子素的MRM参数

Table 1 MR/MS parameters of Osthole and Imperatorin				
化合物	母离子分子量(Da)	子离子分子量(Da)	裂解电压/V	碰撞电压/V
蛇床子素 (Osthole)	245.0	188.9	56.0	19
	245.0	131.0	56.0	35
欧前胡素 (Imperatorin)	271.0	202.9	61.0	17
	271.0	147.0	61.0	43

表 2 欧前胡素和蛇床子素分析的相关参数

Table 2 Validation parameters of the determination of Osthole and Imperatorin			
化合物	MRM 离子对	线性范围/ng·mL ⁻¹	相关系数(r)
蛇床子素(Osthole)	245.0→188.9	6.25~100	0.9993
欧前胡素(Imperatorin)	271.0→202.9	6.25~100	0.9994

2.6 方法学考察

2.6.1 仪器精密度试验 用甲醇稀释得到25, 6.25 ng·mL⁻¹蛇床子素和欧前胡素的混合对照品溶液。取该混合对照品溶液每3 h测定1次浓度,共6次,计算日内精密度;隔日测定1次浓度,共6次,计算日间精密度。测得蛇床子素的日内精密度和日间精密度的RSD分别为4.2%,4.5%;欧前胡素的日内精密度和日间精密度的RSD分别为4.3%,4.4%。表明仪器精密度良好。

2.6.2 样品稳定性试验 取同一份供试品溶液,在相同条件下分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h进行测定,记录总离子流图。测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积值RSD均小于2.6%,表明供试品在24 h

内稳定性较好。

2.6.3 重复性试验 取同一批样品 6 份，按照 2.3 项方法制备供试品溶液，按 2.1 和 2.2 项色谱条件和质谱条件进样，记录总离子流图。测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积值 RSD 均小于 4.2 %，结果表明该方法重复性良好。

2.6.4 加样回收试验 精密称取四川独活、湖北独活、甘肃独活、陇西独活药材粉末 0.5 g，分别加入蛇床子素、欧前胡素标准品，加标为 3 个浓度：6.25，12.5 和 50 ng·mL⁻¹，充分混匀。按前述方法采集谱图，并利用所建立的定量校正方法分析含量。平行做 5 次实验，分别计算加样回收率。四川独活、湖北独活、甘肃独活、陇西独活中平均回收率分别为 98.5 %，97.8 %，98.1%，97.9 %，RSD 分别为 0.32 %，0.63 %，0.51 %，0.76 %。说明方法准确可靠。

2.7 样品的测定 按照上述确定的方法，对 4 个不同产地独活进行了测定，换算得到 4 个产地独活的含量，结果见表 3。

表 3 独活中欧前胡素和蛇床子素含量测定结果

Table 3 Determination of Imperatorin and Osthol		
样品产地	蛇床子素 /μg·g ⁻¹	欧前胡素 /μg·g ⁻¹
四川独活	2.65	3.87
湖北独活	5.02	9.54
甘肃独活	1.18	1.49
陇西独活	1.11	0.85

3 讨论

本研究采用液-质联用技术测定独活药材中蛇床子素、欧前胡素的含量，具有灵敏度高、专属性强等优点。本方法采用等度洗脱，方法简单，完成一次色谱进行分析只需 11 min。相比文献报道^[13-17]的 HPLC 检测时间为 30 min 左右，大大缩短了分析时间。该法操作简便，省时、省溶剂，准确可靠，适用于对独活药材中有效成分进行准确的含量测定。

蛇床子素和欧前胡素在 6.25~100 ng·mL⁻¹之内线性关系良好，并有较好的重现性，方法准确可靠。不同产地独活蛇床子素和欧前胡素含量差异较大，不同产地独活中蛇床子素含量远高于欧前胡素；独活药材中这两种相差大的成分对独活药效的影响还待进一步研究。湖北独活中蛇床子素含量最高，达到中国药典

规定的含量，而四川独活、甘肃独活和陕西独活中蛇床子素浓度均偏低。因此，对不同产地独活的有效成分进行准确的含量测定，对于临床用药安全具有重要指导意义。

参考文献：

[1] 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，2010：246.

[2] 张志祖，连其身，曾靖，等. 蛇床子总香豆素的抗心律失常作用[J]. 中国中药杂志，1995，20（2）：114.

[3] 李乐，庄斐尔，赵更生，等. 蛇床子素对家兔主动脉条的钙拮抗作用[J]. 中国药理学通报，1992，8(3):227.

[4] 刘桦，蒋韵，韩英. 蛇床子素对小鼠免疫药理作用的研究[J]. 中草药，1997，28(9)：543.

[5] Liao JM, Zhu QA, Lu HJ, et al. Effects of total coumarins of *Cnidium monnieri* on bone density and biomechanics of glucocorticoids-induced osteoporosis in rats [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1997, 18(6): 519.

[6] 连其深，胡晓. 蛇床子素镇痛镇静作用的研究[J]. 中药新药与临床药理，2000，11(4)：244.

[7] 李乐，邱瑜. 蛇床子素的局部麻醉作用[J]. 上海实验动物科学，1997，17(3)：133.

[8] Ngwendson JN, Bedir E, O kunji CO, et al. Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects[J]. *Die Pharmazie*, 2003, 58(8)：587.

[9] 邢婕，胡晓静，赵春杰，等. RP-HPLC 法测定独活中蛇床子素和异欧前胡素含量[J]. 沈阳药科大学学报，2006，23(2)：93.

[10] 孟繁浩，李遇伯，杨正毅，等. HPLC 法同时测定蛇床子中蛇床子素和欧前胡素含量[J]. 沈阳药科大学学报，2004，21(3)：201.

[11] 蒋庭玉. 拐芹当归化学成分研究[D]. 济南：山东大学，2011.

[12] 胡晓燕. 紫金沙提取物的制备工艺及质量控制研究[D]. 武汉：湖北中医药大学，2011.

[13] 袁欣. 独活主要成分的分离及含量测定研究概况[J]. 海峡药学，2013，25(6)：13.

[14] 石燕红，赵森森，王瑞，等. RP-HPLC 同时测定独活中蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯的含量[J]. 中国药学杂志，2010，45（16）：1270.

[15] 邹继红，娜日苏，杨慧明，等. 反相高效液相色谱法测定独活中蛇床子素与异欧前胡素的含量[J]. 赤峰学院学报，2010，2(2)：63.

[16] 李玉兰，高美华. HPLC 同时测定独活中蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯含量[J]. 中国医药指南，2010，7(19)：59.

[17] 薛磊冰，周燕，金佩芬. HPLC 法测定岷夷片中蛇床子素和二氢欧芹醇当归酸酯含量[J]. 中国药师，2014，17(4)：697.

（编辑：邓响潮）