

基于 UHPLC-MS/MS 苦参实定性定量及其入血成分分析

宿美凤^{1,2}, 雒晓梅¹, 王小明¹, 常晓燕¹, 王卫华³, 孙虹¹, 李壮壮¹, 石钺^{1,2*}

1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

3. 清华大学 药学技术中心, 北京 100084

摘要: 目的 基于 UPLC-Q-Exactive 轨道阱高分辨质谱技术分析鉴定苦参实及其入血成分, 采用 UHPLC-MS/MS 同时定量分析苦参实中 6 种生物碱。方法 采用 Waters HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸乙腈 (10 mmol/L 醋酸铵) 溶液 (A) 和 0.1% 甲酸水 (10 mmol/L 醋酸铵) 溶液 (B), 梯度洗脱; 质谱采用电喷雾离子源 (ESI); 正离子模式下采集数据进行定性定量分析。结果 苦参实样品中共鉴定 34 个色谱峰, 大多数为生物碱类化学成分, 有 26 个, 血浆样品中共鉴定了 18 个生物碱以原型入血的色谱峰。苦参实中 6 种生物碱的总质量分数高达 18.5%, 其中氧化苦参碱含量最高。结论 苦参实含有大量的生物碱类物质, 苦参实的急性毒性可能是由于生物碱成分直接入血, 本研究为苦参实的开发利用提供参考。

关键词: 苦参实; 液质联用; 氧化苦参碱; 入血成分; UHPLC-MS/MS; *N*-甲基雀舌花碱; 苦参碱; 槐果碱; 槐定碱; 氧化槐果碱; 氧化苦参碱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)09-2041-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.006

Qualitative and quantitative determination of *Sophora flavescens* seeds and analysis of its blood components based on UHPLC-MS/MS

SU Mei-feng^{1,2}, LUO Xiao-mei¹, WANG Xiao-ming¹, CHANG Xiao-yan¹, WANG Wei-hua³, SUN Hong¹, LI Zhuang-zhuang¹, SHI Yue^{1,2}

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

2. College of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Center of Pharmaceutical Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: Objective Based on UPLC-Q-Exactive orbitrap high-resolution mass spectrometry, qualitative analysis of *Sophora flavescens* seeds and its blood components were analyzed, and UHPLC-MS/MS quantitative analysis of six alkaloids in *Sophora flavescens* seeds were performed. **Methods** The separation was performed on the Waters HSS T3 column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), with mobile phase 0.1% formic acid acetonitrile (10 mmol/L ammonium acetate) solution (A) and 0.1% formic acid water (10 mmol/L ammonium acetate) solution (B) for gradient elution. Electrospray (ESI) ion source was used in mass spectrometry; Data were collected in positive ion mode for qualitative and quantitative analysis. **Results** A total of 34 chromatographic peaks were identified in the samples of *Sophora flavescens* seeds. Most of them were 26 alkaloids. A total of 18 alkaloids were identified in the plasma samples. The content of six alkaloids in *Sophora flavescens* seeds was up to 18.5%, and the content of oxymatrine was the highest. **Conclusion** The acute toxicity of *Sophora flavescens* seeds may be due to the alkaloids entering into blood directly. This study provides a reference for the development and utilization of *Sophora flavescens* seeds.

Key words: *Sophora flavescens* seeds; LC-MS; oxymatrine; blood components; UHPLC-MS/MS; *N*-methyl cytosine; matrine; sophocarpine; sophoridine; oxysophocarpine; oxymatrine

苦参 *Sophora flavescens* Ait. 为豆科槐属植物, 药事业的快速发展, 中药非药用部位引起了越来越传统中药苦参的药用部位为根。近年来, 随着中医学 多的研究者的关注。苦参实为豆科槐属植物苦参的

收稿日期: 2018-11-19

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (重大协同创新项目 2016-12M-1)

作者简介: 宿美凤 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及质量控制研究。Tel: 18810820867 E-mail: sumeifeng8@163.com

*通信作者 石钺 (1963—), 男, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail: shiyue1029@126.com

种子。《唐本草》正名为“苦参实”，至《本草纲目》标明异名“苦参子”，可为药用，性味苦寒，能够明目、健胃与驱虫，善治急性菌痢、大便秘结等^[1]。近年来苦参实的研究主要集中在苦参种子的萌发和育苗方面，其化学成分报道相对较少，主要为苦参种仁油的提取工艺、理化性质、脂肪酸组成和不皂化物的研究^[2-4]，文献报道苦参实中含有高含量的生物碱类物质和丰富的脂肪酸类物质，并且苦参实脂肪酸提取物具有良好的抗氧化作用^[5-6]。本实验采用 UPLC-Q-Exactive 轨道阱高分辨质谱技术，根据色谱峰保留时间、精确相对分子质量和离子碎片信息，与对照品及相关文献进行比对，对苦参实及其入血的化学成分进行分析，为苦参实今后的研究提供物质基础。

1 材料与试剂

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠，雌雄各半，体质量 (180±20)g，购自北京市维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK (京) 2016-0006，饲养于中国医学科学院药用植物研究所 SPF 动物实验中心 (20~25℃，湿度 40%~60%)，开展实验前适应性饲喂 7 d，自由饮水进食。

1.2 药品

苦参实购于内蒙古赤峰，经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员鉴定为豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的成熟种子。样品保存于中国医学科学院药用植物研究所植物化学一室。

对照品苦参碱 (批号 CHB-K-008)、氧化苦参碱 (批号 CHB-Y-053)、槐定碱 (批号 CHB-H-062) 购自成都克洛玛生物科技有限公司；槐果碱 (批号 MUST-17061205) 购自成都曼斯特生物科技有限公司；氧化槐果碱 (批号 Z18S6B3547) 购自上海源叶科技有限公司；N-甲基金雀花碱 (批号 J-032-161216)、内标物荷叶碱 (批号 H-042-170301) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司。HPLC 测定对照品质量分数均>98%。

1.3 试剂

95%乙醇购于北京化工厂；HPLC 级乙腈购于 Honeywell Burdick & Jackson 公司；色谱级甲酸购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司；色谱级醋酸铵购于 ROE Scientific Inc 公司；去离子水由 Milli-Q 纯水系统制备。

1.4 仪器

Ultimate 3000 超高效液相 (美国戴安公司) 串

联 Thermo Q ExactiveTM Plus OrbitrapTM 高分辨质谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司)；Agilent 1290 超高效液相串联 Agilent 6460 高分辨质谱仪 (美国安捷伦公司)；ES-1201-P 电子天平称 (1 200 g，长沙湘平科技发展有限公司)；IKA RV10 旋转蒸发仪 (德国 IKA 公司)；DZF-6053 真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司)；5 000 mL 恒温电热套 (北京中兴伟业仪器有限公司)；德国西门子冰箱 (4℃、-20℃)，Mettler Toledo AB135-S 型分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司)，Eppendorf 移液器 (德国艾本德有限公司)。

2 方法与结果

2.1 苦参实提取物的制备

苦参实适度粉碎 (过 20 目筛)，95%乙醇热回流提取 3 次，每次 1 h，收集提取液，回收溶剂，真空干燥即得苦参实提取物，备用。

2.2 苦参实提取物定性分析及血浆样品分析

2.2.1 溶液的配制

(1) 对照品溶液的配制：分别精密称取苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱、氧化槐果碱、N-甲基金雀花碱配制为质量浓度为 1 mg/mL 的对照品储备液，备用。取对照品储备液，用 0.1%甲酸水 (10 mmol/L 醋酸铵) 溶液 (流动相 B) 稀释为 100 ng/mL 的混合对照品溶液经 UPLC-Q-Exactive 分析。

(2) 内标储备液配制：精密称取荷叶碱配制为质量浓度为 1 mg/mL 的内标储备液，备用。

(3) 供试品溶液的配制：称取“2.1”项下苦参实提取物 10 mg 溶于 8 mL 50%甲醇中，涡旋超声后，12 000 r/min 离心 10 min，取 5 μL 上清液经 UPLC-Q-Exactive 分析。

2.2.2 血浆样品的制备

(1) 含药血浆的制备：本实验室前期苦参实的单次给药毒性实验^[7]，发现苦参实给药剂量在 5 g/kg (每千克体质量 5 g 生药量) 以上时动物可能会出现中毒症状并且死亡。本实验采用 8 只雄性 Wistar 大鼠，给药组 5 只，给药剂量 6 g/kg，溶剂对照组 3 只，给予溶剂水，给药前禁食 12~16 h，自由饮水。给药体积 20 mL/kg，单次 ig 给药，观察动物状态以及毒性反应。试验过程中 1 只大鼠出现活动减少、闭目、蜷缩、竖毛，6 h 有动物出现惊厥、肌肉震颤等中毒反应症状并且死亡，发现死亡后立即取血至含有肝素钠的 EP 管中，上下适当摇晃几次防止凝血，至于 4℃，3 500 r/min 离心 10 min，取上清液 100 μL，加 4 倍量 0.1%甲酸乙腈涡旋，13 000 r/min

离心 10 min, 取上清液, 室温下氮气吹干, 加 100 μ L 流动相 B 复溶, 13 000 r/min 离心 2 次, 每次 10 min, 取最后 1 次离心上清液经 UPLC-Q-Exactive 分析。

(2) 空白血浆的制备: 溶剂对照组大鼠取血至含有肝素钠的 EP 管中, 上下适当摇晃几次防止凝血, 置于 4 $^{\circ}$ C, 前处理方法同含药血浆。

2.2.3 UPLC-Q-Exactive 条件

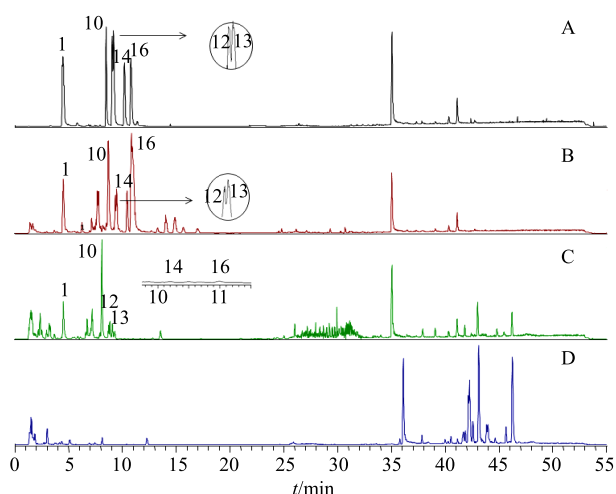
(1) 液相条件: 采用 Waters HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相为 0.1% 甲酸乙腈 (10 mmol/L 醋酸铵) 溶液 (A) 和 0.1% 甲酸水 (10 mmol/L 醋酸铵) 溶液 (B); 梯度洗脱: 0~1 min, 100% B; 1~3 min, 100%~95% B; 3~15 min, 95% B; 15~20 min, 95%~92% B; 20~45 min, 92%~10% B; 45~50 min, 10% B; 50~55 min, 100% B; 体积流量 0.2 mL/min; 进样体积 5 μ L; 柱温 35 $^{\circ}$ C。

(2) 质谱条件: 离子源为 HESI 源, 正离子检测模式, 喷雾电压+3 500 V; 毛细管温度 320 $^{\circ}$ C; 保护气体流量 3 510 L/min; 扫描模式: Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500, 扫描范围 m/z 100~1 500, 阶梯碰撞能量 20、40 和 60 eV。

2.2.4 样品分析 混合对照品、苦参实样品、血浆样品和空白血浆总离子流图见图 1。

通过 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱质谱分析方法, 通过 Compound Discoverer 2.1 软件与 ChemSpider、mzVault 和 mzCloud 数据库匹配, 以及通过精确相对分子质量与二级碎片离子与文献匹配, 从苦参实样品中共鉴定了 34 个色谱峰 (表 1), 其中 26 个为生物碱类成分, 包括苦参碱型 16 个、金雀花碱型 2 个、臭豆碱型 2 个、羽扇豆烷型 5 个和双哌啶型 1 个。

苦参实血浆样品与空白血浆通过 Compound Discoverer 2.1 软件对比, 排除内源性成分干扰, 通过 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱质谱分析方法, 与上述数据库匹配, 保留时间、精确相对分子质量和二级碎片离子与苦参实样品色谱图以及相关文献进行比较, 共鉴定了 18 个生物碱以原型入血, 其中包括苦参碱型 11 个、金雀花碱型 2 个、臭豆碱型 2 个、羽扇豆烷型 2 个和双哌啶型 1 个, 具体信息见表 1, 苦参实中主要化合物质谱图和结构图见图 2。苦参实及其入血的主要成分为苦参碱型



1-N-甲基金雀花碱 10-苦参碱 12-槐果碱 13-槐定碱 14-氧化槐果碱 16-氧化苦参碱
1-N-methyl cytosine 10-matrine 12-sophocarpine 13-sophoridine
14-oxysophocarpine 16-oxymatrine

图 1 混合对照品 (A)、苦参实提取物 (B)、血浆样品 (C) 和空白血浆 (D) 样品总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of mixed standard (A), *Sophora flavescens* seeds extract (B), plasma sample (C), and blank plasma (D)

表 1 苦参实样品及其血浆样品化合物鉴定

Table 1 Identification of *Sophora flavescens* seeds samples and their plasma samples

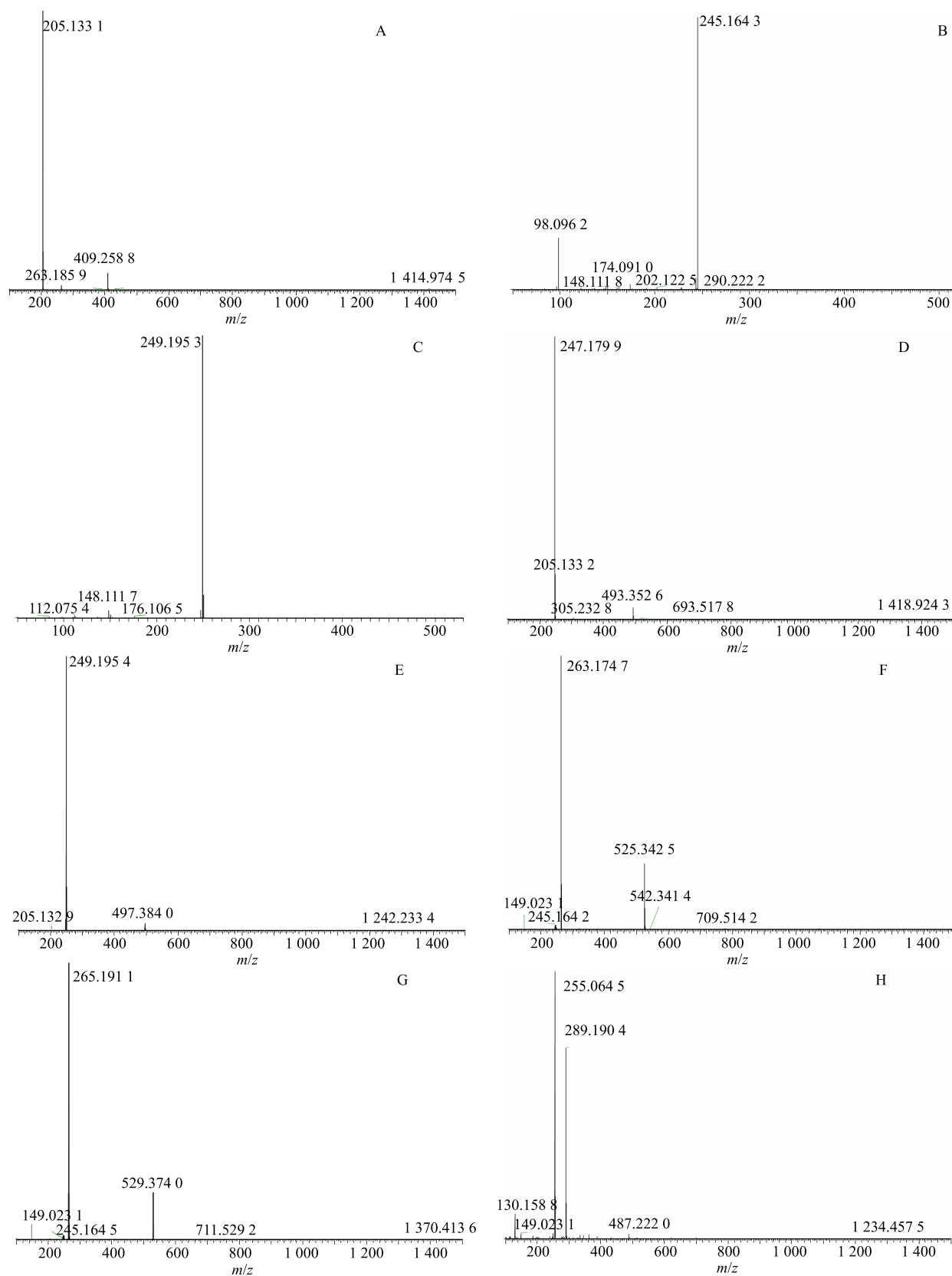
峰号	类型	化合物名称	分子式	t_R /min	[M+H] ⁺		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片峰	提取物	血浆
					测量值	计算值				
1	金雀花碱型	N-甲基金雀花碱 ^[8]	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	4.47	205.133 1	205.133 5	-0.440	149.023 1, 108.080 7, 58.065 5	√	√
2	双哌啶型	苦参胺碱或异苦参胺碱 ^[8]	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₂	4.84	223.143 5	223.144 1	-0.604	191.117 4, 162.091 0, 114.091 2	√	√
3	金雀花碱型	金雀花碱 ^[8]	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O	5.39	191.117 6	191.117 9	-0.290	150.968 6, 148.075 4	√	√
4	臭豆碱型	脲酰叶碱 ^[8]	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₂	6.22	261.159 2	261.159 8	-2.312	243.148 8, 164.106 8, 114.091 1	√	√
5	二氢黄酮	kuraridine ^[9]	C ₂₆ H ₃₀ O ₆	6.37	439.207 8	439.211 5	-3.715	277.155 2, 259.144 2, 241.133 7	√	—

续表 1

峰号	类型	化合物名称	分子式	t_R/min	[M+H] ⁺		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片峰	提取物	血浆
					测量值	计算值				
6	羽扇豆碱	黄叶槐碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	7.38	263.174 7	263.175 4	2.452	231.148 7	√	—
7	苦参碱型	leontalbinine <i>N</i> -oxide ^[8]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	8.00	263.174 7	263.175 4	2.452	245.165 4, 195.148 8, 166.122 4	√	√
8	苦参碱型	9a-羟基槐胺碱或 7a-羟基槐胺碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	8.19	261.159 0	261.159 8	2.252	243.148 5, 177.138 2, 150.127 3	√	—
9	臭豆碱型	臭豆碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	8.34	245.164 3	245.164 8	-0.540	148.111 8, 98.096 2	√	√
10	苦参碱型	苦参碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	8.58	249.195 3	249.196 1	-2.568	176.106 2, 148.111 6	√	√
11	苦参碱型	9a-羟基槐胺碱或 7a-羟基槐胺碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	8.95	261.159 1	261.159 8	-2.506	243.148 5, 177.139 2, 150.127 4, 136.112 0	√	—
12	苦参碱型	槐果碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	9.26	247.179 9	247.180 5	-2.386	179.153 9, 150.127 4, 136.111 9	√	—
13	苦参碱型	槐定碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	9.44	249.195 4	249.196 1	2.419	150.127 5	√	√
14	苦参碱型	氧化槐果碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	10.38	263.174 7	263.175 4	2.425	245.164 3, 150.127 4	√	√
15	羽扇豆碱	羽扇豆碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	10.86	249.195 4	249.196 1	2.419	166.122 0, 136.111 3	√	—
16	苦参碱型	氧化苦参碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	11.11	265.190 3	265.191 1	-2.845	247.179 9, 205.133 0, 148.111 7	√	√
17	羽扇豆碱型	9β-hydroxylamprolobine <i>N</i> -oxide ^[10]	C ₁₅ H ₂₅ N ₂ O ₄	13.13	297.180 2	297.180 8	-2.310	279.169 7, 138.127 5	√	—
18	苦参碱型	7,11-去氢苦参碱或莱曼碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	13.96	247.180 0	247.180 5	-0.490	176.106 7, 148.111 8	√	√
19	苦参碱型	5a-羟基槐果碱或 9a-羟基槐果碱或 12a-羟基槐果碱 ^[10]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	14.77	263.174 8	263.175 4	-2.297	245.164 4, 164.106 8	√	√
20	羽扇豆碱	lamprolobine ^[8]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	15.61	265.190 4	265.191 1	-2.468	150.127 5	√	√
21	苦参碱型	槐醇 ^[8]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	16.89	265.190 4	265.191 1	-2.468	247.179 9, 205.133 1	√	√
22	苦参碱型	9a-羟基苦参碱 ^[8]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	19.16	265.190 5	265.191 1	-2.091	247.180 0, 150.127 6	√	—
23	苦参碱型	9a-羟基氧化槐果碱 ^[10]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	19.78	279.169 8	279.170 3	-1.698	261.169 8, 149.023 1	√	√
24	羽扇豆碱型	氧化槐叶碱 ^[10]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	21.07	279.169 6	279.170 3	2.234	261.159 1, 177.138 2, 149.023 0	√	√
25	苦参碱型	氧化槐醇或 5a,9a-二羟基苦参碱 ^[10]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	24.75	281.185 4	281.186 0	-2.024	263.174 8, 243.140 6, 149.023 1	√	√
26	黄酮醇	5,7-二羟基-4-甲氧基黄酮-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -木 糖-(1-6)-β- <i>D</i> -葡萄糖或 5,7-二羟基-4-甲 氧基黄酮-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -芹糖-(1-6)-β- <i>D</i> -葡 萄糖 ^[10]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	25.65	595.164 5	595.165 7	-2.094	433.112 5, 397.090 6, 313.069 8, 271.059 4	√	—
27	苦参碱型	5a-羟基槐果碱或 9a-羟基槐果碱或 12a-羟基槐果碱 ^[10]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	26.27	263.174 7	263.175 4	-2.677	245.164 2, 176.130 5, 164.107 3	√	√
28	苦参碱型	氧化槐醇或 5a,9a-二羟基苦参碱 ^[10]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	26.49	281.186 2	281.186 0	-3.080	263.175 7, 149.023 5, 138.127 9	√	—
29	异黄酮	daidzin ^[11]	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	27.62	417.117 1	417.118 0	-2.178	255.064 5, 199.074 9	√	—
30	异黄酮	大豆素 ^[11]	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	30.81	255.064 5	255.065 2	-2.687	227.069 9	√	—
31	异黄酮	毛蕊异黄酮 ^[10]	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	31.19	285.075 1	285.075 8	-2.280	270.051 5, 253.048 8, 225.054 0	√	—
32	紫檀素类	高丽槐素 ^[11]	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	31.44	285.075 2	285.075 8	-1.929	257.044 5, 172.205 7	√	—
33	异黄酮	pseudobaptigenin ^[10]	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	34.25	283.059 6	283.060 1	-2.826	249.195 7, 200.237 0, 130.158 9	√	—
34	异黄酮	刺芒柄花素 ^[9]	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	34.55	269.081 1	269.081 1	-2.733	254.054 0, 213.090 6, 137.023 2, 118.041 1	√	—

√-检测到 —未检测到

√-detected —not detected



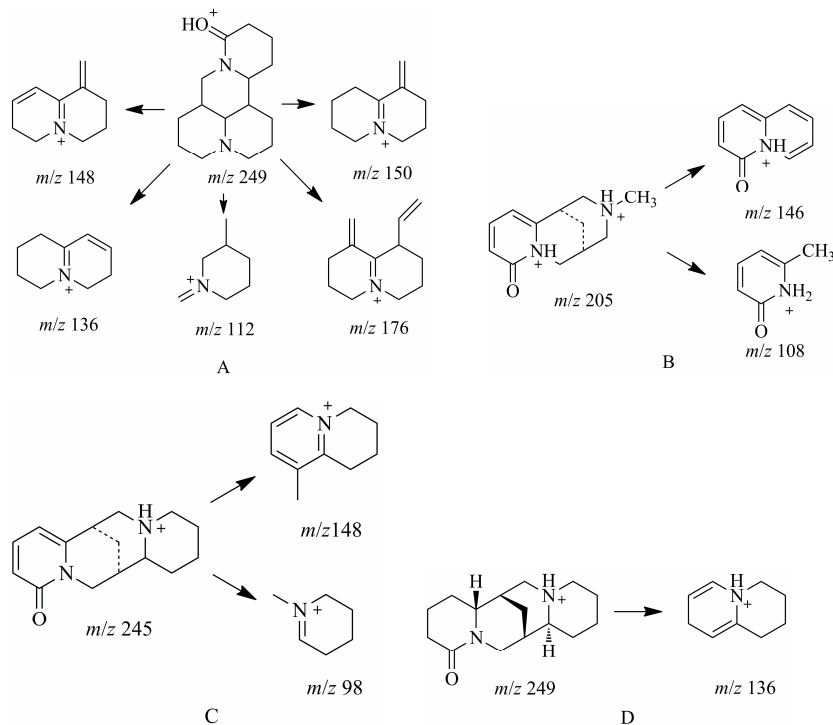
A-N-甲基雀舌花碱 B-臭豆碱 C-苦参碱 D-槐果碱 E-槐定碱 F-氧化槐果碱 G-氧化苦参碱 H-大豆素
A-N-methyl cytosine B-anagyrene C-matrine D-sophocarpine E-sophoridine F-oxysophocarpine G-oxymatrine H-daidzin

图 2 苦参实中主要化合物一级质谱图

Fig. 2 First-order mass spectrum of major compounds in *Sophora flavescens* seeds

生物碱, 苦参碱型生物碱属喹诺里西啉类生物碱, 当该类化合物存在 13/14 位双键或 5、7 位存在羟基脱水后再 16-17 位或 11-16 位形成双键, 使该类化

合物易在 11-12 位和 15-16 位发生 RDA 裂解, 其特征离子峰为 136、148、150、176。苦参实中主要生物碱的裂解规律见图 3。



A-苦参碱 B-N-甲基金雀花碱 C-臭豆碱 D-羽扇豆碱
A-matine B-N-methyl cytisine C-ananrine D-lupinine

图 3 苦参实中主要生物碱裂解图

Fig. 3 Pyrolysis diagram of main alkaloid in *Sophora flavescens* seeds

2.3 苦参实提取物中 6 种生物碱同时定量分析

2.3.1 对照品的配制 取对照品储备液用内标液稀释成含 30 ng/mL 内标物, 质量浓度为 1~250 ng/mL 系列对照品溶液, 用以线性考察。

2.3.2 供试品的配制 称取“2.1”项下苦参实提取物 10 mg 溶于 4 mL 50%甲醇中, 涡旋超声后, 用内标液将其稀释成每毫升含 30 ng 内标物的适当浓度后 12 000 r/min 离心 10 min, 取 10 μ L 上清液经 UHPLC-MS-MS 分析。

2.3.3 定量条件 液相条件: 采用 Waters HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相 0.1% 甲酸乙腈 (10 mmol/L 醋酸铵) 溶液 (A) 和 0.1% 甲酸水 (10 mmol/L 醋酸铵) 溶液 (B); 梯度洗脱: 0~1 min, 100% B; 1~3 min, 100%~95% B; 3~15 min, 95% B; 15~20 min, 95%~92% B; 20~22 min, 92%~30% B; 体积流量 0.2 mL/min; 进样体积 10 μ L; 自动进样器温度 10 $^{\circ}$ C; 柱温 35 $^{\circ}$ C。

质谱条件: 采用带 Jet Stream 电喷雾 ESI 离子源,

氮气发生器 (上海 PEAK 公司) 用于脱溶剂和雾化, 高纯氮气作为碰撞气。鞘气温度 350 $^{\circ}$ C, 鞘气体积流量 10 L/min, 气体温度 325 $^{\circ}$ C, 气体体积流量为 8 L/min。毛细管电压 4 000 V, 雾化气压力 45 psi (1 psi = 6.895 kPa), 喷嘴电压为 1 000 V, 将目标物分别在正离子条件下进行多反应监测 (MRM) 模式检测, 检测条件见表 2。

2.3.4 方法学考察 根据《中国药典》2015 年版药

表 2 6 种生物碱 MRM 模式检测参数

Table 2 Parameters of six alkaloids detected by MRM

成分	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	Fragmentor/V	碰撞能量 (CE)/eV
苦参碱	249.3	148.1	200	40
氧化苦参碱	265.2	205.1	200	40
槐定碱	249.3	152.1	200	40
槐果碱	247.2	96.1	200	40
氧化槐果碱	263.1	245.2	200	20
N-甲基金雀花碱	205.1	58.2	160	40

品质量标准分析方法验证指导原则进行线性关系、检测限、定量限、精密度、重复性和稳定性进行方法学考察^[12], 多反应监测 (MRM) 图见图 4。

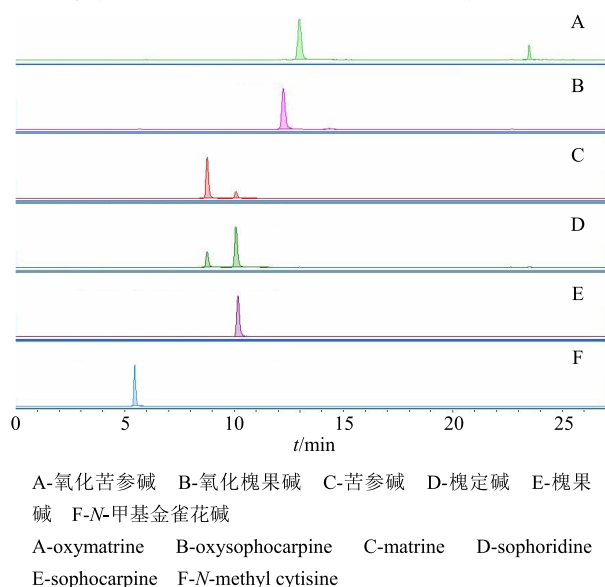


图 4 6 种生物碱 MRM 图

Fig. 4 MRM map of six alkaloids

表 3 苦参实中 6 种生物碱的线性方程和相关系数

Table 3 Linear equations and correlation coefficients of six alkaloids in *Sophora flavescens* seeds

成分	线性方程	r	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	检测限/ (ng·mL ⁻¹)	定量限/ (ng·mL ⁻¹)
苦参碱	$Y=0.194\ 2\ X+0.002\ 26$	0.997\ 2	1~250	0.005\ 0	0.025
氧化苦参碱	$Y=0.086\ 6\ X+0.000\ 703$	0.999\ 6	1~250	0.040\ 0	0.080
槐果碱	$Y=0.218\ 6\ X+0.002\ 50$	0.996\ 4	1~250	0.010\ 0	0.040
氧化槐果碱	$Y=0.108\ 2\ X+0.000\ 910$	0.999\ 5	1~250	0.050\ 0	0.080
槐定碱	$Y=0.075\ 4\ X+0.000\ 759$	0.998\ 0	1~250	0.010\ 0	0.025
N-甲基雀舌花碱	$Y=0.877\ 1\ X+0.010\ 2$	0.996\ 5	1~250	0.002\ 5	0.010

(5) 回收率试验: 取已知含量的苦参实样品适量, 分别按照已知含量的 80%、100%、120% 3 个水平加入对照品, 平行 3 份, 按“2.3.2”项下制备方法制备供试品溶液, 分别进样, 按“2.3.3”项下方法测定, 计算平均回收率, 显示各成分平均回收率为 90%~110%, RSD 均小于 3%, 表明本方法准确度良好。

2.3.5 样品分析 本实验通过对待测 6 个生物碱成分质谱参数进行优化, 选定最优的 MRM 模式定量离子对, 按“2.3”项下方法同时、快速、准确的测定苦参实中苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱、氧化槐果碱和 N-甲基雀舌花碱的含量, 平行 5 份。

(1) 线性关系、检测限和定量限试验: 取“2.3.1”项下对照品溶液, 按“2.3.3”项下色谱条件依法测定, 用内标法进行线性回归, 计算相关系数; 检测限和定量限分别在信噪比为 3 和 10 时测定。所测定的 6 个化合物成分线性关系良好, 灵敏可靠, 结果见表 3。

(2) 精密度试验: 取适当浓度对照品溶液, 在“2.3.3”项色谱条件下重复进样 6 次, 测定各待测成分的峰面积, 以峰面积的相对标准偏差 (RSD) 评价精密度。结果显示各成分的峰面积 RSD 均小于 3%, 表明该方法精密度良好。

(3) 重复性试验: 按照“2.3.2”项下供试品制备方法, 取同一样品制备供试品溶液 (平行 6 份), 测定各峰面积的 RSD 评价重复性。结果表明各成分峰面积 RSD 均小于 3%。表明该方法重复性良好。

(4) 稳定性试验: 取重复性试验中的一份供试品溶液, 分别于 0、4、8、12、24 和 48 h 进样分析, 计算各峰面积, 结果显示各成分峰面积 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

结果显示苦参实中 6 种生物碱的总量为 184.501 mg/g, 其中氧化苦参碱含量最高, 达到 104.159 mg/g, 苦参碱 40.375 mg/g、槐果碱 4.821 mg/g、氧化槐果碱 13.239 mg/g、槐定碱 8.424 mg/g、N-甲基雀舌花碱 13.501 mg/g。

3 讨论

文献报道苦参实含有生物碱、脂肪酸、黄酮等物质, 95% 的乙醇可以将这些物质较好地提取出来。本实验考察了 Waters HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), Waters BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) 和 Agilent EXTEND C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 最终选择 Waters HSS T3

色谱柱, 因其对于苦参碱类生物碱有良好的分离度和灵敏度。还比较了 4 种流动相体系: 乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-10 mmol/L 醋酸铵、乙腈-0.1%甲酸水(10 mmol/L 醋酸铵)和 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水(10 mmol/L 醋酸铵), 表明 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水(10 mmol/L 醋酸铵)最佳。

本实验室前期实验发现苦参实单次给药有毒, 其半数致死量(LD₅₀)为 15.6 g/kg, 本实验的血浆样品来自于服用苦参实提取物发生毒性反应并死亡的动物, 通过 UPLC-Q-Exactive 分析, 苦参实提取物中有 18 个生物碱以原型入血, 通过苦参实定量分析其含有大量氧化苦参碱和苦参碱, 并且苦参碱、氧化苦参碱具有急性毒性文献报道此类生物碱中毒时动物活动减少, 出现闭目、蜷缩、竖毛、惊厥肌肉震颤等症状^[12], 苦参实中毒症状与该类生物碱的中毒症状相似, 苦参实毒性成分分析实验得到苦参实的主要毒性部分为生物碱部分^[7], 通过苦参实入血成分的定性分析表明苦参实的单次给药毒性可能与生物碱类物质直接入血有关。

苦参广泛种植于我国南北各省, 其种植面积逐渐扩大, 每年有大量的苦参实未被利用成为工业废物。苦参实曾被收录于吉林省药品标准^[13], 也有文献报道其临床应用^[14-17], 但是对其物质基础研究较少, 苦参碱类生物碱是苦参的主要药效物质^[18-19], 因此苦参实具有良好的开发利用前景, 本实验为苦参实的开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 靖媛, 苑述刚, 阮时宝. 苦参的历代研究与应用 [J]. 光明中医, 2007, 22(12): 47-50.
- [2] 杨柳, 赵文杰, 卢奎. 苦参子仁油提取工艺研究 [J]. 农业机械, 2011, 10(14): 44-46.
- [3] 赵文杰, 刘星, 付苗苗, 等. 苦参子仁油不皂化物的 GC-MS 分析 [J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2008, 29(4): 14-15.
- [4] 孙保帅, 杨君, 赵文杰. 苦参子仁油的理化特性及脂肪酸组成分析 [J]. 粮油加工, 2009(9): 59-60.
- [5] 翁泽斌, 段金彪, 郭盛, 等. 山西产苦参种子生物碱类化学成分分析及其资源化价值探讨 [J]. 中国中药志, 2016, 41(17): 3265-3271.
- [6] Weng Z B, Guo S, Qian D W, et al. *Sophora flavescens* seed as a promising high potential by-product: Phytochemical characterization and bioactivity evaluation [J]. *Ind Crops Prod*, 2017, 109: 19-26.
- [7] 宿美凤. 苦参实毒性成分分析 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(3): 303-306.
- [8] Liu G Q, Dong J, Wang H, et al. Characterization of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 54(5): 1065-1072.
- [9] Zhang L, Xu L, Xiao S S, et al. Characterization of flavonoids in the extract of *Sophora flavescens* Ait. by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector and electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(5): 1019-1028.
- [10] 赵凤春. 苦参不同部位化学成分及含量差异研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [11] Weng Z B, Zeng F, Zhu Z H, et al. Comparative analysis of sixteen flavonoids from different parts of *Sophora alopecuroides* Ait. by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 156: 214-220.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [13] 戴五好, 钱利武, 王丽丽, 等. 苦参碱、氧化苦参碱对小鼠的毒性研究 [J]. 安徽医药, 2012, 16(7): 904-905.
- [14] 吉林省药品标准 [S]. 1977.
- [15] 管永昌, 魏菊仙. 中医验方集锦 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.
- [16] 程运乾. 中医皮肤病学简编 [M]. 西安: 陕西人民出版社, 1979.
- [17] 王国铨, 沙克千. 苦参子的临床应用 [J]. 中级医刊, 1983(5): 55.
- [18] 张翹, 马悦, 高慧敏, 等. 苦参化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 205-214.
- [19] 张丽华, 陈邦恩, 潘明佳. 苦参碱药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 1000-1003.