

高分离度快速液相色谱-三重串联四极杆质谱快速检查半夏和虎掌南星中水麦冬酸

聂黎行, 康 帅, 张南平, 戴 忠, 魏 锋, 马双成*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: **目的** 建立半夏及其伪品虎掌南星中水麦冬酸的专属性检测方法。**方法** 样品经水超声提取, 利用高分离度快速液相色谱-三重四极杆质谱 (rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry, RRLC-QQQ/MS) 检测水麦冬酸。采用 Agilent SB-C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸 (5:95) 为流动相。柱温 30℃, 体积流量 0.2 mL/min, 进样量 1 μL。离子化模式为 ESI, 选择 m/z 187→143 和 m/z 187→99 作为检测离子对, 进行多反应监测。**结果** 检出限为 4.6 μg/L。11 批半夏中有 3 批检出水麦冬酸, 7 批虎掌南星均检出水麦冬酸, 半夏中水麦冬酸含量低于虎掌南星。**结论** 所建方法专属、准确、快速、简便, 可为半夏的质量控制提供参考。

关键词: 水麦冬酸; 半夏; 虎掌南星; 高分离度快速液相色谱-三重串联四极杆质谱

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 09- 1640 -04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.09.013

Rapid test of triglochinic acid in *Pinelliae Rhizoma* and *Pinelliae Pedatisectae Rhizoma* by rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry (RRLC-QQQ/MS)

NIE Lixing, KANG Shuai, ZHANG Nanping, DAI Zhong, WEI Feng, MA Shuangcheng

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish a specific identification method of triglochinic acid in *Pinelliae Rhizoma* and its counterfeit, *Pinelliae Pedatisectae Rhizoma*. **Methods** Followed by ultrasonic extraction with water, the samples were analyzed using rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry (RRLC-QQQ/MS). The separation was performed on an Agilent SB-C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) column and the column temperature was set at 30℃. The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1% formic acid (5:95) at a flow rate of 0.2 mL/min. The injection volume was 1 μL. Electrospray ionization source was used with negative ion mode and multiple reaction monitoring (MRM) mode was performed with the transitions of m/z 187→143 and m/z 187→99. **Results** The limit of detection was 4.6 μg/L. Triglochinic acid was found in 3 out of 11 batches of *Pinelliae Rhizoma* samples while in all *Pinelliae Pedatisectae Rhizoma* samples (7 batches). Content of triglochinic acid in *Pinelliae Rhizoma* was lower than that in *Pinelliae Pedatisectae Rhizoma*. **Conclusion** The proposed method was specific, accurate, rapid and simple, which provided reference for quality control of *Pinelliae Rhizoma*.

Key words: triglochinic acid; *Pinelliae Rhizoma*; *Pinelliae Pedatisectae Rhizoma*; counterfeit; rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry (RRLC-QQQ/MS)

半夏为天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效, 用于湿痰寒痰、咳嗽痰多、呕吐反胃等症, 收载于《中国药典》2015 年

收稿日期: 2017-12-18

基金项目: 国家自然科学基金 (81303194); 国家中医药管理局中药标准化建设项目 (ZYBZH-C-JS-32); 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金 (2017X1)

第一作者: 聂黎行 (1982—), 副研究员, 研究方向为中药质量控制、中药化学对照品研制和光谱技术在药品质量控制中的应用。Tel: (010)67095282
E-mail: nielixing@163.com

*通信作者: 马双成, 男, 研究员, Tel: (010)67095272 E-mail: masc@nifdc.org.cn

版一部^[1]。半夏的伪品较多,主要为天南星科植物,包括虎掌南星、天南星、水半夏等。虎掌南星是最常见的半夏伪品,又名掌叶半夏,为天南星科半夏属植物掌叶半夏 *Pinellia pedatisecta* Schott 的干燥块茎^[2]。虎掌南星并非药典品种,收载于《江苏省中药材标准》2016年版^[3],在我国多地有大面积的种植,个小者常作半夏使用,个大者为天南星的主流商品使用,自古使用多混乱^[4]。有学者提出半夏和虎掌南星在性状和显微特征方面存在细微差别^[5-8],但个小的虎掌南星外观与半夏极为相似,经加工炮制后更加难以鉴别;栽培变异也造成两个品种的形态组织学差异日渐模糊^[9]。两者为同科同属植物,所含的有机酸、生物碱、核苷等化学成分的种类也极其相近^[10-13]。最新研究指出^[14],水麦冬酸(结构见图1)是虎掌南星具有而半夏不含的特征性成分,可以采用液相色谱法加以鉴别。水麦冬酸在210 nm有末端吸收,在虎掌南星中含量较低,样品需反复萃取富集后测定;该化合物极性较强,在反相色谱柱上保留较弱,可能和药材中其他高极性成分同时被洗脱,容易造成误判。液质联用技术具有高灵敏度、高选择性等优点,已成为中药分析最强有力的工具之一^[15-16]。本文采用高分离度快速液相色谱-三重串联四极杆质谱联用技术,建立了水麦冬酸的快速和专属性检测方法,并运用该方法对半夏和虎掌南星中水麦冬酸的有无进行了考察,以期对半夏的质量评价和控制提供参考。

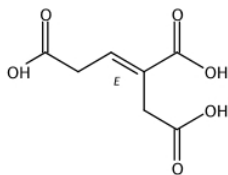


图1 水麦冬酸化学结构

Fig. 1 Chemical structure of triglochinic acid

1 仪器与材料

FW100 高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司), KQ-300DA 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), AE240 电子天平(Mettler 公司)、FX-200 电子天平(Mettler 公司), 1200 高分离度快速液相色谱-6410B 三重四极杆质谱联用系统(Agilent 公司)。

甲酸、甲醇、乙腈(色谱纯)购于 Merck 公司, 氨水(分析纯)购于北京市化学试剂公司, 超纯水

为 RO-ZY-30 型纯水机(山东知浴新能源科技有限公司)和 Milli-Q 纯水系统(Millipore 公司)二次制备。

水麦冬酸(HPLC 纯度为 98%)由成都中医药大学李敏教授馈赠。半夏对照药材 4 批来自中国食品药品检定研究院。基源明确半夏和虎掌南星各 2 批收集于产地。半夏、虎掌南星各 5 批收集于产地或药市, 由四川新荷花中药饮片股份有限公司提供。以上样品均经中国食品药品检定研究院助理研究员康帅鉴定。样品信息见表 1。

表1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	样品种类	批号	产地/来源
1	半夏	121272-200401	对照药材
2	半夏	121272-201002	对照药材
3	半夏	121272-201103	对照药材
4	半夏	121272-201404	对照药材
5	半夏	20160301	湖北
6	半夏	20160310	湖南
7	半夏	Y0116110001	四川
8	半夏	Y051611008	四川
9	半夏	Y051612006	四川
10	半夏	Y051612007	四川
11	半夏	Y051612008	四川
12	虎掌南星	HN006	河南
13	虎掌南星	44181	河南
14	虎掌南星	201701	亳州药市
15	虎掌南星	201702	亳州药市
16	虎掌南星	201703	亳州药市
17	虎掌南星	201704	亳州药市
18	虎掌南星	201705	亳州药市

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 30℃。流动相为乙腈-0.1%甲酸(5:95), 体积流量 0.2 mL/min, 进样量 1 μL。分析时间 2.0 min。

2.2 质谱条件

离子化模式: ESI⁺, 离子源温度 120℃, 毛细管电压 3 000 V, 干燥气温度 300℃, 干燥气体积流量 9 L/min, 雾化气压力 206.84 kPa。扫描方式为多反应监测(MRM), 离子对 m/z 187→143 和 m/z 87→99, 锥孔电压 30 V, 碰撞能量 0 eV。水麦冬酸的 2 级质谱图见图 2。

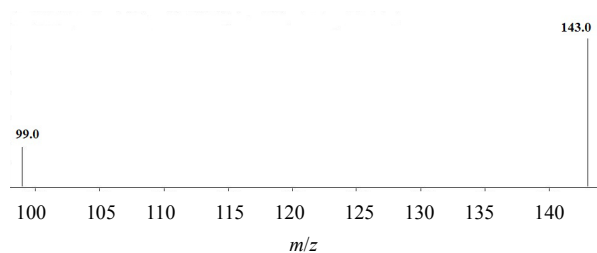


图2 水麦冬酸二级质谱图

Fig.2 The secondary mass spectrum of triglochinic acid

2.3 对照品溶液的制备

取水麦冬酸对照品,加甲醇制成约 0.2 μg/mL 的溶液,即得。

2.4 供试品溶液的制备

取样品,粉碎,过四号筛,取约 2.0 g,精密称定,加水 20.0 mL,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz) 1 h,放冷,离心(6 000 r/min, 20 min),取上清液,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.5 专属性试验

取对照品溶液,半夏(编号6)、虎掌南星(编号13)供试品溶液,甲醇空白溶液,按“2.1”和“2.2”项下方法测定,由图3可见,阴性溶液对测定无干扰,说明方法专属性良好。

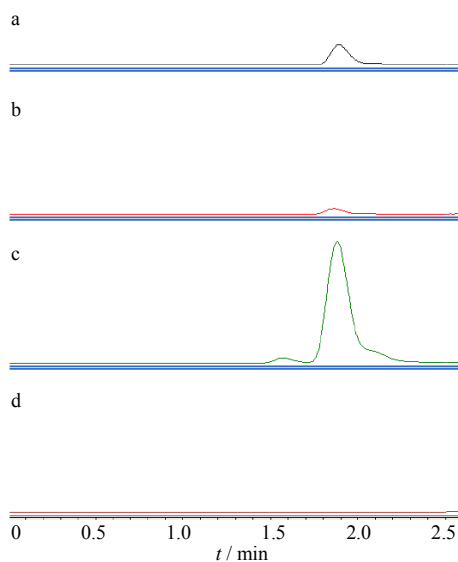


图3 多反应监测模式下采集的水麦冬酸(a)、半夏(b)、虎掌南星(c)、空白(d)的总离子流色谱图

Fig.3 Total ion chromatograms of triglochinic acid (a), *Pinelliae Rhizoma* (b), *Pinelliae Pedatisectae Rhizoma* (c) and blank (d), detected under multiple reaction monitoring mode

2.6 精密度试验

取对照品溶液,按“2.1”和“2.2”项下方法测定6次,积分,保留时间和峰面积平均值分别为 1.88 min 和 4 082, RSD 值分别为 0.3%和 1.6%,说明方法精密度良好。

2.7 检出限

取对照品溶液,逐级稀释成浓度约为 100、50、25、5 μg/L 的系列溶液,以 $S/N \geq 3$ 为最低检出限,测得水麦冬酸在 MRM 模式下的最低检出浓度为 4.6 μg/L。

2.8 样品测定

18批样品测定结果见表2,收集到的11批半夏,有3批检出水麦冬酸,7批虎掌南星均检出水麦冬酸。检出水麦冬酸的半夏样品中,水麦冬酸峰面积普遍低于虎掌南星中水麦冬酸峰面积。鉴于目前缺乏纯度和量足够的对照品,尚无法进行准确定量。

表2 样品测定结果

Table 2 Identification results of samples

编号	样品种类	是否检出水麦冬酸	水麦冬酸峰面积
1	半夏	×	/
2	半夏	√	499
3	半夏	×	/
4	半夏	×	/
5	半夏	√	177
6	半夏	√	91
7	半夏	×	/
8	半夏	×	/
9	半夏	×	/
10	半夏	×	/
11	半夏	×	/
12	虎掌南星	√	4 100
13	虎掌南星	√	18 812
14	虎掌南星	√	10 835
15	虎掌南星	√	7 243
16	虎掌南星	√	5 039
17	虎掌南星	√	3 728
18	虎掌南星	√	7 266

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

考察了 Agilent Eclipse、Agilent SB 色谱柱,不同比例的甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸、乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.1%甲酸作为流动相,不同的柱温、流速对分离的影响,结果显示由于水麦冬酸极性较强,在反相

色谱上保留较弱, 色谱柱型号、柱温, 流动相组成、比例、流速对其保留时间和峰形影响不大。

3.2 质谱条件的优化

首先在全扫描 (SCAN) 模式下确定水麦冬酸的准分子离子峰为 $m/z187$ ($[M-H]^+$)。然后以 $m/z187$ 为目标, 进行选择离子监测 (SIM), 优化离子源温度、毛细管电压、干燥气温度、干燥气流速、雾化气压力、锥孔电压等参数, 使准分子离子峰信号最高。最后以准分子离子连续丢失两个 CO_2 基团产生的特征碎片离子 $m/z143$ ($[M-H-CO_2]^+$) 和 $m/z99$ ($[M-H-2CO_2]^+$) 为目标进行子离子扫描 (product ion scan), 优化碰撞能量, 使子离子 ($m/z143$ 和 $m/z99$) 丰度最高。采用最终优化好的质谱条件建立多反应监测 (MRM) 方法。

3.3 水麦冬酸并非虎掌南星的专属性成分

采用 RRLC-QQQ 技术, 建立了水麦冬酸的专属性检测方法, 操作简便、快速, 结果准确。研究初步证实了半夏中也含有少量水麦冬酸, 故水麦冬酸实际并非虎掌南星的专属性成分, 以其有无鉴别半夏与虎掌南星或可能导致误判。但半夏中水麦冬酸含量低于虎掌南星, 如可获得足够量的水麦冬酸对照品, 并进一步收集大量半夏和虎掌南星样品, 提出科学合理的限度, 或可建立限量检查方法对两者加以区别。

志谢: 实验过程中, 成都中医药大学李敏教授给予了大力支持和帮助。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 119.

[2] 宋立人. 中华本草第 23 卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 504.

[3] 江苏省中药材标准 [S]. 2016: 243-248.

- [4] 王琴霞, 池玉梅. 虎掌南星总有机酸含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 89-92.
- [5] 黄秀兰, 吕植桢, 苏中武. 掌叶半夏、半夏、天南星的比较研究 [J]. 中药材, 1986, 3: 23-25.
- [6] 吴兆斌. 半夏及其主要伪品的区别 [J]. 内蒙古中医药, 2011, 30(11): 95.
- [7] 朱小兵. 半夏及其掺伪品的鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 206.
- [8] 胡双丰. 半夏与其伪品掌叶半夏的鉴别 [J]. 首都医药, 2001, 8(4): 54.
- [9] 卢道会. 不同产区半夏的质量评价及其伪品、近缘品种的鉴别研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [10] 汪荣斌, 王存琴, 刘晓龙. 天南星 (虎掌南星) 的化学成分和药理作用研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2010, 26(4): 590-592.
- [11] 陆丹, 罗芬, 池玉梅, 等. 高效液相色谱法同时测定中药材虎掌南星的核苷类成分 [J]. 色谱, 2011, 29(1): 83-86.
- [12] 孙全, 张景勃, 傅亚, 等. RP-HPLC 法同时测定半夏药材 4 种有机酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1062-1066.
- [13] Wen Q F, Zhang Y F, Zhang J Q, et al. Simultaneous determination of 6 organic acids, 3 nucleosides, and ephedrine in *Pinellia ternata* by HPLC [J]. J Chin Pharm Sci, 2016, 25(12): 906-913.
- [14] 李敏, 敬勇, 陈辉, 等. 一种水麦冬酸的提取分离纯化方法 [P]. 中国专利: CN106831404A, 2017-06-13.
- [15] 刘毅, 刘素香, 龚苏晓, 等. 当归药材 HPLC 指纹图谱及其液相色谱-质谱联用分析 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 259-262.
- [16] 王志成, 季雪, 崔韶婧, 等. 基于超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱技术的通脉颗粒质量评价研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(4): 603-607.