

液相色谱-串联质谱法测定植物来源 保健食品中去甲乌药碱

苏昭仑*, 叶少文, 李 珍

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘 要: **目的** 建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)检测植物来源保健食品中去甲乌药碱的分析方法。**方法** 样品经甲醇溶液超声提取, 采用 0.1%甲酸(A)和甲醇(B)作为流动相进行梯度洗脱, 采用 LC-MS/MS 进行测量, 采用正离子源模式(positive electrospray ionization, ESI⁺)和多离子监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)。**结果** 去甲乌药碱在上述色谱条件下能完全分离。去甲乌药碱线性范围为 5.34~106.8 ng/mL, 相关系数 $r^2=0.9999$, 方法检出限为 2 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 6 $\mu\text{g/kg}$; 平均回收率 98.7%~101.3%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) < 2.0%。**结论** 该方法操作简便, 精密度和回收率高, 重复性好, 可以用于测定植物来源保健食品中去甲乌药碱。

关键词: 去甲乌药碱; 液相色谱-串联质谱法; 植物来源保健食品

Determination of higenamine in plant-derived health food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SU Zhao-Lun, YE Shao-Wen, LI Zhen

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of higenamine in plant-derived health food samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS). **Methods** The samples were ultrasonically extracted with methanol solution, using a gradient elution program of 0.1% formic acid aqueous solution (A) and methanol (B). LC-MS/MS was used for the measurement with positive ion source mode (ESI⁺) and multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** Higenamine was completely separated in the chromatographic conditions. The linear range was 5.34–106.8 ng/mL, with the correlation coefficient $r^2=0.9999$. The limit of detection was 2 $\mu\text{g/kg}$, and the limit of quantification was 6 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries were 98.7%–101.3%, with relative standard deviation (RSD) < 2.0%. **Conclusion** This method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the determination of higenamine in health food from plants.

KEY WORDS: higenamine; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; plant-derived health food

1 引 言

去甲乌药碱(higenamine, HG)属于苜蓿异喹啉类生物碱, 具有刺激 β -肾上腺素受体^[1]、舒张血管、抑制血小板

聚集、抑制血栓形成^[2,3]、对心血管产生正力、正时性作用^[4-6], 增加心输出量和心率^[7-10], 在临床上常被用作强心剂^[11-13]。世界反兴奋剂机构(World Anti-Doping Agency, WADA)在《2019 年禁用清单国际标准》中已将去甲乌药

*通讯作者: 苏昭仑, 执业药师, 主要研究方向为中药和保健食品安全检测。E-mail: suwheel@126.com

*Corresponding author: SU Zhao-Lun, Pharmacist, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: suwheel@126.com

碱明确列为 β -2 激动剂类禁用物质^[14]。去甲乌药碱在许多天然植物中存在, 运动员误食而出现兴奋剂事件时有发生, 因此加大对保健食品中去甲乌药碱的检测力度, 避免运动员食用含去甲乌药碱的食材, 显得日益重要。

日前, 国内还未制定食品和保健食品中去甲乌药碱的相关检测标准。去甲乌药碱的常用检测方法有液相色谱-紫外光谱法、液相色谱-荧光法、液相色谱-电化学检测法和液相色谱-串联质谱检测法等^[14-18]。液相色谱-串联质谱法具有灵敏度高、专属性好等优点, 已被应用于运动员的血清、尿样以及食品、保健食品中去甲乌药碱的检测。本研究采用液相色谱-串联质谱法, 采用多离子监测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 建立测定植物来源保健食品中去甲乌药碱的检测方法, 对常用植物来源保健食品进行定性和定量检测, 以期筛选出适合运动员使用的保健食品提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

LC-30A 型液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); 串联 TRIPLE QUAD4500 型质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); XP205 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); P70H 型超声波清洗机(德国 Elma 公司); Milli-Q 超纯水制备仪(美国密理博公司); TGL-20K 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

去甲乌药碱对照品(纯度 99.4%, 上海安谱公司)。

甲醇、甲酸(色谱纯, CNW 公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

3 款壮阳类产品和 1 款减肥类产品, 购于药店; 47 种常用植物来源保健食品的原料, 来源于供应商。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

去甲乌药碱标准溶液配制: 精密称取约 10 mg(精确至 0.01 g)的去甲乌药碱, 用甲醇溶解, 定容于 100 mL 的棕色容量瓶中, 配成浓度约为 100 μ g/mL 标准储备液, -20 $^{\circ}$ C 保存。精密移取 1.00 mL 标准储备液, 置 50 mL 的棕色容量瓶中, 用甲醇稀释成浓度约为 2 μ g/mL 标准中间液。再分别精密移取适量标准中间液, 分别置 50 mL 的棕色容量瓶中, 用 50% 甲醇水溶液稀释成浓度约为 4、20、40、60、100 ng/mL 系列标准工作液。

50% 甲醇水溶液: 取甲醇 0.5 L、水 0.5 L, 混匀。

0.1% 甲酸水溶液: 取 1.00 mL 甲酸于 1 L 水中, 混匀。

2.2.2 样品前处理

称取试样约 1 g(精确至 0.01 g)于 250 mL 具塞锥形瓶中, 准确加入 50 mL 50% 甲醇水溶液, 充分振荡混匀, 避光超声提取 20 min, 转移至离心管, 8000 r/min 离心 5 min,

取上清液, 过 0.22 μ m 滤膜, 即得供试液。可根据试样的含量适当调整称样量, 配制适当浓度的供试液。

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1) 液相色谱条件

安捷伦 Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μ m), 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B), 流速: 0.5 mL/min, 进样体积: 5 μ L, 柱温: 40 $^{\circ}$ C。梯度洗脱程序: 0~4.0 min, 5%~50%B; 4.0~5.0 min, 50%~95% B; 5.0~6.0 min, 95%B; 6.0~6.1 min, 95%~5%B; 6.1~8.0 min, 5%B。

(2) 质谱条件

电离源: ESI 正离子模式; 扫描方式: MRM 模式; 气帘气压力(氮气): 35 psi; 碰撞气体(氮气): 10 psi; 电喷雾电压: 5500 V; 离子源温度: 350 $^{\circ}$ C; 雾化气(空气): 50.0 psi; 辅助气流速(空气): 50 psi; 去簇电压: 85 V; 母离子: m/z =272.5; 定量离子: m/z =107.1, 碰撞能: 30 V; 定性离子: m/z =161.0, 碰撞能: 25 V; 定性离子: m/z =255.1, 碰撞能: 20 V。

3 结果与分析

3.1 质谱条件和色谱条件优化

3.1.1 质谱条件优化

将去甲乌药碱的标准中间液(2 μ g/mL), 通过针泵进样, 注入质谱, 首先在 Q1 正离子模式下进行全扫描, 确定去甲基乌药碱的母离子; 然后在 MS2 模式下给予一定的碰撞能量, 全扫描二级离子色谱图如图 1 所示。选取丰度较强、干扰较小的子离子分别作为定量离子及定性离子, 然后在 MRM 模式下优化去簇电压)和碰撞能。

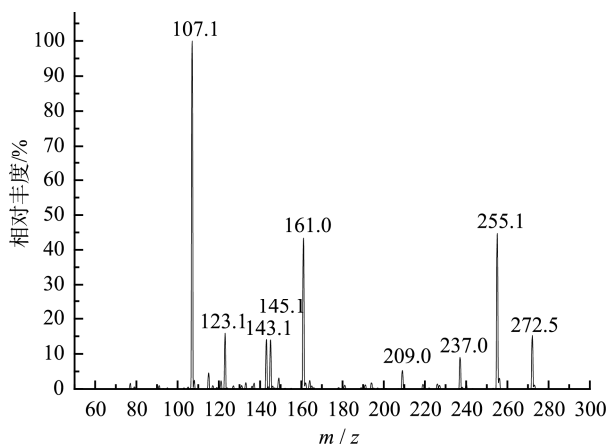


图 1 去甲乌药碱子离子扫描图

Fig.1 The product ion scan of higenamine

3.1.2 色谱条件优化

本研究比较了去甲乌药碱在乙腈-水与甲醇-水流动相中的分离效果, 结果表明, 目标物在甲醇-水流动相中分离

效果更好。进一步考察流动相中添加甲酸、乙酸对分离效果和质谱响应的影响。结果表明, 目标物在 0.1%甲酸水-甲醇组成的流动相梯度洗脱, 分离效率高、峰形对称、保留时间稳定且质谱响应高。去甲乌药碱在 MRM 模式下的色谱图如图 2~4 所示。

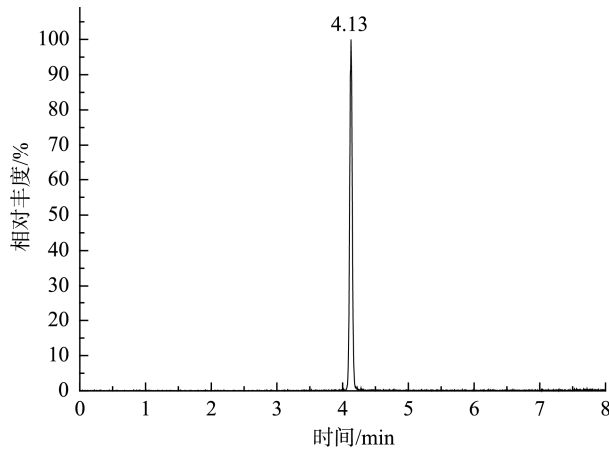


图 2 去甲乌药碱对照品色谱图

Fig.2 The chromatogram of higenamine standard

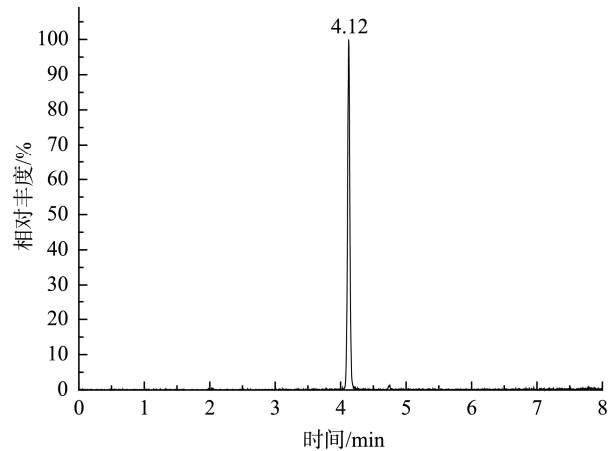


图 3 样品色谱图

Fig.3 The chromatogram of sample

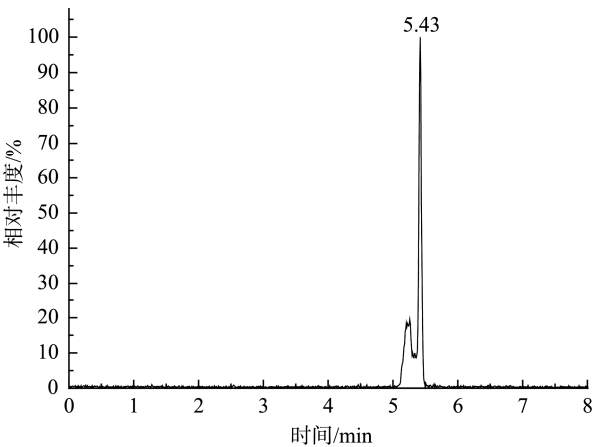


图 4 以乙腈-水为流动相的色谱图

Fig.4 The chromatogram with acetonitrile-water as mobile phase

3.2 前处理条件优化

本研究采用水、25%甲醇、50%甲醇、75%甲醇、甲醇为提取溶剂, 提取时间为 20 min, 结果表明, 水提取得率最低, 25%甲醇提取得率明显升高, 但当采用 50%甲醇时其得率与 75%甲醇并无明显差别, 因此, 采用 50%甲醇作为提取溶剂。实验结果见表 1。

表 1 不同比例甲醇提取溶剂的提取效率比较(n=6)
Table 1 Comparison of extraction efficiency of different methanol extraction solvents(n=6)

提取溶剂	平均含量/(mg/kg)	RSD/%
水	2.72	4.5
25%甲醇	5.16	2.9
50%甲醇	8.64	3.1
75%甲醇	8.59	3.5
甲醇	7.74	2.6

3.3 方法的线性关系

在实验条件下, 对标准工作溶液进行测定, 结果表明, 去甲乌药碱在 5.34~106.8 ng/mL 范围内有良好的线性关系, $r^2=0.9999$, 线性方程: $Y=41400X+72700$ 。

3.4 方法的检出限和定量限

去甲乌药碱标准溶液逐级稀释, 取信噪比为 3:1 时, 为最低检出限, 去甲乌药碱的浓度为 0.04 ng/mL, 当样品取样量 1 g, 定容 50 mL 时, 方法的去甲乌药碱检出限为 2 μ g/kg; 取信噪比为 10:1 时, 为最低定量限, 去甲乌药碱的浓度为 0.12 ng/mL, 当样品取样量 1 g, 定容 50 mL 时, 方法的去甲乌药碱定量限为 6 μ g/kg, 方法灵敏度高。

3.5 精密度实验结果

在实验条件下, 对同一标准工作溶液进行重复进样 6 次测定。其保留时间稳定, 去甲乌药碱浓度范围为 104.7~108.4 ng/mL, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.3%。结果表明, 精密度良好。

3.6 稳定性实验结果

精密称取 0.15 g 淫羊藿提取物的样品, 按 2.2.2 项下方法制得供试品溶液, 分别在 0、1、2、4、6、8 h 进样, 测定去甲乌药碱浓度: 25.8~27.7 ng/mL, 其 RSD 为 2.6%。结果表明, 供试品溶液 8 h 内稳定。

3.7 重复性实验结果

分别精密称取样品适量, 按 2.2.2 项下方法制得供

试品溶液,测定去甲乌药碱的含量。检测结果显示,其RSD 分别为 3.1%、3.2%、3.6%,表明该方法重复性好。实验结果见表 2。

表 2 去甲乌药碱的重复性(n=6)
Table 2 Repeatability of higenamine(n=6)

样品	本法测得含量/ (mg/kg)	平均含量/ (mg/kg)	RSD/%
淫羊藿提取物	8.22~8.94	8.64	3.1
荷叶提取物	36.2~39.4	37.5	3.2
市售某壮阳产品	1.04~1.13	1.09	3.6

3.8 方法的回收率实验结果

精密称取已测定含量(8.64 mg/kg)的同一样品 9 份,每份约 0.15 g, 分别添加 0.30、0.50、0.70 mL 标准中间液(2.6718 µg/mL)进行加标回收实验,结果见表 3。本方法平均回收率98.7%~101.3%,且RSD < 2.0%,说明该方法准确度可以满足去甲乌药碱的检测要求。

表 4 实际样品中去甲乌药碱的含量
Table 4 Higenamine contents in real samples

样品	本法测得含量/(mg/kg)	样品	本法测得含量/(mg/kg)
市售某壮阳产品 1	1.09	绿茶提取物	—
市售某壮阳产品 2	5.38	大麦苗粉	—
市售某壮阳产品 3	2.09	松花粉	—
市售某减肥产品	28.32	茶树花提取物	—
淫羊藿提取物(醇提)	8.64	蜂胶提取物	—
淫羊藿提取物(水提)	3.57	玫瑰茄提取物	—
荷叶提取物	37.50	枸杞提取物	—
仙人掌果果汁粉	0.12	黄精提取物	—
银杏叶提取物	0.096	三七提取物	—
骨碎补提取物	0.088	人参提取物	—
迷迭香提取物	0.13	芹菜籽提取物	—
丹参提取物	—	蒺藜提取物	—
白芍提取物	—	葛根提取物	—
茯苓提取物	—	刺五加提取物	—
猴头菇提取物	—	天麻提取物	—
黄芪提取物	—	陈皮提取物	—
桑葚提取物	—	五味子提取物	—
红景天提取物	—	酵母提取物	—
绞股蓝提取物	—	越橘提取物	—
枳椇子提取物	—	玉竹提取物	—
西兰花种子水提物	—	西洋参提取物	—
螺旋藻粉	—	大豆提取物(异黄酮)	—
玛咖粉	—	蒲公英提取物	—
巴戟天提取物	—	天然草莓果汁粉	—
葡萄籽提取物	—	浓缩香瓜粉	—
姜黄提取物	—	绿茶提取物	—

表 3 加标回收率和相对标准偏差(n=3)
Table 3 The recoveries and relative standard deviation(n=3)

本底含量 /µg	加标量 /µg	测得量 /µg	平均回收率 /%	RSD /%
	0.8015	2.0967	99.9	1.6
1.2960	1.3359	2.6150	98.7	1.4
	1.8702	3.1900	101.3	1.9

3.9 实际样品测定

根据试样的含量适当调整称样量,配制适当浓度的供试液,未检出的试样称样量约为 1 g,用本方法对 3 款市售壮阳类产品、1 款市售减肥类产品和 47 种常用植物来源保健食品的原料进行检测,检测结果见表 4。3 款市售壮阳类、1 款市售减肥类产品、淫羊藿提取物、荷叶提取物、仙人掌果果汁粉、银杏叶提取物、骨碎补提取物、迷迭香提取物均定量检出去甲乌药碱,证明植物来源保健食品可能造成运动员误食去甲乌药碱。

4 结 论

本研究建立了液相色谱-串联质谱法测定植物来源保健食品中去甲乌药碱, 该方法操作简便, 精密度和回收率高, 重复性好, 结果符合要求, 适用于植物源保健食品、食品中去甲乌药碱的快速、批量筛查检测。在所选的 3 款市售壮阳类产品、1 款市售减肥类产品中均检出去甲乌药碱, 在所选的 47 种常用植物来源保健食品的原料中有 7 种原料检出去甲乌药碱, 运动员以及心血管疾病患者需特别慎用。

参考文献

- [1] Pyo MK, Kim JM, Jin JL, *et al.* Effects of higenamine and its 1-naphthylanalogs, YS-49 and YS-51 on platelet TXA2 synthesis and aggregation [J]. *Thromb Res*, 2007, (120): 81–86.
- [2] 韦震鸣, 傅强, 李志樑, 等. 去甲乌药碱对 2 型肾综合征大鼠心肾的保护作用[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(11): 1830–1833, 1838.
- Wei ZM, Fu Q, Li ZL, *et al.* Protective effects of higenamine on heart and kidney in rats with type 2 cardiorenal syndrome [J]. *J Pract Med*, 2018, 34(11): 1830–1833, 1838.
- [3] Park JE, Kang YJ, Park MK, *et al.* Enantiomers of higenamine inhibit LPS-induced iNOS in a macrophage cell line and improve the survival of mice with experimental endotoxemia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(2): 226–233.
- [4] 石晓路, 武乾, 崔海峰, 等. 去甲乌药碱与 6-姜酚配伍对心衰大鼠强心机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(2): 420–423.
- Shi XL, Wu Q, Cui HF, *et al.* Cardiogenic mechanism of compatibility of higenamine and 6-gingerol on heart failure rat [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 31(2): 420–423.
- [5] Lee YS, Kang YJ, Kim HJ, *et al.* Higenamine reduces apoptotic cell death by induction of heme oxygenase-1 in rat myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Apoptosis*, 2006, (11): 1091–1100.
- [6] Kimura I, Makino M, Takamura Y, *et al.* Positive chronotropic and inotropic effects of higenamine and its enhancing action on the aconitine-induced tachyarrhythmia in isolated murine atria [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1994, (66): 75–80.
- [7] Dunlop D, Shanks RG. Inhibition of the carotid sinus reflex by the chronic administration of propranolol [J]. *Brit J Pharmacol*, 1912, (36): 132–143.
- [8] Feng S, Jiang J, Hu P, *et al.* A phase I study on pharmacokinetics and pharmacodynamics of higenamine in healthy Chinese subjects [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, (33): 1353–1358.
- [9] Liang CS, Sprecher D. Cardiovascular actions of beta-phenylethylamine [J]. *Am J Physiol*, 1979, (236): 592–595.
- [10] Praman S, Mulvany MJ, Williams DE, *et al.* Hypotensive and cardiochronotropic constituents of *Tinospora crispa* and mechanisms of action on the cardiovascular system in anesthetized rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, (140): 166–178.
- [11] Ha YM, Kim MY, Park MK, *et al.* Higenamine reduces HMGB1 during hypoxia-induced brain injury by induction of heme oxygenase-1 through PI3K/Akt/Nrf-2 signal pathways [J]. *Apoptosis*, 2012(17): 463–474.
- [12] Kosuge T, Yokota M., Nagasawa M. Studies on cardiac principle in aconite roots. I. isolation and structure determination of higenamine [J]. *Yakugaku Zasshi J Pharm Soc Jpn* 1978, (98): 1370–1375.
- [13] Zhang N, Lian Z, Peng X, *et al.* Applications of higenamine in pharmacology and medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, (196): 242
- [14] 田海峰, 衣涛, 金东日. 柱前衍生化高效液相色谱法测定莲心中去甲乌药碱含量[J]. *延边大学学报(自然科学版)*, 2012, 38(2): 150–153.
- Tian HF, Yi T, Jin DR. Determination of higenamine in *Nelumbo nucifera* Fera by HPLC with precolumn derivatization [J]. *J Yanbian Univ (Nat Sci Ed)*, 2012, 38(2): 150–153.
- [15] 惠战锋, 王前刚, 魏谈笑, 等. RP-HPLC 法测定莲子心提取物中去甲乌药碱的含量[J]. *西北药学杂志*, 2014, (1): 14–16.
- Hui ZF, Wang QG, Wei TX, *et al.* Determination of higenamine in *Nelumbo nucifera* extract by RP-HPLC [J]. *Northwest Pharm J*, 2014, (1): 14–16.
- [16] 杨明, 何思睿, 张丹, 等. 常用药材中去甲乌药碱的 LC-MS/MS 测定方法研究[J]. *中国测试*, 2018, 44(3): 61–65.
- Yang M, He SR, Zhang D, *et al.* Study on determination of higenamine in Chinese medicinal materials by LC-MS/MS [J]. *China Meas Test*, 2018, 44(3): 61–65.
- [17] 杨明, 陈丹, 涂凤琴, 等. 高效液相色谱-串联质谱测定香辛料中的去甲乌药碱[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(3): 275–280.
- Yang M, Chen D, Tu FQ, *et al.* Determination of higenamine in spices by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, 36(3): 275–280.
- [18] 王晗, 汤一铸, 赵晓亚, 等. QuEChERS 与液相色谱-串联质谱联用检测中药、调味品及外敷药物中去甲乌药碱的含量[J]. *色谱*, 2019, 37(10): 1036–1041.
- Wang H, Tang YZ, Zhao XY, *et al.* Determination of higenamine in Chinese herbal medicine, condiments, and topical medicine by QuEChERS combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(10): 1036–1041.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



苏昭仑, 执业药师, 主要研究方向为中药和保健食品安全检测。

E-mail: suwheel@126.com