高效液相色谱/质谱联用法测定保健食品中荷叶碱的含量

陈　波[1]　罗旭彪[1]　姚守拙[1]　王竹天[2]　杨大进[2]
(1. 湖南师范大学,湖南　长沙　410081; 2. 中国疾控中心营养与食品安全所,北京　100021)

摘　要:为建立高效液相色谱 - 紫外 - 电喷雾质谱(HPLC - UV - ESI/MS)联用测定保健食品中荷叶碱的方法,以乙腈和 0.1 %三乙胺水溶液作流动相,在反相 C_{18} 柱上梯度淋洗,以质谱定性,紫外定量进行检测。结果在 0.2～20 μg/ml 范围内峰面积和浓度呈良好的线性关系,样品平均回收率为 97.3 %。该方法抗干扰能力强,可以快速、准确地测定保健食品中的荷叶碱。

关键词:莲;生物碱;色谱法,高压液相;光谱分析,质量;营养保健品

Determination of nuciferine in health foods by high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry

CHEN Bo, LUO Xu-biao, YAO Shou-zhuo, WANG Zhu-tian, YANG Da-jin
(Hunan Normal University, Hunan Changsha 410081, China)

Abstract: A method for determining nuciferine in functional foods by on line HPLC - UV - ESI/MS was established. The separation was operated on an analytical Spherigel C_{18} column (5 μm, 250 mm ×4.6 mm) with acetonitrile: water (containing 0.1 % triethylamine) as mobile phase. The detection wavelength was 280 nm. Good linearity between peak areas and concentrations was obtained within the range of 0.2 μg/ml～20 μg/ml. The method is simple and can determine nuciferine in functional foods accurately.

Key word: NELUMBO NUCIFERA; ALKALOIDS; Chromatography, High Pressure Liquid; Spectrum Analysis, Mass; Dietary Supplement

荷叶为睡莲科植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)的干燥叶,具有清热解暑、升发清阳、散瘀止血的功效[1]。现代临床表明荷叶具有较好的减肥降脂之功效[2],其主要活性成分为荷叶碱、莲碱、原荷叶碱、前荷叶碱等生物碱[3]。国外尤其是日本关于荷叶化学成分报道较多,但是主要是测定其生物总碱,分析方法主要为 TLC 法[4]和紫外分光光度法[5]。本文建立了测定荷叶碱含量的高效液相色谱/质谱联用法。

1　材料与方法

1.1　**仪器与试剂**　Waters 2695 分离单元、Waters 2487 双波长检测器、Waters ZQ 2000 质谱检测器(Waters,美国);色谱纯乙腈(湖南化工研究院精细化工研究所)、三乙胺(上海三浦化工有限公司)、纯净水(杭州哇哈哈公司);降脂胶囊、荷叶减肥茶和降脂减肥茶(市场购得)、含量大于 99 %(HPLC)荷叶碱标准品(本实验室自制,经 NMR、IR 结构确证)。

1.2　**液相色谱 - 质谱条件**　色谱柱:Spherigel C_{18} (5 μm,250 mm ×4.6 mm) (大连江申分离科学科技公司),流动相:A:0.1 %三乙胺水溶液;B:乙腈,进行梯度洗脱,梯度条件为在前 15 min 内 A 由 60 %呈线性变到 20 %,后 5 min 内 A 由 20 %呈线性变到 10 %。进样前,柱子用初始流动相平衡 10 min。分析完 1 个试样以后,用 100 %甲醇冲洗色谱柱,流速: 1 ml/min。检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样体积为 20 μl。

质谱条件　用电喷雾离子化正离子采集模式(ESI +),m/z 范围:180～600 amu,毛细管电压: 3.5 kV,锥孔电压: 20 V,萃取电压 5.0 V,源温度: 105 ℃,脱溶剂温度: 250 ℃,脱溶剂气: 300 L/h,锥孔反吹气: 50 L/h。

1.3　**校正曲线的绘制**　取 20 mg 标准品于 100 ml 容量瓶,加甲醇溶解,得 0.200 mg/ml 标准储备液,取该溶液逐渐稀释得到最终浓度分别为 0.2、0.4、2.5、

基金项目:国家"十五"重大科技专项(2001BA804A21);新药博士基金(2003AA2Z3515);湖南省杰出青年科学基金(03JJY1002)。
作者简介:陈波　男　教授　博士生导师

This work was supported by The Grant from National Science and Technology Program Funds (2001BA804A21); The New Drug Funds (2003AA2Z3515) and The youth of Science Funds (03JJY1002) of Hunan Province of China.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

5、10、20 μg/ml标准系列溶液。每个浓度的试样分析3次,所得峰面积的平均值对浓度做曲线,得到荷叶碱的校正曲线。

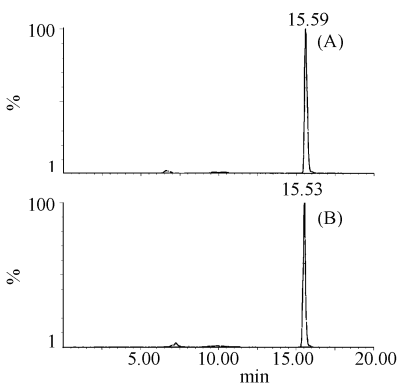
1.4 样品处理 取降脂胶囊10颗,去壳、碾碎、混匀,称取1 g,或者减肥茶准确称取1 g,用20 ml甲醇超声提取5 min,离心后取出上清液,残渣再用20 ml甲醇提取1次,合并提取液,再用甲醇将提取液定容于50 ml容量瓶,取1 ml提取液过0.45 μm膜,滤液直接进色谱系统分析,进样量为20 μl。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择 用水和乙腈、0.1 %的甲酸水溶液和乙腈、0.1 %的氨水溶液和乙腈3种流动相对荷叶碱进行淋洗,荷叶碱不保留或者峰形很不对称,而且严重展宽。采用0.1 %的三乙胺和乙腈作流动相时,荷叶碱的峰形对称,且保留时间较短。所以本实验选择0.1 %的三乙胺和乙腈作流动相。

2.2 检测波长的选择 考察了以212、254、280 nm作检测波长时荷叶碱的响应情况,发现波长为280 nm时响应明显优于其它2个波长,所以选择280 nm作为检测波长。

2.3 标准品的HPLC - UV - ESI/MS分析 荷叶碱的分子式为$C_{19}H_{21}NO_2$,分子量为295。以流动注射的方式考察了荷叶碱最优的电离条件,在实验部分所述的条件下,得到了标准品的色谱图(图1)和质谱图(图2)。荷叶碱的保留时间为15 min左右;图2中 m/z 296.4是荷叶碱分子加氢后形成的准分子离子$[M+H]^+$, m/z 265.4为断裂碳氧键形成的碎片离子。随着锥孔电压升高,总离子流响应增强,分子离子峰的强度降低,当电压达到20 V时,准分子离子峰强度最强。所以在选择离子模式中,锥孔电压设为20 V。



(A)用选择离子(SIR)269.4记录的荷叶碱的色谱图
(B) 用以280 nm为检测波长记录的荷叶碱色普图。

图1 标准品的色谱图

2.4 线性关系 按照"1.3"部分所述制作荷叶碱的校正曲线,得到线性方程为: $y = 17513x + 318$, $r = 0.9995$,将标准溶液逐渐稀释,以信噪比(S/N)为3时的进样量作为检出限,得紫外检测限0.80 ng。

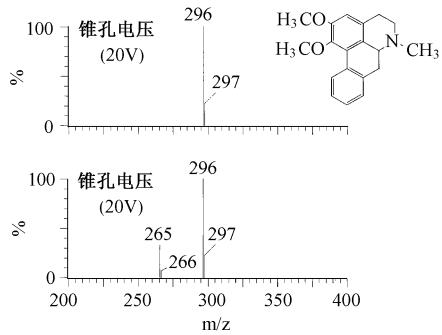


图2 荷叶碱的不同锥孔电压的质谱图和结构式

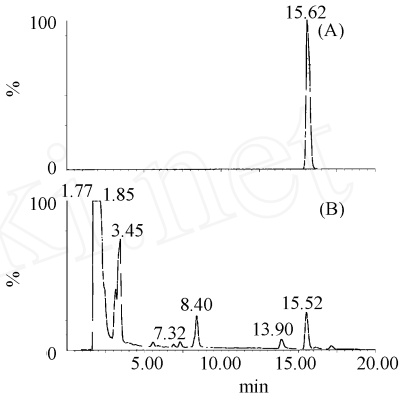


图3 选择离子(SIR)269.4记录的荷叶碱的色谱图(A)和以280 nm为检测波长记录的降脂胶囊的色谱(B)

2.5 回收率的考察 用已知含量的胶囊作标准品,取0.02、0.20、1.00 mg/g的含量作为加入量进行回收实验。每个试样平行处理5份,按照试样测定的方法进行分析,求算平均回收率,求得荷叶碱平均回收率分别为98.3、99.1、97.3 %。

2.6 试样的测定 按照"1.2"所述条件,测定某降脂胶囊中荷叶碱的含量,测定的结果为0.23 mg/g ($RSD = 1.5\%$, $n = 5$),所得的试样谱图见图3。某荷叶减肥茶中荷叶碱的含量为0.59 mg/g ($RSD = 2.1\%$, $n = 5$)。某降脂减肥茶中荷叶碱的含量为0.78 mg/g ($RSD = 1.9\%$, $n = 5$)。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 2000年版. 北京: 化学工业出版社, 2000, 231.
[2] 陶波, 陈慕英, 李晓宁, 等. 荷叶药用研究概况[J]. 中国中医药信息, 2001, 18(2):14.
[3] 郑虎占, 董泽宏, 佘靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1998, 3583-3597.
[4] 聂波, 佟丽华, 于敏. 荷叶化学成分的分离分析[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(4):54.
[5] 王伟, 谭晓梅. 荷叶总生物碱含量测定方法的研究[J]. 中药材, 2004, 27(1):50-51.

[收稿日期:2005 - 05 - 16]

中图分类号:R15;TS218;O657.63 文献标识码:B 文章编号:1004 - 8456(2005)05 - 0420 - 02

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net