

QuEChERS 联合超高效液相色谱-串联质谱法测定 枳实药材中辛弗林和 N-甲基酪胺

陈伟康¹, 朱艳艳^{1,2}, 刘德鸿¹, 杨毅生^{*1}

(1. 江西省药品检验检测研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室,
江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 江西南昌 330029;

2. 江西中医药大学, 江西南昌 330004)

摘要:建立了超高效液相色谱-串联质谱检测枳实药材中辛弗林、N-甲基酪胺的方法。以甲醇为提取溶剂, 经 QuEChERS 分散净化, 采用资生堂 CAPCELL PAK CR 色谱柱 (150 mm×2.0 mm, 5 μ m; C₁₈ 和 SCX 比例为 1:4) 分离, 质谱以正离子扫描, 反应监测模式测定。辛弗林和 N-甲基酪胺在 10~2 000 ng/mL 范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.997$), 检出限和定量限分别为 0.3 ng/mL 和 1.0 ng/mL, 回收率范围为 94.3%~105.7%, 相对标准偏差 (RSD) 均小于 3%。该方法避免了使用磷酸盐和离子对试剂, 仅在流动相中添加甲酸和甲酸铵, 分析物就能有较好的保留, 具有极高的质谱响应。相较于传统方法, 该方法分析时间短、操作简单、专属性强, 在强极性生物碱分离检测方面具有较好的应用价值。

关键词:超高效液相串联质谱; 离子交换与 C₁₈ 混合色谱柱; 辛弗林; N-甲基酪胺; QuEChERS

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1006-6144(2024)05-587-05

枳实为芸香科植物酸橙 (*Citrus aurantium* L.) 及其栽培变种或甜橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 的干燥幼果, 该药材具有破气消积, 化痰散痞之功效^[1,2]。其主要化学成分有以辛弗林和 N-甲基酪胺为代表的生物碱, 以及黄酮、挥发油类成分^[3,4]。辛弗林和 N-甲基酪胺均能兴奋心脏、收缩血管、扩张气管、升高动脉血压、促进胃肠动力等作用^[5-9]。辛弗林和 N-甲基酪胺既与枳实的疗效密切相关, 又对人体血压、心脏等有显著影响, 可能造成药物不良反应。

常见的辛弗林和 N-甲基酪胺检测方法主要有高效液相色谱法 (HPLC) 和薄层扫描法 (TLCS)^[10-14]。TLCS 法操作繁琐, 重现性较差, 在中药分析领域已逐步淘汰。因辛弗林和 N-甲基酪胺为小分子强极性生物碱 (结构见图 1), 现有报道多用甲醇提取, 上聚酰胺柱净化除去黄酮类化合物, 液相分离均采用 C₁₈ 色谱柱, 需在流动相中添加离子对试剂 (十二烷基磺酸钠) 以及磷酸盐等, 才能获得相对较好的保留^[15]。但上述流动相不适合在质谱检测器上运用, 方法存在样品前处理复杂, 分析时间长 (长达 60 min), 专属性不强等诸多不足。本文基于 QuEChERS 预

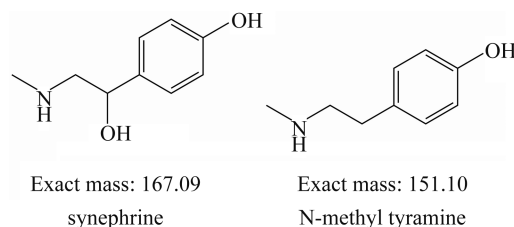


图 1 辛弗林和 N-甲基酪胺化学结构式

Fig. 1 Chemical structural formula of synephrine and N-methyl tyramine

收稿日期: 2023-09-20

修回日期: 2023-11-07

基金项目: 江西省重点研发计划项目 (20212BBG73025); 江西省药品监督管理局科研项目 (2021KY44)

* 通讯作者: 杨毅生, 男, 硕士研究生导师, 主任中药师, 主要从事中药质量控制与评价研究. E-mail: 1020115850@qq.com

处理技术,有效地去除了样品中弱极性干扰物,再以 C_{18} 和 SCX 混合(比例 1:4)填料色谱柱,在流动相不用离子对试剂的情况下,仅在流动相中添加甲酸和甲酸铵,分析物就能有较好的保留,且有极高的质谱响应,联合 UHPLC-MS/MS 技术,建立了快速、专属、准确的测定枳实中辛弗林和 N-甲基酪胺的检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent1290 液相色谱仪(美国安捷伦公司);API4000 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Sartorius Secural25-1CN 电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);Mettler Toledo ML204 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);VELP WX 涡旋混合器(意大利 VELP 公司)。

辛弗林对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110727-201608,含量:99.9%),N-甲基酪胺对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号:wkq21110508,含量 $\geq 98\%$);Waters DisQuE™ 15 mL QuECHERS 预处理管(美国 Waters 公司,含 900 mg $MgSO_4$ /150 mg PSA/150 mg C_{18});乙腈(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司),其余试剂均为分析纯。水为 Milli-Q 纯水仪制备的超纯水。

枳实药材 6 批,编号 S1-S6,其中 S1-S5 为酸橙,S6 为甜橙;S1~S3 采自江西樟树,S4~S5 采自江西新干,S6 采自湖南怀化。

1.2 溶液配制

精密称取辛弗林对照品 25.67 mg、N-甲基酪胺对照品 25.36 mg,分别置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液,置 4 °C 低温保存。分别精密吸取上述储备液体适量,加甲醇稀释成含辛弗林和 N-甲基酪胺各 500 $\mu g/mL$ 混合对照品溶液,作为中间工作液。

1.3 样品前处理

取枳实药材,粉碎后,过 4 号筛,精密称取 1 g 置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定重量;超声处理(功率 250 W,频率 25 kHz)30 min,冷却后再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀后,滤过。取滤液 10 mL,置 QuECHERS 预处理管中涡旋 1 min,静置;取上清液 1 mL 于 100 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜后进样分析。

1.4 UPLC-MS/MS 条件

1.4.1 色谱条件 资生堂 CAPCELL PAK CR 色谱柱(150 mm $\times$ 2.0 mm,5 μm ; C_{18} 和 SCX 比例为 1:4);流动相:乙腈-含 10 mmol 甲酸铵的 0.1%甲酸溶液(体积比 70:30);流速:0.3 mL/min;进样量:1 μL ;柱温:40 °C。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 ESI+模式;多反应离子监测(MRM);喷雾电压:1.5 kV;气帘气压力:25 psi;喷雾气压力:60 psi;干燥气压力 55 psi;碰撞气:6 psi;离子源温度:550 °C,定性离子(Q_1)、定量离子(Q_3)、解簇电压(DP)及碰撞能量(CE)见表 1。

表 1 辛弗林、N-甲基酪胺的质谱信息
Table 1 Mass spectrum information of synephrine and N-methyl tyramine

Compound	Retention time (min)	Q_1 Mass	Q_3 Mass	DP/V	CE/V
Synephrine	6.81	152.0	121.1	35	16
N-Methyl tyramine	7.65	168.1	150.2	30	12

Q_1 : quantitative ion, Q_2 : qualitative ion.

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

比较了 Phenomenex Luna C_{18} 、资生堂 CAPCELL PAK CR 色谱柱对辛弗林和 N-甲基酪胺的分离效果。当采用 C_{18} 色谱柱时,以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相,即使乙腈比例降到 2%,辛弗林和 N-甲基酪胺在 Phenomenex Luna C_{18} 仍然几乎没有保留,保留时间小于 1 min,而且峰型分叉。而资生堂 CAPCELL

PAK CR 色谱柱,对强极性小分子生物碱具有良好的保留效果,分析结果发现,辛弗林和 N-甲基酪胺在资生堂 CAPCELL PAK CR 色谱柱分离较好,峰形对称,适用于目标化合物的定性定量分析。提取离子色谱图见图 2。

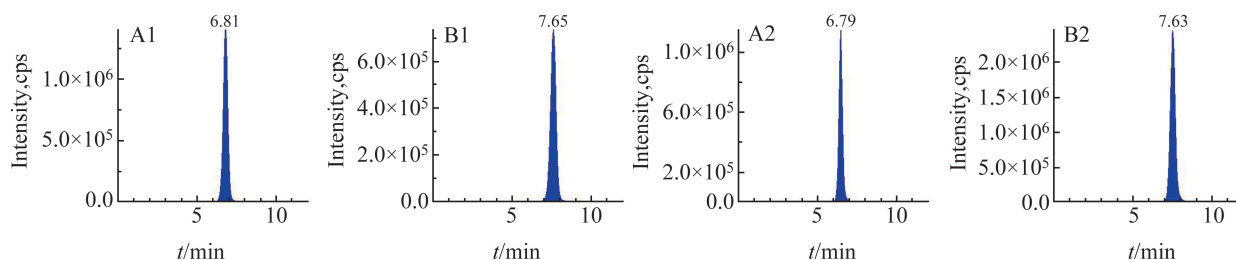


图 2 对照品溶液(A1、B1)和样品溶液(A2、B2)的提取离子色谱图

Fig. 2 The extracted ion chromatograms of (A1, B1) standard and (A2, B2) sample solution

A. Synephrine, B. N-Methyl tyramine.

2.2 流动相中甲酸铵浓度的选择

以乙腈为有机相,实验比较了含 5 mmol 甲酸铵的 0.1%甲酸溶液、10 mmol 甲酸铵的 0.1%甲酸溶液、20 mmol 甲酸铵的 0.1%甲酸溶液为水相,对辛弗林和 N-甲基酪胺的分离效果。结果表明:3 个浓度的甲酸铵均能产生较好的保留作用,随着甲酸铵浓度的增加,保留时间缩小,以 10 mmol 甲酸铵的 0.1%甲酸溶液保留时间适中,峰型尖锐,且质谱响应受样品溶液中其他组分干扰较小。

2.3 提取方法的比较

比较了用甲醇直接提取样品后稀释进样和甲醇提取液用 QuEChERS 预处理管净化后稀释进样。结果发现,采用甲醇提取液再用 QuEChERS 预处理管净化后稀释进样的峰面积,比甲醇直接提取后稀释进样的峰面积大 15%。推测为采用 QuEChERS 预处理管净化后去除了枳实提取物中部分挥发油、黄酮类等化合物,减少了样品中其他组分对待测组分电离的影响。

2.4 质谱条件的优化

质谱条件优化过程中发现,喷雾电压对辛弗林和 N-甲基酪胺影响比较大。API 4000 质谱仪喷雾电压通常设置在 4~5 kV 之间,化合物离子化效率比较高;但是,优化过程中发现,喷雾电压如设置在 4~5 kV 辛弗林和 N-甲基酪胺质谱响应比 1.5 kV 响应值低 30%左右,考虑生物碱类成分本身就容易离子化,辛弗林和 N-甲基酪胺分子结构侧链较长,如果喷雾电压过高,可能部分分子在离子源就已经碎片化,导致响应降低。因此,经过优化喷雾电压最终设置为 1.5 kV。

2.5 方法学研究

2.5.1 线性关系考察 精密吸取“1.2”节中间工作液,加甲醇稀释成含辛弗林和 N-甲基酪胺 10、25、50、100、250、500、1 000、2 000 ng/mL 的系列标准曲线工作溶液,按“1.4”节条件分别进样 1 μ L 测试。以辛弗林和 N-甲基酪胺的峰面积为纵坐标(y),以相应浓度(x)为横坐标拟合线性回归方程,辛弗林和 N-甲基酪胺线性回归方程分别为: $y=2.562 \times 10^4 x + 1.760 \times 10^6$ (相关系数 $R^2=0.9981$) 和 $y=4.182 \times 10^4 x + 2.412 \times 10^6$ ($R^2=0.9979$)。结果表明,辛弗林和 N-甲基酪胺质量浓度在 10~2 000 ng/mL 之间与相应峰面积呈良好线性关系。

2.5.2 定量限与检出限 取“1.2”节中间工作液适量用甲醇稀释成辛弗林和 N-甲基酪胺浓度约 0.3 和 1 ng/mL 的溶液,按“1.4”节条件进行测定,结果辛弗林和 N-甲基酪胺浓度为 0.3 ng/mL 时两峰信噪比均大于 3:1,1.0 ng/mL 时两峰信噪比均大于 10:1。因此,辛弗林和 N-甲基酪胺的检出限和定量限分别为 0.3 ng/mL 和 1.0 ng/mL。

2.5.3 精密度试验 取混合对照品溶液(含辛弗林和 N-甲基酪胺各约 500 ng/mL),按“1.4”节色谱条件连续进样 6 次进行分析。分别计算辛弗林和 N-甲基酪胺峰面积的相对标准偏差(RSD),结果均小于 0.5%,说明仪器精密度符合要求。

2.5.4 稳定性试验 处理好的样品溶液放置于室温,分别在 0、1、3、5、10、24 h 进样分析,分别计算辛弗林和 N-甲基酪胺峰面积 RSD,结果 RSD 均小于 2%,说明样品溶液 24 h 内方法稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 枳实药材粉末(编号:S1)按“1.3”节方法处理 6 份后测定 RSD,结果显示,辛弗林和 N-甲基酪胺含量平均值分别为 6.46 mg/g 和 1.21 mg/g,RSD 分别为 1.6%和 2.3%,方法重复性符合要求。

2.5.6 回收率实验 取枳实药材粉末(编号:S1)0.5 g,共 9 份,每 3 份为 1 个水平,按低、中、高 3 个浓度水平(样品中辛弗林和 N-甲基酪胺含量的 80%,100%,120%)分别精密加入辛弗林和 N-甲基酪胺混合对照溶液 50 mL 后按“1.3”节方法处理后测定,结果见表 2。

表 2 回收率试验结果
Table 2 The results of recovery

Compound	Spiked(mg)	Recovery(%)	RSD(%)
Synephrine	2.5792, 3.2240, 3.8688	99.6-105.3, 95.3-99.2, 94.3-99.4	2.8, 2.0, 2.7
N-Methyl tyramine	0.4840, 0.6050, 0.7260	103.6-105.6, 100.1-103.6, 102.3-105.7	1.0, 2.3, 1.6

2.7 多批样品分析

选取枳实样品 6 批,按“1.3”节方法处理 6 份进行 UHPLC-MS/MS 检测,结果见表 3。由表 3 可知,6 批枳实辛弗林含量在 3.23~6.46 mg/g 之间,N-甲基酪胺含量在 0.51~2.13 mg/g 之间。

表 3 样品测定结果(mg/g)
Table 3 The determination results of real samples(mg/g)

Sample	Compound		Sample	Compound	
	synephrine	N-methyl tyramine		synephrine	N-methyl tyramine
S1	6.46	1.21	S4	5.28	1.11
S2	5.32	2.13	S5	5.43	1.30
S3	4.91	1.57	S6	3.23	0.51

3 结论

采用 QuEChERS 联合超高效液相色谱-串联质谱法,使用 C₁₈ 和 SCX 混合填料柱建立了测定辛弗林和 N-甲基酪胺的方法。QuEChERS 预处理,相对于传统上聚酰胺柱净化枳实样品,前处理方式得到了进一步简化;采用 C₁₈ 和 SCX 混合填料色谱柱,在不使用磷酸盐及离子对试剂的情况下,辛弗林和 N-甲基酪胺在色谱柱上有较好的保留,且峰形良好,同时采用质谱仪检测,大大节约了分析时间。该方法简便、快速、灵敏,可为大批量枳实样品测定提供快速、可靠的检测方法,并能为开发同类小分子生物碱质谱检测方法提供借鉴。

参考文献:

[1] ZHAO J C,WANG Y H,WENG Q Q,et al. Mod Chin Med(赵佳琛,王艺涵,翁倩倩等. 中国现代中药),2020,**22**(8): 1175.

[2] MENG D D,WU X D,YUAN S,et al. J Shandong Univ Tradit Chin Med(孟丹丹, 吴晓迪,袁顺等. 山东中医药大学学报),2022,**46**(5):578.

[3] HE Y J,LIU D P,TANG Q,et al. Chin Med Mat(何英杰,刘东波,唐其等. 中药材),2017,**40**(6):1488.

[4] HUANG X L,CHEN Y Y. Guangzhou Chem Ind(黄雪丽,陈玉宇. 广州化工),2016,**44**(17):22.

[5] Dorottya K,Barbara T,Akbar M B,et al. Nutrients,2022,**14**(19):4019.

[6] Stohs S J,Hartman M J. Phytotherapy research;PTR,2015,**29**(1):14.

[7] Shara M,Stohs S J,Mukattash T L. Phytotherapy research;PTR,2016,**30**(5):842.

[8] DeJonge M L L,Kieviet L C,Sierts M,Egberink L B. Cardiovascular toxicology,2023,**23**(1):1.

[9] Suntar I,Khan H,Patel S,et al. Oxid Med Cell Longev,2018:7864269.

[10] ZENG X Y,CHEN X H,XIAO W,et al. Chin J Chin Men Hater Med(曾宪仪,陈小红,肖鸣等. 中国中药杂志),1997, **22**(6):42.

[11] DONG J,LIANG Z C,CHEN F,et al. J Jinggangshan Univ(Nat Sci)(董晶,梁兆昌,陈海芳等. 井冈山大学学报(自然科学版))2016,**37**(2):92.

- [12] WANG G R, ZHANG Y Z, HU S L. Chin J Pharm Anal(王国荣, 章育中, 胡世林. 药物分析杂志), 1994, **14**(4): 48.
- [13] LI X D, MA Z J, LIN S, et al. Chin J Chin Mater Med(李先端, 马志静, 林生. 中国中药杂志), 2004, **29**(6): 537.
- [14] HUANG A D, LIU W Z, WANG M X, et al. Chin Med Mat(黄爱东, 王玫馨, 周爱群等. 中药材), 1994, **17**(9): 31.
- [15] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China(I). Beijing: China Medical Science Press(中国药典委员会. 中华人民共和国药典(I 部). 北京: 中国医药科技出版社), 2015: 23.

Determination of Synephrine and N-Methyl Tyramine in Frutus Aurantii Immaturus by QuECHERS with Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

CHEN Weikang¹, ZHU Yanyan^{1,2}, LIU Dehong¹, YANG Yisheng^{*1}

(1. Jiangxi Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Jiangxi Province Engineering Research Center of Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029;

2. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the determination of synephrine and *n*-methyl tyramine in Frutus Aurantii Immaturus was established. The samples were extracted with methanol, and purified by QuECHERS. The separation was performed on Shiseido CAPCELL PAK CR column (2.0 mm × 150 mm, 5 μm; C₁₈ to SCX ratio of 1:4), and the samples were determined by positive ion scanning with multi-reaction monitoring mode. The linear relationship of synephrine and *n*-methyl tyramine was good in the range of 10–2 000 ng/mL ($R^2 > 0.997$). The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of synephrine and *n*-methyl tyramine were 0.3 ng/mL and 1 ng/mL, respectively. The recovery range was 94.3%–105.7%, and relative standard deviations (RSDs) were all less than 3%. This method avoids using phosphate and ion pair reagents, and only adding formic acid and ammonium formate in the mobile phase. The analytes have good retention and very high mass spectral response. Compared with the traditional method, this analytical method is fast, simple, specific, and it has a good application value in the separation and detection of large polar alkaloids.

Keywords: UPLC-MS/MS; Ion exchange and C18 hybrid column; Synephrine; N-Methyl tyramine; QuECHERS