

# UPLC-MS 测定不同产地及不同部位昆明山海棠中 6 种活性成分含量

杨迎光<sup>1,2</sup>, 张渝渝<sup>2</sup>, 翁代群<sup>3</sup>, 张毅<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 成都中医药大学药学院中药材标准化教育部重点实验室 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137; <sup>2</sup> 重庆市中药研究院, 重庆 400065; <sup>3</sup> 重庆地质矿产研究院, 重庆 400042

**摘要:**建立了超高效液相色谱-质谱联用同时测定昆明山海棠中雷公藤吉碱、雷公藤次碱、雷公藤甲素、去甲泽拉木醛、雷酚内酯、雷公藤内酯甲 6 种活性成分含量的方法,并对不同产地及不同部位药材含量进行了分析。采用 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱(50 × 2.0 mm, 3 μm),以乙腈和 0.1% 甲酸水为流动相梯度洗脱,流速 0.3 mL/min,柱温 30 °C,质谱条件为电喷雾电离源(ESI),多反应检测模式(MRM)。雷公藤吉碱、雷公藤次碱、雷公藤甲素、去甲泽拉木醛、雷酚内酯、雷公藤内酯甲分别在 6.80 ~ 1360.00、5.90 ~ 1180.00、1.20 ~ 240.00、25.05 ~ 5010.00、1.45 ~ 290.00、1.65 ~ 330.00 μg/L 浓度范围内显示出良好的线性关系( $r \geq 0.9998$ ),平均加样回收率为 98.19% ~ 100.91%,RSD 为 1.46% ~ 2.99%。应用该方法对来自不同产地及不同部位的 36 个昆明山海棠样品进行了测定,该方法简便、快速、准确,可用于昆明山海棠药材的质量控制。

**关键词:**液质联用;昆明山海棠;含量测定;不同产地;不同部位

中图分类号:R927.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.3.011

## Simultaneous Determination of 6 Active Compounds in Different Habitats and Different Parts of *Tripterygium hypoglaucum* Hutch by UPLC-MS

YANG Ying-guang<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu-yu<sup>2</sup>, WENG Dai-qun<sup>3</sup>, ZHANG Yi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine; Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and MOST, Chengdu 611137, China; <sup>2</sup> Chongqing Academy of Chinese Material Medical, Chongqing 400065, China; <sup>3</sup> Chongqing Institute of Geology and Mineral Resources, Chongqing 400042, China

**Abstract:** An ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) method was developed for the simultaneous determination of wilforgine, wilforine, triptolide, demethylzeylasteral, triptophenolide and wilforlide A in different habitats and different parts of *Tripterygium hypoglaucum* Hutch. The chromatographic separation was performed on a Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column (50 × 2.0 mm, 3 μm) with gradient elution consisting of acetonitrile and 0.1% formic acid in water at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 30 °C. Detection was carried out on a triple quadrupole tandem mass spectrometry by multiple-reaction monitoring (MRM) and an electrospray ionization (ESI) was operated in positive mode. All calibration curves of the 6 active compounds showed good linearity in the range of 6.80-1360.00, 5.90-1180.00, 1.20-240.00, 25.05-5010.00, 1.45-290.00 and 1.65-330.00 μg/L ( $r \geq 0.9998$ ). The recoveries were in the range of 98.19%-100.91% and RSDs were between 1.46% and 2.99%. The method was applied for the determination of 6 compounds in 36 samples of *T. hypoglaucum* Hutch from different habitats and different parts. The results indicated that this method was simple, rapid and reliable. It can be used for the quality control of *T. hypoglaucum* Hutch.

**Key words:** UPLC-MS; *Tripterygium hypoglaucum* Hutch; content determination; different habitats; different parts

收稿日期:2015-10-10 接受日期:2015-12-21

基金项目:重庆市集成示范项目(cstc2013jesf10011);重庆市应用

开发(重大)计划(cstc2014yykfC10005)

昆明山海棠[*Tripterygium hypoglaucum* (Levl.)

\* 通讯作者 E-mail:cqzhangyi@hotmail.com

Hutch]为卫矛科雷公藤属植物,又名火把花、金刚藤、紫金皮、掉毛草等,始载于《本草纲目》<sup>[1]</sup>。昆明山海棠是一种民间常用草药,在我国应用历史悠久,具有清热解毒、祛风除湿、舒筋活络的功效,临床上主要用于治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮、慢性肾炎等疾病<sup>[2-4]</sup>。

近年来,由于昆明山海棠独特的药品市场需求增加,导致其野生资源急剧下降,而昆明山海棠的人工种植才小规模起步,且各产地质量差异也很大<sup>[4]</sup>。此外,市售产品“昆明山海棠片”以及“火把花根片”均是以根入药,但在我国部分少数民族地区也将茎、叶纳入药用部位。因此,本文采用液质联用法对四川、贵州、重庆等地的昆明山海棠药材不同部位进行了 6 种活性成分的含量测定,对比了各产地与各部位之间的含量差异,为保护昆明山海棠的药用资源,充分利用各药用部位及其质量控制提供依据。

## 1 仪器与材料

LC-30A 超高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司);API-4000 LC-MS/MS 三重四级杆液质串联系统(美国 ABSCIEX 公司);AUW220D 型电子分析天平(日本 SHIMADZU 公司);BS224S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);R-215 旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 公司);HH-S 恒温水浴锅(江苏国胜实验仪器厂)。

对照品雷公藤吉碱(批号 140403,纯度  $\geq 98\%$ )、雷公藤次碱(批号 130823,纯度  $\geq 98\%$ )均购自成都普菲德生物技术有限公司;雷公藤甲素(批号 MUST-14080207,纯度 99.27%)、去甲泽拉木醛(批号 MUST-14061002,纯度  $\geq 98\%$ )、雷酚内酯(批号 MUST-14011205,纯度  $\geq 98\%$ )、雷公藤内酯甲(批号 MUST-14041001,纯度  $\geq 98\%$ )均购自成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

昆明山海棠药材来源见表 1,不同产地及不同部位昆明山海棠药材由重庆市中药研究院生药研究所提供,经重庆市中药研究院瞿显友教授鉴定为昆明山海棠 [*Triptergium hypoglaucum* (Levl.) Hutch] 的干燥根、茎、叶。

表 1 昆明山海棠药材来源

Table 1 Source of *T. hypoglaucum* Hutch

产地 Source	部位 Part	编号 Serial number
剑河 1	根	Y1-1
	茎	Y1-2
	叶	Y1-3
剑河 2	根	Y2-1
	茎	Y2-2
	叶	Y2-3
印江 1	根	Y3-1
	茎	Y3-2
	叶	Y3-3
印江 2	根	Y4-1
	茎	Y4-2
	叶	Y4-3
雷山 1	根	Y5-1
	茎	Y5-2
	叶	Y5-3
雷山 2	根	Y6-1
	茎	Y6-2
	叶	Y6-3
米易 1	根	Y7-1
	茎	Y7-2
	叶	Y7-3
米易 2	根	Y8-1
	茎	Y8-2
	叶	Y8-3
冕宁 1	根	Y9-1
	茎	Y9-2
	叶	Y9-3
冕宁 2	根	Y10-1
	茎	Y10-2
	叶	Y10-3
武隆 1	根	Y11-1
	茎	Y11-2
	叶	Y11-3
武隆 2	根	Y12-1
	茎	Y12-2
	叶	Y12-3

## 2 方法与结果

### 2.1 分析条件

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱 (50 × 2.0 mm, 3 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 系统, 梯度洗脱程序为: 0 ~ 1 min, 35% (B); 1

~ 4 min, 35% ~ 85% (B); 4 ~ 8 min, 85% (B), 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 3 μL, 柱温: 30 °C。

#### 2.1.2 质谱条件

离子源: ESI 源; 模式: MRM-Positive; 电喷雾电压: 5500 V; 雾化气压: 35 Psi; 气帘气压: 15 Psi; 辅助气压: 50 Psi; 离子源温度: 500 °C; 各化合物质谱分析条件参数如表 2 所示, MRM 谱图见图 1。

表 2 6 种成分的质谱分析条件参数

Table 2 MS parameters for the determination of the 6 compounds in *T. hypoglaucom* Hutch

化合物 Compounds	保留时间 Retention time (min)	多反应离子检测 MRM (m/z)	去簇电压 DP (V)	碰撞能 CE (eV)
1	4.54	858.3→206.0	117.98	38
2	4.85	868.3→206.0	71.82	40
3	2.94	361.2→361.1	105.86	17.54
4	5.65	481.3→231.2	83.84	34.69
5	4.76	313.3→225.1	52.04	28.76
6	6.90	455.3→437.4	78.3	19.2

注: 1. 雷公藤吉碱 2. 雷公藤次碱 3. 雷公藤甲素 4. 去甲泽拉木醛 5. 雷酚内酯 6. 雷公藤内酯甲。下表同。

Note: 1. Wilforgine 2. Wilforine 3. Triptolide 4. Demethylzeylasteral 5. Triptophenolide 6. Wilforlide A. Same as below.

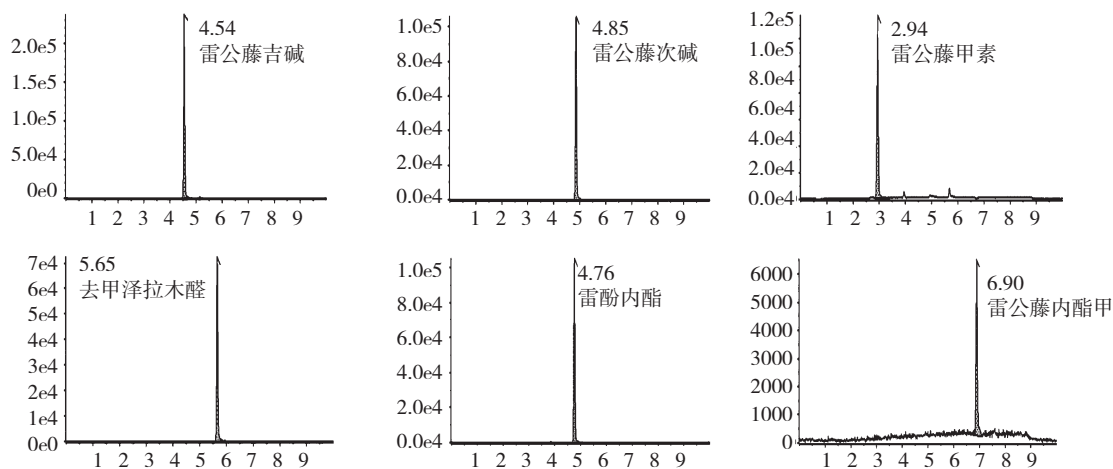


图 1 6 种成分的 MRM 图谱

Fig. 1 MRM chromatograms of the six compounds

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 供试品溶液的制备

精密称取各个产地及各个部位昆明山海棠粉末 (过四号筛) 2 g, 置圆底烧瓶中, 加入乙酸乙酯 50 mL, 水浴回流提取 3 h。滤过, 浓缩至干, 残渣用适量乙腈溶解, 并定容至 100 mL 容量瓶中, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

#### 2.2.2 对照品储备溶液的制备

分别称取雷公藤吉碱、雷公藤次碱、雷公藤甲素、去甲泽拉木醛、雷酚内酯、雷公藤内酯甲 6 种对

照品适量, 置 100 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 得到质量浓度分别为 0.0136、0.0118、0.0024、0.0501、0.0029、0.0018 g/L 的混合对照品储备液。

### 2.3 线性关系的考察

精密吸取上述混合对照品储备液 10 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 得混合对照品溶液①。精密吸取①5 mL 置 10 mL 容量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 得混合对照品溶液②。分别将①、②稀释 10 倍和 100 倍, 得到混合对照品溶液③、

④、⑤、⑥。

精密吸取上述 6 个不同浓度的混合对照品溶液各 3  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项下条件进样测定,以进样质量浓

度( $\mu\text{g/L}$ )为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程,并以 3 倍信噪比确定检测限,10 倍信噪比确定定量限,结果见表 3。

表 3 6 种活性成分的线性回归方程

Table 3 Linear regression equations of the six compounds

化合物 Compounds	回归方程 Regression equation	$r$	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g/L}$ )	检测限 LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	定量限 LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )
1	$Y = 2135X + 4004$	0.9999	6.80 ~ 1360.00	0.008	0.021
2	$Y = 1720X - 3284$	0.9999	5.90 ~ 1180.00	0.023	0.072
3	$Y = 1813X + 220$	0.9999	1.20 ~ 240.00	0.327	1.081
4	$Y = 2777X - 41562$	0.9998	25.05 ~ 5010.00	0.189	0.425
5	$Y = 1917X + 734$	0.9999	1.45 ~ 290.00	0.175	0.632
6	$Y = 147X + 130$	0.9999	1.65 ~ 330.00	0.742	2.868

注:混合对照品⑥中雷公藤内酯甲含量低于定量限。

Note:the content of wilforlide A in the sixth mixed standard was lower than LOQ.

## 2.4 精密度试验

精密吸取对照品溶液③,按“2.1”项下条件连续进样 5 次,进行测定,记录峰面积,各化学成分峰面积的 RSD 值分别为 1.17%、0.99%、0.44%、1.51%、0.83%、0.74%,表明仪器精密度良好。

## 2.5 稳定性试验

取同一份供试品溶液,室温放置,分别于 0、2、4、6、12 h 进样测定,记录峰面积,结果各化学成分峰面积的 RSD 值分别为 0.98%、1.10%、0.92%、1.46%、1.93%、1.28%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

## 2.6 重复性试验

取昆明山海棠根粉末(贵州剑河)2 g,精密称

定,按“2.2.1”项下操作,平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下条件进样测定,6 种活性成分平均含量分别为 366.21、348.22、21.69、64.45、30.28、29.25  $\mu\text{g/g}$ ,RSD 值分别为 1.42%、1.31%、1.26%、2.04%、1.23%、2.86%,表明该方法重复性良好。

## 2.7 加样回收率试验

取已知含量的昆明山海棠根粉末(贵州剑河)6 份,每份约 2 g,精密称定,置圆底烧瓶中,然后精密加入混合对照品溶液适量,按“2.2.1”项下操作,制得供试品溶液,在“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积,计算回收率,结果见表 3。

表 4 6 种活性成分的加样回收率

Table 4 Recoveries of the 6 compounds

化合物 Compounds	加样收率范围 The range of recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	相对标准差 RSD (%)
1	96.36 ~ 101.45	98.19	1.73
2	98.64 ~ 103.27	100.91	1.78
3	97.93 ~ 102.41	100.00	1.46
4	95.76 ~ 101.19	98.84	1.83
5	97.40 ~ 102.43	99.92	1.98
6	95.71 ~ 104.75	100.35	2.99

## 2.8 样品测定

取各产地以及各部位昆明山海棠药材各 2 g,精密称定,按“2.2.1”项下操作,制得供试品溶液,每批平行 3 份,在“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积,计算样品中各成分含量,结果见表 5。

## 3 讨论

### 3.1 供试品溶液提取条件的优化

实验考察了回流、超声不同提取方法,甲醇、乙酸乙酯、50%乙醇等不同提取溶剂,提取时间,以及

表5 昆明山海棠中6种活性成分含量( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=3$ )Table 5 Content determination results of the 6 compounds in *T. hypoglaucom Hutch* ( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=3$ )

编号 Serial number	化合物 Compounds					
	1	2	3	4	5	6
Y1-1	301.05	328.76	20.72	109.48	30.91	34.23
Y1-2	27.74	28.66	8.12	30.95	10.19	13.66
Y1-3	4.09	3.22	5.35	-	2.78	-
Y2-1	359.44	344.54	23.89	63.67	30.24	28.56
Y2-2	30.40	26.64	7.58	30.88	9.38	12.25
Y2-3	3.15	3.04	6.25	-	2.69	-
Y3-1	507.25	389.50	66.36	180.47	37.02	29.98
Y3-2	25.71	30.57	14.12	28.11	14.24	2.87
Y3-3	4.63	2.58	7.76	-	1.34	-
Y4-1	490.97	365.32	68.36	210.02	36.86	27.29
Y4-2	25.40	23.52	11.67	29.72	11.62	2.47
Y4-3	4.41	2.62	8.79	-	1.18	-
Y5-1	1563.05	397.17	35.32	2546.88	90.17	34.75
Y5-2	32.61	34.45	8.50	84.45	15.59	10.57
Y5-3	4.44	2.37	4.68	-	2.19	-
Y6-1	1447.68	394.29	34.35	1870.51	90.73	35.72
Y6-2	32.48	31.85	8.39	62.59	16.79	10.03
Y6-3	3.48	2.62	4.42	-	2.39	-
Y7-1	355.31	248.91	33.69	163.06	37.23	27.39
Y7-2	24.87	24.98	10.04	28.70	12.27	5.57
Y7-3	3.49	2.07	9.79	-	1.25	-
Y8-1	404.86	241.16	34.75	195.25	27.10	25.18
Y8-2	27.60	23.32	10.98	26.16	9.48	4.60
Y8-3	3.57	1.96	8.66	-	1.25	-
Y9-1	311.67	147.13	27.13	859.78	51.77	33.60
Y9-2	24.42	24.76	10.05	62.71	36.56	12.43
Y9-3	3.43	1.72	4.77	-	5.07	-
Y10-1	450.87	130.86	26.02	738.90	42.59	35.17
Y10-2	32.91	30.21	10.55	47.84	35.93	12.61
Y10-3	4.10	2.21	5.24	-	4.47	-
Y11-1	690.57	156.30	26.11	1822.74	25.43	32.86
Y11-2	29.45	26.64	14.89	66.44	10.94	5.40
Y11-3	5.74	2.46	13.89	-	1.10	-
Y12-1	659.19	140.59	23.33	1801.41	23.50	36.73
Y12-2	22.08	25.51	14.27	64.89	9.68	5.75
Y12-3	4.01	2.27	13.22	-	1.14	-

注:“-”表示检测结果低于定量限。

Note:“-” indicated that the content was lower than LOQ.

提取次数。结果显示,乙酸乙酯回流提取 3 h,提取 1 次,得到理想的提取方法。

### 3.2 待测组分的选取

《中国药典》2010 版收录的昆明山海棠片<sup>[5]</sup>,是以总生物碱作为评价指标。但是近年来,不少文献报道昆明山海棠中的萜类成分也是其主要活性成分,因此仅以生物碱作为评价指标不够全面。故本实验分别选取了 6 个最具有代表性的生物碱以及二萜、三萜成分作为待测活性组分,这样更有利于对药材的全面评价。

### 3.3 样品分析

#### 3.3.1 不同产地样品分析

实验结果显示,不同产地之间茎、叶中 6 种活性成分含量整体差异不大,但根中待测组分含量差异明显。雷山昆明山海棠根中雷公藤吉碱、去甲泽拉木醛、雷酚内酯含量均明显高于其他产地;而常作为毒性以及指标性成分的雷公藤甲素各产地含量差异较小,印江产地的含量略高于其他产地。

#### 3.3.2 不同部位样品分析

同一产地不同部位中,各待测物均是以根中含量最高,而茎、叶含量差距不大,大多是茎中含量高于叶。雷公藤甲素各部位差异不大,均在 1 ~ 100  $\mu\text{g/g}$  之间。此外,对昆明山海棠的花、果实等部位含量测定表明,各成分含量与茎、叶近似。

## 4 结论

建立了一种同时测定昆明山海棠中 6 种活性成分含量的方法,相比传统的 HPLC 法极大的缩短了时间,提高了效率<sup>[6,7]</sup>。同时,由于昆明山海棠中结构相似的化合物较多,采用此法能避免各待测组分最大吸收波长差异以及氧化铝柱等纯化处理后导致的测定结果不准确<sup>[7-9]</sup>。不同产地间昆明山海棠根各化学成分含量有一定差异,提示药厂在采购药材时需控制产地。同时,目前昆明山海棠大多为野生来源,仅少量种植,而检测结果显示茎、叶中也含有相同成分,可考虑对其充分利用,进行进一步深度开

发。

### 参考文献

- 1 Li SZ(李时珍). Compendium of Materia Medica (本草纲目). Beijing: People's Medical Publishing House, 1977. 1277.
- 2 Wang Y(王钺), Long CF(隆长峰). The advances in Chinese medicinal herbs (*Tripterygium hypoglaucum* Hutch). *Med Recapitulate* (医学综述), 2006, 12: 691-692.
- 3 Zhang Y(张莹), Fang YF(方勇飞), Wang Y(王勇), et al. Study development on pharmacological effect and clinical research of *Tripterygium hypoglaucum* Hutch. *People's Milit Surgeon* (人民军医), 2008, 51: 463-464.
- 4 Sun H(孙辉), Jiang SY(蒋舜媛), Deng WL(邓文龙), et al. Progress on the study of a medicinal plant *Tripterygium hypoglaucum* and sustainable use of its wild resources. *World Sci-Tech Res Dev* (世界科技研究与进展), 2008, 30(1): 69-72.
- 5 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 1056.
- 6 Zhang RP(张茹萍), He Y(何昱), Shi SL(石森林), et al. Determination of six effective components, total diterpenoids, total alkaloids and total triterpenes in *Tripterygium wilfordii* Hook. f. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2013, 28: 224-229.
- 7 Guo XX(郭响香), Wang YH(王云红), Yu JY(于金英), et al. A study on the HPLC fingerprints of the *Tripterygium hypoglaucum* tablet. *J Shanxi Coll Tradit Chin Med* (陕西中医学院学报), 2015, 38(3): 88-91.
- 8 Hu JL(胡建林), Liu JY(刘晋祎), Bin J(宾婕), et al. Determination of wilforlide A in *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch. *J Kunming Med Univ* (昆明医学院学报), 2010, 31(7): 10-12.
- 9 Wang XY(王贤英), Xie XJ(谢香菊), Li SR(李胜容). Determination of triptolide and epicatechin in *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch. *Chongqing J Res Chin Drugs Herbs* (重庆中草药研究), 2012, 65(1): 17-21.