

液-液微萃取/高效液相色谱-质谱测定五指毛桃水提取液中的补骨脂素与佛手内酯

陶敬奇^{1*}, 闻莹莹¹, 王辉¹, 王三永², 陈洪伟³

(1. 华南师范大学 化学与环境学院, 广东 广州 510631; 2. 广东省食品工业研究所, 广东 广州 510308; 3. 东莞理工学院 化学与环境工程学院, 广东 东莞 523808)

摘要:建立了一种同时测定五指毛桃水提取液中补骨脂素和佛手内酯的高效液相色谱-电喷雾串联质谱法(HPLC-ESI MSⁿ),并对液-液微萃取前处理方法的影响因素进行了探讨。在优化条件下,补骨脂素在0.55~2 200 μg·L⁻¹范围内线性关系良好($r=0.999\ 9$),佛手内酯在1.00~4 000 μg·L⁻¹范围内线性关系良好($r=0.999\ 2$);补骨脂素和佛手内酯的检出限($S/N=3$)分别为0.13、0.18 μg·L⁻¹,定量下限($S/N=10$)分别为0.43、0.60 μg·L⁻¹。对110 μg·L⁻¹补骨脂素和100 μg·L⁻¹佛手内酯平行测定5次,其相对标准偏差(RSD)均小于1%。两者的回收率分别为100%与101%,方法的结果满意,可为五指毛桃水提取液中补骨脂素和佛手内酯的定量分析提供依据,同时结果也表明液-液微萃取/高效液相色谱-质谱联用法可对中药成分进行快速、便捷和有效的检测。

关键词:五指毛桃;液-液微萃取;高效液相色谱-质谱;补骨脂素;佛手内酯

中图分类号: O657.63; TQ460.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2011)06-0618-06

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.06.005

Determination of Psoralen and Bergapten in *Radix fici hirtae* by Liquid-Liquid Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

TAO Jing-qi^{1*}, WEN Ying-ying¹, WANG Hui¹, WANG San-yong², CHEN Hong-wei³

(1. School of Chemistry and Environment, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Guangdong Food Industry Institute, Guangzhou 510308, China; 3. School of Chemistry and Environmental Engineering, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography coupled with electro-spray ionization-tandem mass spectrometric(HPLC-ESI MSⁿ) method was developed for the simultaneous determination of psoralen and bergapten in aqueous extraction from *Radix fici hirtae*. The separation of psoralen and bergapten was performed on a Hypersil C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm), using water-methanol(50:50) as mobile phase at a flow rate of 0.80 mL·min⁻¹. The detection was carried out at room temperature with a detection wavelength of 300 nm(PDA) and an injection volume of 10 μL. The influencing factors for liquid-liquid microextraction(LLME) were investigated. Under the optimized conditions, the calibration curves were linear in the range of 0.55-2 200 μg·L⁻¹ for psoralen and 1.00-4 000 μg·L⁻¹ for bergapten, with correlation coefficients of 0.999 9 and 0.999 2, respectively. The limits of detection($S/N=3$) were 0.13 μg·L⁻¹ and 0.18 μg·L⁻¹, and the limits of quantitation($S/N=10$) were 0.43 μg·L⁻¹ and 0.60 μg·L⁻¹, respectively. The relative standard deviations(RSDs, $n=5$) of 110 μg·L⁻¹ psoralen and 100 μg·L⁻¹ bergapten were both less than 1%. The recoveries of psoralen and bergapten were 100% and 101%, respectively. The results demonstrated that LLME combined with LC-MS was a rapid, convenient and efficient method for the determination of herbal compositions, and could provide the basis for the quantitation detection of psoralen and bergapten in aqueous sample from *Radix fici hirtae*.

Key words: *Radix fici hirtae*; liquid-liquid microextraction(LLME); high performance liquid

收稿日期: 2010-12-23; 修回日期: 2011-02-23

基金项目: 广东省食品工业研究所开放实验室项目资助(FIPL-07-006)

* 通讯作者: 陶敬奇, 硕士, 讲师, 研究方向: 有机分析化学, Tel: 15360506265, E-mail: tao_jing_qi@163.com

chromatography – mass spectrometry (HPLC – MS); psoralen; bergapten

五指毛桃(*Radix fici hirtae*) (拉丁名 *Ficus simplicissima* Lour. [*F. hirta* Vahl var. *palmatiloba* (Merr.) Chun]) 又名“南芪”、“五指榕”、“土黄芪”、“三爪龙、五爪龙、五爪桃”,是我国重要的传统药材之一,且为药食同源植物,属桑科(*Moraceae*)榕属(*Ficus*)植物粗叶榕(*F. hirta*)。在中国南方五指毛桃长期作为饮食汤剂,在治疗脾虚浮肿、肺结核、盗汗、肝硬化、肝炎、癌症、支气管炎、贫血、慢性胃炎等方面具有显著的临床疗效^[1]。此外,该饮品还具有明目、健脾补肺、增强体质等特殊作用。

研究表明补骨脂素与佛手内酯是五指毛桃中最重要的药效成分^[2-4],存在于五指毛桃水提取液中。五指毛桃常用的前处理技术有液-液萃取(LLE)^[5]、固相萃取(SPE)^[6]和固相微萃取(SPME)^[7]等。液相微萃取作为一种价廉的前处理技术,日益受到关注。目前,发展较为成熟的液相微萃取模式主要有单液滴微萃取(SDME)^[8-10]、中空纤维液相微萃取(HFLPME)^[11]、顶空液相微萃取(HSLPME)^[12]、动态液相微萃取(DLPME)^[13]和分散液-液微萃取(DLLME)^[14]等。近年来有关五指毛桃的研究报道日益增多。较早的报道有陈勇等^[15]用薄层色谱(TCL)测定五指毛桃中的补骨脂素,目前的测定方法主要有HPLC法和GC-MS法。

本文采用简易的液-液微萃取(LLME)对五指毛桃水提取液进行前处理,有效降低了背景干扰,增大了富集因子。该方法具有快速、易操作、环境友好、价廉等优点。该前处理方法首次应用于五指毛桃水的提取液,并结合液相色谱-电感耦合电喷雾串联质谱法(HPLC-ESI MSⁿ)对其中的补骨脂素与佛手内酯进行检测。已有针对五指毛桃化学成分的研究多集中于其有机相提取物^[16-20]。本文首次从汤剂的角度,对五指毛桃水提取物中的两种主要活性成分进行微萃取分析,可为五指毛桃的药物入汤研究提供一定的数据参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-40AVP 液相色谱仪(Shimadzu, Japan), 二极管阵列检测器(PDA), Finnigan LCQ Deca XP Max LC-MSⁿ 液相色谱/质谱仪(Thermo 公司), JB-3 磁力加热搅拌器(上海雷磁新经仪器), RE52CS 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), SHB-III 循环水真空泵(郑州长城科工贸), YSC-701 粉碎机(北京燕山正德机械)。

甲醇(色谱纯); 苯、甲苯、二甲苯、正辛醇、正丁醇、正己烷、环己烷、乙酸乙酯均为分析纯; 二次蒸馏水(过 0.22 μm 滤膜)。

补骨脂素和佛手内酯(5-甲氧基补骨脂素)标准品(上海同田生物科技); 4批五指毛桃(购于广东、广西两省药材市场), 经广州中医药大学鉴定均为粗叶榕 *Ficus hirta* Vahlde 的根, 洗净, 晾干, 干燥保存。

1.2 色谱-质谱条件

色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水-甲醇(50:50)等度洗脱; 检测波长: 300 nm; 流速: 0.80 mL · min⁻¹; 进样量: 10 μL。

电喷雾电离源(ESI)质谱检测器: 正离子模式; 喷雾器压力: 1.38 × 10⁵ Pa; 质量范围: *m/z* 50 ~ 800; 扫描类型: 全扫描; 进样量: 10 μL; 停留时间: 300 ms。

1.3 实验方法

粉碎样品, 均质化后过 0.18 mm 筛, 取样, 采用传统煲汤方法萃取(样品放入 10 倍水中浸泡 15 min, 120 °C 大火煲 20 min, 再改为小火 60 °C 煲 1 h), 过滤得目标液(水提取液)。加入 2.00 mL 水提取液于容量瓶中, 将 0.10 mL 有机溶剂平铺其上, 以 800 r · min⁻¹ 搅拌萃取 5 min, 静置分层, 吸取 10 μL 有机相进样分析。

2 结果与讨论

2.1 有机相溶剂种类、体积对富集因子的影响

液-液微萃取包括料液相(水相)和有机相两相, 通过搅拌料液相, 可使目标物通过疏水作用进入有机相。选择的有机相溶剂需与水不互溶、易分层、萃取率高。实验对比了苯、甲苯、二甲苯、正辛

醇、正丁醇、正己烷、环己烷和乙酸乙酯 8 种溶剂对富集因子的影响,结果如图 1。其中,富集因子 $F_E = C_o/C_d$ (C_o 为目标物在有机相中的浓度, C_d 为目标物在水相中的初始浓度)。由图 1 可知,正辛醇作有机相时,两目标物的富集因子均为最大,因此实验选择正辛醇作为有机相。

实验考察了正辛醇的体积对富集因子的影响,结果发现,正辛醇体积越小,水相与有机相的体积比越大,富集因子越高。但有机相体积过小时,溶剂层过薄,分层不明显,较难吸取进样,实验选择 0.10 mL 作为有机相最佳体积。

2.2 搅拌速度对富集因子的影响

搅拌速度是影响富集因子的重要因素,提高搅拌速度,可以增加对流扩散的传质速度,促进传质过程,提高萃取效率^[21]。考察了转速分别为 400、600、800、1 000 $r \cdot \min^{-1}$ 时对富集因子的影响,结果如图 2 所示。结果表明,提高搅拌速度可以提高富集因子。但搅拌速度过高时,溶液不易分层,且有机相在短时间内有所损失。实验选择最佳搅拌速度为 800 $r \cdot \min^{-1}$ 。

2.3 萃取时间对富集因子的影响

分析物从水相进入有机相的微萃取过程是一个富集平衡过程,溶质分子穿越水相和有机相界面的时间不同富集因子不同^[22]。水相和有机相的混合溶液在 800 $r \cdot \min^{-1}$ 下搅拌 5 min 时呈乳浊状。由于水相和有机相得以高度混合,因此传质较快。考察了萃取时间对富集因子的影响,如图 3 所示。萃取 5 min 后,两种分析物的富集因子均有下降趋势,一是由于达到平衡后,随着时间增长,分析物进行反萃取;二是因为长时间搅拌,有机相有所挥发。实验选择最佳萃取时间为 5 min。

2.4 方法的线性范围、检出限及定量下限

用甲醇溶解标样并定容至 5 mL 作为贮备液,逐级稀释后,在优化实验条件下对补骨脂素和佛手内酯的标准溶液分别进行定量分析。以峰面积对质量浓度作标准曲线,补骨脂素在 0.55 ~ 2 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好 ($r = 0.999\ 9$),佛手内酯在 1.00 ~ 4 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好 ($r = 0.999\ 2$)。检出限 ($S/N = 3$) 分别为 0.13、0.18 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,定量下限 ($S/N = 10$) 分别为 0.43、0.60 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对 110 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 补骨脂素和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 佛手内酯平行测定 5 次,其相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.95% 与 0.64%。

2.5 实际样品的分析

在优化实验条件下,对五指毛桃水提物进行 LLME/HPLC 分析,测得补骨脂素和佛手内酯的质量

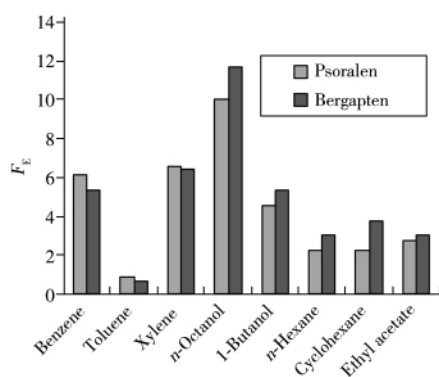


图 1 有机相种类对富集因子的影响

Fig. 1 Effect of various organic solvents on the enrichment factors

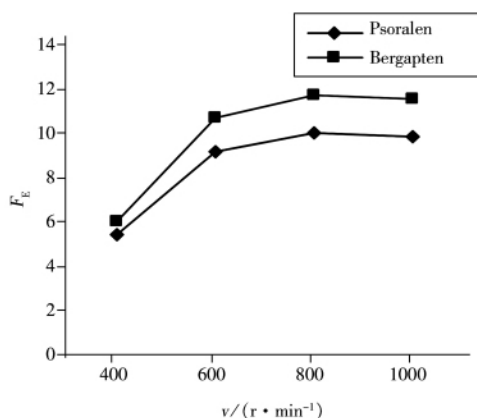


图 2 搅拌速度对富集因子的影响

Fig. 2 Effect of stirring speed on the enrichment factors

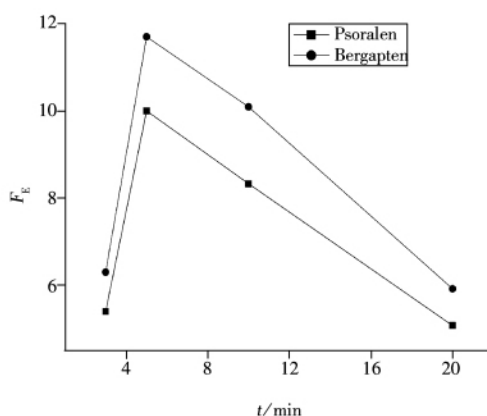


图 3 萃取时间对富集因子的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on the enrichment factors

浓度分别为 0.92、0.18 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。补骨脂素与佛手内酯的回收率分别为 100% 与 101%；重复性的 RSD ($n=5$) 分别为 1.5% 与 1.8%；稳定性的 RSD(48 h) 分别为 3.8% 与 1.7%。

分别考察了不同进样方式下 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的补骨脂素与佛手内酯混标(图 4) 及实际样品的色谱图(图 5)，两图中 A 均为直接进样，B 为经正辛醇萃取后进样。以保留时间定性，峰高定量，经富集因子公式计算： $F_E = C_o/C_d$ ，补骨脂素与佛手内酯的富集因子分别为 9.0 与 11.7。

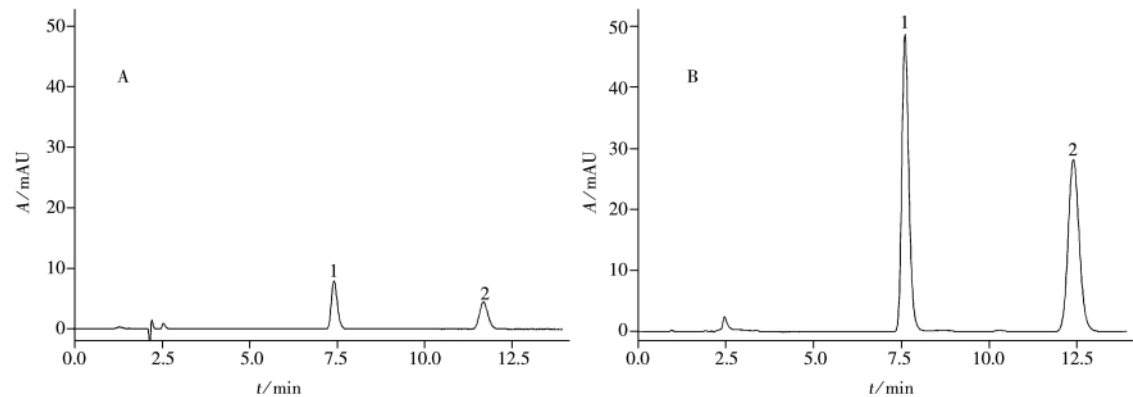


图 4 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的补骨脂素与佛手内酯混标的色谱图
Fig. 4 Chromatograms of $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ psoralen and bergapten standards mixture
A. without extraction, B. extracted by LLME; 1. psoralen, 2. bergapten

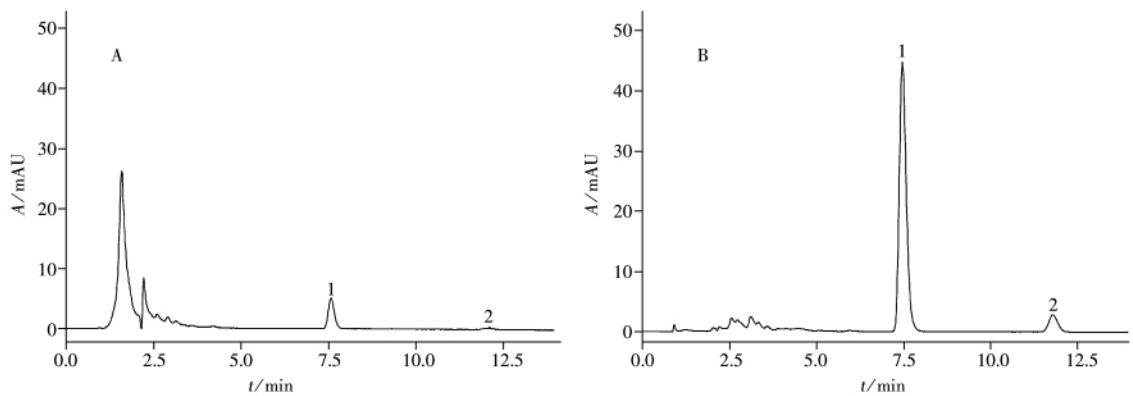


图 5 五指毛桃水提取样的色谱图
Fig. 5 Chromatograms of water extract sample of *Radix ficus hirtae*
the noted were the same as those in fig. 4

2.6 补骨脂素与佛手内酯的裂解机理

图 6 分别为补骨脂素和佛手内酯的质谱图(ESI(+) - MS)，其中图 6A 的 $[M + H]^+$ 为 187，其相对分子质量为 186， m/z 159 为碎片 $[M + H - CO]^+$ ， m/z 131 为碎片 $[M + H - 2CO]^+$ ，确定为补骨脂素；图 6B 的 $[M + H]^+$ 为 217，其相对分子质量为 216， m/z 202 为碎片 $[M + H - CH_3]^+$ ， m/z 174 为碎片 $[M + H - CH_3 - CO]^+$ ，确定为佛手内酯。

补骨脂素在 ESI 正离子下可形成质子化准分子离子 m/z 187 $[M + H]^+$ ，由于其内酯结构，可连续失去羰基分别形成碎片离子 m/z 159、 m/z 131；佛手内酯为 5 位取代的补骨脂素，在 ESI 正离子模式下可形成质子化准分子离子 m/z 217 $[M + H]^+$ ，其先失去侧链甲基形成碎片离子 m/z 202，丢失羰基后形成碎片离子 m/z 174。相应的裂解途径见图 7。

3 结 论

本研究首次将液-液微萃取用于五指毛桃水提物的前处理，并与 HPLC - MS 联用分析其中的活性补骨脂素与佛手内酯。结果表明，该方法具有快速、廉价、环境友好、灵敏度高等优点。同时，该方法针对中药水提物中的活性成分，为药膳同食有效成分的研究提供了一定的数据。

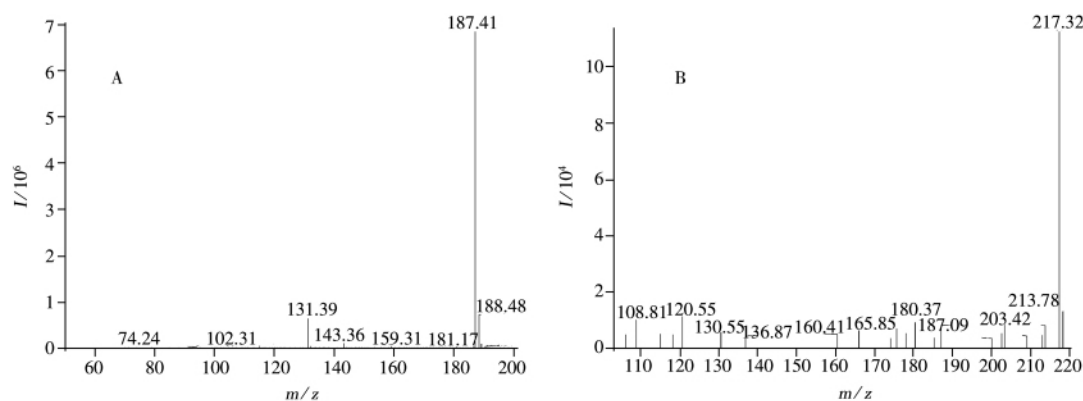


图 6 补骨脂素 (A) 与佛手内酯 (B) 的质谱图

Fig. 6 Mass spectra of psoralen (A) and bergapten (B)

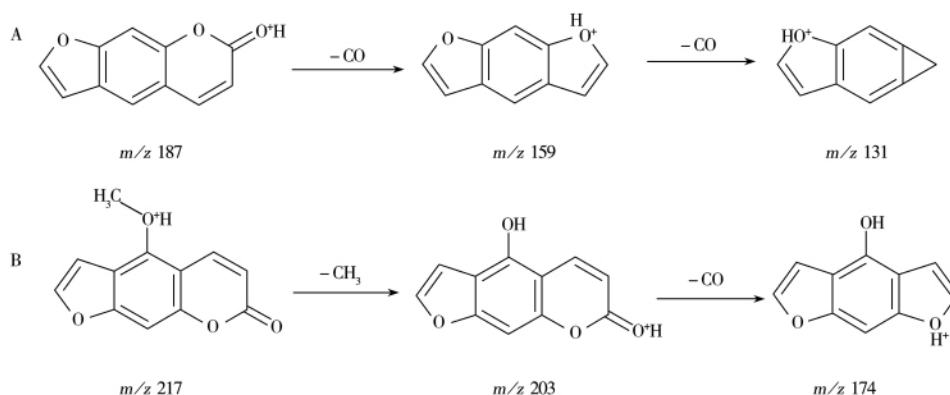


图 7 补骨脂素 (A) 与佛手内酯 (B) 的碎片裂解图

Fig. 7 Proposed MS/MS fragmentation of psoralen (A) and bergapten (B)

参考文献:

- [1] 谢宗万, 范崔生, 朱兆仪. 全国中草药汇编 [M]. 上册. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 155.
- [2] 魏刚, 刘春玲, 何健雄, 庞程罗. 五指毛桃 GC-MS 特征指标成分群探讨 [J]. 中国药理学, 2005, 23(7): 1249-1250.
- [3] 钟镜金, 刘占强, 曾元儿, 江滨, 徐鸿华. HPLC 法测定五指毛桃药材中补骨脂素和佛手内酯的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(2): 126-128.
- [4] CHI C Y, SHI B, LIANG P, LI J M, YOICHIRO I. Isolation and purification of psoralen and bergapten from *ficus carica* L. leaves by high-speed countercurrent chromatography [J]. J Liq Chromatogr Relate Technol, 2009, 32(1): 136-143.
- [5] ZAATER M, TAHBOUB Y, QASRAWY S. Monitoring of polychlorinated biphenyls in surface water using liquid extraction, GC/MS and GC/ECD [J]. Anal Lett, 2005, 38(13): 2231-2245.
- [6] WESTBOM R, THORNEYBY L, ZORITA S, MATHIASSEN L, BJORKLUND E. Development of a solid-phase extraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water [J]. J Chromatogr: A, 2004, 1033(1): 1-8.
- [7] LAMBROPOULOU D A, KONSTANTINOOU I K, ALBANIS T A. Sample pretreatment method for the determination of polychlorinated biphenyls in bird livers using ultrasonic extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr: A, 2006, 1124(1/2): 97-105.
- [8] AHMADI F, ASSADI Y, MILANI HOSSEINI S M R, REZAEI M. Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector [J]. J Chromatogr: A, 2006, 1101(1/2): 307-312.
- [9] 张成功, 赵倩, 陈波, 马铭. 液-液-液三相液相微萃取-高效液相色谱法检测尿样中的安非他明和氯胺酮 [J]. 色谱, 2007, 25(5): 641-645.
- [10] SARAFAZ - YAZDI A, MOFAZZELI F, ES'HAGHI Z. Directly suspended droplet three liquid phase microextraction of diclofenac prior to LC [J]. Chromatographia, 2008, 67(1/2): 49-53.
- [11] HO T S, PEDERSEN - BJERGAARD S, RASMUSSEN K E. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions [J]. Analyst, 2002, 127(5): 608-613.
- [12] TANKEVICIUTE A, KAZLAUSKAS R, VICKACKAITE V. Headspace extraction of alcohols into a single drop [J]. Analyst, 2001, 126(10): 1674-1677.

- [3] WU J, EE K H, LEE H K. Automated dynamic liquid-liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of phenoxy acid herbicides in environmental waters [J]. J Chromatogr: A, 2005, 1082(2): 121-127.
- [4] REZAEI F, BIDARI A, BIRJANDI A P, MILANI H, MOHAMMAD R, ASSADI Y. Development of a dispersive liquid-liquid micro-extraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water [J]. J Hazard Mater, 2008, 158(2/3): 621-627.
- [5] 陈勇, 甄汉深, 陈美燕. 五指毛桃中补骨脂素的含量测定 [J]. 中草药, 2002, 25(4): 265-266.
- [6] 李明, 陈志维, 黎玉翠, 陈振权, 陈楚镇, 苏子仁. HPLC 法测定五指毛桃中补骨脂素和芹菜素的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(1): 52-54.
- [7] 周嵩煜, 韦家福. HPLC 法测定五指毛桃中补骨脂素的含量 [J]. 中南药学, 2004, 2(6): 341-342.
- [8] 许勇, 李乐道, 熊志力, 黄裕银, 郭兴杰. 高效液相色谱法测定中药材补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的含量 [J]. 色谱, 2003, 21(4): 385-387.
- [9] 温玲, 吴华碧, 杨文豪, 梁苇颜, 刘沙, 马骥. 不同叶形不同采收部位五指毛桃中补骨脂素含量的测定 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 687-688.
- [10] 张卫红, 郑玉光, 李晓松, 崔淑艳. HPLC 法对不同产地补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的含量测定 [J]. 河北中医医学报, 2008, 23(1): 43-44.
- [11] PSILLAKIS E, KALOGERAKIS N. Developments in liquid-phase microextraction [J]. Trends Anal Chem, 2003, 22(9): 565-574.
- [12] PALMARSDOTTIR S, THORDARSON E, EDHOLM L E, JONSSON J A, MATHIASSEN L. Miniaturized supported liquid membrane device for selective on-line enrichment of basic drugs in plasma combined with capillary zone electrophoresis [J]. Anal Chem, 1997, 69(9): 1732-1737.

(上接第617页)

- [3] ULU S T, EMALI F T. UV-Second derivative spectrophotometric and colorimetric methods for the determination, validation and thermogravimetric analysis of new oral antidiabetic pioglitazone in pure and pharmaceutical preparations [J]. Anal Lett, 2009, 42(14): 2254-2270.
- [4] COLLADO M S, MANTOVANI V E, GOICEVHEA H C, OLIVIERI A C. Simultaneous spectrophotometric multivariate calibration determination of several components of ophthalmic solutions: phenylephrine, chloramphenicol, antipyrine, methylparaben and thimerosal [J]. Talanta, 2000, 52(5): 909-920.
- [5] ABBASPOUR A, MIZAJANI R. Simultaneous determination of phenytoin, barbital and caffeine in pharmaceuticals by absorption (zero-order) UV spectra and first-order derivative spectra-multivariate calibration methods [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 38(3): 420-427.
- [6] FERRARO M C F, CASTELLANO P M, KAUFMAN T S. Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 34(2): 305-314.
- [7] 吴庆生, 丁亚平. 一阶紫外导数光谱 PLS 法直接同时测定硝酸根和亚硝酸根 [J]. 分析测试学报, 1995, 14(3): 1-5.
- [8] MILLER J N, MILLER J C. Statistics and chemometrics for analytical chemistry [M]. 5th ed. New York: Pearson/Prentice Hall, 2005.