

UPLC-MS/MS 法测定不同产地延胡索中原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素

程井, 孙爱玲, 孙凤娟, 马文军

北京市大兴区人民医院 药剂科, 北京 102600

摘要: 目的 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定不同产地延胡索药材中原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素。方法 采用 Waters UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈-0.1%醋酸铵为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL。ESI 正离子模式采集, 采集模式: MRM (多反应检测), 离子源温度 150 °C, 毛细管电压 3.0 kV, 锥孔电压 50 V, 脱溶剂气流量 800 L/h, 脱溶剂气温度 400 °C。结果 原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素分别在 0.20~10.12、0.25~12.58、1.02~51.20、0.85~42.64、0.39~19.44 ng 线性关系良好; 平均回收率分别为 97.48%、100.16%、101.61%、96.05%、104.17%, RSD 值分别为 1.70%、2.05%、2.55%、0.74%、3.24%。不同产地的延胡索药材中 5 种生物碱的含量有明显差异, 浙江产地延胡索药材中 5 种生物碱的含量相对其他产地较高, 5 种生物碱中脱氢紫堇碱的含量最高。结论 UPLC-MS/MS 法灵敏度高、测定速度快、准确度高, 可用于延胡索药材中 5 种成分的快速测定。

关键词: 延胡索; 原阿片碱; 巴马汀; 脱氢紫堇碱; 延胡索乙素; 延胡索甲素; 超高效液相色谱串联质谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)06-1239-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.06.011

Determination of protopine, palmatinechloride, dehydrocorydaline, tetrahydropalmatine, and corydaline in *Corydalis Rhizoma* from different origins by UPLC-MS/MS

CHENG Jing, SUN Ai-ling, SUN Feng-juan, MA Wen-jun

Department of Pharmacy, Beijing Daxing District People's Hospital, Beijing 102600, China

Abstract: Objective To establish a method for the simultaneous determination of protopine, palmatinechloride, dehydrocorydaline, tetrahydropalmatine, and corydaline in *Corydalis Rhizoma* by UPLC-MS/MS. **Methods** Waters HSS T3 C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used with mobile phase consisted of acetonitrile - 0.1% ammonium acetate by gradient elution. The column temperature was 40 °C and the volume of injection was 5 μL with flow rate of 0.3 mL/min. Multiple-reaction monitoring scanning was used for quantification with electrospray positive ions model. The ion source temperature was 150 °C, the capillary voltage was 3.0 kV, the cone voltage was 50 V, the desolvation gas flow rate was 800 L/h, and the desolvation gas temperature was 400 °C. **Results** The linear ranges of protopine, palmatinechloride, dehydrocorydaline, tetrahydropalmatine, and corydaline were 0.20 — 10.12 ng, 0.25 — 12.58 ng, 1.02 — 51.20 ng, 0.85 — 42.64 ng, and 0.39 — 19.44 ng, respectively. The average recoveries were 97.48%, 100.16%, 101.61%, 96.05%, and 104.17% with RSD of 1.70%, 2.05%, 2.55%, 0.74%, and 3.24%, respectively. The contents of five alkaloids in *Corydalis yanhusuo* from different origins were obviously different. The contents of five alkaloids in *Corydalis Rhizoma* from Zhejiang Province origin were higher than those of other origins, and the content of dehydrocorydaline was the highest among the five alkaloids. **Conclusion** The established method is easy, rapid, and accurate which can be used for the content determination of five alkaloids in *Corydalis Rhizoma*.

Key words: *Corydalis Rhizoma*; protopine; palmatinechloride; dehydrocorydaline; tetrahydropalmatine; corydaline; UPLC-MS/MS

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 夏初茎叶枯萎时

采挖, 除去须根, 洗净, 晒干, 处方中常用其醋制品, 具有活血止痛、行气的功效, 主要用于治疗胸

收稿日期: 2022-03-01

作者简介: 程井 (1985—), 男, 北京大兴人, 中药师, 本科, 研究方向为中药分析及中药鉴定。E-mail: cj202201@yeah.net

痹心痛、脘腹疼痛等^[1-3]。文献报道延胡索中主要活性成分为生物碱类，其中异喹啉类生物碱的含量最高，是发挥镇痛、抗炎、镇静、抗心律失常的主要成分^[4-6]。目前关于延胡索中活性成分测定的报道主要有多种生物碱的同时测定^[7-9]、指纹图谱研究^[10]。延胡索中生物碱类成分提取时，供试品溶液的制备通常采用碱性甲醇，提取效率会高，但会对色谱柱产生一定的影响。超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)测定中药材(饮片)和成方制剂具有灵敏度高、测定速度快、准确度高的优点，采用独特的多反应检测方式进行测定可以应对复杂的中药基质，由于中药的药效发挥通常是整体作用而不是单一化学成分起作用，因此多成分的测定是有必要的。因此为了更好地控制延胡索的质量，本实验建立 UPLC-MS/MS 法测定不同产地延胡索中原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素，为优选延胡索的基源和临床药用提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters H Class 超高效液相色谱仪，Xevo TQs

三重四级杆质谱仪(美国 Waters 公司); Masslynx 4.0 工作站, BSA124SCW 电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试药

原阿片碱(批号 110853-201404, 质量分数以 99.7%计)、盐酸巴马汀(批号 110732-201812, 质量分数以 97.6%计)、延胡索乙素(批号 110726-201819, 质量分数以 99.8%计)对照品均购自中国食品药品检定研究院;脱氢紫堇碱(批号 171025, 质量分数以 98.0%计)、延胡索甲素(批号 190523, 质量分数以 98.6%计)对照品均购自四川维克奇生物科技有限公司;乙酸铵为质谱级(Sigma 试剂公司),乙腈均为色谱纯(美国 Fisher 公司),水为超纯水(Milipore 超纯水机制备),其他试剂均为分析纯试剂。

延胡索药材购自北京市各大中药材市场,购自全国各地,药材信息见表 1,药材分别经北京市大兴区人民医院药剂科马文军副主任药师鉴定为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。

表 1 延胡索药材的信息

Table 1 Information of *Corydalis Rhizoma*

序号	名称	批号	产地	序号	名称	批号	产地
1	延胡索	201201	浙江东阳	6	延胡索	200701	浙江东阳
2	延胡索	200901	江苏南通	7	延胡索	210601	安徽芜湖
3	延胡索	210202	河北安国	8	延胡索	2110003	浙江磐安
4	延胡索	210501	浙江仙居	9	延胡索	200703	陕西汉中
5	延胡索	2010021	浙江磐安	10	延胡索	200802	浙江东阳

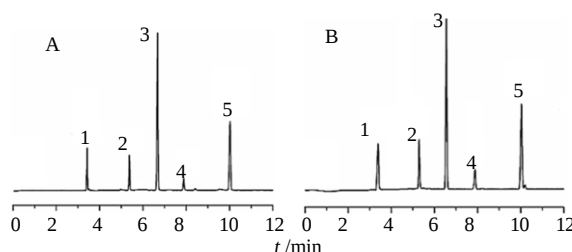
2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以乙腈(A)-0.1%醋酸铵(B)为流动相,梯度洗脱(0~5 min, 20% A; 5~15 min, 20%→80% A; 15~18 min, 80%→20% A),体积流量 0.3 mL/min,柱温 40 °C,进样量 5 μL。色谱图见图 1。

2.2 质谱条件

电离方式:ESI 正离子模式采集,采集模式:MRM(多反应检测),离子源温度 150 °C,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 50 V,脱溶剂气流量 800 L/h,脱溶剂气温度 400 °C。质谱测定参数见表 2。



1-原阿片碱 2-盐酸巴马汀 3-脱氢紫堇碱 4-延胡索乙素 5-延胡索甲素
1-protopine 2-palmatinechloride 3-dehydrocorydaline 4-tetrahydropalmatine 5-corydaline

图 1 对照品(A)和延胡索(B)的总离子流图

Fig. 1 Total ions chromatograms of reference substances (A) and *Corydalis Rhizoma* sample (B)

表 2 各成分的质谱参数

Table 2 MS parameters of each component

名称	母离子	子离子	碰撞电压/V
原阿片碱	354.1	188.1*, 274.9	30、25
盐酸巴马汀	352.1	338.1*, 308.2	20、25
脱氢紫堇碱	366.2	351.1*, 322.1	26、30
延胡索乙素	356.1	191.9*, 203.9	30、20
延胡索甲素	370.1	192.1*, 179.1	22、26

*-定量离子

*-quantitative ions

2.3 对照品溶液的制备

精密称取原阿片碱 5.06 mg、盐酸巴马汀 6.29 mg，置同一 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，作为对照品储备溶液 I；精密称取脱氢紫堇碱 5.12 mg，置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，作为对照品储备溶液 II；精密称取延胡索乙素 5.33 mg，置 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，作为对照品储备溶液 III；精密称取延胡索甲素 4.86 mg，置 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻

度，作为对照品储备溶液 IV。分别精密吸取各对照品储备溶液 I、II、IV 各 1 mL，对照品储备溶液 III 2 mL，置于同一 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释并加至刻度，摇匀，作为混合对照品溶液（原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素的质量浓度分别为 10.12、12.58、51.20、42.64、19.44 $\mu\text{g/mL}$ ）。

2.4 供试品溶液的制备

精密称取延胡索粉末 0.5 g，置回流瓶中，加甲醇 25 mL，称定质量，回流 30 min，冷却，用甲醇补足减失的质量，滤过，滤液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.5 线性关系考察

取对照品混合溶液作为线性系列溶液的最高浓度，然后分别精密吸取 500、300、200、100、20 μL ，置 1 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，作为系列线性对照品溶液，进样测定。以进样质量为横坐标，定量离子的峰面积为纵坐标，进行线性回归考察，结果见表 3。

表 3 5 种成分的线性方程、相关系数和线性范围

Table 3 Linear equation, correlation coefficient, and linear range of five c components

名称	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ng
原阿片碱	$Y=5\,530.3\,X+603.13$	0.999 3	0.20~10.12
盐酸巴马汀	$Y=41\,383\,X-9\,630.4$	0.999 6	0.25~12.58
脱氢紫堇碱	$Y=3\,235.4\,X-382.5$	0.999 8	1.02~51.20
延胡索乙素	$Y=2\,408.7\,X-181.15$	0.999 0	0.85~42.64
延胡索甲素	$Y=5\,077.7\,X-516.78$	0.999 3	0.39~19.44

2.6 精密度试验

取中间浓度对照品溶液（含原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素 2.024、2.516、10.240、8.528、3.888 $\mu\text{g/mL}$ ），连续进样 6 次，记录峰面积，结果原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素峰面积的 RSD 值分别为 1.22%、1.13%、0.86%、1.35%、1.75%。

2.7 重复性试验

精密称取批号 201201 延胡索样品 0.5 g，共 6 份，制备供试品溶液，进样测定峰面积，计算得原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素的质量分数分别为 0.46、0.66、2.32、0.78、0.16 mg/g，RSD 值分别为 1.22%、1.08%、2.05%、1.68%、2.67%。

2.8 稳定性试验

取批号 201201 延胡索样品制备的供试品溶液，分别在 0、1、2、4、8、12、16、24 h 进行测定，结果原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素峰面积的 RSD 值分别为 2.58%、3.12%、2.87%、3.35%、3.86%，结果表明该溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.9 回收率试验

取批号 201201 延胡索样品，精密称取 0.25 g，平行制备 9 份，每 3 份作为 1 组，每组样品分别精密加入原阿片碱（0.101 $\mu\text{g/mL}$ ）、盐酸巴马汀（0.126 $\mu\text{g/mL}$ ）、脱氢紫堇碱（0.512 $\mu\text{g/mL}$ ）、延胡索乙素（0.213 $\mu\text{g/mL}$ ）、延胡索甲素（0.039 $\mu\text{g/mL}$ ）对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL，制备供试品溶液，进样测定

各成分的峰面积, 计算得原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素的平均回收率分别为 97.48%、100.16%、101.61%、96.05%、104.17%, RSD 值分别为 1.70%、2.05%、2.55%、0.24%、3.74%。

2.10 样品测定

取不同产地的 10 批延胡索样品, 制备供试品溶液, 进行测定, 外标法定量, 结果见表 4。可以看出不同产地的延胡索药材中 5 种生物碱的含量有

明显差异, 浙江产地延胡索药材中 5 种生物碱的含量相对其他产地较高, 其中原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素的质量分数分别在 0.38~0.65、0.29~0.81、1.68~2.55、0.58~1.05、0.07~0.23 mg/g; 5 种生物碱中脱氢紫堇碱的含量最高, 由于脱氢紫堇碱也具有杀菌、消炎、镇痛、镇静作用, 因此在延胡索药材的质量控制中可以同时控制多种活性成分, 从而更加全面地反映药材的质量。

表 4 延胡索中原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素的测定结果 ($n=2$)

Table 4 Determination of protopine, palmatinechloride, dehydrocorydaline, tetrahydropalmatine, and corydaline in *Corydalis Rhizoma* ($n=2$)

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	原阿片碱	盐酸巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	延胡索甲素
200801	0.46	0.66	2.32	0.78	0.16
201001	0.52	0.43	1.96	1.05	0.11
191201	0.38	0.29	1.68	0.62	0.09
200701	0.49	0.71	2.05	0.63	0.14
201023	0.65	0.81	2.55	0.83	0.22
210201	0.56	0.51	2.49	0.88	0.21
210302	0.45	0.68	1.89	0.67	0.07
210501	0.57	0.46	2.11	0.75	0.18
210701	0.43	0.62	1.77	0.58	0.12
201011	0.48	0.72	2.28	0.83	0.23

3 讨论

3.1 指标成分的选择

延胡索药材中主要成分为生物碱类, 但《中国药典》2020 年版一部中延胡索项下仅采用延胡索乙素作为质控指标^[3], 单一的成分不能代表药材的整体质量, 且延胡索乙素并不是延胡索药材中含量最高的活性成分, 原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱和延胡索甲素的含量也较高, 也在延胡索的药效中发挥重要作用, 因此本实验建立延胡索中 5 种生物碱的同时测定的方法, 为延胡索药材的质量控制提供方法。

3.2 色谱条件的优化

首先对流动相分别为乙腈-水溶液、甲醇-0.1%醋酸铵溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液和乙腈-0.1%醋酸铵溶液进行了考察, 结果发现乙腈的洗脱能力较强, 5 种成分的出峰较快, 色谱峰形较好。当使用 0.1%醋酸铵作为流动相时, 5 种成分的离子响应强度优于甲酸, 因此选择乙腈-0.1%醋酸铵作

为流动相。然后分别对不同柱温 (30、35、40、45 $^{\circ}\text{C}$) 进行了考察, 结果发现柱温对其影响不大, 柱温高时, 峰形好, 且柱温高时出峰时间快, 但当柱温 45 $^{\circ}\text{C}$ 时, 4 个成分的分度度较差, 综合考虑选择 40 $^{\circ}\text{C}$ 。最后分别考察不同的进样量 (1、2、5、10 μL) 的影响, 结果发现如果进样量偏大, 会造成色谱峰形裂分, 定量不准确, 进样量小, 峰形太差, 响应较低, 积分峰面积小, 样品测定的重复性差, 因此选择进样量为 5 μL 。

3.3 质谱条件的优化

在上述色谱条件下, 取对照品混合溶液, 采用仪器自动优化方式, 首先采用全扫描的方式对 5 种生物碱的母离子进行扫描, 结果发现 5 种成分在正离子模式下 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 的响应值较高, 然后对每个成分的毛细管电压和锥孔电压进行优化, 选取响应较高的毛细管电压和锥孔电压; 最后通过调整不同的碰撞电压分别对 5 种成分的子离子进行优化, 每个成分选取至少 2 个离子对, 作为其定性的依据, 同

时选择 2 个离子对中响应最高的离子对进行定量分析,最后确定采用多反应检测(MRM)方法进行定量分析。

本实验采用 UPLC-MS/MS 法测定不同产地延胡索药材中 5 种生物碱,与文献报道的 HPLC 法^[11]比较,可以在 11 min 完成 5 个成分的测定,具有分析速度快、采用质谱 MRM 模式进行采集灵敏度高,且质谱测定的专属性强,可以避免假阳性的出现。本研究建立的方法可用于延胡索药材中 5 种成分的快速测定,为延胡索药材的质量控制提供方法依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 尚坤,李敬文,常美月,等.延胡索药理作用研究[J].吉林中医药,2019,39(1):108-110.
- [2] 吴雪松,许浚,张喜民,等.元胡止痛方的化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2015,46(7):1081.
- [3] 中国药典[S].一部.2020:145.
- [4] 杨鑫宝,杨秀伟,刘建勋.延胡索物质基础研究[J].中国中药杂志,2014,39(1):20-27.
- [5] 侯鹏飞,宿树兰,段金彪,等.液质联用技术分析延胡索中的生物碱类成分[J].中国医药导报,2008,5(11):48-49.
- [6] 范天慈,窦志英,宋洪伟,等.基于多成分含量测定结合化学计量学考察延胡索不同加工方法对成分稳定性的影响[J].中草药,2021,52(13):4047-4054.
- [7] 张静,周浓,祁俊生,等.HPLC 同时测定不同产地延胡索中的 6 种生物碱[J].华西药学杂志,2016,31(4):415-419.
- [8] 徐皓.HPLC 法测定不同产地元胡药材中 5 种生物碱含量[J].药物分析杂志,2015,35(8):1403-1407.
- [9] 张丹,王昌利,卜雕雕,等.高效液相色谱法同时测定延胡索中 5 种生物碱含量的方法学研究[J].中南药学,2018,16(12):1759-1762.
- [10] 王欢,毕福钧,林彤,等.延胡索 HPLC 指纹图谱研究及 9 种生物碱含量测定[J].中药材,2017,40(3):624-629.
- [11] 毕福钧,林彤.RP-HPLC 法同时测定醋延胡索配方颗粒中 7 种生物碱[J].中草药,2016,47(4):606-609.

[责任编辑 解学星]