

## 盘龙七片中抗炎镇痛生物碱类成分同时测定的方法学研究

何 姬<sup>1</sup>, 刘妍如<sup>1\*</sup>, 段金廉<sup>2\*</sup>,  
唐志书<sup>1,3</sup>, 宋忠兴<sup>1</sup>, 赵艳婷<sup>1</sup>, 张德柱<sup>4</sup>, 杨国伟<sup>5</sup><sup>1</sup>陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 咸阳 712083;<sup>2</sup>南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 南京 210023;<sup>3</sup>中国中医科学院, 北京 100700; <sup>4</sup>陕西盘龙药业集团股份有限公司, 商洛 711400;<sup>5</sup>山西省检验检测中心(山西省标准计量技术研究院), 太原 030002

**摘要:**采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS)技术,对盘龙七片抗炎镇痛生物碱类成分进行表征,共表征出17种生物碱成分;根据表征的结果建立UPLC-ESI-MS/MS定量分析方法以用于盘龙七片质量分析评价,结果表明17种生物碱在各自浓度范围内线性关系良好, $r \geq 0.9990$ ,仪器精密度、方法重复性、供试品稳定性均良好,平均加样回收率为86.42%~112.75%,RSD为1.49%~5.59% ( $n = 6$ )。本研究所建立的方法准确、重复性良好,可用于盘龙七片中17种生物碱的定量测定,为完善盘龙七片质量控制的潜在新指标提供了参考。

**关键词:**盘龙七片;生物碱;成分分析;UPLC-Q-TOF-MS/MS;UPLC-ESI-MS/MS

中图分类号:R286.0;R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)2-0291-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.2.013

## Study on the method of simultaneous determination of anti-inflammatory and analgesic alkaloids in Panlongqi tablets

HE Ji<sup>1</sup>, LIU Yan-ru<sup>1\*</sup>, DUAN Jin-ao<sup>2\*</sup>, TANG Zhi-shu<sup>1,3</sup>,  
SONG Zhong-xing<sup>1</sup>, ZHAO Yan-ting<sup>1</sup>, ZHANG De-zhu<sup>4</sup>, YANG Guo-wei<sup>5</sup><sup>1</sup>Medicine Shaanxi Provincial and Ministerial Collaborative Innovation Center for Industrialization of Traditional Chinese Medicine Resources, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712083, China;<sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;<sup>3</sup>China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; <sup>4</sup>Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shangluo 711400, China; <sup>5</sup>Shanxi Provincial Inspection and Testing Center (Shanxi Institute of Standards and Metrology Technology), Taiyuan 030002, China

**Abstract:** The ultra performance liquid chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) technology was utilized to identify the anti-inflammatory and analgesic alkaloids components of Panlongqi tablets, and a total of seventeen alkaloids components were characterized; based on the characterization results, UPLC-ESI-MS/MS quantitative analysis method was established for the quality analysis of Panlongqi tablets. The results showed that seventeen alkaloids had good linear relationship in their respective concentration ranges,  $r \geq 0.9990$ , the average recoveries rate was 86.42% - 112.75%, the RSDs of 1.49% - 5.59% ( $n = 6$ ). The method established in this study is accurate and reproducible for the quantitative determination of seventeen alkaloids in Panlongqi tablets, which provides a reference for the improvement of potential new indicators for quality control of Panlongqi tablets.

**Key words:** Panlongqi tablets; alkaloids; composition analysis; UPLC-Q-TOF-MS/MS; UPLC-ESI-MS/MS

收稿日期:2022-07-15 接受日期:2022-10-26

基金项目:陕西省科技厅重点产业创新链(群)项目(2020ZDLSF05-08);国家自然科学基金面上项目(82173970);陕西省高层次人才特殊支持计划 &amp; 青年拔尖人才支持计划(2018-33)

\* 通信作者 Tel:86-29-38182207; E-mail:yanzi\_2203@aliyun.com, dja@njucm.edu.cn

盘龙七片来源于中医骨伤世家王家成所献秘方,是由 29 味中药组成的复方制剂。临床上主要用于治疗风湿类、腰肌劳损、软组织损伤所致的疼痛、肿胀等病症<sup>[1,2]</sup>。研究表明生物碱是盘龙七片的主要成分之一,通过下调炎症因子,调节巨噬细胞极化等途径发挥抗炎镇痛的作用<sup>[3-5]</sup>。现代药理学结果显示部分生物碱类既是有效成分也是毒性成分<sup>[6]</sup>,如使用不当可导致严重的不良反应,而目前盘龙七片的质量控制标准(《国家中成药标准》WS3-B-3998-98-1)未对生物碱含量进行测定<sup>[7]</sup>。因此,为了提高盘龙七片的质量控制水平,保证其临床用药的安全性和有效性,本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对盘龙七片中具有抗炎镇痛作用的生物碱类成分进行表征,然后建立同时测定其含量的定量方法,为提高盘龙七片质量控制水平提供数据基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

Triple TOF™ 5600 三重四级杆飞行时间质谱仪(美国爱博才思公司);FW-400AD 高速万能粉碎机(天津鑫博得仪器有限公司);Agilent 1290 型高效液相色谱串联 AB SCIEX4500 Qtrap 三重四级杆线性离子阱质谱仪(美国安捷伦公司,美国爱博才思公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Sartorius CPA225D 十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司)。

### 1.2 材料

对照品别隐品碱(批号 MUST-22031111,纯度

98.12%);小檗红碱(批号 MUST-21120701,纯度 98.71%);次乌头碱(批号 MUST-22032312,纯度 98.59%);二氢盐酸白屈菜红碱(批号 MUST-22032004,纯度 99.21%);四氢小檗碱(批号 MUST-22030608,纯度 99.27%);苯甲酰乌头原碱(批号 MUST-22042014,纯度 98.26%);盐酸盐酸白屈菜红碱(批号 MUST-21101002,纯度 99.41%);盐酸小檗碱(批号 MUST-22010607,纯度 98.38%);盐酸盐酸血根碱(批号 MUST-21062912,纯度 99.76%);苯甲酰次乌头原碱(批号 MUST-22030911,纯度 99.68%);苯甲酰新乌头原碱(批号 MUST-22031710,纯度 98.55%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;欧乌头碱(批号 HR2056W1,纯度 ≥ 98%);二氢血根碱(批号 HR2111W10,纯度 ≥ 98%)均购自宝鸡辰光生物科技有限公司;乌头碱(批号 230001-202105,纯度 ≥ 98%);新乌头碱(批号 240007-202104,纯度 ≥ 98%)均购自上海鸿永生生物科技有限公司;原阿片碱(批号 110853-201805,纯度 99.6%)购自中国食品药品鉴定研究所;α-玉柏碱(批号 AF21061902,纯度 ≥ 98%)购自成都埃法生物科技有限公司;无水乙醇(分析级,安徽安特食品股份有限公司);甲醇(分析级,成都市科隆化学有限公司);乙腈(色谱级,德国默克公司);甲酸(批号:H158A,美国西格玛奥德里奇公司);水为超纯水(密理博超纯水机制备)。样品为盘龙七片及单味药材,由陕西盘龙药业集团股份有限公司提供(见表 1)。

表 1 盘龙七片样品及单味药材信息

Table 1 Panlongqi tablets samples and single flavor medicinal material information

样品 Sample	编号 No.	批号 Sample No.
盘龙七片 Panlongqi tablets (PLT)	1	20210521
	2	20210530
	3	20210614
	4	20210621
	5	20210802
	6	20210804
	7	20210805
	8	20210329
伸筋草 Lycopodium Herba (LH)	-	2020091022
老鼠七 Hylomeconis Rhizoma (HR)	-	2020091016
铁棒锤 Aconiti Penduli Radix (APR)	-	2020091014
草乌 Aconiti Kusnezoffii Radix (AKR)	-	2020091015
川乌 Aconiti Radix (AR)	-	2020091012

### 1.3 溶液的制备

#### 1.3.1 对照品溶液的制备

分别称取对照品适量,加甲醇制成每毫升含苯甲酰次乌头原碱 6.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,小檗碱 6.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,二氢白屈菜红碱 2.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,苯甲酰新乌头原碱 9.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,二氢血根碱 4.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,欧乌头碱 3.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,盐酸血根碱 2.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,原阿片碱 2.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,苯甲酰乌头原碱 8.57  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,别隐品碱 2.40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , $\alpha$ -玉柏碱 2.70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,白屈菜红碱 2.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,四氢小檗碱 2.60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,次乌头碱 1.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,乌头碱 13.60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,新乌头碱 3.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,小檗红碱 1.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液,于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。分别等量吸取上述对照品储备液混匀并浓缩 3 倍作为混合标准品溶液,于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 1.3.2 供试品溶液的制备

取本品 20 片除去包衣,研细,混匀,精密称取细粉约 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,超声 25 min (250 W, 40 kHz),放冷至室温,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液<sup>[7]</sup>。

#### 1.3.3 单味药材样品的制备

取伸筋草、铁棒锤、老鼠七、草乌、川乌各 0.5 g,精密称定,按“1.3.2”项下方法制备单味药材溶液。

#### 1.3.4 阴性样品的制备

按盘龙七片处方比例及制备工艺分别制备缺伸筋草、缺老鼠七、缺草乌、缺川乌、缺铁棒锤的阴性样品,按照“1.3.2”项下方法制备各阴性样品供试品溶液。

### 1.4 成分表征条件

#### 1.4.1 色谱条件

采用 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 柱 (2.1 mm  $\times$

100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱,流动相为 0.1% 甲酸-水溶液 (A)-乙腈溶液 (B),梯度洗脱程序: 0 ~ 2 min, 0.2%  $\rightarrow$  12% B; 2 ~ 8 min, 12%  $\rightarrow$  13% B; 8 ~ 14 min, 13%  $\rightarrow$  30% B; 14 ~ 24 min, 30%  $\rightarrow$  45% B; 24 ~ 35 min, 45%  $\rightarrow$  70% B; 35 ~ 42 min, 70%  $\rightarrow$  90% B; 42 ~ 46 min, 90%  $\rightarrow$  0.2% B; 46 ~ 50 min, 0.2%  $\rightarrow$  0.2% B; 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 体积流量为 0.3 mL/min, 进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.4.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式下, 采用信息依赖采集 (IDA)、动态背景扣除 (DBS) 和高灵敏度模式采集数据。离子扫描范围  $m/z$  100 ~ 2 000, 正离子模式下源喷射电压 (ion spray voltage floating) 为 5 500 V, 裂解电压 (declustering potential, DP) 为 80 V, 碰撞能量 (collision energy, CE) 为 35 V, 正离子模式下, 雾化气 (ion source gas 1, GS1) 和辅助气 (ion source gas 2, GS2) 为氮气, 皆为 50 psi, 气帘气 (curtain gas, CUR) 为 35 psi, 雾化温度 (temperature, TEM) 550  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.5 定量条件

#### 1.5.1 液相条件

同“1.4.1”项。

#### 1.5.2 质谱条件

定量质谱分析采用 ESI 正离子模式进行扫描, 检测模式为多反应检测 (multiple reaction monitoring, MRM)。离子化参数为离子喷雾电压, 正离子模式 5 500 V; 雾化气和辅助气为氮气, 皆为 50 psi; 离子源温度 550  $^{\circ}\text{C}$ 。化合物离子对, 优化后的采集参数: 去簇电压 (declustering potential, DP)、碎裂能量 (collision energy, CE) 和碰撞池出口电压 (cell exit potential, CXP) 等信息见表 2。

表 2 盘龙七片中 17 种生物碱类化合物检测参数

Table 2 LC-MS-MS data for the seventeen alkaloids in PLT

序号 No.	化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	离子对 Ion pair	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
1	欧乌头碱 Napelline	5.12	360.3/342.2	24.00	45.00	13.00
2	$\alpha$ -玉柏碱 $\alpha$ -Obscurine	5.74	275.1/244.1	95.72	29.29	8.77
3	原阿片碱 Protopine	13.36	354.1/188.1	95.00	40.00	5.00
4	别隐品碱 Allocryptopine	14.09	370.1/188.1	99.40	37.20	9.00
5	苯甲酰新乌头原碱 Benzoylmesaconine	14.64	590.3/558.3	24.00	46.00	13.00
6	四氢小檗碱 Canadine	14.87	340.1/176.1	86.00	34.00	9.00
7	小檗红碱 Berberubine	14.92	322.1/307.1	70.00	40.00	13.00

续表 2 (Continued Tab. 2)

序号 No.	化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	离子对 Ion pair	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
8	盐酸血根碱 Sanguinarine chloride	15.37	332.1/274.1	92.00	44.00	9.00
9	苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine	15.40	604.3/572.3	24.00	45.00	13.00
10	盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride	15.69	336.1/320.1	70.00	40.00	13.00
11	苯甲酰次乌头原碱 Benzoylhypaconitine	15.81	574.3/542.3	24.00	46.00	13.00
12	盐酸白屈菜红碱 Chelerythrine chloride	16.68	348.1/333.1	70.00	35.00	13.00
13	新乌头碱 Mesaconitine	17.82	632.3/572.2	24.66	45.72	6.16
14	次乌头碱 Hypaconitine	19.12	616.3/556.3	24.00	46.00	12.00
15	乌头碱 Aconitine	19.22	646.4/586.3	17.18	45.49	16.06
16	二氢白屈菜红碱 Dihydrochelerythrine	32.65	350.1/334.1	70.00	35.00	13.00
17	二氢血根碱 Dihyrosanguinarine	34.69	334.1/318.1	92.00	44.00	13.00

## 2 结果

### 2.1 成分表征

单味药材、盘龙七片生物碱成分表征正离子模式的总离子流图见图 1。通过 Peakview 2.2 查看采集数据,以 AB SCIEX master view 1.1.0.0 中药成分

数据库(TCM library 1.0)作为生物碱成分匹配库。通过比对精确质量数、同位素峰度比以及碎片离子裂解规律等信息,初步从盘龙七片中表征出 17 种生物碱成分并做了单味药材成分归属(见表 3)。

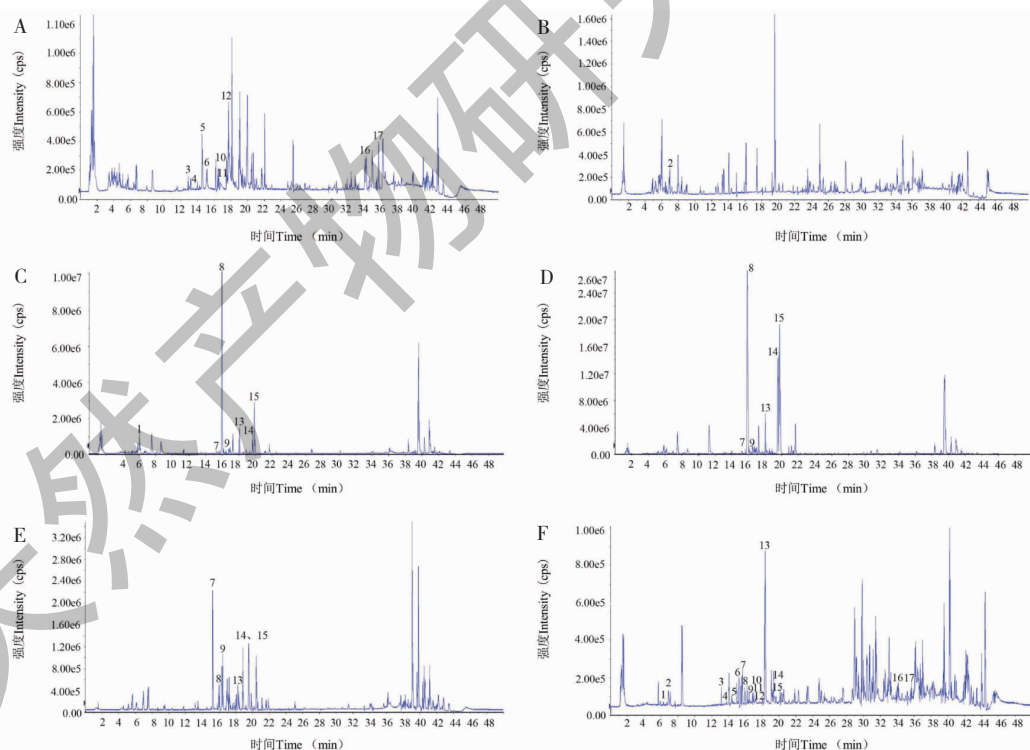


图 1 单味药材、盘龙七片生物碱成分表征的正离子模式总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram for the characterization of single herbs and Panlongqi tablets alkaloids composition under positive ion mode

注: A. 老鼠七; B. 伸筋草; C. 铁棒锤; D. 草乌; E. 川乌; F. 盘龙七片(批号 20210329); 1~17 的化合物名称见表 3。Note: A. HR; B. LH; C. APR; D. AKR; E. AR; F. PLT (Batch Number 20210329); The compound names of 1-17 are shown in Table 3.

表3 盘龙七片中17种生物碱成分  
Table 3 Seventeen alkaloids components in the PLT

编号 No.	化合物 Compound	保留时间 (min)	化学式 Molecular formula	母离子 Parent ion ( <i>m/z</i> )	碎片离子及结构信息 Fragment ion and structural information	药材归属 Ownership of medicinal herbs	参考文献 Reference
1	欧乌头碱 Napelline	6.05	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub>	360.3	342[M + H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	APR	8
2	α-玉柏碱 α-Obcurine	6.96	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O	275.2	244[M + H-NH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	LH	9
3	四氢小檗碱 Canadine	13.17	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	340.2	177[M + H-C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	HR	10
4	小檗红碱 Berberrubine	13.47	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	322.1	307[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>·+</sup> , 279[M-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>·+</sup>	HR	对照品比对
5	原阿片碱 Protopine	14.57	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	354.1	336[M + H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 206[M + H-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 188[M + H-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 149[M + H-C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N] <sup>+</sup>	HR	10
6	别隐品碱 Alloclryptopine	15.14	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	370.2	290[M + H-H <sub>2</sub> O-NH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -OCH <sub>3</sub> ] <sup>·+</sup> , 188[M + H-C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	HR	10
7	苯甲酰新乌头原碱 Benzoylmesaconine	15.24	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>10</sub>	590.3	558[M + H-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> , 540[M + H-CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	APR、AR、AKR	11,12
8	苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine	15.95	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>10</sub>	604.3	572[M + H-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> , 554[M + H-CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 522[M + H-2CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	APR、AR、AKR	11,12
9	苯甲酰次乌头原碱 Benzoylhypacoitine	16.43	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>9</sub>	574.3	542[M + H-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> , 524[M + H-CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	APR、AR、AKR	12,13
10	盐酸血根碱 Sanguinarine chloride	16.44	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	332.3	317[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>·+</sup> , 302[M-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 274[M-2CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup>	HR	10
11	盐酸小檗碱 Berberine Hydrochloride	16.74	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	336.1	321[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>·+</sup> , 320[M-CH <sub>3</sub> -H] <sup>+</sup> , 292[M-CH <sub>3</sub> -H-CO] <sup>+</sup> , 278[M-2CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup>	HR	10
12	盐酸白屈菜红碱 Chelerythrine chloride	17.67	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	348.1	333[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 318[M-H-2CH <sub>3</sub> ] <sup>·+</sup> , 304[M-H-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup>	HR	10
13	新乌头碱 Mesaconitine	18.35	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>11</sub>	632.3	614[M + H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 586[M + H-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	APR、AR、AKR	11,12
14	乌头碱 Aconitine	19.52	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>11</sub>	646.3	586[M + H-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup> , 554[M + H-CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> , 522[M + H-CH <sub>3</sub> COOH-2CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>	APR、AR、AKR	11,14
15	次乌头碱 Hypaconitine	19.54	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>10</sub>	616.3	584[M + H-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> , 506[M + H-CH <sub>3</sub> OH-CH <sub>3</sub> COOH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	APR、AR、AKR	12,14
16	二氢白屈菜红碱 Dihydrochelerythrine	34.12	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	350.1	334[M + H-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 319[M + H-H-2CH <sub>3</sub> ] <sup>·+</sup>	HR	对照品比对
17	二氢血根碱 Dihydrosanguinarine	35.66	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	334.1	318[M + H-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	HR	对照品比对

## 2.2 定量方法学考察

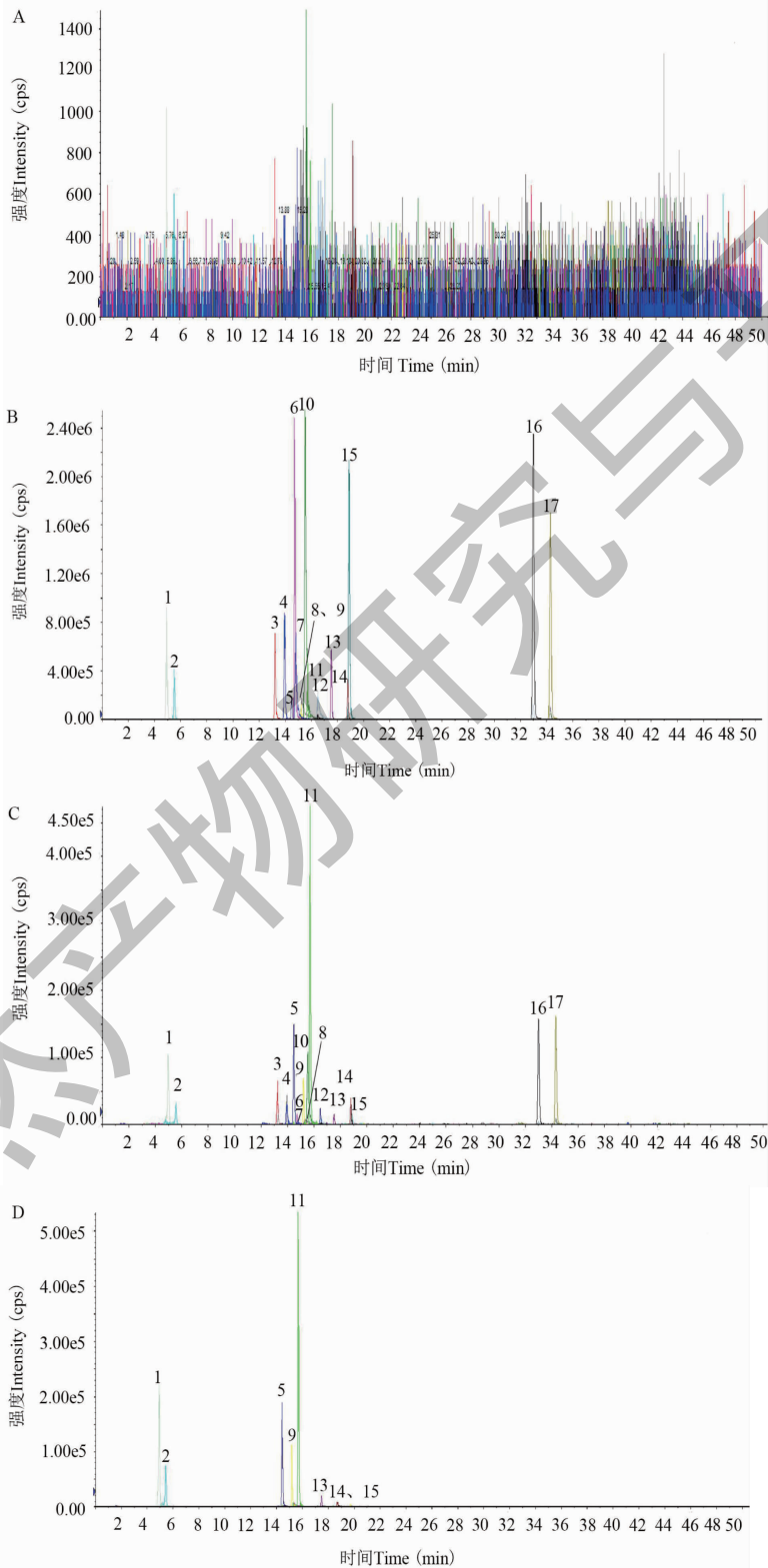
根据 UPLC-Q-TOF-MS 确定的生物碱成分,采用

UPLC-ESI-MS/MS 对盘龙七片中 17 种生物碱成分进行定量方法学考察。

### 2.2.1 专属性

分别取空白、混合对照品溶液、供试品溶液、缺单味药材的阴性供试品溶液,按“1.5”项下条件进行样分析,MRM 提取离子图见图2。除铁棒锤、草乌、

川乌中均含有相似的生物碱成份外,在其他对照品出峰位置上缺单味药材阴性供试品溶液未见干扰峰,说明单味药材中的生物碱成分不干扰盘龙七片中化合物的测定。



续图 2(Continued Fig.2)

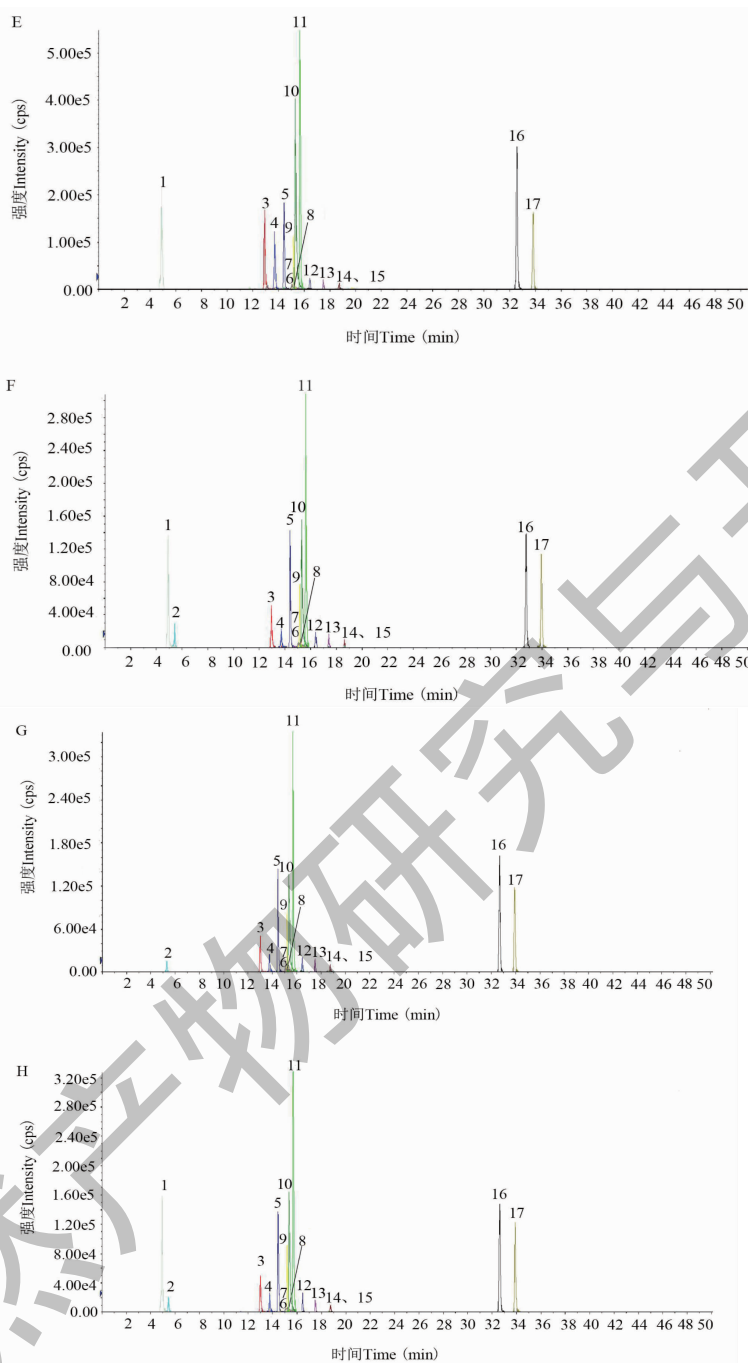


图2 空白、混合对照品、供试品溶液、阴性供试品溶液的MRM提取离子图

Fig. 2 MRM extraction ion chromatograms of blank, mixed control, test solution and negative test solution

注: A. 空白; B. 17种对照品(名称见表2); C. 供试品溶液(批号20210329); D. 缺老鼠七单味药材; E. 缺伸筋草单味药材; F. 缺川乌单味药材; G. 缺铁棒锤单味药材; H. 缺草乌单味药材。Note: A. Blank; B. Seventeen kinds of controls (the names are shown in Table 2); C. Test solution (batch number 20210329); D. Lack of HR; E. Lack of LH; F. Lack of AR; G. Lack of APR; H. Lack of AKR.

## 2.2.2 标准曲线、检出限和定量限

精密吸取“1.3.1”项下混合对照品溶液,加入甲醇按梯度体积稀释,按照“1.5”项下条件进行测定,记录色谱图。以被测化合物浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )为横坐标( $x$ ),相应峰面积为纵坐标( $y$ ),绘制标准曲线。

盘龙七片不同化合物的线性范围为  $0.26 \times 10^{-3} \sim 28.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,且相关系数均大于0.999,表明各对照品线性关系良好。17种生物碱的线性方程、相关系数、线性范围及定量限、检测限结果见表4。

表4 17种生物碱同时测定方法线性方程、线性范围、定量限、检测限结果

Table 4 Linear equations, linear ranges, quantitative limits, and detection limits of seventeen alkaloids simultaneous determination methods

编号 No.	化合物 Compound	线性方程(相关系数) Linear equation (correlation coefficient)	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )	定量限 Limit of quantitation ( $\text{ng/mL}$ )	检测限 Limit of detection ( $\text{ng/mL}$ )
1	欧乌头碱 Napelline	$y = 1.75 \times 10^6 x + 4.90 \times 10^4 (r = 0.999 9)$	0.10 ~ 6.66	4.16	$3.33 \times 10^{-1}$
2	$\alpha$ -玉柏碱 $\alpha$ -Obscurine	$y = 9.97 \times 10^5 x - 1.21 \times 10^4 (r = 0.999 3)$	0.01 ~ 0.68	6.75	2.70
3	原阿片碱 Protopine	$y = 9.23 \times 10^5 x + 1.84 \times 10^5 (r = 0.999 2)$	0.09 ~ 8.70	$2.90 \times 10^{-1}$	$2.90 \times 10^{-3}$
4	别隐品碱 Alloeryptopine	$y = 3.01 \times 10^6 x + 1.72 \times 10^4 (r = 0.999 0)$	0.01 ~ 1.20	$2.40 \times 10^{-1}$	$2.40 \times 10^{-3}$
5	苯甲酰新乌头原碱 Benzoylmesaconine	$y = 9.79 \times 10^4 x - 5.93 \times 10^3 (r = 0.999 4)$	1.19 ~ 28.50	23.75	9.50
6	四氢小檗碱 Canadine	$y = 5.69 \times 10^6 x + 2.05 \times 10^3 (r = 0.999 5)$	$0.26 \times 10^{-3} \sim 0.16$	$2.60 \times 10^{-2}$	$2.60 \times 10^{-3}$
7	小檗红碱 Berberubine	$y = 4.08 \times 10^6 x - 1.56 \times 10^4 (r = 0.999 3)$	$0.15 \times 10^{-2} \sim 0.19$	1.53	$1.53 \times 10^{-1}$
8	盐酸血根碱 Sanguinarine chloride	$y = 6.49 \times 10^5 x - 4.08 \times 10^4 (r = 0.999 9)$	0.02 ~ 8.40	3.50	$2.80 \times 10^{-1}$
9	苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine	$y = 6.74 \times 10^4 x - 1.64 \times 10^4 (r = 0.999 8)$	0.26 ~ 25.71	85.70	8.57
10	盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride	$y = 3.54 \times 10^6 x + 5.30 \times 10^5 (r = 0.999 9)$	0.38 ~ 18.00	$6.00 \times 10^{-1}$	$6.00 \times 10^{-2}$
11	苯甲酰次乌头原碱 Benzoylhypaconitine	$y = 2.64 \times 10^5 x - 2.10 \times 10^4 (r = 0.999 4)$	0.19 ~ 12.00	7.50	6.00
12	盐酸白屈菜红碱 Chelerythrine chloride	$y = 7.25 \times 10^5 x - 9.66 \times 10^3 (r = 0.999 7)$	0.03 ~ 2.90	3.63	0.29
13	新乌头碱 Mesaconitine	$y = 1.12 \times 10^6 x + 3.90 \times 10^4 (r = 0.999 2)$	0.03 ~ 3.00	3.75	$3.00 \times 10^{-1}$
14	次乌头碱 Hypaconitine	$y = 9.94 \times 10^5 x + 1.77 \times 10^4 (r = 0.999 5)$	0.02 ~ 1.67	1.67	$1.67 \times 10^{-1}$
15	乌头碱 Aconitine	$y = 1.23 \times 10^6 x - 1.12 \times 10^4 (r = 0.999 6)$	0.01 ~ 3.40	17.00	1.36
16	二氢白屈菜红碱 Dihydrochelerythrine	$y = 5.98 \times 10^6 x + 3.49 \times 10^3 (r = 0.999 9)$	0.09 ~ 2.90	0.29	$2.90 \times 10^{-3}$
17	二氢血根碱 Dihydrosanguinarine	$y = 2.50 \times 10^6 x - 2.52 \times 10^4 (r = 0.999 7)$	0.01 ~ 4.80	6.00	$4.80 \times 10^{-1}$

### 2.2.3 精密度试验

取盘龙七片供试品溶液(批号 20210329),按“1.5”项下色谱条件连续进样 6 次,计算盘龙七片中 17 种生物碱峰面积的 RSD 在 2.00% ~ 2.95% 之间,表明仪器精密度良好。

### 2.2.4 稳定性试验

取盘龙七片的供试品溶液(批号 20210329),按“1.5”项下色谱条件分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样,计算盘龙七片中 17 种生物碱峰面积的 RSD

在 1.18% ~ 4.48% 之间,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.2.5 重复性试验

取盘龙七片(批号 20210329)6 份,按“1.3.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“1.5”项下色谱条件进样,计算盘龙七片中 17 种生物碱含量的 RSD 在 0.75% ~ 5.65% 之间,表明此方法重复性良好。17 种生物碱精密度、稳定性、重复性结果见表 5。



表 5 17 种生物碱同时测定方法精密度、稳定性、重复性结果 ( $n = 6$ )Table 5 Results of precision, stability and repetitive of seventeen simultaneous determination methods of alkaloids ( $n = 6$ )

编号 No	化合物 Compound	精密度 RSD Precision RSD (%)	稳定性 RSD Stability RSD (%)	重复性 RSD Repetitive RSD (%)
1	欧乌头碱 Napelline	2.93	2.52	2.13
2	$\alpha$ -玉柏碱 $\alpha$ -Obscurine	2.74	2.13	2.53
3	原阿片碱 Protopine	2.20	2.50	2.83
4	别隐品碱 Allocryptopine	2.00	2.59	2.96
5	苯甲酰新乌头原碱 Benzoylmesaconine	2.58	2.76	2.80
6	四氢小檗碱 Canadine	2.59	2.66	4.54
7	小檗红碱 Berberrubine	2.63	2.91	3.55
8	盐酸血根碱 Sanguinarine chloride	2.57	4.48	1.55
9	苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine nine	2.30	1.18	0.75
10	盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride	2.95	2.14	5.65
11	苯甲酰次乌头原碱 Benzoylhypacoitine	2.88	2.37	2.12
12	盐酸白屈菜红碱 Chelerythrine chloride	2.92	2.96	2.51
13	新乌头碱 Mesaconitine	2.20	2.16	1.60
14	次乌头碱 Hypaconitine	2.93	1.40	4.86
15	乌头碱 Aconitine	2.87	2.48	1.70
16	二氢白屈菜红碱 Dihydrochelerythrine	2.68	2.94	1.21
17	二氢血根碱 Dihyrosanguinarine	2.46	2.20	2.85

## 2.2.6 加样回收率试验

精密称取同一供试品 (批号 20210329) 约 0.5 g, 共 6 份, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 加入各对照品适量, 按“1.3.2”项方法制备供试品溶液, 在“1.5”项

下的色谱条件下进行测定, 记录不同成分相应信号强度, 计算加样回收率。各成分的平均回收率和 RSD 的结果见表 6。

表 6 17 种生物碱同时测定方法平均加样回收率及 RSD 结果 ( $n = 6$ )Table 6 Average dosing recovery rate and RSD results of seventeen alkaloids simultaneous determination methods ( $n = 6$ )

编号 No.	化合物 Compound	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
1	欧乌头碱 Napelline	102.15	1.97
2	$\alpha$ -玉柏碱 $\alpha$ -Obscurine	91.52	2.4
3	原阿片碱 Protopine	103.49	2.78
4	别隐品碱 Allocryptopine	102.35	2.16
5	苯甲酰新乌头原碱 Benzoylmesaconine	97.64	1.49
6	四氢小檗碱 Canadine	90.29	3.39
7	小檗红碱 Berberrubine	103.58	5.59
8	盐酸血根碱 Sanguinarine chloride	102.47	1.84
9	苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine	99.74	1.76
10	盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride	109.22	4.6
11	苯甲酰次乌头原碱 Benzoylhypacoitine	99.91	1.52
12	盐酸白屈菜红碱 Chelerythrine chloride	86.42	2.46

续表 6(Continued Tab. 6)

编号 No.	化合物 Compound	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
13	新乌头碱 Mesaconitine	111.21	2.71
14	次乌头碱 Hypaconitine	103.31	3.82
15	乌头碱 Aconitine	98.29	2.36
16	二氢白屈菜红碱 Dihydrochelerythrine	98.13	2.34
17	二氢血根碱 Dihydrosanguinarine	112.75	2.54

## 2.2.7 样品测定

中 17 种生物碱成分的含量( $\mu\text{g/g}$ ),结果见表 7。

按“1.5”项的条件,测定并计算 8 批盘龙七片

表 7 8 个批次盘龙七片中 17 种生物碱成分的含量

Table 7 The content of seventeen alkaloids components in eight batches of PLT( $\mu\text{g/g}$ )

化合物 Compound	批次 Batch							
	1	2	3	4	5	6	7	8
欧乌头碱 Napelline	23.22	25.28	28.74	22.24	19.85	17.7	15.1	17.84
$\alpha$ -玉柏碱 $\alpha$ -Obscurine	11.27	12.63	18.35	5.32	3.63	7.1	5.23	6.00
原阿片碱 Protopine	29.98	21.43	40.12	4.85	4.41	8.41	4.07	12.14
别隐品碱 Alloclptopine	9.98	7.23	11.06	1.81	1.86	2.41	1.48	3.14
苯甲酰新乌头原碱 Benzoylmesaconine	362.95	415.51	492.35	358.39	370.18	420.71	312.13	340.83
四氢小檗碱 Canadine	0.54	0.4	0.64	0.64	0.47	0.4	0.33	0.28
小檗红碱 Berberubine	0.8	0.74	0.75	0.66	0.52	0.55	0.53	0.57
盐酸血根碱 Sanguinarine- chloride	34.74	38.24	50.34	35.16	32.78	41.08	33.59	37.27
苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine	325.11	360.49	445.91	314.46	307.93	243.87	198.02	267.33
盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride	0.79	338.28	32.48	4.17	5.55	7.21	5.01	2.60
苯甲酰次乌头原碱 Benzoylhypaconitine	330.58	386.78	465.46	293.55	276.04	180.12	146.01	448.69
盐酸白屈菜红碱 Chelerythrine chloride	7.84	13.7	8.2	6.92	4.96	5.08	5.03	6.59
新乌头碱 Mesaconitine	1.18	2.5	2.5	1.93	1.82	4.78	2.93	0.69
次乌头碱 Hypaconitine	1.56	1.84	2.27	0.95	1.37	1.87	0.99	2.39
乌头碱 Aconitine	3.39	3.95	4.28	3.82	3.67	3.45	3	2.59
二氢白屈菜红碱 Dihydrochelerythrine	10.34	8.63	18.88	8.59	7.65	9.61	8.44	2.92
二氢血根碱 Dihydrosanguinarine	16.84	12.62	22.61	16.99	15.02	19.03	17.44	7.68

### 3 讨论与结论

#### 3.1 检测条件及供试品溶液制备方法的选择

综合考虑生物碱类成分的结构和极性特点,采用MRM扫描模式,正、负离子模式分别检测,根据响应值及色谱峰的数量选择正离子模式检测。考察了提取方式(超声、加热回流)、提取溶剂(无水乙醇、70%甲醇、100%甲醇)对盘龙七片生物碱类成分提取的影响,综合色谱峰峰型及响应值,本研究选择甲醇超声提取25 min为盘龙七片中生物碱的提取方法。

#### 3.2 潜在质量控制成分指标筛选

生物碱类成分是盘龙七片发挥抗炎镇痛功效的重要成分之一,其中含量较高的单酯类生物碱苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱由双酯类生物碱乌头碱、新乌头碱、次乌头碱水解得到,在保留其抗炎、抗风湿、治疗关节炎等药理作用的同时毒性大大降低。结合生物碱类指标成分的相关研究<sup>[11,15,16]</sup>,本文选择苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱作为潜在的质量指标成分。乌头碱类生物碱成分水解方式如图所示<sup>[17]</sup>,如图3。

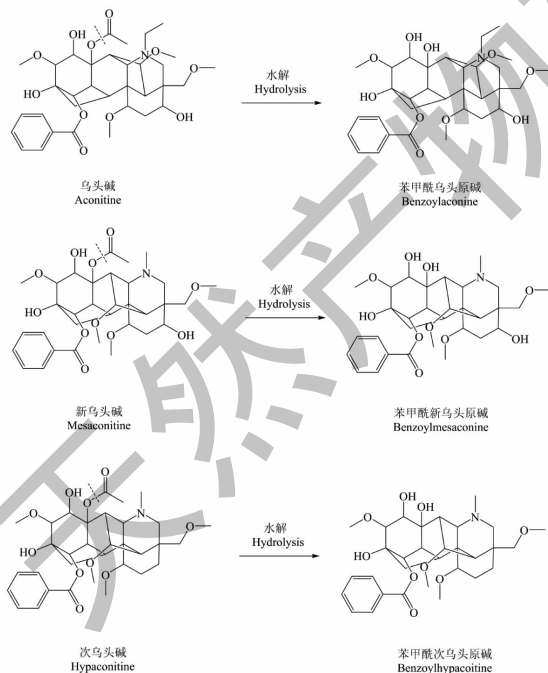


图3 乌头碱类生物碱成分水解过程

Fig. 3 Hydrolysis process of aconitine alkaloid components

#### 3.3 异喹啉生物碱成分含量差异

通过比较8个批次样品中异喹啉生物碱的成分

含量差异,发现盐酸血根碱、二氢血根碱、盐酸白屈菜红碱、二氢盐酸白屈菜红碱、别隐品碱、小檗红碱、四氢小檗碱、原阿片碱各批次含量较为稳定,而盐酸小檗碱各批次含量差异较大。分析原因可能是小檗碱为季胺碱,在游离状态对热不稳定分解成为小檗红碱,与盘龙七片中的黄酮类等酸性成分结合生成盐,造成盐酸小檗碱含量的变化<sup>[18,19]</sup>。

盘龙七片是临床中治疗风湿骨痛类疾病的重要药物,由于其含有毒性生物碱类成分,药物的安全性更应得到重视。故基于UPLC-Q-TOF-MS技术表征出的盘龙七片中17种生物碱成分,本文建立了盘龙七片中生物碱类成分同时测定的液质联用方法,所建方法准确可靠,可为提升盘龙七片的质量控制水平提供基础。

#### 参考文献

- 1 Wang L. Research on the efficacy and mechanism of Panlongqi Tablets in the treatment of osteoarthritis [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University (宁夏医科大学), 2021.
- 2 Geng WF. Pharmacological effect and clinical evaluation of Panlongqi Tablets [J]. Chin Med (中国现代药物应用), 2009, 3: 130-131.
- 3 Liu TT, Xiao ZB, Chen Q, et al. Systematic study on molecular mechanism of aconitum alkaloids in treatment of rheumatoid arthritis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 171-181.
- 4 Ai C, Zhu YY, Zhao CQ. Recent advances on chemical constituents, pharmacological study and the endophytes of the genus *Aconitum* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 248-259.
- 5 Chang L, Dai Y. Immunomodulatory effects of isoquinoline alkaloids [J]. Pharm Clin Res (药学与临床研究), 2020, 28: 198-201.
- 6 Hu ZM, Huang L, Hou JH, et al. Research progress in toxicity of alkaloids in traditional Chinese medicine [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2022, 20: 633-641.
- 7 Zhang DZ. Study on the improvement of the quality standard of Panlongqi Tablets [J]. Northwest Pharm J (西北药学杂志), 2008: 218-219.
- 8 Zou CL, Kong QQ. Chemical constituents of *Radix Aconiti Flavi* [J]. Med Diet Health (医学食疗与健康), 2019, 11: 63.
- 9 Zou GX, You XM, Wang GH. HPLC method for the determination of  $\alpha$ -obscurine in *Lycopodium Herba* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2010, 33: 934-936.