

双水相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法 测定倒提壶中8种生物碱

樊轻亚^{1*}, 许卫军¹, 代春美²

(1. 信阳职业技术学院 药学院, 河南 信阳 464000; 2. 中国中医科学院, 北京 100700)

摘要:建立了乙醇-磷酸氢二钾双水相萃取技术结合超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS/MS)同时测定倒提壶中8种生物碱含量的方法。采用单因素实验考察了双水相的萃取条件对倒提壶中8种生物碱萃取率的影响,最佳萃取条件为:乙醇质量分数为30%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 的质量分数为20%,萃取剂与样品相比为6:1,水相的pH值为4.0。以乙腈-0.1 mol/L醋酸铵为流动相进行UHPLC-MS/MS分析,8种生物碱之间具有良好的分离度,各成分在一定质量浓度范围内具有良好的线性关系($r^2 > 0.99$)。方法的精密性、重复性及加标回收率的相对标准偏差(RSD)均小于3.0%。方法简单快捷、灵敏准确,可满足倒提壶中生物碱检测的要求。

关键词:倒提壶;生物碱;双水相萃取;超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS/MS)

中图分类号:O657.63;O629.3 文献标识码:A 文章编号:1004-4957(2019)11-1328-07

Determination of Eight Alkaloids in *Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Aqueous Two-phase Extraction

FAN Qing-ya¹, XU Wei-jun¹, DAI Chun-mei²

(1. Pharmaceutical Sciences of Xinyang Vocational and Technical College, Xinyang 464000, China; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: An ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with EtOH/ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ aqueous two-phase extraction was developed for the simultaneous determination of eight alkaloids in *Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm. Effects of aqueous two-phase extraction conditions on extraction efficiencies of eight alkaloids were optimized by single factor experiment. The optimum conditions were as follows: 30% (mass ratio) of ethanol, 20% (mass ratio) of $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 6:1 for an extractant to sample ratio, and 4.0 for pH value. The extract was analyzed by UHPLC-MS/MS with acetonitrile-0.1 mol/L ammonium acetate as mobile phases, and eight alkaloids in the extract were well separated. There were good linear relationships for the analytes in the certain concentration ranges with their correlation coefficients (r^2) larger than 0.99. The relative standard deviations (RSDs) for precision, reproducibility and recovery were all less than 3.0%. The method is convenient, sensitive and accurate, and is suitable for the determination and confirmation of eight alkaloids in *Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm.

Key words: *Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm; alkaloid; aqueous two-phase extraction; ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS)

倒提壶(*Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm)是著名的药用植物,以根及全草入药,有清热利湿、散瘀止血、止咳等功效^[1-2]。倒提壶的主要成分是吡咯里西啶类生物碱,在临床中有着非常重要的药用价值^[3-5]。姚志道^[6]和买买素唐^[7]等发现倒提壶生物碱治疗神经衰弱具有较好的疗效。刘清华等^[8]研究发现,毛茛天芥菜碱对实验肿瘤系统 Walker-256 系统有显著活性。陈昭文等^[9]研究发现绿花倒

收稿日期:2019-07-11;修回日期:2019-08-25

基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(172102310315);第24批博士后科技服务团合作项目

*通讯作者:樊轻亚,副教授,硕士,研究方向:药物提取分离及分析,E-mail: fqy2006hn@163.com

提壶碱(Virdiflorine)具有增强小鼠心肌耐缺氧作用。Pandey等^[10]发现天芥菜碱能显著降低尼古丁所致神经节激动效应,而刺凌德草碱(Echinatine)不仅有神经节阻滞作用,还能增强肾上腺素的升压作用。因此,研究倒提壶中生物碱具有很好的临床应用价值。

双水相萃取系统(Aqueous two-phase system, ATPS)是由两种化学结构不同的亲水性聚合物,或一种亲水性聚合物、低分子量亲水性有机溶剂与无机盐在水中以适当浓度而形成的互不相容的两水相系统,利用目标物在两相中的不同分配特性从而实现分离^[11-12]。双水相体系最早发现于1896年,经过近半个世纪的发展,双水相萃取技术已应用于生物、食品、医药以及稀有金属的分析^[13-15]。近年来双水相体系发展迅速,在中药有效成分的萃取分离中逐渐得到应用,显示了良好的应用前景^[16-19]。由于其具有操作环境温和,不改变目标物质的生物活性,避免了使用有机溶剂,且操作条件简单,节约成本,符合绿色化学的发展要求,因此是一种具有极大发展前景的萃取技术。

超高效液相色谱-串联质谱技术具有较高的灵敏度、选择性和重现性,可确保复杂基质中目标分析物的准确定量^[20-22]。本文首次将双水相萃取技术引入中药材倒提壶中有效成分的分离,采用UHPLC-MS/MS技术建立了倒提壶中8种生物碱(天芥菜品、毛果天芥菜碱、绿花倒提壶碱、天芥菜碱、天芥菜定、刺凌德草碱、仰卧天芥菜碱、欧天芥菜碱)含量测定的方法,从而为更加全面地控制倒提壶药材的质量,开发倒提壶制剂提供了可靠依据。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

DFY-200 摇摆式高速中药粉碎机(温岭市大德中药机械有限公司);美国 Waters Xevo TQ-MS 型超高效液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾离子源;天芥菜品、毛果天芥菜碱、绿花倒提壶碱、天芥菜碱、天芥菜定、刺凌德草碱、仰卧天芥菜碱、欧天芥菜碱对照品(纯度为98.5%,武汉 ChemFaces 有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,美国默克公司)。实验用倒提壶药材均购于网络药材市场,经鉴定为倒提壶(*Cynoglossum amabile Stapf et Drumm*)全草。

1.2 实验方法

1.2.1 乙醇回流法提取生物碱 称取一定量粉碎过100目筛的倒提壶药材,加4倍量95%乙醇回流3次,每次1.5h,过滤,滤液合并,浓缩,备用。

1.2.2 双水相体系的配制 称取一定量的 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$,加入一定量的水,超声溶解,加入30%乙醇,振摇,静置,使形成乙醇/磷酸氢二钾双水相体系。

1.2.3 双水相法萃取提取液(ATPE) 取经“1.2.1”提取后的倒提壶生物碱粗提液浸膏,用盐酸或氨水分别调节水相pH值。加入EtOH/ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 双水相溶液,25℃下超声萃取20min,取上清液,转入分液漏斗静置分层后,取上层有机相待测。

1.2.4 溶剂法萃取提取液(SE) 取经“1.2.1”提取后的倒提壶生物碱粗提液浸膏,用稀盐酸溶液超声溶解后置于分液漏斗中,氯仿萃取后,旋干,用甲醇定容后,待测。

1.2.5 反胶束法萃取提取液(RME)^[23] 取经“1.2.1”提取后的倒提壶生物碱粗提液浸膏,以KCl调节水相的离子强度,加入4倍体积的二(2-乙基己基)磷酸酯/二(2-乙基己基)丁二酸酯磺酸钠(DOLPA/AOT)-异辛烷反胶束溶液,电磁搅拌萃取后取上层有机相转移至一锥形瓶中,加入等体积的水,室温下进行电磁搅拌反萃取30min后,转入分液漏斗静置分层,取下层水相待测。

1.2.6 对照品溶液的制备 精密称取8种对照品各10.0mg,分别用甲醇溶解并定容至10mL,得各对照品储备液。分别吸取储备液各1mL,置于50mL容量瓶中,用甲醇定容后即得混合对照品溶液。

1.3 样品分析条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BHE C_{18} (50mm×2.1mm,1.7 μ m,美国 Waters 公司);流动相:乙腈(A)-0.1mol/L醋酸铵(B),梯度洗脱程序:0~2min,5%~15%A;2~7min,15%~40%A;7~10min,40%~80%A;10~12min,80%~5%A;柱温:30℃;流速:0.3mL/min;进样量:3 μ L。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源:ESI;检出模式:正离子模式;离子源温度:100℃;质量扫描范

围: 10~600 m/z ; 干燥气(N_2)流速: 10.0 L/min; 干燥气温度: 350 $^{\circ}C$; 毛细管电压: 3.5 kV; 锥孔气流量: 50 L/h; 碰撞气流量: 2.5 L/h。

2 结果与讨论

2.1 双水相体系的筛选及萃取条件的优化

影响双水相萃取的因素较多, 为了筛选合适的双水相体系, 本文采用单因素实验方法考察乙醇质量分数、磷酸氢二钾质量分数、萃取剂与样品的相比、水相体系的 pH 值等萃取条件, 研究了各萃取条件对倒提壶中 8 种生物碱萃取率的影响。

2.1.1 双水相体系成相物质的筛选 将无水乙醇与不同的无机盐按一定比例混合, 按是否成相及成相的难易程度, 成相范围的宽窄等为指标, 初步筛选双水相的成相物。实验考察了不同无机盐 (NH_4)₂SO₄、K₂HPO₄·3H₂O、Na₂CO₃、CaCl₂、Na₂SO₄、NaCl 与乙醇形成双水相的性质, 结果显示, K₂HPO₄·3H₂O、(NH_4)₂SO₄ 能与无水乙醇形成稳定的双水相体系, 而 Na₂CO₃、Na₂SO₄ 虽然也能与无水乙醇形成双水相, 但成相范围很窄, 下相容易产生沉淀, 其他无机盐则不能与无水乙醇形成双水相体系。

进一步采用浊点滴定法绘制 EtOH/(NH_4)₂SO₄ 与 EtOH/K₂HPO₄·3H₂O 两种双水相体系的相图。由实验可知, 在醇的质量浓度较小时, 分相所需的无机盐的量较大, 乙醇/K₂HPO₄ 双水相体系比 EtOH/(NH_4)₂SO₄ 体系的分相曲线更接近原点, 在盐质量浓度相同的情况下仅需较少的醇即可形成双水相体系, 说明 EtOH/K₂HPO₄·3H₂O 比 EtOH/(NH_4)₂SO₄ 更易形成双水相, 故本实验选择 EtOH/K₂HPO₄·3H₂O 双水相体系进行后续研究。

2.1.2 EtOH 和 K₂HPO₄·3H₂O 的质量分数对 8 种生物碱萃取率的影响 EtOH/K₂HPO₄·3H₂O 双水相体系的成相原理为乙醇与盐之间对水分子的缔合竞争, 因此醇与盐的质量分数对体系的构成与性质, 以及目标物的萃取都具有极大的影响。两相质量分数的变化会改变体系的成相行为, 进而影响生物碱在两相中的分配。在实验条件下, 调节萃取剂与样品相比为 6:1, 萃取剂 pH 值为 4.0, 对无水乙醇和 K₂HPO₄·3H₂O 的质量分数进行考察, 结果见图 1。

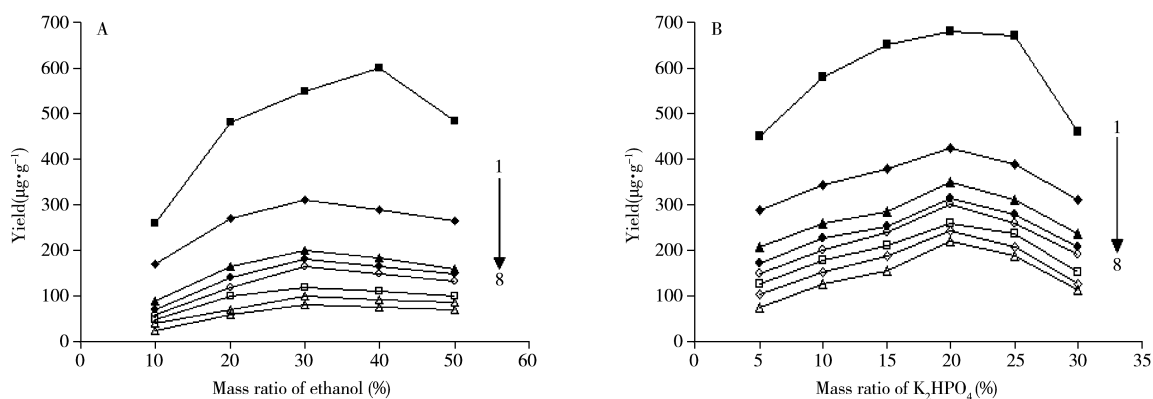


图 1 乙醇(A)和磷酸氢二钾(B)质量分数对倒提壶中 8 种生物碱萃取率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol (A) and K₂HPO₄·3H₂O (B) mass ratios on extraction efficiencies of 8 alkaloids from *Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm

1. heliotrine; 2. lasiocarpine; 3. heliotridine; 4. supinine; 5. echinatine; 6. heliosupine; 7. virdiflorine; 8. europine

由图 1A 可知, 固定 K₂HPO₄·3H₂O 质量分数为 20%, 8 种生物碱的萃取率随乙醇质量分数的增大呈先增大后降低趋势, 且当乙醇质量分数为 30% 时, 8 种生物碱的提取率最大。这是因为乙醇比例增大时, 分相范围增大, 有利于倒提壶生物碱的分配及萃取。但当乙醇比例大于 30% 时, 下相有晶体析出, 体系不稳定, 所以萃取率下降, 因而选 30% 乙醇作为最佳比例。

由图 1B 可知, 固定乙醇质量分数为 30%, 倒提壶生物碱的萃取率随着 K₂HPO₄·3H₂O 质量分数的增加呈先增大后减小趋势。这是因为随着 K₂HPO₄·3H₂O 质量分数的增大, 分相能力也增大, 倒提壶中的生物碱更易增溶到上相中, 故萃取率升高, 当 K₂HPO₄·3H₂O 的质量分数超过 20% 时, 分子间

相应碰撞增加,分相时间延长,上相体积减小,溶液中分子间的作用力增大,使得生物碱分子不易进入上相。此外, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 的加入量较多时,盐较难完全溶解,不利于物质在相间的扩散,故萃取率先增大后减小。最终确定 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 的最佳质量分数为20%。

2.1.3 萃取剂与样品相比对8种生物碱萃取率的影响

萃取剂与样品的相比会影响固相和液相之间的传质推动力。取“1.2.1”提取后的生物碱储备液,分别加入 $Et(OH)(30\%)/K_2HPO_4 \cdot 3H_2O(20\%)$ 双水相萃取剂,调节萃取剂pH值为4.0,按萃取剂与样品的相比分别为1:1、2:1、4:1、6:1、8:1、10:1时考察萃取物体积与双水相萃取剂用量的相比对萃取率的影响(见图2)。结果显示,随着萃取剂用量的增大,倒提壶生物碱的萃取率逐渐增大,当萃取剂和样品相比为6:1时,萃取剂基本可将倒提壶中的生物碱萃取完全,继续增加萃取剂,萃取效率变化不大。这是因为液料比越小,两相间的浓度差越小,从而传质推动力就越小,所以萃取率较低。随着液料比的提高,传质推动力得到提高,但成本也相应增加,萃取剂与样品相比大于6:1时,萃取率已无明显变化,综合考虑,最终选择萃取剂与样品的最佳配比为6:1。

2.1.4 不同pH值对8种生物碱萃取率的影响

pH值的改变会影响磷酸盐的解离,从而影响 $EtOH/K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 体系的相间电位和物质的分配系数,同时物质本身的结构和性质也会随pH值的变化而变化。取“1.2.1”提取后的生物碱储备液,分别加入 $Et(OH)(30\%)/K_2HPO_4 \cdot 3H_2O(20\%)$ 双水相萃取剂,并使萃取剂与样品的体积比为6:1,通过采用氨水调节萃取剂的pH值,考察了不同pH值对倒提壶中生物碱萃取效果的影响。由图3可知,生物碱的萃取率随着水相pH值的升高而增加,在pH值4.0时,萃取率最大,随着pH的继续增大,溶液中带正电荷的生物碱离子逐渐减少,生物碱主要以游离分子存在(pH 8.0),其与 $EtOH/K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 间的静电引力逐渐降低,从而导致其萃取率也逐渐降低,当pH为12.0时,萃取率几乎为0,因此实验选择最佳pH值为4.0。

综上所述,采用 $EtOH/K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 萃取倒提壶中生物碱,最佳萃取条件为30%乙醇/20% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$,萃取剂pH值为4.0,萃取剂与样品相比为6:1。

2.2 色谱-质谱条件的优化

2.2.1 色谱条件的优化 对倒提壶双水相萃取后提取液进行UHPLC分析,采用乙腈、甲醇与不同浓度氨水、醋酸铵的不同配比作为流动相系统进行考察。结果发现,采用乙腈作为流动相时峰形更加尖锐,在流动相中加入一定比例的醋酸铵可以改善峰形和提高离子化效率,且醋酸铵为挥发性物质,可减少对色谱柱的损害。因此,实验选择乙腈-0.1 mol/L醋酸铵溶液为流动相,在优化的梯度洗脱条件下,8种目标化合物可以得到良好分离,且各色谱峰的峰形好、峰对称、柱效高,所得总离子流图如图4所示。

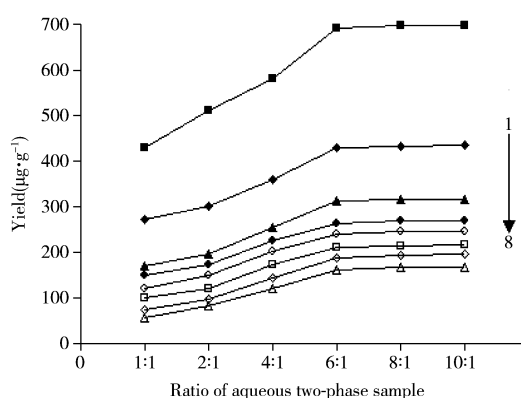


图2 双水相萃取剂与样品的相比对倒提壶中8种生物碱萃取率的影响

Fig. 2 Effect of aqueous two-phase and sample ratios on extraction efficiencies of 8 alkaloids from *Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm
1. heliotrine; 2. lasiocarpine; 3. heliotridine; 4. supinine; 5. echinatine; 6. heliosupine; 7. viridiflorine; 8. europine

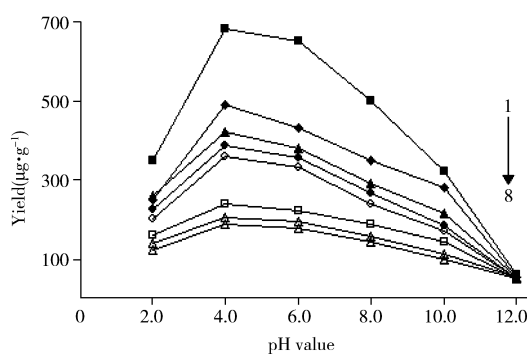


图3 萃取剂pH值对倒提壶中8种生物碱萃取率的影响
Fig. 3 Effect of pH value on extraction efficiencies of 8 alkaloids from *Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm

1. heliotrine; 2. lasiocarpine; 3. heliotridine; 4. supinine; 5. echinatine; 6. heliosupine; 7. viridiflorine; 8. europine

2.2.2 质谱条件的优化 分别用质谱电喷雾电离源正离子模式和负离子模式对 8 种生物碱进行质谱分析, 结果发现负离子模式下几乎无质谱响应, 因此选择 ESI(+) 作为离子化模式, 分别找出这 8 种化合物的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 并对干燥气体、雾化气压力、干燥气流量等参数进行优化, 然后对母离子进行碰撞诱导解离, 选择 2 个信噪比较高的特征子离子分别作为定量和定性离子对, 8 种化合物的质谱数据见表 1。在 ESI(+)-MS/MS 条件下, 8 种化合物主要发生侧链酯键的断裂和吡咯里西啶母核与整个侧链的断裂, 8 种化合物的质谱裂解途径见图 5。

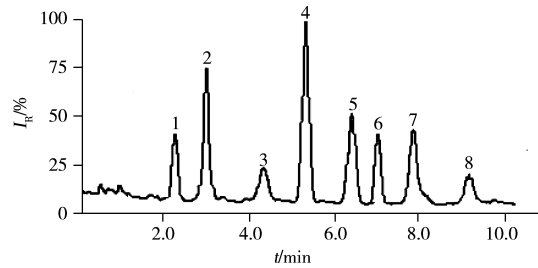


图 4 药用倒提壶经双水相萃取后的提取液总离子流图
Fig. 4 TIC chromatogram of extract from *Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm by aqueous two-phase extraction
1. heliosupine; 2. lasiocarpine; 3. virdiflorine; 4. heliotrine;
5. heliotridine; 6. echinatine; 7. supinine; 8. europine

表 1 8 种生物碱的质谱参数
Table 1 MS parameters of 8 alkaloids

Peak number	Analyte	Retention time (min)	$[M+H]$ (m/z)	MS/MS (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
1	Heliosupine(天芥菜品)	2.21	398.1	237.1, 155.1	35	26, 30
2	Lasiocarpine(毛果天芥菜碱)	3.05	412.2	237.1, 155.2	35	18, 10
3	Virdiflorine(绿花倒提壶碱)	4.23	286.2	141.1, 111.2	40	28, 26
4	Heliotrine(天芥菜碱)	5.18	314.1	155.1, 125.1	35	25, 20
5	Heliotridine(天芥菜定)	6.32	156.1	125.1, 109.1	20	20, 12
6	Echinatine(刺棱德草碱)	7.09	300.1	155.1, 125.1	40	38, 27
7	Supinine(仰卧天芥菜碱)	7.94	284.2	139.1, 109.1	40	30, 25
8	Europine(欧天芥菜碱)	9.05	330.2	155.1, 125.1	20	54, 28

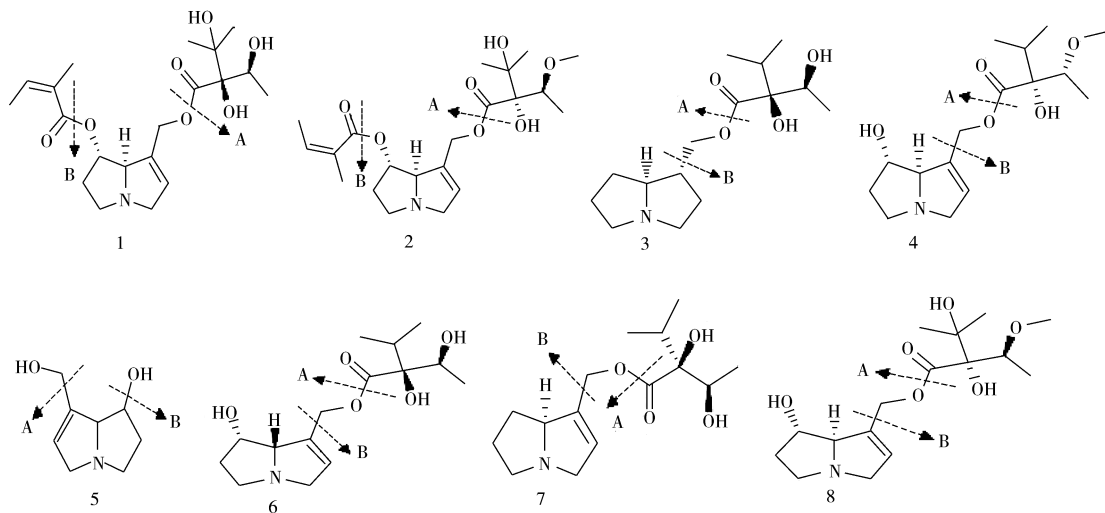


图 5 8 种生物碱的质谱裂解途径

Fig. 5 Fragmentation pathways of 8 compounds alkaloids

1. heliosupine; 2. lasiocarpine; 3. virdiflorine; 4. heliotrine; 5. heliotridine; 6. echinatine; 7. supinine; 8. europine

2.3 线性范围、检出限与加标回收率

取 8 种生物碱标准溶液, 分别配制成一系列浓度的混合标准品, 按“1.2.3”方法进行双水相萃取, 按“1.3”方法进行测定, 以峰面积(Y)为纵坐标, 以质量浓度(X , mg/L)为横坐标绘制标准曲线, 得到线性回归方程, 按信噪比 $S/N=3$, 计算检出限。精密称取已测定含量的倒提壶样品, 分别向其添加低、中、高 3 个浓度水平的标准溶液, 每个水平做 6 个平行, 计算其平均回收率。8 种生物碱的线性方程、线性范围、相关系数、检出限及实际样品加标回收率结果见表 2。由表可知, 8 种生物碱在线性范围内线性关系良好, 相关系数均在 0.99 以上, 检出限为 0.03~0.10 mg/L, 8 种生物碱的回

收率为 91.5%~97.6%，相对标准偏差(RSD)不大于 3.0%，方法体现了较高的精密度和准确度。

表 2 8 种生物碱的标准工作曲线、线性范围、检出限，及其在实际样品中的回收率

Table 2 Calibration curves, linear ranges and detection limits of 8 alkaloids, and their recoveries in real sample

Analyte	Linear range (mg/L)	r^2	LOD (mg/L)	Content (mg/g)	Added (mg/g)	Average recovery (%)	RSD (%)
Heliosupine	0.3~30	0.995 2	0.03	0.52	0.25, 0.5, 1.0	91.7, 93.8, 93.6	1.9, 2.1, 1.8
Lasiocarpine	0.6~60	0.993 4	0.06	0.78	0.25, 0.5, 1.0	95.4, 93.6, 91.5	2.2, 2.8, 2.3
Virdiflorine	0.3~30	0.995 7	0.03	0.43	0.25, 0.5, 1.0	95.1, 92.8, 94.9	1.9, 2.2, 2.0
Heliotrine	1.0~100	0.998 7	0.10	0.93	0.25, 0.5, 1.0	96.2, 94.7, 93.6	2.5, 2.1, 2.3
Heliotridine	0.5~50	0.999 1	0.05	0.66	0.25, 0.5, 1.0	93.4, 92.8, 95.7	2.1, 2.2, 2.5
Echinatine	0.5~50	0.998 3	0.05	0.61	0.25, 0.5, 1.0	92.8, 95.2, 94.5	2.5, 2.5, 2.1
Supinine	0.5~50	0.998 0	0.05	0.63	0.25, 0.5, 1.0	97.6, 92.5, 93.6	1.8, 1.3, 1.7
Europine	0.3~30	0.997 6	0.03	0.46	0.25, 0.5, 1.0	92.7, 96.7, 95.4	1.9, 2.1, 2.4

2.4 稳定性与重复性

精密称取倒提壶药材细粉 6 份，按实验方法分别进行萃取、处理和测定，取样品和对照品溶液于室温下放置 0~24 h 后，进行含量测定。结果表明稳定性和重复性的 RSD 均小于 2.0%，方法具有良好的重复性和稳定性。

2.5 萃取分析及应用

精密称取 3 个产地的倒提壶药材各 100 g，采用双水相萃取在最优条件下萃取药材中的生物碱，按“1.3”方法测定其含量，并与“1.2.4”溶剂萃取法及“1.2.5”反胶束萃取法进行对比，结果见表 3。

表 3 不同产地倒提壶药材 8 种生物碱的提取分析结果($n=3$)

Table 3 Analytical results of 8 alkaloids from *Cynoglossum amabile* Stapf et Drumm obtained with different origins($n=3$)

Origin	Extraction method	Content(mg/g)							
		Heliosupine	Lasiocarpine	Virdiflorine	Heliotrine	Heliotridine	Echinatine	Supinine	Europine
Sichuan	ATPE	0.31	0.42	0.28	0.64	0.48	0.38	0.40	0.22
	SE	0.14	0.24	0.12	0.35	0.20	0.22	0.15	0.11
	RME	0.25	0.36	0.25	0.58	0.41	0.32	0.31	0.17
Guangxi	ATPE	0.35	0.64	0.30	0.73	0.54	0.46	0.49	0.28
	SE	0.15	0.29	0.12	0.34	0.23	0.18	0.21	0.12
	RME	0.28	0.53	0.21	0.62	0.45	0.40	0.43	0.25
Yunnan	ATPE	0.56	0.79	0.45	0.92	0.69	0.63	0.65	0.49
	SE	0.22	0.31	0.15	0.34	0.23	0.30	0.24	0.20
	RME	0.42	0.61	0.32	0.70	0.56	0.50	0.54	0.41

由表 3 可知，与传统的溶剂萃取技术以及反胶束萃取技术相比，经 EtOH/K₂HPO₄·3H₂O 双水相萃取后，倒提壶中各种生物碱的萃取效率为传统溶剂萃取法的 2.5 倍左右，比反胶束萃取法高 20% 左右。此外，传统溶剂萃取法操作复杂、萃取效率低，且有机溶剂用量大、残留多。反胶束萃取法也需使用有机溶剂，且萃取效率低于双水相法。由此可见，双水相萃取技术的操作简单、萃取效率高，且避免使用有机溶剂、成本低，是一种实用的绿色环保萃取分离技术。此外，本文采用 UHPLC-MS/MS 检测方法具有分析时间短(10 min)、溶剂消耗少等特点。因此，本文所建立的分析方法适用于该中药材多指标成分的定量检测。

从表 3 还可以看出，在所有产地的倒提壶中以天芥菜碱的含量最高，毛果天芥菜碱次之。此外，不同产地倒提壶中的生物碱含量分布明显不同，其中云南产倒提壶中生物碱含量明显高于其他 2 个产地。因此，在提取倒提壶中生物碱有效活性成分时，应根据不同产地、气候及环境选择原料，以获得更高的提取率。

3 结 论

本文将 EtOH/K₂HPO₄·3H₂O 双水相萃取技术应用于倒提壶中生物碱的萃取，并优化了超高效液相色谱-串联质谱法测定生物碱含量的条件。本萃取方法利用水作为萃取体系，避免使用或尽可能少使用有机溶剂，可选择性地将目标生物碱与其他杂质进行分离，萃取效率高，易于工艺放大和连续操

作,且溶剂可以循环利用,降低了环境污染,是一种具有极大发展前景的萃取技术。进一步采用超高效液相色谱-串联质谱法测定倒提壶中生物碱的含量,实现了对不同产地倒提壶中生物碱含量的检测和评价。该方法简单快速、准确灵敏,可为倒提壶制剂的开发及质量控制提供可靠依据。

参考文献:

- [1] Writing Group of the Compilation of Chinese Herbal Medicine. *The Compilation of Chinese Herbal Medicine*. Beijing: People's Medical Publishing House (《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 北京: 人民卫生出版社), 1996.
- [2] Editorial Committee of Flora of Chinese. *Flora Chinese*. Beijing: Science Press (《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 北京: 科学出版社), 2005.
- [3] Tang J, Cheng M. *Acta Pharm. Sin.* (汤俊, 程敏. 药学报), 2019, 54(3): 420-431.
- [4] Gao J G, Wang C H, Li Y, Wang Z T. *China J. Chin. Mater. Med.* (高江国, 王长虹, 李岩, 王峥涛. 中国中药杂志), 2009, 34(5): 506-511.
- [5] Liu Y L. *J. Northwest Normal Univ. : Nat. Sci. Ed.* (刘玉兰. 西北师范大学学报: 自然科学版), 1980, 1: 61-65.
- [6] Yao Z D, Sun S K, Yang F R. *Northwest Pharm. J.* (姚志道, 孙述奎, 杨凤茹. 西北药学杂志), 1996, 11(1): 32-33.
- [7] Mai M S T. *J. Xinjiang Med. Univ.* (买买素唐. 新疆医科大学学报), 1982, Z1: 310-311.
- [8] Liu Q H, Yuan J Q, Yang J S. *Chin. Pharm. J.* (刘清华, 袁经权, 杨峻山. 中国药学杂志), 2005, 40(8): 561-564.
- [9] Chen S W, Tang J, Li J S, Zhang Q, Zhao X F, Hu J H. *J. Chin. Pharm. Univ.* (陈昭文, 唐杰, 李金山, 张勤, 赵秀芳, 胡俊宏. 中国药科大学学报), 1987, 75(1): 51-53.
- [10] Pandey V B, Singh J P, Rao Y V, Acharya S B. *Planta Med.*, 1982, 45(8): 229-233.
- [11] Wu L, Zhou L, Li P, Sang S H, Ouyang Y L, Zhu X P. *Chin. J. Anal. Lab.* (吴琳, 周莉, 李品, 桑世华, 欧阳亚澜, 朱霞萍. 分析实验室), 2016, 35(6): 629-632.
- [12] Tian H Z, Zhang M H, Zhou X J, Yuan B H, Zhang C G. *J. Instrum. Anal.* (田宏哲, 张明浩, 周鑫杰, 袁宝辉, 张晨光. 分析测试学报), 2019, 38(1): 80-85.
- [13] Wan W S, Li W J, Han J. *J. Instrum. Anal.* (关卫省, 黎文娟, 韩娟. 分析测试学报), 2012, 31(5): 600-604.
- [14] Huang S Y, Wu X H, Huang Y X, Hong Y C, Chen C L, Jian H Y, Wang Y, Fan H J. *Pharm. Today* (黄少愉, 吴学昊, 黄远翔, 洪燕春, 陈灿林, 简惠莹, 王瑶, 范华均. 今日药学), 2015, 25(9): 626-630.
- [15] Su W B, Lan R J, Xu Y Y. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (苏文斌, 兰瑞家, 徐瑶瑶. 理化检验-化学分册), 2014, 50(5): 579-582.
- [16] Li N, Zhou W J, Yu Q N, Yang R P. *Chin. J. Pharm. Anal.* (励娜, 周文杰, 禹奇男, 杨荣平. 药物分析杂志), 2014, 34(7): 1315-1320.
- [17] Zhu D, He S L, Fan H J, Wang L P, Lou X X, Wang Q, Zang L Q. *J. Instrum. Anal.* (朱丹, 何世玲, 范华均, 王李平, 娄欣欣, 万强, 臧林泉. 分析测试学报), 2013, 32(9): 1075-1080.
- [18] Yao Q, Zhao M J, Zhang L, Jiang Y Y, Wu Y C, Fang H, Xie Y L, Yang W. *Nat. Prod. Res. Dev.* (姚琴, 赵茂俊, 张利, 姜媛媛, 吴一超, 方会, 谢焱林, 杨雯. 天然产物研究与开发), 2018, 30(5): 11-15.
- [19] Zheng Z Z, Liu Y T, Cui P. *Chin. J. Process Eng.* (郑争志, 刘雅婷, 崔鹏. 过程工程学报), 2018, 18(3): 557-562.
- [20] Zhang Y, Xue K P, He M, Chen Z J, Wu H, Zhao Y X. *J. Instrum. Anal.* (张勇, 薛昆鹏, 何美, 陈再洁, 吴虹, 赵岳星. 分析测试学报), 2013, 32(1): 122-126.
- [21] Qin Y, Yin J B, Du D S, Cao J, Yin C L, Cheng Z H. *J. Instrum. Anal.* (秦艳, 尹建兵, 杜冬生, 曹捷, 尹成乐, 程志红. 分析测试学报), 2017, 36(1): 9-17.
- [22] Liu J X, Meng F Y, Zhang S H, Lu H, Zhou X T, Hou J Y, Li G. *Chin. Herbal Med.* (刘金欣, 孟繁蕴, 张胜海, 卢恒, 周晓腾, 侯静怡, 李耿. 中草药), 2014, 45(10): 1477-1480.
- [23] Fan Q Y, Wang W H, Dai C M. *J. Instrum. Anal.* (樊轻亚, 王万好, 代春美. 分析测试学报), 2018, 37(12): 1445-1450.

(责任编辑: 龙秀芬)