

钩藤代煎液中 6 种生物碱的稳定性研究

嵇书霞¹, 陈奕灵², 钱跣¹, 须秋萍¹, 赵亮¹, 李盛建^{1*}(1.上海市宝山区罗店医院, 上海 201908; 2.上海健康医学院, 上海 201318)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱串联质谱法(UHPLC-MS/MS)测定钩藤代煎液中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱和去氢毛钩藤碱的含量,考察不同储存条件对有效成分的放置稳定性的影响。方法 采用 UHPLC-MS/MS, 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 线性梯度洗脱, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C; 进样量为 2 μL, 质谱检测采用动态多反应离子检测模式; 考察不同储存温度和储存时间对钩藤代煎液中 6 种有效成分稳定性的影响。结果 钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱和去氢毛钩藤碱运用本法被成功分离, 且在相应浓度范围内线性关系良好, 其精密性、重复性、稳定性和加样回收率均良好; 低温储存的药液 14 d 内 6 种生物碱基本稳定, 常温储存 3 d 内基本稳定, 高温储存较不稳定。结论 所建立的 UHPLC-MS/MS 稳定、快速、重复性好, 可用于测定钩藤代煎液中 6 种有效成分的含量; 冷藏有利于钩藤代煎液的稳定性。

关键词: 钩藤代煎液; 超高效液相色谱串联质谱; 稳定性

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)24-3411-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222012

引用本文: 嵇书霞, 陈奕灵, 钱跣, 等. 钩藤代煎液中 6 种生物碱的稳定性研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(24): 3411-3417.

Study on the Stability of Six Alkaloids in Uncaria Decoction

Ji Shuxia¹, Chen Yiling², Qian Xian¹, Xu Qiuping¹, Zhao Liang¹, Li Chengjian^{1*}(1. Shanghai Baoshan Luodian Hospital, Shanghai 201908, China; 2. Shanghai Health Medical College, Shanghai 201308, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for determination of hynchophylline, isorhynchophylline, isocorynoxine, corynoxine, hirsutine and hirsuteine in Uncaria decoction, and investigate the effect of different storage conditions on the stability of active ingredients. **METHODS** An UHPLC-MS/MS method was established to investigate the effects of different storage temperature and time on the stability of six active components in Uncaria decoction. Separation was performed with a gradient mobile phase system of acetonitrile-0.1% formic water solution, the flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, the temperature of column was 30 °C, the injection volume was 2 μL, the MS detection was dynamic multiple reaction monitoring mode. The effects of different storage temperature and time on the stability of six active components in Uncaria decoction was investigated. **RESULTS** Rhynchophylline, isorhynchophylline, corynoxine, isocorynoxine, hirsutine and hirsuteine were successfully separated using this method, with good linear relationship in the corresponding concentration range. The precision, repeatability, stability and recovery rate were good. The six alkaloids were basically stable within 14 d under low temperature storage, basically stable within 3 d under normal temperature storage, and not stable under high temperature storage. **CONCLUSION** The UHPLC-MS/MS method is stable, rapid and reproducible. It can be used to determine the contents of six effective components in Uncaria decoction. Cold storage is beneficial to the stability of Uncaria decoction.

KEYWORDS: Uncaria decoction; UHPLC-MS/MS; stability

钩藤为茜草科钩藤 *Uncaria rhyunchophylla* (Miq.) Miq.ex Havil.、钩藤 *Uncaria macrophylla* Wall.、毛钩藤 *Uncaria hirsuta* Havil.、华钩藤 *Uncaria sinensis* (Oliv.) Havil.或无柄果钩藤 *Uncaria sessilifructus* Roxb.的干燥带茎枝, 功能与主治主要为息风定惊, 清热平肝。用于肝风内动,

惊痫抽搐, 高热惊厥, 感冒夹惊, 小儿惊啼, 妊娠子痫, 头痛眩晕等症的治疗^[1]。钩藤中有效成分为钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱和去氢毛钩藤碱等生物碱成分, 具有抗高血压、抗炎、神经保护等药理作用^[1-2]。临床上常使用自动煎药机代替人工煎煮中药, 而中

基金项目: 上海市宝山区医学特色专科和社区项目建设计划项目(BSZK-2019-C03); 上海市宝山区科技创新专项资金项目(19-E-55); 上海市宝山区卫生健康委(育才)计划(BSWSYC-2023-14)

作者简介: 嵇书霞, 女, 主管药师 E-mail: jsx0729@163.com

***通信作者:** 李盛建, 男, 硕士, 主管药师 E-mail: punk8@163.com

药处方中经常有“先煎”“后下”的药材，一般先按煎煮制备成小包装中药代煎液，用时加到复方中混合。代煎液的储藏温度和时间都会影响药效成分的稳定性从而降低复方汤剂的药效。钩藤作为“后下”中药材，目前并没有代煎液质量控制过程研究报道，缺少有效的质量监管措施，难以保证其临床疗效。

目前钩藤中生物碱含量测定方法主要有 HPLC^[3]、液质联用法等^[4]，上述已报道的方法存在分析时间较长、检测限不足等诸多局限。本研究所建立的 UHPLC-MS/MS 具有灵敏度高、准确度高、快速等优点，该方法采用了更小的粒径色谱柱，提高色谱分离度、灵敏分析准确度、可获得良好的重现性，更适合有效成分的定量分析和稳定性等研究^[5-6]。本研究将以中国药典 2020 年版中分析方法验证指导原则为依据，建立 UHPLC-MS/MS 定量法，测定钩藤代煎液中 6 种有效成分(钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱和去氢毛钩藤碱)的含量，考察代煎液在不同温度长期储存条件下有效成分含量的变化，为保障钩藤代煎液的质量控制和临床疗效提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS 超高效液相色谱仪(Agilent 科技有限公司);十万分之一电子天平(梅特勒-托利多公司);SK7200H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);DK-320 电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司);高速离心机(赛默飞世尔科技有限公司)。

对照品钩藤碱(批号: 4894; 纯度: 99.0%)、异钩藤碱(批号: 6899; 纯度: 99.3%)、去氢钩藤碱(批号: 4075; 纯度: 98.9%)、异去氢钩藤碱(批号: 4175; 纯度: 99.7%)、毛钩藤碱(批号: 6068; 纯度: 98.5%)、去氢毛钩藤碱(批号: 6070; 纯度: 98.5%)均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司;钩藤代煎液(批号: 210201, 230327, 230329, 230403)购自上海市宝山区罗店医院中药房;卡马西平(内标, 德国 Dr.Ehrenstorfer, 批号: G171923; 纯度: 99.5%)。甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯, 购自霍尼韦尔公司, 水为双蒸纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈

(2.1 mm×150 mm, 2.7 μm), 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 线性梯度洗脱, 洗脱程序如下: 0~2.5 min, 20%B; 2.5~3 min, 20%→65%B; 3~5 min, 65%→80%B; 流速: 0.4 mL·min⁻¹, 平衡时间: 3 min, 柱温: 30 °C; 进样量: 2 μL。

2.2 质谱条件

采用 AJS ESI 动态多反应离子监测模式(DMRM)进行二级扫描; 离子源参数设置: 干燥气温度 300 °C; 干燥气流速 7 L·min⁻¹; 雾化器压力 40 psi(1 psi=6 894.7 Pa); 鞘气温度 350 °C; 鞘气流速 11 L·min⁻¹; 毛细管电压 4 000 V; 6 种成分及内标的质谱参数及保留时间见表 1, 化学结构式见图 1, 典型 MRM 色谱图见图 2。

表 1 6 种钩藤类生物碱及内标的质谱参数

Tab. 1 Mass spectrometric parameters of six rhynchophylline alkaloids and internal standard

成分	母离子	子离子	电压/V	碰撞电压/eV	保留时间/min
钩藤碱	385.2	160.0	180	37	4.3
异钩藤碱	385.2	241.1	190	33	3.3
去氢钩藤碱	383.2	160.0	170	37	3.5
异去氢钩藤碱	383.2	160.0	170	37	2.7
毛钩藤碱	369.2	144.0	180	35	4.5
去氢毛钩藤碱	367.2	144.0	170	37	4.5
卡马西平*	237.1	194.1	150	17	4.6

注: *为内标。

Note: *as the internal standard.

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品储备液 精密称取钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱、卡马西平对照品 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别得到质量浓度为 1.00 mg·mL⁻¹ 的 7 种对照品储备液。精密移取对照品储备液适当体积于 10 mL 量瓶中, 用甲醇进行逐级梯度稀释, 配成混合对照品系列溶液, 质量浓度分别为钩藤碱 2.5~100 ng·mL⁻¹, 异钩藤碱 2.5~20 ng·mL⁻¹, 去氢钩藤碱 2.5~100 ng·mL⁻¹, 异去氢钩藤碱 1~40 ng·mL⁻¹, 毛钩藤碱 7.5~300 ng·mL⁻¹, 去氢毛钩藤碱 15~600 ng·mL⁻¹, 卡马西平对照品溶液单独配置质量浓度为 100 ng·mL⁻¹, 上述溶液保存于 4 °C 冰箱待用。

2.3.2 供试品溶液的制备及前处理 取适量钩藤代煎液稀释 200 倍, 经 12 000×g 高速离心 5 min, 取上清液即得钩藤代煎液供试品溶液; 取供试品溶液 900 μL, 加入内标溶液 100 μL, 混匀, 待分析。

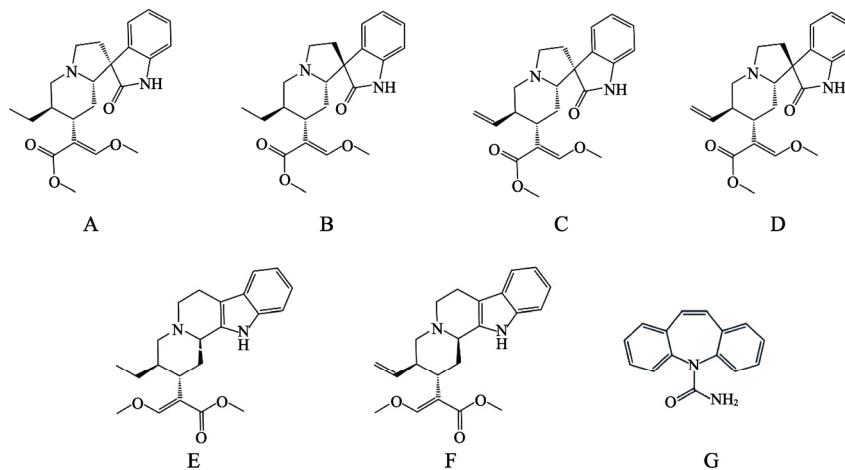


图 1 6种钩藤碱类生物碱及内标化学结构式

A-钩藤碱; B-异钩藤碱; C-去氢钩藤碱; D-异去氢钩藤碱; E-毛钩藤碱; F-去氢毛钩藤碱; G-卡马西平。

Fig. 1 Chemical structural formulas of six rhynchophylline alkaloids and internal standard

A-rhynchophylline; B-isorhynchophylline; C-corynoxine; D-isocorynoxine; E-hirsutine; F-hirsuteine; G-carbamazepine.

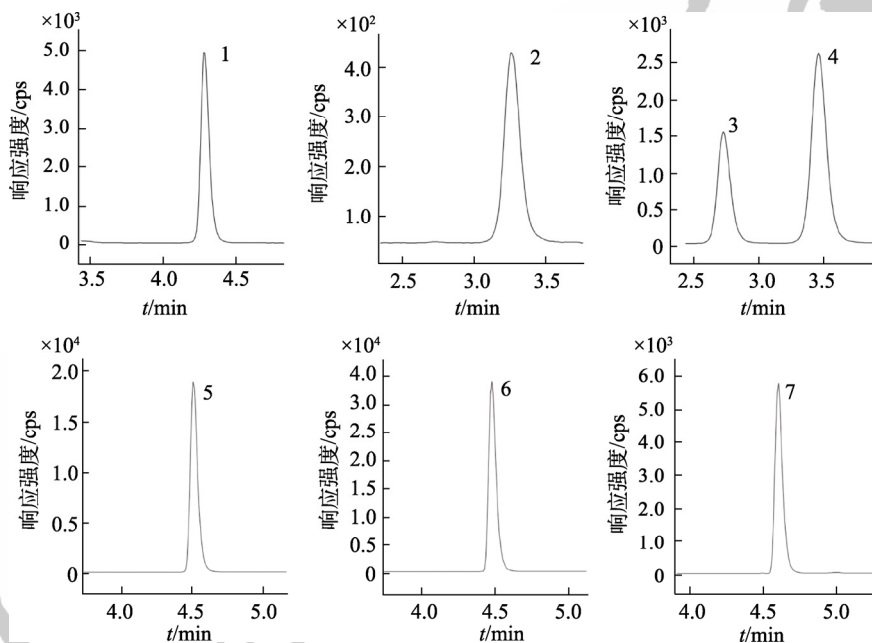


图 2 6种指标性成分及内标的典型色谱图

1-钩藤碱; 2-异钩藤碱; 3-异去氢钩藤碱; 4-去氢钩藤碱; 5-毛钩藤碱; 6-去氢毛钩藤碱; 7-卡马西平。

Fig. 2 Typical chromatograms of 6 index components and internal standard

1-rhynchophylline; 2-isorhynchophylline; 3-isocorynoxine; 4-corynoxine; 5-hirsutine; 6-hirsuteine; 7-carbamazepine.

2.4 标准曲线及线性关系考察

分别精密移取“2.3.1”项中配置好的混合对照品系列溶液 900 μL , 加入内标溶液 100 μL , 混匀, 按“2.1”和“2.2”项下 UHPLC-MS/MS 条件进样分析, 记录色谱图, 计算各成分与内标峰面积的比值。以添加浓度为横坐标(X), 各成分与内标峰面积的比值为纵坐标(Y), 进行线性回归。以信噪比(S/N)>10 作为定量下限, S/N>3 作为检测下限。检测限、定量限、回归方程、线性范围及相

关系数见表 2, 结果表明 6 种成分在相应的线性范围内呈良好的线性关系。

2.5 仪器精密度试验

取混合对照品低(钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱的质量浓度分别为 10, 2, 10, 4, 30, 60 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中(质量浓度分别为 25, 5, 25, 10, 75, 150 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高(质量浓度分别为 50, 10, 50, 20, 150, 300 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)3 个浓度, 按“2.3.2”项下方法处理

表 2 钩藤代煎液中 6 种指标性成分的标准曲线(n=5)

Tab. 2 Standard curve of six index components in Uncaria Decoction(n=5)

化合物	回归方程	r ²	线性范围/ng·mL ⁻¹	检测限/ng·mL ⁻¹	定量限/ng·mL ⁻¹
钩藤碱	Y=6.656 × 10 ⁻³ X - 1.051 × 10 ⁻³	0.999 7	2.5~100	0.1	1
异钩藤碱	Y=4.280 × 10 ⁻³ X - 2.19 × 10 ⁻⁴	0.999 6	0.5~20	0.2	0.5
去氢钩藤碱	Y=7.338 × 10 ⁻³ X - 7.01 × 10 ⁻⁴	0.999 6	2.5~100	0.1	1
异去氢钩藤碱	Y=3.220 × 10 ⁻³ X + 3.553 × 10 ⁻³	0.999 6	1~40	0.1	1
毛钩藤碱	Y=5.868 × 10 ⁻³ X + 1.408 6 × 10 ⁻²	0.995 8	7.5~300	0.15	0.3
去氢毛钩藤碱	Y=5.553 × 10 ⁻³ X + 1.566 8 × 10 ⁻²	0.989 7	15~600	0.15	0.3

样品,并按“2.1”和“2.2”项下UHPLC-MS/MS条件进样分析,连续3d测定,记录各成分色谱峰面积,计算浓度,考察日内和日间精密密度,结果钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱在低浓度下的日内精密密度RSD值分别为1.0%,0.99%,0.54%,5.7%,0.77%,0.92%(n=3),日间精密密度RSD值分别为3.7%,1.1%,2.0%,3.9%,2.2%,2.5%;中浓度下的日内精密密度RSD值分别为1.2%,0.92%,0.75%,0.70%,1.3%,1.2%(n=3),日间精密密度RSD值分别为3.4%,1.4%,0.84%,2.6%,1.5%,1.6%;高浓度下的日内精密密度RSD值分别为0.65%,0.72%,0.94%,1.3%,0.53%,0.69%(n=3),日间精密密度RSD值分别为1.7%,0.99%,0.75%,1.2%,0.75%,0.90%;结果显示该方法精密密度符合方法学要求,仪器精密密度良好。

2.6 重复性试验

精密取同一批钩藤代煎液,共6份,按“2.3.2”项下方法操作制备供试品溶液,按“2.1”和“2.2”项下UHPLC-MS/MS条件进样分析,记录各成分色谱峰面积,计算浓度,钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱的质量浓度分别为28.49,6.12,28.17,8.24,75.26,146.90 ng·mL⁻¹,RSD分别为1.4%,2.3%,1.2%,1.1%,0.55%,0.51%,结果表明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密移取“2.6”项下供试品溶液,分别在0,4,8,12,24 h测定供试品溶液中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱的含量,考察供试品常温放置稳定性,钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱的RSD分别为2.0%,1.3%,0.81%,5.0%,0.21%,0.41%,结果表明样品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取钩藤代煎液供试品溶液,加入适量

对照品溶液,平行操作6份,按“2.3.2”项下方法制备溶液,测定钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱的含量,计算加样回收率,结果见表3,结果表明该方法回收率良好。

表 3 加样回收试验结果

Tab. 3 Experimental results of sample addition and recovery

成分	取样量/ μL	样品量/ ng	加入 量/ng	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
钩藤碱	1 000	28.49	25	53.24	99.0	105.5	2.9
	1 000	28.49	25	54.42	103.7		
	1 000	28.49	25	54.52	104.1		
	1 000	28.49	25	55.00	106.0		
	1 000	28.49	25	55.25	107.0		
	1 000	28.49	25	55.24	107.0		
异钩藤碱	1 000	6.12	5	11.34	104.4	103.1	4.0
	1 000	6.12	5	10.97	97.0		
	1 000	6.12	5	11.08	99.2		
	1 000	6.12	5	11.30	103.6		
	1 000	6.12	5	11.45	106.6		
	1 000	6.12	5	11.50	107.6		
去氢钩藤碱	1 000	28.17	25	54.65	105.9	103.7	4.6
	1 000	28.17	25	54.41	105.0		
	1 000	28.17	25	52.29	96.5		
	1 000	28.17	25	52.95	99.1		
	1 000	28.17	25	54.84	106.7		
	1 000	28.17	25	55.37	108.8		
异去氢钩藤碱	1 000	8.24	10	18.11	98.7	101.5	3.1
	1 000	8.24	10	18.04	98.0		
	1 000	8.24	10	18.31	100.7		
	1 000	8.24	10	18.35	101.1		
	1 000	8.24	10	18.62	103.8		
	1 000	8.24	10	18.88	106.4		
毛钩藤碱	1 000	75.26	75	148.84	98.1	99.8	2.5
	1 000	75.26	75	149.92	99.5		
	1 000	75.26	75	150.62	100.5		
	1 000	75.26	75	147.57	96.4		
	1 000	75.26	75	150.46	100.3		
	1 000	75.26	75	153.06	103.7		
去氢毛钩藤碱	1 000	146.90	150	298.82	101.3	103.3	4.1
	1 000	146.90	150	300.16	102.2		
	1 000	146.90	150	291.86	96.6		
	1 000	146.90	150	304.57	105.1		
	1 000	146.90	150	306.05	106.1		
	1 000	146.90	150	309.94	108.7		

2.9 钩藤代煎液 6 种生物碱含量测定

取 3 批次钩藤代煎液于当日测定 6 种指标性成分的含量,按“2.3.2”项下方法操作制备溶液,按“2.1”和“2.2”项下 UHPLC-MS/MS 条件进样分析,计算指标性成分的含量,结果见表 4,3 批次钩藤代煎液质量稳定。

2.10 钩藤代煎液长期稳定性试验

取 3 袋钩藤代煎液于当日(第 0 天)测定 6 种指标性成分的含量,按“2.3.2”项下方法操作制备溶液,按“2.1”和“2.2”项下 UHPLC-MS/MS 条件进样分析,计算指标性成分的含量。剩余袋装药液分组保存在 4 °C(冷藏组),20 °C(常温组),35 °C(高温组)恒温条件下,1,3,7,14,21,28 d

后重复上述步骤,检测指标性成分的含量,考察环境温度和放置时间对指标性成分稳定性的影响。应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,两组间差异比较采用 LSD 法,检验水准(α)为 0.05。结果见表 5,与储存第 0 天相比,低温存储 21,28 d,常温储存 7,14,21,28 d 及高温储存 1,3,7,14,21,28 d 后部分钩藤生物碱的含量显著性降低($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 被测成分的选择

本研究所选取钩藤中 6 种单萜吲哚生物碱成分具有多种药理活性作用,可以作为指标性成分考察

表 4 钩藤代煎液 6 种指标性成分的含量测定结果

批号	钩藤碱	异钩藤碱	去氢钩藤碱	异去氢钩藤碱	毛钩藤碱	去氢毛钩藤碱	总钩藤类生物碱
230327	31.25	7.56	27.56	8.54	66.87	148.57	290.35
230329	28.98	6.55	26.54	7.67	61.47	139.77	270.98
230403	28.61	7.10	25.68	7.87	59.78	135.57	264.61

表 5 不同条件下钩藤代煎液中 6 种指标性成分的含量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	成分	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
冷藏组	钩藤碱	29.86±0.34	29.47±0.87	29.22±1.05	28.43±1.26	29.05±0.41	27.21±1.95	26.52±3.58 ¹⁾
	异钩藤碱	6.33±0.06	6.28±0.10	6.23±0.27	6.22±0.07	6.23±0.29	5.56±0.68 ¹⁾	5.40±0.74 ¹⁾
	去氢钩藤碱	29.54±0.14	29.01±0.67	29.29±1.17	28.23±0.99	28.88±0.60	27.38±1.18	27.57±3.10
	异去氢钩藤碱	8.65±0.32	8.11±0.19	8.23±0.22	8.21±0.13	8.52±0.24	7.55±0.94 ¹⁾	7.57±0.42 ¹⁾
	毛钩藤碱	60.09±0.23	60.41±2.75	58.97±4.37	60.52±2.20	59.04±1.35	56.92±3.24	56.62±2.79
	去氢毛钩藤碱	147.52±0.88	146.92±4.86	142.49±6.24	140.51±4.53	141.50±1.84	138.27±5.35	132.72±19.87
	总钩藤类生物碱	281.98±1.22	280.20±7.16	274.44±11.62	272.11±8.8	273.23±4.61	262.89±4.53	256.40±24.27 ¹⁾
常温组	钩藤碱	29.86±0.34	29.65±1.10	28.28±0.19	25.21±1.11 ¹⁾	26.09±0.36 ¹⁾	24.81±1.34 ¹⁾	23.70±1.72 ¹⁾
	异钩藤碱	6.33±0.06	6.31±0.13	6.14±0.35	5.29±0.23 ¹⁾	5.46±0.08 ¹⁾	4.90±0.25 ¹⁾	4.73±0.35 ¹⁾
	去氢钩藤碱	29.54±0.14	28.71±0.13	27.82±1.35	26.14±0.83 ¹⁾	26.91±1.91 ¹⁾	26.98±0.99 ¹⁾	26.65±1.54 ¹⁾
	异去氢钩藤碱	8.65±0.32	8.27±0.39	8.16±0.19	7.30±0.47 ¹⁾	7.21±0.46 ¹⁾	6.00±1.02 ¹⁾	6.26±0.33 ¹⁾
	毛钩藤碱	60.09±0.23	58.49±1.36	57.15±2.37	59.42±1.83	57.33±2.20 ¹⁾	51.99±3.11 ¹⁾	50.73±4.05 ¹⁾
	去氢毛钩藤碱	147.52±0.88	142.70±2.77	139.05±7.84	124.85±9.06 ¹⁾	122.74±4.68 ¹⁾	116.69±9.39 ¹⁾	111.77±13.5 ¹⁾
	总钩藤类生物碱	281.98±1.22	274.14±2.86	266.61±4.52	248.2±11.08 ¹⁾	245.74±7.03 ¹⁾	231.35±9.52 ¹⁾	223.84±20.91 ¹⁾
高温组	钩藤碱	29.86±0.34	29.81±0.47	29.05±0.25	24.33±1.23 ¹⁾	24.84±1.50 ¹⁾	24.23±2.4 ¹⁾	22.92±1.22 ¹⁾
	异钩藤碱	6.33±0.06	6.18±0.14	5.82±0.06 ¹⁾	5.01±0.07 ¹⁾	5.07±0.05 ¹⁾	4.93±0.22 ¹⁾	4.56±0.26 ¹⁾
	去氢钩藤碱	29.54±0.14	29.24±0.71	28.44±1.80	25.81±1.02 ¹⁾	25.18±2.04 ¹⁾	24.34±1.65 ¹⁾	23.62±0.91 ¹⁾
	异去氢钩藤碱	8.65±0.32	8.13±0.31	8.10±0.13	7.21±0.81 ¹⁾	5.50±0.23 ¹⁾	4.79±0.20 ¹⁾	4.66±0.53 ¹⁾
	毛钩藤碱	60.09±0.23	60.58±1.23	56.43±0.38	56.21±2.29	50.94±1.81 ¹⁾	50.06±4.17 ¹⁾	48.95±4.11 ¹⁾
	去氢毛钩藤碱	147.52±0.88	143.07±2.74	137.50±5.38 ¹⁾	118.69±2.17 ¹⁾	117.30±5.43 ¹⁾	115.77±5.78 ¹⁾	109.8±5.99 ¹⁾
	总钩藤类生物碱	281.98±1.22	277.02±2.91 ¹⁾	265.34±5.61 ¹⁾	237.27±2.43 ¹⁾	228.83±4.51 ¹⁾	224.13±2.00 ¹⁾	214.52±11.11 ¹⁾

注:与第 0 天比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the 0 day, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

钩藤代煎药液的稳定性。其中钩藤碱的药理作用研究较多,具有保护中枢神经系统、保护心肌、抗炎、平喘作用等^[1-2,7-10]。毛钩藤碱具有保护心血管、抗肿瘤等药理作用^[11-12]。钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱和去氢毛钩藤碱均具有逆转肿瘤多药耐药活性作用^[2,13]。

3.2 稀释倍数的确定

钩藤代煎液中不同成分的含量差异较大,不同稀释倍数处理后进样,部分成分超出标准曲线线性范围。如毛钩藤碱和去氢钩藤碱含量较高,高浓度样品进入质谱离子源时,自身离子抑制造成相应饱和,扩大线性范围会导致线性方程 r 系数不达标;而异钩藤碱含量较低,过度稀释使其浓度不能达到定量限。因此,本实验针对稀释倍数进行了探索,钩藤代煎液稀释200倍处理后,6种指标性成分的浓度均在线性范围内。

3.3 色谱、质谱条件的优化

本研究所选取的待测成分中,钩藤碱和异钩藤碱、去氢钩藤碱和异去氢钩藤碱为同分异构体。由于同分异构体之间极性差异较小,在色谱柱中较难分离,这给含量测定带来难度。为解决这一难题,本研究从各方面进行条件优化。在质谱离子对选择上,钩藤碱和异钩藤碱、去氢钩藤碱和异去氢钩藤碱的二级碎片离子中未存在特异性离子,无法通过选择特异性离子对图谱进行分析,通过尝试 Agilent Zorbax C₁₈、Agilent TC-C₁₈、CAPCELL PAK C₁₈ MGS3 等不同色谱柱,甲酸水、水、乙腈甲醇不同流动相体系,以及调节水相10%~90%梯度比例,使得同分异构体成分在色谱柱中达到基线分离,互不干扰。最终该实验条件下的含量测定方法成功应用于钩藤代煎液中6种钩藤类生物碱的含量测定。

3.4 钩藤代煎液储存稳定性

低温储存的药液14 d内稳定,储存28 d后,总钩藤类生物碱浓度发生显著性降低,降低至最初浓度的90.92%,其中显著性下降的成分钩藤碱、异钩藤碱、异去氢钩藤碱储存28 d后浓度分别降低至最初浓度的88.88%,85.30%,87.51%。常温储存的药液3 d内稳定,储存7 d后总钩藤类生物碱浓度开始发生显著性降低,储存28 d后降低至最初浓度的79.38%,其中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱分别降低至最初浓度的79.37%,74.72%,

90.22%,72.37%,84.42%,75.67%。高温储存的药液较为不稳定,储存1 d后总钩藤类生物碱浓度开始发生显著性降低,储存28 d后降低至最初浓度的76.08%。其中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱分别降低至最初浓度的76.75%,72.04%,79.96%,53.87%,81.46%,74.43%。低温组钩藤生物碱浓度虽有下降,但总体上28 d内仍保持较高浓度,6种成分含量均在初始浓度的85%以上,药理活性影响较小,能保持其心血管保护、抗肿瘤活性作用。常、高温组储存28 d后,总钩藤生物碱丢失>20%,尤其是异去氢钩藤碱,其含量最低至初始的53.87%,逆转肿瘤多药耐药活性受较大影响。

由此可见,低温保存的钩藤预煎药液较稳定,冷藏有利于钩藤代煎液的稳定性,较高的温度不利于药液的保存。在笔者所在医院对代煎企业的日常质控中发现代煎中药成品通常室温储存,且部分成品储存时间超过本研究药液成分稳定的期限,不当的储存环境和超期限的储存可能影响其临床疗效,这为医疗机构对代煎企业的监管起警示作用。

总之,中药饮片被煎煮加工成为液体形态,往往比固体形态更加不稳定,其活性成分的稳定性决定中药代煎液的储存环境和保质期限,为了使医疗机构对代煎企业开展更好的质量监控,本研究以钩藤代煎液为例,建立了6种钩藤类生物碱活性成分的UHPLC-MS/MS含量测定方法,该方法能够快速、准确地对代煎液进行含量测定,可以应用于钩藤代煎液中钩藤生物碱的稳定性研究。该研究有助提高医疗机构对企业的代煎业务监管能力,并从有效成分含量的角度为代煎液质量控制体系的制定提供数据支持。

REFERENCES

- [1] ZHANG J G, CHEN J J, GENG C G. Advances in indole alkaloids from traditional Chinese medicine of *Uncariae Ramulus Cum Uncis* documented in Chinese Pharmacopoeia[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(4): 685-695.
- [2] YU X, ZHU L L, LIU J, et al. Research progress on monoterpenoid indole alkaloids in *Uncariae Ramulus Cum Uncis* and their pharmacological activities[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(19): 6052-6065.
- [3] 吴婷婷, 鲍曦, 蔡进章, 等. HPLC 法测定钩藤不同部位中钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱含量[J]. 北京中医药,

- 2019, 38(12): 1237-1240.
- [4] CHI Y F, WANG X M, ZHANG L, et al. Content determination of four kinds of alkaloids in *Uncaria* by HPLC-MS[J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, (山东中医药大学学报), 2017, 41(3): 262-265.
- [5] TAN P, LI C Y, ZHANG C E, et al. Application status and prospect of ultra-performance liquid chromatography in analysis field of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(24): 5938-5945.
- [6] ZHANG F, ZHAO Y Q, LI X Y. Determination of 7 constituents in Xiao'er Xieli Tablets by UPLC-MS/MS[J]. Central South Pharm(中南药学), 2021, 19(2): 265-270.
- [7] KANG T H, MURAKAMI Y, TAKAYAMA H, et al. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on *in vitro* ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: Putative neurotransmitter receptors involved in their action[J]. Life Sci, 2004, 76(3): 331-343.
- [8] GEETHA R G, RAMACHANDRAN S. Recent advances in the anti-inflammatory activity of plant-derived alkaloid rhynchophylline in neurological and cardiovascular diseases[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(8): 1170.
- [9] LI F P. Effects of rhynchophylline on HMGB1 and CDK5 mRNA expression in oxygen-glucose deprived astrocytes[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.
- [10] LI F P, LOU X L. Research progress on protective effect of rhynchophylline on central nervous system[J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志), 2021, 41(23): 5467-5471
- [11] LI Y W, XIE L, WANG N. Effect of hirsutine on proliferation, apoptosis, metastasis, and invasion of human cervical cancer Ca ski cells[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2022, 28(4): 109-115.
- [12] WU L X. Preliminary study on cardiovascular protective effect of rhynchophylline and its synthesis[D]. Shanghai: Fudan University, 2010.
- [13] ZHOU Y L, ZHOU Z W, ZENG R. Reversal effect of Isorhynchophylline on cisplatin resistance of line A549/DDP human lung adenocarcinoma cells[J]. Centr South Pharm(中南药学), 2008, 6(3): 267-270.

收稿日期: 2022-12-19

(本文责编: 陈怡心)