

基于 UHPLC-MS/MS 的钩藤生物碱在大鼠体内的组织分布研究

吴依松^{1,2}, 李士伟^{1,2}, 李昊举², 魏文龙², 吴士飞², 果德安^{1,2*}

1. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

2. 中国科学院上海药物研究所 上海中药现代化研究中心, 中药标准化技术国家工程研究中心, 上海 201203

摘要: **目的** 建立超高效液相串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS) 法测定大鼠不同组织中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱与缝籽嗉甲醚的含量, 并用于钩藤的组织分布研究。 **方法** 大鼠 ig 钩藤水煎液后, 分别于 0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、8、12 h 取心、肝、脾、肺、肾、脑组织。以长春胺为内标, 采用液液萃取法提取后进行样本检测。 **结果** 建立的 UHPLC-MS/MS 方法中, 7 个生物碱在不同的组织中最低定量限范围为 0.05~1.00 ng, 响应与浓度的相关性 $R^2 \geq 0.991$ 。方法学考察中的专属性、基质效应、回收率、精密度与准确度以及稳定性等方法学考察均满足要求。各个组织中均为异钩藤碱含量最高, 其次为去氢钩藤碱; 异钩藤碱与去氢钩藤碱含量均远高于其对应的异构体钩藤碱与异去氢钩藤碱; 而 3 个四环单萜吲哚生物碱 (毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱、缝籽嗉甲醚) 在各组织中均含量最低。比较不同组织中生物碱成分含量可以发现, 7 个生物碱均在肝脏中含量最高, 其次为肾脏与肺部, 推测钩藤生物碱在肝脏与肾脏的蓄积是因为两者分别是生物碱成分的主要代谢部位与排泄部位。 **结论** 建立的方法灵敏度高、准确性好、专属性好, 适用于大鼠不同组织中钩藤生物碱的组织分布研究。

关键词: 钩藤; 生物碱; 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; 缝籽嗉甲醚; 定量分析; 组织分布

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)13-4035-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.017

Tissues distribution of alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* in rats by UHPLC-MS/MS

WU Yi-song^{1,2}, LI Shi-wei^{1,2}, LI Hao-ju², WEI Wen-long², WU Shi-fei², GUO De-an^{1,2}

1. College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Shanghai Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, National Engineering Research Center for TCM Standardization Technology, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for determination of contents of rhynchophylline (RHY), isorhynchophylline (IRHY), corynoxine (COE), isocorynoxine (ICOE), hirsutine (HTI), hirsuteine (HTE) and geissoschizine methyl ether (GSM) and applied for tissue distribution of *Uncaria rhynchophylla*. **Methods** Rats were ig *U. rhynchophylla* decoction, then heart, liver, spleen, lung, kidney and brain tissue were acquired at 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12 h. Vincamine was used as internal standard, samples were extracted by liquid-liquid extraction. **Results** For the established UHPLC-MS/MS method, minimum quantitative limits of seven alkaloids in different tissues ranged from 0.05 to 1.00 ng, and correlation between response and concentration was $R^2 \geq 0.991$. The specificity, matrix effect, recovery rate, precision and accuracy and stability met the requirements. IRHY content was the highest in each tissue, followed by COE; Both IRHY and COE were much higher than their corresponding isomers (RHY and ICOE), while three tetracyclic monoterpene indole alkaloids (HTE, HTI and GSM) were the lowest in all tissues. Comparing the contents of alkaloids in different tissues, it was found that content of seven alkaloids was the highest in liver, followed by kidney and lung. The cause of accumulation was probably due to kidney and liver to be the main sites of metabolism and excretion. **Conclusion** The established method has high sensitivity, good accuracy

收稿日期: 2022-04-02

基金项目: 上海市青年科技英才扬帆计划资助项目 (21YF1455800)

作者简介: 吴依松, 硕士研究生, 中药化学研究方向。E-mail: wuys0828@163.com

*通信作者: 果德安, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药化学与现代质量标准研究。Tel: (021)50271516 E-mail: daguo@simm.ac.cn

and specificity, which was suitable for tissue distribution study of alkaloids from *U. rhynchophylla* in different tissues of rats.

Key words: *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.; alkaloids; rhynchophylline; isorhynchophylline; corynoxine; isocorynoxine; hirsutine; hirsuteine; geissoschizine methyl ether; quantitative analysis; tissue distribution

钩藤为茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.、华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil.、毛钩藤 *U. hirsute* Havil.、大叶钩藤 *U. macrophylla* Wall. 或无柄果钩藤 *U. sessilifructus* Roxb. 的干燥带钩茎枝, 其性味甘、凉, 归肝、心包经, 具有息风定惊、清热平肝的功效, 临床用于治疗小儿惊啼、妊娠子痫、感冒夹惊、高热惊厥、惊痫抽搐、肝风内动、头痛眩晕等症状^[1]。钩藤含有黄酮、生物碱、香豆素、三萜酸等多种成分, 其中生物碱为主要活性成分^[2-3]。现代药理学研究表明, 钩藤具有降血压^[4-5]、镇静催眠和抗老年痴呆等作用^[6-7]。

钩藤的代谢研究主要集中于其中所含的生物碱成分, 国内王英峰等^[8]最早开展了钩藤药动学研究, 结果显示, 小鼠 ig 钩藤碱 2 h 后达到最高血药浓度。目前钩藤的组织分布研究, 大多为生物碱单体的研究。例如以新西兰大白兔为动物模型, 开展钩藤碱在兔体内的组织分布^[9-10], 结果显示钩藤碱在家兔体内吸收快、消除快、动力学呈线性等特征; 其他药动学与组织分布研究也表明, 钩藤碱的体内过程具有吸收快、消除快的特点, 且在肝脏、心脏、脑、肺组织、肾组织等器官中均有分布^[11-12]。然而关于钩藤的体内组织分布研究较少, 需要构建高灵敏的多指标含量测定方法用于体内钩藤生物碱的定量分析。

在中药体内的多成分定量研究中, 常使用 QqQ 或 Q-trap 的多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式, 待测物去溶剂化带电后通过 Q1 对母离子进行筛选, 在碰撞池 q2 进行二级碎裂, 随后在 Q3 中对子离子进行筛选^[13], 与其他方式比较, MRM 模式对待测物具有较高的选择性与灵敏度, 已广泛应用于药材中微量成分或体内成分的定量研究。本研究构建了超高效液相串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS) 方法用于定量分析不同组织中的 7 个生物碱, 并应用于钩藤的体内分布研究, 明确钩藤生物碱类的成分体内分布规律, 为钩藤的药物靶向治疗提供参考依据。

1 材料

1.1 药材

钩藤药材为从市场购买, 经中国科学院上海药

物研究所中药现代化中心姚帅高级实验师鉴定为茜草科植物钩藤 *U. rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 的干燥带钩茎枝, 钩藤样本 (样本号 20161202) 储存于中国科学院上海药物研究所。

1.2 试剂与仪器

色谱级乙腈 (批号 UCNA1H) 购自美国 Honeywell 公司; 质谱级氨水 (批号 H2119089) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 醋酸乙酯 (批号 20200306) 购自国药试剂有限公司; 去离子水由 Millipore Alpha-Q 纯水制备系统制备获得; 对照品钩藤碱、异钩藤碱、异去氢钩藤碱、去氢钩藤碱、去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱、缝籽嗪甲醚由本实验制备获得, 经 HPLC-UV 检测, 质量分数均大于 98%; 内标长春胺 (批号 8492) 购自上海诗丹德标准技术有限公司。

Agilent 1290 infinityII 串联 Agilent Triple Quad 6495 (美国安捷伦科技公司), 液相系统包括二元泵系统、样品管理器与色谱柱管理器; IKA® VIBRAX VXR BS25 型涡旋混匀仪 (德国 IKA 公司); 2200 型超声波清洗仪 (上海睿祺电子设备有限公司); 氮吹仪 (美国 Organomation Associates. Inc 公司); BT25S 型分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

1.3 动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠, 7~8 周龄, 体质量 200~250 g, 购自上海斯莱克动物实验中心, 合格证号 SYXK(沪)2020-0042。动物于温度 20~24 °C, 相对湿度 40%~70%, 单向通风环境, 12 h 光照循环环境中饲养, 自由进食饮水。大鼠在实验前饲养 1 周适应环境, 正式实验前, 禁食 12 h 不禁水。动物实验方案通过中国科学院上海药物所动物管理委员会的许可 (IACUC 审批号 2020-10-GDA-75)。

2 方法

2.1 对照品与钩藤水提物的制备

精密称定对照品钩藤碱、异钩藤碱、异去氢钩藤碱、去氢钩藤碱、去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱、缝籽嗪甲醚和内标, 用纯乙腈溶解获得 1 mg/mL 溶液备用。用纯乙腈对照品溶液进行稀释, 获得标准曲线不同质量浓度点与质控样本的储存液, 于 4 °C 保存备用。

称取钩藤药材 100 g, 加入 1 L 去离子水, 浸泡

30 min 后用武火煎煮至沸, 转文火煎煮 30 min 后滤过, 获得煎煮液, 连续煎煮 2 次, 合并煎煮液, 减压旋蒸浓缩后冷冻干燥, 获得钩藤水煎液冻干粉。

2.2 给药和样品制备

钩藤水煎液冻干粉用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液溶解。大鼠 ig 钩藤水煎液 (1 g/kg) 后, 分别于 0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、8、12 h 麻醉, 腹主动脉取血后, 分别摘取心、肝、脾、肺、肾、脑组织, 于液氮中淬灭后, 于 -80 °C 保存备用。

由于化合物在组织的整体空间分布情况不同, 为尽可能降低取样不均匀引起的误差, 故取样为不同时间点下相同组织的同一部位, 如心脏的心尖位置、脑的左侧部分沿外侧矢状面切割、左肾的左下方位置、肝脏的三角叶部分等。精确称定各组织 100 mg, 按照 1:5 的比例加入生理盐水匀浆 6 min, 每匀浆 20 s 间隔 10 s, 即得组织匀浆液。取组织匀浆液 100 μ L 置于离心管中, 加入 5 μ L 内标溶液, 涡旋均匀后加入 1 mL 醋酸乙酯溶液, 涡旋 3 min 后, 14 000 r/min 离心 10 min, 取 900 μ L 上清液氮气吹干, 随后在离心管中加入 100 μ L 乙腈复溶, 超声 5 min, 涡旋 3 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样。

精确称定各空白组织, 按照 1:5 的比例加入生理盐水进行匀浆。取组织匀浆液 95 μ L 加入 5 μ L 的标准曲线溶液或质控样本溶液, 然后加入 5 μ L 内标溶液, 其余操作同样品制备方法, 即得标准曲线与质控样本。

2.3 色谱与质谱条件

2.3.1 色谱条件 Phenomenex Kinetex® EVO C₁₈ 色谱柱为 (100 mm×2.1 mm, 2.6 μ m), 流动相为 0.1% 氨水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~0.1 min, 10% B; 0.1~5 min, 10%~25% B; 5~13 min, 25%~40% B; 13~15 min, 40%~50% B; 15~19 min, 50%~95% B; 19~22 min, 95% B。柱温 35 °C; 体积流量 0.4 mL/min。

2.3.2 质谱条件 ESI 源; 正离子模式; 数据采集模式为 MRM 模式。分别对待测物进行离子对优化, 离子对参数见表 1, 其他参数为: 干燥气温度 200 °C; 雾化气压力 35 psi (1 psi=6.895 kPa); 干燥气体积流量 14 L/min; 毛细管电压 4000 V; 鞘气温度 250 °C; 鞘气体积流量 11 L/min; 喷嘴电压 500 V。仪器控制、质谱参数优化、数据采集与数据后处理使用 Agilent Masshunter Workstation Software 9.0 软件。

表 1 MRM 定量用质谱参数

Table 1 Parameters of mass spectrometer for MRM

对照品	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	驻留时间/min	碎裂电压/V	碰撞能/eV	加速电压/V
去氢钩藤碱	383.2	160.1	110	380	41	4
异去氢钩藤碱	383.2	108.1	110	380	37	4
钩藤碱	385.2	353.2	110	380	25	4
异钩藤碱	385.2	160.1	110	380	41	4
去氢毛钩藤碱	367.2	144.0	110	380	33	4
毛钩藤碱	369.2	144.0	110	380	37	4
缝籽嗉甲醚	367.2	144.0	110	380	33	4
内标	355.2	337.1	110	380	17	4

2.4 方法学考察

根据 FDA 生物分析方法验证指南的指导意见进行 LC-MS/MS 定量的方法学考察^[18]。通过各组织间基质效应比较, 发现质控样本在不同基质中无明显的基质效应影响, 在保证准确度的前提下, 随机选取肝、心、脑 3 个组织进行方法学考察。

2.4.1 专属性考察 专属性是指在相同保留时间范围内, 空白基质中相应位置的空白峰面积应小于待测物最低定量限 (lower limit of quantification, LLOQ) 的 20%, 内标小于 5.0%。

2.4.2 基质效应与提取回收率 基质效应是指在

生物样品评价过程中, 生物基质对不同浓度点样品的测定值浓度影响是否一致, 其考察方法是比较 3 个不同质量浓度的质控溶液在含有和不含有基质的样本中检测结果之间的差异。

提取回收率是指在样本处理过程中, 在样本提取前后加入质控样本, 比较不同浓度点差异变化。

2.4.3 精密度与准确度考察 精密度与准确度包括日内精密度、日内准确度、日间精密度与日间准确度, 用于考察仪器的稳定性。日内精密度与准确度是比较在连续进样的情况下, 不同浓度点的组内值变化大小以及与实际值的差异大小, 包括 LLOQ、

低浓度质控 (lower quantity control, LQC)、中间浓度质控 (middle quantify control, MQC) 与高浓度质控 (high quantity control, HQC) 4 个部分, LQC、MQC、HQC 组内相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 应小于 15%, LLOQ 组内 RSD 应小于 20%, 质控样本与理论值的相对偏差 (relative error, RE) 应小于 15%。

日间精密度与日间准确度是考察连续 3 d 进样的测量值之间的变化以及与理论值的偏差, 要求连续 3 d 3 个质控样本的 RSD 应小于 15%, LLOQ 的 RSD 应小于 20%, 不同质控样本的 RE 应小于 15%。

2.4.4 稳定性考察 稳定性考察包括室温 4 h 稳定

性、自动进样器 24 h (4 °C) 稳定性、冻融 3 个循环稳定性 (-20 °C) 和短期稳定性 (-20 °C 放置 7 d)。考察方式为将空白组织均浆液分别与不同浓度质控样本进行混合, 加入内标溶液后混匀分别于室温放置 4 h、-20 °C 放置 1 周以及冻融 3 个循环, 冻融循环每次大于 12 h, 自动进样器稳定性为质控样本处理完成提取、吹干和复溶等过程后置自动进样器 24 h 进样。各浓度点的 RE 应小于 15%, 组内 RSD 应小于 15%。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 线性范围 根据预实验结果与质谱检灵敏度确定定量线性范围, 线性结果见表 2。在除肝脏组

表 2 不同组织中 7 个成分的回归方程与线性范围

Table 2 Linear range and regression equation of seven alkaloids in different tissue

组织	成分	线性方程	R^2	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LLOQ/(ng·mL ⁻¹)
心	异去氢钩藤碱	$y=2.523\ 446\ x+0.006\ 215$	0.992	0.5~1 250.0	0.50
	去氢钩藤碱	$y=0.701\ 396\ x+0.000\ 5672$	0.993	1.0~2 500.0	1.00
	钩藤碱	$y=3.018\ 928\ x+0.032\ 672$	0.994	0.5~1 250.0	0.50
	异钩藤碱	$y=1.503\ 035\ x+0.057\ 948$	0.995	1.0~2 500.0	1.00
	去氢毛钩藤碱	$y=2.712\ 177\ x-0.010\ 604$	0.991	0.05~125.00	0.05
	缝籽嗉甲醚	$y=2.504\ 551\ x-0.012\ 465$	0.993	0.05~125.00	0.05
	毛钩藤碱	$y=1.761\ 823\ x-0.007\ 27$	0.992	0.05~125.00	0.05
肝	异去氢钩藤碱	$y=4.996\ 761\ x-0.057\ 176$	0.996	0.5~2 500.0	0.50
	去氢钩藤碱	$y=0.721\ 232\ x+0.004\ 083$	0.995	1.0~5 000.0	1.00
	钩藤碱	$y=3.091\ 612\ x+0.007\ 577$	0.996	0.5~2 500.0	0.50
	异钩藤碱	$y=3.260\ 915\ x-0.005\ 66$	0.996	1.0~5 000.0	1.00
	去氢毛钩藤碱	$y=1.155\ 277\ x-0.003\ 309$	0.993	0.05~250.00	0.05
	缝籽嗉甲醚	$y=1.738\ 354\ x+0.001\ 945$	0.992	0.05~250.00	0.05
	毛钩藤碱	$y=1.288\ 939\ x+0.004\ 803$	0.993	0.05~250.00	0.05
脾	异去氢钩藤碱	$y=2.070\ 328\ x-0.022\ 442$	0.993	0.5~1 250.0	0.50
	去氢钩藤碱	$y=0.570\ 833\ x-0.012\ 793$	0.991	1.0~2 500.0	1.00
	钩藤碱	$y=2.720\ 595\ x-0.037\ 11$	0.992	0.5~1 250.0	0.50
	异钩藤碱	$y=1.283\ 3\ x-0.024\ 905$	0.992	1.0~2 500.0	1.00
	去氢毛钩藤碱	$y=3.192\ 123\ x-0.003\ 179$	0.992	0.05~125.00	0.05
	缝籽嗉甲醚	$y=2.500\ 705\ x-0.003\ 788$	0.993	0.05~125.00	0.05
	毛钩藤碱	$y=1.954\ 904\ x+0.002\ 218$	0.996	0.05~125.00	0.05
肺	异去氢钩藤碱	$y=2.608\ 458\ x+0.030\ 274$	0.994	0.5~1 250.0	0.50
	去氢钩藤碱	$y=0.726\ 214\ x+0.010\ 501$	0.996	1.0~2 500.0	1.00
	钩藤碱	$y=2.922\ 682\ x+0.047\ 619$	0.994	0.5~1 250.0	0.50
	异钩藤碱	$y=1.590\ 665\ x+0.059\ 309$	0.993	1.0~2 500.0	1.00
	去氢毛钩藤碱	$y=3.645\ 983\ x-0.002\ 464$	0.992	0.05~125.00	0.05
	缝籽嗉甲醚	$y=2.857\ 352\ x-0.008\ 049$	0.993	0.05~125.00	0.05
	毛钩藤碱	$y=2.260\ 964\ x+0.003\ 081$	0.994	0.05~125.00	0.05
肾	异去氢钩藤碱	$y=3.102\ 039\ x-0.053\ 778$	0.995	0.5~1 250.0	0.50
	去氢钩藤碱	$y=0.830\ 579\ x-0.034\ 525$	0.992	1.0~2 500.0	1.00
	钩藤碱	$y=3.806\ 784\ x-0.055\ 567$	0.993	0.5~1 250.0	0.50
	异钩藤碱	$y=0.922\ 039\ x-0.067\ 796$	0.992	1.0~2 500.0	1.00
	去氢毛钩藤碱	$y=4.049\ 22\ x-0.009\ 823$	0.993	0.05~125.00	0.05
	缝籽嗉甲醚	$y=2.952\ 23\ x-0.009\ 261$	0.993	0.05~125.00	0.05
	毛钩藤碱	$y=2.471\ 191\ x-0.004\ 597$	0.995	0.05~125.00	0.05
脑	异去氢钩藤碱	$y=3.085\ 289\ x-0.032\ 577$	0.996	0.5~1 250.0	0.50
	去氢钩藤碱	$y=0.662\ 539\ x-0.019\ 238$	0.997	1.0~2 500.0	1.00
	钩藤碱	$y=3.439\ 665\ x-0.041\ 07$	0.996	0.5~1 250.0	0.50
	异钩藤碱	$y=1.289\ 731\ x-0.017\ 116$	0.996	1.0~2 500.0	1.00
	去氢毛钩藤碱	$y=1.640\ 211\ x-0.003\ 339$	0.991	0.05~125.00	0.05
	缝籽嗉甲醚	$y=1.201\ 973\ x-0.001\ 494$	0.993	0.05~125.00	0.05
	毛钩藤碱	$y=0.863\ 487\ x+0.002\ 843$	0.992	0.05~125.00	0.05

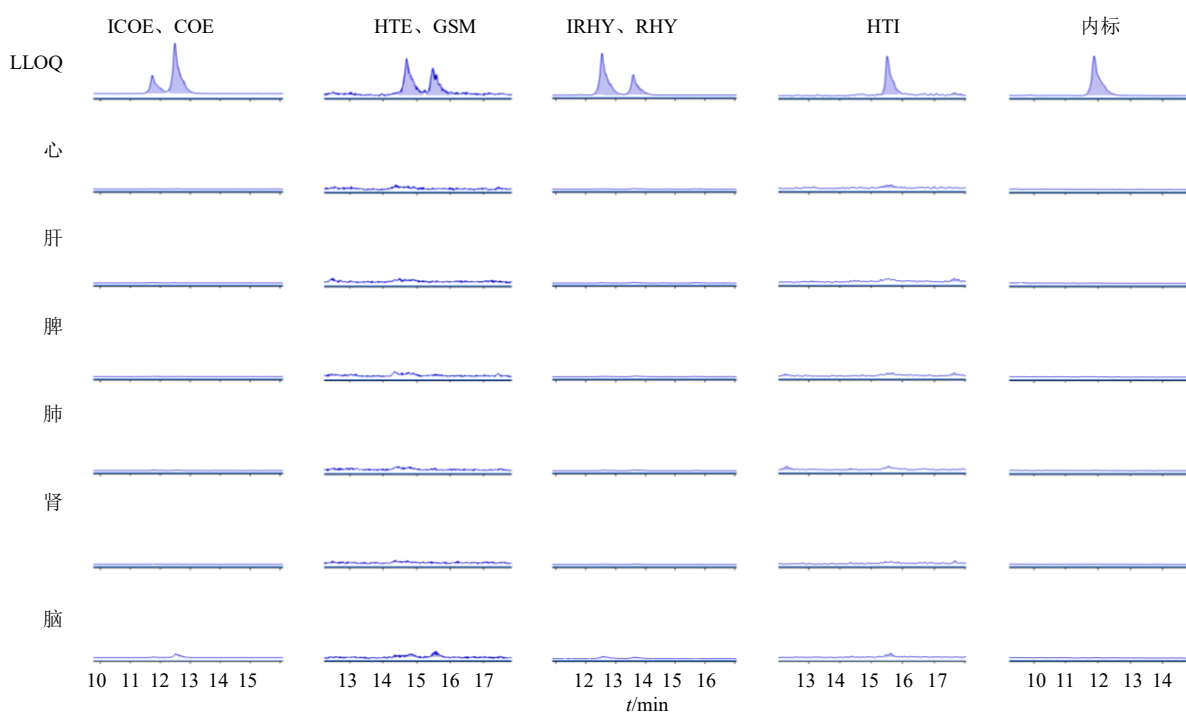
织以外, 异去氢钩藤碱与异钩藤碱在不同组织中的线性范围为 1~2500 ng/mL, 异去氢钩藤碱与钩藤碱的线性范围为 0.5~1250 ng/mL, 去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱和缝籽嗪甲醚的线性范围为 0.05~125 ng/mL。在肝组织中, 去氢钩藤碱与异钩藤碱的线性范围为 1~5000 ng/mL, 异去氢钩藤碱与钩藤碱的线性范围为 0.5~2500 ng/mL, 去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱和缝籽嗪甲醚的线性范围为 0.05~250 ng/mL。

3.1.2 专属性考察 心、肝、脾、肺、肾与脑组织待测物保留时间位置均无明显色谱峰, 表明方法专属性较好 (图 1)。分别在不同组织的线性最高点后

明该方法无残留效应。

3.1.3 基质效应与回收率 选取心、脑、肝 3 个组织进行基质效应与回收率考察, 结果如表 3、4 所示, 在 3 个组织中, 7 个生物碱的基质效应为 86.43%~118.85%, 均在可接受范围内; 7 个生物碱与内标的回收率为 76.28%~99.37%, 均在可接受范围内。

3.1.4 精密度与准确度 选取心、脑、肝 3 个组织对钩藤 7 个生物碱进行精密度与准确度进行评价, 结果如表 5、6 所示, 7 个生物碱的日内精密度、日内准确度、日间精密度、日间准确度均在接受范围内 ($\pm 15\%$)。



RHY-钩藤碱 IRHY-异钩藤碱 ICOE-异去氢钩藤碱 COE-去氢钩藤碱 HTE-去氢毛钩藤碱 HTI-毛钩藤碱 GSM-缝籽嗪甲醚, 下图同 RHY-rhynchophylline IRHY-isorhynchophylline COE-corynoxine ICOE-isocorynoxine HTE-hirsutine HTI-hirsutine GSM-geissoschizine methyl ether, same as below figures

图 1 7 个生物碱类成分和内标在大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑组织样品中的专属性结果

Fig. 1 Specificity of seven alkaloids and IS in heart, liver, spleen, lung, kidney, brain tissue samples of rats

表 3 生物碱在不同组织中基质效应

Table 3 Matrix effect of alkaloids in different tissues

成分	心			脑			肝		
	LQC/%	MQC/%	HQC/%	LQC/%	MQC/%	HQC/%	LQC/%	MQC/%	HQC/%
异去氢钩藤碱	99.78	101.04	103.50	87.09	94.48	95.76	99.02	86.43	88.33
去氢钩藤碱	101.91	110.69	95.53	95.43	110.59	99.29	105.37	97.32	89.67
钩藤碱	104.52	106.39	93.12	93.97	99.18	95.69	98.66	93.61	89.80
异钩藤碱	103.29	111.79	99.13	98.93	110.14	102.35	105.63	96.19	92.05
去氢毛钩藤碱	107.02	113.48	96.43	102.44	105.68	106.15	106.88	109.00	106.45
缝籽嗪甲醚	101.00	112.00	89.91	109.23	106.92	113.76	110.06	106.83	106.78
毛钩藤碱	105.22	111.58	97.83	107.53	118.85	106.64	104.67	111.41	104.30

表 4 生物碱在不同组织中提取回收率

Table 4 Recovery of alkaloids in different tissues

成分	心			脑			肝		
	LQC/%	MQC/%	HQC/%	LQC/%	MQC/%	HQC/%	LQC/%	MQC/%	HQC/%
异去氢钩藤碱	86.36	83.15	89.47	83.35	91.73	99.37	83.43	84.74	83.70
去氢钩藤碱	93.93	83.39	88.05	80.88	90.10	87.02	83.12	82.95	89.20
钩藤碱	88.58	83.27	86.44	81.24	90.39	85.40	83.14	81.24	88.29
异钩藤碱	92.21	85.64	84.76	80.67	91.47	87.47	82.54	81.65	79.42
去氢毛钩藤碱	97.75	91.00	90.04	84.05	96.97	88.76	92.36	93.72	84.16
缝籽嗉甲醚	84.23	97.56	98.40	86.37	97.30	88.74	87.47	92.84	81.90
毛钩藤碱	94.10	89.69	93.98	76.28	95.85	87.26	91.35	91.69	85.22
内标	89.38	82.37	82.99	82.78	92.10	84.79	80.91	89.28	86.32

表 5 日内精密度与准确度

Table 5 Intra-day precision and accuracy

组织	成分	LLOQ			LQC			MQC			HQC		
		实测值/ (ng·mL ⁻¹)	精密度/%	准确度/%	实测值/ (ng·mL ⁻¹)	精密度/%	准确度/%	实测值/ (ng·mL ⁻¹)	精密度/%	准确度/%	实测值/ (ng·mL ⁻¹)	精密度/%	准确度/%
心	异去氢钩藤碱	0.50±0.02	3.41	0.92	1.49±0.03	1.74	-0.62	39.74±0.48	1.20	5.98	980.69±46.41	4.73	-1.93
	去氢钩藤碱	1.09±0.03	2.92	8.83	2.82±0.19	6.77	-7.92	77.55±2.35	3.03	3.41	2 050.74±132.57	6.46	2.54
	钩藤碱	0.52±0.01	2.04	3.58	1.41±0.06	4.03	-7.72	37.34±0.35	0.95	-0.44	1 042.85±32.99	3.16	4.28
	异钩藤碱	1.03±0.04	4.31	3.50	2.87±0.02	0.73	-4.33	73.71±1.29	1.75	-1.72	2 056.86±57.31	2.79	2.84
	去氢毛钩藤碱	0.05±0.00	2.48	1.83	0.14±0.01	9.09	-7.67	3.58±0.12	3.27	-4.65	107.00±2.08	1.94	7.00
	缝籽嗉甲醚	0.05±0.00	4.31	-0.93	0.13±0.01	4.70	-12.07	3.58±0.15	4.15	-4.60	104.17±2.79	2.68	4.17
	毛钩藤碱	0.05±0.00	5.23	0.53	0.14±0.02	10.54	-7.80	3.56±0.09	2.58	-5.12	107.74±2.25	2.09	7.74
脑	异去氢钩藤碱	0.48±0.02	4.53	-3.25	1.45±0.08	5.22	-4.39	40.36±2.98	7.39	7.62	1 064.49±41.88	3.93	6.45
	去氢钩藤碱	1.00±0.02	2.31	-0.49	2.96±0.24	8.14	-0.13	82.53±1.68	2.03	10.03	2 170.42±33.11	1.53	8.52
	钩藤碱	0.48±0.01	2.61	-3.61	1.44±0.03	2.36	-4.19	39.50±2.07	5.24	5.34	1 057.85±41.32	3.91	5.79
	异钩藤碱	1.01±0.03	3.19	1.40	2.93±0.18	6.32	-1.07	79.79±2.16	2.71	6.39	2 174.82±41.40	1.90	8.74
	去氢毛钩藤碱	0.05±0.00	0.91	-0.87	0.15±0.02	11.32	-1.15	3.99±0.41	10.38	6.53	108.14±1.90	1.76	8.14
	缝籽嗉甲醚	0.05±0.00	4.94	5.90	0.15±0.01	7.18	1.11	3.90±0.42	10.91	3.88	108.06±3.48	3.22	8.06
	毛钩藤碱	0.04±0.00	3.88	-10.73	0.13±0.01	4.15	-10.40	3.83±0.45	11.75	2.06	107.18±2.62	2.45	7.18
肝	异去氢钩藤碱	0.50±0.03	6.24	-0.01	1.55±0.06	3.95	1.94	53.56±2.87	5.35	-2.62	1 869.11±89.3	4.78	-6.54
	去氢钩藤碱	1.08±0.04	3.31	8.04	2.96±0.09	2.99	-1.93	109.56±5.11	4.67	-0.40	3 609.18±111.17	3.08	-9.77
	钩藤碱	0.55±0.02	3.18	10.35	1.52±0.02	1.16	1.74	53.22±2.81	5.28	-3.23	1 806.96±61.75	3.42	-9.65
	异钩藤碱	0.87±0.02	2.55	-13.37	2.83±0.10	3.42	-5.56	104.86±4.75	4.53	-4.67	4 059.01±121.85	3.00	1.48
	去氢毛钩藤碱	0.05±0.00	4.67	0.57	0.15±0.01	5.04	-2.61	5.31±0.24	4.50	-3.51	205.84±6.71	3.26	2.92
	缝籽嗉甲醚	0.06±0.00	5.26	11.03	0.15±0.00	2.19	1.39	5.19±0.23	4.38	-5.55	195.28±7.36	3.77	-2.36
	毛钩藤碱	0.06±0.00	2.59	10.67	0.15±0.01	4.16	0.63	5.13±0.20	3.95	-6.70	198.26±8.08	4.08	-0.87

3.1.5 稳定性 选取心、脑、肝 3 个组织对钩藤 7 个生物碱的稳定性进行考察,结果如表 7~10 所示,表明生物碱在不同储存条件下[室温 4 h 稳定性、自动进样器 24 h (4 °C) 稳定性、冻融 3 个循环稳定性 (-20 °C) 和短期稳定性 (-20 °C 放置 7 d)]较为稳定,均在±15%以内。

3.2 检测结果

基于构建的定量方法对钩藤给药后不同时间点大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑组织中 7 个生物碱进行了定量分析,结果如图 2 所示。

文献报道钩藤中的主要成分为钩藤碱、异钩藤

碱、去氢钩藤碱和去氢钩藤碱。药动学报道表明,大鼠 ig 钩藤后血浆中异钩藤碱含量最高,异钩藤碱与钩藤碱之间存在显著差异^[14-15]。组织分布结果与文献报道数据相对应,可以观察到在各个组织中均为异钩藤碱含量最高,其次为去氢钩藤碱;异钩藤碱与去氢钩藤碱均远高于其对应的异构体钩藤碱与异去氢钩藤碱;3 个四环单萜吡啶生物碱(去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱、缝籽嗉甲醚)在各组织中均含量最低。比较不同组织中生物碱成分含量可以发现,7 个生物碱均在肝脏中含量最高,其次为肾脏与肺部,而相比较,脑中各生物碱的含量均比较低,推

表 6 日间精密度与准确度
Table 6 Inter-day precision and accuracy

组织	成分	LLOQ			LQC			MQC			HQC		
		实测值/ (ng·mL ⁻¹)	精密度/%	准确度/%	实测值/ (ng·mL ⁻¹)	精密度/ %	准确度/ %	实测值/ (ng·mL ⁻¹)	精密度/ %	准确度/ %	实测值/(ng·mL ⁻¹)	精密度/ %	准确度/ %
心	异去氢钩藤碱	0.52±0.03	5.57	3.68	1.50±0.03	1.78	0.18	39.28±1.19	3.04	4.75	1 008.07±41.62	4.13	0.81
	去氢钩藤碱	1.04±0.05	4.45	4.23	2.78±0.12	4.14	-7.20	77.55±1.84	2.37	3.41	2 104.02±90.9	4.32	5.20
	钩藤碱	0.51±0.02	3.20	2.08	1.41±0.04	3.05	-6.09	37.86±0.83	2.20	0.95	1 037.75±23.11	2.23	3.78
	异钩藤碱	1.00±0.04	4.01	-0.02	2.83±0.08	2.71	-5.55	74.74±2.05	2.74	-0.35	2 074.07±56.8	2.74	3.70
	去氢毛钩藤碱	0.05±0.00	6.29	-1.69	0.14±0.01	6.51	-4.94	3.66±0.14	3.91	-2.40	107.75±3.02	2.80	7.75
	缝籽嗉甲醚	0.05±0.00	5.22	-1.36	0.14±0.01	6.27	-6.33	3.52±0.11	3.13	-6.07	106.03±2.73	2.57	6.03
	毛钩藤碱	0.05±0.00	4.58	0.13	0.14±0.01	6.34	-4.01	3.65±0.15	4.13	-2.57	108.35±2.40	2.21	8.35
脑	异去氢钩藤碱	0.51±0.03	5.71	1.64	1.54±0.10	6.45	3.00	39.93±2.06	5.17	6.48	1 080.18±28.69	2.66	8.02
	去氢钩藤碱	1.01±0.03	2.70	0.72	2.99±0.16	5.27	-0.27	82.71±1.67	2.02	10.28	2 152.59±84.27	3.91	7.63
	钩藤碱	0.50±0.02	3.21	-0.67	1.50±0.05	3.39	0.18	39.68±2.02	5.09	5.81	1 059.46±48.64	4.59	5.95
	异钩藤碱	1.01±0.02	2.45	1.49	3.00±0.14	4.55	-0.08	80.38±2.99	3.72	7.17	2 112.42±71.47	3.38	5.62
	去氢毛钩藤碱	0.05±0.00	6.31	-1.44	0.15±0.01	7.69	-0.96	3.93±0.28	7.19	4.92	107.94±3.60	3.33	7.94
	缝籽嗉甲醚	0.05±0.00	7.21	1.42	0.14±0.01	7.84	-5.13	3.78±0.28	7.50	0.77	107.21±3.39	3.17	7.21
	毛钩藤碱	0.05±0.00	6.82	-5.48	0.14±0.01	7.57	-5.11	3.84±0.31	8.17	2.27	107.12±4.10	3.82	7.12
肝	异去氢钩藤碱	0.52±0.04	7.63	4.55	1.53±0.05	3.05	1.97	55.86±3.35	5.99	1.56	1 836.61±117.05	6.37	-8.17
	去氢钩藤碱	1.05±0.08	7.62	5.24	3.00±0.10	3.47	-0.03	110.84±4.13	3.73	0.77	3 783.60±404.06	10.68	-5.41
	钩藤碱	0.53±0.03	6.26	5.20	1.42±0.08	5.30	-5.12	54.25±2.20	4.05	-1.36	1 809.92±68.08	3.76	-9.50
	异钩藤碱	0.98±0.09	9.11	-2.06	2.95±0.13	4.57	-1.56	106.08±3.96	3.74	-3.56	3 963.55±213.64	5.39	-0.91
	去氢毛钩藤碱	0.05±0.00	9.06	1.41	0.15±0.01	6.20	0.70	5.72±0.39	6.83	3.97	209.41±14.58	6.96	4.71
	缝籽嗉甲醚	0.05±0.00	6.13	5.37	0.16±0.01	5.37	4.56	5.50±0.35	6.43	0.03	201.12±17.07	8.49	0.56
	毛钩藤碱	0.05±0.00	8.68	2.04	0.15±0.02	9.86	1.53	5.57±0.45	8.09	1.34	205.65±19.31	9.39	2.83

表 7 短期稳定性 (室温放置 4 h)
Table 7 Stability within 4 h in room temperature

组织	成分	LQC		MQC		HQC	
		精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%
心	异去氢钩藤碱	5.26	-0.20	1.71	0.74	0.98	-10.40
	去氢钩藤碱	3.76	0.26	0.40	6.03	1.24	4.51
	钩藤碱	2.11	1.67	1.59	7.36	1.33	4.72
	异钩藤碱	2.16	5.06	3.69	7.55	2.31	5.49
	去氢毛钩藤碱	4.56	2.17	2.55	6.00	0.37	8.17
	缝籽嗉甲醚	5.00	-7.33	2.29	0.66	1.38	8.32
	毛钩藤碱	7.69	2.39	3.13	11.37	2.04	8.15
脑	异去氢钩藤碱	2.15	7.56	2.59	7.44	1.35	9.83
	去氢钩藤碱	1.91	-1.08	1.62	8.06	2.15	6.65
	钩藤碱	4.49	0.63	1.65	11.25	1.06	11.05
	异钩藤碱	2.17	3.75	2.91	11.35	2.64	9.25
	去氢毛钩藤碱	6.61	-6.28	9.10	-2.69	5.28	7.95
	缝籽嗉甲醚	3.34	-11.56	9.93	-5.04	3.41	6.23
	毛钩藤碱	4.19	-12.80	5.37	-9.14	4.86	6.25
肝	异去氢钩藤碱	5.60	-5.92	5.07	-6.43	5.38	-9.20
	去氢钩藤碱	4.22	-3.51	3.39	0.17	6.38	-10.63
	钩藤碱	2.46	-7.65	2.98	-3.02	7.46	-10.15
	异钩藤碱	5.00	-6.23	3.12	-2.96	8.83	-1.61
	去氢毛钩藤碱	2.28	-12.69	4.83	-9.57	8.48	-6.86
	缝籽嗉甲醚	3.01	-8.79	3.22	-10.57	3.17	-12.37
	毛钩藤碱	6.23	5.52	3.63	-9.79	5.29	-9.64

表 8 进样器稳定性 (4 ℃放置 24 h)

Table 8 Stability within 24 h in autosampler at 4 ℃

组织	成分	LQC		MQC		HQC	
		精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%
心	异去氢钩藤碱	7.70	-5.39	0.79	2.20	6.53	-7.37
	去氢钩藤碱	2.32	-5.32	1.72	3.80	2.44	4.29
	钩藤碱	0.99	-3.35	1.70	4.38	2.82	7.04
	异钩藤碱	0.74	-1.92	1.58	-0.31	3.34	5.69
	去氢毛钩藤碱	2.45	5.79	6.43	7.88	1.55	6.24
	缝籽嗉甲醚	4.92	-4.49	1.94	2.61	2.33	4.86
	毛钩藤碱	3.33	5.80	2.89	6.14	0.97	8.10
脑	异去氢钩藤碱	2.17	-0.90	3.06	2.61	1.85	11.16
	去氢钩藤碱	2.13	0.02	2.59	8.63	2.14	10.90
	钩藤碱	1.14	5.68	2.57	11.26	1.21	9.96
	异钩藤碱	2.18	-0.84	2.65	4.23	2.58	8.57
	去氢毛钩藤碱	9.71	-3.52	5.62	-0.44	1.75	9.05
	缝籽嗉甲醚	3.28	-6.52	4.76	-0.58	2.50	6.74
	毛钩藤碱	6.34	-2.36	5.64	0.22	2.99	10.65
肝	异去氢钩藤碱	2.70	-1.48	3.48	-2.59	3.11	-3.59
	去氢钩藤碱	1.68	-1.58	2.99	1.66	4.42	-9.20
	钩藤碱	3.63	-3.58	3.44	0.16	4.78	-6.82
	异钩藤碱	2.33	-7.68	3.19	-4.91	5.94	-3.01
	去氢毛钩藤碱	5.30	2.49	5.31	-4.72	10.08	-0.55
	缝籽嗉甲醚	3.56	6.05	5.04	-0.48	11.51	-5.61
	毛钩藤碱	3.93	5.55	3.00	-3.77	9.83	-3.43

表 9 冻融 3 个循环稳定性

Table 9 Stability in frozen-thawed cycle for three times

组织	成分	LQC		MQC		HQC	
		精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%
心	异去氢钩藤碱	2.34	5.09	1.15	10.99	0.78	9.79
	去氢钩藤碱	3.89	1.77	1.56	7.45	1.08	10.24
	钩藤碱	1.77	0.73	1.11	6.89	0.44	3.22
	异钩藤碱	1.59	-2.77	2.53	7.78	1.10	6.92
	去氢毛钩藤碱	4.16	-9.29	0.63	-8.12	0.98	8.90
	缝籽嗉甲醚	3.89	-5.33	1.33	-10.26	2.60	9.52
	毛钩藤碱	5.21	-4.21	0.87	-9.73	1.25	8.87
脑	异去氢钩藤碱	4.19	8.39	2.39	9.34	3.59	7.06
	去氢钩藤碱	3.89	1.93	3.09	6.91	4.60	3.35
	钩藤碱	2.73	0.64	2.45	0.79	2.69	-2.17
	异钩藤碱	3.05	8.83	4.04	9.69	3.54	4.78
	去氢毛钩藤碱	3.59	10.25	2.28	9.44	2.65	8.28
	缝籽嗉甲醚	3.25	7.73	3.82	6.18	1.78	8.18
	毛钩藤碱	3.35	8.31	2.57	6.06	1.04	10.17
肝	异去氢钩藤碱	3.82	4.54	4.74	1.37	7.87	-8.51
	去氢钩藤碱	2.52	3.09	0.52	8.73	7.63	-1.09
	钩藤碱	2.04	0.82	2.13	4.45	7.85	-4.11
	异钩藤碱	3.36	9.35	1.10	3.31	11.30	4.54
	去氢毛钩藤碱	2.76	6.47	2.34	7.37	11.12	1.54
	缝籽嗉甲醚	5.15	7.35	3.01	5.45	5.84	-9.28
	毛钩藤碱	2.98	7.59	1.62	9.15	10.92	-2.35

表 10 长期稳定性 (-20°C 放置 7 d)
Table 10 Short-term stability at -20°C for 7 d

组织	成分	LQC		MQC		HQC	
		精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%
心	异去氢钩藤碱	2.34	5.09	1.15	10.99	0.78	9.79
	去氢钩藤碱	3.89	1.77	1.56	7.45	1.08	10.24
	钩藤碱	1.63	0.66	1.58	7.23	0.44	3.22
	异钩藤碱	2.58	-1.08	2.53	7.78	1.10	6.92
	去氢毛钩藤碱	4.16	-9.29	0.95	-8.28	1.03	8.94
	缝籽嗉甲醚	3.89	-5.33	1.33	-10.26	2.60	9.52
	毛钩藤碱	5.21	-4.21	0.98	-9.78	1.25	8.87
脑	异去氢钩藤碱	1.50	5.06	2.72	4.66	1.36	8.12
	去氢钩藤碱	3.03	6.07	1.86	4.89	1.32	5.51
	钩藤碱	0.29	-1.52	2.30	-2.94	1.31	-2.75
	异钩藤碱	2.18	9.08	1.68	7.36	2.27	5.46
	去氢毛钩藤碱	1.71	9.63	1.59	8.08	1.72	8.90
	缝籽嗉甲醚	3.14	7.79	5.49	8.93	3.18	7.38
	毛钩藤碱	2.30	10.68	2.14	6.26	1.88	12.47
肝	异去氢钩藤碱	9.57	12.49	2.83	2.84	2.96	1.48
	去氢钩藤碱	4.13	4.38	7.88	-5.47	7.26	-5.27
	钩藤碱	3.34	3.28	2.37	3.46	4.83	-4.13
	异钩藤碱	2.11	10.87	0.90	2.47	5.41	1.91
	去氢毛钩藤碱	5.57	3.95	1.30	8.83	4.31	8.62
	缝籽嗉甲醚	3.72	8.31	5.62	3.15	6.13	0.59
	毛钩藤碱	2.86	3.48	1.00	12.14	4.46	9.46

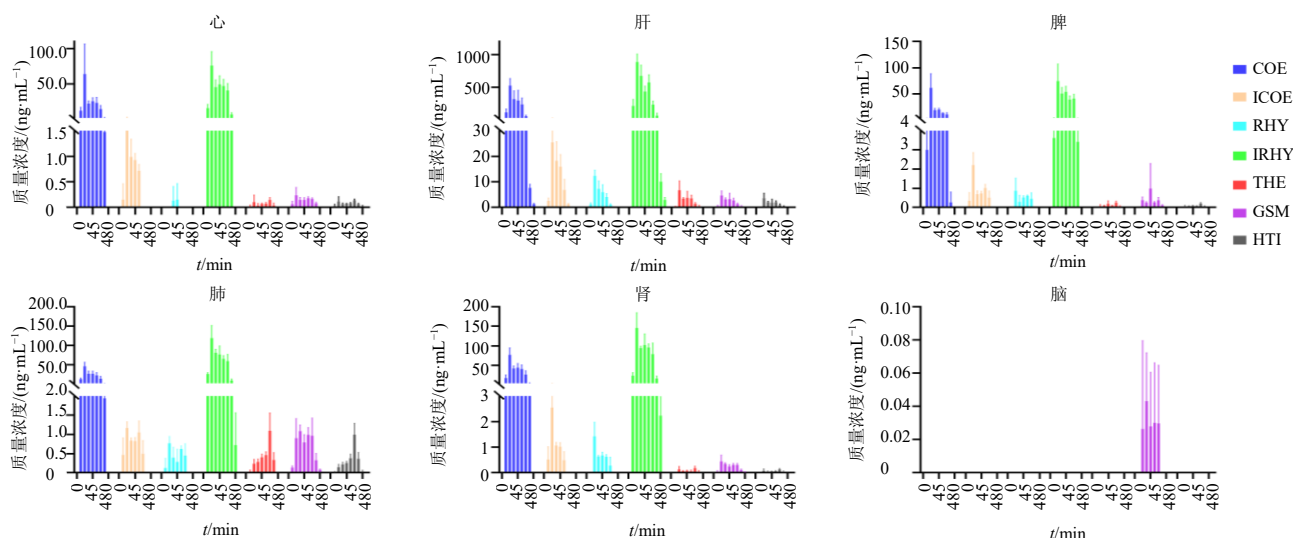


图 2 6 个组织中不同生物碱含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Concentration of alkaloids in six tissues ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

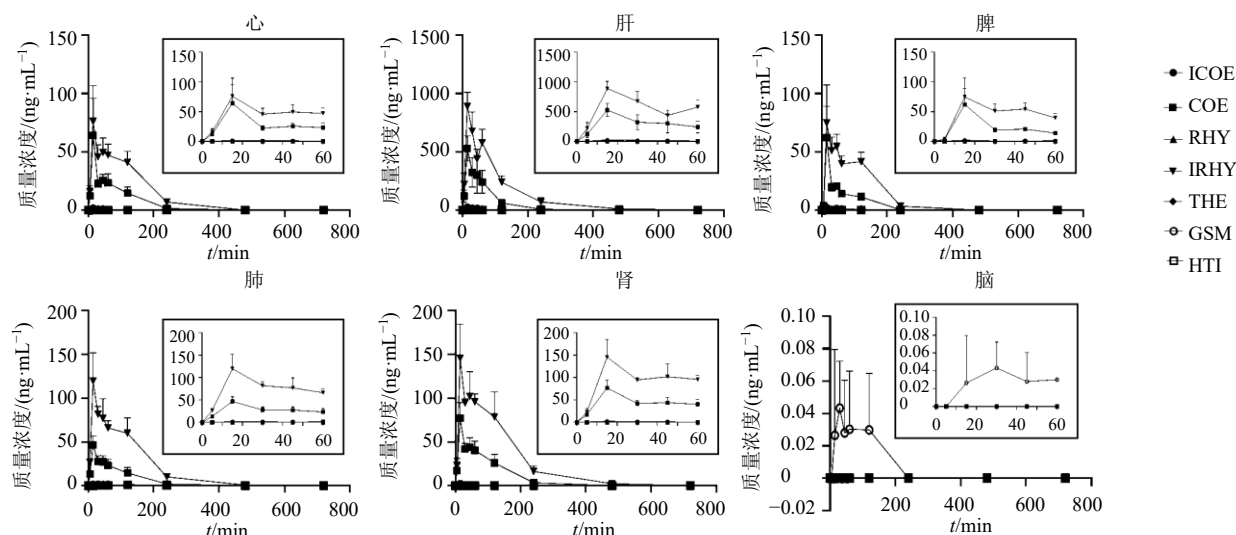
测是血脑屏障限制了生物碱进入脑部，但是缝籽嗉甲醚在脑部的含量比其他成分高，可能是其发挥神经系统作用的基础。

各组织中生物碱浓度随时间变化轮廓（图 3）与药动力学相关研究的结果相似，ig 钩藤水煎液冻干粉 15 min 左右各组织即达到最高浓度（ $C_{\max}$ ），说明生物碱的吸收速率快，并能够迅速达到各个组织。肝脏中部分生物碱在给药 1 h 时含量出现双峰现象，

与肝脏比较，在心、脾、肺、肾中，部分生物碱成分（异钩藤碱）浓度降低的速度较慢，两者可能存在潜在的因果关系。在给药 12 h 大多组织中的生物碱含量低于 LLOQ，说明钩藤生物碱在体内能够被迅速代谢。

4 讨论

本研究建立了同时对钩藤中 7 个主要吲哚生物碱的 LC-MS/MS 定量方法，采用具有较高的选择性

图 3 6 个组织中生物碱浓度随时间变化轮廓 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Concentration-time profile of seven alkaloids in six tissues ($\bar{x} \pm s, n=3$)

与灵敏度的 MRM 模式进行数据采集,并应用于大鼠体内组织分布研究。本研究使用的生物碱对照品溶解在乙腈溶剂中稳定性良好,且长春胺作为常用内标同样具有较好的稳定性^[19-20]。通过对多个组织进行方法学考察更具可靠性,且结果显示该方法下生物碱在各组织中的专属性、基质效应、回收率、精密度与准确度以及稳定性均在可接受范围内,各成分在各组织中线性关系良好,说明该方法准确可靠。大鼠 ig 钩藤提取物后,分析不同时间下的心、肝、脾、肺、肾、脑组织中 7 个生物碱含量变化。从不同时间各组织生物碱含量变化方面分析,发现分布在 6 个组织中的多数生物碱能够在 1 h 内均快速达到最高浓度,表明生物碱能够通过肠道-血液-组织的路径快速转移至各组织内。随后在给药 12 h 后大多数组织中生物碱几乎代谢完全(含量低于 LLOQ),说明钩藤生物碱具有吸收快、代谢快的特点。

从不同组织含量方面分析,生物碱主要在肝脏蓄积,尤其异钩藤碱和去氢钩藤碱含量最高,并在 1 h 内含量持续分布较高,其次分布依次为肺>肾>脾>心>脑。比较不同组织中钩藤生物碱的含量发现,7 个生物碱均在肝脏中表达出最高的浓度含量,其次为肾,此结果与文献报道的结果基本一致^[10],推测是因为肝脏为生物碱的主要代谢部位,肾为排泄部位,在单体注射给药的相关实验中也观察到肺部的蓄积效应,生物碱肺部的蓄积可能会引起不良反应,临床用药时需要重点关注。而在脑中生物碱的含量基本低于 LLOQ,虽然缝籽嗉甲醚在钩藤药

材中含量较少,但是组织分布中仍能看到在脑中的分布,与文献报道缝籽嗉甲醚更容易入脑结果一致^[16],并且 Yang 等^[17]发现缝籽嗉甲醚有较强的乙酰胆碱酯酶抑制活性,说明缝籽嗉甲醚能透过血脑屏障,可能是钩藤发挥神经系统作用的物质基础,这为钩藤生物碱可以对中枢神经、脑缺血保护作用的药理活性提供了一定的体内数据支持,值得进一步研究。钩藤中 7 个主要生物碱的定量方法开发和组织分布研究,对钩藤生物碱靶向给药和体内代谢研究具有一定的参考价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 268.
- [2] 于潇,祝琳琳,刘婕,等. 钩藤中单萜吡啶类生物碱成分及其药理活性的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 6052-6065.
- [3] 辛文波,俞桂新,王峥涛. 钩藤生物碱类成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 204-207.
- [4] Guo H P, Zhang X, Cui Y Q, et al. Isorhynchophylline protects against pulmonary arterial hypertension and suppresses PASMCs proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 729-734.
- [5] 何飞,苏华,韦桂宁,等. 钩藤属部分不同种植物药材对正常大鼠血压的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 270-275.
- [6] Yuan D, Ma B, Yang J Y, et al. Anti-inflammatory effects of rhynchophylline and isorhynchophylline in mouse N9 microglial cells and the molecular mechanism [J]. *Int*

- Immunopharmacol*, 2009, 9(13/14): 1549-1554.
- [7] Shi J S, Yu J X, Chen X P, *et al*. Pharmacological actions of *Uncaria* alkaloids, rhynchophylline and isorhynchophylline [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(2): 97-101.
- [8] 王英锋, 魏璐雪, 王保中. 钩藤生物碱实验动物体内药物分析 [J]. 药物分析杂志, 1999, 19(1): 58-60.
- [9] 胡岚岚. 生物样本中钩藤碱的浓度测定及其动物体内药代动力学和组织分布研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.
- [10] Hu L L, Tang J L, Zhou S W. Quantification of rhynchophylline in rabbit plasma by UPLC-MS/MS and its application in a pharmacokinetic study [J]. *J Chin Pharma Sci*, 2015, 24(6): 393-399.
- [11] Wang W, Ma C M, Hattori M. Metabolism and pharmacokinetics of rhynchophylline in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(4): 669-676.
- [12] Wu Y T, Lin L C, Tsai T H. Determination of rhynchophylline and hirsutine in rat plasma by UPLC-MS/MS after oral administration of *Uncaria rhynchophylla* extract [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(3): 439-445.
- [13] Yu Y, Yao C L, Guo D A. Insight into chemical basis of traditional Chinese medicine based on the state-of-the-art techniques of liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1469-1492.
- [14] 王建伟. 中药钩藤吲哚生物碱体内代谢研究 [D]. 南京: 中国药科大学, 2017.
- [15] Wang X, Zheng M, Liu J, *et al*. Stereoselective pharmacokinetic study of rhynchophylline and isorhynchophylline epimers in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Xenobiotica*, 2017, 47(6): 479-487.
- [16] Kushida H, Fukutake M, Tabuchi M, *et al*. Simultaneous quantitative analyses of indole and oxindole alkaloids of *Uncaria* Hook in rat plasma and brain after oral administration of the traditional Japanese medicine Yokukansan using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(12): 1647-1656.
- [17] Yang Z D, Duan D Z, Du J, *et al*. Geissoschizine methyl ether, a corynanthean-type indole alkaloid from *Uncaria rhynchophylla* as a potential acetylcholinesterase inhibitor [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(1): 22-28.
- [18] U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [EB/OL]. [2018-05-24]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory>.
- [19] 梁颖欣, 朱旦, 黄舒婷, 等. 一测多评法测定钩藤中 7 种生物碱类成分的含量 [J]. 中药材, 2019, 42(8): 1820-1823.
- [20] 潘惠勤. 基于液相-高分辨质谱的多基原钩藤生物碱系统表征研究 [D]. 上海: 中国科学院大学 (中国科学院上海药物研究所), 2018.

[责任编辑 李亚楠]