

· 资源与质量评价 ·

## UPLC-QqQ-MS/MS 同时测定槟榔方中 4 个生物碱成分

江斯炜<sup>1</sup>, 郑作亮<sup>1</sup>, 徐方方<sup>1</sup>, 陈伟英<sup>1</sup>, 汤丽鹏<sup>1</sup>, 陈志强<sup>1</sup>, 刘博<sup>1,2\*</sup>, 黎奔<sup>1,2\*</sup>

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006;

2. 广州中医药大学广东省中医证候临床研究重点实验室, 广州 510006)

**[摘要]** **目的:** 建立超高效液相色谱-三重四极杆质谱法(UPLC-QqQ-MS/MS)同时测定槟榔方中槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔多定、波尔多定的含量, 比较槟榔、乌药单煎液与槟榔方合煎液中 4 种生物碱成分的含量变化, 为槟榔方制剂研究提供实验基础。**方法:** 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱, 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C; 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式扫描, 多反应监测(MRM)模式检测; 各化合物的定量离子对分别为 *m/z* 142.10/44.11(槟榔次碱), 156.20/44.07(槟榔碱), 314.29/265.12(去甲异波尔多定), 328.13/265.10(波尔多定)。**结果:** 槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔多定、波尔多定分别在 0.479 0 ~ 57.48, 0.976 0 ~ 78.08, 0.812 0 ~ 64.96, 0.091 2 ~ 18.24 μg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好( $r \geq 0.9948$ ), 平均加样回收率为 93.73% ~ 104.34%, RSD 均 < 5% ( $n = 6$ )。槟榔方中槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔多定、波尔多定的质量分数分别为(90.07 ± 1.26), (445.27 ± 12.39), (742.35 ± 38.39), (38.50 ± 3.33) μg·g<sup>-1</sup>, 均显著低于单煎液中的含量。**结论:** 该方法快速、灵敏、准确、重复性好, 可用于槟榔方中生物碱成分的含量测定, 为槟榔方的质量控制及深入研究提供参考依据; 槟榔方配伍对槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔多定、波尔多定的溶出量具有显著影响。

**[关键词]** 槟榔方; 生物碱; 超高效液相色谱-串联质谱法; 槟榔次碱; 槟榔碱; 去甲异波尔多定; 波尔多定

**[中图分类号]** R284.2; R285; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0152-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191718

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190517.1647.002.html>

**[网络出版时间]** 2019-05-21 8:51

### Simultaneous Determination of Four Alkaloid Components in Xiangbin Decoction by UPLC-QqQ-MS/MS

JIANG Si-wei<sup>1</sup>, ZHENG Zuo-liang<sup>1</sup>, XU Fang-fang<sup>1</sup>, CHEN Wei-ying<sup>1</sup>, TANG Li-peng<sup>1</sup>,

CHEN Zhi-qiang<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1,2\*</sup>, LI Ben<sup>1,2\*</sup>

(1. The Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome,

Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a quantitative method for the simultaneous determination of arecaine, arecoline, norisoboldine and boldine in Xiangbin decoction by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS), and compare the variation of their contents between single and mixed

**[收稿日期]** 20190327(001)

**[基金项目]** 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1707900); 国家自然科学基金项目(81202398, 81703379, 81602748); 国家中医药管理局临床基地科研专项(JDZX2015207); 广东省中医药局中医药传承发展专项(20181121, 20191137, 20191142); 广东省中医院中医药科学技术研究专项(YN2015MS03, YN2016YX03, YN2016QJ05, YN2016QJ08); 国家一流学科建设重点项目(A1-AFD018181A34)

**[第一作者]** 江斯炜, 在读硕士, 从事中药分析与质量标准研究, E-mail: see\_why@126.com

**[通信作者]** \* 刘博, 研究员, 博士生导师, 从事中药活性物质化学研究与结构优化研究, Tel: 020-39318571, E-mail: doctliu@263.net;

\* 黎奔, 主任药师, 硕士生导师, 从事临床药学研究, Tel: 020-39318571, E-mail: lcyxlb@126.com

decoctions. **Method:** The separation was carried on a Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) column, with 0.1% formic acid solution-acetonitrile as mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, and the column temperature was 30 °C. The quantitative MRM transitions of the four components were *m/z* 142.10/44.11 for arecaine, *m/z* 156.20/44.07 for arecoline, *m/z* 314.29/265.12 for norisoboldine and *m/z* 328.13/265.10 for boldine. The determination was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode by mass spectrometry with electrospray ionization (ESI) source under positive mode.

**Result:** The linear ranges of arecaine, arecoline, norisoboldine and boldine were 0.479-0.57.48, 0.976-0.78.08, 0.812-0.64.96, 0.0912-18.24 μg·L<sup>-1</sup>, respectively. The average recoveries of the above compounds ranged from 93.73% to 104.34%, with RSD (*n* = 6) of less than 5%. The contents of arecoline, arecoline, noribeldine and boltinine in Xiangbin decoction were (90.07 ± 1.26), (445.27 ± 12.39), (742.35 ± 38.39), (38.50 ± 3.33) μg·g<sup>-1</sup>, which were significantly lower than the contents in *Linderae Radix* and *Arecae Semen*.

**Conclusion:** The method is rapid, sensitive, accurate and reproducible, and suitable for the simultaneous determination of multiple components in Xiangbin decoction, so as to provide a basis for the quality control of Xiangbin decoction. The compatibility of Xiangbin decoction has a significant effect on the dissolution contents of arecaine, arecoline, norisoboldine and boldine.

[ **Key words** ] Xiangbin decoction; alkaloid; UPLC-QqQ-MS/MS; arecaine; arecoline; horisoboldine; boldine

香槟方是由广东省中医院围手术期团队根据多年临床经验创制的方药,方中包含砂仁、乌药、人参片、桃仁、槟榔 5 味中药,可通过促进胃肠道协调有序的运动<sup>[1]</sup>及调节体内胃动素、生长激素释放肽 Ghrelin 等脑-肠肽水平<sup>[2-3]</sup>有效改善腹部手术后患者胃肠功能紊乱的症状,促进患者的快速康复<sup>[4-5]</sup>。

课题组前期对香槟方的化学成分、提取工艺、药理药效及临床应用进行了较深入的研究<sup>[1-2,6]</sup>,结果提示生物碱可能为香槟方促胃肠动力的主要物质基础,其中主要包括槟榔碱和槟榔次碱等吡啶类生物碱及去甲异波尔定和波尔定碱等异喹啉类生物碱。然而,目前关于香槟方质量标准的研究仍较少<sup>[7]</sup>。因此,本文旨在对香槟方中 4 种主要的生物碱类活性成分槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定和波尔定碱建立快速有效的含量测定方法,为其质量控制提供参考依据。目前,文献报道槟榔及乌药生物碱类成分的测定多采用紫外-可见分光光度法(UV-Vis)<sup>[8-9]</sup>,毛细管电泳法<sup>[10]</sup>,pH 区带逆流色谱法(PZRCCC)<sup>[11]</sup>及高效(超高效)液相色谱-二极管阵列检测法[H(U)PLC-DAD]<sup>[12-15]</sup>等。其中,UV-Vis 应用于总生物碱的测定,不能获知某单一成分的确切含量;毛细管电泳法分析所需样品量少,但重复性较差;PZRCCC 法可对生物碱实现富集、分离及纯化,但该技术仍在起步阶段;H(U)PLC-DAD 法灵敏度较高,但分析时间较长、流动相体系较为复杂,且槟榔次碱及槟榔碱的紫外吸收属于末端吸收,在实

际测定中容易受基线漂移的干扰。近年来,因 H(U)PLC-QqQ-MS/MS 具有分析速度快,灵敏度高等优势,且不受检测指标光谱性质的影响,已被逐步应用于槟榔和乌药生物碱成分的含量测定<sup>[16-18]</sup>,但目前未见采用 UPLC-QqQ-MS/MS 法同时测定中药及其制剂中槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定和波尔定碱的报道。因此,本文建立灵敏度高、专属性强、UPLC-QqQ-MS/MS 法同时测定香槟方中槟榔碱、槟榔次碱、去甲异波尔定和波尔定碱 4 种主要有效成分的含量,并与槟榔、乌药单煎液中的含量进行比较,为香槟方及其制剂的质量控制及进一步的药效研究提供一定的依据。

## 1 材料

Xevo TQ-S 型超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪,配有 ACQUITY H-Class 型超高效液相色谱、电喷雾离子源(ESI)和 MassLynx V4.1 软件(美国 Waters 公司);ME235S 型 1/10 万天平(德国 Sartorius 公司);5430R 型高速冷冻离心机,(德国 Eppendorf 公司);MS3 型微量振荡器(德国 IKA 公司);ET58 型全自动电位滴定仪(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

槟榔碱氢溴酸盐和去甲异波尔定对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-18032302, MUST-18032605,纯度分别为 98.5%, 98.63%);槟榔次碱盐酸盐和波尔定碱对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为

W26J9Z6664, P05S7F20532, 纯度均  $\geq 98\%$ )。槟榔 (批号 170303601, 产地海南), 乌药 (批号 180303651, 产地浙江), 砂仁 (批号 160303911, 产地福建), 桃仁 (批号 180507291, 产地四川), 人参片 (批号 180503251, 产地吉林) 饮片均购自广东康美药业股份有限公司, 经广东省中医院陈文良药师鉴定均为正品。甲酸 (天津市科密欧化学试剂有限公司), 甲醇、乙腈 (德国 Merck 公司, 色谱纯); 超纯水由 Milli-Q 系统 (美国 Millipore 公司) 制备。

## 2 方法与结果

### 2.1 分析条件

**2.1.1 色谱条件** Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 色谱柱 (2.1 mm  $\times$  150 mm, 1.7  $\mu$ m); 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 5% B; 1 ~ 3.5 min, 5% ~ 70% B; 3.5 ~ 4.5 min, 70% ~ 95% B; 4.5 ~ 6.5 min, 95% ~ 5% B; 6.5 ~ 8 min, 5% B); 流速 0.2 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 柱温 30  $^{\circ}$ C; 进样量 2  $\mu$ L。

**2.1.2 质谱条件** 电喷雾离子源 (ESI), 检测方式正离子多反应离子监测模式 (MRM); 毛细管电压 2.2 kV; 脱溶剂气温度 600  $^{\circ}$ C; 脱溶剂气流量 700 L  $\cdot$  h<sup>-1</sup>; 雾化器压力 620 kPa; 锥孔气流量 150 L  $\cdot$  h<sup>-1</sup>。通过手动优化对各成分的锥孔电压及碰撞能进行优化, 选择各化合物的定量离子对分别为  $m/z$  142.10/44.11 (槟榔次碱),  $m/z$  156.20/44.07 (槟榔碱),  $m/z$  314.29/265.12 (去甲异波尔定),  $m/z$  328.13/265.10 (波尔定碱)。优化后的质谱参数见表 1。各成分的二级质谱扫描图见图 1。

表 1 槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定、波尔定碱的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters for arecaine, arecoline, norisoboldine and boldine

成分	母离子	子离子	锥孔电压/V	碰撞能/V
槟榔次碱	142.10	44.11	32	14
	142.10	81.06	32	15
槟榔碱	156.20	44.07	32	12
	156.20	81.06	32	16
去甲异波尔定	314.29	265.12	34	16
	314.29	237.10	34	24
波尔定碱	328.13	265.10	30	18
	328.13	237.07	30	26

**2.2 对照品溶液的制备** 分别取槟榔次碱盐酸盐、槟榔碱氢溴酸盐、去甲异波尔定、波尔定碱对照品适量, 精密称定, 分别置于 10 mL 量瓶中, 以 50% 甲醇

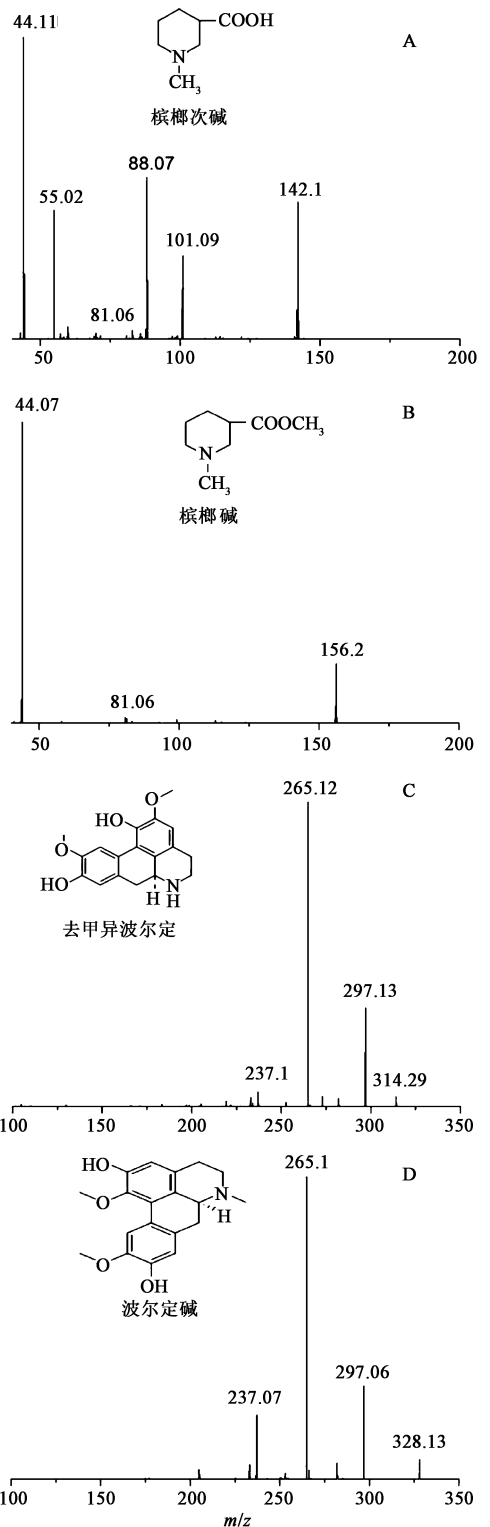


图 1 槟榔次碱 (A), 槟榔碱 (B), 去甲异波尔定 (C), 波尔定碱 (D) 的子离子扫描

Fig. 1 Production mass spectrums of arecaine (A), arecoline (B), norisoboldine (C) and boldine (D)

(含 0.1% 甲酸) 溶解并定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为 0.958 (以槟榔次碱计), 0.976 (以槟榔

碱计), 0.812, 0.912 g·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液(槟榔次碱质量 = 槟榔次碱盐酸盐质量/1.258 3; 槟榔碱质量 = 氢槟榔碱氢溴酸盐质量/1.521 4), 分别精密移取上述各对照品储备溶液适量, 分别依次以 50% 甲醇(含 0.1% 甲酸)稀释成系列浓度的单一对照品溶液, 4 °C 保存, 备用。

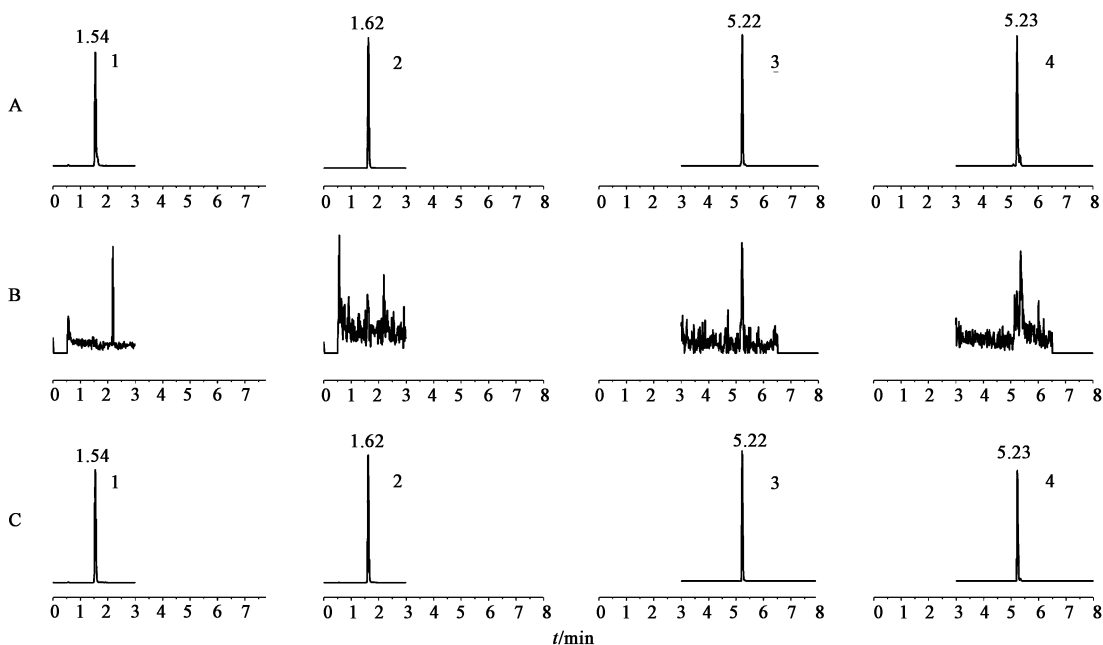
**2.3 供试品溶液的制备** 称取经适当粉碎并过 20 目筛的乌药 1 g, 槟榔 1 g, 桃仁 1 g, 人参 0.9 g, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入纯水 45 mL 浸泡 30 min, 加热回流 30 min 后, 加入砂仁 0.6 g, 继续加热回流 10 min, 过滤, 药渣继续加入纯水 45 mL, 加热回流 40 min, 过滤, 合并滤液, 静置, 待冷却后, 将药液转移置 100 mL 量瓶, 加纯水定容至刻度。取药液 1 mL, 加入甲醇(含 0.1% 甲酸) 1 mL, 涡旋震荡 3 min, 4 °C 静置 30 min 后以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min。取上清液 200 μL, 以 50% 甲醇(含 0.1% 甲

酸)稀释 500 倍, 摇匀, 即得香槟方供试品溶液。样品进样前以 15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

另取乌药 1 g 及槟榔 1 g, 同法分别制得乌药单煎液供试品溶液及槟榔单煎液供试品溶液。

**2.4 阴性对照样品溶液的制备** 称取缺槟榔和缺乌药的香槟方各味药材(桃仁 1 g, 人参 0.9 g, 砂仁 0.6 g), 按照 2.3 项下方法制得缺槟榔和缺乌药的阴性对照样品溶液。

**2.5 专属性考察** 分别取 2.2, 2.3, 2.4 项下制备的混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照样品溶液, 按 2.1 项下的分析条件进样测定, 槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定及波尔定碱的保留时间分别为 1.54, 1.62, 5.22, 5.23 min; 阴性对照样品在相应的离子对通道未见干扰。4 种成分的离子流图见图 2。



1. 槟榔次碱; 2. 槟榔碱; 3. 去甲异波尔定; 4. 波尔定碱

图 2 香槟方供试品(A), 阴性对照样品(B), 混合对照品(C)溶液的提取离子流色谱

Fig. 2 Ion flow chromatograms of sample(A), negative control(B) and mix standards(C)

**2.6 线性关系、检测限和定量限考察** 分别精密移取等体积 2.2 项下各系列浓度的单一对照品溶液适量, 混合配制成系列浓度的混合对照品溶液, 按 2.1 项下分析质谱条件进样。以待测成分峰面积为纵坐标(Y), 待测成分质量浓度为横坐标(X), 运用加权最小二乘法进行线性回归, 权重为 1/X<sup>2</sup>, 得到 4 种成分相应的标准曲线方程及峰面积与质量浓度间的相关系数; 以信噪比(S/N)为 3

作为检测限(LOD), 信噪比为 10 作为定量限(LOQ), 结果见表 2。

**2.7 精密度试验** 配制槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定及波尔定碱的质量浓度分别为 3.832, 39.04, 32.48, 3.648 μg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液, 按条件连续进样 6 次, 计算各成分峰面积 RSD。结果槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定及波尔定碱峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 1.0%, 0.9%, 0.7%, 表明仪

表 2 4 种生物碱成分的回归方程、线性范围、检测限和定量限

Table 2 Standard curve, liner range, limit of detector and limit of quantity for 4 alkaloids in Xiangbin decoction

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
槟榔次碱	$Y = 20\ 737.30X + 1\ 495.99$	0.999 6	0.479 0 ~ 57.48	0.048 8	0.096 0
槟榔碱	$Y = 41\ 875.80X + 7\ 328.86$	0.998 2	0.976 0 ~ 78.08	0.047 9	0.098 0
去甲异波尔定	$Y = 37\ 918.00X + 9\ 475.62$	0.994 8	0.812 0 ~ 64.96	0.040 6	0.081 2
波尔定碱	$Y = 91\ 950.00X + 749.091$	0.998 8	0.091 2 ~ 18.24	0.018 2	0.091 2

器精密度良好。

**2.8 重复性考察** 取同一香槟方供试品溶液 6 份,按 2.1 项下分析条件进样,测定各成分含量并计算 RSD。结果显示槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定及波尔定碱的平均质量分数分别为 95.82, 457.83, 826.81 和 38.81  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD ( $n = 6$ ) 分别为 4.3%, 2.7%, 2.0% 和 4.4%, 表明方法重复性良好。

**2.9 稳定性试验** 取同一香槟方供试品溶液于室温下放置,按 2.1 项下分析条件分别于 0, 2, 6, 8, 12, 24 h 进样,计算各成分峰面积 RSD。结果显示供试品溶液于室温条件下放置 24 h, 槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定及波尔定碱峰面积 RSD 分别

为 2.4%, 1.8%, 2.8%, 2.6%, 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

**2.10 加样回收率试验**<sup>[19-20]</sup> 取已知含量同一批次的香槟方各味药材(乌药 0.5 g, 槟榔 0.5 g, 桃仁 0.5 g, 人参片 0.45 g, 砂仁 0.3 g) 6 份, 精密称定, 加入一定量各对照品溶液, 按 2.3 项下方法制得香槟方提取液, 按 2.1 项下分析条件进样, 计算各成分回收率及其 RSD。结果槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定及波尔定碱的平均加样回收率分别为 104.96%, 93.72%, 97.93%, 100.65%, RSD 分别为 4.0%, 2.8%, 1.4%, 3.7%, 表明该方法准确度良好。结果见表 3。

表 3 香槟方中 4 种生物碱成分加样回收率试验

Table 3 Recovery test of 4 alkaloids in Xiangbin decoction

成分	称样量/g	样品中量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
槟榔次碱	2.316 2	221.94	191.6	430	108.59	104.96	4.0
	2.302 1	220.59		420	104.08		
	2.309 0	221.25		430	108.95		
	2.299 5	220.34		410	98.99		
	2.353 4	225.50		420	101.51		
	2.314 6	221.78		428	107.63		
槟榔碱	2.316 2	1 060.43	1 121.5	2 103	92.96	93.72	2.8
	2.302 1	1 053.97		2 080	91.49		
	2.309 0	1 057.13		2 135	96.11		
	2.299 5	1 052.78		2 070	90.70		
	2.353 4	1 077.46		2 130	93.85		
	2.314 6	1 059.69		2 150	97.22		
去甲异波尔定	2.316 2	1 915.06	1 624.0	3 508	98.09	97.93	1.4
	2.302 1	1 903.40		3 478	96.96		
	2.309 0	1 909.10		3 485	97.04		
	2.299 5	1 901.25		3 483	97.40		
	2.353 4	1 945.81		3 577	100.44		
	2.314 6	1 913.73		3 500	97.68		
波尔定碱	2.316 2	89.89	91.2	180	98.80	100.65	3.7
	2.302 1	89.34		180	99.41		
	2.309 0	89.61		180	99.11		
	2.299 5	89.24		180	99.52		
	2.353 4	91.34		190	108.18		
	2.314 6	89.83		180	98.87		

**2.11 样品测定** 取香槟方各处方饮片,按 2.3 项下方法制备 3 批次香槟方供试品溶液(20181116, 20181117, 20181122), 乌药单味药提取液(w-20181201, w-20181202, w-20181205), 槟榔单味药提取液(b-20181206, b-20181209, b-20181210), 按上述液相-质谱条件进样分析,记录各成分的含量。采用 SPSS 20.0 软件对香槟方及乌药、槟榔单煎液中 4 种生物碱成分的含量进行统计分析。采用 Kolmogorov-Smirnov 检验和 Levene 检验对各计量资料分别进行正态性检验及方差齐性检验,并采用两独立样本 *t* 检验对香槟方合煎液与单煎液中的各生物碱含量进行比较分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。结果见表 4, 5。

表 4 香槟方及单煎液中 4 种生物碱成分的质量分数测定  
Table 4 Contents of 4 alkaloids in Xiangbin decoction, Linderæ Radix and Arecae Semen

组别	批次	μg·g <sup>-1</sup>			
		槟榔次碱	槟榔碱	去甲异波尔定	波尔定碱
香槟方	20181116	89.34	431.47	701.68	34.87
	20181117	91.52	455.44	747.44	41.40
	20181122	89.34	448.90	777.95	39.22
乌药单煎液	w-20181201	-	-	4 856.27	240.63
	w-20181202	-	-	4 853.23	244.62
	w-20181205	-	-	4 967.79	251.21
槟榔单煎液	b-20181206	580.63	3 263.00	-	-
	b-20181209	561.47	3 088.01	-	-
	b-20181210	534.04	2 965.47	-	-

表 5 香槟方复方与乌药、槟榔单煎液中 4 种生物碱成分煎出量的比较( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Contents of 4 alkaloids in Xiangbin decoction, Linderæ Radix and Arecae Semen( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	槟榔次碱	槟榔碱	去甲异波尔定	波尔定碱
香槟方	413.33 ± 5.77	2 043.33 ± 56.86	3 406.67 ± 176.16	176.67 ± 15.28
乌药单煎液	-	-	5 037.78 ± 93.61 <sup>2)</sup>	252.78 ± 6.31 <sup>2)</sup>
槟榔单煎液	574.44 ± 20.57 <sup>2)</sup>	3 192.78 ± 130.86 <sup>2)</sup>	-	-

注:与香槟方组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

**3.1 提取方法及样品前处理方法的选择** 香槟方的临床应用形式仍以汤剂为主,因此本实验供试品的制备采用水提法。此外,本实验中通过对药材进行适当粉碎并过筛、煎煮前浸泡 30 min 及复煎等方式保持供试品溶液的均一性并增加有效成分的溶出率,与前期实验结果对比发现<sup>[7]</sup>, 槟榔碱和去甲异波尔定的煎出量有所增加。本实验涉及的 4 种生物碱均为两性生物碱,酸性环境有利于增加其溶解性及稳定性<sup>[21]</sup>,在提取液中加入等量含 0.1% 甲酸的甲醇,既能使待测成分更稳定,又能除去样品中部分大分子杂质,一定程度上实现样品的净化,减少干扰<sup>[22]</sup>。

**3.2 分析条件的选择** 本研究采用 UPLC-QqQ-MS/MS 同时测定 4 种生物碱类化合物,试验发现正离子模式下 4 种成分响应高于负离子,进一步以结构信息和流动相条件为导向,对毛细管电压、锥孔电压、碰撞能等参数进行了优化。此外,本实验考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水溶液、甲醇-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-5 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵缓冲液等流动相体系对各生物碱色谱行为的影响,结果发现,在流动相体系中加入适当浓度的甲酸并采用梯度洗脱方式,能显著改善色谱峰拖尾、裂峰等现象,综合考虑采用

乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相梯度洗脱。

**3.3 定量分析方法的选择** 外标法和内标法都是常用的定量分析方法。目前,采用 UPLC-QqQ-MS/MS 测定槟榔、乌药生物碱的报道仍较少,且多为生物样品的测定。其中,学者多选择 β-蒎烯<sup>[23]</sup>、更昔洛韦<sup>[16]</sup>等作为槟榔生物碱的内标;青藤碱作为乌药生物碱的内标<sup>[17]</sup>。与内标法相比,外标法具有操作简便、不需要寻找合适的内标成分及考察校正因子等优势,在中药及其制剂的定量分析中仍较多使用<sup>[24-25]</sup>。综合考虑仪器稳定性、样品前处理简单等因素,本实验选择外标法作为定量分析方法。

**3.4 样品测定结果分析** 本实验结果表明,香槟方中 4 种生物碱含量高低依次为去甲异波尔定 > 槟榔碱 > 槟榔次碱 > 波尔定碱。其中,砂仁、桃仁、人参等其他药味对乌药及槟榔生物碱类成分的溶出影响较大,复方煎煮液中 4 种生物碱成分的煎出量均不同程度低于乌药及槟榔单煎液中的煎出量,仅为单煎液的 65% ~ 75%,利用 SPSS 软件对复方煎煮液与单煎液中 4 种生物碱的煎出量分别进行两独立样本 *t* 检验,其分析比较结果具有统计学差异。

提取溶媒的 pH 是影响生物碱提取率的关键因素之一。相关文献报道<sup>[26]</sup>,异喹啉类生物碱在酸性介质中的溶出度较纯水中高,且随着溶媒 pH 降低,

生物碱的溶出量逐渐增加。此外,槟榔生物碱在 pH 较低的酸性介质中的提取率及稳定性较高<sup>[27]</sup>。笔者测定各供试品溶液 pH 发现,香槟方水煎液 pH 为  $5.51 \pm 0.38$ , 高于乌药单煎液 pH ( $4.69 \pm 0.16$ ) 和槟榔单煎液 pH ( $5.32 \pm 0.13$ ), 推测槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定及波尔定碱 4 种生物碱在香槟方中的煎出量降低可能与复方配伍后其他成分的溶出导致提取液 pH 略有上升有关。

另一方面,含有机酸类、鞣质类与生物碱类成分的中药配伍,其水煎液常出现自沉淀现象<sup>[28-29]</sup>。香槟方由砂仁、乌药、人参片、桃仁、槟榔 5 味药材组方而成,方中砂仁含有较多酚酸类成分,乌药、槟榔中含有大量生物碱及鞣质类成分,诸药配伍后,煎煮过程中可能会发生酸碱中和反应以及生物碱与鞣质之间的络合反应,形成相对分子质量较大的复合物,极易析出,产生沉淀,这也可能是复方水煎液中生物碱的含量降低的原因之一。

本实验建立的 UPLC-QqQ-MS/MS 简单快捷、专属性强,可在 8 min 内快速分析香槟方中槟榔次碱、槟榔碱、去甲异波尔定、波尔定碱等 4 种生物碱成分<sup>[30]</sup>。经方法学验证,该方法灵敏度高、稳定性好、准确可靠,可为香槟方后期临床用药质量控制与综合评价及含乌药、槟榔复方制剂的多指标成分含量测定提供参考依据。此外,通过该方法比较单味药与香槟方复方煎煮液中 4 种生物碱成分的含量差异,发现配伍可影响其溶出,但该变化对香槟方整体药效以及体内的药代动力学过程的影响有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] 陈其城,蒋志,张骏鸿,等. 香槟方颗粒和胃肠动力西药对犬胃肠运动作用比较[J]. 广东医学,2018,39(6):837-841.

[2] JIANG Z, CAO L X, LIU B, et al. Effects of Chinese herbal medicine Xiangbin prescription on gastrointestinal motility [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(16): 2987-2994.

[3] WEN S L, FENG X, CHEN Z Q, et al. Effect of Xiangbin granules on post-operative gastrointestinal function and brain-gut peptides after transabdominal gynecological surgery[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016, 205:1-6.

[4] 陈安斌. 香槟方改善胆总管结石术后胃肠功能的临床观察[D]. 广州:广州中医药大学,2016.

[5] 林锦璇. 中药香槟方促进妇科腹部术后胃肠功能恢

复的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学,2018.

[6] 肖润辉,郑成,毛姚嫣. 胃肠病中药方剂(香槟方)微波提取[J]. 广州大学学报:自然科学版,2018,17(3):40-44.

[7] 徐方方,漆睿,江斯炜,等. LC-MRM-MS 法同时测定香槟方 10 个成分的含量[J]. 中华中医药杂志,2017,32(5):2226-2229.

[8] 杨新全,何明军,卢丽兰,等. 酸性染料比色法测定不同种质槟榔总生物碱的含量[J]. 中国现代中药,2014,16(3):199-201.

[9] 张剑,刘冰晶,李超,等. 紫外分光光度法测定乌药中总生物碱含量[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):266-267.

[10] 赵振东,谢艳丽,牛成,等. 毛细管电泳法分析槟榔中槟榔碱和槟榔次碱[J]. 海南师范大学学报:自然科学版,2009,22(2):170-172.

[11] 刘倩. pH 区带逆流色谱法分离七种植物中生物碱的方法研究[D]. 泰安:山东农业大学,2016.

[12] 田莲超,秦少荣,易红,等. 同源中药大腹皮与槟榔中 4 种生物碱的含量比较研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(14):2850-2856.

[13] 李春燕,张学敏,岳璐,等. HPLC 法测定槟榔中槟榔碱和槟榔次碱的含量[J]. 中医药学报,2018,46(3):21-23.

[14] 肖建平,李彘,俞桂新,等. 超高效液相色谱法测定乌药中去甲异波尔定的含量[J]. 福建中医药大学学报,2013,23(1):34-36.

[15] 韩铮,苏慧丽,陈娜,等. 高效液相色谱法同时测定乌药中的 4 种生物碱[J]. 中国中药杂志,2009,34(5):583-586.

[16] PAN H, LI Y, HUANG L, et al. Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for simultaneous quantification of arecoline and its two active metabolites in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2018, 154: 397-403.

[17] CHEN J Z, XU Y, CHOU G X, et al. Simultaneous determination of norisoboldine and its major metabolite in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogra, 2011,25(3):367-372.

[18] LI Y, ZENG R, CHEN J Z, et al. Pharmacokinetics and metabolism study of isoboldine, a major bioactive component from Radix Linderae in male rats by UPLC-MS/MS[J]. J Ethnopharmacol, 2015,171:154-160.

[19] 张会平,蔡丽侠,于文帅,等. UPLC 法研究甘草京大戟反药对配伍后京大戟对甘草中有效成分含量的影

- 响[J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(3): 216-223.
- [20] 刘晶晶, 张贵君, 彭慧, 等. 三黄泻心汤药效组分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 103-108.
- [21] 胡四琴, 徐仿周, 高文平, 等. 槟榔生物碱提取分离及检测方法的研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(2): 308-311.
- [22] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 36.
- [23] LI B, ZHOU X Z, LI J Y, et al. Determination and pharmacokinetic studies of arecoline in dog plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 969: 12-18.
- [24] 耿昭, 吴强, 苟琰, 等. 超高效液相色谱串联质谱同时测定瓦布贝母中 6 个生物碱成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 95-100.
- [25] 方雪其, 黄朝辉. UPLC-MS/MS 测定复方甘草口服溶液中 4 种生物碱含量[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1127-1130.
- [26] 向玉婷. 三种含异喹啉类生物碱中药粉体的表征、理化性质及体外溶出度研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [27] 张战峰, 张继瑜, 李剑勇, 等. 槟榔碱提取分离工艺的研究及其含量测定[J]. 中兽医医药杂志, 2007, 26(2): 18-20.
- [28] ZHANG C Z, ZHAO R, YAN W Q, et al. Compositions, formation mechanism, and neuroprotective effect of compound precipitation from the traditional Chinese prescription Huang-Lian-Jie-Du-Tang [J]. Molecules, 2016, 21(8): 1094.
- [29] 田学浩, 张昊, 李桐, 等. 中药配伍理论科学内涵的外在表象——复方水煎自沉淀[J]. 中草药, 2017, 48(22): 4778-4783.
- [30] 吴瑶, 岳显可, 葛卫红, 等. 乌药不同部位乌药醚内酯、去甲异波尔定含量比较和 FT-NIR 光谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 73-78.

[责任编辑 顾雪竹]