

钩藤中钩藤碱、异钩藤碱的提取与含量测定 在预后中的应用分析

张 恒 饶坤林

(湖北省荆州市中心医院药学部,荆州,434020)

摘要 目的:探讨钩藤中钩藤碱、异钩藤碱的提取与含量测定在预后中的应用。方法:采取水煎液以及甲醇提取液的方式对钩藤中的钩藤碱及异钩藤碱进行提取,并使用高效液相色谱系统分别对其提取的含量进行测定。结果:在 2.5~80 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内钩藤碱的线性关系良好,此时的回归方程为 $Y = 76.7170X - 0.0727$ ($r = 0.9998$), $RSD < 8.7\%$; 在 2.0~80 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内异钩藤碱的线性关系良好,此时的回归方程为 $Y = 87.4729X - 0.3666$ ($r = 0.9997$), $RSD < 7.3\%$ 。甲醇提取液的方式所提取钩藤碱和异钩藤碱的含量高于水煎液的方式,并且使用二十倍质量的甲醇量,24 h 的冷浸时间以及 60 min 的超声时间最合适。结论:使用甲醇进行提取在用于钩藤中钩藤碱及异钩藤碱中作用优异,对其质量的控制性好,重复性高,操作方法简单,可提高预后,值得在临床上应用推广。

关键词 钩藤碱;异钩藤碱;提取方法

Application in Prognosis of the Extraction and Content Determination of Rhynchophylline and Isorhynchophylline in Gambir Plant Nod

Zhang Heng, Rao Kunlin

(Jingzhou Central Hospital, Hubei, Jingzhou 434020, China)

Abstract Objective: To explore the application of extraction and content determination in the prognosis of uncaria rhynchophylline and isorhynchophylline in Gambir Plant Nod. **Methods:** The uncaria rhynchophylline and isorhynchophylline extract was taken by water extract and methanol extract methods, and the content of the extract was determined by high performance liquid chromatography. **Results:** The good linear relationship of rhynchophylline was in the range of 2.5~80 $\mu\text{g/mL}$, the regression equation for the time $Y = 76.7170X - 0.0727$ ($r = 0.9998$), $RSD < 8.7\%$; In the linear relationship between the range of 2.0~80 $\mu\text{g/mL}$, rhynchophylline was good, the regression equation for the time $Y = 87.4729X - 0.3666$ ($r = 0.9997$), $RSD < 7.3\%$. The content of rhynchophylline and isorhynchophylline extracted by methanol extraction liquid was higher than those extracted by the water. And the best way to extract the contents was under the condition of 20 times the maximum amount of methanol, 24 hours of the invasion of cold time and 60 min of sonication. **Conclusion:** The methanol extraction method is prominent in extracting in uncaria rhynchophylline and isorhynchophylline, with good quality control, high repeatability, simple operation, and effect of improving prognosis, which is worthy of clinical application and promotion.

Key Words Rhynchophylline; Isorhynchophylline; Extraction method

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.07.047

钩藤是一种传统中药,其种类繁多,有钩藤、毛钩藤、大叶钩藤、华钩藤等,有 15 种,属于一种茜草科植物^[1-2]。该药物的钩茎枝可以用来入药,具有降压、抗心律失常、镇静的作用,并且在老年痴呆症的治疗中也发挥着功效^[3-4]。在钩藤中,钩藤碱和异钩藤碱这 2 种成分在药效上面的作用效果最大^[5-6]。因此在对这 2 种成分的提取和测定上面有着十分重要的临床意义,此次我们应用了不同方式对钩藤中

的钩藤碱及异钩藤碱进行了提取并对其含量进行了检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 仪器 由美国 DIONEX 公司生产的高效液相色谱系统, Dionex summit 型,其中包括色谱工作站 Chromeleon,二极管阵列检测器 PDA-100,柱温箱 TCC-100,自动进样器 ASI-100。美国 Milipore 公司生产的 Milipore0.45 μm 滤膜以及过滤器,日本 shi-

基金项目:武汉市科技计划基金资助项目(编号:2013060501010152)

作者简介:张恒(1982.11—),男,本科,主管药师,研究方向:药学,E-mail:2064611@qq.com

通信作者:饶坤林(1983.09—),女,硕士研究生,主管护师,研究方向:手术室护理,E-mail:121004261@qq.com

madzu 公司生产的 AUM220D 电子分析天平,上海安亭科学仪器厂生产的低速大容量离心机 LXJ-IIB。

1.2 受试药物 钩藤碱对照品(纯度 $\geq 98\%$,批号 150821,生产厂家:南昌被他生物科技有限公司),异钩藤碱对照品(纯度 $\geq 98\%$,批号 150902,生产厂家:南京贝塔生物科技有限公司),甲醇(色谱纯,北京 Dikma 科技有限公司),钩藤标准药材:广州市药品检验所。水为去离子水,由密理博纯水机 Milli-Q 型进行制备。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱选择 Phenomenex C_{18} 柱,流动相中甲醇和水的比例为 70:30,0.5 mL/min 的流速,30 $^{\circ}\text{C}$ 柱温,5 $^{\circ}\text{C}$ 进样器温度,245 nm 的检测波长。

1.3.2 对照品储备液的配置 精密提取 1.00 mg 的钩藤碱标准对照品以及 1.00 mg 的异钩藤碱标准对照品,将其分别放置在 1.0 mL 的棕色容量瓶之中,然后加入 60% 的甲醇溶液进行摇匀,得出钩藤碱标准储备溶液 1.00 mg/mL,异钩藤碱标准储备溶液 1.00 mg/mL,然后放入冷冻箱内保存,注意避光。在使用前可用 60% 的甲醇进行稀释至所需要的浓度。

1.3.3 样品的制备 将钩藤药材使用 2 种方式进行制备:1)通过水煎液制备,将钩藤药材经过捣碎之后过 20 目筛,通过精密称取 5 g 的量,放入圆底烧瓶之中,再使用 10 倍质量的纯水将其浸泡 40 min 后,使用电热套进行加热,然后进行 45 min 的回流提取,之后冷却约 15 min 的时间,将滤液体积进行测量并记录。2)另一种方式使用甲醇提取液,将钩藤药材捣碎之后过 20 目筛,同样精密称取 5 g 的量,放入棕色瓶之中,精密加入甲醇,质量为钩藤药材的 20 倍,随后放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内将其冷浸 24 h,并进行 45 min 的低温超声,将甲醇的重量补足后进行过滤,测量并记录滤液体积。将以上制备的 2 种滤液提取 1.5 mL 后放入离心管之中,通过 10 000 r/min 离心 10 min 后,加入 0.45 μm 的清液入微孔滤膜进行过滤,然后进行进样分析,分别按照各自最后剩下的“滤液体积”进行换算,换算后的含量为相同提取液体积下相等含量的药材的。

1.3.4 标准曲线的制备 通过精密吸取钩藤碱对照品 1.0 mg/mL 的标准液,分别置入 7 个 1 mL 的棕色容量瓶之中,分别为 80、60、40、20、10、5、2.5 μL ,再精密吸取异钩藤碱对照品 1 mg/mL 的标准液,同样放入 7 个 1 mL 的棕色容量瓶之中,为 80、60、40、20、10、5、2.0 μL 。然后使用 60% 的甲醇定容,分别对所有溶液进行 10 μL 的进样检测分析。结果显

示,在 2.5 ~ 80 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内钩藤碱的线性关系良好,此时的回归方程为 $Y = 76.717 0X - 0.072 7$ ($r = 0.999 8$);在 2.0 ~ 80 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内异钩藤碱的线性关系良好,此时的回归方程为 $Y = 87.472 9X - 0.366 6$ ($r = 0.999 7$)。

1.3.5 检测限和定量限 通过精密量取线性项下的对照品储备液进行定量的稀释,信噪比 S/N 的比值为 3:1,结果显示钩藤碱的检测限为 0.25 $\mu\text{g/mL}$,异钩藤碱的检测限为 0.5 $\mu\text{g/mL}$;然后信噪比 S/N 的比值为 10:1,结果显示钩藤碱的定量限为 1.0 $\mu\text{g/mL}$,异钩藤碱的定量限为 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.3.6 专属性试验 通过精密吸取 10 μL 的对照品溶液以及样品溶液,在 1.3.1 所描述的色谱条件下对其进行测定。结果显示的钩藤碱的保留时间约在 15.6 min,异钩藤碱的保留时间大约 18.92 min,双峰的分离度较好,所得结果不受钩藤药材中其他成分的影响。

1.3.7 精密度试验 通过精密吸取钩藤碱和异钩藤碱精密后将其混合在对照品溶液中,溶液剂量为 10 μL ,连续进行 6 次的测定,结果所得钩藤碱的峰面积 RSD 为 1.20%,异钩藤碱的为 3.13%,证明了仪器的精密度良好。

1.3.8 重复性试验 选取 5 份同一批次的钩藤样品,按照 2.3 所描述的方法下对供试品溶液进行制备,通过 10 μL 进样的方法进行检测,所得的钩藤碱含量的 RSD 为 2.23%,异钩藤碱的为 2.14%。

1.3.9 稳定性试验 选取同一供试品溶液,在 0、2、4、6、10 以及 14 h 时进行进样检测,所得到的结果显示,钩藤碱和异钩藤碱的峰面积 RSD 分别为 4.65% 和 3.54%,结果显示供试品在 14 h 内依然稳定。

1.3.10 钩藤碱及异钩藤碱加样回收率试验比较分析 提取同一批次的钩藤总共 6 份,通过精密计算分别加入含有钩藤碱以及异钩藤碱的对照品之中,溶液有高、中、低三种浓度,提取并测定,同时计算回收率。见表 1。

2 结果

2.1 钩藤药材通过水煎液的方式含量结果 选取 6 份钩藤药材,每份 5 g,依照 1.3.3 方法进行试品的制备,分别在 10 min、20 min、30 min、45 min、60 min 以及 90 min 的时候对样品进行提取。所得到的结果显示在热稳定上,钩藤碱和异钩藤碱的表现极差,通过加热很容易将其破坏,使得药理作用缺失,不同时间段水煎液中测得钩藤碱含量为 0.0025% ~ 0.0030%,异钩藤碱的含量为 0.0041% ~ 0.0053%。

2.2 正交试验优选钩藤药材的甲醇提取方法 由于甲醇的用量、冷浸时间、超声时间对提取率的结果影响较大,通过表 2 的因素水平安排表进行试验。结果显示,在甲醇量、冷浸时间、超声时间中,对提取率的影响情况由大至小依次为,超声时间 > 甲醇量 > 冷浸时间,使用 20 倍质量的甲醇量,24 h 的冷浸时间以及 60 min 的超声时间最合适。

表 1 钩藤碱及异钩藤碱加样回收率试验比较分析					
指标	样本含量 μg · mL ⁻¹	加入量 μg · mL ⁻¹	测得量 μg · mL ⁻¹	回收率 (%)	RSD (%)
钩藤碱	6.94	30.00	36.82 ± 1.19	116.90 ± 4.61	3.94
		14.00	21.34 ± 0.50	112.41 ± 3.97	3.55
		5.00	11.93 ± 0.68	99.82 ± 8.71	8.72
异钩藤碱	4.89	55.00	61.95 ± 1.22	87.06 ± 1.87	2.13
		32.00	35.27 ± 1.53	92.67 ± 4.73	5.09
		8.00	13.47 ± 0.65	104.99 ± 7.62	7.28

表 2 因素水平表			
水平	甲醇量	冷浸时间(h)	超声时间(min)
1	5 倍质量	6	60
2	10 倍质量	12	40
3	20 倍质量	24	20

2.3 钩藤碱中钩藤碱与异钩藤碱的含量测量 提取 3 个批次的钩藤药材以及标准钩藤药材,按照上面的正交试验所得到的最佳条件提取制备,然后测定钩藤碱和异钩藤碱的结果。见表 3。

表 3 钩藤碱中钩藤碱与异钩藤碱的含量测量 (%)				
批号	钩藤碱	RSD	异钩藤碱	RSD
20150912	0.0597	1.22	0.0307	1.87
20151003	0.0559	1.38	0.0296	2.14
20150924	0.0631	1.05	0.0325	1.15
标准药材	0.0290	1.55	0.0132	2.26

3 讨论

钩藤主要产于江西、湖南、广东、云南等地区,性微寒,味甘,归肝、心包经,主要功效为清热平肝、定惊熄风^[7-8]。在肝风内动,惊痫抽搐,感冒夹惊,妊娠子痫,小儿啼哭,头疼晕眩上也有很大的功效^[9]。在现代药理学中,具有控制血压,扩张外周血管等作用,并且该药物毒性低,用药时带来的不良反应较小,安全性高,临床上常用于治疗高血压^[10-11]。有研究显示,钩藤在抗血小板聚集以及抵抗血栓形成的过程中也有着良好的疗效^[12-13]。在之前临床上有很多关于钩藤的处理方式,其中有水煎液、石油醚回流、甲醇提取、乙醇回流等^[14-15]。其中乙醇回流和甲醇提取能够保证钩藤碱和异钩藤碱的提取率最高,但是乙醇回流的方式由于操作方式过于复杂,分离

方式太难,并且其中的杂质也较多。此次我们使用了水煎液和甲醇的方式对钩藤中的钩藤碱和异钩藤碱进行了提取。

钩藤碱和异钩藤碱的稳定性很差,在一些极性溶液或者处于高温照射的条件下很容易形成转换,从而使得钩藤碱和异钩藤碱的含量出现降低的情况。建议将钩藤碱和异钩藤碱的标准品放在放置于冷冻、干燥且避光的环境下进行保存,不易使其中各物质含量发生降解,并且在实验时需即配即用,测定样品的时候需尽快,以得到最可靠有效的实验结果。研究显示,相比于水煎液的提取方式,通过甲醇提取钩藤中钩藤碱及异钩藤碱的方式要更为优异,这种方式所得的提取率大约在水煎液法的 10 倍以上,有效性高。并且此次研究对影响提取率的因素上也进行了分析,发现最佳的提取工艺和检测方式为用 20 倍量的甲醇量,24 h 的冷浸时间以及 60 min 的超声时间。以往有研究显示,在对配置 1 周后的钩藤碱对照品溶液进行重新检测后,钩藤碱的表达依然稳定,但是异钩藤碱多出了一峰,含量变小,该作者推断是少数的钩藤碱转化成了异钩藤碱^[16]。但在我们的研究中显示,钩藤碱及异钩藤碱在甲醇中 24 h 内的含量都呈现稳定,证明了使用钩藤碱和异钩藤碱用来对药材的质量进行评价是可靠的。

综上所述,使用甲醇进行提取在用于钩藤中钩藤碱及异钩藤碱中作用优异,对其质量的控制性好,重复性高,操作方法简单,可提高预后,值得在临床上应用推广。

参考文献

[1] 韦芳芳,曾常青,赵宇红,等. 钩藤神经保护机制的研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(14):2603-2607.

[2] 李娜,李江,游绍雪. 高效液相色谱法同时测定钩藤中 4 种生物碱的含量[J]. 贵州农业科学,2013,41(2):50-53.

[3] 黄月芳,楼招欢,余芳. 天麻钩藤颗粒对硝酸甘油致偏头痛模型大鼠的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(1):230-233.

[4] 雷冰坚,马健雄. 钩藤生物碱类化学成分研究进展[J]. 华西医学,2014,29(3):592-594.

[5] Li Y, Yang W, Zhu Q, et al. Protective effects on vascular endothelial cell in N'-nitro-L-arginine (L-NNA)-induced hypertensive rats from the combination of effective components of Uncaria rhynchophylla and Semen Raphani[J]. Biosci Trends,2015,9(4):237-244.

[6] 焦扬,王模强,华丹,等. 中药钩藤化学成分研究[J]. 天津医科大学学报,2013,19(2):107-109.

[7] 郭晓阳. 天麻钩藤汤治疗老年高血压阴虚阳亢证疗效观察[J]. 亚太传统医药,2014,10(22):98-99.

[8] Zhang Q, Lin C, Duan W, et al. Preparative separation of six rhynchophylla alkaloids from Uncaria macrophylla wall by pH-zone refining counter-current chromatography[J]. Molecules,2013,18(12):15490-15500.

出现,所以将此二味药的条文集中在一起。主要有以下几条记载:第一篇,《重阳真人金阙玉锁诀》云:“离铅者,是身中心气,八节中立夏、夏至,身中为血也。”^[3]第二篇,《重陽真人授丹陽二十四訣》云:“丹阳又问:何者为铅汞? 祖师答曰:铅者是元神,汞者是元气也,名曰铅汞”^[4]。第三篇,《太古集》云:“铅汞须分阳与阴,半斤银合半斤金”^[5]。“夫太古者,太谓太易、太初、太始、太素;古谓远古、上古、邃古、亘古。务使将来慕道君子,知其不虚为者也。且夫气象莫大乎天地,变通莫大乎阴阳。天地之英华,阴阳之根本,二气之谓也。木龙金虎,赤凤乌龟,四象之谓也。六七八九,其数之谓也。刀圭铅汞,生成备物之谓也。神遇气交,性命之谓也”^[5]。第四篇,《上方灵宝无极至道开化真经》云:“阴之气血善能益于阳之精神也。阳之精神善能滋于阴之气血矣”^[6]。“元炁备者,男精女血,元而坚固也。法配水火者,道合离坎也。制定铅汞者,点化干之铅,制炼坤之汞也。合彼震魂者,混合震宫之魂,以青龙真精契之也。长生者,不夜之乡也”^[6]。

石部主要代表药有朱砂、云母和禹余粮三味药。

第一味:朱砂。主要有两条记载。第一条,唐·王悬河《三洞珠囊》云:“巴越之精上者”^[2]。第二条,《无上秘要》云:“摄魂魄,填三神,理和气”^[1]。这两条主要提示了朱砂的采集质量鉴定和长于调摄精神的功效。

第二味:云母。《无上秘要》记载,云母可“泽形体,面生光,补骨血”^[1]。

第三味:禹余粮。《无上秘要》记载,禹余粮有

“定六府,填五藏”^[1]之效。《三洞珠囊》记载,云母需“取中央黄者”^[2]。这里提示了禹余粮的采集要点。

3 小结

本文是对《太平部》中出现的中药材的基本情况,以后将陆续对《道藏》其他三辅中的中药材记载整理完整。经初步整理发现,《太平部》中对中药材的功效记载虽然有一部分夸大了事实,但是大部分中药材的功效记载较为符合事实。书中对药材的生长习性,品质鉴定,采集要点,加工炮制等的描述也较符合。例如书中言雄黄“取洞明者”,云母“光明白者”,麦冬“去心”,龙骨“舐之附舌者佳也”。总之,《太平部》中的中药材记载是对主流中药认识的补充,是加深对中药认识的重要一环,亟需对这些中药材的记载进行深入研究。希望更多的同道能加入对《道藏》中的中药材文献的整理研究。

参考文献

- [1] 无上秘要[A]. 道藏:二十五册[Z]. 上海:文物出版社,上海书店;天津:天津古籍出版社,1988:219,250,249.
- [2] 三洞珠囊[A]. 道藏:二十五册[Z]. 上海:文物出版社,上海书店;天津:天津古籍出版社,1988:221,247,310,312,313,317,319.
- [3] 重阳真人金阙玉锁诀[A]. 道藏:二十五册[Z]. 上海:文物出版社,上海书店;天津:天津古籍出版社,1988:799.
- [4] 重阳真人授丹阳二十四诀[A]. 道藏:二十五册[Z]. 上海:文物出版社,上海书店;天津:天津古籍出版社,1988:807.
- [5] 太古集[A]. 道藏:二十五册[Z]. 上海:文物出版社,上海书店;天津:天津古籍出版社,1988:880,867.
- [6] 上方灵宝无极至道开化真经[A]. 道藏:二十四册[Z]. 上海:文物出版社,上海书店;天津:天津古籍出版社,1988:908.

(2015-06-29 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 1333 页)

- [9] 董秀丽,李厚建. 天麻钩藤饮合柴胡疏肝散加减治愈头晕头痛 1 例[J]. 中国民间疗法,2013,21(10):41.
- [10] 周倩仪,马楷奇,郭意欣,等. 天麻钩藤饮联用血管紧张素转化酶抑制剂治疗原发性高血压的 Meta 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):206-212.
- [11] 栗源,可燕,蒋嘉烨,等. 天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠血管功能及肾脏蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2015,35(4):481-487.
- [12] Hao B, Yang XJ, Feng Y, et al. Pharmaceutical research progress of rhynchophylla based on chemical stability[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2014, 39(23):4532-4537.

- [13] 田丽娜,高华武,龙子江,等. 钩藤碱对自发性高血压大鼠的降压作用及其对血管的调节机制探讨[J]. 中草药,2014,45(15):2210-2213.
- [14] 杨秀娟,洪燕龙,吴飞,等. HPLC 测定钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的方法学探讨[J]. 中国中药杂志,2013,38(5):720-724.
- [15] Pan H, Yang W, Zhang Y, et al. An integrated strategy for the systematic characterization and discovery of new indole alkaloids from Uncaria rhynchophylla by UHPLC/DAD/LTQ-Orbitrap-MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(20):6057-6070.
- [16] 原田正敏,姜顺善. 日本常用生药的定量方法——防己、钩藤[J]. 国外医药(植物药分册),1991,6(5):217-222.

(2016-03-08 收稿 责任编辑:张文婷)