文章编号:1000-5404(2010)14-1539-03

论著

中药钩藤中钩藤碱含量的测定

刘 明,汤建林,胡岚岚,周世文 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院临床药理基地)

[摘要] **目的** 建立优化钩藤药材中钩藤碱的提取及含量测定方法。**方法** 采用甲醇冷浸超声法处理钩藤药材,Diamonsil C18(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,流动相及梯度:甲醇:0.01 mol/L 醋酸铵缓冲液(氨水调 pH=6.0)0~20 min内比例由 25∶75 递增至 50∶50;流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;检测波长:245 nm;进样量:20 μl。**结果** 钩藤碱在 0.25~64.0 μg/ml 范围内线性良好,回归方程为 $y=3.64\times10^4x-2.13\times10^4$($r=0.999\ 5$),相对回收率为 95.95%~114.40%,重复性试验 RSD 为 6.50%,稳定性试验钩藤碱高、中、低浓度溶液室温 5 d 内 RSD 为 4.62%、2.65% 和 4.58%。**结论** 本测定方法准确可靠,重复性好,可应用于钩藤药材中钩藤碱含量的测定。

[关键词] 钩藤;钩藤碱;高效液相色谱法
[中图法分类号] R282.71;R284.1 [文献标志码] A

Determination of rhynchophylline in *Ramulus Uncariae cum Uncis*

Liu Ming, Tang Jianlin, Hu Lanlan, Zhou Shiwen (Base for Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To establish and optimize a method to extract and determine rhynchophylline in a traditional Chinese herb, *Ramulus Uncariae cum Uncis*. Methods Cold maceration with methanol and supersonic extraction was used to treat the medical material. Chromatography was performed on a Diamonsil C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Gradient elution was employed with a mobile phase consisting of methanol (solution A) and ammonium acetate buffer (0.01 mol/L, pH 6.0 adjusted by ammoniae aqua, solution B) as follows: A: B from 25∶75 to 50∶50 from 0 to 20 min. The flow rate of the mobile phase was 1.0 ml/min and the column was maintained at 20 ℃. The detector was monitored at 245 nm. Results The calibration curve was linear among the concentration range of 0.25 to 64.0 μg/ml ($y=3.64\times10^4x-2.13\times10^4$, $r=0.999\ 5$) and the relative recovery ranged from 95.95% to 114.4%. The relative standard deviation (RSD) of the reproducibility test was 6.50% and of the stability test was 4.62%, 2.65% and 4.58% from the high density to the low. Conclusion Our method is accurate, reliable and with good reproducibility, and it can be used for determining rhynchophylline in *Ramulus Uncariae cum Uncis*.

[**Key words**] *Ramulus Uncariae cum Uncis*; rhynchophylline; high performance liquid chromatography

Corresponding author: Tang Jianlin, Tel: 86-23-68755311, E-mail: jltang6317@163.com

钩藤[*Uncariar rhynchophylla* (*Miq*) *Jacks*]是我国传统中药,属茜草科植物,种类繁多,包括钩藤[*Uncaria rhynchophylla* (*Miq.*) *Jacks*]、大叶钩藤[*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*]等 15 种,其带钩茎枝入药,性凉味苦甘,具有清热平肝、熄风定惊的作用[1]。现代药理研究表明,钩藤具有显著的降压、抗心律失常、镇静和治疗老年痴呆症等功效[2,3],且副作用小,安全性较高,有必要对其进一步开发利用。钩藤有效成分为吲哚类生物碱,主要包括钩藤碱(*rhychophylline*)、异钩藤碱(*isorhychophylline*)、柯诺辛碱(*corynoxine*)、柯诺辛碱(*corynoxine*)B、去氢钩藤碱(*corynoxeine*)和异去氢钩藤碱(*corynoxeine*)等,其中钩藤碱含量最高,

[通信作者] 汤建林,电话:(023)68755311,E-mail: jltang6317@163.com

为主要有效成分[4,5]。为了对钩藤碱进行深入研究，如建立质量标准体系及进行药理药效学研究，必须建立安全高效的提取方法和快速准确的测定方法。钩藤药材中钩藤碱的提取测定方法多有报道[6-14]，但实验证明多数方法重复性较差。本研究采用反相高效液相色谱梯度洗脱的方法，成功分离了钩藤碱、异钩藤碱等几种结构相近的生物碱，并对几种不同的钩藤碱提取方法进行比较分析，旨在为下一步的研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

Waters高效液相色谱系统(Waters公司)：Waters 600 Controller高压泵、Waters 996 Photodiode Array Detector检测器、Waters 717 plus Autosampler自动进样器，纯水仪(MILLIPORE公司)，AS3120A超声仪(上海冠特超声仪器有限公司)，Sartorious MC210S电子天平(1/10^5)(Sartorious公司)，WaterBath BM100旋转蒸发仪(Yamato公司)，TGL-16G离心机(上海安亭科学仪器厂)。钩藤碱对照品(南昌贝塔生物科技有限公司，批号：10172-080114，纯度>98%)，异钩藤碱对照品(南昌贝塔生物科技有限公司，批号：10525-080117，纯度>98%)，柯诺辛碱B对照品(南昌贝塔生物科技有限公司，批号：10268-081126，纯度>98%)，甲醇(Scharlau，HPLC grade)，水为超纯水(Millipore)，其余试剂均为市售分析纯，钩藤药材(产地湖南)。

1.2 方法

1.2.1 钩藤药材处理 醚提法：将清洗干燥后的钩藤药材粉碎，过20目筛，准确称取100 g药粉，加入氨水：水：乙醇(9:30:16)300 ml活化后弃去滤液，将药材置于圆底烧瓶中，加入500 ml乙醚，恒温水浴回流4 h，将乙醚液滤出，重复提取3次，合并乙醚滤液后旋转蒸发至100 ml左右，转移至分液漏斗中，用0.1%盐酸溶液40 ml萃取3次，合并酸液，用氨水调节pH 9~10，再用50 ml乙醚萃取3次，合并醚液，挥干后收集固体称质量，称取一定量该固体用甲醇溶解得醚提样品液，进样前用0.22 μm滤膜过滤。醇提法：将清洗干燥后的钩藤药材粉碎，过20目筛，准确称取10 g药粉，加入50 ml甲醇混匀后，置4 ℃冰箱中冷浸24 h，之后超声30 min，滤纸过滤后用甲醇清洗冷浸药粉与滤液合并，定容于50 ml容量瓶中，进样前用0.22 μm滤膜过滤。

1.2.2 色谱条件 色谱柱：Diamonsil C18(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相梯度：甲醇：0.01 mol/L醋酸铵缓冲液(氨水pH=7.0)0~20 min内比例由25:75递增至50:50；流速：1.0 ml/min；柱温：25 ℃；检测波长：245 nm；进样量：20 μl。

1.2.3 对照品储备液及标准溶液的配制 准确称取钩藤碱对照品12.80 mg，用甲醇溶解并定容于10 ml容量瓶中，得1.28 mg/ml钩藤碱标准储备液，置于-20 ℃冰箱保存。准确吸取1.28 mg/ml钩藤碱标准储备液5.00 ml于10 ml容量瓶中，用甲醇稀释到刻度线，得到64.0 μg/ml钩藤碱标准工作液；准确吸取64.0 μg/ml钩藤碱标准工作液5.00 ml于10 ml容量瓶中，用甲醇稀释到刻度线得到32.0 μg/ml钩藤碱标准工作液；按上法依次稀释定容，得16.0、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25 μg/ml标准工作液，置于-20 ℃冰箱保存备用。

2 结果

2.1 专属性试验

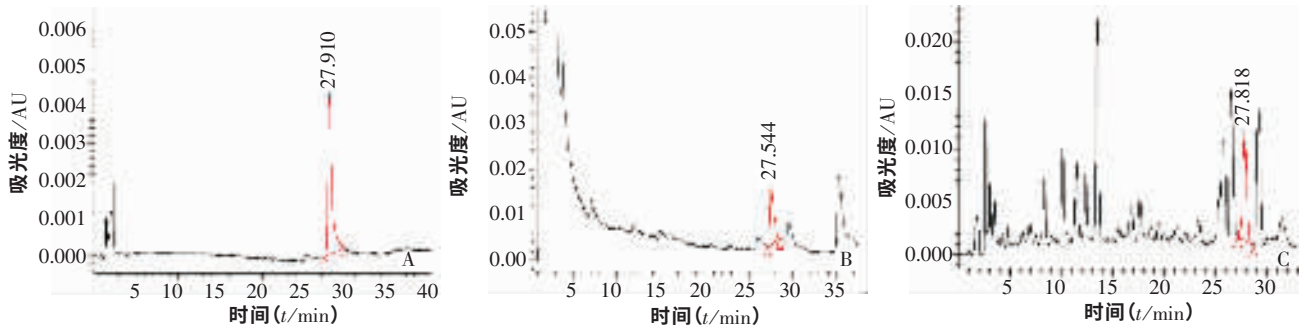
取2种处理方法得到的样品溶液和4.0 μg/ml钩藤碱标准工作液按1.2.2色谱条件进样分析，钩藤碱保留时间约在27.9 min，且与其余生物碱和杂质分离度良好(图1)。

2.2 标准曲线绘制

将钩藤碱标准工作液依次进样分析，以峰面积为纵坐标，浓度为横坐标进行线性回归，得到回归方程：$y=3.64\times10^4\chi-2.13\times10^4$，相关系数$r=0.999\ 5$，结果表明在此色谱条件下，钩藤碱在浓度0.25~64.0 μg/ml范围内呈良好线性关系。

2.3 重复性试验

根据标准曲线计算样品浓度，得到结果换算成同质量药材中钩藤碱的含量，醚提与醇提结果基本一致，但醚提样品杂质量大且步骤复杂，因此选择甲醇冷浸超声法作为提取方法。按1.2.1方法平行处理9份样品，进样分析，钩藤碱测定的RSD为6.50%。



A：4.0 μg/ml钩藤碱标准工作液；B：甲醇冷浸超声提取样品；C：乙醚回流提取样品

图1 钩藤碱专属性试验色谱分析

2.4 加样回收试验

按 1.2.1 方法平行处理 3 份样品,测定浓度后分别与等体积的 64.0、16.0、2.0 μg/ml 钩藤碱标准工作液混合均匀,得到 32.0、8.0、1.0 μg/ml 加标样品溶液,每个浓度平行配制 5 份,分别进样测定,计算回收率,结果高、中、低浓度加标样品回收率分别为 95.95%、109.62% 和 114.40%(表 1)。

表 1 加样回收试验结果

样品	*n*	加入浓度(μg/ml)	测得浓度(μg/ml)	回收率(%)	RSD(%)
钩藤碱样品	3	0	8.37		3.63
测试样品 1	5	1.0	9.51	114.40	5.94
测试样品 2	5	8.0	17.13	109.62	2.69
测试样品 3	5	32.0	39.07	95.95	6.53

2.5 稳定性试验

制备 2.4 中 32.0、8.0、1.0 μg/ml 加标样品溶液各 1 份,室温放置,分别在 12、24、36、48 h,3、5 d 进行测定,结果表明钩藤碱室温下在 5 d 内含量稳定,其中高、中、低浓度样品 RSD 分别为 4.62%、2.65% 和 4.58%。

3 讨论

3.1 钩藤药材处理方法选择

本研究考察了多种文献报道的钩藤处理方法,包括水煮法、乙醇回流、石油醚回流等[6-9],结果钩藤碱提取率均极低,无法重复报道结果,只有乙醚回流及甲醇冷浸超声处理得到了一定量的钩藤碱,但乙醚回流样品杂质较多,难以分离且步骤复杂。本研究基于张荣等[10]的报道,对甲醇用量和超声时间作适当调整,作为药材中钩藤碱的提取方法。药材品种、产地和收获季节不同,钩藤碱的含量也不尽相同,作者考察了广西、山西、四川、贵州和湖南产双钩藤,结果只有湖南产钩藤钩藤碱含量较高,占 0.03% ~0.04%,故本研究中选择湖南产药材钩藤作为研究材料。

3.2 色谱条件的选择

根据钩藤碱的紫外光谱图,确定其最大吸收波长为 245 nm;作者对流动相进行了多种选择,最后确定甲醇与醋酸铵为最佳组合。研究表明,缓冲液 pH 值为 6 ~7 时钩藤碱峰型较好,且等度条件下难以实现钩藤碱与类似结构生物碱和杂质的分离,经选择后确定应用缓冲液(pH =6.0)、梯度洗脱的方法,实现了钩藤碱的良好分离。

3.3 钩藤碱的稳定性

钩藤碱稳定性较差,在极性溶液中或高温光照条件下易转化为其对映体异钩藤碱[4]。本研究表明钩藤碱对照品甲醇溶液于室温放置,2 d 后即会发生转化,但钩藤药材经过甲醇冷浸超声处理后,其溶液中钩藤碱的含量在室温 5 d 未发生明显降低,较为稳定,可能是由于溶液中的杂质抑制了钩藤碱的转化,有必要进行深入研究。

综上所述,本研究选择甲醇冷浸超声法对钩藤药材进行处理,采用反相高效液相色谱梯度洗脱分析提取液中的钩藤碱,成功分离了钩藤碱和结构类似的生物碱,方法准确,重复性好,钩藤碱在室温 5 d 内保持含量稳定,为钩藤碱单体的纯化制备及质量标准建立和药效学研究奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2005 版(一部). 北京: 化学工业出版社, 2005: 180.
[2] 王群, 李江疆. 钩藤碱对心血管系统部分药理作用研究[J]. 宁夏医学杂志, 1998, 20(5): 289 -291.
[3] 周程艳, 王树华, 赵瑞蒲, 等. 钩藤碱的药理学研究进展[J]. 华北煤炭医学院学报, 2002, 4(4): 447 -448.
[4] 郑嘉宁, 王定勇. 大叶钩藤生物碱类化学成分研究[J]. 中医药导报, 2009, 15(1): 80 -81, 86.
[5] 杨家强, 秦伟, 江波, 等. 钩藤中钩藤碱的成分分析[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(16): 2378 -2379.
[6] 张颖, 刘理南, 赵燕清. 钩藤提取工艺研究[J]. 中成药, 2000, 22(5): 331 -332.
[7] 应懿, 何志红, 周世文, 等. 测定黄连中5 种生物碱含量的高效液相色谱法研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9): 843 -845.
[8] 杨宪, 杨水平, 张雪, 等. 紫杉醇提取工艺的优化试验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(19): 1886 -1888.
[9] 李晓云, 叶小丽, 牛小花, 等. 正交设计优选钩藤碱的提取工艺[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(1): 49 -50.
[10] 张荣, 刘睿, 刘启德, 等. 钩藤中钩藤碱、异钩藤碱的提取与含量测定[J]. 中国新药与临床药理, 2009, 20(4): 338 -341.
[11] 王英锋, 魏璐雪, 王保中. 高效液相色谱法测定钩藤中钩藤碱、异钩藤碱含量[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(1): 56 -57.
[12] 王捷, 刘宗河, 龙禹, 等. 高效液相色谱法测定安神养血口服液中钩藤碱和异钩藤碱含量[J]. 中药材, 2009, 32(7): 1134 -1137.
[13] Fiot J, Baghdikian B, Boyer L, *et al*. HPLC quantification of uncarine D and the anti-plasmodial activity of alkaloids from leaves of Mitragyna inermis (Willd.) O. Kuntze[J]. Phytochem Anal, 2005, 16(1): 30 -33.
[14] Stuppner H, Sturm S, Konwalinka G. HPLC analysis of the main oxindole alkaloids from Uncaria tomentosa[J]. Chromatographia, 1992, 34(11/12): 597 -600.

(**收稿**:2009-12-24;**修回**:2010-01-25)
(编辑　龙　亮)