

◆ 中药民族药 ◆

大叶钩藤中柯诺辛碱 B 及柯诺辛碱的含量测定及分析*

杨海船^{1,2},张赟赟^{1,2**},张颖^{1,2},巫凯^{1,2},李嘉^{1,2}

(1. 广西壮族自治区中医药研究院化学室,广西南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室,广西南宁 530022)

摘要:为建立大叶钩藤 *Uncaria macrophylla* Wall. 中柯诺辛碱 B (Corynoxine B) 及柯诺辛碱 (Corynoxine) 的含量测定方法,采用高效液相色谱法测定在不同采收月份大叶钩藤及不同药用部位中柯诺辛碱 B 及柯诺辛碱的含量。测定条件:Inertsil ODS-3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.02%三乙胺(68:32),流速 1 mL/min,检测波长 246 nm,柱温 25℃。实验结果表明:柯诺辛碱 B 进样量为 0.130-1.950 μg,柯诺辛碱进样量为 0.296-4.440 μg,与峰面积呈良好的线性关系,相关系数 r 均为 1.000 0 ($n=5$);柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱的平均回收率($n=6$)分别为 99.47%和 100.06%,RSD 分别为 1.56%和 0.98%。本法简便易行,重现性好,可为钩藤药材的质量控制提供科学依据。

关键词:大叶钩藤 柯诺辛碱 B 柯诺辛碱 含量测定 采收时间 药用部位

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)04-0423-05

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20211109.005

0 引言

钩藤为茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.、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. 的干燥带钩茎枝,秋、冬二季采收,去叶,切段,晒干^[1],具有息风定惊、清热平肝的功效。现代药学研究表明,钩藤主要具有镇静、降血压、抗阿尔茨海默病和抗肿瘤等多种药理作

用^[2-6],吲哚生物碱是其主要的药效物质,其中大叶钩藤主要含有钩藤碱、异钩藤碱、柯诺辛碱(Corynoxine)、柯诺辛碱 B (Corynoxine B) 等生物碱。

目前,有关钩藤化学成分的研究主要集中于钩藤碱和异钩藤碱,对柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱的研究相对较少。通过查阅文献和抗肿瘤筛选实验证实,柯诺辛碱 B 及柯诺辛碱是钩藤中很重要的抗肿瘤药效物质。因此,本研究建立了运用 HPLC 同时测定柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱的方法,并测定其在不同采收月份大叶钩藤及其不同药用部位中的含量,以期为钩藤

收稿日期:2020-08-14

* 广西中药质量标准研究重点实验室青年骨干创新基金项目(桂中重自 201504)资助。

【作者简介】

杨海船(1986-),男,助理研究员,主要从事药物分析和中药活性成分研究,E-mail:88609029@qq.com。

【**通信作者】

张赟赟(1980-),女,副主任药师,主要从事药物分析研究,E-mail:melody0707@163.com。

【引用本文】

杨海船,张赟赟,张颖,等.大叶钩藤中柯诺辛碱 B 及柯诺辛碱的含量测定及分析[J].广西科学,2021,28(4):423-427.

YANG H C,ZHANG Y Y,ZHANG Y,et al. Determination and Analysis of the Content of Corynoxine B and Corynoxine in *Uncaria macrophylla* Wall. [J]. Guangxi Sciences,2021,28(4):423-427.

药材质量标准的建立提供科学数据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要仪器

Waters alliance E2695 型高效液相色谱仪(美国 waters 公司), BS110S 型 1/10 万电子分析天平(梅特勒公司), B2200s 超声波清洗器(必能信超声有限公司)。

1.1.2 主要试剂

钩藤药材采自广西南宁市高峰林场, 经广西中医药研究院黄云峰副研究员鉴定为大叶钩藤(*Uncaria macrophylla* Wall.); 柯诺辛碱(纯度 ≥ 98 , 批号: BCY-0155), 柯诺辛碱 B(纯度 ≥ 98 , 批号: BCTG-0924), 均购自江西佰草源生物科技有限公司; 色谱纯甲醇(美国 Fisher 公司); 水为超纯水; 其他试剂为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 色 谱 条 件

色谱柱: Inertsil ODS-3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 检测波长: 246 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 流动相: 甲醇-0.02%三乙胺(68:32); 流速: 1 mL/min; 进样体积: 10 μ L。色谱图见图 1。

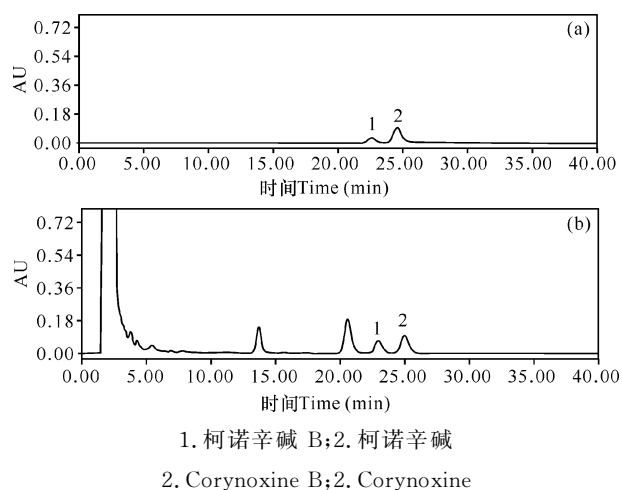


图 1 混合对照品溶液(a)和大叶钩藤样品(b)HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference solution (a) and *Uncaria macrophylla* Wall. (b)

1.2.2 混合对照品溶液的制备

精密称定柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱对照品适量, 置于容量瓶内, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成每 1 mL 分别含 0.13, 0.296 mg 的混合对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备

取大叶钩藤药材粗粉约 1.0 g, 精密称量, 置于具塞锥形瓶内, 精密加入甲醇 25 mL, 精密称重, 超声提取 40 min, 放冷称重并用甲醇补足失重, 摇匀, 用 0.45 μ m 有机微孔滤膜滤过, 制得供试品溶液。

1.2.4 耐用性试验

用 Inertsil ODS-3 C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), Kromasil C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 等不同品牌色谱柱进样测定, 结果本品供试液中柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱色谱峰的分离度均大于 1.5, 理论板数分别按柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱色谱峰计算, 均不低于 3 000, 表明本方法在不同色谱柱的适用性良好。

1.2.5 线性关系考察

分别精密吸取 1.2.2 节混合对照品溶液 1, 3, 5, 10, 15 μ L, 按 1.2.1 节色谱条件进行测定, 以峰面积值(y)为纵坐标, 各待测物进样量(x)为横坐标, 分别绘制标准曲线。

1.2.6 精密度试验

取同一份供试品溶液, 按 1.2.1 节色谱条件连续进样 6 次, 测定各待测成分峰面积, 峰面积相对标准偏差应小于等于 2.00%

1.2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液, 于制备后 0, 1, 2, 6, 10, 18 h 分别进行测定, 峰面积相对标准偏差应小于等于 3.00%

1.2.8 重复性试验

精密称取同一样品 6 份, 每份约 1.0 g, 按 1.2.3 节方法制备供试品溶液, 在 1.2.1 节色谱条件下进行测定, 每份供试品溶液平行进样 2 次, 取平均值并计算供试品中各待测成分含量及其 RSD。若待测成分含量为 0.01% - 0.10%, 则 RSD 应小于等于 4.00%; 若待测成分含量在 0.10% - 1.00%, 则 RSD 应小于等于 3.00%。

1.2.9 加样回收试验

精密称取已知含量(重复性实验样品)的同一批钩藤药材 6 份, 每份约 0.5 g, 分别置于具塞锥形瓶中, 每个锥形瓶中均精密加入 7.00 mL 混合对照品溶液(每 1 mL 混合对照品溶液含 0.128 mg 柯诺辛碱 B, 0.308 mg 柯诺辛碱)和 18.00 mL 甲醇, 按 1.2.3 节方法制备供试品溶液, 在 1.2.1 节色谱条件下进行测定, 计算回收率。

$$\text{回收率}\% = (C - A) / B \times 100\%$$

式中, A 为供试品中所含被测成分的量, B 为加入对照品的量, C 为实测值。

1.2.10 样品测定

精密称取供试品适量,按 1.2.3 节方法制备供试品溶液,按 1.2.1 节色谱条件进行测定,每份供试品溶液平行进样 2 次,取平均值并计算供试品中各待测

成分含量。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

由表 1 可知,各成分在各自的线性范围内具有良好的线性关系。

表 1 柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱的线性关系考察结果

Table 1 Results of linear relationship between corynoxine B and corynoxine

成分 Component	标准曲线 Standard curve	r	线性范围 Linear range (μg)
柯诺辛碱 B Corynoxine B	$y = 2 \times 10^6 x - 84528$	1.000 0	0.130 - 1.950
柯诺辛碱 Corynoxine	$y = 2 \times 10^6 x - 167058$	1.000 0	0.296 - 4.440

2.2 精密度试验

供试品溶液中柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.86%、0.74%,表明仪器精密度良好。

2.3 稳定性试验

柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱峰面积的 RSD 分别为 2.05%、2.82%,表明供试品溶液在 18 h 内稳定。

2.4 重复性试验

柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱峰面积的 RSD ($n = 6$)

分别为 1.48%、2.23%,表明该方法重复性良好。

2.5 加样回收试验

由表 2 可知,供试品中柯诺辛碱 B 和柯诺辛碱的平均回收率 ($n = 6$) 分别为 99.47% 和 100.06%,RSD 分别为 1.56% 和 0.98%,表明该方法准确度良好。

表 2 大叶钩藤中 2 种生物碱的加样回收率 ($n = 6$)

Table 2 Recovery rates of two alkaloids in *Uncaria macrophylla* Wall. ($n = 6$)

成分 Component	原有量 Original quantity (mg)	加入量 Amount added (mg)	测得量 Measured quantity (mg)	回收率 Rate of recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	相对标准偏差 RSD (%)
柯诺辛碱 B Corynoxine B	0.642 5	0.896	1.553 3	101.65	99.47	1.56
	0.646 8	0.896	1.547 8	100.56		
	0.651 2	0.896	1.538 4	99.02		
	0.638 1	0.896	1.533 4	99.92		
	0.655 6	0.896	1.536 0	98.26		
	0.664 3	0.896	1.537 1	97.41		
柯诺辛碱 Corynoxine	1.548 3	2.156	3.727 5	101.08	100.06	0.98
	1.558 8	2.156	3.718 4	100.17		
	1.569 3	2.156	3.702 1	98.92		
	1.537 7	2.156	3.722 8	101.35		
	1.579 9	2.156	3.726 3	99.56		
	1.601 0	2.156	3.742 0	99.30		

2.6 样品测定

根据表3的结果可以看出,不同月份采收的大叶钩藤中柯诺辛碱B和柯诺辛碱的含量呈现无明显规律的波动现象,其中,8月份采收的药材中柯诺辛碱B和柯诺辛碱含量最高。

表3 柯诺辛碱B及柯诺辛碱含量测定结果

Table 3 Content determination results of corynoxine B and corynoxine

采收样品时间 Sample collected time	柯诺辛碱 B Corynoxine B (%)	柯诺辛碱 Corynoxine (%)
1月 January	0.06	0.15
2月 February	0.07	0.18
3月 March	0.09	0.24
4月 April	0.04	0.14
5月 May	0.05	0.16
6月 June	0.07	0.15
7月 July	0.09	0.18
8月 August	0.12	0.29
9月 September	0.05	0.13
10月 October	0.06	0.20
11月 November	0.05	0.19
12月 December	0.06	0.13
带钩茎枝细粉 Fine powder of stem and branch with hook	0.12	0.22
带钩茎枝纤维 Fiber of the stem and branch with hook	0.02	0.02
叶子 Leaf	0.05	0.29

3 讨论

2020年版《中华人民共和国药典》^[1]规定钩藤的药用部位为带钩茎枝,采收季节为秋冬季节。钩藤带钩茎枝在粉碎后常有较多纤维,很难继续被粉碎成细粉,这些纤维主要存在于药材的木质部中。因此,笔者将其单独取出,与过筛后的细粉分别测定其中柯诺辛碱B和柯诺辛碱的含量。结果显示,细粉中柯诺辛碱B和柯诺辛碱的含量要明显高于纤维中的含量,提示柯诺辛碱B和柯诺辛碱很可能主要存在于大叶钩藤带钩茎枝的皮部,在木质部中含量较低。带钩茎枝中的柯诺辛碱B含量明显高于叶子,柯诺辛碱含量则略低于叶子,但两个药用部位中柯诺辛碱B

和柯诺辛碱的含量之和却相同,提示大叶钩藤叶子可能也具有很好的药用价值。这对于2020年版《中华人民共和国药典》^[1]中关于“去叶”规定的合理性提出一定的思考。表3结果表明,8月份采收的药材中柯诺辛碱B和柯诺辛碱含量最高,这对药典规定“秋冬季节采收”提供一定的数据支撑。

根据2020年版《中华人民共和国药典》^[1]记载,钩藤项下只有1个薄层鉴别项,没有含量测定项,质量控制指标还有所欠缺,质量标准有待完善。随着中药现代化、国际化的发展,人们对药材质量标准的制定提出了更高的要求,一个能体现药材药理学特征和优良临床价值的质量评价体系显得越发重要,这就要求广大科研工作者运用各种技术,获取药材环境、遗传、性状、化学、药理等特征数据^[7]。

4 结论

本研究方法可准确、快捷地测定大叶钩藤中柯诺辛碱B和柯诺辛碱的含量,该结果可为大叶钩藤的化学成分、适宜采收季节和药用部位的研究提供科学数据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:268.
- [2] 王本华. 对中药钩藤抗高血压有效成分及其抗高血压效果的研究[J]. 当代医药论丛, 2015, 13(15):28-29.
- [3] YAN F X, MAO Q Q, WU J C, et al. Isorhynchophylline treatment improves the amyloid- β -induced cognitive impairment in rats via inhibition of neuronal apoptosis and tau protein hyperphosphorylation [J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2014, 39(2):331-346.
- [4] 黄宝媛, 曾常青, 曾宇, 等. 钩藤总生物碱对 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响及机制研究 [J]. 中药材, 2017, 40(3):707-710.
- [5] 郭晓敏, 黄宝媛, 曾常青, 等. 钩藤生物碱提取物及其单体逆转 HepG2/ADM 细胞耐药活性的筛选 [J]. 广东药学院学报, 2018, 34(4):447-451.
- [6] HUANG B Y, ZENG Y, YING J L, et al. *Uncaria alkaloids* reverse ABCB1-mediated cancer multidrug resistance [J]. International Journal of Oncology, 2017, 51:257-268.
- [7] 赵军宁, 华桦, 戴瑛, 等. 道地药材药理学与道地药材标准构建新思路 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(4):709-714.

Determination and Analysis of the Content of Corynoxine B and Corynoxine in *Uncaria macrophylla* Wall.

YANG Haichuan^{1,2}, ZHANG Yunyun^{1,2}, ZHANG Ying^{1,2}, WU Kai^{1,2}, LI Jia^{1,2}

(1. Department of Chemistry, Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards of Guangxi, Nanning, Guangxi, 530022, China)

Abstract: In order to establish a method for the determination of Corynoxine B and Corynoxine in *Uncaria macrophylla* Wall., the contents of Corynoxine B and Corynoxine in different harvest months and different medicinal parts were determined by high performance liquid chromatography. The analysis was carried out on an Inertsil ODS-3 C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using a mixture of 68% methanol and 32% triethylamine aqueous solution with concentration of 0.02% as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature was 25°C and the wavelength for measurement was 246 nm. The experimental results showed that the sample size of Corynoxine B was 0.130 – 1.950 μg, and the sample size of Corynoxine was 0.296 – 4.440 μg. There was a good linear relationship with the peak area, and the correlation coefficient *r* was both 1.000 0 (*n* = 5). The average recovery (*n* = 6) for Corynoxine B and Corynoxine was 99.47% and 100.06%, respectively. RSD was 1.56% and 0.98% respectively. The method is simple, reproducible and can provide scientific basis for the quality control of *Uncaria rhynchophylla*.

Key words: *Uncaria macrophylla* Wall., Corynoxine B, Corynoxine, content determination, harvest time, medicinal parts

责任编辑:陆雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>