

广西不同产地和不同采收期大叶钩藤中钩藤碱定量分析

黄瑞松¹, 覃冬杰², 张 鹏³, 黄必奎⁴, 陶宛平⁴, 刘 婧¹

1. 广西民族医药研究院, 广西 南宁 530001

2. 广西医科大学, 广西 南宁 530021

3. 广西大学, 广西 南宁 530004

4. 广西百色食品药品检验所, 广西 百色 533000

摘 要: 目的 研究广西不同产地大叶钩藤药材质量并确定其最佳采收期。方法 采用 HPLC 法测定 21 批广西不同产地和其中 3 个产地不同采收期大叶钩藤中钩藤碱的量。色谱柱为 Gemini C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(0.002 mol/L 三乙胺, pH 7.5)(64:36), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm。结果 广西不同产地 21 批大叶钩藤药材钩藤碱量均较高, 但产地间差异较大; 不同采收期大叶钩藤中钩藤碱的动态积累略有差异。结论 广西不同产地大叶钩藤药材质量均较好, 但质量随产地不同而异; 大叶钩藤药材一年四季均可采收。

关键词: 大叶钩藤; 产地; 定量分析; 钩藤碱; 最佳采收期

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0178-04

Analysis on rhynchophylline in *Uncaria macrophylla* from different habitats in Guangxi at various periods

HUANG Rui-song¹, QIN Dong-jie², ZHANG Peng³, HUANG Bi-kui⁴, TAO Yao-ping⁴, LIU Jing¹

1. Guangxi Academy of Minority Nationality Medicine and Pharmacology, Nanning 530001, China

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. Guangxi University, Nanning 530004, China

4. Baise Institute for Food and Drug Control, Baise 533000, China

Key words: *Uncaria macrophylla* Wall.; habitats; quantitative analysis; rhynchophylline; best harvest period

钩藤为中医及壮、瑶民族常用药材, 具有息风定惊、清热平肝的功能。大叶钩藤为茜草科钩藤属植物 *Uncaria macrophylla* Wall., 系《中国药典》2010 年版一部钩藤收载的 5 个植物来源之一, 以带钩茎枝入药^[1]。文献记载, 该植物在广西资源丰富, 主要分布于上林、大新、崇左、邕宁、南宁、隆安、防城、上思、博白、百色、平果、靖西、凌云、田林、巴马等地^[2-3]; 据本课题组调查, 除了上述文献记载的产地外, 龙州、宁明、凭祥、东兰、那坡、浦北等地亦有分布。现代研究证实, 大叶钩藤主要含钩藤碱、异钩藤碱、帽柱木碱、异翅果定碱、柯诺辛碱等成分; 降压作用作为主要药效之一, 其主要有效成分为钩藤碱和异钩藤碱^[4-8]。目前对大叶钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的测定已有报道^[4], 但对其不同产地和不同采收期药材主要有效成分变化的研

究涉及甚少, 质量分析评价缺乏依据。为此, 本实验采集了广西不同产地 21 批和其中 3 个产地不同采收期大叶钩藤样品进行钩藤碱的测定分析, 为评价广西不同产地大叶钩藤药材质量、确定药材最佳采收期及进一步开发利用大叶钩藤资源提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC—20AT 高效液相色谱仪, 二极管阵列检测器, LC Solution 色谱工作站(均为日本岛津公司); SB3200DTS 双频超声清洗仪(功率 180 W, 频率 40 kHz, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 雷磁 pHs—3CpH 计(上海精科有限公司); XS205 电子天平(瑞士梅特勒公司); EASYPURE II 超纯水器(美国热电公司)。

收稿日期: 2011-08-20

基金项目: 广西科学基金项目应用基础研究专项资助(桂科基 0991007)

作者简介: 黄瑞松(1958—), 男, 主任药师, 教授, 主要从事中草药化学分析和新药研究。

1.2 材料

共采集 21 批不同产地大叶钩藤带钩茎枝样品, 详见表 1。其中 1、4、15 号产地每间隔 1 个月采集 1 次, 共采集 12 个月。全部样品的标本分别经广西中医学院刘寿养副教授、朱意麟讲师及广西中医药研究院严克俭助理研究员鉴定, 均为大叶钩藤 *Uncaria macrophylla* Wall.。钩藤碱对照品(批号 100603, 质量分数 >98%) 购于上海融禾医药科技有限公司; 流动相所用甲醇、乙腈色谱纯(美国 Fisher Scientific); 水为自制超纯水; 其余化学试剂为分析纯。

表 1 大叶钩藤样品来源

Table 1 Origin of *U. macrophylla*

编号	产地	采集时间
1	南宁市兴宁区高峰林场	2009-01
2	南宁市兴宁区广西药用植物园 1	2007-09
3	南宁市兴宁区广西药用植物园 2	2010-06
4	南宁市邕宁区四塘镇高峰林场延河分场	2009-11
5	隆安县龙虎山自然保护区	2010-08
6	隆安县城厢镇良二村	2011-03
7	上林县西燕镇云陶村	2011-07
8	龙州县宾桥乡先锋农场	2007-10
9	龙州县下冻乡扶伦村	2010-03
10	凭祥市夏石镇榴利村	2009-11
11	凭祥市凭祥镇三塘	2010-03
12	凭祥市夏石镇丰乐村	2010-03
13	宁明县桐棉镇桐棉村	2010-03
14	宁明县爱店镇那党村	2010-04
15	百色市右江区平山林场	2009-09
16	靖西县福润乡那国村	2010-07
17	那坡县平当镇那珍村	2010-06
18	巴马县巴马镇巴马村	2010-04
19	浦北县小江镇文山村	2010-04
20	上思县叫安乡提高村	2010-08
21	博白县那林镇六岗村	2011-11

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Gemini C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(0.002 mol/L 三乙胺, 用冰醋酸调 pH 值 7.5)(64:36); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 254 nm。

2.2 对照品、供试品和阴性对照溶液的制备

取钩藤碱对照品适量, 精密称定, 加 75%甲醇制成约 30 μg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

取大叶钩藤粉末(过 60 目筛)约 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 75%甲醇 15 mL, 称定质量, 静置 60 min, 超声处理 40 min, 放冷, 用 75%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液; 以 75%甲醇溶液作为阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别吸取“2.2”项下的对照品、供试品和阴性对照溶液各 20 μL 进样, 按上述色谱条件测定。供试品溶液色谱图中有与钩藤碱保留时间相同的吸收峰, 阴性对照溶液无此吸收峰。说明本方法测定大叶钩藤药材钩藤碱无阴性干扰, 专属性强。色谱图见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密称取钩藤碱对照品 10.45 mg, 加 75%甲醇定容至 100 mL, 分别精密吸取 0.1、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL, 各加 75%甲醇定容至 10 mL。分别精密吸取上述稀释液 20 μL, 测定峰面积, 以峰面积积分值为纵坐标(Y), 钩藤碱进样量为横坐标(X), 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=1\ 945\ 033.9 X-22\ 315$, $r=0.999\ 8$, 钩藤碱在 0.020 9~1.672 0 μg 与峰面积呈良好线性关系。

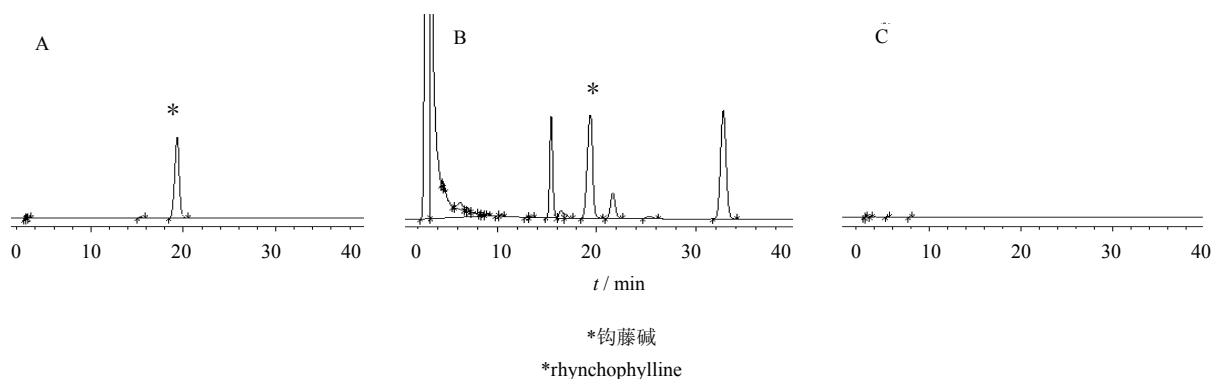


图 1 钩藤碱对照品(A)、供试品溶液(B)、阴性对照液(C)HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of rhynchophylline reference substance (A), sample solution (B), and negative control (C)

2.4.2 精密度试验 取 1 号样品供试品溶液重复进样 5 次, 测定, 结果供试品溶液钩藤碱峰面积的 RSD 为 0.3%。

2.4.3 重现性试验 取 1 号样品制备的 6 份平行溶液进行测定。6 份样品钩藤碱质量分数的 RSD 为 0.9%。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取 1 号样品供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、24 h 进样测定, 各次测定钩藤碱量的 RSD 为 1.5%。

2.4.5 加样回收率试验 取已测定的 1 号药材粉末约 0.1 g, 共 6 份, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入新配制的钩藤碱甲醇溶液 (0.034 3 g/L) 15 mL, 照“2.2”项方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 20 μ L 进样测定。钩藤碱平均回收率为 98.96%, RSD 为 0.7%。

2.5 样品测定

分别取钩藤碱对照品、各产地样品及 1、4、15 号产地各 12 份样品, 按照“2.2”项方法制备对照品

和供试品溶液, 按照“2.1”项色谱条件测定。结果见表 2、3。

表 2 不同产地大叶钩藤中钩藤碱量 ($n=3$)

Table 2 Rhynchophylline content of *U. macrophylla* from different habitats ($n=3$)

编 号	钩藤碱 / %	编 号	钩藤碱 / %
1	0.384	12	0.443
2	0.253	13	0.364
3	0.143	14	0.260
4	0.307	15	0.308
5	0.398	16	0.270
6	0.642	17	0.282
7	0.455	18	0.496
8	0.401	19	0.495
9	0.441	20	0.292
10	0.511	21	0.301
11	0.419		

表 3 不同采收期 3 个产地大叶钩藤中钩藤碱的动态积累 ($n=3$)

Table 3 Dynamic of rhynchophylline accumulation in *U. macrophylla* from three different habitats at various periods ($n=3$)

编号	采集时间	钩藤碱 / %	编号	采集时间	钩藤碱 / %	编号	采集时间	钩藤碱 / %
1-1	2009-01	0.384	4-1	2009-01	0.330	15-1	2009-01	0.539
1-2	2009-02	0.380	4-2	2009-02	0.350	15-2	2009-02	0.398
1-3	2009-03	0.361	4-3	2009-03	0.419	15-3	2009-03	0.465
1-4	2009-04	0.323	4-4	2009-04	0.305	15-4	2009-04	0.437
1-5	2009-05	0.367	4-5	2009-05	0.299	15-5	2009-05	0.445
1-6	2009-06	0.378	4-6	2009-06	0.302	15-6	2009-06	0.425
1-7	2009-07	0.424	4-7	2009-07	0.301	15-7	2009-07	0.536
1-8	2009-08	0.387	4-8	2009-08	0.354	15-8	2009-08	0.521
1-9	2009-09	0.362	4-9	2009-09	0.368	15-9	2009-09	0.308
1-10	2009-10	0.307	4-10	2009-10	0.387	15-10	2009-10	0.586
1-11	2009-11	0.360	4-11	2009-11	0.307	15-11	2009-11	0.432
1-12	2009-12	0.424	4-12	2009-12	0.279	15-12	2009-12	0.588

3 结果与讨论

历版《中国药典》均未制订钩藤药材的定量测定方法。本实验方法是建立在提取方法和色谱条件摸索试验的基础上, 经方法学考察, 符合中药定量测定的技术要求。

大叶钩藤是广西钩藤属植物中分布较广、产量较大的品种之一, 对其所含生物碱化学成分已有所了解, 但该属植物化学成分复杂, 对其不同产地和不同采收期药材的生物碱成分的变化了解甚少, 对该植物药材的质量缺乏正确的评价。本研究发现,

大叶钩藤在广西钩藤属植物药材中是唯一各地所采样品均可检出钩藤碱且量最高的品种, 其他品种如钩藤、无柄果钩藤、毛钩藤和华钩藤等均有未能检出钩藤碱的情况, 且能检出钩藤碱的样品定量大多较大叶钩藤低。文献记载, 广西 3 个产地和云南 3 个产地的大叶钩藤钩藤碱量在 0.037%~0.223%, 整体上广西产地较云南产地高^[4]。本研究结果表明, 广西不同产地采集的 21 批大叶钩藤药材样品均含钩藤碱, 且量较高, 以药材干燥品计算, 各地样品钩藤碱在 0.143%~0.642%, 平均量为 0.375%, 除

了1批样品(产于南宁市兴宁区广西药用植物园2的3号样品)的量为0.143%以外,其余20批样品均大于0.200%,最高为产于隆安县城厢镇良二村的6号样品,这说明广西各地大叶钩藤药材质量较好。但广西各地大叶钩藤药材的质量仍随着产地的不同而异,如产于隆安县城厢镇良二村(6号)的样品钩藤碱量为南宁市兴宁区广西药用植物园(3号)样品的4.5倍。即使同一县(或市),采集区域不同钩藤碱量也有明显差异,如1~3号样品均产于南宁市兴宁区,但采集区域不同,钩藤碱量差异较大。这可能与大叶钩藤植物种质资源的遗传特性及生长环境的不同有关。

关于钩藤的采集时间,古籍及现代文献均有记载,但各种文献记载的采集时间有所不同。《本草图经》记载“三月采”^[9];《中国药典》2010版一部记载“秋、冬二季采收”^[1];《新编中药志》则记载“9月至翌年4月”采制^[4]。本课题组在调查中发现广西壮、瑶族民间各地对其采收季节无严格规定,一年四季均有采收为此选择南宁市兴宁区高峰林场(1号)、南宁市邕宁区四塘镇高峰林场延河分场(4号)和百色市右江区平山林场(15号)3个产地的大叶钩藤,在一年内进行不同采收期钩藤碱成分的动态积累观察。结果表明,3个观察点的同一产地不同采收期采集的样品钩藤碱量(以干燥品计算)

均各有一定差异,但差异无规律性,如1号产地最高为7月份和12月份(均为0.424%),最低为10月份(0.307%);4号产地量最高为3月份(0.419%),最低为12月份(0.279%);15号产地量最高为12月份(0.588%),最低为9月份(0.308%)。因此,广西壮、瑶民间一年四季均可采收钩藤的经验则应该是较合理的。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 覃海宁,刘演.广西植物名录[M].北京:科学出版社,2010.
- [3] 广西壮族自治区中医药研究所.广西药用植物名录[M].南宁:广西人民出版社,1986.
- [4] 肖培根.新编中药志(第3卷)[M].北京:化学工业出版社,2002.
- [5] 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.
- [6] 朱爽,周林,黄楷鸿,等.毛钩藤和无柄果钩藤的ITS序列分析研究[J].中草药,2010,41(10):1696-1700.
- [7] 黄家康.常用中药成分与药理手册[M].北京:中国医药科技出版社,1994.
- [8] 宋纯清,樊懿,黄伟晖,等.钩藤中不同成分降压作用的差异[J].中草药,2000,31(10):762.
- [9] 江苏新医学院.中药大辞典(下册)[M].上海:上海科学技术出版社,1986.