

## HPLC 法同时测定钩吻茎中胡蔓藤碱丙等 6 个生物碱的含量\*

谌赛男, 王河山\*\*, 曾靖舒, 周也莅, 雷仙武, 林贵男, 吴水生\*\*

(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

**摘要** 目的: 建立 HPLC 法同时测定钩吻茎中胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙的含量, 并比较评价各产地钩吻生物碱含量的差异。方法: 采用外标法进行测定, 色谱柱为 ZORBAX Bonus-RP Analytical (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C。分别测定 32 批钩吻茎, 并进行聚类分析。结果: 胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱、胡蔓藤碱乙 6 个成分的线性范围分别为 1.00~50.06 μg · mL<sup>-1</sup> (r=1.000 0)、1.13~50.85 μg · mL<sup>-1</sup> (r=0.999 8)、1.16~52.20 μg · mL<sup>-1</sup> (r=1.000 0)、1.16~52.20 μg · mL<sup>-1</sup> (r=0.999 7)、1.06~50.88 μg · mL<sup>-1</sup> (r=0.999 7) 和 1.01~50.50 μg · mL<sup>-1</sup> (r=1.000 0), 平均加样回收率为 93.1%~103.8% (RSD 为 2.0%~2.9%)。不同产地样品中钩吻茎中胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙含量范围分别为 0.136~2.202、0.564~2.686、0.718~3.553、0.160~2.025、0.151~3.493、0.288~4.700 mg · g<sup>-1</sup>。结果显示不同产地的钩吻 6 个成分含量均有差异, 32 批不同产地钩吻药材可聚为 6 大类。结论: 该法可为钩吻多指标成分的质量评价提供参考。不同产地钩吻的各个化学成分的含量呈现明显分类特点, 为钩吻地区鉴定提供依据。

**关键词:** 钩吻; 断肠草; 胡蔓藤; 大茶药; 野葛; 生物碱成分; 胡蔓藤碱丙; 钩吻素甲; 钩吻素子; 钩吻素己; 钩吻绿碱; 胡蔓藤碱乙; 中药多组分含量测定; 聚类分析; 高效液相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 04-0595-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.04.06

## Simultaneous determination of 6 major alkaloids including humantenidine in the stem of *Gelsemium elegans* Benth. by HPLC\*

CHEN Sai-nan, WANG He-shan\*\*, ZENG Jing-shu, ZHOU Ye-li,

LEI Xian-wu, LIN Gui-nan, WU Shui-sheng\*\*

(School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of 6 major alkaloids including humantenidine, gelsemine, koumine, gelsenicine, gelsevirine and humantenine in the stem of *Gelsemium elegans*

\* 福建省自然科学基金项目 (2017J0106); 福建省教育厅资助课题 (JA16154、JAT160224); 高等学校博士学科点专项科研基金联合资助项目 (20133519/110005); 福建省“大学生创新创业训练计划”项目 (201410393060、201410393062、201410393032); 福建中医药大学校管课题 (2014146-学科)

\*\* 通信作者 王河山 Tel: 18050195110; E-mail: whs007chq@126.com

吴水生 Tel: (0591) 22861135; E-mail: wsstcm@yahoo.cn

第一作者 Tel: 18950490357; E-mail: 18950490357@163.com

Benth., and to compare the difference of the contents of these alkaloids in samples from different habitats. **Methods:** The external standard method was performed on a ZORBAX Bonus-RP Analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a gradient elution using methanol and 0.1% formic acid. The column temperature was 30 °C. The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was set at 254 nm. 32 batches of samples were determined and the results were analyzed by cluster analysis. **Results:** The linear ranges of humanenidine, gelsemine, koumine, gelsenicine, gelsevirine and humanenine were 1.00–50.06 μg · mL<sup>-1</sup> ( $r=1.000\ 0$ ), 1.13–50.85 μg · mL<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 8$ ), 1.16–52.20 μg · mL<sup>-1</sup> ( $r=1.000\ 0$ ), 1.16–52.20 μg · mL<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 7$ ), 1.06–50.88 μg · mL<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 7$ ), 1.01–50.50 μg · mL<sup>-1</sup> ( $r=1.000\ 0$ ), respectively. The average recoveries were 93.1%–103.8% with the RSD ranging from 2.0% to 2.9%. The content ranges of humanenidine, gelsemine, koumine, gelsenicine, gelsevirine and humanenine in samples from different habitats were 0.136–2.202, 0.564–2.686, 0.718–3.553, 0.160–2.025, 0.151–3.493 and 0.288–4.700 mg · g<sup>-1</sup>, respectively. 6 alkaloids in samples varied in habitats and 32 batches of samples could be clustered into 6 classifications. **Conclusion:** The proposed method offered reference for multi-component determination of *G. elegans*. Obvious classification was found in contents of 6 compounds in *G. elegans* from different habitats, which provided basis for habitat identification of the drug.

**Keywords:** *Gelsemium elegans* Benth.; Duanchangcao; Humanteng; Dachayao; Yege; alkaloids; humanenidine; gelsemine; koumine; gelsenicine; gelsevirin; humanenine; multicomponent determination of traditional Chinese medicine (TCM); cluster analysis; HPLC

钩吻 *Gelsemium elegans* Benth. 是马钱科 Loganiaceae 钩吻属 *Gelsemium* 植物, 又名断肠草、胡蔓藤、大茶药、野葛等<sup>[1]</sup>, 中医理论认为其性温, 味苦、辛, 有大毒<sup>[2]</sup>, 主要分布于浙江、福建、广东、广西等省, 以全草入药, 其中地上部分因生物量大, 可持续采收, 目前已成为福建、浙江等地种植户供应的主要药用部位之一。20 世纪 80 年代, 临床以钩吻为主要原料的钩吻制剂在各种肿瘤治疗上均取得显著疗效, 民间常用, 但质量是否一致, 即不同产地钩吻化学成分有无差异鲜有报道。钩吻的主要化学成分是吲哚类生物碱, 现代药理研究表明其是钩吻抗肿瘤<sup>[3-6]</sup>、抗炎镇痛<sup>[7-11]</sup>、增强免疫<sup>[12]</sup>、散瞳<sup>[13]</sup>等作用的药效物质基础。查阅文献, 目前钩吻质量评价方法已有报道, 但是仅仅测定 2 到 3 个生物碱的含量, 难以全面反映钩吻内在质量<sup>[14-15]</sup>, 课题组前期对钩吻进行化学成分分离鉴定研究, 从钩吻中分离出 16 个生物碱, 其中 6 个生物碱即胡蔓藤碱丙 (humanenidine)、钩吻素甲 (gelsemine)、钩吻素子 (koumine)、钩吻素己 (gelsenicine)、钩吻绿碱 (gelsevirine)、胡蔓藤碱乙 (humanenine) 分离量最多, 提示这 6 个生物碱是钩吻的主要生物碱成分, 化学结构见图 1。

因此, 本文采用 HPLC 法同时测定钩吻中胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱、胡蔓藤碱乙 6 个生物碱的含量, 同时比较这些生物碱在 32 批

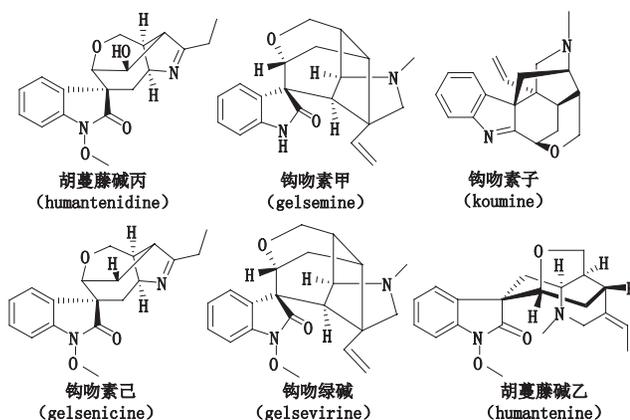


图 1 钩吻中 6 个生物碱类成分的结构

Fig. 1 Chemical structures of six alkaloids in *Gelsemium elegans*

不同产地钩吻药材中的含量差异, 为钩吻的质量控制、资源评价、安全用药等提供科学的分析方法和依据。

## 1 仪器与试剂

安捷伦公司 Agilent Technologies 1260 高效液相色谱仪 (包括 G1311C 四元泵、G1329B 自动进样器、G1315B 二极管阵列检测器、G1316A 柱温箱和 Agilent ChemStation 工作站); 安捷伦公司 Agilent ZORBAX Bonus-RP Analytical 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料: 长烷基链中嵌入极性酰胺基团); CPA225D 型十万分之一分析天平 (Sartorius 公司); KQ-500E 型

台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DFY-500 型中药粉碎机(温州市林大机械有限公司); Milli-Q 超纯水仪(Millipore 公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯,甲酸为色谱纯。

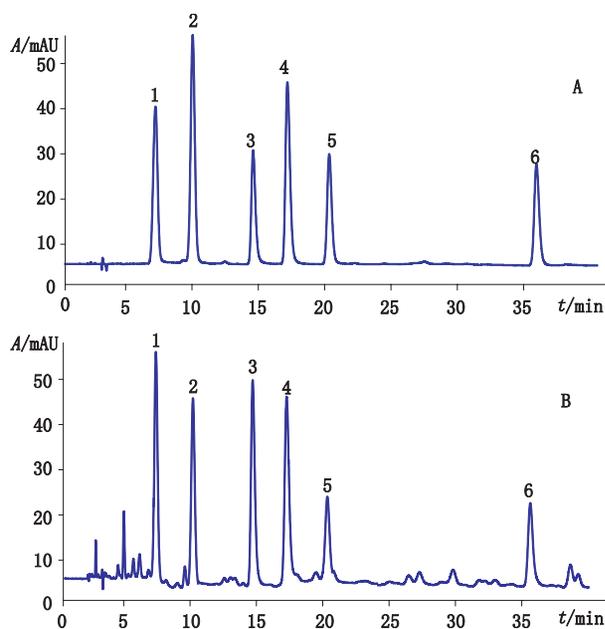
对照品胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙均为实验室自制,将各化合物的  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR 和 MS 数据与文献[16-21]进行比较确认,以 HPLC-UV 检测的纯度均大于 98.5%。

32 批钩吻茎收集于不同产地(见表 3),经福建中医药大学药学院范世明高级实验师鉴定为马钱科胡蔓藤属植物钩吻(*Gelsemium elegans* Benth.)的干燥茎。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Bonus-RP Analytical (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇(A)-0.1% 甲酸水(B) 溶液, 梯度洗脱(0~30 min, 2%A → 10%A; 30~40 min, 10%A → 15%A); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。在上述色谱条件下,对照品与样品的色谱图见图 2。



1. 胡蔓藤碱丙(humantenidine) 2. 钩吻素甲(gelsemine) 3. 钩吻素子(koumine) 4. 钩吻素己(gelsenicine) 5. 钩吻绿碱(gelsevirine) 6. 胡蔓藤碱乙(humantenine)

图 2 混合对照品(A)及样品 S19(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances(A) and sample S19(B)

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 对照品储备液 精密称取胡蔓藤碱丙、钩吻素

甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙的对照品适量,分别置于 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释到刻度,摇匀,分别得到质量浓度为 200.2、226.0、232.0、232.0、212.0、202.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的单一对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 药材经粉碎机粉碎,过 40 目筛。取样品粉末约 0.2 g,精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入 50% 甲醇水(含 0.1% 甲酸)25 mL, 密塞,称量,超声(功率 250 W,频率 80 kHz)处理 30 min, 放冷,再称量,用 50% 甲醇水(含 0.1% 甲酸)补足减失的量,摇匀,离心(4 000 r · min<sup>-1</sup>)10 min, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,取续滤液,即得。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 取“2.2.1”项下方法制备的各对照品储备液,用 50% 甲醇水稀释,配成胡蔓藤碱丙质量浓度分别为 1.00、2.00、5.01、10.01、20.02、30.03、50.05  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 钩吻素甲质量浓度分别为 1.13、2.26、5.65、11.30、22.60、33.90、50.85  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 钩吻素子质量浓度分别为 1.16、2.32、5.80、11.60、23.20、34.80、52.20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 钩吻素己质量浓度分别为 1.16、2.32、5.80、11.60、23.20、34.80、52.20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 钩吻绿碱质量浓度分别为 1.06、2.12、5.30、10.60、21.20、30.74、50.88  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 胡蔓藤碱乙质量浓度分别为 1.01、3.03、5.05、10.10、30.30、40.40、50.50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进行分析,以质量浓度  $X$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标,峰面积均值  $Y$  为纵坐标,进行回归处理,得到 6 个分析物的回归方程。以信噪比( $S/N$ )为 3:1 和 10:1 为基准测得各化合物的检测限和定量限,结果见表 1。

2.3.2 精密度试验 日内精密度:精密吸取混合对照品溶液(胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙质量浓度分别为 20.02、22.60、23.20、23.20、21.20、30.30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )10  $\mu\text{L}$ , 在上述色谱条件下连续进样 6 次,测得胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙峰面积的 RSD 分别为 0.57%、0.17%、0.47%、0.16%、1.2% 和 0.75%。日间精密度:精密吸取上述混合对照品溶液连续测定 3 d,每天测定 6 次,测得胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙峰面积的 RSD 分别为 0.88%、0.38%、0.73%、0.56%、1.0% 和 1.1%,结果表明精密度良好。

表 1 6 个成分的线性关系、检测限及定量限  
Tab. 1 Linearity, LOD and LOQ of six alkaloids

成分 (component)	线性范围 (linear range)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	检测限 (LOD)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	定量限 (LOQ)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
胡蔓藤碱丙 (humantenidine)	1.00~50.05	$Y=11.114 5X+0.920 6$	1.000 0	0.065 8	0.219 3
钩吻素甲 (gelsemine)	1.13~50.85	$Y=11.247 3X+1.976 4$	0.999 8	0.197 1	0.500 0
钩吻素子 (koumine)	1.16~52.20	$Y=7.937 3X-0.495 7$	1.000 0	0.212 2	0.816 9
钩吻素己 (gelsenicine)	1.16~52.20	$Y=13.546 0X+0.627 3$	0.999 7	0.378 2	0.527 3
钩吻绿碱 (gelsevirine)	1.06~50.88	$Y=5.396 6X-0.191 8$	0.999 7	0.256 5	0.736 1
胡蔓藤碱乙 (humantenine)	1.01~50.50	$Y=7.261 5X+0.923 6$	1.000 0	0.360 7	0.841 7

**2.3.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液(样品编号为 S19),分别在制备后 0、2、4、10、12 和 24 h 进样 10  $\mu\text{L}$ ,记录胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙的峰面积,计算得峰面积的 RSD 分别为 1.3%、0.97%、0.33%、0.92%、0.35% 和 0.38%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.3.4 重复性试验** 取同一样品(编号为 S19)0.2 g 共 6 份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样测定,测得胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱

乙平均含量分别为 2.202、1.907、3.178、2.025、2.376、1.778  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,含量 RSD 分别为 1.2%、0.34%、0.76%、0.89%、0.65% 和 1.192%。结果表明重复性良好。

**2.3.5 加样回收率试验** 取“2.3.4”项下已测知 6 个成分含量的样品粉末 0.1 g 共 9 份,精密称定,每 3 份加入相同量(分别为已知含量的 80%、100%、120%)的胡蔓藤碱丙、钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙的对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,进样测定,计算各待测成分的加样回收率,结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果  
Tab. 2 Results of recovery tests

成分 (component)	样品含量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得值 (found)/mg	平均回收率 (average recovery)/% (n=9)	RSD/%
胡蔓藤碱丙 (humantenidine)	220.20	180	410.54 $\pm$ 0.07	103.8	2.8
		225	452.73 $\pm$ 0.10		
		258	485.32 $\pm$ 0.05		
钩吻素甲 (gelsemine)	190.66	150	345.38 $\pm$ 0.04	103.3	2.1
		203	400.10 $\pm$ 0.16		
		235	433.49 $\pm$ 0.04		
钩吻素子 (koumine)	317.76	248	560.78 $\pm$ 0.13	98.8	2.3
		310	628.39 $\pm$ 0.24		
		379	690.12 $\pm$ 0.12		
钩吻素己 (gelsenicine)	202.47	158	350.73 $\pm$ 0.03	94.5	2.7
		197	383.54 $\pm$ 0.09		
		236	430.58 $\pm$ 0.02		
钩吻绿碱 (gelsevirine)	237.58	180	410.28 $\pm$ 0.13	96.9	2.0
		230	462.51 $\pm$ 0.20		
		282	509.93 $\pm$ 0.21		
胡蔓藤碱乙 (humantenine)	177.77	140	306.98 $\pm$ 0.07	93.1	2.9
		173	338.74 $\pm$ 0.07		
		215	378.63 $\pm$ 0.02		

**2.4 样品测定**

称取干燥的 32 批不同产地钩吻茎样品粉末 0.2 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述“2.1”

项下色谱条件进样 10 μL 测定峰面积, 根据标准曲线计算其含量, 结果见表 3。

**表 3 样品含量测定结果 (n=3)**
**Tab. 3 The contents of six alkaloids in 32 batches of *Gelsemium elegans* from different habitats**

样品编号 (sample No.)	来源 (habitat)	含量 (content) / (mg · g <sup>-1</sup> )						总量 (total) / (mg · g <sup>-1</sup> )
		胡蔓藤碱丙 (humantenidine)	钩吻碱甲 (gelsemine)	钩吻素子 (koumine)	钩吻素己 (gelsenicine)	钩吻绿碱 (gelsevirine)	胡蔓藤碱乙 (humantenine)	
S1	广东肇庆 (Zhaoqin, Guangdong)	0.560	0.984	2.743	0.735	2.451	1.083	8.556
S2	广东肇庆 (Zhaoqin, Guangdong)	0.587	0.704	2.064	1.181	1.548	1.173	7.257
S3	广西南宁 (Nanning, Guangxi)	0.247	0.851	1.397	0.646	0.776	0.668	4.585
S4	广西南宁 (Nanning, Guangxi)	0.251	0.959	1.948	0.529	1.442	0.841	5.970
S5	广西河池 (Hechi, Guangxi)	0.439	0.822	2.475	0.988	0.835	1.083	6.642
S6	广西贵港 (Guigang, Guangxi)	2.192	2.686	3.315	0.410	2.920	1.780	13.301
S7	浙江丽水 (Lishui, Zhejiang)	0.273	2.513	1.874	0.287	1.730	0.702	7.379
S8	安徽六安 (Luan, Anhui)	0.234	1.375	0.913	0.526	0.197	0.632	3.877
S9	江西赣州 (Ganzhou, Jiangxi)	-	0.564	0.779	0.275	0.887	1.066	3.571
S10	湖北荆门 (Jingmen, Hubei)	-	0.635	1.033	0.387	1.138	1.014	4.208
S11	福建宁德 (Ningde, Fujian)	0.934	1.137	3.242	1.694	2.585	2.060	11.651
S12	福建宁德 (Ningde, Fujian)	0.373	0.938	3.551	0.948	1.851	1.761	9.422
S13	福建龙岩 (Longyan, Fujian)	0.684	1.864	3.553	1.370	3.034	1.840	12.345
S14	福建龙岩 (Longyan, Fujian)	0.196	2.211	1.630	0.202	1.476	1.091	6.806
S15	福建龙岩 (Longyan, Fujian)	0.136	1.321	0.718	0.160	0.343	0.288	2.967
S16	福建龙岩 (Longyan, Fujian)	0.882	2.011	3.487	1.187	2.713	1.404	11.683
S17	福建龙岩 (Longyan, Fujian)	0.348	1.249	3.367	0.490	2.500	1.685	9.639
S18	福建龙岩 (Longyan, Fujian)	0.588	1.591	3.056	1.336	2.959	1.755	11.285
S19	福建福州 (Fuzhou, Fujian)	2.202	1.907	3.178	2.025	2.376	1.778	13.464
S20	福建福州 (Fuzhou, Fujian)	0.192	-	2.592	0.909	0.151	4.700	8.544
S21	福建福州 (Fuzhou, Fujian)	0.214	1.010	2.736	0.592	2.170	1.578	8.300
S22	福建福州 (Fuzhou, Fujian)	0.551	0.686	1.455	0.434	0.982	0.936	5.045
S23	福建漳州 (Zhangzhou, Fujian)	0.417	1.240	2.548	1.150	2.232	0.976	8.563
S24	福建漳州 (Zhangzhou, Fujian)	0.458	1.538	2.045	1.043	1.953	1.004	8.041
S25	福建泉州 (Quanzhou, Fujian)	0.675	1.579	3.047	0.967	3.077	2.181	11.526
S26	福建泉州 (Quanzhou, Fujian)	0.508	1.522	2.821	0.836	2.254	1.383	9.324
S27	福建泉州 (Quanzhou, Fujian)	0.542	2.049	0.983	1.570	3.493	2.606	11.244
S28	福建厦门 (Xiamen, Fujian)	0.542	0.716	2.467	0.650	0.766	1.126	6.266
S29	福建莆田 (Putian, Fujian)	0.809	1.441	3.329	1.036	2.228	1.882	10.725
S30	福建莆田 (Putian, Fujian)	0.969	1.380	2.943	1.195	2.616	1.881	10.984
S31	福建三明 (Sanming, Fujian)	0.588	1.058	2.585	0.954	1.866	1.237	8.286
S32	福建三明 (Sanming, Fujian)	0.631	1.573	3.269	1.470	2.467	0.933	10.342
RSD/%		80.18	40.88	37.21	52.62	48.53	54.73	34.56

注 (note): “-” 为未检出 (“-” mean not detected)

## 2.5 聚类分析

运用 DPS 14.50 数据处理软件分析: 采用系统聚类法, 以 6 种被测物含量为变量, 以卡方距离为指标, 对 32 批钩吻样品进行聚类分析(离差平方和法)分析, 得到钩吻样品聚类图, 见图 3。当距离介于 1.50~2.00 时, 可以将 32 个批次分为 6 类, S1、S12、S17、S21、S23、S24、S26、S31 为第 1 类, S2、S3、S4、S5、S9、S10、S22、S28 为第 2 类, S6、S19 为第 3 类, S7、S8、S14、S15 为第 4 类, S20 为第 5 类, S11、S13、S16、S18、S25、S27、S29、S30、S32 为第 6 类。其中第 1、2、3、5、6 类中钩吻素子含量最高, 其含量范围分别主要集中在 2.5~3、1~2.5、3、2.5、3~3.5  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 且在第 3 类中, 除钩吻素己外各个化合物的含量均很接近; 第 4 类中钩吻素甲含量最高。因此 6 类得以区分。

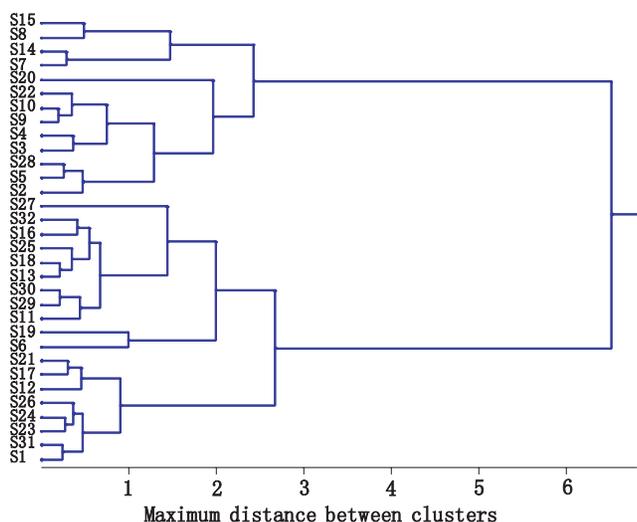


图 3 聚类分析树状图

Fig. 3 The cluster analysis dendrogram

## 3 讨论

### 3.1 提取方法和色谱条件的优化

比较了水、0.1% 甲酸水、10% 甲醇水、30% 甲醇水、50% 甲醇水、70% 甲醇水、纯甲醇以及相应比例的甲醇水(含 0.1% 甲酸), 结果表明提取溶剂中加入甲酸后各成分含量均有上升, 50% 甲醇水(含 0.1% 甲酸)的提取率最高, 说明在酸性溶液中, 钩吻 6 个生物碱化合物易呈离子状态, 有利于生物碱成分被提取、测定, 故选用 50% 甲醇水(含 0.1% 甲酸)为提取溶剂; 在样品的处理过程中, 比较了回流提取法、温浸法、索氏提取法、超声提取法, 结果超声提取法的提取率优于温浸法, 而与索氏提取法、回流提取法

无明显的差异, 考虑节省时间和操作方法简单的问题, 故选用超声提取法; 同时分别考察了超声 10、20、30、40 min 的提取效果, 结果表明从超声 30 min 后, 40 min 的提取量并无明显差别, 故提取时间选择 30 min; 采用超声提取法, 分别考察了加入 250 倍、125 倍、50 倍、32 倍量的提取溶剂的提取效果, 结果表明 250 倍、125 倍提取量无明显差别, 且 125 倍量的提取量高于其他倍量的提取量, 在提取完全的前提下, 考虑到节省溶剂的问题, 故选择 125 倍量的提取溶剂进行提取。

### 3.2 色谱条件的考察

罗淑荣等<sup>[22]</sup>采用 HPLC 分析钩吻生物碱注射液及其提取物中 5 个生物碱(分别对应于本文的胡蔓藤碱丙、钩吻素己、钩吻素甲、胡蔓藤碱乙、钩吻素子)的分析方法, 其采用甲醇-水-正丁胺体系等度洗脱, 钩吻绿碱分离效果不佳, 也参考课题组前期研究<sup>[15]</sup>, 采用乙腈-0.1% 三乙胺体系等度洗脱, 6 个分析物均无法基线分离, 因此重新考察了不同流动相(甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水)对分离和柱效的影响, 结果发现样品在甲醇-水、乙腈-水体系中的分离度较差, 难以洗脱, 但当水中加入一定量的甲酸后 6 个生物碱能够完全被洗脱和分离, 可能由于在酸性环境下促使生物碱解离, 易于被洗脱。而在乙腈-0.1% 甲酸体系中易出现很强的溶剂峰, 且在甲醇-0.1% 甲酸水体系中各化学成分均达到基线分离的要求, 故最终采用甲醇-0.1% 甲酸水溶液作为洗脱系统。

### 3.3 样品测定结果

本实验对 32 个产地的钩吻茎药材进行含量测定, 结果表明, 不同产地钩吻茎中 6 个成分的含量差异较大: 从 6 个成分含量均值来看, 含量最高的为钩吻素子, 其范围在 0.718~3.553  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 并且以产地 S12、S13、S16 含量较高, 其次是钩吻绿碱, 其含量范围在 0.103~3.493  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 以产地 S13、S25、S27 含量较高, 而胡蔓藤碱丙、钩吻素己的含量相对最少, 含量范围分别在 0.125~2.202  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  和 0.076~2.025  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 其中, 产地 S6、S19 胡蔓藤碱丙含量远高于其他产地, 而产地 S19 钩吻素己含量远高于其他产地。另外, 从 6 个生物碱成分总和来看, S6、S13、S19 3 个产地的生物碱含量最高, 达到 1.2% 以上。

综上, 本文建立了 HPLC 法同时测定钩吻茎中 6 个生物碱成分的定量分析方法, 该方法简便、准确, 重

复性好,适用于钩吻药材中上述 6 个生物碱成分的含量测定,为其质量评价提供了科学的实验依据。

### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 251  
China Flora Editorial Board, Chinese Academy of Sciences. China Flora[M]. Beijing: Science Press, 1988: 251
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 118  
The National Assembly of Chinese Herbal Medicine Editorial. The National Assembly of Chinese Herbal Medicine. Part II[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1983: 118
- [3] KITAJIMA M, NAKAMURA T, KOGURE N, *et al.* Isolation of gelsedine-type indole alkaloids from *Gelsemium elegans* and evaluation of the cytotoxic activity of gelsemium alkaloids for A431 epidermoid carcinoma cells[J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(4): 715
- [4] 迟德彪, 李琳, 孙莉莎, 等. 钩吻素子诱导人结肠腺癌细胞凋亡的细胞生物学机制研究[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(7): 994  
CHI DB, LI L, SUN LS, *et al.* Koumine-induced apoptosis of human colonic adenocarcinoma cells: the cell biological mechanism[J]. *J South Med Univ*, 2007, 27(7): 994
- [5] JIN GL, SU YP, LIU M, *et al.* Medicinal plants of the genus *Gelsemium* (*Gelsemiaceae*, *Gentianales*) —A review of their phytochemistry, pharmacology, toxicology and traditional use[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 33
- [6] 蔡晶, 雷林生, 迟德彪. 钩吻素子对小鼠 H22 实体瘤抑制作用的实验研究[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(9): 1851  
CAI J, LEI LS, CHI DB. Antineoplastic effect of koumine in mice bearing H22 solid tumor[J]. *J South Med Univ*, 2009, 29(9): 1851
- [7] RUJJANAWATE C, KANJANAPOTHI D, PANTHONG A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 89(1): 91
- [8] XU Y, QIU HQ, LIU H, *et al.* Effects of koumine, an alkaloid of *Gelsemium elegans* Benth., on inflammatory and neuropathic pain models and possible mechanism with allopregnanolone[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 101(3): 504
- [9] ZHANG JY, GONG N, HUANG JL, *et al.* Gelsemine, a principal alkaloid from *Gelsemium sempervirens* Ait., exhibits potent and specific antinociception in chronic pain by acting at spinal alpha 3 glycine receptors[J]. *Pain*, 2013, 154(11): 2452
- [10] LIU M, SHEN J, LIU H, *et al.* Gelsenicine from *Gelsemium elegans* attenuates neuropathic and inflammatory pain in mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(12): 1877
- [11] LING Q, LIU M, WU MX, *et al.* Anti-allodynic and neuroprotective effects of koumine, a Benth alkaloid, in a rat model of diabetic neuropathy[J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(5): 858
- [12] 王坤, 肖健, 黄燕, 等. 钩吻对小鼠造血功能的影响[J]. 广西中医药, 2000, 23(6): 48  
WANG K, XIAO J, HUANG Y, *et al.* Effects of *Gelsemium elegans* Benth. on hemopoiesis in mice[J]. *Guangxi J Tradit Chin Med*, 2000, 23(6): 48
- [13] 王友顺, 高英立, 刘上云, 等. 盐酸钩吻碱眼药水散瞳与调节麻痹作用的临床观察[J]. 中药药理与临床, 1990, 6(6): 40  
WANG YS, GAO YL, LIU SY, *et al.* A clinical study on effects of gelsemium hydrochloride on mydriasis and cycloplegia[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 1990, 6(6): 40
- [14] 栗建明, 冯时茵, 何华红, 等. 单一内标多控法同步测定钩吻中钩吻碱甲和钩吻素子的含量[J]. 中药材, 2013, 36(10): 1626  
LI JM, FENG SY, HE HH, *et al.* Determination of gelsemine and koumine in *Gelsemium elegans* Benth. by single internal standard multi-control method[J]. *J Chin Med Mater*, 2013, 36(10): 1626
- [15] 陈卫琳, 杨樱, 吴水生. 闽产钩吻根茎叶中钩吻碱甲和钩吻素子及胡蔓藤碱甲的含量测定[J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(5): 48  
CHEN WL, YANG Y, WU SS. Determination of gelsemine, koumine, gelsenicine in *Gelsemium elegans* Benth. roots, stems and leaves form Fujian Province[J]. *J Fujian Univ Tradit Chin Med*, 2011, 21(5): 48
- [16] 杨峻山, 陈玉武. 胡蔓藤生物碱的化学研究 II. 胡蔓藤碱丙 (humantenidine) 的化学结构[J]. 药学学报, 1984, 19(6): 437  
YANG JS, CHEN YW. Chemical studies on the alkaloids from *Human-teng* (*Gelsemium elegans* Benth.) II. The structure of humantenidine[J]. *Acta Pharm Sin*, 1984, 19(6): 437
- [17] LIN LZ, YEH S, GEOFFREY AC, *et al.* Three oxindole alkaloids from *Gelsemium* species[J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(2): 679
- [18] LIN LZ, GEOFFREY AC, NI CZ, *et al.* 19-(R)- and 19-(S)-hydroxydihydrokoumine from *Gelsemium elegans*[J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(3): 965
- [19] 杜秀宝, 戴韵华, 张常麟, 等. 钩吻生物碱的研究 I. 钩吻素己的结构[J]. 化学学报, 1982, 40(12): 1137  
DU XB, DAI YH, ZHANG CL, *et al.* Studies on the *gelsemium* alkaloids I. The structure of gelsenicine[J]. *Acta Chim Sin*, 1982, 40(12): 1137
- [20] LIN LZ, GEOFFREY AC, NIC Z, *et al.* New humantenine-type alkaloids from *Gelsemium elegans*[J]. *J Nat Prod*, 1989, 52(3): 588
- [21] 刘铸晋, 陆仁荣, 朱子清, 等. 国产钩吻生物碱再研究和钩吻素子的构造[J]. 化学学报, 1961, 27(1): 47  
LIU ZJ, LU RR, ZHU ZQ, *et al.* Reinvestigation of the alkaloids of kou-wen, *Gelsemium elegans* Benth. and the constitution of koumine[J]. *Acta Chim Sin*, 1961, 27(1): 47
- [22] 罗淑荣, 李彤, 杨峻山. RP-HPLC 法测定钩吻生物碱[J]. 药学学报, 1993, 28(9): 695  
LUO SR, LI T, YANG JS. Determination of *Gelsemium* alkaloids by RP-HPLC[J]. *Acta Pharm Sin*, 1993, 28(9): 695

(本文于 2016 年 7 月 17 日收到)