

钩吻炮制减毒存效的物质基础分析

任丽, 李高攀, 湛赛男, 许文, 王河山, 黄美霞, 廖华军*, 吴水生*
(福建中医药大学药学院, 生物医药研发中心, 福州 350122)

[摘要] 目的:在前期研究基础上,检测钩吻炮制前后的6种主要生物碱成分的变化情况,以期揭示钩吻炮制后减毒存效的内在机制。方法:采用HPLC同时测定钩吻素甲、胡蔓藤碱丙、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱、胡蔓藤碱乙6个成分的含量,色谱条件为流动相甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,22% A;10~20 min,22%~30% A;20~30 min,30%~40% A),流速1 mL·min⁻¹,检测波长254 nm,柱温30℃,进样量10 μL。采用聚类分析和主成分分析法对钩吻炮制前后化学成分变化情况进行分析。结果:炮制前上述6种成分在12批生品中的平均质量分数分别为1.444,1.129,3.590,1.603,2.376,1.631 mg·g⁻¹;炮制后六者的平均质量分数则依次为2.258,0.343,1.176,0.115,0.459,0.281 mg·g⁻¹;毒性最强成分钩吻素己质量分数下降最为显著,下降率达92.83%,而毒性较小的钩吻素甲炮制后质量分数升高了56.37%,其他4个成分质量分数均有不同程度的降低。聚类分析结果表明钩吻炮制前后可明显分为2个类别,主成分分析表明钩吻炮制后第1主成分由钩吻素子变为钩吻素甲。结论:钩吻炮制后毒性成分钩吻素己被显著降解,胡蔓藤碱丙、钩吻素子、钩吻绿碱、胡蔓藤碱乙成分含量下降以及钩吻素甲的含量升高可能是钩吻炮制后减毒存效的内在机制之一。

[关键词] 钩吻;炮制;生物碱;钩吻素己;钩吻素甲;聚类分析;主成分分析

[中图分类号] R22;R28;R943.1;O212;R914 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)03-0117-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191948

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190618.0915.003.html>

[网络出版时间] 2019-06-19 11:27

Material Basis Analysis of Toxicity Attenuation and Efficacy Reservation of Processing of *Gelsemium elegans* Rhizomes

REN Li, LI Gao-pan, CHEN Sai-nan, XU Wen, WANG He-shan, HUANG Mei-xia,
LIAO Hua-jun*, WU Shui-sheng*

(School of Pharmacy, Biomedical Research and Development Center, Fujian University of
Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective:** On the basis of previous research, to detect the changes of six main alkaloids in *Gelsemium elegans* rhizomes before and after being processed, so as to reveal its internal mechanism of processing. **Method:** The contents of gelsemine, humantenidine, koumine, gelsenicine, gelsevirine and humantenine in *G. elegans* rhizomes was determined simultaneously by HPLC, the content changes of these components before and after processing and its reasons were analyzed by cluster analysis and principal component analysis. The mobile phase was methanol (A) -0.1% formic acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-10 min, 22% A; 10-20 min, 22%-30% A; 20-30 min, 30%-40% A). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 254 nm, the injection volume was 10 μL, and the column temperature was 30℃. **Result:** Before

[收稿日期] 20190508(024)

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2018J01872);2017年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社[2017]66号);福建省教育厅高校科研专项

[第一作者] 任丽,在读硕士,从事中药药效物质基础及其作用机制研究,Tel:0591-22861135,E-mail:renli1229@qq.com

[通信作者] *廖华军,博士,副教授,从事中药药效物质基础及其作用机制研究,Tel:0591-22861135,E-mail:lhj2002123@126.com;

*吴水生,博士,教授,从事中药药效物质基础及其作用机制研究,Tel:0591-22861135,E-mail:wushuishengwss@163.com

processing, contents of the above six components in raw products were 1.444, 1.129, 3.590, 1.603, 2.376, 1.631 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, after processing, the contents of these six components were 2.258, 0.343, 1.176, 0.115, 0.459, 0.281 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. Gelsenicine, the most toxic ingredient of *G. elegans* rhizomes, decreased most significantly with a decreasing rate of 92.83%, while the less toxic ingredient, gelsemine, increased by 56.37% after processing. The contents of other four components in *G. elegans* rhizomes decreased to varying degrees after processing. The results of cluster analysis indicated that *G. elegans* rhizomes were clearly divided into two categories before and after processing. Principal component analysis showed that the first principal component before and after processing was changed from koumine to gelsemine. **Conclusion:** The degradation of toxic components and content changes of other components may be one of the intrinsic mechanism of toxicity attenuation and efficacy reservation of *G. elegans* rhizomes being processed.

[Key words] *Gelsemium elegans* rhizomes; processing; alkaloids; gelsenicine; gelsemine; cluster analysis; principal component analysis

有毒中药一直是中药炮制研究的重点,《神农本草经》云“有毒宜制”^[1]。炮制可使毒性中药由大毒减为低毒乃至无毒,保证了临床用药的安全有效^[2]。中药炮制的重要目的之一在于减毒增效、去毒存性,在降低毒性的同时,增加药物的安全范围,以突出其治疗作用。通过炮制降低毒性中药的毒性成分,增加药物临床治疗效果,是毒性中药炮制的目的所在^[3]。

钩吻为马钱科胡蔓藤属植物,又名断肠草、胡蔓藤、大茶药等。中医理论认为其性温,味苦、辛,有大毒,全草可入药^[4-5]。钩吻始载于《神农本草经》,记载其“味辛,温。主金疮,乳疮,中恶风,咳逆上气,水肿,杀鬼疰、蛊毒。”具有祛风、消肿拔毒之功效。民间常用其治疗恶性肿瘤、皮肤病、风湿病、跌打损伤等。现代研究发现钩吻生物碱类成分具有抗肿瘤、消炎镇痛、免疫调节等药理作用^[6]。其中钩吻素子具有抗肿瘤^[7]、抗焦虑^[8]、免疫调节^[9]、镇痛^[10]作用;钩吻素甲具有神经元保护^[11]、麻醉、镇痛^[12]、抗焦虑^[13]作用;钩吻绿碱具有抗焦虑作用^[13];胡蔓藤碱乙可抑制细胞色素 P450 (CYP450) 酶活性,对 CYP2E1, CYP2A6 亚型均有较强的抑制作用^[14]。生物碱类成分是钩吻最重要的药效物质,其中钩吻素子含量最高。

现代研究表明, N₁ 位甲氧基和 C₂₀ 位乙基是钩吻生物碱类成分具有毒性的必需条件,钩吻定 (gelsedine) 型生物碱和胡蔓藤碱乙 (humantenine) 型生物碱含有类似的笼状骨架且均有毒,其中钩吻素己的毒性最强^[15]。钩吻作为常见的毒性中药,临床应用受到了其毒副作用的限制。基于此,钩吻的减毒增效机制分析成了众多学者的研究方向和目标。例如 WANG 等^[14]研究了钩吻配伍

玉叶金花后的减毒作用;李德森等^[16-17]报道钩吻中毒后可通过服食鸭血、羊血进行解毒,并通过双向固体发酵方式对钩吻的解毒机制进行了研究;吴水生等^[18]基于谱效关系对钩吻炮制的减毒存效进行实验研究。炮制是降低中药毒性的一种有效方法,可使中药的药理作用发生一定改变,最终达到降低中药毒性以及副作用的目的,进而使中药的临床应用效果得到有效增强^[19]。因此,如何进行炮制减毒并阐明减毒机制对促进钩吻的临床应用具有重要意义。

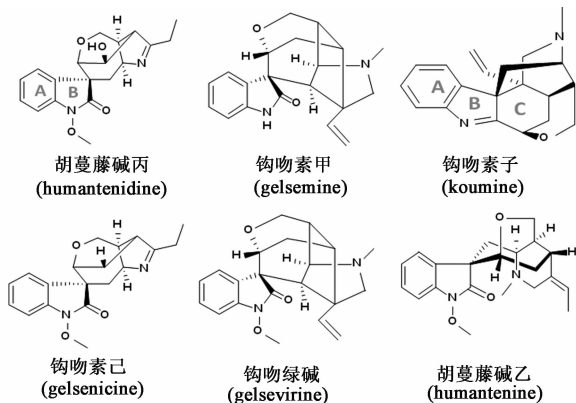
中药炮制理论认为,炮制减毒保证用药安全是炮制学的首要任务和第一条炮制理论^[20]。目前,已有较多学者进行了中药炮制减毒作用的研究。例如慕云霞等^[21]研究发现生乌头经炮制后其毒性能明显降低,赵小梅等^[22]研究发现甘草炮制雷公藤可降低后者的肝毒性。炮制是影响何首乌效/毒作用的重要因素,古代强调何首乌“制非九次,勿寝其毒”。崔鹤蓉等^[23]和马致洁等^[24]研究证实炮制可显著降低何首乌的毒副作用,且炮制减毒是保障何首乌临床用药安全的重要措施之一。药物所含毒性成分对热不稳定时,可利用高温破坏或分解毒性成分来达到降低药物毒性作用的目的。例如马钱子经油炸或砂烫后,可使其土的宁及马钱子碱的开环氧化,形成异土的宁的氮氧化物及异马钱子碱的氮氧化物,进而降低毒性^[25]。根据这一原理,本课题组前期系统地开展了钩吻传统炮制减毒工艺研究,利用响应面法优选得到钩吻的最佳炮制工艺,并进行药效学实验验证,结果表明钩吻经高温炮制后毒性明显降低,同时又能保存其良好的镇痛效果^[18],但并未对钩吻炮制后减毒存效的物质基础进行深入研究。因此,本研究拟以钩吻生物碱(钩吻素甲、胡蔓藤碱

丙、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱、胡蔓藤碱乙)为切入点,考察钩吻炮制前后 6 个生物碱类成分的含量变化,并利用化学计量学方法比较钩吻炮制前后化学成分变化,为揭示钩吻炮制减毒存效机制提供实验依据。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括 LC-20AT 型泵, SIL-20A 型自动进样器, TO-20A 型柱温箱, SPD-M20A 型紫外检测器, LC Solution 色谱工作站), ME204E 型 1/1 万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], AR223CN 型 1/10 万电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司], Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

钩吻药材采自云南文山和福建霞浦,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植物钩吻 *Gelsemium elegans* 的干燥根茎;其中样品 S1 ~ S3 为钩吻根,采自云南文山;样品 S4 ~ S12 为钩吻茎,采自福建霞浦;样品 S13 ~ S15 分别为样品 S1 ~ S3 的自制炮制品,样品 S16 ~ S24 分别为样品 S4 ~ S12 的自制炮制品。钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-15071312, MUST-15062614, MUST-14100901, 纯度依次为 $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 96\%$), 胡蔓藤碱丙、胡蔓藤碱乙对照品(云南西力生物技术股份有限公司,批号分别为 BBP02553, BBP02653, 纯度依次为 $\geq 97.5\%$, $\geq 95\%$), 钩吻绿碱对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 P15A10S85857, 纯度 $\geq 95\%$), 各对照品的化学结构见图 1。水为自制超纯水, 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。



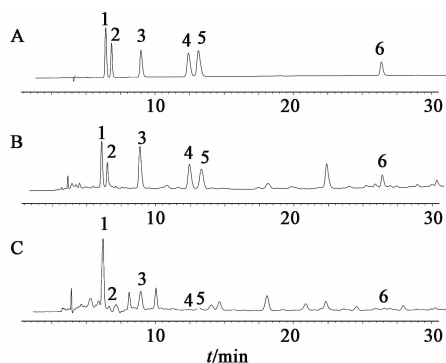
A, B, C 依次代表化合物结构式中 A 环, B 环, C 环

图 1 钩吻中 6 个生物碱成分的化学结构式

Fig. 1 Chemical structural formulas of six alkaloids in *Gelsemium elegans* rhizomes

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Luna-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 22% A; 10 ~ 20 min, 22% ~ 30% A; 20 ~ 30 min, 30% ~ 40% A), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。在该色谱条件下, 各成分分离度良好, 见图 2。



A. 混合对照品; B. 生品; C. 炮制品; 1. 钩吻素甲; 2. 胡蔓藤碱丙; 3. 钩吻素子; 4. 钩吻素己; 5. 钩吻绿碱; 6. 胡蔓藤碱乙

图 2 钩吻的 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of *Gelsemium elegans* rhizomes

2.2 药品炮制^[18] 取钩吻药材, 除去杂质, 进行切制, 得直径 2 ~ 4 cm, 厚约 2 mm 的钩吻生品。取钩吻生品 50 g, 置本课题组改装后的电烤箱^[26]中, 设定温度 210 °C 烤制 15 min, 取出, 放凉, 得褐色至黑褐色钩吻炮制品。

2.3 混合对照品溶液的制备 精密称取钩吻碱甲、胡蔓藤碱丙、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱、胡蔓藤碱乙对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声使溶解, 得质量浓度分别为 147.0, 107.0, 167.4, 134.4, 154.8, 106.4 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液, 备用。

2.4 供试品溶液的制备 分别精密称定各钩吻样品粉末(过 40 目筛)0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇(含 0.1% 甲酸)25 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇(含 0.1% 甲酸)补足减失的质量, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 取 2.3 项下混合对照品溶液适量, 用 50% 甲醇稀释, 配成钩吻素甲质量浓度分别为 1.47, 5.88, 11.76, 23.52, 29.40, 73.50 mg·L⁻¹, 胡蔓藤碱丙质量浓度分别为 1.07, 4.28, 8.56, 17.12, 21.40, 53.50 mg·L⁻¹, 钩吻素子

质量浓度分别为 1.67, 6.70, 13.39, 26.78, 33.48, 83.70 mg·L⁻¹, 钩吻素己质量浓度分别为 1.34, 5.38, 10.75, 21.50, 26.88, 67.20 mg·L⁻¹, 钩吻绿碱质量浓度分别为 1.55, 6.19, 12.38, 24.77, 30.96, 77.40 mg·L⁻¹, 胡蔓藤碱乙质量浓度分别为 1.06, 4.26, 8.51, 17.02, 21.28, 53.20 mg·L⁻¹ 的系列混合对照品溶液, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行回归处理, 绘制标准曲线, 见表 1, 结果表明各成分在相应质量浓度内与峰面积呈良好线性关系。

表 1 钩吻中 6 个成分的线性关系考察
Table 1 Investigation of linear relationship of six alkaloids in *Gelsemium elegans* rhizomes

成分	回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
钩吻素甲	Y = 14 252X + 1 389.9	0.999 8	1.47 ~ 73.50
胡蔓藤碱丙	Y = 12 728X - 2 096.7	0.999 9	1.07 ~ 53.50
钩吻素子	Y = 10 249X - 5 074.8	0.999 9	1.67 ~ 83.70
钩吻素己	Y = 14 552X - 2 672.2	0.999 9	1.34 ~ 67.20
钩吻绿碱	Y = 15 705X - 4 786.3	0.999 9	1.55 ~ 77.40
胡蔓藤碱乙	Y = 8 567.2X - 1 088.1	1.000 0	1.06 ~ 53.20

2.5.2 精密度试验 取 2.3 项下混合对照品溶液适量, 用 50% 甲醇稀释, 得质量浓度分别为 14.70, 10.70, 16.74, 13.44, 15.48, 10.64 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算钩吻素甲、胡蔓藤碱丙、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 0.6%, 1.5%, 2.3%, 0.7%, 2.9%, 1.9%, 表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取样品 S12 共 6 份, 每份 0.2 g, 按 2.4 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算钩吻素甲、胡蔓藤碱丙、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙的平均质量分数分别为 1.633, 1.183, 3.511, 1.587, 0.803, 1.118 mg·g⁻¹; RSD 分别为 4.7%, 3.4%, 3.4%, 1.7%, 5.0%, 3.5%, 表明该方法重复性较好。

2.5.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算钩吻素甲、胡蔓藤碱丙、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 1.5%, 4.4%, 2.5%, 1.7%, 4.2%, 4.4%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取已知各指标成分含量的样品 S12 共 6 份, 每份约 0.1 g, 分别加入

等量对照品, 按 2.4 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定。计算钩吻素甲、胡蔓藤碱丙、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱和胡蔓藤碱乙的加样回收率, 见表 2, 结果表明该方法准确可靠。

2.6 样品测定 取各批样品适量, 按 2.4 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算各成分的含量, 结果见表 3。

2.7 数据分析

2.7.1 钩吻炮制前后含量变化分析 应用 SPSS 21.0 软件处理 12 批钩吻样品炮制前和炮制后 6 种生物碱成分的含量测定结果, 进行配对样本 t 检验, 通过 GraphPad Prism 7 软件对炮制前后的钩吻样品进行含量统计分析, 见表 4。结果发现钩吻炮制前后各生物碱含量均有显著性差异; 钩吻中毒性最强成分钩吻素己含量均值降低最多, 达到 92.83%; 钩吻经炮制后钩吻素甲含量均值升高 56.37%, 成为钩吻炮制品中含量最高的成分; 胡蔓藤碱丙、钩吻素子、钩吻绿碱、胡蔓藤碱乙含量分别降低 69.62%, 67.24%, 80.68%, 82.77%。对不同产地钩吻生品和炮制品中指标成分含量应用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析, 见表 5, 结果发现不同产地的钩吻经炮制后各成分含量变化趋势相同。

2.7.2 聚类分析^[26] 运用 DPS 14.50 数据处理软件进行聚类分析, 采用系统聚类法, 以 6 种生物碱成分含量为变量, 以卡方距离为指标, 见图 3。结果发现炮制前后钩吻样品明显分为两类, 样品 S1 ~ S12 (生品) 聚为一类, 样品 S13 ~ S24 (炮制品) 聚为一类, 说明在主要成分物质基础上, 化学计量聚类模式可以将生品和炮制品完全区分, 提示内在化学成分发生了显著改变。

2.7.3 主成分分析^[26] 运用 DPS 14.50 数据处理软件进行主成分分析, 结果见图 4。分别对钩吻炮制前和炮制后 6 个生物碱含量进行主成分计算, 钩吻生品的主成分公式为 $Y_1 = 0.426 2X_1 + 0.417 1X_2 + 0.377 X_3 + 0.420 6X_4 - 0.392 3X_5 - 0.414 X_6$, 钩吻素子为第 1 主成分, 贡献率 90.87%; 而炮制后的主成分公式则为 $Y_1 = 0.443 4X_1 + 0.350 3X_2 + 0.352 1X_3 + 0.406 7X_4 + 0.438 9X_5 + 0.445 8 X_6$, 钩吻素甲为第 1 主成分, 贡献率 81.93%, 第 2 主成分 (钩吻素子) 贡献率 10.69%, 累计贡献率 92.62%; 式中 $X_1 \sim X_6$ 分别为钩吻素甲、胡蔓藤碱丙、钩吻素子、钩吻素己、钩吻绿碱、胡蔓藤碱乙。经炮制后, 第 1 主成分由钩吻素子变为钩吻素甲。

表 2 钩吻中 6 个成分含量测定的加样回收试验

Table 2 Recovery test for determination of six alkaloids in *Gelsemium elegans* rhizomes

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
钩吻素甲	0.100 0	0.163 3	0.171 3	0.343 2	105.02	103.14	2.7
	0.100 5	0.164 1	0.168 8	0.345 0	107.17		
	0.100 3	0.163 8	0.168 9	0.333 1	100.24		
	0.100 2	0.163 6	0.162 3	0.326 9	100.62		
	0.100 4	0.164 0	0.155 9	0.326 9	104.49		
	0.100 1	0.163 5	0.152 9	0.318 4	101.31		
胡蔓藤碱丙	0.100 0	0.118 3	0.119 3	0.240 0	102.01	101.21	2.8
	0.100 5	0.118 9	0.117 4	0.235 0	98.89		
	0.100 3	0.118 7	0.122 4	0.241 0	99.92		
	0.100 2	0.118 5	0.119 6	0.246 0	106.61		
	0.100 4	0.118 8	0.120 3	0.238 0	99.09		
	0.100 1	0.118 4	0.110 8	0.230 0	100.72		
钩吻素子	0.100 0	0.351 1	0.336 8	0.711 5	107.01	103.06	3.4
	0.100 5	0.352 9	0.344 7	0.699 0	100.41		
	0.100 3	0.352 2	0.372 3	0.738 0	103.63		
	0.100 2	0.351 8	0.348 3	0.691 0	97.39		
	0.100 4	0.352 5	0.350 7	0.720 0	104.79		
	0.100 1	0.351 5	0.353 7	0.723 4	105.15		
钩吻素己	0.100 0	0.158 7	0.153 7	0.310 0	98.44	98.03	4.3
	0.100 5	0.159 5	0.158 6	0.315 1	98.11		
	0.100 3	0.159 2	0.158 2	0.314 3	98.04		
	0.100 2	0.159 0	0.160 2	0.309 0	93.63		
	0.100 4	0.159 3	0.160 6	0.311 0	94.46		
	0.100 1	0.158 9	0.161 0	0.328 8	105.53		
钩吻绿碱	0.100 0	0.080 3	0.080 7	0.158 6	97.03	101.09	4.2
	0.100 5	0.080 7	0.085 1	0.173 0	108.46		
	0.100 3	0.080 5	0.084 9	0.168 0	103.06		
	0.100 2	0.080 5	0.075 6	0.157 0	101.19		
	0.100 4	0.080 6	0.078 1	0.158 0	99.1		
	0.100 1	0.080 4	0.077 4	0.156 0	97.67		
胡蔓藤碱乙	0.100 0	0.111 8	0.110 7	0.220 7	98.37	99.80	1.3
	0.100 5	0.112 4	0.109 6	0.223 3	101.19		
	0.100 3	0.112 1	0.108 3	0.219 0	98.71		
	0.100 2	0.112 0	0.108 9	0.222 4	101.38		
	0.100 4	0.112 2	0.115 3	0.226 4	99.05		
	0.100 1	0.111 9	0.117 9	0.229 9	100.08		

3 讨论与总结

3.1 流动相考察 本研究考察了不同流动相配比对生物碱类成分分离度的影响,结果表明甲醇-水体

系可以将 6 种生物碱成分分开,加入低质量分数甲酸后可以改善峰型,故最终流动相选择了甲醇-水(含 0.1% 甲酸)梯度洗脱。

表 3 钩吻样品中 6 个指标成分的含量测定

Table 3 Contents of six components in samples of *Gelsemium elegans* rhizomes

样品	mg·g ⁻¹					
	钩吻素甲	胡蔓藤碱丙	钩吻素子	钩吻素己	钩吻绿碱	胡蔓藤碱乙
S1	0.828	0.636	2.861	0.947	4.103	2.778
S2	0.803	0.696	3.053	1.098	7.527	3.161
S3	0.807	0.669	3.324	1.020	6.035	3.029
S4	1.655	1.269	3.941	1.823	1.430	1.182
S5	1.521	1.099	3.192	1.692	1.334	1.191
S6	1.932	1.663	4.069	2.118	1.354	1.153
S7	1.631	1.286	3.863	1.811	1.437	1.185
S8	1.638	1.290	3.696	1.799	1.457	1.171
S9	1.632	1.253	3.959	1.806	1.047	1.162
S10	1.616	1.239	3.755	1.751	0.979	1.279
S11	1.631	1.263	3.856	1.785	1.009	1.165
S12	1.633	1.183	3.511	1.587	0.803	1.118
S13	3.183	0.428	1.647	0.276	1.107	0.647
S14	3.147	0.439	1.609	0.171	1.559	0.657
S15	3.151	0.396	1.411	0.417	1.667	0.630
S16	1.765	0.363	0.744	0.034	0.075	0.203
S17	1.802	0.354	0.712	0.059	0.117	0.116
S18	2.016	0.344	0.792	0.055	0.300	0.133
S19	1.997	0.253	1.122	0.066	0.074	0.146
S20	2.053	0.348	1.314	0.051	0.128	0.174
S21	2.065	0.272	1.203	0.054	0.054	0.102
S22	2.009	0.292	1.209	0.095	0.247	0.229
S23	2.063	0.275	1.232	0.037	0.106	0.151
S24	1.848	0.349	1.122	0.060	0.078	0.183

3.2 炮制前后钩吻生物碱的含量分析 通过 HPLC 测定钩吻炮制前后 6 种主要生物碱的含量变化情况,经炮制后钩吻中钩吻素甲含量升高,其他

表 5 不同产地钩吻样品炮制前后 6 种成分的含量变化情况($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Content changes of six components in *Gelsemium elegans* rhizomes from different origins before and after processing($\bar{x} \pm s$) mg·g⁻¹

成分	云南(n=3)		福建(n=9)	
	生品	炮制品	生品	炮制品
钩吻素甲	0.813 ± 0.013	3.160 ± 0.020	1.654 ± 0.111	1.958 ± 0.119
胡蔓藤碱丙	0.667 ± 0.030	0.421 ± 0.022	1.283 ± 0.155	0.317 ± 0.043
钩吻素子	3.079 ± 0.233	1.556 ± 0.127	3.760 ± 0.268	1.050 ± 0.234
钩吻素己	1.022 ± 0.076	0.288 ± 0.123	1.797 ± 0.142	0.057 ± 0.018
钩吻绿碱	5.888 ± 1.717	1.444 ± 0.297	1.206 ± 0.246	0.131 ± 0.085
胡蔓藤碱乙	2.989 ± 0.195	0.645 ± 0.014	1.178 ± 0.043	0.160 ± 0.041

表 4 12 批钩吻样品炮制前后 6 种成分含量变化($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Contents of six components in 12 batches of *Gelsemium elegans* rhizomes before and after processing($\bar{x} \pm s, n=12$) mg·g⁻¹

成分	生品	炮制品
钩吻素甲	1.444 ± 0.392	2.258 ± 0.553 ¹⁾
胡蔓藤碱丙	1.129 ± 0.308	0.343 ± 0.060 ¹⁾
钩吻素子	3.590 ± 0.396	1.176 ± 0.308 ²⁾
钩吻素己	1.603 ± 0.372	0.115 ± 0.118 ²⁾
钩吻绿碱	2.376 ± 2.251	0.459 ± 0.612 ¹⁾
胡蔓藤碱乙	1.631 ± 0.824	0.281 ± 0.222 ¹⁾

注:与生品相比¹⁾P < 0.01, ²⁾P < 0.001。

5 种生物碱成分含量均下降,从化学成分转化层面探究其原因,推测其炮制机制可能存在以下 3 种情况:①钩吻素甲与钩吻绿碱化学结构相似,不同之处在于钩吻绿碱比钩吻素甲 B 环 N 原子上多 1 个甲氧基,高温炮制后钩吻绿碱 B 环上的甲氧基发生断裂,可转化成钩吻素甲,从而使钩吻绿碱的含量降低,推测钩吻素甲含量升高可能与钩吻绿碱的甲氧基断裂有关。②胡蔓藤碱丙、钩吻素己、胡蔓藤碱乙化合物结构与钩吻绿碱一样 B 环上均含有 1 个 N 原子的甲氧基基团,高温炮制后均可发生与钩吻绿碱类似的转化,甲氧基断裂,因此含量均降低。③钩吻素子与前 5 个化合物不同,B 环上是一个饱和的含氮结构,可能是 B 环与 C 环发生二元杂合,导致杂环骨架结构在高温状态下容易破坏,导致其含量下降。

3.3 钩吻炮制前后的化学计量学分析 通过对福建和云南 2 个产地钩吻中指标成分含量进行聚类分析,发现钩吻炮制品和生品聚成 2 个大类,说明其生物碱类成分的构成比及含量确实发生了变化,经炮制后钩吻素甲取代钩吻素子成为钩吻炮制品中含量最高的物质;主成分分析同样解释炮制前后第 1

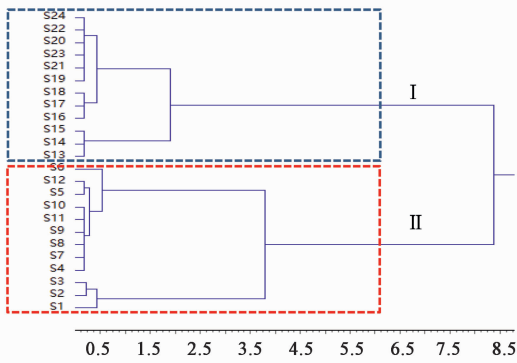


图 3 12 批钩吻样品炮制前后 6 种成分含量变化的聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis of content changes of six components in 12 batches of *Gelsemium elegans* rhizomes before and after processing

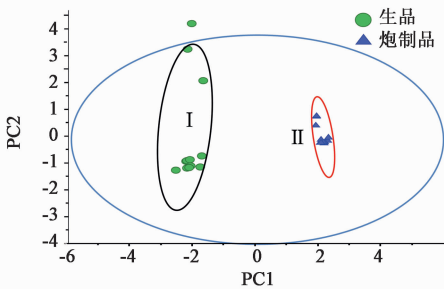


图 4 12 批钩吻样品炮制前后的主成分分析
Fig. 4 PCA for 12 batches of *Gelsemium elegans* rhizomes before and after processing

主成分从钩吻素子转变为钩吻碱甲,同时,毒性成分钩吻素己炮制后含量大大降低可能是钩吻炮制减毒存效的机制之一。

3.4 总结 钩吻具有抗肿瘤、止痛不成瘾等优点,但由于其毒性大、使用剂量安全窗口小,使得其在临床上的应用受到了较大制约,因而探寻有效的减毒存效途径是钩吻研究的重点与突破口之一。钩吻中所含的大多数成分是吲哚类生物碱,经高温炮制会发生氧化反应而降解或转化,进而使该类成分含量与钩吻毒性均大大降低。本课题组前期研究表明,采用砂炒炮制可以明显减少钩吻的毒性并保存其止痛药效。本文在前期开展了钩吻炮制减毒的工艺研究基础上,通过 HPLC 同时对钩吻炮制前后特征性 6 个生物碱成分进行检测并进行化学计量学分析,初步揭示了炮制后生物碱类成分变化是钩吻炮制减毒存效的作用机制之一,但具体的化学成分转化方式尚不明确,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 蒋且英,罗素花,杨瑞昆,等. 炮制对雷公藤毒效及其化学成分影响的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂

志,2018,24(4):216-221.

[2] 苏海萍,马悦宁. 雷公藤减毒增效方法研究进展[J]. 山西中医,2018,34(9):55-56.

[3] 王璐. 浅谈毒性中药的炮制解毒技术[J]. 中国民族医药学,2018,30(9):71-72,128.

[4] 赵雅婷,武淑鹏,胡春丽,等. 钩吻的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(3):200-210.

[5] 许豪然,廖华军,王河山,等. 钩吻的研究进展[J]. 中国民族民间医药,2016,25(10):37-38.

[6] JIN G L, SU Y P, 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):33-52.

[7] ZHANG X, CHEN Y, GAO B, et al. Apoptotic effect of koumine on human breast cancer cells and the mechanism involved [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 72(2):411-416.

[8] CHEN J Z, LI Y, XIAO J P, et al. Development of a sensitive and rapid UPLC-MS/MS method for the determination of koumine in rat plasma; application to a pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(6):736-740.

[9] XU Y K, LIAO S G, NA Z, et al. *Gelsemium* alkaloids, immunosuppressive agents from *Gelsemium elegans* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(6):1120-1124.

[10] XIONG B J, XU Y, JIN G L, et al. Analgesic effects and pharmacologic mechanisms of the *Gelsemium* alkaloid koumine on a rat model of postoperative pain [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):14269.

[11] YANG J, CAI H D, ZENG Y L, et al. Effects of koumine on adjuvant-and collagen-induced arthritis in rats [J]. J Nat Prod, 2016, 79(10):2635-2643.

[12] ZHANG S S, HU S P, YANG X X, et al. Development of a liquid chromatography with mass spectrometry method for the determination of gelsemine in rat plasma and tissue; application to a pharmacokinetic and tissue distribution study [J]. J Sep Sci, 2015, 38(6):936-942.

[13] LIU M, HUANG H H, YANG J, et al. The active alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth. are potent anxiolytics [J]. Psychopharmacology (Berl), 2013, 225(4):839-851.

[14] WANG Y H, WU S S, CHEN Z C, et al. Inhibitory effects of cytochrome P450 enzymes CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1 and CYP3A4 by extracts and alkaloids of *Gelsemium elegans* roots [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 166:66-73.

- [15] LI N P, LIU M, HUANG X J, et al. Gelsecorydines A-E, five gelsedine-corynanthe-type bisindole alkaloids from the fruits of *Gelsemium elegans* [J]. *J Org Chem*, 2018, 83(10):5707-5714.
- [16] 李德森, 杨樱, 王英豪, 等. 钩吻民间应用调查及不同动物水解其毒实验研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(11):23-26.
- [17] 李德森, 郑雅焯, 陈亮, 等. 双向固体发酵前后钩吻中生物碱含量变化研究 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2017, 40(3):63-68.
- [18] 吴水生, 李德森, 许豪然, 等. 基于谱效关系的钩吻炮制减毒存效的实验研究 [J]. *中医药学报*, 2017, 45(5):80-84.
- [19] 丁彦春. 中药中各类毒性成分中毒机制和炮制减毒原理分析 [J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(10):45-46.
- [20] 唐廷猷. 中药炮制理论炮制原理研究史初探(清代前部分) [J]. *中国现代中药*, 2018, 20(2):230-238.
- [21] 慕云霞, 孙世成, 张吉玲, 等. 草乌的化学成分及炮制减毒研究进展 [J]. *名医*, 2018(3):135.
- [22] 赵小梅, 宫嫚, 肖小河, 等. 甘草炮制雷公藤降低其肝毒性作用的初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(1):119-124.
- [23] 崔鹤蓉, 柏兆方, 肖小河, 等. 从古今炮制方法演变探讨何首乌毒性的潜在影响因素 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(2):333-339.
- [24] 马致洁, 李晓菲, 肖小河, 等. 基于肝细胞毒价检测的何首乌炮制工艺比较研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(12):2325-2329.
- [25] 贾天柱, 许枏, 史辑. 炮制引起中药药性及功用的变化 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2017, 19(3):450-457.
- [26] 唐启义. *DPS 数据处理系统*. 第 2 卷 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2013:531-537, 580-582.

[责任编辑 刘德文]