

# 钩藤总碱的提取工艺和急性毒性及其对人脐静脉内皮细胞的保护作用

张留记<sup>1,2</sup>, 夏曼玉<sup>2</sup>, 吴冰帆<sup>2</sup>, 屠万倩<sup>1\*</sup>, 李开言<sup>1</sup>, 卢新<sup>2</sup>(1.河南省中医药研究院, 河南省地道药材综合开发工程研究中心, 郑州 450004; 2.河南中医药大学, 郑州 450008)

**摘要:** 目的 利用正交试验优选钩藤最佳提取工艺, 研究钩藤总碱对小鼠急性毒性和对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导损伤的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的保护作用。方法 采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验法, 选择乙醇浓度、提取次数、提取时间、物料比为考察因素, 用HPLC测定异钩藤碱、钩藤碱、去氢毛钩藤碱和毛钩藤碱含量并计算转移率, 以主成分分析综合得分为指标, 优选钩藤总碱的最佳提取工艺。选用KM小鼠, 灌胃钩藤总碱溶液, 进行最大耐受量(maximum tolerated dose, MTD)的测定, 观察14 d内小鼠情况变化, 后摘眼球取血, 测定小鼠血清中的尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)、谷草转氨酶(glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT)含量变化。测定钩藤总碱对1.0 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤的HUVEC存活率和上清液乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、内皮素(endothelin-1, ET-1)、一氧化氮(nitric oxide, NO)含量的影响。结果 优选的钩藤总碱最佳提取工艺为用70%乙醇加热回流提取2次, 每次2 h, 物料比1:8。急性毒性试验表明, 给药后14 d内, 各组小鼠活动正常、无明显不良反应、无死亡; 钩藤总碱溶液对小鼠的MTD为21.0 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 相当于临床成人日用量的1377倍; 与空白组比较, 钩藤总碱组GPT显著降低(P<0.01)。与空白组比较, 模型组HUVEC存活率及上清液中NO含量显著降低(P<0.01或P<0.05), LDH、ET-1含量显著升高(P<0.01); 与模型组比较, 钩藤总碱5 μg·mL<sup>-1</sup>细胞存活率显著升高(P<0.01), LDH、ET-1含量显著降低(P<0.01或P<0.05)。结论 优选的钩藤总碱提取工艺简单可行, 钩藤总碱对小鼠急性毒性较小, 对HUVEC损伤有保护作用。

**关键词:** 钩藤; 钩藤总碱; 正交试验; 主成分分析; 提取工艺优化; 急性毒性; 人脐静脉内皮细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)10-1330-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221448

引用本文: 张留记, 夏曼玉, 吴冰帆, 等. 钩藤总碱的提取工艺和急性毒性及其对人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(10): 1330-1336.

## Extraction Process of Total Alkaloids of *Uncaria Rhynchophylla*, and Its Acute Toxicity and Protective Effect on HUVEC

ZHANG Liuji<sup>1,2</sup>, XIA Manyu<sup>2</sup>, WU Bingfan<sup>2</sup>, TU Wanqian<sup>1\*</sup>, LI Kaiyan<sup>1</sup>, LU Xin<sup>2</sup>(1.Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Henan Engineering Center of Genuine Medicinal Materials Comprehensive Development, Zhengzhou 450004, China; 2.Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To optimize the optimal extraction process of *Uncaria rhynchophylla* by orthogonal experiment, to study the acute toxicity of *Uncaria rhynchophylla* total alkaloids to mice and protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury of human umbilical vein endothelial cells(HUVEC). **METHODS** The L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test method was used, ethanol concentration, extraction times, extraction time, and material ratio were selected as the factors to be investigated, the contents of isorhynchophylline, rhynchophylline, hirsuteine and hirsutine were determined by HPLC, the transfer ratios were calculated, and the comprehensive score of principal component analysis was taken as the index to optimize the extraction process of *Uncaria rhynchophylla* total alkaloids. KM mice were selected. After intragastric administration of total alkaloids solution of *Uncaria rhynchophylla* for twice, maximum tolerated dose(MTD) was calculated, the changes of mice within 14 d were observed. The eyeballs were removed to collect blood. The contents of urea nitrogen(BUN), glutamic-pyruvic transaminase(GPT) and glutamic-oxaloacetic transaminase(GOT) in the serum of mice were determined. HUVECs were selected and damaged by 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to observe the protective effects of total alkaloids of *Uncaria rhynchophylla*. The survival rate of HUVECs and the contents of lactate dehydrogenase(LDH), endothelin-1(ET-1), nitric oxide(NO) in the supernatant were measured. **RESULTS** The optimum parameters of *Uncaria rhynchophylla* total alkaloids extraction process were as following: *Uncaria rhynchophylla* was extracted by 70% ethanol for twice, each time for 2 h, and the material ratio was 1:8. Within 14 d of the acute toxicity test, the mice's activity was normal, no obvious adverse reactions were observed, and no death after administration; the MTD was

基金项目: 河南省中医专项课题重大专项(2019ZYZD08)

作者简介: 张留记, 男, 博士, 研究员 E-mail: zlj666671@163.com \*通信作者: 屠万倩, 女, 硕士, 副研究员 E-mail: wqtu632@126.com

21.0 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, which was equivalent to the daily dose of clinical adults 1 377 times. Compared with blank group, GPT in *Uncaria rhynchophylla* total alkaloids group was significantly decreased( $P<0.01$ ). Compared with the blank group, the survival rate of HUVEC and the NO content in the supernatant of the model group were significantly decreased( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ), while the LDH and ET-1 contents were significantly increased( $P<0.01$ ); compared with the model group, the cell viability of *Uncaria rhynchophylla* total alkaloids(5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was significantly increased( $P<0.01$ ), and the content of LDH and ET-1 in the supernatant was significantly decreased( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). **CONCLUSION** The optimized extraction process of total alkaloids of *Uncaria rhynchophylla* is simple and feasible, total alkaloids of *Uncaria rhynchophylla* has less acute toxicity in mice, and has a protective effect on HUVECs damage.

**KEYWORDS:** *Uncaria rhynchophylla*; *Uncaria rhynchophylla* total alkaloids; orthogonal test; principal component analysis; optimization of extraction process; acute toxicity; HUVEC

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 sessilifrutis* Roxb.的干燥带钩茎枝<sup>[1]</sup>,含有生物碱类、三萜类、黄酮类和酯类等化学成分<sup>[2-3]</sup>。钩藤碱、异钩藤碱、去氢毛钩藤碱和毛钩藤碱等生物碱类成分是钩藤中的主要活性成分,具有抗炎、平喘、保护中枢神经系统、降压等多种药理作用<sup>[2-4]</sup>。目前多以钩藤碱为指标优选钩藤总碱的提取工艺<sup>[5-6]</sup>,对多种生物碱为指标综合优选钩藤总碱的提取工艺、钩藤总碱的毒性反应和细胞生物活性等研究报道较少。

本实验用异钩藤碱、钩藤碱、去氢毛钩藤碱和毛钩藤碱含量的主成分分析法所得综合得分为评价指标,采用正交试验法,对钩藤总碱提取的乙醇浓度、提取次数、提取时间、物料比等主要影响因素进行考察,优选最佳提取工艺。钩藤临床常用于高血压、头痛眩晕等心脑血管疾病的治疗,氧化应激诱导的细胞损伤是血管内皮功能紊乱的主要诱因之一,在防治心血管疾病研究中的重要研究意义<sup>[7]</sup>。因此,本实验对制备的钩藤总碱进行急性毒性研究,并观察钩藤总碱对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导损伤的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的影响,初步探索钩藤总碱的用药安全性和有效性,为钩藤总碱后续的深入开发、合理利用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

钩藤碱(HPLC $\geq$ 98%,批号:112028-201601)、异钩藤碱(HPLC $\geq$ 98%,批号:111927-201804)均购自中国食品药品检定研究院;毛钩藤碱(HPLC $\geq$ 98%,批号:6068)、去氢毛钩藤碱(HPLC $\geq$ 98%,批号:4170)均购自上海诗丹德生物技术有限公司。

钩藤总碱(自制,每克相当于15.76 g钩藤);谷草转氨酶(glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT)测试盒(批号:20200901)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)测试盒(批号:20200901)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)测试盒(批号:20200825)均购自北京索莱宝科技有限公司;噻唑蓝(MTT)试剂盒(美国 Amresco 公司,批号:6041053);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20180619);内皮素-1(endothelin-1, ET-1)试剂盒(武汉云克隆科技股份公司,批号:L180904198);DMEM培养基(博士德生物工程有限公司,批号:15C24C74);H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(派尼化学试剂厂,批号:20160508);澳洲新生胎牛血清(江苏恩莫阿赛生物技术有限公司,批号:S171204F)。

甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。钩藤药材经河南省中医药研究院马开副研究员鉴定,凭证标本号为20190729,凭证标本存放于河南省中医药研究院中药室。

### 1.2 动物与细胞

SPF级KM小鼠40只,雌雄各半,体质量18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2016-0011;动物合格证号:1100112011050388。

HUVEC细胞株购自江苏恩莫阿赛生物技术有限公司。

### 1.3 仪器

Waters 2695型高效液相色谱仪(配有2996二极管阵列检测器,柱温箱和EmPower II色谱工作站)(美国Waters公司);LIBROR-160DPT电子天平(万分之一,日本岛津公司);AE240电子天平(十万分之一,瑞士Mettler公司);HH-S6型恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司);UV-5200DT紫外分光光度计(日本岛津公司);ELX800型多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司);HF160W型CO<sub>2</sub>培养箱

(上海力申科学仪器有限公司); LXJ-II 型离心沉淀机(上海医用分析仪器厂)。

## 2 方法和结果

### 2.1 钩藤总碱提取工艺优化

**2.1.1 正交试验设计** 选取乙醇浓度、提取次数、提取时间、物料比为考察因素,根据钩藤生物碱的理化性质结合预实验结果,分别设 3 个水平,选用  $L_9(3^4)$  正交表安排试验,因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

Tab. 1 Level of orthogonal test factor

| 水平 | 乙醇浓度(A)/% | 提取次数(B)/次 | 提取时间(C)/h | 物料比(D)/倍 |
|----|-----------|-----------|-----------|----------|
| 1  | 50        | 1         | 0.5       | 6        |
| 2  | 70        | 2         | 1         | 8        |
| 3  | 90        | 3         | 2         | 10       |

**2.1.2 正交试验样品溶液的测定**<sup>[8]</sup> 正交试验样品溶液制备:取贵州剑河县钩藤粉末 9 份,每份 30 g,按照表 1 所示提取条件进行加热回流,分别合并各次试验提取液并定容至 1 000 mL。将提取后的溶液过滤,作为正交试验样品溶液。

混合对照品溶液制备:精密称取异钩藤碱、钩藤碱、去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱对照品适量,加甲醇溶解并配制成每 1 mL 分别含异钩藤碱 0.008 mg、钩藤碱 0.017 mg、去氢毛钩藤碱 0.037 mg、毛钩藤碱 0.014 mg 的混合对照品溶液,即得。

供试品溶液制备:贵州剑河县钩藤粉碎成细粉,过五号筛,取约 1 g,精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称重,加热回流提取 60 min,放冷,补足失重,摇匀,滤过,即得。

色谱条件:Kinetex<sup>®</sup> C<sub>18</sub>100A 色谱柱(100 mm×4.6 nm, 2.6 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水(含 0.5 g·L<sup>-1</sup> 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐)(B),梯度洗脱(0~2.5 min, 10%A; 2.5~4 min, 10%→15%A; 4~5 min, 15%A; 5~9 min, 15%→20%A; 9~14 min, 20%A; 14~15 min, 20%→25%A; 15~27 min, 25%A; 27~28 min, 25%→10%A; 28~30 min, 10%A);流速:0.8 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:35 °C;进样量:10 μL。

按照上述色谱条件测定钩藤药材供试品溶液和 9 份正交试验样品溶液中异钩藤碱、钩藤碱、去氢毛钩藤碱和毛钩藤碱 4 种单体成分含量,并按以下公式计算各成分相应的转移率:转移率=正交试验中待测成分的含量/钩藤中待测成分的含量×100%。结果见表 2, HPLC 图见图 1。

表 2 正交试验测定结果

Tab. 2 Orthogonal test determination results

| 序号 | A | B | C | D | 异钩藤碱转移率/% | 钩藤碱转移率/% | 去氢毛钩藤碱转移率/% | 毛钩藤碱转移率/% |
|----|---|---|---|---|-----------|----------|-------------|-----------|
| 1  | 3 | 3 | 3 | 1 | 70.37     | 62.71    | 303.33      | 117.95    |
| 2  | 3 | 1 | 2 | 3 | 35.19     | 37.95    | 166.67      | 51.28     |
| 3  | 2 | 3 | 1 | 3 | 94.44     | 84.16    | 340.00      | 117.95    |
| 4  | 1 | 1 | 1 | 1 | 57.41     | 61.06    | 223.33      | 61.54     |
| 5  | 1 | 3 | 2 | 2 | 88.89     | 100.66   | 290.00      | 133.33    |
| 6  | 1 | 2 | 3 | 3 | 88.89     | 108.91   | 343.33      | 117.95    |
| 7  | 2 | 1 | 3 | 2 | 75.93     | 82.51    | 273.33      | 153.85    |
| 8  | 3 | 2 | 1 | 2 | 85.19     | 64.36    | 343.33      | 194.87    |
| 9  | 2 | 2 | 2 | 1 | 103.70    | 92.41    | 350.00      | 200.00    |

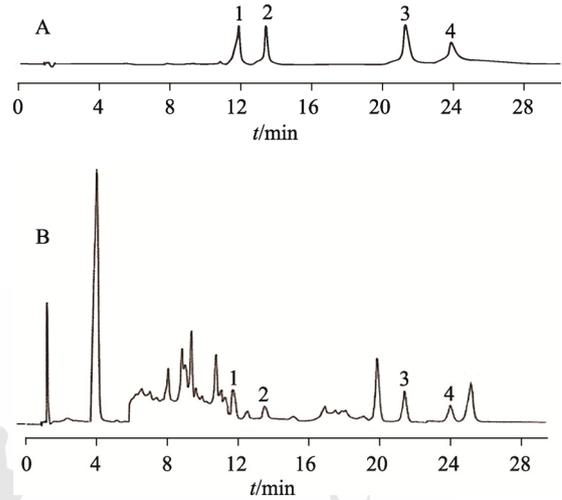


图 1 混合对照品(A)和钩藤样品(B)色谱图

1-异钩藤碱; 2-钩藤碱; 3-去氢毛钩藤碱; 4-毛钩藤碱。

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substance (A) and *Uncaria rhynchophylla* sample(B)

1-Iso-rhynchophylline; 2-rhynchophylline; 3-hirsuteine; 4-hirsutine.

**2.1.3 主成分提取及贡献率计算** 采用软件 SPSS 21.0,对表 2 测得正交试验各组样品的各成分转移率进行降维处理,取特征值>1 对应的成分作为提取主成分,结果见表 3。由表 3 可知,所提取的主成分 1 的特征值为 3.268,累计贡献率为 81.691%;对提取的主成分进行载荷矩阵分析,异钩藤碱、钩藤碱、去氢毛钩藤碱和毛钩藤碱等测定指标均在所提取的主成分上有较高的因子载荷,因子载荷值>0.8,表明提取的主成分能够反映上述指标的绝大多数信息。

表 3 主成分分析

Tab. 3 Principal component analysis

| 主成分 | 初始特征值 |        |         | 提取平方和载入 |        |         |
|-----|-------|--------|---------|---------|--------|---------|
|     | 合计    | 方差/%   | 累计贡献率/% | 合计      | 方差/%   | 累计贡献率/% |
| 1   | 3.268 | 81.691 | 81.691  | 3.268   | 81.691 | 81.691  |
| 2   | 0.538 | 13.439 | 95.131  |         |        |         |
| 3   | 0.161 | 4.034  | 99.165  |         |        |         |
| 4   | 0.033 | 0.835  | 100.000 |         |        |         |

**2.1.4 正交试验结果** 运用SPSS 21.0对成分矩阵中相关数值进行标准化处理,求得综合评分,并以所得综合评分为评价指标,对乙醇浓度(A)、提取次数(B)、提取时间(C)、物料比(D)进行优选,结果见表4。以极差最小列(C)作为误差列,对其他因素的正交试验结果进行方差分析 *F* 检验和 *P* 检验,结果见表5。

表4 正交试验结果

Tab. 4 Orthogonal test results

| 序号 | A     | B     | C     | D     | 综合评分  |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1  | 3     | 3     | 3     | 1     | -0.40 |
| 2  | 3     | 1     | 2     | 3     | -2.98 |
| 3  | 2     | 3     | 1     | 3     | 0.72  |
| 4  | 1     | 1     | 1     | 1     | -1.66 |
| 5  | 1     | 3     | 2     | 2     | 0.65  |
| 6  | 1     | 2     | 3     | 3     | 1.04  |
| 7  | 2     | 1     | 3     | 2     | 0.11  |
| 8  | 3     | 2     | 1     | 2     | 0.79  |
| 9  | 2     | 2     | 2     | 1     | 1.73  |
| K1 | 0.03  | -4.53 | -0.15 | -0.33 |       |
| K2 | 2.56  | 3.56  | -0.6  | 1.55  |       |
| K3 | -2.59 | 0.97  | 0.75  | -1.22 |       |
| R  | 5.15  | 8.09  | 1.53  | 2.77  |       |

表5 方差分析

Tab. 5 Analysis of variance

| 方差来源 | 离均差平方和 | 自由度 | 均方    | <i>F</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|------|--------|-----|-------|------------|------------|
| A    | 4.421  | 2   | 2.210 | 14.034     | 0.067      |
| B    | 11.378 | 2   | 5.689 | 36.122     | 0.027      |
| D    | 1.333  | 2   | 0.667 | 4.233      | 0.191      |
| 误差   | 0.315  | 2   | 0.158 | -          | -          |

由表4-5直观分析可知,各因素对提取效果的影响程度大小为提取次数(B)>乙醇浓度(A)>物料比(D),提取次数(B)对提取工艺有显著性影响( $P<0.05$ ),乙醇浓度(A)和物料比(D)影响较小,不呈显著性。综合考虑,确定最佳提取工艺条件为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即物料比1:8,70%乙醇提取2次,每次2h。

**2.1.5 工艺验证** 以所优选的最佳工艺条件测定3份钩藤总碱提取液,进行验证性试验。结果显示,3份样品中异钩藤碱、钩藤碱、去氢毛钩藤碱和毛钩藤碱的平均转移率分别为90.74%,110.56%,326.67%,128.21%(RSD<5%),表明该提取工艺参数合理,条件稳定可行、重复性好。

## 2.2 钩藤总碱含量测定

**2.2.1 钩藤总碱的制备**<sup>[9-11]</sup> 取钩藤药材约2.45 kg,适当粉碎,加入8倍量的70%乙醇加热

回流提取2次,每次2h,合并提取液,回收乙醇并浓缩至1000 mL,浓缩液中加2%盐酸调pH至1~3,静置过夜,析出红棕色沉淀,离心(2800×g)30 min。上清液再用氨水调至pH 9~10,静置过夜,析出红棕色沉淀,再次离心,合并沉淀,60℃烘干,称重,得到155.5 g深褐色固体,即得钩藤总碱。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取钩藤碱对照品5.28 mg,甲醇溶解,定容至50 mL,得浓度为0.1056 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液。

**2.2.3 钩藤碱的含量测定方法和标准曲线的绘制**<sup>[12]</sup> 精密称取钩藤总碱1.094 mg,加入5 mL pH 3.4的醋酸-醋酸钠缓冲溶液和5 mL 溴甲酚绿溶液,移至分液漏斗,加入10 mL 氯仿,充分振摇萃取3次,合并氯仿层,定容至25 mL,进行紫外光谱扫描(700~300 nm),最大吸收光谱为412 nm。

精密吸取对照品溶液1,5,8,10,15 mL,挥干溶剂,按上述方法制备并进行测定。以吸光度(*X*)和浓度(*Y*)作线性回归,回归方程为 $Y=0.0387X+0.0004$ , $R^2=0.9990$ 。

**2.2.4 钩藤碱含量测定结果** 钩藤总碱提取物中含总生物碱以钩藤碱计,含量为45.88%。另按“2.1.2”项下方法测定异钩藤碱、钩藤碱、去氢钩藤碱和毛钩藤碱的含量,结果分别为2.41,3.17,4.42,1.12 mg·g<sup>-1</sup>。

## 2.3 数据处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用软件SPSS 21.0进行组间比较和独立样本*t*检验分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2.4 急性毒性研究

**2.4.1 最大耐受量(maximum tolerated dose, MTD) 试验** 按中国药典记载的钩藤口服最大用量12 g作为钩藤的成人(50 kg)最大日用量,取“2.2.1”项下制备的钩藤总碱,配制成浓度为0.35 mg·mL<sup>-1</sup>(相当于钩藤药材5.51 g·mL<sup>-1</sup>)的钩藤总碱溶液对小鼠进行急性毒性研究。取小鼠(实验前禁食不禁水12 h)随机分为空白组、钩藤总碱组,每组20只,雌雄各半。给药组按最大灌胃体积30 mL·kg<sup>-1</sup>灌胃给药2次(间隔4 h),给药后观察14 d。空白组给予等量蒸馏水。根据MTD倍数公式计算得各组药物与人MTD值的倍数关系,MTD倍数=(小鼠平均耐受药量/小鼠平均体质量)×(成人平均体质量/成人每日用量)。钩藤总碱溶液对小鼠的MTD为

21.0 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 相当于临床成人日用量的 1 377 倍。

**2.4.2 一般情况观察及体质量影响** 实验期间每天于固定时间段称量小鼠体质量和观察小鼠活动状态、毛发、饮食、二便和死亡情况等, 发现给药 14 d 内, 空白组及钩藤总碱组小鼠都活动正常, 毛发净白有光泽, 饮食饮水无异常, 未有小鼠死亡。与空白组相比, 钩藤总碱组体质量无显著性差异, 表明钩藤总碱对小鼠体质量无明显影响, 见表 6。

表 6 14 d 内小鼠体质量变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=20$ )

Tab. 6 Changes in body weight of mice within 14 d ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=20$ )

| 时间     | 空白组        | 钩藤总碱组      |
|--------|------------|------------|
| 第 1 天  | 23.22±2.03 | 23.11±0.65 |
| 第 2 天  | 27.38±2.71 | 26.04±2.53 |
| 第 3 天  | 28.68±3.16 | 27.73±2.86 |
| 第 4 天  | 30.34±3.82 | 29.35±3.47 |
| 第 5 天  | 31.33±4.11 | 30.25±4.19 |
| 第 6 天  | 32.46±4.65 | 31.88±4.46 |
| 第 7 天  | 33.30±4.90 | 32.85±4.83 |
| 第 8 天  | 33.67±5.15 | 33.41±5.24 |
| 第 9 天  | 34.26±5.41 | 34.13±5.50 |
| 第 10 天 | 35.03±5.34 | 34.71±5.75 |
| 第 11 天 | 35.48±5.58 | 35.23±5.81 |
| 第 12 天 | 36.26±5.84 | 35.98±6.25 |
| 第 13 天 | 37.06±5.91 | 36.80±6.27 |
| 第 14 天 | 37.61±6.01 | 37.45±6.29 |

**2.4.3 生化指标的测定** 实验结束后进行小鼠摘眼球取血, 测定血清中 BUN、GPT、GOT 水平。BUN 反映肾脏的健康状况, GOT、GPT 反映肝脏的健康状况。与空白组比较, 钩藤总碱组 BUN 和 GOT 有降低的趋势, 但差异无统计学意义, GPT 显著降低( $P<0.01$ ), 表明钩藤总碱在 MTD 下对小鼠无肝肾急性毒性, 结果见表 7。

表 7 钩藤总碱对小鼠生化指标的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=20$ )

Tab. 7 Effects of total alkaloids of *Uncaria rhynchophylla* on biochemical indexes of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=20$ )

| 组别    | BUN/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | GOT/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ | GPT/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
|-------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 空白组   | 7.33±1.10                             | 12.88±0.30                         | 13.40±0.58                         |
| 钩藤总碱组 | 6.65±0.78                             | 12.74±1.25                         | 11.52±0.49 <sup>1)</sup>           |

注: 与空白组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ .

## 2.5 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤的 HUVEC 影响

**2.5.1 钩藤总碱对 HUVEC 的不良反应** 取对数生长的 HUVEC 以  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度接种于 96 孔

板, 每孔 150  $\mu\text{L}$ , 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 浓度饱和湿度的培养箱中培养 24 h。实验设空白组、钩藤总碱组(浓度分别为 1 500, 500, 50, 5, 0.5, 0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 每组设 3 个复孔, 24 h 后, 加入 20  $\mu\text{L}$  0.5% 噻唑蓝 [3-(4,5)-dimethylthiaziazolo (-z-y1)-3,5-diphenyltetrazoliumromide, MTT] 溶液, 继续培养 4 h 后吸弃旧培养基, 加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 室温避光震荡 10 min, 570 nm 处检测各孔吸光度(optical density, OD)值并计算细胞存活率。

结果显示, 与空白组比较, 钩藤总碱组的药物浓度在 5~1 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , OD 值均随药物浓度的提高而降低, 提示细胞存活率有一定的下降趋势, 差异无统计学意义; 药物浓度为 0.5, 0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的钩藤总碱组 OD 值与空白组基本一致。实验结果说明不同浓度钩藤总碱对 HUVEC 的毒性较小。根据实验结果, 当钩藤总碱浓度为 5, 0.5, 0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, HUVEC 的 OD 值与空白组较为接近, 选择上述 3 个浓度组考察钩藤总碱对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 HUVEC 活力的影响。

**2.5.2 钩藤总碱对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤的 HUVEC 细胞存活率的影响** 取对数生长的 HUVEC,  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  接种于 96 孔板, 每孔 150  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 浓度饱和湿度的培养箱中培养 24 h。实验设空白组、模型组和钩藤总碱组(5, 0.5, 0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 与 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共培养, 每孔 150  $\mu\text{L}$ , 每组设 5 个复孔, 24 h 后, 加入 20  $\mu\text{L}$  0.5% MTT 溶液, 继续培养 4 h 后吸弃旧培养基, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 室温避光震荡 10 min, 570 nm 处检测各孔 OD 值并计算细胞存活率。

结果显示, 与空白组比较, 模型组经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤后, 细胞存活率显著降低( $P<0.01$ ), 仅为空白组的 58%; 与模型组比较, 0.05~5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  钩藤总碱组细胞存活率均有不同程度的提高, 为模型组的 113%~119%, 且细胞存活率随着钩藤总碱浓度增加而逐渐升高; 与模型组比较, 钩藤总碱 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组细胞存活率差异有统计学意义( $P<0.01$ )。说明钩藤总碱对损伤的 HUVEC 有一定的保护作用。

**2.5.3 钩藤总碱对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤的 HUVEC 上清液中 LDH、ET-1、NO 的影响** HUVEC 培养同“2.5.2”项, 实验设空白组、模型组和钩藤总碱组(5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 与 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共培养, 每

组 5 个复孔, 取上清液, 按试剂盒的说明书测定并计算 LDH、ET-1、NO 的含量, 结果见表 8。

表 8 钩藤总碱对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤 HUVEC 上清液 LDH、NO、ET-1 的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab. 8 Effects of total alkaloids of *Uncaria rhynchophylla* on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury HUVEC supernatant LDH, NO, ET-1 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 组别    | LDH/U·mL <sup>-1</sup>         | ET-1/pg·mL <sup>-1</sup>      | NO/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 空白组   | 77.189 3±0.238 7               | 2.072 2±0.034 5               | 8.682 5±0.436 7               |
| 模型组   | 82.996 7±0.275 6 <sup>2)</sup> | 2.500 8±0.003 3 <sup>2)</sup> | 7.450 3±0.198 2 <sup>1)</sup> |
| 钩藤总碱组 | 80.371 4±0.767 2 <sup>4)</sup> | 2.304 9±0.062 3 <sup>3)</sup> | 8.327 7±0.696 9               |

注: 与空白组比较, <sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01; 与模型组比较, <sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01。

Note: Compared with the blank group, <sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01; compared with the model group, <sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01.

结果显示, 与空白组相比, 模型组 LDH、ET-1 显著升高(P<0.01), NO 显著降低(P<0.05); 与模型组相比, 钩藤总碱组 LDH、ET-1 显著降低(P<0.01 或 P<0.05)。

### 3 讨论

钩藤中含多种生物碱成分, 本研究采用 HPLC 同时测定了钩藤及其提取液中异钩藤碱、钩藤碱、去氢毛钩藤碱和毛钩藤碱等 4 种生物碱类成分的含量。钩藤中生物碱多为吲哚类生物碱, 该类成分在乙醇中溶解度较好, 故本研究采用乙醇加热回流的方式提取钩藤总碱。研究发现, 以乙醇为溶媒, 钩藤中生物碱的提取转移率较高, 异钩藤碱和钩藤碱的最高转移率可达药材的 90%以上, 去氢毛钩藤碱和毛钩藤碱的最高转移率可达药材的 200%~300%。据文献报道<sup>[13-14]</sup>, 钩藤生物碱的分子结构中均含有酯键, 对热不稳定, 在长时间或多次加热过程中可出现化学成分的结构变化。已有研究表明, 钩藤碱在提取过程中可大部分转化为异钩藤碱、小部分转化为未知成分, 异钩藤碱可在提取过程中转化为异去氢钩藤碱、去氢钩藤碱及钩藤碱等成分<sup>[13]</sup>。历代本草记录钩藤入煎剂应“后下”、不宜久煎, 可能与钩藤生物碱的不稳定性有关。根据本研究结果, 推测钩藤中生物碱类成分在溶液状态下受热, 可能发生复杂的相互转化反应, 毛钩藤碱和去氢毛钩藤碱的提取率远超过原药材中的含量, 是由钩藤中其他生物碱受热转化而来。该设想有待今后开展更多实验加以验证。

由于中药成分复杂, 分别以多个成分含量为考察指标, 难以获得一致的最佳提取工艺参数,

加权法处理是目前常见的综合评价方法<sup>[15]</sup>。考虑到加权法对各指标权重系数的分配具有一定的主观性, 引入主成分分析法, 将多个观察指标结果经降维处理, 综合为 1 个主成分, 以其综合得分对钩藤提取工艺的主要影响因素进行评估, 能够较好地反映 4 个生物碱成分的信息, 从而使实验结果更客观、更合理。以主成分因子的综合得分为指标, 优选出了钩藤总碱的最佳提取工艺参数, 经验证表明, 所选工艺参数生物碱提取率高, 稳定可行。

原拟以 40 mL·kg<sup>-1</sup> 对小鼠进行灌胃, 发现该剂量超过小鼠的最大胃容积, 因此, 将灌胃剂量改为 30 mL·kg<sup>-1</sup>, 灌胃给药 2 次, 结果显示钩藤总碱组小鼠无死亡情况出现, 故不对小鼠进行半数致死量测定。

在内皮细胞中, 过氧化损伤产生过量的活性氧和活性氮, 破坏自由基清除平衡, 引起 DNA、蛋白质和细胞膜的损伤, 导致 NO 等指标生物利用度降低, 损害内皮细胞功能, 从而引起中风、高血压、冠心病、心肌梗死、动脉粥样硬化等心血管性疾病<sup>[16]</sup>。NO 为内皮源性舒张因子, 可以调节血管扩张和内皮细胞功能, LDH 为机体内的一种糖酵解酶, 可反映细胞或细胞膜损伤的程度<sup>[17]</sup>, ET-1 可以促进血管平滑肌细胞向内皮迁移, 加快损伤部位修复的过程<sup>[18]</sup>。研究表明, 钩藤总碱可以提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVEC 存活率, 上调 NO 的含量, 下调 LDH、ET-1 的含量, 表明其能调控 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVEC 中血管活性物质, 影响 HUVEC 的细胞膜收缩、舒张等功能, 对损伤的 HUVEC 有保护作用, 较好地体现出与钩藤治疗中风、高血压的临床功效相关的生物活性。

本实验采用正交试验-主成分分析法优选出了钩藤总碱最佳提取工艺(物料比 1:8, 70%乙醇提取 2 次, 每次 2 h), 操作简单方便, 方法可行, 提取的钩藤总碱中生物碱的含量较高。对钩藤总碱进行小鼠急性毒性研究、HUVEC 毒性和对 HUVEC 过氧化损伤的保护作用研究, 发现钩藤总碱的急性毒性和细胞毒性较小, 有心脑血管细胞保护作用。本实验可为今后开展钩藤的临床用药的长期安全性和有效性评价、钩藤总碱的生物活性及其作用机制研究提供实验参考。

### REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 268-269.

- [2] 高晓宇, 丁茹, 王道平, 等. 钩藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2017, 23(4): 380-382.
- [3] LIU W, DENG L H, ZHAO Y Q. Research progress on pharmacological effects of *Uncaria* extract and rhynchophylline[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2021, 32(6): 899-904.
- [4] 韦贵云, 许崇摇. 钩藤碱和异钩藤碱抗高血压作用的研究进展[J]. 中国医药科学, 2020, 10(15): 32-36.
- [5] WANG M Y, TANG Y, LIU F, et al. Optimization of the extraction technology of total alkaloids from *Uncaria rhynchophylla*[J]. J Zunyi Med Univ(遵义医科大学学报), 2020, 43(5): 656-661.
- [6] ZHANG H, LI S. Study on extraction process of alkaloid from *Uncaria rhynchophylla*[J]. Asia Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2017, 13(7): 36-38.
- [7] SHI X W, ZHAO X, ZHANG B, et al. Study on *Schisandra* lignan relieves ang II-induced oxidative stress damage of human umbilical vein endothelial cells[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(5): 576-584.
- [8] 吴冰帆. 基于补肝肾临床功效的怀牛膝-钩藤降压有效部位实验研究[D]. 河南中医药大学, 2021.
- [9] 徐东升, 高言明, 杨春, 等. 贵州钩藤总生物碱含量测定研究[J]. 微量元素与健康研究, 2015, 32(2): 34-35.
- [10] WANG H G, KONG X, GU D S, et al. Extraction and effects of total alkaloids from *Squilla oratoria* on proliferation of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2Z[J]. China Trop Med(中国热带医学), 2017, 17(5): 449-451.
- [11] DONG H, LI J Q, WANG Y Q, et al. Optimization of extraction process and antioxidant studies of total alkaloids from Tibetan medicine *Dryopteris* by response surface[J]. J Nat Sci Hunan Norm Univ(湖南师范大学自然科学学报), 2020, 43(4): 69-74.
- [12] 徐东升, 杨春, 叶世芸, 等. 贵州中药材钩藤主要有效成分总生物碱含量的测定[J]. 贵阳中医学院学报, 2014, 36(4): 30-32.
- [13] HAO B, YANG X J, FENG Y, et al. Pharmaceutical research progress of rhynchophylla based on chemical stability[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(23): 4532-4537.
- [14] LIU W, YANG X P, WANG Z S, et al. Studies on thermal stability of total alkaloids in rhynchophylline[J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2011, 29(6): 442-444.
- [15] HAN Y F, TANG X, SHI Y, et al. Optimization of extraction process for Yangyin Runmu granules by box-behnken design based on entropy weight method-analytic hierarchy process method[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2022, 39(7): 896-903.
- [16] 张建江, 易著文. 血管内皮细胞损伤及修复的研究进展[J]. 临床心身疾病杂志, 2007(2): 183-185, 177.
- [17] YANG Y, DUAN W X, JIN Z X, et al. The protective effects and mechanism of curcumin against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced vascular endothelial cells injury[J]. Chin J Extracorp Circ(中国体外循环杂志), 2011, 9(4): 239-242.
- [18] LI M, WANG L L, CHANG B M. Advances in research on the mechanism of vascular endothelial cell function injury[J]. Chin J Arterioscler(中国动脉硬化杂志), 2019, 27(8): 730-736.

收稿日期: 2022-04-22

(本文责编: 李艳芳)