

钩藤饮片 HPLC 指纹图谱研究

谭超元¹, 王海波^{1,2}, 王东^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立钩藤饮片的 HPLC 指纹图谱评价体系, 并结合聚类分析判别方法, 提高钩藤饮片质量控制标准。方法: 流动相乙腈-0.385% 乙酸铵-冰乙酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 245 nm。对 27 批不同商品地钩藤饮片进行测定, 以中药色谱指纹图谱相似度评价软件建立了钩藤饮片标准指纹谱, 并计算饮片的相似度。结果: 方法精密度、重复性与稳定性良好。将钩藤饮片聚类分为五类, 确定 17 个共有峰, 80% 的样品相似度 > 0.87。结论: 建立的 HPLC 指纹图谱和聚类分析方法有助于钩藤饮片质量全面评价体系的建立。

[关键词] 钩藤; 高效液相色谱; 指纹图谱; 聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0063-03

Study on Uncariae Ramulus Cum Uncis by HPLC-Fingerprints

TAN Chao-yuan¹, WANG Hai-bo^{1,2}, WANG Dong^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;
2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method of HPLC fingerprint and hierarchical cluster analysis for quality control of Uncariae Ramulus Cum Uncis. **Method:** About 27 samples from different sources were analyzed by HPLC. Acetonitrile and 0.385% ammonium acetate-acetic acid buffer were used as mobile phase by gradient eluting. Detection wavelength was set at 245 nm and column at 35 °C. By the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (Version 2004A), mean chromatogram was generated as the representative standard fingerprint. **Result:** Seventeen main marker peaks were selected in the standard fingerprint, and the similarity of 80% samples was over 0.87. The method is high sensitivity and good reproducibility and the Uncariae Ramulus Cum Uncis could be divided into five grades through the results of hierarchical cluster analysis. **Conclusions:** The fingerprint study and hierarchical cluster analysis method can be used for the quality control of Uncariae Ramulus Cum Uncis.

[Key words] Uncariae Ramulus Cum Uncis; HPLC; fingerprint; hierarchical cluster analysis

钩藤为茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks.、大叶钩藤 *U. macrophylla* Wall.、毛钩藤 *U. hirsuta* Havil.、华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil. 或无柄果钩藤 *U. sessili fructus* Roxb. 的干燥带钩茎枝。具有清热平肝, 息风定惊之功效。在天

麻钩藤饮、羚角钩藤汤等方剂中均有使用。现代研究表明钩藤具有降压、扩血管、抗心率失常、抗癫痫等作用^[1]。

钩藤主要有效成分为生物碱类^[2], 主含钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱等。钩藤系多基源中药材^[3], 由于受产地、气候和生态环境、存储条件的影响, 不同产地钩藤饮片中主要指标成分的差异较大。虽有钩藤 HPLC 指纹图谱的文献报道, 但是对钩藤饮片中去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱等异构成分的区分文献未见报道。为了更准确地控制药材的质量, 利用中药指纹图谱技术^[4-5]并结合聚类分析对收集的 27 个不同商品地的钩藤饮片

[收稿日期] 20110628(008)

[第一作者] 谭超元, 在读硕士, 从事中药制剂分析, Tel: 0411-87586107, E-mail: tanchaoyuan@163.com

[通讯作者] * 王东, 教授, 博士研究生导师, 医学博士, 从事中药药效物质基础和质量标准研究, E-mail: wd1967@sohu.com

的质量进行综合评价,为其质量控制提供研究依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(四元梯度泵),Instrument online 色谱工作站(Agilent 公司),微孔滤膜(0.45 μg),日本岛津 AY220 电子分析天平(d=0.1 mg)。

1.2 试药 甲醇、乙腈(色谱纯,天津大茂),水为

超纯水,冰乙酸、乙酸铵为分析纯;钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、去氢钩藤碱氮氧化物、异去氢钩藤碱氮氧化物为自制,经 HPLC 检测纯度 >98.0%。

1.3 药材 钩藤饮片经鉴定后,编号、粉碎(过四十目筛)备用,药材信息见表 1。

表 1 收集药材来源产地

No.	样品来源	产地	No.	样品来源	产地
S1	湖南长沙	湖南	S15	大连市东特 2 店	江西
S2	湖南长沙	广西	S16	沈阳市天益堂	不详
S3	沈阳市成大方圆	不详	S17	沈阳市东北大药房-4	不详
S4	沈阳药店	不详	S18	厦门市济生堂	江西
S5	沈阳药店	不详	S19	厦门市卡好康药房	广西
S6	沈阳市东北大药房-1	江苏	S20	厦门市鹭黄大药房	广东
S7	沈阳市东北大药房-2	江苏	S21	厦门市鹭黄大药房	福建
S8	沈阳市东北大药房-3	江苏	S22	营口鲅鱼圈	亳州
S9	沈阳市保健大药房	广西	S23	营口鲅鱼圈	江苏
S10	安国市场	湖南	S24	安国市场	不详
S11	沈阳市新药特药连锁店	不详	S25	杭州张同泰药房	浙江
S12	沈阳市天士力大药房	湖南	S26	安徽	安徽
S13	沈阳红太阳大药房	不详	S27	中国药品生物制品鉴定所	对照药材
S14	大连市东特 1 店	江西			

2 方法与结果

2.1 溶剂制备

2.1.1 对照品储备液的制备 准确称取钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱氮氧化物、去氢钩藤碱氮氧化物对照品,加甲醇分别配制成 1 g·L⁻¹ 的溶液,作为对照储备液备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 样品粉碎后过四十目筛,称取 4.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 的乙醇 30 mL,静置 36 h,摇匀,过滤,取续滤液定容到 25 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 色谱条件 色谱柱为 Agilent XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),检测波长 245 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,进样量 20 μL,流动相乙腈(A),0.385% 乙酸铵-冰乙酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 10 min,15% ~ 27% A,10 ~ 40 min,27% ~ 35% A)。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度实验 选取 S1 号样品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,并按上述色谱条件进行测定,连续进样 6 次,以 17 个特征峰的峰面积计算各特征峰的峰面积 RSD < 3.4%,相对峰面积的 RSD < 4.7%,各共有峰的保留时间 RSD < 0.2%,相对保留

时间 RSD < 0.2%,说明方法精密度良好。

2.3.2 重复性实验 取同一 S1 号样品,同时称取 6 份,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,并按上述色谱条件进行 HPLC 测定。以 17 个特征峰的峰面积计算各特征峰的峰面积 RSD < 5.0%,相对峰面积的 RSD < 4.4%,各共有峰的保留时间 RSD < 4.1%,相对保留时间 RSD < 0.5%,说明方法的重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一样品,分别放置 0,1,2,4,8 h,按上述色谱条件进行 HPLC 测定,以 17 个特征峰的峰面积计算各特征峰的峰面积 RSD < 4.5%,相对峰面积的 RSD < 5.0%,各共有峰的保留时间 RSD < 0.4%,相对保留时间 RSD < 0.5%,说明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 指纹图谱的绘制 将 27 批药材按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下方法测定样品与对照品,将所得的 27 批钩藤饮片的 HPLC 图谱以 AIA 格式依次导入到国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统 2004A》软件,对比色谱图确定共有峰为 17 个。将钩藤碱、去氢钩藤碱、异钩藤碱、异去氢钩藤碱、去氢钩藤碱氮氧化物、异去氢钩藤碱氮

氧化物对照品色谱图与样品色谱图中相应位置的色谱峰进行比较,确认样品指纹图谱中7号峰是异去氢钩藤碱氮氧化物,8号峰是去氢钩藤碱氮氧化物,10号峰是钩藤碱,11号峰是去氢钩藤碱,16号峰是异钩藤碱,17号峰是异去氢钩藤碱(见图1)。各共有峰相对保留时间 RSD < 3.4%。

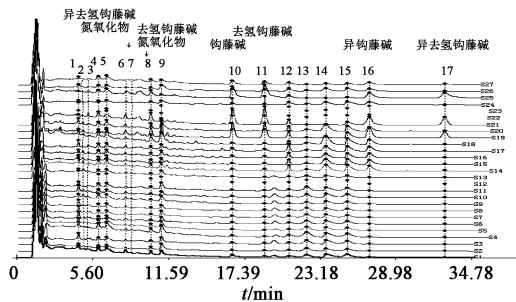


图1 钩藤样品指纹图谱叠加图

2.4.2 指纹图谱的聚类分析 将27个样品的17个共有峰相对峰面积作为特征,使用SPSS分析软件,采用欧氏距离作为测度,按组间分析法对样品进行聚类分析。试验结果显示将样品聚为五类,其中S1,S19,S21,S23,S25,S27为第一类,S16,S17,S22,S26为第二类,S3,S4,S5,S6,S7,S8,S9,S10,S12,S13,S18,S21为第三类,S14,S15,S20,S24为第四类,S18为第五类。

2.4.3 纹图谱综合评价 通过对27批不同来源钩藤饮片整体观察结合指纹图谱综合评价,发现不同产地和购买地的药材外观及内在质量不尽相同。通过对药材整体观察综合评价,发现相对峰面积聚类分析的第一类所含生物碱整体含量较高,且与对照药材归为一类,说明该类饮片样品质量较好,作为推荐品。利用该组饮片建立模型饮片,再与27批饮片进行相似度评价计算,用来评价各个钩藤饮片质量。

取27批样品的17个共有特征峰的相似度,由此来评价样品之间的相似性。样本间夹角余弦计算结果为:0.971 0,0.886 3,0.939 1,0.882 1,0.882 3,0.920 4,0.910 4,0.946 3,0.875 0,0.954 9,0.910 5,0.958 2,0.919 3,0.934 5,0.887 3,0.923 0,0.873 9,0.890 0,0.612 2,0.951 3,0.498 6,0.870 1,0.558 2,0.893 2,0.405 7,0.908 0,0.708 6。相似度评价结果显示,27批钩藤饮片质量较好的有23批,样品所含化学成分与含量较为一致,说明收集的市售钩藤饮片质量较为稳定,81%的样品相似度 > 0.87。其余19%的样品相似度 < 0.8,可能是由于样品来源、产地和储存等条件差异

造成化学成分与含量有一定差异,提示在质量控制上需要给予重视。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法选择 分别以60%,75%,80%,95%乙醇和75%,100%甲醇为提取剂,并采用超声、回流、索氏提取法、浸提4种提取方式进行供试品溶液制备。试验结果表明,75%乙醇浸提,色谱图峰数最多,峰面积较大。提取溶剂的料液比考察1:20,2:20,3:20,4:20 g·mL⁻¹结果表明,料液比为3:20时色谱图显示样品峰面积较大、共有峰数目最多,因此确定钩藤饮片浸提所用提取溶剂用量。12,24,36,48 h浸提时间试验,考察结果表明浸提36 h出峰数最多。

3.2 色谱条件选择 钩藤所含生物碱类成分的极性差异较大,在参考文献的基础上,优化选择了分离度较佳的梯度洗脱系统,尽可能使不同极性的成分和主要成分峰均能检出。在色谱条件的选择上,选择了两根不同厂家的色谱柱进行实验,比较分析时间、分离度和色谱峰型。考察了不同的流动相体系,如甲醇-水,乙腈-水等。结果表明试验所用条件分离度较好。

在试验中发现,由于钩藤饮片来源较多,市售饮片由于贮藏条件、存放时间等因素导致在质量上存在很大区别。本试验尝试利用多指标综合评价饮片质量,并将中药指纹图谱-聚类分析技术应用于市售钩藤饮片的质量研究,有利于全面、准确的控制钩藤饮片质量,利于保证临床用药和制药生产安全、有效。

[参考文献]

- [1] 王晓良,张黎明,华峰. 钩藤对大鼠和豚鼠心肌细胞钾离子通道的影响[J]. 药学学报,1994,29(1):9.
- [2] 王盟,刘卫. 钩藤总生物碱的研究进展[J]. 实用医学杂志,2008,3(3):360.
- [3] 王宛. 我国钩藤药材资源现状调查[J]. 中国药师,2008,11(11):1368.
- [4] 范莉,濮润,赵海誉,等. 红花药材的HPLC指纹图谱及质量研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):37.
- [5] 王海波,裴世柱. 指纹图谱技术在中药研究上的应用[J]. 辽宁中医学院学报,2005,7(4):395.
- [6] 郭星,曾常青. HPLC测定不同产地钩藤中异钩藤碱和钩藤碱的含量[J]. 河南中医,2010,30(1):40.

[责任编辑 蔡仲德]