

黔产钩藤药材茎枝和叶的 HPLC 指纹图谱比较

崔桂琴¹, 查雨锋¹, 王克英^{2*}

(1. 贵阳医学院, 贵阳 550004; 2. 贵州省食品药品检验所, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**比较黔产钩藤带钩茎枝和叶的 HPLC 指纹图谱,分析二者化学成分的差异,为钩藤叶的后续研究提供实验依据。**方法:**采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版计算钩藤带钩茎枝和叶各 10 批样品的 HPLC 指纹图谱的相似度,以钩藤碱和异钩藤碱为指标成分进行指纹图谱比较,色谱条件为 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.02% 氨水(B)梯度洗脱(0~45 min, 30%~60% A; 45~75 min, 60%~64% A; 75~90 min, 64%~70% A; 90~95 min, 70%~70% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 245 nm,进样量 10 μL。**结果:**确定了 16 个共有峰构成 10 批钩藤茎枝药材的特征指纹图谱,各批样品的相似度均 > 0.87; 16 个共有峰构成 10 批钩藤叶特征指纹图谱,各批样品的相似度均 > 0.80。**结论:**钩藤叶中异钩藤碱含量高于钩藤茎枝,但二者含有的钩藤碱含量相差不大。建立的指纹图谱条件能用于比对钩藤茎枝和叶中主要化学成分,为钩藤叶的药用研究提供参考。

[关键词] 钩藤茎枝叶; 指纹图谱; 相似度评价; 钩藤碱; 异钩藤碱

[中图分类号] R284.1; R284.2; R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0120-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210120

Comparison on HPLC Fingerprint of Uncariae Ramulus Cum Uncis Stems and Leaves from Guizhou Province

CUI Gui-qin¹, ZHA Yu-feng¹, WANG Ke-ying^{2*}

(1. Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Guizhou Institute for Food and Drug Control, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint for comparative studying on chemical substances difference between stems and leaves of Uncariae Ramulus Cum Uncis, in order to lay scientific basis for follow-up studies of Uncariae Ramulus Cum Uncis leaves. **Method:** Similarity of HPLC fingerprint was calculated by 2004A version of “traditional medicine fingerprint similarity software evaluation system” for 10 batches of stems and 10 batches of leaves in Uncariae Ramulus Cum Uncis. Taking rhynchophylline and isorhynchophylline as index components, HPLC analysis was performed on a Kromasil column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient eluting system consisted of methanol (A) -0.02% ammonia (B) (0-45 min, 30%-60% A; 45-75 min, 60%-64% A; 75-90 min, 64%-70% A; 90-95 min, 70%-70% A), flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was maintained at 30 ℃ and detection wavelength was set at 245 nm, injection volume of 10 μL. **Result:** Sixteen common peaks were obtained in 10 batches of Uncariae Ramulus Cum Uncis stems with similarity higher than 0.87 in each batches of samples; sixteen common peaks were obtained in 10 batches of Uncariae Ramulus Cum Uncis leaves with similarity higher than 0.80 in each batches of samples. **Conclusion:** The content of isorhynchophylline in leaves is higher than that in leaves, but the content of rhynchophylline have little difference. This established fingerprint conditions can be used as initial comparative studies on main chemical

[收稿日期] 20140526(011)

[基金项目] 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合中药字[2010]5039号)

[第一作者] 崔桂琴,在读硕士,初级药师,从事中药鉴定及质量标准研究, Tel:15085963998, E-mail:957158331@qq.com

[通讯作者] *王克英,主任药师,从事中药鉴定、成分分析及质量标准研究, Tel:13078562739, E-mail:260901641@qq.com

components of *Uncariae Ramulus Cum Uncis* stems and leaves, it provide a reference for medicinal research of *Uncariae Ramulus Cum Uncis* leaves.

[Key words] *Uncariae Ramulus Cum Uncis* stems and leaves; fingerprint; similarity evaluation; rhynchophylline; isorhynchophylline

钩藤为中医临床常用的传统中药,具有息风定惊、活血通经、清热平肝^[1]之功效,治疗头痛眩晕、感冒夹惊、惊痫抽搐、全身麻木等心血管及神经系统疾病的疗效很好^[2-3],目前市场上已有大量使用钩藤作为原料药材制成的复方制剂,致使钩藤资源已达到供求紧张状态。该药材中医临床收录的用药部位仅为带钩茎枝,叶多丢弃。但通过化学成分研究发现,钩藤叶中主要化学成分为生物碱类,且生物碱种类与其带钩茎枝中成分相似^[4]。现代药理学研究证实钩藤的主要活性成分为生物碱类^[5-6],故推测钩藤叶应具有和钩藤茎枝相同或相似的药理作用^[7],说明对钩藤叶进行全方位质量评价具有重要意义。关于钩藤叶中总生物碱的含量测定及以钩藤碱为控制指标的含量测定已有报道,但尚未见钩藤叶指纹图谱研究方面的报道。本实验拟通过构建较为成熟的钩藤带钩茎枝指纹图谱^[8-9]作为参照,建立钩藤叶的指纹图谱,通过比较二者的指纹图谱,分析钩藤带钩茎枝和钩藤叶中化学成分的相似情况,为钩藤的新药用部位开发提供参考。

1 材料

2695/2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),XS105DU 型和 AE240 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),UPW-50N 型超纯水器(北京历元电子仪器技贸电子仪器公司)。钩藤碱、异钩藤碱对照品(上海原叶生物科技有限公司,批号分别为 2010923-2011,2010923-2011,纯度依次为 98%,96%),水为自制超纯水,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。钩藤带钩茎枝和钩藤叶各 10 批,均采自贵州省的药材种植基地,由贵州省昌昊责任有限公司提供,经贵阳中医学院陈德援教授鉴定为茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks 的带钩茎枝和叶,采集信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.02% 氨水(B)梯度洗脱(0 ~ 45 min, 30% ~ 60% A; 45 ~ 75 min, 60% ~ 64% A; 75 ~ 90 min, 64% ~ 70% A; 90 ~ 95 min, 70% ~ 70% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 245 nm,进样量 10 μL。

表 1 钩藤带钩茎枝(S1 ~ S10)及钩藤叶(S11 ~ S20)的样品来源

No.	产地	收集日期	相似度
S1	贵州荔波	2012 年 12 月	0.923
S2	贵州剑河	2013 年 01 月	0.953
S3	贵州剑河	2012 年 12 月	0.878
S4	贵州锦屏	2013 年 01 月	0.891
S5	贵州凯里	2013 年 01 月	0.923
S6	贵州荔波	2013 年 01 月	0.918
S7	贵州榕江	2013 年 12 月	0.992
S8	贵州台州	2013 年 12 月	1.000
S9	贵州天柱	2013 年 12 月	0.925
S10	贵州余庆	2013 年 12 月	0.891
S11	贵州荔波	2013 年 07 月	0.838
S12	贵州剑河	2013 年 07 月	0.835
S13	贵州剑河	2013 年 10 月	0.827
S14	贵州锦屏	2013 年 07 月	0.803
S15	贵州凯里	2013 年 07 月	0.886
S16	贵州荔波	2013 年 10 月	0.934
S17	贵州榕江	2013 年 10 月	0.835
S18	贵州台州	2013 年 07 月	0.992
S19	贵州天柱	2013 年 10 月	0.892
S20	贵州余庆	2013 年 07 月	0.889

2.2 对照品溶液的制备 分别称取钩藤碱、异钩藤碱对照品适量,加甲醇制成质量浓度依次为 0.062 4, 0.061 9 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末(过三号筛)约 1.0 g,加甲醇 25 mL 超声 20 min,滤过,残渣加甲醇 20 mL 超声 20 min,合并滤液,滤液蒸干,加适量甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密量取 S1 供试品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件进样 6 次,记录色谱图,以 12 号峰异钩藤碱和 14 号峰钩藤碱为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 0.03% ~ 1.61%,相对峰面积的 RSD 0.53% ~ 2.33%。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版计算指纹图谱的相似度 0.980 ~ 1.000,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 称取样品 S1 共 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,以 12 号峰异钩藤碱和 14 号峰钩藤碱为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 0.03% ~ 1.54%,相对峰面积的 RSD 0.68% ~ 2.58%。《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版计算指纹图谱相似度 0.929 ~ 1.000,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 S1 供试品溶液分别在 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,以 12 号峰异钩藤碱和 14 号峰钩藤碱为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 0.04% ~ 0.83%,相对峰面积的 RSD 0.34% ~ 2.88%。应用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版计算指纹图谱相似度 0.959 ~ 1.000,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立及相似度分析 称取 10 批钩藤茎枝和 10 批钩藤叶适量,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版进行相似度分析,见图 1 ~ 5 和表 1。结果显示钩藤叶和钩藤茎枝的共有色谱峰均为 16 个,以钩藤带钩茎枝建立的共有指纹图谱为参照,钩藤叶建立的共有指纹图谱模式中色谱信息能在带钩茎枝中得到追踪,比较钩藤茎枝和钩藤叶的拟合共有模式中两者整体面貌基本一致,二者的相似度均 > 0.8,说明 10 批钩藤茎枝和 10 批钩藤叶色谱信息基本一致,但各色谱峰的峰面积差距较大,见图 3。通过异钩藤碱、钩藤碱对照品进行色谱峰指认,钩藤茎枝和钩藤叶色谱图中 12 号峰为异钩藤碱,14 号峰为钩藤碱;计算发现钩藤叶中异钩藤碱含量高于钩藤茎枝,但钩藤碱含量相差不大。通过两者的指纹图谱共有模式对比发现,钩藤茎枝和钩藤叶的色谱信息及各色谱峰保留行为基本一致,说明二者所含化学成分相似。

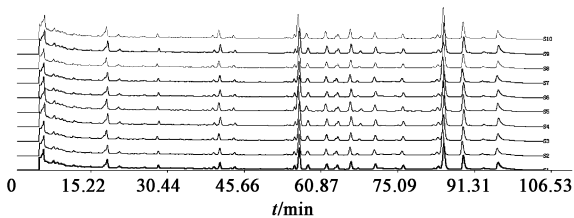


图 1 钩藤茎枝样品指纹谱叠加(由下往上为 S1 ~ S10)

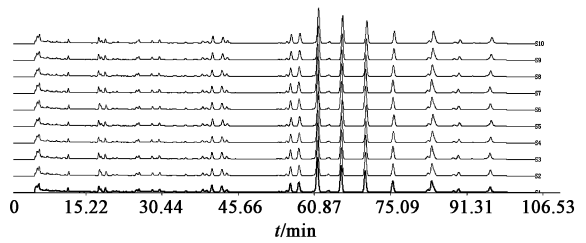
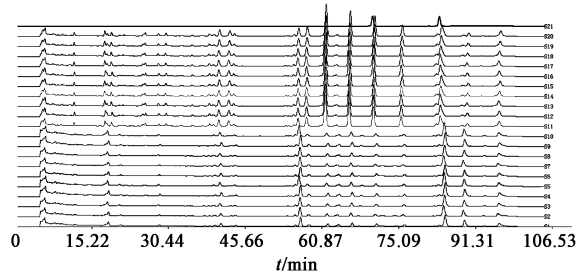
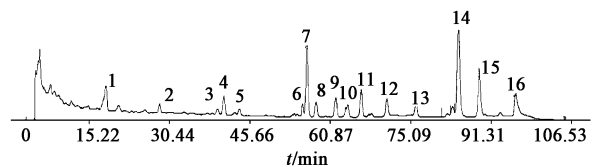


图 2 钩藤叶样品指纹谱叠加(由下往上为 S1 ~ S10)



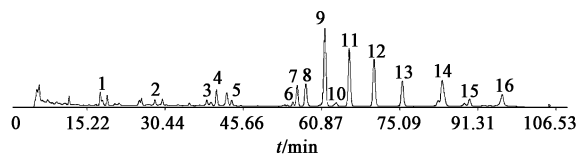
注:S21 为异钩藤碱、钩藤碱的混合对照品溶液

图 3 钩藤茎枝和钩藤叶指纹谱叠加(由下往上为 S1 ~ S21)



12. 异钩藤碱;14. 钩藤碱

图 4 钩藤茎枝共有模式



12. 异钩藤碱;14. 钩藤碱

图 5 钩藤叶共有模式

纹图谱的建立干扰较大,可能是溶剂峰及一些杂质峰的影响,但钩藤主要化学成分为生物碱类,出峰时间较晚,故在样品色谱图处理时将前 5 min 的色谱峰去除。指纹图谱能体现中药样品中化学成分的细微差异,还能评价不同产地的同种药材质量的差异,故本文选用指纹图谱评价钩藤茎枝和钩藤叶中化学成分的相似性,采用相同的样品提取方法及色谱条件,以反映在该条件下二者中化学成分的差异。

建立的钩藤叶指纹图谱中色谱峰可在钩藤茎枝建立的指纹图谱中得到追踪,充分表明二者在化学成分上具有相似性,通过对照品色谱峰比对,指认出了异钩藤碱和钩藤碱 2 个化学成分的色谱峰,钩藤叶中异钩藤碱含量均高于钩藤带钩茎枝,但二者所

3 讨论

由于样品中前 5 min 的色谱峰重复性差,对指

小金丸中制草乌单酯型生物碱类成分的含量测定

任桂林¹, 韩丽^{1*}, 王小平^{1,2}, 梅明¹, 何婧¹, 唐宜轩¹, 张定堃¹, 杨明^{1,3}

(1. 成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 成都 611137;

2. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000;

3. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的:通过比较不同厂家及批号小金丸中单酯型生物碱类成分的含量,为该制剂的临床用药安全提供参考。方法:建立小金丸中制草乌单酯型生物碱类成分(苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱)的HPLC含量测定方法,流动相乙腈-20 mmol·L⁻¹磷酸二氢钠(用三乙胺调节pH 6.5)(47:53),检测波长235 nm。比较4个厂家生产的8批样品中3种生物碱类成分含量。结果:3种生物碱类成分线性范围均为4~60 mg·L⁻¹,加样回收率分别为98.42%,101.79%,102.13%。3种单酯型生物碱总质量分数最高达214.718 μg·g⁻¹,最低值18.452 μg·g⁻¹。结论:不同厂家和同一厂家不同批次样品中3种生物碱的含量存在较大差异,可能与原材料质量、制剂工艺及生产设备等因素有关。

[关键词] 制草乌; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 小金丸

[中图分类号] R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0123-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210123

Determination of Monoester-alkaloids from Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta in Xiaojin Wan

REN Gui-lin¹, HAN Li^{1*}, WANG Xiao-ping^{1,2}, MEI Ming¹, HE Jing¹,

[收稿日期] 20140221(012)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81274098)

[第一作者] 任桂林,硕士,从事中药新技术、新工艺研究,Tel:18010618161,E-mail:1007866178@qq.com

[通讯作者] *韩丽,教授,硕士生导师,从事中药新制剂、新技术、新剂型研究,Tel:028-61800127,E-mail:hanliyx@163.com

含钩藤碱含量相差不大。

钩藤叶入药在《广西本草选集》中有记载:用钩藤全株5钱~1两,水煎服,可治疗感冒风热,高烧抽搐,高血压,头晕,头痛,目眩;用全株1斤水煎代茶饮,可解断肠草中毒^[10]。有些地区用钩藤叶与蛇莓等捣烂敷于患处治疗关节痛。说明钩藤叶入药古来有之,钩藤叶作为药用部位入药将成为钩藤用药趋势。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:240.

[2] 莫志贤,许丹丹. 钩藤临床运用的新进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(5):684.

[3] 霍青,赵婧,李运伦,等. 钩藤临床应用研究概况[J]. 山东中医药杂志,2010,29(6):426.

[4] 汪冰. 新药资源钩藤叶的基础研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2006.

[5] 张峻,杨成金,吴大刚,等. 钩藤的化学成分研究[J]. 中草药,1998,29(10):649.

[6] 叶齐,齐荔红. 钩藤的主要成分及生物活性研究进展[J]. 西北药学杂志,2012,27(5):508.

[7] 林晓亮. 毛钩藤叶的药学鉴定及药理学研究[D]. 广州:南方医科大学,2007.

[8] 胡岚岚,汤建林. HPLC-ELSD测定中药钩藤中钩藤碱的含量[J]. 重庆医学,2013,42(10):1089.

[9] 杨秀娟,洪燕龙,吴飞,等. HPLC测定钩藤中和异钩藤碱的方法学探讨[J]. 中国中药杂志,2013,38(5):720.

[10] 广西壮族自治区革命委员会卫生局. 广西本草选编. 上册[M]. 桂林:广西人民出版社,1974:886.

[责任编辑 刘德文]