

HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价黔钩藤质量

郭正红^{1,2}, 陈山¹, 何琪¹, 肖婷^{3*}, 杨武德^{1*}

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州中医药大学钩藤产业关键技术研究及产品开发中心, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 基于HPLC指纹图谱、多成分定量结合化学模式识别法评价黔钩藤质量。方法 从贵州中药材市场随机购买了18批钩藤饮片, 采用HPLC法建立了18批钩藤饮片的指纹图谱; 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)进行相似度评价, 对其中5种生物碱进行了指认, 并采用外标法和一测多评法进行了含量测定; 采用SPSS 26.0统计软件进行聚类分析和主成分分析。结果 在钩藤饮片指纹图谱中, 确定了共有峰28个, 采用对照品指认了5个生物碱成分, 分别为异去氢钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、钩藤碱和去氢毛钩藤碱, 18批钩藤的相似度评价表明市场上钩藤的质量差异较大; 聚类分析将18批钩藤饮片样品聚为3大类; 主成分分析用5个主成分进行综合评价, 其中8批钩藤饮片的综合得分大于1; 采用一测多评法和外标法计算18批钩藤饮片中5种生物碱的含量, 经GraphPad差异性分析表明, 2种方法无显著性差异。结论 市场上钩藤质量差异较大, 建立了检测5个生物碱成分的一测多评法和外标法, 为完善钩藤质量评价提供参考。

关键词: 钩藤; 生物碱; 指纹图谱; 一测多评; 化学模式识别法; 质量评价; 异去氢钩藤碱; 异钩藤碱; 去氢钩藤碱; 钩藤碱; 去氢毛钩藤碱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2023)03-0583-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.03.016

Quality evaluation of *Uncaria rhynchophylla* collected in Guizhou province based on combinative methods of HPLC fingerprint and multi-components determination and chemical pattern recognitionGUO Zhenghong^{1,2}, CHEN Shan¹, HE Qi¹, XIAO Ting³, YANG Wude¹

1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Uncaria Industry key technology research and product development center, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

3. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang, 550025, China

Abstract: Objective To evaluate the quality of *Uncaria rhynchophylla* collected in Guizhou province based on combinative methods of HPLC fingerprint and multi-components determination and chemical pattern recognition. **Methods** Totally 18 batches of *U. rhynchophylla* were randomly purchased from Guizhou traditional Chinese medicine market. The fingerprint of 18 batches of *U. rhynchophylla* was established by HPLC. The similarity of 18 batches was analyzed with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia (2012). Five alkaloids were identified, and their contents were determined by external standard method and one test and multiple evaluations (QAMS). The hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were performed by SPSS 26.0. **Results** Totally 28 peaks were identified in the fingerprint of *U. rhynchophylla* and five of the common peaks were identified as isocorynoxine, isorhynchophylline, corynoxine, rhynchophylline, and hirsuteine by reference substance. The fingerprint similarities of the 18 batches indicate that the quality of *U. rhynchophylla* in the market varied greatly. According to HCA, the samples were divided into three groups. Five principal components were selected

收稿日期: 2022-10-12

基金项目: 贵州省科技计划项目[黔科合基础-ZK(2021)540]; 贵州省科技计划项目[黔科合基础-ZK(2021)535]; 贵州中医药大学博士启动基金[3043-043190010]

第一作者: 郭正红, 讲师, 主要从事中药活性成分及质量标准研究。E-mail: guo_zhenghong@163.com

*通信作者: 杨武德, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药化学成分及作用机制研究。E-mail: 2994771096@qq.com

肖婷, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药化学成分及作用机制研究。E-mail: tingjinxiao@126.com

for comprehensive evaluation by PCA, and the comprehensive scores of eight batches were greater than one. The contents of five alkaloids in 18 batches were calculated by the methods of external standard method and QAMS. GraphPad was used for difference analysis, and the results showed that there was no significant difference between the two methods. **Conclusion** This study showed that the quality of *U. rhynchophylla* differed greatly in the market, we have successfully established the multiple evaluation method and the external standard method for the determination of five alkaloid components, providing a reference for the improvement of the quality evaluation of *uncaria hook.*

Key words: *Uncaria rhynchophylla*; alkaloids; fingerprint; one test and multiple evaluations; chemical pattern recognition; quality evaluation; isocorynoxine; isorhynchophylline; corynoxine; rhynchophylline; hirsuteine

钩藤是茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.、大叶钩藤 *U. macropylla* Wall.、毛钩藤 *U. hirsute* Havil.、华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil. 或无柄果钩藤 *U. sessilifructus* Roxb. 的干燥带钩茎枝,味甘苦、微寒,归心经,具有息风定惊、清热平肝等功效,用于肝风内动、惊痫抽搐、高热惊厥、头痛眩晕等症的治疗,同时也是包括天麻钩藤颗粒、女珍颗粒和牛黄镇惊丸等27种成方制剂的重要组成部分^[1]。现代药理学研究表明,钩藤具有保护心脑血管和神经系统、抑制炎症和肿瘤细胞增殖、清除自由基和抗焦虑等作用^[2]。

钩藤主要分布在两广、云贵高原及福建、湖南、湖北等地区^[3]。贵州气候全年温暖湿润,光热同期,地势落差大,气候垂直差异明显,适合药用植物的生长,是著名的道地药材产地和中药材最丰富的省份之一。《贵州省国民经济和社会发展第十四个五年规划和2035年远景目标纲要》提出优先发展道地药材,稳定中药材种植面积,建成全国道地中药材的重要产区。《国务院关于支持贵州在新时代西部大开发上闯新路的意见》国发[2022]2号文件要求贵州不断做好绿水青山就是金山银山这篇大文章,推进中药材精深加工产业发展。钩藤是贵州传统中药材,在贵州种植历史悠久,钩藤在我国共有12个种,其中贵州省有7个,2011年国家质检总局批准“剑河钩藤”为地理标志保护产品,2021年钩藤种植面积15万余亩,种植户万余户,主要集中在贵州剑河、三都、锦屏和天柱县等地。

作为少数民族主要聚居地区,钩藤在贵州苗族、布依族、水族、仡佬族等少数民族医药中也是常用药^[4],但用药方式、药量和品种多有差异,同时钩藤基原多,导致不同品种钩藤使用混乱,市场上多伪品,质量参差不齐,严重影响治疗效果和用药安全,《中国药典》2020年版仅对钩藤中的异钩藤碱进行了定性分析,缺乏更为严格的质控标准。因此本研究收集了贵州中药材市场上的18批钩藤药材,建

立HPLC指纹图谱,并采用HPLC外标法和一测多评法对钩藤主要药效活性成分生物碱进行多成分定量,结合化学模式识别法对贵州药材市场上的钩藤进行质量评价,为钩藤药材的质量标准提升提供依据。

1 材料

1.1 药材

18批钩藤药材均购买于贵阳中药材市场(表1),经贵州中医药大学王波老师鉴定为茜草科植物钩藤 *U. rhynchophylla* (Miq.)Miq. ex Havil. UR。

表1 样品来源信息

Table 1 Sample source information

编号	来源	编号	来源
S1	铄铭药业	S10	祥怡农产品
S2	升源明特	S11	太升8号
S3	安泰药行	S12	泽东商行
S4	徐波土特产	S13	源生土特产
S5	百草堂	S14	鑫发药行
S6	何正国土特产	S15	陈姐土特产批发部
S7	和信特产批发	S16	鸿鑫行
S8	绍升中药行	S17	忘芳名特
S9	鑫兴药行	S18	良生土特产批发部

1.2 主要仪器

Ultimate 3000 高效液相、PDA 检测器(Thermo Fisher Scientific, USA); Agilent HC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、ME204/02 万分之一分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; HH-4 数显恒温水浴锅(上海力晨邦西仪器科技有限公司); KQ5200 超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司); J209A-4 药用粉碎机(河南黄骅齐家务科学仪器)。

1.3 主要试剂

钩藤碱(批号 76-66-4)、异钩藤碱(批号 6859-01-4)、去氢钩藤碱(批号 630-94-4)、异去氢钩藤碱(批号 51014-29-0)、去氢毛钩藤碱(批号 35467-43-7)购买于成都艾博克生物科技有限公司,质量分

数均大于98%;色谱纯甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司);磷酸氢二钠、二氯甲烷、浓氨水、浓硫酸、偏钒酸铵等试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制和色谱条件

2.1.1 供试品溶液的制备 将饮片粉碎,过40目筛,精密称量2.000 g,置具塞平底烧瓶中。加入浓氨试剂2.0 mL,浸泡30 min,精密加入二氯甲烷50.0 mL,密塞称量,水浴加热回流提取1 h,放冷,补足减失质量,滤过,弃去初滤液,精密量取滤液25.0 mL,挥干,残渣加入10.0 mL 甲醇使其全部溶解,精密量取5.0 mL于10 mL EP管中,用0.45 μm 微孔滤膜滤过,得供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取钩藤碱4.72 mg、异钩藤碱4.06 mg、去氢钩藤碱3.90 mg、异去氢钩藤碱4.14 mg、去氢毛钩藤碱4.20 mg置于5.0 mL量瓶中,加甲醇至刻度线,制成质量浓度分别为0.944、0.812、0.780、0.828、0.840 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,置冰箱中备用。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为Agilent HC-C₁₈(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm);流动相为5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液(A)-甲醇(B);体积流量为1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温为25 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为245 nm^[5];进样量为10 μL ;梯度洗脱条件:0~10 min,30%~45% B;10~25 min,45%~56% B;25~32 min,56%~64% B;32~34 min,64%~74% B;34~40 min,74%~76% B。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 专属性考察 混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液(甲醇)的色谱图见图1。

2.2.2 精密度试验 精密称取同一批钩藤饮片粉末(S1)2.000 g,按“2.1.1”项方法制备供试品溶液,再按照“2.1.3”项色谱条件进样6次,以钩藤碱作为参照计算得到各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%($n=6$),说明该方法精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 精密称取同一批钩藤饮片粉末(S1)2.000 g,按“2.1.1”项方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、1、2、4、8、12、24 h,再按照“2.1.3”项色谱条件进行含量测定。以钩藤碱作为参照计算得到各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%($n=6$),说明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.4 重复性试验 分别精密称取同一批钩藤饮

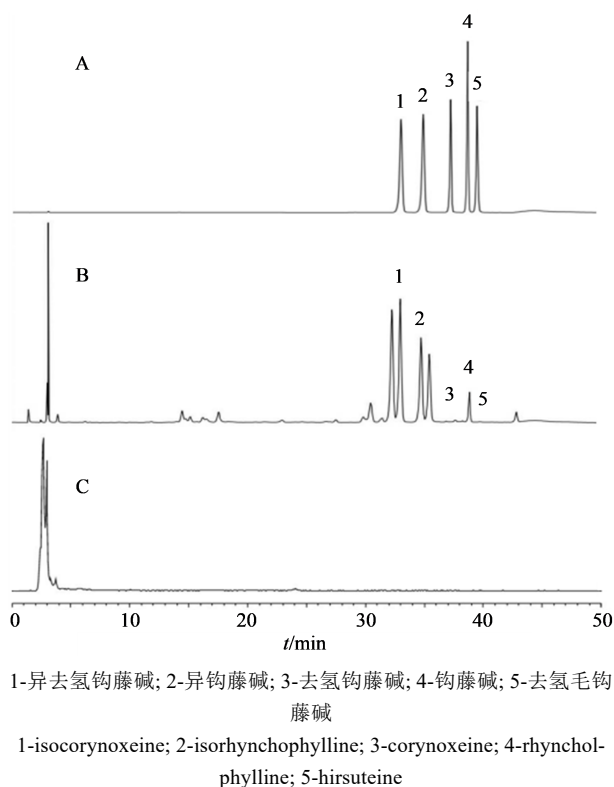


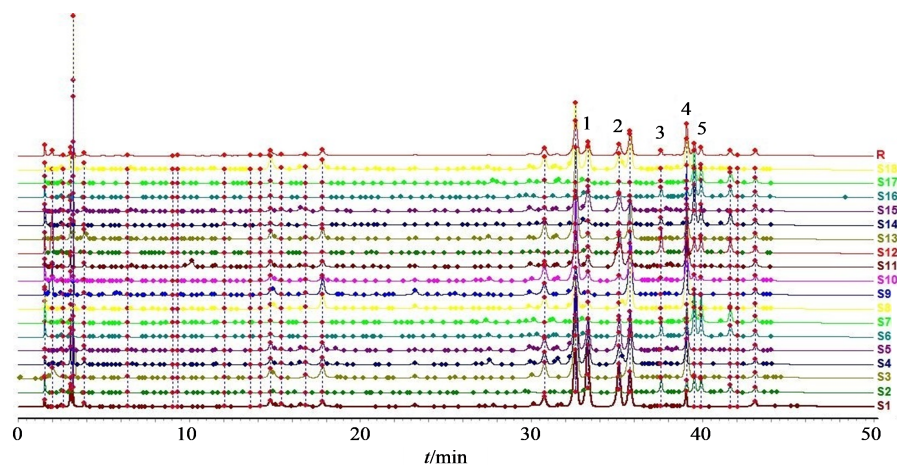
图1 混合对照品溶液(A)、供试品溶液S1(B)、阴性对照溶液(C)HPLC色谱图

Fig. 1 Mixed control solution (A), test solution S1 (B), and negative control solution (C) HPLC chromatograms

片粉末(S1)6份,每份2.000 g,按“2.1.1”项方法制备供试品溶液,再按照“2.1.3”项色谱条件进行含量测定。以钩藤碱作为参照计算得到各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%($n=6$),说明该方法重复性良好。

2.2.5 HPLC指纹图谱生成及共有峰指认 取18批钩藤饮片粉末制备供试品溶液,进样分析,记录色谱图。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)》,分别以S12为参照样品种,设置时间窗宽度为0.5 min,图谱间距为100,通过多点校正及自动峰匹配生成叠加指纹图谱,采用中位数法生成钩藤药材的对照指纹图谱(R)。在钩藤饮片指纹图谱中,确定了共有峰28个。通过对照品对比,确认了其中5个色谱峰(1~5)分别为异去氢钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、钩藤碱、去氢毛钩藤碱。见图2。

2.2.6 HPLC指纹图谱相似度分析 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对18批钩藤的HPLC指纹图谱以及R进行相似度评价。结果如表2所示,18批钩藤的相似度为0.377~0.954,钩藤的指纹图谱相似度有差异,表明市场上钩藤的质量差异较大。



1-异去氢钩藤碱;2-异钩藤碱;3-去氢钩藤碱;4-钩藤碱;5-去氢毛钩藤碱
1-isohydrohynchophylline; 2-isorhynchophylline; 3-dehydrohynchophylline; 4-rhynchophylline; 5-dehydrohirsutine

图2 HPLC 指纹图谱共有模式和对照指纹图谱(R)

Fig. 2 HPLC fingerprint common mode and control fingerprint (R)

表2 HPLC 指纹图谱的相似度分析

Table 2 Similarity analysis results of HPLC fingerprint

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
S1	1.000	0.321	0.672	0.923	0.950	0.263	0.187	0.544	0.459	0.757	0.870	0.336	0.746	0.236	0.987	0.265	0.192	0.864
S2	0.321	1.000	0.254	0.290	0.288	0.962	0.881	0.379	0.345	0.236	0.341	0.877	0.173	0.881	0.382	0.943	0.845	0.271
S3	0.672	0.254	1.000	0.861	0.829	0.244	0.139	0.893	0.875	0.909	0.760	0.372	0.910	0.223	0.627	0.213	0.141	0.908
S4	0.923	0.290	0.861	1.000	0.990	0.260	0.173	0.684	0.608	0.942	0.918	0.331	0.939	0.240	0.898	0.249	0.179	0.984
S5	0.950	0.288	0.829	0.990	1.000	0.263	0.185	0.656	0.578	0.908	0.934	0.328	0.903	0.246	0.925	0.258	0.193	0.968
S6	0.263	0.962	0.244	0.260	0.263	1.000	0.947	0.332	0.308	0.238	0.320	0.814	0.176	0.951	0.317	0.991	0.937	0.258
S7	0.187	0.881	0.139	0.173	0.185	0.947	1.000	0.180	0.157	0.180	0.203	0.691	0.116	0.956	0.231	0.966	0.973	0.168
S8	0.544	0.379	0.893	0.684	0.656	0.332	0.180	1.000	0.980	0.680	0.662	0.488	0.678	0.259	0.521	0.276	0.159	0.730
S9	0.459	0.345	0.875	0.608	0.578	0.308	0.157	0.980	1.000	0.617	0.588	0.520	0.618	0.236	0.436	0.252	0.144	0.661
S10	0.757	0.236	0.909	0.942	0.908	0.238	0.180	0.680	0.617	1.000	0.814	0.260	0.993	0.252	0.712	0.227	0.183	0.961
S11	0.870	0.341	0.760	0.918	0.934	0.320	0.203	0.662	0.588	0.814	1.000	0.435	0.806	0.260	0.873	0.295	0.204	0.899
S12	0.336	0.877	0.372	0.331	0.328	0.814	0.691	0.488	0.520	0.260	0.435	1.000	0.211	0.691	0.397	0.776	0.648	0.323
S13	0.746	0.173	0.910	0.339	0.903	0.176	0.116	0.678	0.618	0.993	0.806	0.211	1.000	0.187	0.702	0.164	0.123	0.964
S14	0.236	0.881	0.223	0.240	0.246	0.951	0.956	0.259	0.236	0.252	0.260	0.691	0.187	1.000	0.276	0.965	0.979	0.244
S15	0.987	0.382	0.627	0.898	0.925	0.317	0.231	0.521	0.436	0.712	0.873	0.397	0.702	0.276	1.000	0.320	0.241	0.836
S16	0.265	0.943	0.213	0.249	0.258	0.991	0.966	0.276	0.252	0.227	0.295	0.776	0.164	0.965	0.320	1.000	0.964	0.238
S17	0.192	0.845	0.141	0.179	0.193	0.937	0.973	0.159	0.144	0.183	0.204	0.648	0.123	0.979	0.241	0.964	1.000	0.176
S18	0.864	0.271	0.908	0.984	0.968	0.258	0.168	0.730	0.661	0.961	0.899	0.323	0.964	0.244	0.836	0.238	0.176	1.000
R	0.846	0.500	0.920	0.948	0.935	0.481	0.378	0.824	0.768	0.914	0.893	0.542	0.897	0.448	0.831	0.460	0.377	0.954

2.3 聚类分析

采用 SPSS 26.0 统计软件,以 18 批钩藤饮片样品的共有峰峰面积为变量,采用组间平均数联结法,以平方欧氏距离作为样品相似度的距离公式,对钩藤饮片样品进行聚类分析。由聚类分析结果可知,当欧式平方距离为 20 时,18 批钩藤饮片样品可聚为 3 大类,其中第 1 类包含 7 个样品,即 S6、

S16、S7、S14、S2、S17、S12。第 2 类包含 2 个样品,即 S8、S9。第 3 类包含 9 个样品,即 S10、S13、S3、S11、S15、S4、S5、S18、S1。同指纹图谱相似度分析结果相似,表明市场上钩藤质量存在差异,其差异与生长所处的气候环境、土壤环境、种植方式、采收时间及加工有关。结果见图 3。

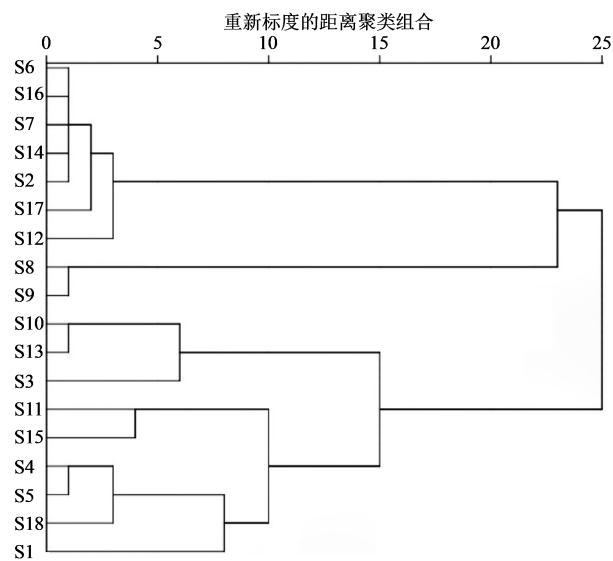


图3 18批钩藤样品指纹图谱聚类分析树状图

Fig. 3 Fingerprint of dendrogram of cluster analysis of 18 batches of *U. rhynchophylla*

2.4 主成分分析(PCA)

以18批钩藤饮片样品的28个共有峰峰面积标准化为变量,用SPSS 26.0统计分析软件对其进行PCA,以主成分的特征值及贡献率作为选择主成分的依据,计算主成分综合得分,得特征值、贡献率、成分矩阵见表3、4。

表3 主成分特征值和累积贡献率

Table 3 Eigenvalues of principal components and cumulative contribution rate

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比	累积贡献率%	总计	方差百分比	累积贡献率%
1	11.574	41.335	41.335	11.574	41.335	41.335
2	6.880	24.572	65.907	6.880	24.572	65.907
3	2.173	7.760	73.667	2.173	7.760	73.667
4	1.911	6.824	80.491	1.911	6.824	80.491
5	1.431	5.110	85.601	1.431	5.110	85.601

由表3可知,提取特征值大于1的为前5个主成分,主成分1的特征值为11.574,贡献率为41.335%;主成分2的特征值为6.880,贡献率为25.572%;主成分3的特征值为2.173,贡献率为7.760%;主成分4的特征值为1.911,贡献率为6.824%;主成分5的特征值为1.431,贡献率为5.110%;5个主成分能反映钩藤中85.601%的主要信息。表4反映了5个主成分与28个共有峰之间的相关系数,第1主成分主要反映了色谱峰26、15、24、21、17、18、25、16、13、22、6、5、11、1和28的贡献。

表4 因子载荷矩阵

Table 4 Component matrix

	1	2	3	4	5
26	-0.903	0.262	0.169	0.102	0.065
15	0.894	0.367	0.102	0.001	0.026
24	-0.887	0.184	0.173	0.240	-0.016
21	0.887	0.215	-0.296	0.067	0.007
17	0.882	0.164	0.018	0.188	-0.133
18	0.865	-0.149	0.246	0.010	-0.219
25	-0.845	0.249	0.237	0.133	0.078
16	0.831	0.366	-0.369	0.069	-0.005
13	0.761	-0.137	0.384	0.358	-0.035
22	-0.740	0.283	0.204	-0.164	0.229
6	0.732	-0.375	0.316	0.131	-0.182
5	0.676	-0.574	0.335	0.061	-0.057
11	0.627	0.547	0.057	0.003	-0.128
1	-0.621	0.215	-0.032	0.388	0.008
28	-0.576	0.243	-0.313	-0.251	-0.250
8	0.452	0.841	0.147	-0.214	0.187
12	0.399	0.740	0.027	0.237	0.366
7	0.498	0.710	0.167	-0.416	0.015
10	0.138	0.703	0.335	0.341	0.352
20	0.411	-0.700	0.149	-0.202	0.378
19	0.395	-0.695	0.146	-0.207	0.448
2	0.119	0.671	0.177	-0.600	0.234
4	0.660	-0.664	0.253	0.003	0.011
27	0.427	0.632	0.021	0.332	-0.362
3	0.279	0.631	0.295	-0.457	-0.238
9	-0.311	0.532	0.497	0.378	0.069
23	0.501	0.467	-0.671	0.115	0.071
14	0.462	-0.067	-0.418	0.286	0.545

通过各主成分所对应的贡献率为权重系数计算综合得分,并进行排序,结果见表5。综合得分较高的为S18、S3、S9、S5、S14、S10、S13、S8。此8批钩藤饮片的综合得分均大于1,说明这8批钩藤饮片的质量较好。

将经过处理后的峰面积导入多元变量统计软件SIMCA14.1作图,得到PCA二维分布图,见图4。采用非监督模式识别方法PCA来观察样品的自然聚集。可以看出,18批钩藤样品同样也聚为3类,与聚类分析结果一致。

2.5 外标法测定5种生物碱的含量

2.5.1 线性关系考察 精密吸取对照品适量,加甲醇逐级稀释,制成钩藤碱质量浓度分别为0.236 00、0.118 00、0.047 20、0.011 80 mg·mL⁻¹,

表5 18批钩藤饮片的主成分因子得分和排序

Table 5 Principal component factor scores and ranking of 18 batches of *U. rhynchophylla*

编号	主成分1得分	主成分2得分	主成分3得分	主成分4得分	主成分5得分	综合得分	排序
S1	1.941	-5.074	0.154	-1.160	0.154	-3.985	13
S2	-3.930	-0.485	0.030	-0.703	-0.144	-5.232	16
S3	4.879	6.663	0.763	-2.765	-0.418	9.122	2
S4	2.103	-3.25	-0.089	-0.763	-0.780	-2.779	10
S5	3.517	-1.474	0.830	0.111	0.959	3.943	4
S6	-4.362	-0.044	-0.029	0.086	-0.128	-4.477	14
S7	-4.36	0.586	0.320	0.668	-0.265	-3.051	11
S8	1.795	1.717	-2.890	0.887	-0.375	1.134	8
S9	2.737	2.131	-3.656	1.499	1.358	4.069	3
S10	1.174	0.656	0.116	0.802	-0.833	1.915	6
S11	0.513	-2.081	-0.299	-0.667	-0.581	-3.115	12
S12	-3.000	2.800	1.140	-1.965	1.884	0.859	9
S13	3.171	-0.977	1.385	0.306	-2.645	1.240	7
S14	-3.841	2.318	1.877	2.373	0.945	3.672	5
S15	0.162	-2.731	-0.681	-1.155	-0.295	-4.700	15
S16	-4.226	-0.156	-0.383	-0.092	-0.649	-5.506	17
S17	-3.218	-0.564	-0.932	-0.085	-1.077	-5.876	18
S18	4.949	-0.035	2.345	2.625	0.580	10.464	1

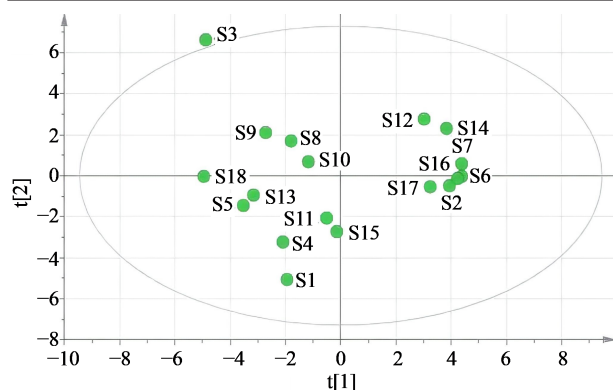


图4 18批钩藤样品PCA二维散点图

Fig. 4 PCA two-dimensional scatter plot of 18 batches of *U. rhynchophylla*

异钩藤碱质量浓度分别为0.203 00、0.101 50、0.040 60、0.010 15 mg·mL⁻¹,去氢钩藤碱的质量浓度分别为0.195 00、0.097 50、0.039 00、0.009 75 mg·mL⁻¹,异去氢钩藤碱的质量浓度分别为0.207 00、0.103 50、0.041 40、0.010 35 mg·mL⁻¹,去氢毛钩藤碱的质量浓度分

别为0.210 00、0.105 00、0.042 00、0.010 50 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液。精密吸取10 μL,按照“2.1.3”项色谱条件进行含量测定,记录峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量质量浓度为横坐标,绘制5种生物碱的标准曲线,并求其回归方程,见表6。

2.5.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液10 μL注入HPLC仪中,按照“2.1.3”项色谱条件进行含量测定,连续进样6次,记录峰面积,计算RSD小于2.0%,结果表明该仪器的精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一钩藤饮片供试品溶液10 μL,分别于0、1、2、4、8、12、24 h,按照“2.1.3”项色谱条件进行含量测定,记录峰面积,计算RSD小于3.0%,结果表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取同一批钩藤饮片粉末6份,按“2.1.1”项方法制备供试品溶液,按照“2.1.3”项色谱条件进行含量测定,记录峰面积,计算RSD小于

表6 线性关系考察

Table 6 Investigation results of linear relationship

成分	回归方程	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	R ²
异去氢钩藤碱	$Y=466.37x+0.7937$	0.010 35~0.828 00	1.000 0
异钩藤碱	$Y=494.12x+0.1983$	0.010 15~0.812 00	0.999 8
去氢钩藤碱	$Y=338.62x+2.1214$	0.009 75~0.780 00	0.999 7
钩藤碱	$Y=415.75x+0.7456$	0.011 80~0.944 00	1.000 0
去氢毛钩藤碱	$Y=343.31x+1.2722$	0.010 50~0.840 00	0.999 8

3.0%,结果表明该方法的重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取同一批钩藤饮片供试品6份,分别精密加入5种对照品,按“2.1.1”项方法制备供试品溶液,按照“2.1.3”项色谱条件进行含量测定,加样回收率为95%~105%,RSD小于3.0%。

2.6 一测多评法测定5种生物碱的含量

2.6.1 相对校正因子的测定 将混合对照品溶液各浓度10 μL注入HPLC中进行测量,以钩藤碱为内参物,计算其他4种生物碱的相对校正因子。见表7。

2.6.2 不同条件对校正因子的影响 考察不同柱温、不同体积流量对相对校正因子的影响。见表8。

表7 4种生物碱的相对校正因子

Table 7 Relative correction factor of four alkaloids

试验	相对校正因子			
	异去氢钩藤碱/钩藤碱	异钩藤碱/钩藤碱	去氢钩藤碱/钩藤碱	去氢毛钩藤碱/钩藤碱
1	0.893	0.841	1.223	1.208
2	0.876	0.868	1.213	1.213
3	0.897	0.839	1.147	1.181
4	0.886	0.849	1.176	1.155
5	0.885	0.853	1.162	1.205
平均值	0.887	0.850	1.184	1.192
RSD/%	0.91	1.36	2.76	2.04

表8 柱温、体积流量对校正因子的影响

Table 8 Effect of column temperature and flow rate on relative correction factor

影响因素	相对校正因子				
	异去氢钩藤碱/钩藤碱	异钩藤碱/钩藤碱	去氢钩藤碱/钩藤碱	去氢毛钩藤碱/钩藤碱	
体积流量/(mL·min ⁻¹)	0.9	0.874	0.842	1.176	1.206
	1.0	0.885	0.853	1.184	1.246
	1.1	0.918	0.858	1.194	1.253
柱温/°C	25	0.885	0.836	1.178	1.198
	28	0.876	0.875	1.201	1.289
	30	0.913	0.882	1.218	1.272
	35	0.906	0.873	1.216	1.238
平均值	0.894	0.860	1.195	1.243	
RSD/%	1.91	1.88	1.44	2.64	

2.7 一测多评法与标准曲线法结果的比较

称取18批钩藤粉末适量,制备供试品溶液,并进样进行含量测定,记录峰面积值。采用一测多评法和标准曲线法计算18批钩藤饮片中5种生物碱的含量。见表9。

用GraphPad对标准曲线法和一测多评法测定结果进行差异性分析,结果见图5。4个成分标准曲线法和一测多评法测定结果无显著性差异。一测多评法可用于钩藤饮片中生物碱的含量测定。

表9 18批钩藤饮片中5种生物碱的含量

Table 9 Contents of five alkaloids in 18 batches of *U. rhynchophylla*

编号	钩藤碱/(mg·g ⁻¹)		异去氢钩藤碱/(mg·g ⁻¹)		异钩藤碱/(mg·g ⁻¹)		去氢钩藤碱/(mg·g ⁻¹)		去氢毛钩藤碱/(mg·g ⁻¹)	
	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评
S1	0.42	2.42	2.52	1.63	1.69	0.09	0.04	0.04	0.02	0.02
S2	0.36	0.26	0.26	0.13	0.13	0.48	0.45	0.53	0.53	0.53
S3	2.14	0.21	0.21	0.11	0.11	0.10	0.04	0.07	0.03	0.03
S4	0.89	1.20	1.22	0.97	0.97	0.08	0.03	0.06	0.03	0.03
S5	0.66	1.30	1.38	1.37	1.39	0.08	0.03	0.06	0.02	0.02
S6	0.43	0.22	0.22	0.20	0.20	0.48	0.46	0.82	0.84	0.84
S7	0.10	0.15	0.17	0.11	0.13	0.17	0.15	0.93	1.10	1.10
S8	3.29	0.32	0.32	0.26	0.25	0.08	0.02	0.06	0.03	0.03
S9	3.66	0.12	0.11	0.10	0.09	0.08	0.02	0.05	0.02	0.02
S10	0.81	0.31	0.32	0.29	0.29	0.12	0.06	0.24	0.21	0.21
S11	0.75	0.38	0.40	1.23	1.25	0.09	0.04	0.06	0.03	0.03
S12	0.82	0.30	0.30	0.34	0.34	0.77	0.76	0.66	0.65	0.65
S13	0.84	0.29	0.29	0.18	0.19	0.08	0.03	0.07	0.03	0.03
S14	0.19	0.17	0.18	0.13	0.13	0.28	0.26	0.75	0.79	0.79
S15	0.23	1.00	1.10	0.69	0.73	0.08	0.02	0.11	0.08	0.08
S16	0.24	0.20	0.21	0.16	0.17	0.35	0.33	0.67	0.71	0.71
S17	0.93	0.15	0.15	0.11	0.11	0.10	0.09	0.17	0.14	0.14
S18	1.01	0.81	0.85	0.70	0.70	0.08	0.02	0.08	0.04	0.04

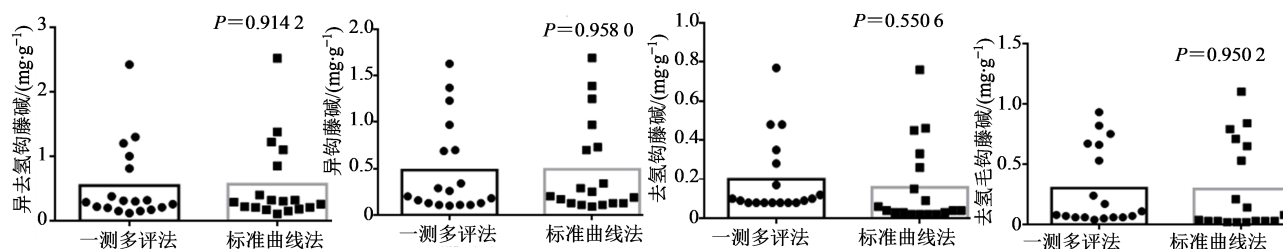


图5 18批钩藤饮片4种生物碱测定结果的差异分析

Fig. 5 Variation analysis of four alkaloids in 18 batches of *U. rhynchophylla*

3 讨论

中药材作为一种特殊的经济作物,在贵州的经济结构中占有重要地位,钩藤种植、生产和销售已经成为贵州省部分地区人民和财政收入的主要来源。作为一种特殊的商品,中药材质量的好坏直接关系到人民的生命健康安全。一方面,贵州独特的气候和地势地貌,非常适合药用植物的生长,贵州现有药用植物4 400余种;贵州酸性土壤与钩藤生长所需的pH相一致^[6],特别是贵州剑河的自然环境为钩藤的生长提供了道地环境^[7]。另一方面,贵州属于典型的喀斯特地貌,土壤养分不足,肥力较差;“一山分四季,十里不同天”的小气候也对钩藤的种植和质量产生一定的影响,2014年有研究表明贵州市场的钩藤药材中的钩藤碱的含量较低^[8]。随着政府加大科技的投入和“绿水青山就是金山银山”理念的倡导,贵州在钩藤资源、种植栽培、钩藤饮片、提取物和加工设备领域方面进步较大,特别是在钩藤资源、种植栽培方面专利申请比全国平均水平高10.7%^[9]。此次18批药材虽然质量差异较大,随着政府资金投入的不断加大和种植栽培相关技术的进步,实验结果表明钩藤质量有较大的进步。

中药化学成分复杂,具有多靶点和整体性的特点。《中国药典》2020年版除对钩藤浸出物做了规定,仅对钩藤中的异钩藤碱进行了定性鉴别,无法系统整体评价钩藤的质量。为更好地评价市场上钩藤的质量,本实验采用指纹图谱技术全面整体评价其质量,具有层次性和关联性特点,采用外标法和一测多评对钩藤中的5种生物碱成分进行了含量测定;化学计量学采用统计学方法在测量值和体系的状态之间建立联系,在中药质量控制和评价中发挥重要作用,聚类分析结果直观、简明,PCA通过降维,将获取的主成分综合反映原始变量信息,在中药材产地、基原和真伪鉴别中发挥重要作用,本实验中通过聚类分析反映了18批药材之间的相关性,采用PCA方法用5个主成分反映钩藤中复杂化学成分,并对钩藤进行整体质量评价。

钩藤中含有生物碱类、三萜类、黄酮类等化学成分^[10-12],生物碱是钩藤的特征性成分^[13],也是其主要活性成分^[14],因此选择生物碱作为控制钩藤质量的主要指标。目前从钩藤中发现100余种生物碱类成分,其中钩藤碱和异钩藤碱质量分数超过40%^[15],是钩藤中的主要活性成分,此外,去氢钩藤碱对大鼠主动脉环有舒张作用,降血压、直接降低心肌耗氧量^[16];异去氢钩藤碱具有降压、镇静、抗惊厥的作用^[17];去氢毛钩藤碱具有抗高血压的作用,因此选择此5种生物碱作为控制钩藤的主要指标具有合理性,指标太少无法全面准确保证钩藤的质量,指标太多增加检测成本,也不利于钩藤产业的发展。钩藤中的生物碱长时间在温度>60℃情况下不稳定,容易发生结构或构型的改变^[18],因此本实验提取温度控制在40℃以下,保证生物碱的稳定性。在缺乏对照品的情况下,一测多评法采用相对校正因子实现了对中药的多指标质量控制,具有成本低、简便、快捷等优点,测定结果与外标法无显著性差别,但在实验中发现,在含量较低的情况下,一测多评法与外标法实验结果比较误差较大,因此在实验条件允许情况下优先选择外标法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2015.
- [2] Li H J, Wei W L, Li Z W, et al. Systematic comparison of metabolic differences of *Uncaria rhynchophylla* in rat, mouse, dog, pig, monkey and human liver microsomes [J]. Anal Bioanal Chem, 2020, 412(28): 7891-7897.
- [3] 蒋京辰, 李梅珊, 朱廷春. 钩藤现代研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(22): 74-78. Jiang J C, Li M S, Zhu Y C. Modern research progress of *Uncaria rhynchophylla* [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2021, 30(22): 74-78.
- [4] 李慧, 叶江海, 柴慧芳. 黔产钩藤属植物在民间的药用考证 [J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(8): 66-68.

- Li H, Ye J H, Chai H F. Medicinal textual research on *Uncaria* plants produced in Guizhou among the people [J]. J Med & Pharm Chin Minor, 2021, 27(8): 66-68.
- [5] 蔡洪鲲, 蒋范任, 钟胜佳, 等. 一测多评法同时测定钩藤中4种生物碱的含量 [J]. 中南药学, 2019, 17(11): 1937-1940.
- Cai H K, Jiang F R, Zhong S J, et al. Determination of 4 alkaloids in *Uncaria* by quantitatively analyzing multi-components with single-marker [J]. Central South Pharm, 2019, 17(11): 1937-1940.
- [6] 林绍霞, 曾宪平, 林昌虎, 等. 钩藤种植对贵州黄壤土壤性状影响研究 [J]. 中国农学通报, 2020, 36(28): 118-123.
- Lin S X, Zeng X P, Lin C H, et al. Research on yellow soil properties with *Uncaria rhynchophylla*-plant in Guizhou [J]. Chin Agric Sci Bull, 2020, 36(28): 118-123.
- [7] 张家春, 张珍明, 曾宣平, 等. 贵州地产钩藤根区与非根区土壤碳、氮、磷分布特征 [J]. 中药材, 2017, 40(11): 2491-2495.
- Zhang J C, Zhang Z M, Zeng X P, et al. Guizhou real estate *Uncaria rhynchophylla* root zone and non root zone soil carbon, nitrogen and phosphorus distribution [J]. J Chin Med Mater, 2017, 40(11): 2491-2495.
- [8] 唐才林, 高言明, 杨春, 等. HPCE内标法测定中药钩藤中钩藤碱含量 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(7): 1477-1478.
- Tang C L, Gao Y M, Yang C, et al. Determination of rhynchophylline in *Uncaria rhynchophylla* by HPCE internal standard method [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2014, 41(7): 1477-1478.
- [9] 陈宁, 宋雪, 代玉洁, 等. 基于专利情报的贵州钩藤产业发展分析 [J]. 农村经济与科技, 2019, 30(13): 177-180.
- Chen N, Song X, Dai Y J, et al. Analysis of *Uncaria rhynchophylla* industry development in Guizhou based on patent information [J]. Rural Econ Sci Technol, 2019, 30(13): 177-180.
- [10] 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.
- Gao X Y, Ding R, Wang D P, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Uncaria rhynchophylla* [J]. J Tianjin Med Univ, 2017, 23(4): 380-382.
- [11] 余俊, 黄宗雯. 钩藤属化学成分研究进展 [J]. 中药材, 2021, 44(1): 233-239.
- Yu J, Huang Z W. Research progress on chemical constituents of *Uncaria* [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(1): 233-239.
- [12] 刘扬, 张妮, 罗俊, 等. 黔产钩藤茎、叶化学成分及抗肿瘤活性研究 [J]. 广西植物, 2021, 41(7): 1061-1069.
- Liu Y, Zhang N, Luo J, et al. Chemical constituents of stems and leaves from *Uncaria rhynchophylla* in Guizhou and their antitumor activities [J]. Guihaia, 2021, 41(7): 1061-1069.
- [13] 张华, 李姗. 贵州不同产地钩藤的总生物碱含量测定 [J]. 贵州农业科学, 2017, 45(1): 119-121.
- Zhang H, Li S. Determination of total alkaloids in *Uncaria rhynchophylla* from different producing areas in Guizhou [J]. Guizhou Agric Sci, 2017, 45(1): 119-121.
- [14] 于潇, 祝琳琳, 刘婕, 等. 钩藤中单萜吲哚类生物碱成分及其药理活性的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 6052-6065.
- Yu X, Zhu L L, Liu J, et al. Research progress on monoterpenoid indole alkaloids in *Uncariae Ramulus Cum Uncis* and their pharmacological activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(19): 6052-6065.
- [15] 范恺磊, 王协和, 杜俊潮, 等. 一测多评法同时测定钩藤饮片中4种生物碱类化学成分 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(5): 876-881.
- Fan K L, Wang X H, Du J C, et al. Simultaneously quantitative analysis of four alkaloids of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* based on multi-components with single marker [J]. Mod Chin Med, 2021, 23(5): 876-881.
- [16] 肖凡, 师建国, 张燕, 等. 去氢钩藤碱对谷氨酸功能低下精神分裂症模型小鼠自主活动和探究行为的影响 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(30): 1-3.
- Xiao F, Shi J G, Zhang Y, et al. The influence of locomotor activity and exploration behavior in dehydrogenase rhynchophylline on schizophrenia models of glutamate dysfunction in mice [J]. Guide China Med, 2013, 11(30): 1-3.
- [17] 陈其钊, 曾常青, 刘林, 等. 异去氢钩藤碱在大鼠体内药动学及组织分布研究 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(1): 18-21.
- Chen Q Z, Zeng C Q, Liu L, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of isocorynoxine in rats [J]. Asia Pac Tradit Med, 2016, 12(1): 18-21.
- [18] 杨秀娟, 洪燕龙, 吴飞, 等. HPLC测定钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的方法学探讨 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5): 720-724.
- Yang X J, Hong Y L, Wu F, et al. Determination of rhynchophylline and isorhynchophylline in *Uncaria rhynchophylla* by HPLC [J]. China J Chin Mater Med, 2013, 38(5): 720-724.