

大风藤根与茎的 HPLC 指纹图谱研究

魏茂陈¹, 易 琴¹, 张 杰²

1. 贵阳新天药业股份有限公司, 贵州 贵阳 550000

2. 上海海天医药科技开发有限公司, 上海 200023

摘 要: **目的** 通过构建大风藤 *Cocculus orbiculatus* 根与茎的指纹图谱, 对比两者相似度, 为科学评价大风藤根与茎药用价值及临床应用提供参考。**方法** 采用高效液相色谱法对贵州省 14 个产地 20 批的大风藤根与茎进行色谱分离, 色谱条件为 Agilent ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 运行时间为 95 min, 体积流量 1.0 mL/min, 测定波长 254 nm, 柱温 30 ℃。使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0”进行数据处理, 对大风藤根与茎进行相似度分析。**结果** 建立了大风藤根与茎指纹图谱共有模式, 归纳出大风藤根与茎共有峰 8 个, 指纹图谱相似度为 0.985~0.998。**结论** 大风藤根与茎化学成分相近, 但不同产地和部位的大风藤所含活性物质的量具有一定差异。

关键词: 大风藤; 根; 茎; 相似度; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)12-2522-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.12.025

Study on HPLC fingerprint of *Cocculus orbiculatus* root and stem

WEI Mao-chen¹, YI Qin¹, ZHANG Jie²

1. Guiyang Xintian Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550000, China

2. Shanghai Haitian Pharmaceutical Science and Technology Co., Ltd., Shanghai 200023, China

Abstract: Objective To evaluate the similarity of *Cocculus orbiculatus* root and stem by high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint, and to provide a reference for evaluation and clinical application of *C. orbiculatus* root and stem. **Methods** HPLC was applied to chromatographic separation of *C. orbiculatus* root and stem in different seasons from 14 areas of Guizhou province. The chromatography conditions were: Agilent ODS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, mobile phase of CAN 0.1% H₃PO₄, running time of 95 min, flow speed of 1.0 mL/min, detection wavelength of 254 nm, and column temperature of 30 ℃. The data were processed by Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation system 2.0. Different *C. orbiculatus* root and stem were subjected to similarity analysis. **Results** The chromatography fingerprint of *C. orbiculatus* root and stem was established and eight common characteristic peaks were demonstrated. The similarities of the chromatography fingerprint were between 0.985—0.998. **Conclusion** The chemical compositions of *C. orbiculatus* root and stem is similar, but the active substances quantity of *C. orbiculatus* from different regions and seasons are different.

Key words: *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.; root; stem; similarity; HPLC; fingerprint

大风藤为贵州省少数民族用药, 具有祛风止痛、行水消肿、解毒、降血压的功效, 用于风湿痹痛、神经痛、肾炎水肿、尿路感染、跌打损伤、蛇咬伤^[1-2]。文献报道其主要活性成分为生物碱类和多糖类^[3-6], 如木兰花碱、木防己碱等。大风藤在不同的地方标准中规定略有不同: 贵州省中药材标准(2003 版)规定, 大风藤为防己科植物木防己 *Cocculus orbiculatus*

(L.) DC. 的干燥根。而新修订的湖南省中药材标准(2009 版)规定, 大风藤为防己科植物木防己的干燥根及茎^[7]。这表明大风藤的根与茎可能具有相似的药理活性, 茎可替代根入药。但从临床用药安全、有效的角度衡量, 大风藤茎能否代替根入药, 尚无相关研究佐证, 此外, 尚未有大风藤药材指纹图谱相关研究, 也无其根部与茎部指纹图谱对比

收稿日期: 2017-02-21

作者简介: 魏茂陈(1983—), 男, 贵州湄潭人, 博士, 副主任药师, 研究方向为中药质量控制及新药研究。

Tel: (0851)86317631 E-mail: weimc168@163.com

研究, 只有少量有关其成方制剂在临床应用的相关研究^[8-9]。因此, 本研究旨在采用高效液相色谱 (HPLC) 法, 对贵州省 14 个产地大风藤根与茎进行指纹图谱研究, 从而为临床用药及大风藤质量评价提供参考。

1 仪器、试剂与药材

1.1 仪器

岛津 LC-20AD 型高效液相色谱仪, SPD-M20A 二极管阵列检测器, 岛津 LC-Solution 工作站; 超声波清洗器 (上海冠特超声仪器有限公司); 梅特勒 ME104 型电子天平 (十万分之一)。

1.2 试剂

乙腈为色谱纯 (美国迪马公司), 重蒸水 (自制), 甲醇与磷酸为分析纯。

1.3 药材

对照品木兰花碱 (批号 MUST-14061310) 购于成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数大于 98%。大风藤药材由贵阳新天药业股份有限公司提供, 药材采自贵州 14 个不同地区, 20 批不同部位药材经贵阳中医学院周汉华教授鉴定为本防己 *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. 的根和茎, 药材均符合《贵州省中药材、民族药材质量标准 (2003 版)》, DB52/YC059-2003, P32 质量检验标准^[1]。药材产地及部位见表 1。

2 方法

2.1 色谱条件

Agilent ODS C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~30 min, 10%~15% A; 30~70 min, 15%~30% A; 70~95 min, 30%~80% A, 运行

时间为 95 min。体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长 254 nm。木兰花碱与其他峰的分离度均大于 1.0, 木兰花碱保留时间为 25 min, 95 min 内色谱峰全部检出。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取木兰花碱对照品适量, 加甲醇溶解, 制成 50 μg/mL 的溶液, 作为木兰花碱对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取药材粉末 (过 60 目筛) 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 称定质量, 超声提取 1 h, 取出, 放冷, 用甲醇补足质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过微孔滤膜 (0.45 μm), 作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取样品 (S12) 按上述制备方法制成供试品溶液, 连续重复进样 6 次, 记录指纹图谱。以木兰花碱 (1 号峰) 的保留时间和峰面积为参照 (s), 计算样品中共有峰与木兰花碱的相对峰面积和相对保留时间, RSD 分别为 0~0.13%、0~1.46%, 表明精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取样品 (S12) 按上述方法制成供试品溶液, 室温放置, 分别在 0、3、6、9、12、15 h 进样, 记录色谱图。以木兰花碱 (1 号峰) 的保留时间和峰面积为参照, 计算样品中共有峰与木兰花碱的相对峰面积和相对保留时间, RSD 分别为 0~0.22%、0~1.85%, 表明样品稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取 6 份样品 (S12) 粉末, 制备 6 份供试品溶液, 同法进行检测, 记录色谱图。以木兰花碱 (1 号峰) 的保留时间和峰面积为参照, 计算样品中共有峰与木兰花碱的相对峰面积和相对保留时间, RSD 分别为 0~0.38%、0~2.84%, 符合指纹图谱要求, 重复性良好。

3 结果与分析

3.1 HPLC 指纹图谱建立

采用贵州省 14 个产地大风藤根与茎样品, 制备供试品溶液, 进行 HPLC 检测, 得到不同批次大风藤根与茎指纹图谱, 见图 1。根据 20 批大风藤根与茎指纹图谱, 提取共有模式作为根与茎对照指纹图谱 (R), 见图 2。

3.2 共有峰的标定

8 个色谱峰确定为 20 批大风藤根与茎的共有峰。以 1 号峰木兰花碱的保留时间和峰面积为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 见表 2、3。

表 1 大风藤药材产地和部位

Table 1 Origins and collecting seasons of *C. orbiculatus*

编号	来源	部位	编号	来源	部位
S1	贵定县云雾镇	根部	S11	花溪区黔陶乡	根部
S2	贵定县云雾镇	茎部	S12	安顺市新场乡	根部
S3	花溪区黔陶乡	茎部	S13	清镇市红枫湖	茎部
S4	乌当区水田镇	根部	S14	龙里县羊场镇	根部
S5	惠水县	茎部	S15	贵定县云雾镇	茎部
S6	正安县	根部	S16	关岭县断桥	根部
S7	龙里县羊场镇	茎部	S17	镇宁县黄果树	根部
S8	兴义县	茎部	S18	平坝县高峰山	茎部
S9	兴义县	根部	S19	乌当区水田镇	茎部
S10	安龙县	根部	S20	修文六广镇	茎部

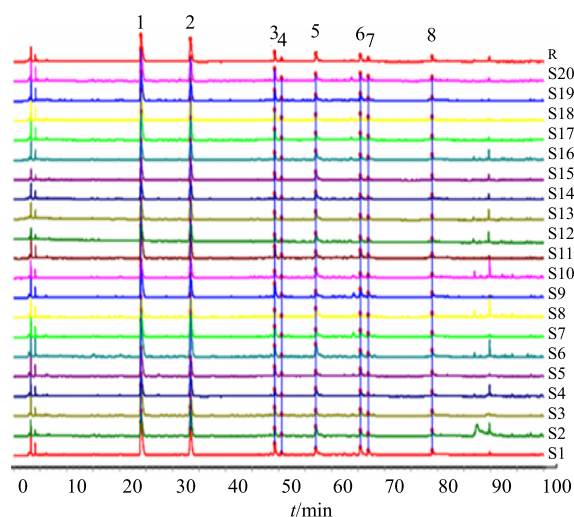


图 1 大风藤根和茎的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of root barks and stem barks of different batches of *C. orbiculatus*

通过比较指纹图谱中共有峰的组成和比例，可以了解不同批次大风藤的质量状况。比较发现，不同产地大风藤根与茎共有峰的相对保留时间相对一致，主要成分相同，但相对峰面积差异较大，表明主要

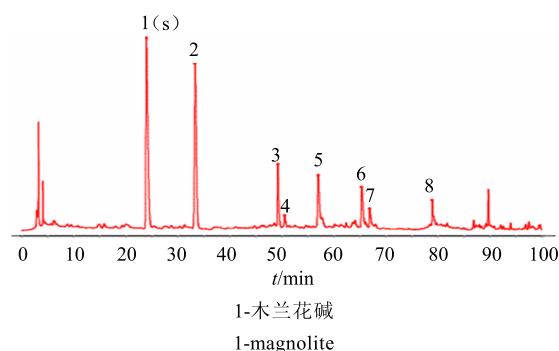


图 2 大风藤对照指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of root barks and stem barks of *C. orbiculatus*

表 2 大风藤根与茎指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks for fingerprint of root barks and stem barks of *C. orbiculatus*

样品	相对保留时间							
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8
S1	1.000	1.379	2.014	2.066	2.327	2.666	2.729	3.212
S2	1.000	1.395	2.052	2.106	2.376	2.721	2.784	3.282
S3	1.000	1.390	2.046	2.099	2.365	2.712	2.776	3.271
S4	1.000	1.394	2.050	2.105	2.374	2.717	2.783	3.280
S5	1.000	1.397	2.060	2.115	2.379	2.732	2.794	3.297
S6	1.000	1.392	2.049	2.104	2.371	2.717	2.780	3.280
S7	1.000	1.389	2.044	2.098	2.363	2.713	2.775	3.271
S8	1.000	1.396	2.054	2.110	2.379	2.724	2.788	3.291
S9	1.000	1.387	2.041	2.095	2.359	2.708	2.770	3.266
S10	1.000	1.396	2.055	2.110	2.378	2.724	2.787	3.290
S11	1.000	1.383	2.033	2.086	2.354	2.699	2.762	3.258
S12	1.000	1.390	2.059	2.114	2.386	2.737	2.802	3.305
S13	1.000	1.391	2.059	2.114	2.386	2.737	2.802	3.305
S14	1.000	1.385	2.045	2.100	2.368	2.717	2.782	3.283
S15	1.000	1.391	2.062	2.117	2.389	2.742	2.806	3.312
S16	1.000	1.396	2.070	2.127	2.400	2.751	2.816	3.329
S17	1.000	1.397	2.072	2.129	2.403	2.754	2.820	3.332
S18	1.000	1.396	2.072	2.128	2.402	2.753	2.821	3.334
S19	1.000	1.398	2.075	2.132	2.407	2.758	2.823	3.341
S20	1.000	1.398	2.076	2.133	2.407	2.759	2.826	3.342
均值	1.000	1.392	2.054	2.109	2.379	2.727	2.791	3.294
RSD/%	0.000	0.384	0.747	0.789	0.847	0.844	0.864	0.983

表 3 大风藤根与茎指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 3 Relative areas of common peaks for fingerprint of root barks and stem barks of *C. orbiculatus*

样品	相对峰面积							
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8
S1	1.000	0.710	0.205	0.030	0.141	0.190	0.068	0.121
S2	1.000	0.935	0.196	0.055	0.264	0.203	0.051	0.105
S3	1.000	0.636	0.214	0.040	0.121	0.206	0.052	0.075
S4	1.000	0.986	0.212	0.030	0.225	0.215	0.106	0.124
S5	1.000	0.822	0.248	0.030	0.255	0.225	0.080	0.096
S6	1.000	1.045	0.210	0.055	0.397	0.138	0.076	0.092
S7	1.000	0.724	0.221	0.053	0.176	0.139	0.049	0.084
S8	1.000	0.724	0.169	0.051	0.298	0.113	0.082	0.073
S9	1.000	0.840	0.198	0.034	0.150	0.210	0.040	0.075
S10	1.000	1.005	0.279	0.071	0.327	0.166	0.107	0.105
S11	1.000	0.970	0.354	0.045	0.309	0.181	0.077	0.137
S12	1.000	0.970	0.354	0.045	0.309	0.181	0.085	0.137
S13	1.000	1.068	0.284	0.050	0.355	0.190	0.060	0.146
S14	1.000	1.022	0.225	0.045	0.344	0.178	0.081	0.133
S15	1.000	0.802	0.234	0.047	0.168	0.209	0.075	0.055
S16	1.000	0.677	0.211	0.046	0.138	0.186	0.066	0.058
S17	1.000	0.663	0.208	0.055	0.233	0.209	0.047	0.051
S18	1.000	0.942	0.261	0.065	0.186	0.259	0.057	0.057
S19	1.000	0.786	0.247	0.057	0.161	0.229	0.066	0.055
S20	1.000	0.882	0.198	0.035	0.328	0.199	0.062	0.114
均值	1.000	0.861	0.235	0.046	0.248	0.192	0.069	0.096
RSD/%	0	15.813	20.787	24.934	34.355	17.241	25.787	32.417

成分的质量分数差异显著,说明产地和部位的不同会导致相关物质活性成分的量有一定的差异。

3.3 相似度计算

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0版)》分析^[10],对照图谱生成方法为中位数法,时间窗宽度 0.5,多点校正,全峰匹配,相似度结果见表 4。相似度均大于 0.98,说明不同产地、不同部位的大风藤根及茎具有良好的相关性。

4 讨论

4.1 提取溶剂、提取方法、流动相、检测波长的优化

本实验比较了不同提取溶剂:95%乙醇、70%乙醇、50%甲醇、甲醇水浴回流和超声提取的提取效果,结果表明,采用甲醇提取,可将其不同成分完全表达,提取的总体效果好,选择甲醇为提取溶剂。比较超声提取与回流提取,无显著差异,但超声提取时间 30、45、60 min 的结果表明,超声提取 60 min,提取较完全,且方法稳定、重复性好,所以采用超声提取。比较不同流动相系统:乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水的梯

表 4 相似度评价结果

Table 4 Similarity evaluation results

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.996	S11	0.992
S2	0.985	S12	0.993
S3	0.987	S13	0.994
S4	0.997	S14	0.995
S5	0.990	S15	0.990
S6	0.993	S16	0.993
S7	0.998	S17	0.998
S8	0.989	S18	0.993
S9	0.986	S19	0.992
S10	0.985	S20	0.994

度洗脱实验效果,结果表明,乙腈-0.1%磷酸水总体效果好,峰形尖锐且分离度较好,各峰的保留时间适中,且基线较平稳,不易漂移,有利于指纹图谱的分析。木兰花碱的最大吸收波长为 268 nm,为兼顾其他峰的吸收,突出木兰花碱色谱峰特征外也同时突出其他峰的特征,故选 254 nm 为检测波长。

4.2 建立了大风藤 HPLC 指纹图谱研究方法

建立了大风藤指纹图谱分析方法。确定了贵州不同产地、不同部位甲醇提取大风藤根与茎,有 8 个共有峰,各产地不同部位的大风藤根及茎指纹图谱与对照指纹图谱相似度均大于 0.98,可用作定性研究。该方法准确,重复性好,为科学评价及有效控制其质量提供参考。

本研究清晰地揭示大风藤根与茎化学组成相近。基于上述研究结果以及野生大风藤植物资源十分有限的情况,认为以茎代替根入药具有较高的可行性,这样一方面有利于保护资源,扩大药源,另一方面也有利于将来 GAP 的实施^[10]。此外,本研究运用 HPLC 法建立的大风藤药材指纹图谱,可直观比较不同产地、不同部位大风藤的差别,为大风藤药材及其易混淆品的区分提供了一种方法依据,有效地控制大风藤的质量。

参考文献

[1] 贵州省中药材、民族药材质量标准 [S]. 2003.

- [2] 中草药彩色图谱 [M]. 第 3 版. 福州: 福建科学技术出版社, 2006.
- [3] 陈海生, 梁华清, 廖时萱. 木防己化学成分研究 [J]. 药学报, 1991, 26(10): 755-758.
- [4] 杨叶坤, 邱明华, 高诚伟, 等. 木防己属植物中生物碱成分的研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1997, 10(2): 104-113.
- [5] 杨海东, 陈艳梅, 刘淑芬, 等. 木防己多糖的组成及其清除活性氧自由基的作用 [J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2005, 22(2): 6-8.
- [6] 甄攀. 粉防己和木防己多糖的含量测定 [J]. 张家口医学院学报, 2003, 20(2): 11-13.
- [7] 湖南省中药材标准 [S]. 2009.
- [8] 许琳, 陈烨文, 龚一萍. 论木防己汤方证特点和发展 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(11): 729-731.
- [9] 张美玉, 侯双双, 庄园, 等. 张仲景木防己汤临床及实验研究概述 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 116-119.
- [10] 辛海量, 吴迎春, 徐燕丰, 等. 对萆薢猴桃根与茎的比较研究 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(3): 298-302.