

宽筋藤药材 UPLC 特征图谱研究

迟森森 韩丹 刘斌

【摘要】 目的 建立宽筋藤药材的超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 特征图谱, 为宽筋藤药材的整体质量分析和评价提供参考依据。**方法** 采用 Waters Acquity C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液 (A)–0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 320 nm。采用聚类分析和特征图谱相似度分析对 16 批不同地区的宽筋藤商品药材 UPLC 特征图谱进行评价。**结果** 建立了宽筋藤药材的 UPLC 特征指纹图谱共有模式, 共标定了 35 个共有峰。聚类分析将 16 批宽筋藤商品药材分为 4 类, 特征图谱经国家药典规定的相似度计算软件计算, 整体相似度良好。**结论** 本研究建立的宽筋藤药材特征图谱的特征性和专属性强, 方法准确、可靠、重复性好, 可用于宽筋藤药材的整体质量控制和评价。

【关键词】 宽筋藤; 特征图谱; 超高效液相色谱; 聚类分析; 质量控制

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.09.013

Study on UPLC specific chromatogram of caulis tinosporae sinensis CHI Sen-sen, HAN Dan, LIU

Bin. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: LIU Bin, E-mail: liubiny67@163.com

【Abstract】 Objective To establish the ultra performance liquid chromatography (UPLC) specific chromatogram of caulis tinosporae sinensis, in order to provide reference basis for overall quality analysis and evaluation of caulis tinosporae sinensis. **Methods** Analysis was performed on the Waters Acquity C₁₈ column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), the acetonitrile with 0.1% formic acid (A)–0.1% formic acid (B) was adopted as mobile phase in gradient elution mode, and monitored under 320 nm wavelength. The flow rate was set at 0.5 mL/min and the column temperature was set at 30 ℃. Sixteen batches of caulis tinosporae sinensis medicinal material samples collected from different areas were analyzed by hierarchical clustering analysis (HCA) and similarity analysis (SA) to evaluate the UPLC specific chromatogram. **Results** Thirty-five common peaks were selected to establish the UPLC specific chromatogram of caulis tinosporae sinensis. Sixteen batches of medicinal material samples were classified as four clusters by HCA and a good overall similarity was calculated by the overall similarity software specified in the national pharmacopeia. **Conclusions** The established method for specific chromatogram by UPLC with better characteristic and specificity was accurate, reliable and repeatable, which could be applied to the overall quality control and evaluation of caulis tinosporae sinensis.

【Key words】 Caulis tinosporae sinensis; Specific chromatogram; UPLC; Hierarchical cluster analysis; Quality control

基金项目:北京中医药大学自主选题(2013-JYBZZ-XS-116)

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院[迟森森(硕士研究生)、韩丹、刘斌]

作者简介:迟森森(1990–),女,2014 级在读硕士研究生。研究方向:中药(复方)有效成分(组分)发现与新药创制。E-mail: m17801085298@163.com

通讯作者:刘斌(1967–),博士,教授。研究方向:中药(复方)有效成分(组分)发现与新药创制。E-mail:liubiny67@163.com

宽筋藤 *Tinosporae sinensis* (Lour.) Merr. 来源于防己科植物中华青牛胆的干燥藤茎^[1],具有祛风止痛,舒筋活络的功效,中医用其治疗风湿痹痛,腰肌劳损,跌打损伤^[2]。宽筋藤在藏医药中又名“勒哲”,《甘露之池》中记载“勒哲味甘、苦、涩、辛,化味甘、酸,性润、凉、温,治龙、赤巴合并症、培根病、风湿病、风热病”^[3]。药理研究表明宽筋藤药材提取

物具有抗氧化、抗炎、保肝和免疫调节等方面药理活性^[4-6],这是其所含的生物碱类、甾体类、萜类、香豆素类和氨基酸等成分协同作用的结果^[2]。但目前国内有关宽筋藤药材活性成分的研究报道比较少,缺乏整体性的化学表征。且其在广东、海南、广西和云南等地多有分布,各地区宽筋藤商品药材品质差异未能有效区分,其质量控制标准几乎处于空白阶段。由于中药化学成分的复杂多样性,因此任何单一成分含量高低均不能准确完整的评价一味中药的质量^[7],基于此,本文采用超高效液相色谱法,建立多元梯度洗脱模式测定了 16 批宽筋藤商品药材饮片的 UPLC 特征指纹图谱,可从整体上表征宽筋藤药材的成分信息,为其整体质量控制提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acquity 超高效液相系统,包括二元高压梯度泵、25 μL 可调进样器、柱温箱、PDA 全波长检测器和 Waters Enpower 3 色谱数据处理工作站(美国 Waters 公司);Sartorius BT 25S 型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);KQ-500DE 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试药

宽筋藤药材购自全国 14 个不同地区,分别为安国、成都、广州、桂林、亳州、昆明、南京、梧州、武汉、新疆、玉林、湛江、青海和北京,共 16 批样品,标号为 S1~S16。乙腈(Sigma-aldrich 公司,色谱纯),试验用水均为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯;所有试剂用前均经 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity C_{18} 柱(2.1 mm \times 50 mm,1.7 μm),PDA 检测器,流动相为 0.1% 甲酸乙腈溶液(A)-0.1% 甲酸水溶液(B),采用梯度洗脱(0.0~3.0 分钟,5% A;3.0~6.0 分钟,5%~7.9% A;6.0~7.5 分钟,7.9%~8.3% A;7.5~9.0 分钟,8.3%~9.2% A;9.0~10.5 分钟,9.2%~9.6% A;10.5~14.5 分钟,9.6%~14.4% A;14.5~17.0 分钟,14.4%~16.2% A;17.0~19.0 分钟,16.2%~18.8% A;19.0~24.0 分钟,18.8%~25.0% A;24.0~25.0 分钟,25.0%~25.5% A),柱温

30 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.5 mL/min,检测波长 320 nm,进样量 2 μL 。

2.2 样品溶液的制备

取宽筋藤药材粉末(60 目)约 1 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 80 mL,称定重量,超声(功率 250 W,频率 20 KHz)提取 30 分钟,摇匀,放冷,称重,用甲醇补足减失的重量,过滤。滤液减压回收溶剂至干,残留物用甲醇溶解并定容至 2 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,连续进样 6 次,按“2.1”项下色谱条件进行检测,记录各共有峰保留时间和峰面积,以峰 19(t_{R} =17.532 分钟)为参照物,计算结果显示 35 个共有峰相对保留时间 RSD 在 0.02%~0.84% 之间,相对峰面积 RSD 在 0.51%~2.82% 之间,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱检测要求。

2.3.2 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别于制备后 0,3,6,9,12,24 小时进行检测,记录各共有峰保留时间和峰面积,以峰 19(t_{R} =17.532 分钟)为参照物,计算结果显示 35 个共有峰相对保留时间 RSD 在 0.04%~0.95% 之间,相对峰面积 RSD 在 0.48%~2.93% 之间,表明样品在 24 小时内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批次宽筋藤药材粉末(60 目)6 份,每份约 1 g,精密称定,按“2.2 样品溶液的制备”项下方法制备供试品液,按“2.1”项下色谱条件进行检测,记录各共有峰保留时间和峰面积,以峰 19(t_{R} =17.532 分钟)为参照物,计算结果显示 35 个共有峰相对保留时间 RSD 在 0.01%~0.34% 之间,相对峰面积 RSD 在 0.70%~2.99% 之间,表明该方法重复性良好。

2.4 宽筋藤特征图谱的构建和解析

2.4.1 宽筋藤共有峰的确定 取 14 个不同地区 16 批宽筋藤商品药材样品,按“2.2 样品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件对各批宽筋藤药材进行分析检测,记录各色谱峰保留时间和峰面积。确定在 16 批宽筋藤特征图谱中出峰时间基本一致、峰面积较大的 35 个峰为共有特征色谱峰,其共有峰面积之和均占原有色谱图所有峰面积的 90% 以上,结果见图 1、2。其中 19 号峰(t_{R} =17.532 分钟)分离度较好,且保留时间和峰面

积适中,因此选择 19 号峰作为内参比峰,计算其他各色谱峰对内参比峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD 值在 0.01% ~1.06%之间,说明 16 批样品之间的共有模式稳定,而相对峰面积的 RSD 值则比较大,说明不

同批次宽筋藤商品药材之间的质量存在一定差异。
2.4.2 聚类分析 将 16 批宽筋藤商品药材的 UPLC 图谱中共有峰的峰面积值标准化处理,运用 SPSS 16.0 软件对其进行系统聚类分析,采用组间连接法,利用欧式距离作为样品的测度,可将样品分为 4

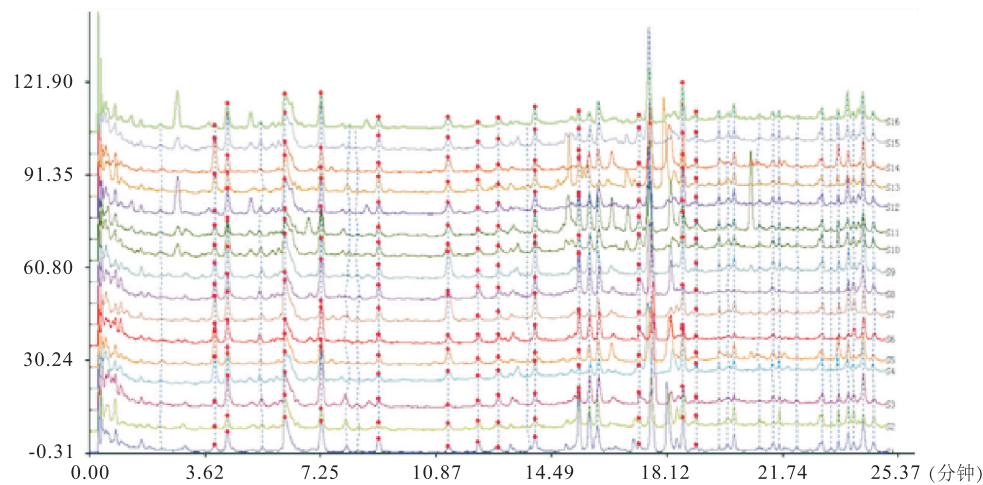


图 1 16 批宽筋藤商品药材 UPLC 色谱图(320 nm)

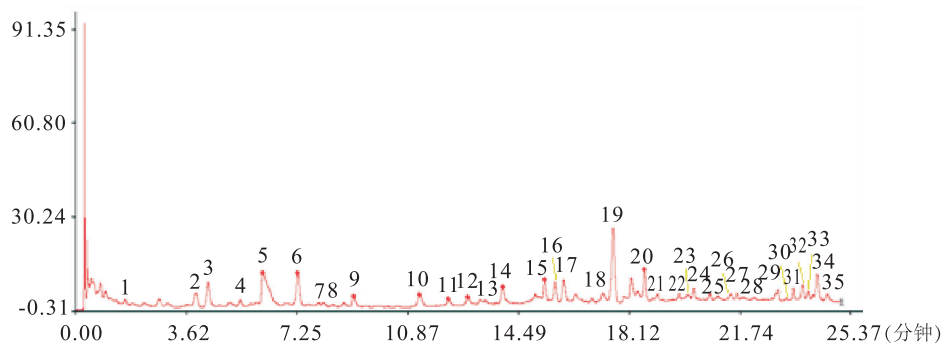


图 2 宽筋藤商品药材 UPLC 特征图谱(320 nm)

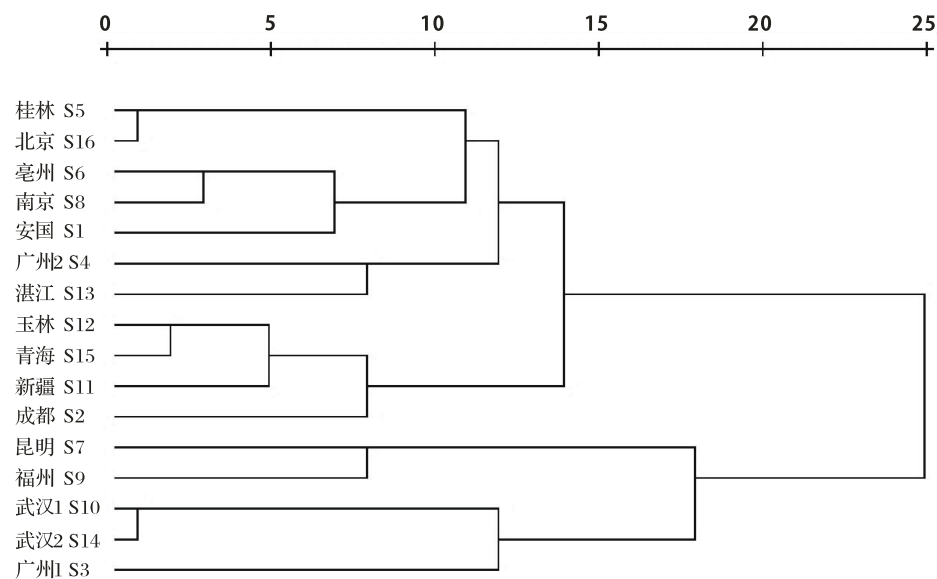


图 3 16 批宽筋藤商品药材聚类分析

类,结果见图3。聚类分析结果表明宽筋藤商品药材质量差异在全国分布无明显地域特征,但在一些相邻的省份药材质量较为相似。S9和S7,S13和S4分别在同一类中,可能是宽筋藤作为民族药,主产于广州、广西、云南三省南部。S1、S16、S6、S8均在同一类中,则可能是由于安国和亳州为中药材市场的聚集地,而北京和南京分别紧邻这两个城市,购买地相似所致。S15、S2、S11均在同一类中,可能是这3批药材的购买地都地处中国的西部,货源相似。

2.4.3 特征图谱相似度计算 采用国家药典委员会《中药色谱特征图谱相似度评价系统(2004A)》对16批宽筋藤商品药材的UPLC图谱进行相似度分析,以所建立的宽筋藤特征图谱共有峰作为参照,分别进行时间窗的设定、谱峰匹配,进行相似度计算,结果见表1。由表1可知,16批宽筋藤商品药材相似度在0.779~0.969之间,其中11批商品药材相似度在0.900以上,药材质量较好。而购自安国、桂林、新疆、北京和湛江的宽筋藤商品药材相似度在0.779~0.879之间,药材质量一般。

表1 16批宽筋藤商品药材相似度分析结果

No.	相似度	No.	相似度
S1	0.879	S9	0.969
S2	0.901	S10	0.963
S3	0.941	S11	0.813
S4	0.951	S12	0.910
S5	0.854	S13	0.779
S6	0.938	S14	0.963
S7	0.936	S15	0.910
S8	0.928	S16	0.854

3 讨论

通过对提取方式(超声、加热回流),药材粉碎度(40、60、80目),提取溶剂(甲醇、70%甲醇、50%甲醇),溶剂倍量(10、20、40、80、160倍量),提取时间(15、30、45、60分钟)进行考察,最终确定宽筋藤药材提取方法为:药材粉碎至60目,加入80倍量甲醇溶液,超声提取30分钟(功率250W,频率20KHz)。

分别考察了乙腈-水、0.1%甲酸乙腈溶液、0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液3个流动相系统,结果表明采用0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液流动相系统,各峰分离度较好,且基线平

稳,最有利于特征图谱的分析。同时采用Waters二级管阵列检测器对检测波长进行了选择,通过比较254nm、320nm和340nm检测波长下的色谱图,以图谱提供的色谱峰的信息量和峰面积为考察指标,发现在320nm波长下,色谱峰信息量最大,因此选择320nm为检测波长。

在中药色谱特征图谱相似度评价系统(2004A版)的辅助下,得出了宽筋藤药材的UPLC对照特征图谱。比较16批宽筋藤商品药材特征图谱后发现,不同地区宽筋藤药材特征图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,相似度在0.779~0.969之间,说明不同地区药材中各成分含量的相对比值有所差别。这种在共性特征基础上存在的个体差异是常见的现象,因为药材生产过程中受到土壤、气候、环境因素及采收加工过程中很多因素的影响,通过量化比较可以为选购原料药材及指导GAP提供质量信息。

特征图谱是目前控制中药材质量最有效、最直观的手段之一。有关宽筋藤药材的质量控制在中国药典和各地方药材质量标准中没有详细的规定。本文采用UPLC方法,建立了宽筋藤药材的特征图谱。结果表明该方法稳定、可靠、重现性好,可为宽筋藤药材质量分析、评价与控制提供依据。

参 考 文 献

- [1] 湖南植物志编辑委员会. 湖南植物志[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2000,768-769.
- [2] 吴凤荣,曾聪彦,戴卫波. 宽筋藤的药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国执业药师,2014,11(12):37-40.
- [3] 江苏新医学院编辑委员会. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:人民出版社,1977:219,1139,1393.
- [4] Bhagyashri N, Rohan K, Prashant B, et al. Comparative hepatoprotective potential of *Tinospora cordifolia*, *Tinospora sinensis* and *Neem-guduchi* [J]. *British Journal of Pharmaceutical Research*,2013,3(4):906-916.
- [5] Manjrekar PN, Jolly CI, Narayanan S. Comparative studies of the immunomodulatory activity of *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*[J]. *Fitoterapia*,2000,71(3):254.
- [6] 薛强,罗莹,许小林. 宽筋藤提取物对小鼠抗炎作用的实验研究[J]. 右江医学,2014,42(3):285-287.
- [7] 彭川丛,梁英娇. 中药指纹图谱研究进展[J]. 实用中医药杂志,2010,26(11):810-812.

(收稿日期:2015-02-02)

(本文编辑:董历华)