

钩藤叶 5 种活性成分的测定研究

黄舒婷¹, 黄燕俊², 梁颖欣¹, 赖志明³, 文升祥⁴, 曾常青^{1*}¹广东药科大学中药学院/国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点研究室, 广州 510006;²中山市中智药业集团有限公司, 中山 528437; ³广东南领药业有限公司, 梅州 514600;⁴贵州省剑河县科技局钩藤研究所, 剑河 556400

摘要:为建立钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil 叶中 5 种活性成分含量测定方法, 弥补钩藤叶质量控制方法的不足。本文通过对钩藤叶进行了抗氧化活性部位追踪, 发现钩藤叶抗氧化活性主要与黄酮和多酚等成分相关; 采用 HPLC-PDA 方法, 以乙腈-0.1% 磷酸水进行梯度洗脱, 测定了钩藤叶中绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷和喜果苷等 5 种活性成分的含量。在该方法的条件下, 5 种成分分离良好, 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均 < 3.0%, 平均加样回收率为 96.73% ~ 103.5%。不同采集地点的 12 批样品的聚类分析表明 5 种成分的含量差异与产地地理分布相关。建立的 HPLC 方法操作简单, 准确度好, 精密度高, 为钩藤叶的综合开发利用提供了基础。

关键词:钩藤叶; 抗氧化; 绿原酸; 表儿茶素; 芦丁; 金丝桃苷; 喜果苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)10-1731-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.10.009

Determination of five active components in *Uncaria rhynchophylla* leavesHUANG Shu-ting¹, HUANG Yan-jun², LIANG Ying-xin¹, LAI Zhi-ming³, WEN Sheng-xiang⁴, ZENG Chang-qing^{1*}¹School of Traditional Chinese Medicine & Key Laboratory of Digital Quality Evaluation of Chinese Materia Medica of State Administration of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;²Zhongshan Zhongzhi Pharmaceutical Group Co., Ltd. Zhongshan 528437, China;³Guangdong Nanling Pharmaceutical Co., Ltd. Meizhou 514600, China;⁴*Uncaria* Research Institute, Jianhe County Science and Technology Bureau, Guizhou Province, Jianhe 556400, China

Abstract: The determination method of five active components in the leaves of *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil was established to make up for the deficiency of the quality control method of *U. rhynchophylla* leaves. In this paper, the antioxidant activity sites of *U. rhynchophylla* leaves were traced, and the antioxidant activity of *U. rhynchophylla* leaves was mainly related to flavonoids and polyphenols. HPLC-PDA method was used to determine the content of five active ingredients such as chlorogenic acid, epicatechin, rutin, hyperoside and vincoside lactam in *U. rhynchophylla* leaves by gradient elution mode with acetonitrile-0.1% phosphoric acid. The five components were separated well in the chromatographic conditions. The RSDs of the precision, stability and repeatability test were all < 3.0%, and the average recoveries were between 96.73%-103.50%. The cluster analysis of 12 batches of samples at different regions showed that the content of the five components was related to geographical distribution of the regions. The established HPLC method is simple in operation, good in accuracy and high in precision, and provides a basis for comprehensive development and utilization of *U. rhynchophylla* leaves.

Key words: *Uncaria rhynchophylla* leaves; antioxidant; chlorogenic acid; epicatechin; rutin; hyperoside; vincoside lactam; HPLC

钩藤为常用中药, 茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil 是目前钩藤药材

市场的主要品种^[1]。钩藤化学成分有生物碱类、黄酮类、三萜类、香豆素类及有机酸类等, 其中生物碱化学成分已经被广泛的研究, 但非生物碱成分研究较少。钩藤叶与其药用部位带钩茎枝化学成分相似^[2], Li 等^[3]提取分离了钩藤叶 3 个生物碱和 14 个非生物碱, 并分别进行了抗氧化活性测定。Luo

收稿日期: 2019-04-15 接受日期: 2019-08-05

基金项目: 贵州省剑河县中药材产业科技合作专项(剑科合字(2014)4号)

* 通信作者 Tel: 86-013527729559; E-mail: gdzcq@163.com

等^[4]对黔产钩藤不同部位中总黄酮进行含量测定,发现总黄酮的含量是皮>叶>钩>茎>木质部>薄壁组织。Huang等^[5]利用HPLC法测定钩藤植物各个不同部位钩藤碱含量。在民间一直有钩藤叶药用习俗^[6]。课题组前期对钩藤植物各部位进行成分和药效活性研究发现:与带钩茎枝药用部位相比,叶子中非生物碱成分含量高,并具有明显的抗氧化活性。目前每年钩藤药材采收时,大量的叶子随带钩茎枝的采摘而被当作废物处理,造成大量的资源浪费。综合开发利用钩藤叶可以降低药用部位的成本,扩大钩藤的药用部位,有益于资源可持续发展。钩藤叶质量控制方法研究较少,本文在钩藤叶抗氧化活性追踪等实验基础上,建立钩藤叶的五种成分的含量测定方法,弥补了目前钩藤叶质量控制方法的不足,为钩藤叶的研究开发提供基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

2695 高效液相色谱仪(2996 二极管阵列检测器,Waters公司),CNW C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,上海安谱实验科技有限公司),UV-1800 紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司),KQ-250B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为120 W)。

1.2 试药

对照品喜果苷(批号: MUST-16072110)、表儿茶素(批号: MUST-17060114)、绿原酸(批号: MUST-16072110)、芦丁(批号: MUST-16122011)、金丝桃苷(批号: MUST-16102605)纯度均>98%,均购于成都曼斯特生物科技有限公司。乙腈、磷酸为色谱纯,超纯水,甲醇、没食子酸(含量>98%)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),其它试剂均为分析纯。

1.3 样品

钩藤叶在广东、贵州和广西等钩藤产地采集,经广东药科大学中药学院曾常青教授鉴定均为茜草科植物钩藤(*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil)的叶子,样品S1~S5,分别采集于贵州省剑河县摆伟村、南明区、敏洞乡、柳川镇、岑松镇;S6采集于贵州省凯里市;S7采集于贵州省兴义市;样品S1~S7,采集于2014年10月。S8采集于广西省三江县;S9采集于广东省韶关市始兴县;S10~S12,分别采集于广东省平远县畲脑村、大拓镇、黄花陂村;样品S8~S12,采集于2016年10月。将钩藤叶样品置于60℃烘箱中烘干,打粉,过40目筛备用。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备

取绿原酸对照品约20 mg,表儿茶素、芦丁、金丝桃苷、喜果苷对照品约10 mg,精密称定,分别置于10 mL的容量瓶中,加70%甲醇使其溶解、定容至刻度,摇匀,即得各对照品母液,备用;其中对照品母液浓度为:绿原酸2.041 mg/mL,表儿茶素1.064 mg/mL,芦丁1.005 mg/mL,金丝桃苷0.986 0 mg/mL,喜果苷1.060 mg/mL。精密量取适量的各对照品母液,置于50 mL的容量瓶中,再加70%甲醇定容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液,其中绿原酸浓度为0.367 4 mg/mL、表儿茶素浓度为0.085 12 mg/mL、芦丁浓度为0.020 10 mg/mL、金丝桃苷浓度为0.078 88 mg/mL、喜果苷浓度为0.021 20 mg/mL。置于-20℃冰箱保存备用。

2.1.2 供试品溶液的制备

2.1.2.1 抗氧化活性追踪的各部位溶液制备

取贵州剑河县钩藤叶(S4)细粉15 g于500 mL具塞锥形瓶中,加入70%乙醇300 mL,浸泡45 min,超声45 min,滤过。滤液用石油醚萃取,弃去石油醚层,水层浓缩。浓缩液分别用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取,分别得到各部位的萃取液,减压浓缩各部位萃取液,最后于60℃减压干燥至恒重。取各个部位固体25 mg,分别配制浓度为0.100 mg/mL的氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等部位供试品溶液。

2.1.2.2 五成分含量测定供试品溶液制备

取钩藤叶约0.2 g,精密称定,置于50 mL的具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇20 mL,称重;浸泡30 min,超声30 min,冷却,补重,摇匀,过0.22 μm的有机微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.2 钩藤叶抗氧化活性部位追踪

2.2.1 钩藤叶总酚含量测定

采用Folin-Ciocalteu法^[7],测定钩藤叶中总酚的含量。以没食子酸标准溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y=0.152X+0.0089$, $r=0.9993$,没食子酸在0~5.00 μg/mL内线性关系良好。分别精密取0.100 mg/mL的氯仿、乙酸乙酯和正丁醇三个萃取部位的供试品溶液0.5 mL至10 mL的容量瓶,按标准曲线制备方法测定钩藤叶三个萃取部位的总酚含量,结果见表1。

2.2.2 钩藤叶中总黄酮含量测定

采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠^[8],测定钩藤

叶中总黄酮含量。以芦丁标准溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 0.0366X + 0.05$, $r = 0.9988$, 芦丁在 $0 \sim 20.0 \mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。分别精密取 0.100 mg/mL 的氯仿、乙酸乙酯和正丁醇三个萃取部位的供试品溶液 1 mL 至 10 mL 的容量瓶,按标准曲线制备方法测定钩藤叶三个萃取部位的总黄酮含量,结果见表 1。

2.2.3 DPPH 自由基清除能力测定

参考郭雪峰等^[9] DPPH 自由基清除能力测定方法。分别精密量取适量 0.100 mg/mL 的氯仿、乙酸乙酯和正丁醇三个萃取部位的供试品溶液,置于 50 mL 的容量瓶中,再加甲醇定容至刻度,摇匀,即得三

个萃取部位的不同浓度梯度的供试品溶液,其中乙酸乙酯部位浓度梯度为 $5.00 \sim 25.0 \mu\text{g/mL}$;正丁醇部位浓度梯度为 $10.0 \sim 60.0 \mu\text{g/mL}$;氯仿部位浓度梯度为 $10.0 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 。依次加入不同浓度的三个部位供试品溶液 1 mL 、 0.1 mmol/L 的 DPPH 甲醇溶液 3 mL 于各试管中,充分混匀,避光静置 30 min 后,于 519 nm 波长处测定其吸光度 A_0 ,另同法操作做空白对照,测定其吸光度 A_1 。DPPH 自由基清除率的计算公式: $Y(\%) = (A_1 - A_0) / A_1 \times 100\%$ 。

清除 DPPH 自由基能力使用 AE 表示, $AE = 1 / IC_{50}$, AE 越大,其清除 DPPH 自由基的能力越大。结果见表 1。

表 1 钩藤叶总酚、总黄酮含量和 AE 值

Table 1 Total phenolics, total flavonoids and AE values of *U. rhynchophylla* leaves

三个部位供试品溶液 Three parts for test solution	总酚含量 Total phenol content (%)	总黄酮含量 Total flavonoid content (%)	AE (L/g)
乙酸乙酯部位 Ethyl acetate moiety	62.79	21.15	112.59
正丁醇部位 n-Butanol moiety	28.15	14.47	40.77
氯仿部位 Chloroform moiety	13.62	12.10	15.84

2.2.4 钩藤叶抗氧化活性物质基础分析

采用 SPSS21.0 数据处理。结果表明钩藤叶总酚含量与清除 DPPH 自由基的能力呈显著正相关 ($P < 0.05$),其相关系数为 0.999 。钩藤叶总黄酮含量与清除 DPPH 自由基的能力呈极显著正相关 ($P < 0.01$),其相关系数为 1.000 。由表 1 结果及相关分析结果可知,钩藤叶清除 DPPH 自由基的物质基础与酚类和黄酮类成分显著正相关。对三个部位的 HPLC 色谱图进行分析,根据对照品对照及各色谱峰光谱图分析可知乙酸乙酯部位以绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷等黄酮和多酚类成分为主;正丁醇层以绿原酸、芦丁等极性较大的黄酮苷和生物碱苷等为主;氯仿层以生物碱成分为主。结合课题组药效成分的研究,本文建立钩藤叶中绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷、喜果苷等活性成分的 HPLC 测定方法。

2.3 测定钩藤叶 5 种成分的 HPLC 方法研究

2.3.1 检测条件的选择

2.3.1.1 检测波长的选择

分析 5 种成分的对照品溶液的 HPLC 色谱峰的光谱图,比较各波长下 5 种成分色谱峰灵敏度和分离情况,选择 354 nm 为定量检测绿原酸、芦丁和金丝桃苷的最佳波长,选择 226 nm 为定量检测表儿茶

素和喜果苷的最佳波长(见图 1、图 2)。

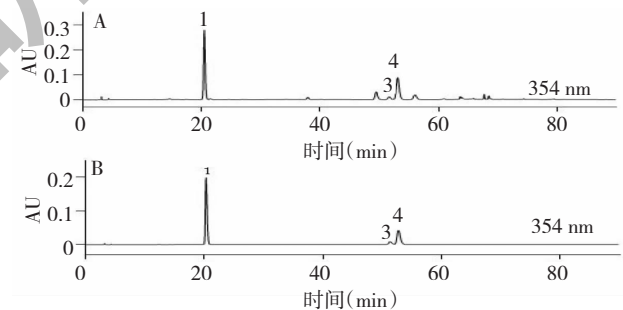


图 1 样品与混合对照品的高效液相色谱图(354 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms of sample and mixed standards (354 nm)

注:1. 绿原酸;3. 芦丁;4. 金丝桃苷。

Note: 1. Chlorogenic acid; 3. Rutin; 4. Hyperoside.

2.3.1.2 色谱条件

采用 CNW C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流动相 A 为乙腈;流动相 B 为 0.1% 磷酸,梯度洗脱 ($0 \sim 25 \text{ min}, 8\% \sim 13\% \text{ A}; 25 \sim 27 \text{ min}, 13\% \sim 15\% \text{ A}; 27 \sim 55 \text{ min}, 15\% \sim 16\% \text{ A}; 55 \sim 60 \text{ min}, 16\% \sim 22\% \text{ A}; 60 \sim 75 \text{ min}, 22\% \sim 30\% \text{ A}; 75 \sim 80 \text{ min}, 30\% \sim 35\% \text{ A}; 80 \sim 90 \text{ min}, 35\% \sim 35\% \text{ A}$),检测波长为 $226, 354 \text{ nm}$,流速 1.0 mL/min ,进样量 $20 \mu\text{L}$,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

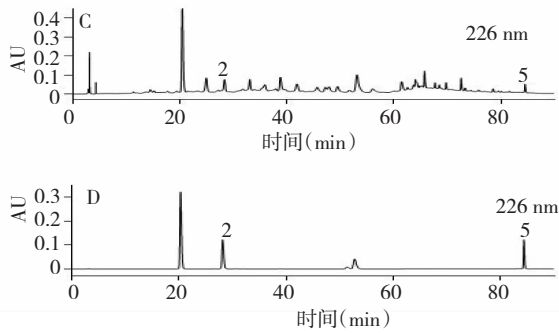


图2 样品与混合对照品的高效液相色谱图(226 nm)

Fig. 2 HPLC chromatograms of sample and mixed standards (226 nm)

注:2. 表儿茶素;5. 喜果苷。

Note:2. Epicatechin;5. Vincoside lactam.

2.3.2 钩藤叶前处理

2.3.2.1 提取溶剂的考察

取钩藤叶(S8)粉末4份,每份约1g,精密称定。分别精密加入30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇溶液各100 mL,称重,浸泡30 min,超声45 min,冷却,补足重量,摇匀,过滤膜,按“2.3.1.2”项下色谱条件进行分析,四种提取溶剂制备样品的五成分测定的峰面积结果见图3。综合4种溶剂对各

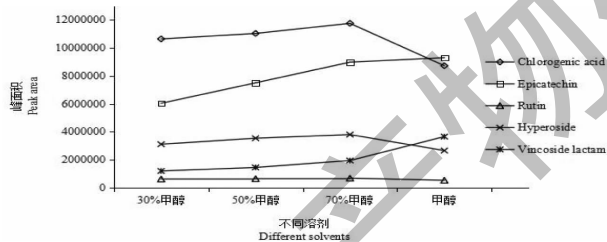


图3 不同溶剂提取的钩藤叶中5种成分的峰面积

Fig. 3 Peak area of five components in *U. rhynchophylla* leaves extracted at different solvents

表2 五种对照品的回归方程与线性范围

Table 2 Regression equation and linear range of the five reference

成分 Compound	检测波长 Detection wavelength (nm)	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range (μg)
绿原酸 Chlorogenic acid	354	$Y = 2.189 \times 10^7 X - 5.697 \times 10^3$	1	0.014 70 - 11.02
表儿茶素 Epicatechin	226	$Y = 6.668 \times 10^7 X - 5.835 \times 10^3$	1	0.003 405 - 2.554
芦丁 Rutin	354	$Y = 3.012 \times 10^7 X - 6.542 \times 10^3$	0.999 3	0.000 804 0 - 0.603 0
金丝桃苷 Hyperoside	354	$Y = 4.264 \times 10^7 X - 9.282 \times 10^3$	0.999 9	0.003 155 - 2.366
喜果苷 Vincoside lactam	226	$Y = 7.849 \times 10^7 X - 4.130 \times 10^2$	1	0.000 848 0 - 0.636 0

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 精密度的试验

成分的提取情况,选择70%甲醇为最佳提取溶剂。

2.3.2.2 提取时间的考察

取钩藤叶(S8)粉末4份,每份约1g,精密称定。精密加入70%甲醇溶液100 mL,称重,浸泡30 min,分别超声15、30、45、60 min,冷却、补重,摇匀,过滤膜,按“2.3.1.2”项下色谱条件进行分析,不同的提取时间制备样品的五成分测定的峰面积结果见图4。结果发现提取时间为30 min时,五成分已趋于提取平衡,其中绿原酸、表儿茶素、喜果苷提取含量已达最大;继续增加提取时间表儿茶素降解明显。最终选择超声时间30 min为最佳提取时间。

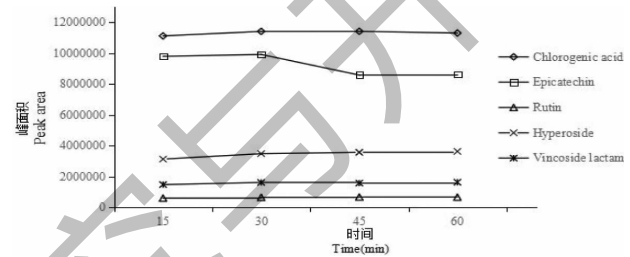


图4 不同时间提取的钩藤叶中5种成分的峰面积

Fig. 4 Peak area of five components in *U. rhynchophylla* leaves extracted at different times

2.3.3 线性关系考察

将“2.1.1”项制备的混合对照品溶液分别稀释0、5、10、50、100、250、500倍,得系列混合对照品溶液,按“2.3.1.2”项下色谱条件测定,其中稀释0倍的混合对照品溶液进样20、30 μL 两进样体积;每个浓度分别重复进样2次,峰面积积分平均值为纵坐标(Y),分别以绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷、喜果苷的进样浓度(mg/mL)为横坐标(X),得回归方程。各成分的线性回归方程、相关系数及线性范围见表2。

精密吸取混合对照品溶液20 μL ,按“2.3.1.2”项下色谱条件连续进样6次,考察仪器的精密度。

结果显示,绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷、喜果苷的峰面积 RSD 分别为 0.90%、1.1%、1.7%、1.8%、1.1%。表明仪器精密度良好。

2.3.4.2 稳定性试验

取钩藤叶(S8)样品,按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、3、6、9、12、16、24 h 按“2.3.1.2”项下色谱条件测定,考察供试品溶液的稳定性。结果显示,绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷、喜果苷的峰面积 RSD 分别为 0.34%、1.3%、1.2%、0.19%、1.6%。表明供试品溶液室温放置 24 h 内稳定。

2.3.4.3 重复性试验

取钩藤叶(S8)样品,按“2.1.2.2”项下方法制

备供试品溶液 6 份,按“2.3.1.2”项下色谱条件测定,考察实验方法的重复性。结果显示,绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷、喜果苷的平均含量分别为 19.76、4.191、0.745 4、3.036、1.317 mg/g, RSD 分别为 1.9%、2.7%、2.4%、0.69%、2.3%。表明该方法重复性良好。

2.3.4.4 加样回收率试验

取已知含量的钩藤叶(S8)约 0.1 g,共取 6 份,精密称定,分别精密加入 5 mL 的混合对照品溶液,按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1.2”项下色谱条件分析,记录色谱图和峰面积,计算 5 种成分平均回收率及 RSD 值。结果见表 3,平均回收率在 96.73% ~ 103.50%, RSD 均小于 3%。

表 3 加样回收试验结果($n=6$)

Table 3 Recovery ($n=6$)

成分 Component	取样量 Sample weight (g)	样品含量 Original (mg)	加入量 Added (mg)	测得量 Found (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
绿原酸 Chlorogenic acid	0.100 3	1.982	1.837	3.868	102.63	103.50	2.4
	0.101 6	2.008	1.837	3.857	100.66		
	0.100 7	1.990	1.837	3.985	108.60		
	0.100 0	1.976	1.837	3.859	102.48		
	0.100 2	1.980	1.837	3.887	103.79		
表儿茶素 Epicatechin	0.101 0	1.996	1.837	3.886	102.88	100.44	1.3
	0.100 3	0.420 3	0.425 6	0.851 8	101.38		
	0.101 6	0.425 8	0.425 6	0.861 5	102.39		
	0.100 7	0.422 0	0.425 6	0.852 0	101.04		
	0.100 0	0.419 1	0.425 6	0.841 7	99.31		
芦丁 Rutin	0.100 2	0.419 9	0.425 6	0.845 0	99.89	97.75	1.9
	0.101 0	0.423 3	0.425 6	0.843 1	98.64		
	0.100 3	0.074 76	0.100 5	0.172 0	96.77		
	0.101 6	0.075 73	0.100 5	0.172 1	95.87		
	0.100 7	0.075 06	0.100 5	0.171 0	95.50		
金丝桃苷 Hyperoside	0.100 0	0.074 54	0.100 5	0.175 2	100.16	96.73	1.5
	0.100 2	0.074 69	0.100 5	0.174 1	98.92		
	0.101 0	0.075 29	0.100 5	0.175 1	99.30		
	0.100 3	0.304 5	0.394 4	0.683 8	96.17		
	0.101 6	0.308 4	0.394 4	0.682 7	94.89		
喜果苷 Vincoside lactam	0.100 7	0.305 7	0.394 4	0.680 9	95.15	100.32	2.9
	0.100 0	0.303 5	0.394 4	0.692 3	98.56		
	0.100 2	0.304 1	0.394 4	0.689 1	97.59		
	0.101 0	0.306 6	0.394 4	0.693 2	98.03		
	0.100 3	0.132 1	0.106 0	0.240 8	102.59		
	0.101 6	0.133 8	0.106 0	0.243 4	103.45	96.11	
	0.100 7	0.132 6	0.106 0	0.241 7	102.90		
	0.100 0	0.131 7	0.106 0	0.233 6	96.11		
	0.100 2	0.131 9	0.106 0	0.235 1	97.32		
	0.101 0	0.133 0	0.106 0	0.238 5	99.55		

2.3.4.5 样品测定

取不同产地的钩藤叶样品 0.2 g,精密称定,按“2.1.2.2”项下的方法制备供试品溶液,按“2.3.1.2”项

下色谱条件分析,记录色谱图和峰面积,计算 5 种成分的含量。结果见表 4。

表 4 不同产地钩藤叶含量测定 (mg/g)

Table 4 Determination of *U. rhynchophylla* leaves from different localities (mg/g)

样品号 Sample No.	绿原酸 Chlorogenic acid	表儿茶素 Epicatechin	芦丁 Rutin	金丝桃苷 Hyperoside	喜果苷 Vincoside lactam	总量 Total amount
S1	28.45	3.255	0.750 5	3.798	0.293 9	36.55
S2	26.85	3.686	0.698 3	3.761	0.270 5	35.27
S3	29.02	3.449	1.096	5.249	0.758 5	39.57
S4	24.81	1.322	0.868 2	7.381	0.604 0	34.99
S5	28.97	2.661	1.373	7.142	0.154 3	40.30
S6	24.78	1.311	1.318	7.321	0.660 1	35.39
S7	24.92	4.511	1.547	4.285	2.155	37.42
S8	19.76	4.191	0.745 4	3.036	1.317	29.05
S9	24.95	3.718	0.389 1	3.442	1.576	34.08
S10	15.44	3.294	0.425 4	1.490	1.527	22.18
S11	10.57	2.981	0.408 6	1.052	1.676	16.69
S12	13.10	2.431	0.425 7	0.982 0	0.199 0	17.14

2.4 聚类分析

为评价不同产地的钩藤叶测定成分的差异,对 12 批次钩藤叶中 5 种成分的含量测定结果进行聚类分析。采用 SPSS21.0 统计软件进行系统聚类分析,选用组间联接聚类方法,采用 Euclidean 距离作为钩藤叶样品的测度,结果 12 个产地的钩藤叶可以分为 3 类,第一类:S7;第二类:S1、S2、S3、S4、S6、S5;第三类:S10、S11、S8、S9、S12。不同产地钩藤叶聚类分析树状图见图 5。

另外,还对样品的提取溶剂体积进行了考察,发现 1:100 的料液比进行提取,五成分含量已经趋于提取平衡。

不同产地的钩藤叶五成分含量测定结果(见表 4)表明:绿原酸在五成分含量中明显最高,占五成分总量的 63%~78%。钩藤叶五成分含量依产地不同存在明显的差异,可能与不同产地的环境差异有关。根据 12 批不同产地钩藤叶五成分含量的聚类分析结果(见图 5),广东、广西地区钩藤叶聚为第三类;贵州地区除兴义市产地钩藤叶独立归为第一类外,其余的均聚为第二类。从含量看,产于贵州地区钩藤叶五成分总含量高于广东地区。第二类贵州凯里市、剑河县等地钩藤叶,属于贵州黔东南区域,而独立分类兴义市位于贵州黔西南区域,可能是地区不同种植环境造成的贵州钩藤叶五成分差异聚分为两类。

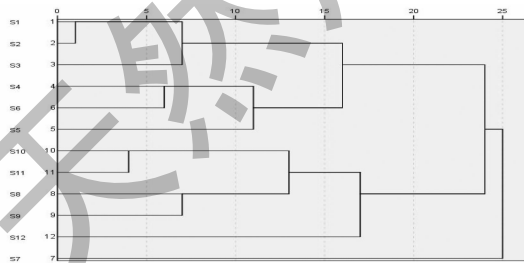


图 5 不同产地钩藤叶聚类分析树状图

Fig. 5 Tree diagram of cluster analysis of *U. rhynchophylla* leaves from different localities

3 结论

对供试品溶液提取方法进行优化时,除对不同溶剂、不同提取时间进行了优化,还对药材取样量进行了考察;结果表明 0.1 g 取样量已经具有代表性。

钩藤叶药用历史悠久^[6],来源丰富。现代药理学研究表明,绿原酸具有抗氧化、抗菌、抗突变和抗癌变、降血脂和降血压等作用^[10],表儿茶素^[11]、金丝桃苷^[12]和芦丁^[13]等也具有类似功效;喜果苷具有显著抗白血病和抑制肿瘤^[14]、抗炎^[15]等活性。本课题组前期功效研究发现钩藤叶除明显的抗氧化作用,还有抗炎和镇静等作用。因此这五个成分是

钩藤叶的主要功效成分,本文建立了钩藤叶中绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷和喜果苷的含量测定方法,为钩藤叶的综合开发利用提供了质量控制方法。

参考文献

- 1 Wang W. Investigation on the status of *Uncaria* medicinal materials in china[J]. China Pharm(中国药师), 2008, 11: 1368-1369.
- 2 Cui GQ, Zha YF, Wang KY. Comparison on HPLC fingerprint of *Uncariae ramulus cum unciis stems and leaves* from guizhou province[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 120-123.
- 3 Li RX, Cheng JT, Jiao MJ, et al. Chemical constituents from leaves of *Uncaria rhynchophylla*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48: 1499-1505.
- 4 Luo J, Zhang N, Wang DP, et al. Determination of total flavonoids in different parts of *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil[J]. Guizhou Sci(贵州科学), 2019, 37(2): 15-18.
- 5 Huang RS, Zhang P, Yan DJ, et al. Analysis of the rhyncophylline in different medicinal parts of *Uncaria rhynchophylla* [J]. West Chin J Pharm Sci(华西药学杂志), 2013, 28: 183-185.
- 6 Xia GC, Xu SM, Liu XM. Study on the utilization of domestic *Uncaria* resources [J]. Chin Herb Med(中草药通讯), 1977, 2: 43-47.
- 7 Duan HX, Lin YX, Zhang JR, et al. Determination of phlorotannins in *Sargassum horneri* using Folin-Ciocalteu colorimetric method[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27: 1374-1378.
- 8 Luo XM, Zhang Y, Huang DD, et al. Content determination of total flavonoids in extracts from *Ficus carica* leaves by UV-visible spectrophotometry [J]. China pharm(中国药房), 2015, 26: 2111-2113.
- 9 Guo XF, Yue YD, Tang F, et al. Detection of antioxidative capacity of bamboo leaf extract by scavenging organic free radical DPPH[J]. Spectrosc Spect Anal(光谱学与光谱分析), 2008, 7: 1578-1582.
- 10 Na XX, Zhang WT, Tan YF, et al. Research progress on the pharmacological effects and adverse reactions of chlorogenic acid and Its Isomers[J]. J Liaoning Univ TCM(辽宁中医药大学报), 2018, 20: 140-144.
- 11 Tong GZ, Fu XP, Yang Y, et al. Advances in research on the distribution and pharmacological activities of epicatechin [J]. J Yunnan Agr Univ: Nat Sci(云南农业大学学报: 自科版), 2018, 33: 343-349.
- 12 Li JS, Chen JH, Meng MJ. Progress on the pharmacological effects and mechanism of hyperoside [J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药学院学报), 2015, 31: 269-272.
- 13 Li YS. Progress on resources, pharmacological effect and major forms of rutin[J]. Ami Acids & Bio Res(氨基酸和生物资源), 2013, 35(3): 13-16.
- 14 Wall ME, Wani MC, Cook CE, et al. Antihumor agent I. the isolation and structure of campto-thecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. Amer Chem Soc, 1966, 88: 3888.
- 15 Yuan D, Ma B, Wu C, et al. Alkaloids from the leaves of *Uncaria rhynchophylla* and their inhibitory activity on NO production in lipopolysaccharide-activated microglia. [J]. Nat Prod, 2008, 71: 1271-1274.