

# 钩藤 UHPLC 指纹图谱及化学模式识别研究

黄雯雯<sup>1</sup>, 王晓明<sup>1</sup>, 郭亚卿<sup>1</sup>, 韩立峰<sup>1</sup>, 黄宇虹<sup>2</sup>, 潘桂湘<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>天津中医药大学 天津市中药化学与分析重点实验室,天津 301617; <sup>2</sup>天津中医药大学第二附属医院,天津 300250

**摘要:**利用UHPLC指纹图谱结合化学模式识别技术对钩藤药材进行质量评价。采用ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub>色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱,检测波长254 nm,流速0.3 mL/min,进样量2 μL,柱温30 °C,采集并记录不同来源的钩藤UHPLC指纹图谱,然后利用相似度评价、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘判别分析等化学模式识别方法,对不同来源的钩藤药材质量进行分析和评价。所建立的钩藤UHPLC指纹图谱共识别、标定了15个共有峰,经鉴定其中的7个共有峰分别为绿原酸、异帽柱木菲碱、异钩藤碱、钩藤碱、缝籽嗪甲醚、去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱;30批不同市售来源钩藤的相似度在0.850~0.995之间。经正交偏最小二乘判别分析筛选出了导致不同批次药材质量差异的5个共有峰。本研究建立的UHPLC指纹图谱结合化学模式识别的方法简单、可靠,可为钩藤的质量评价提供参考。

**关键词:**钩藤;指纹图谱;UHPLC;化学模式识别

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)5-0727-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.5.002

## Study on UHPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Uncariae Ramulus Cum Uncis

HUANG Wen-wen<sup>1</sup>, WANG Xiao-ming<sup>1</sup>, GUO Ya-qing<sup>1</sup>, HAN Li-feng<sup>1</sup>, HUANG Yu-hong<sup>2</sup>, PAN Gui-xiang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory

of Traditional Chinese Medicine Chemistry and Analysis, Tianjin 301617, China;

<sup>2</sup>Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China

**Abstract:** The UHPLC fingerprints and chemical pattern recognition were studied to evaluate the quality of Uncariae Ramulus Cum Uncis (URCU). The chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub> column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm). Acetonitrile-0.1% formic acid solution was used as mobile phase with gradient elution. The detection wavelength was set at 254 nm, the flow rate was 0.3 mL/min, the injection volume was 2 μL, and the column temperature was 30 °C. The chemical pattern recognition of similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares analysis were used to analyze and evaluate the quality of URCU. The established URCU UHPLC fingerprint identified 15 common peaks and 7 common peaks could be identified using standards, including chlorogenic acid, isomitraphylline, isorhynchophylline, rhynchophylline, geissoschizine methylether, hirsuteine and hirsutine. The results about the chemical pattern recognition showed that the similarities of those fingerprints were between 0.850 and 0.995. Furthermore, the quality difference of those URCU was mainly caused by 5 common peaks according to the results of orthogonal partial least squares discriminant analysis. In conclusion, the fingerprints combined with chemical pattern recognition provide a simple and accurate analytical method for the quality evaluation of URCU.

**Key words:** Uncariae Ramulus Cum Uncis; fingerprint; UHPLC; chemical pattern recognition

2020版《中国药典》收载的钩藤,为茜草科植物

钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.、大叶钩藤 *Uncaria macrophylla* Wall.、毛钩藤 *Uncaria hirsuta* Havil.、华钩藤 *Uncaria sinensis* (Oliv.) Havil.或无柄果钩藤 *Uncaria sessilifructus* Roxb. 的干燥带钩茎枝<sup>[1]</sup>。目前医药市场上流通的药用钩藤,主要

收稿日期:2020-11-05 接受日期:2021-02-22

基金项目:国家自然科学基金(81303182);国家自然科学基金(81173523);国家重大科技“重大新药创制”专项(2018ZX09734-002)

\*通信作者 E-mail:guixiangp@163.com

为 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 钩藤。钩藤具有清热平肝,息风定惊的功效,可用于肝风内动、惊痫抽搐、高热惊厥、感冒夹惊、小儿惊啼、妊娠子痫、头痛眩晕等,临幊上常用于治疗高血压、心律失常、焦虑、癫痫等疾病<sup>[2-4]</sup>。钩藤所含化学成分众多,主要含有生物碱类、黄酮类、三萜类等成分<sup>[5-7]</sup>,其中生物碱被认为是钩藤降压的主要药效组分<sup>[8]</sup>。

中药指纹图谱是一种综合的、可量化提供化学成分特征的色谱图。就钩藤药材而言,不少学者已开展了一些有关钩藤指纹图谱的研究。例如 Huang 等<sup>[9-11]</sup>以钩藤碱和异钩藤碱为指标成分,建立了不同产地钩藤的 HPLC 色谱指纹图谱,Tan 等<sup>[12]</sup>针对钩藤生物碱部位,建立了钩藤的 HPLC 指纹图谱。这些研究为深入评价钩藤的质量做出了有益的探索,但囿于研究的关注点主要集中于钩藤碱、异钩藤碱等少数生物碱成分,且只采用了单一的相似度评价,未对指纹图谱数据进行更深层次的挖掘与探讨,在准确全面反映钩藤内在质量方面尚有所不足。

为了更客观、全面、高效地评价钩藤药材质量,本实验通过 UHPLC 建立了 30 批不同来源钩藤的指纹图谱研究,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”标定了 15 个共有峰,经对照品比对,鉴定出了绿原酸、异帽柱木菲碱、异钩藤碱、钩藤碱、缝籽嗪甲醚、去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱 7 个共有峰。在指纹图谱相似度评价基础上,将指纹图谱数据与化学计量学方法相结合,应用基于化学计量学的聚类分析 (cluster analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析

(orthogonal partial least squares analysis, OPLS-DA) 等多元统计方法对钩藤药材质量进行分析评价,以筛选和识别钩藤质量差异的标志性化合物,便于为有效控制钩藤的质量提供参考。

## 1 仪器和材料

### 1.1 仪器

Thermo Fisher UHPLC 3000 超高效液相色谱仪;AX205 型十万分之一天平(Mettler Toledo, Switzerland);KQ-300B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);3K15 型高速离心机(美国 Sigma 公司);XW-80A 型涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂);Milli-Q 超纯水制备仪;粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司,天津,中国)。

### 1.2 试剂

乙腈、甲醇(色谱纯,购于 Fisher 公司);甲酸(色谱级,ROE 公司);超纯水由 Milli-Q 超纯水仪制备。对照品异帽柱木菲碱(批号:B33640)、异钩藤碱(批号:B21526)、钩藤碱(批号:B20453)、去氢毛钩藤碱(批号:B21025)(上海源叶生物科技有限公司);缝籽嗪甲醚(批号:DST190705)、毛钩藤碱(批号:DST190617-009)、绿原酸(批号:DST181201-021)(成都德思特生物技术有限公司);以上对照品纯度均 ≥ 98%。

### 1.3 材料

30 批不同来源的市售钩藤收集于湖南、江西、贵州、广西等地,所有样品经天津中医药大学李天祥教授鉴定,表 1 为不同来源钩藤的具体信息。

表 1 钩藤样品信息

Table 1 Information of Uncariae Ramulus Cum Uncis

编号 No.	来源 Origin	编号 No.	来源 Origin
S1	湖南省邵东市	S16	广西省玉林市
S2	湖南省怀化市	S17	广西省玉林市
S3	湖南省湘西市	S18	广西省柳州市
S4	湖南省郴州市	S19	广西省南宁市
S5	湖南省郴州市	S20	安徽省大别山
S6	湖南省长沙市	S21	安徽省亳州市
S7	江西省赣州市	S22	安徽省亳州市
S8	江西省赣州市	S23	陕西省渭南市
S9	江西省九江市	S24	陕西省西安市
S10	江西省九江市	S25	陕西省西安市
S11	江西省南昌市	S26	云南省昆明市

续表 1(Continued Tab. 1)

编号 No.	来源 Origin	编号 No.	来源 Origin
S12	贵州省黔东南	S27	云南省昆明市
S13	贵州省黔东南	S28	四川省成都市
S14	贵州省黔东南	S29	四川省眉山市
S15	贵州省铜仁市	S30	福建省三明市

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱采用 ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub> 柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相: A 相为 0.1% 甲酸-水, B 相为乙腈, 梯度洗脱, 梯度程序为: 0 ~ 22 min, 5% B → 18% B; 22 ~ 37 min, 18% B → 25% B; 37 ~ 47 min, 25% B → 35% B; 47 ~ 50 min, 35% B → 55% B, 流速为 0.3 mL/min, 柱温: 30 °C, 进样量为 2 μL, 检测波长为 254 nm。

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 对照品溶液制备

精密称定异帽柱木菲碱、异钩藤碱、钩藤碱、缝籽嗪甲醚、去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱、绿原酸适量, 分别加入甲醇制成浓度为 1 mg/mL 的对照品储备液。精密移取各化合物储备液适量, 配制成混合对照品溶液, 并置于 4 °C 冰箱冷藏备用。

#### 2.2.2 供试品溶液制备

取钩藤药材粉末(过三号筛)0.3 g, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 精密加入 75% 甲醇定容至刻度线, 超声提取(功率 250 W, 频率 50 kHz)40 min, 静置至室温后, 加 75% 甲醇补足至刻度线, 摆匀后滤过。滤液减压浓缩至干, 加入 3 mL 75% 甲醇复溶, 14 000 rpm 高速离心 20 min, 吸取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 并置于 4 °C 冰箱冷藏备用。

### 2.3 指纹图谱方法学考察

#### 2.3.1 精密度实验

取同一批次样品(S5), 按照“2.2.2”项制备供试品溶液, 按照上文所述的色谱条件连续 6 次进样, 以 3 号色谱峰为参照峰, 可测得各个共有色谱峰的峰面积和相对保留时间, 计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.28%, 相对峰面积的 RSD 均 < 4.73%, 结果表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱的要求。

#### 2.3.2 稳定性试验

取同一批次样品(S5), 按照“2.2.2”项制备供

试品溶液, 按照上文所述的色谱条件分别在时间点 0、2、4、8、12、24、48 h 下分别进样, 以 3 号色谱峰为参照峰, 可测得各个共有色谱峰的峰面积和相对保留时间, 计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.37%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.96%, 结果表明样品放置于室温 48 h 内稳定性良好。

#### 2.3.3 重复性试验

取同一批次样品(S5)6 份, 每份称取 0.3 g, 按照“2.2.2”项制备供试品溶液, 按照上文所述的色谱条件连续进样, 以 3 号色谱峰为参照峰, 可测得各个共有色谱峰的峰面积和相对保留时间, 计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.26%, 相对峰面积的 RSD 均 < 4.97%, 结果表明供试品制备方法重复性良好。

### 2.4 不同来源钩藤 UHPLC 指纹图谱建立

#### 2.4.1 指纹图谱的建立及相似度评价

分别称定 30 批不同来源的钩藤药材, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 同时按照“2.1”项的色谱条件进行测定, 得到 30 批钩藤药材的 UHPLC 色谱指纹图谱。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012 版)”对所得数据结果进行分析, 将时间窗宽度设置为 0.2 min 以避免一些极端数据对于大部分数据造成影响, 选取中位数法作为色谱指纹图谱的共有模式图的生成方式, 运用多点校正的方法进行了校正, 选取 S5 作为参照色谱图, 得到了相应的钩藤特征图谱, 和指纹图谱共有模式对照图见图 1, 相似度评价结果见表 2。30 批不同来源钩藤样品中有 29 批样品与对照指纹图谱的相似度在 0.919 ~ 0.995 之间, 仅 S10 样品相似度为 0.850, 可见大部分药材质量比较接近。

#### 2.4.2 特征峰的标定

根据保留时间标定特征指纹峰, 对 30 批钩藤 UHPLC 指纹图谱测定结果进行比较分析, 发现 15 个特征峰是 30 批钩藤共有的, 因此确定这 15 个峰为特征指纹峰。通过对对照品比对, 确定 3 号峰为绿

原酸、7号峰为异帽柱木菲碱、8号峰为异钩藤碱、10号峰为钩藤碱、12号峰为缝籽嗪甲醚、13号峰为去

氢毛钩藤碱、14号峰为毛钩藤碱。钩藤药材(S5为例)样品和混合对照品的UHPLC图谱见图2。

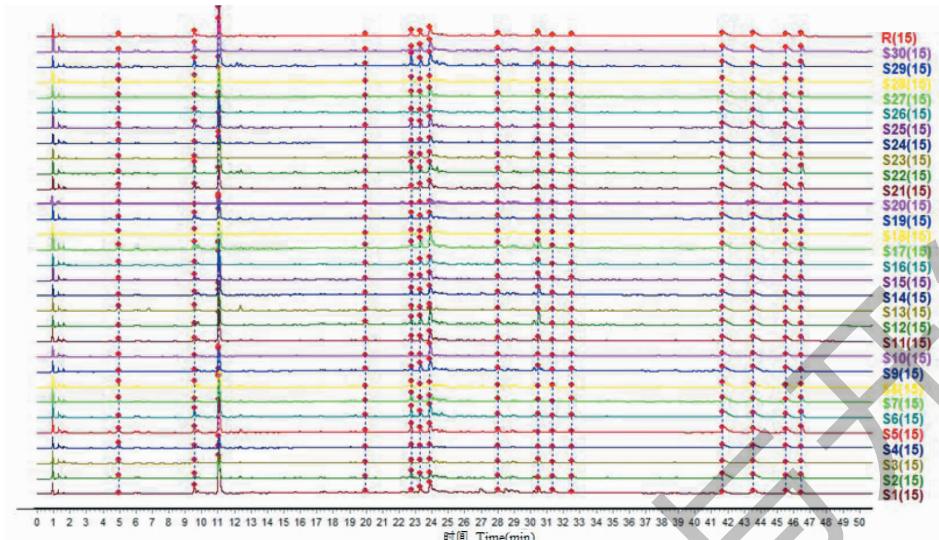


图1 30批样品指纹图谱拟合及共有模式对照图谱

Fig. 1 UHPLC fingerprints and reference fingerprint of 30 batches of Uncariae Ramulus Cum Uncis

表2 30批样品与对照指纹图谱相似度结果

Table 2 Similarity results of 30 batches of Uncariae Ramulus Cum Uncis and control fingerprint

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.956	S16	0.980
S2	0.973	S17	0.952
S3	0.965	S18	0.987
S4	0.938	S19	0.980
S5	0.980	S20	0.919
S6	0.976	S21	0.962
S7	0.968	S22	0.952
S8	0.953	S23	0.971
S9	0.965	S24	0.943
S10	0.850	S25	0.984
S11	0.994	S26	0.985
S12	0.928	S27	0.995
S13	0.980	S28	0.986
S14	0.974	S29	0.944
S15	0.979	S30	0.975

#### 2.4.3 聚类分析

以钩藤样品中15个共有峰的相对峰面积为变量,得到30×15原始数据矩阵,运用SPSS 24.0分析软件,采用组间联接法结合欧式距离平方对样品进行聚类分析,结果见图3。当分类距离为20时,S10样品为一类,其余样品聚为一大类;当分类距离

为5时,S10样品为一类,S20样品为一类,S1、S6、S14、S15、S22、S29样品聚为一类,S9、S12、S16、S17样品聚为一类,其余样品聚为一大类。

#### 2.4.4 主成分分析与正交偏最小二乘-判别分析

将指纹图谱中所得到的30批钩藤样品共有峰的峰面积导入SIMCA14.1软件绘制主成分分析得

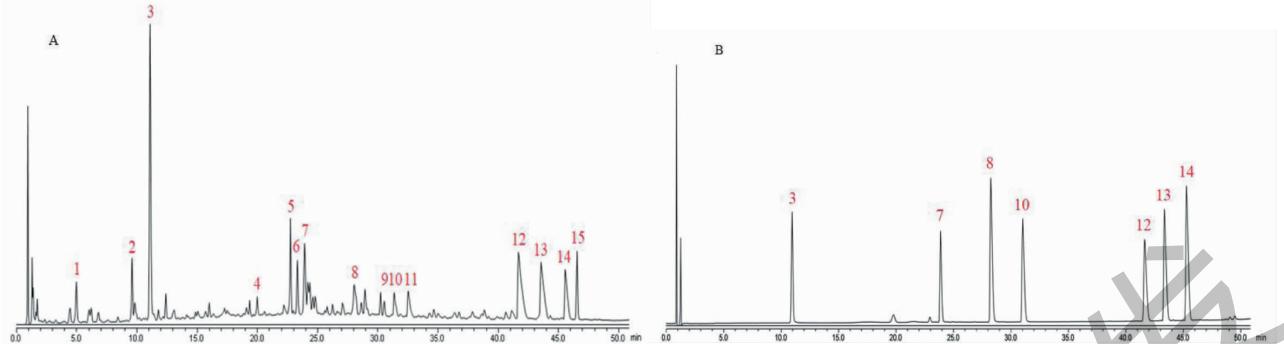


图2 钩藤样品(A)和混合对照品(B)的UHPLC图谱

Fig. 2 UHPLC chromatograms of Uncariae Ramulus Cum Uncis (A) and mixed standards (B)

注:3:绿原酸;7:异帽柱木菲碱;8:异钩藤碱;10:钩藤碱;12:缝籽嗪甲醚;13:去氢毛钩藤碱;14:毛钩藤碱。Note:3:Chlorogenic acid;

7 : Isomitraphylline ; 8 : Isorhynchophylline ; 10 : Rhynchophylline ; 12 : Geissoschizine methylether ; 13 : Hirsuteine ; 14 : Hirsutine.

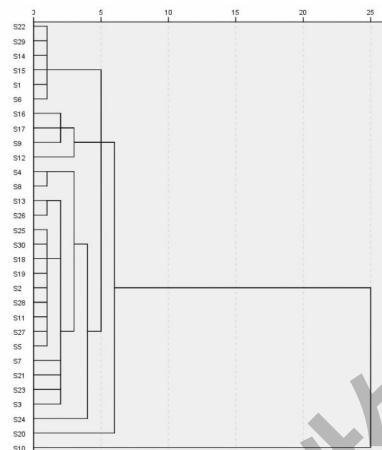


图 3 钩藤样品聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis of 30 batches of *Uncariae Ramulus Cum Uncis*

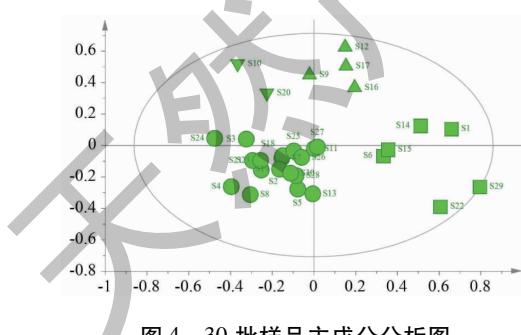


图 4 30 批样品主成分分析图

Fig. 4 Principal component analysis plot of 30 batches of Uncariae Ramulus Cum Uncis

分图,Par 作为标度化方式(见图 4)。PCA 结果与聚类分析基本一致。在载荷散点图中(见图 5),每一个点代表一个色谱峰,其在坐标系中距离原点

(0,0)距离的远近,表明该成分对样品分类的贡献的作用程度。其中1号、3(绿原酸)、6号、7(异帽柱木菲碱)、9号、12(缝籽嗪甲醚)、14号(毛钩藤碱)号色谱峰在坐标系中的绝对值较大,表明这几个成分对样品整体分布起主要影响。

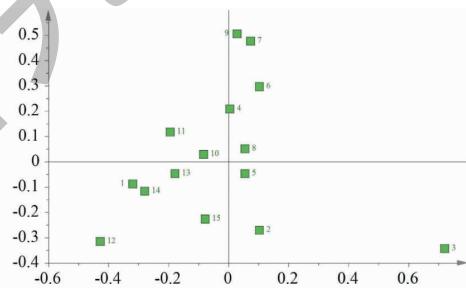


图 5 30 批样品主成分载荷图

Fig. 5 Loading plot of 30 batches  
of Uncariae Ramulus Cum Uncis

为进一步筛选出对上述样品分类贡献较大的成分,采用正交偏最小二乘判别分析结合变量投影重要度(variable importance for the projection, VIP),以VIP > 1.0为筛选标准对数据进行处理分析,共得到贡献相对较大的5个变量色谱峰(见图6)。按照变量投影重要度值大小依次为3号峰(绿原酸,VIP = 2.172 3) > 12号峰(缝籽嗪甲醚,VIP = 1.476 4) > 1号峰(VIP = 1.227 9) > 9号峰(VIP = 1.141 5) > 7号峰(异帽柱木菲碱,VIP = 1.138 3)。该结果与主成分载荷图分析结果大体一致,提示这几个成分是样品之间产生差异的主要原因,具有一定的标志性作用。为了更加全面、高效地评价药物质量,在以后对钩藤的研究中,应对上述成分引起关注。

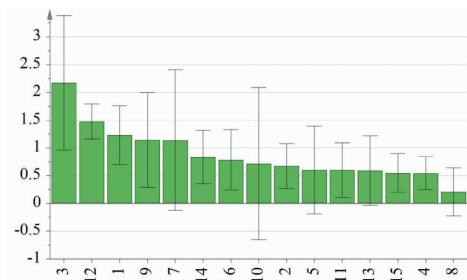


图 6 30 批钩藤样品各成分 VIP 图

Fig. 6 VIP diagram of various constituents of 30 batches of *Uncariae Ramulus Cum Uncis*

### 3 讨论

#### 3.1 供试品溶液制备方式和色谱条件优化

本研究分别考察了药材提取时间(超声 20、40、60 min)、提取溶剂(100%、75%、50% 甲醇和 100%、75%、50% 乙醇)、色谱柱(ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub>、Cortecs UPLC T<sub>3</sub>、Cortecs UPLC C<sub>18</sub> 和 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>)、不同的流动相体系(甲醇-0.1% 甲酸水溶液和乙腈-0.1% 甲酸水溶液)对色谱峰数量及分离情况的影响,最终确定 75% 甲醇超声提取 40 min 作为供试品制备方法,色谱柱选用 ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub>,以乙腈-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱。同时考察了 254、274、366 nm 等不同的检测波长,发现 254 nm 处的色谱图峰较多且分离度良好。

#### 3.2 市售钩藤的指纹图谱一致性比较

2020 版中国药典对钩藤药材的质量控制,以异钩藤碱为指标成分采用 TLC 法进行定性鉴别。该法操作较为繁琐、灵敏度较低,要对钩藤的质量进行较全面的控制较为困难。本研究首先对 30 批不同市售来源的钩藤建立指纹图谱进行相似度评价,随后对其进行化学模式识别研究。经相似度评价软件计算,结果显示 30 批钩藤药材相似度在 0.850~0.995 之间;指纹图谱共确定 15 个共有峰,经过对照品的比对指认了 7 个化学成分,分别为绿原酸、异帽柱木菲碱、异钩藤碱、钩藤碱、缝籽嗪甲醚、去氢毛钩藤碱、毛钩藤碱。绿原酸具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降血脂、降压等<sup>[13,14]</sup>广泛的药理作用;异帽柱木菲碱对人淋巴细胞白血病 T 细胞具有抗增殖作用<sup>[15]</sup>;异钩藤碱和钩藤碱是钩藤治疗高血压的主要活性成分<sup>[16]</sup>;缝籽嗪甲醚为有效的 5-HT<sub>1A</sub> 受体的激动剂,是传统日药抑肝散的主要成分<sup>[17,18]</sup>;去氢毛钩藤碱是神经细胞保护作用的有效成分<sup>[19]</sup>;毛钩藤

碱具有抗癌作用<sup>[20]</sup>,在体外可抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞活力,并诱导 DNA 损伤反应和氧化应激反应<sup>[21]</sup>。采用无监督的聚类分析、主成分分析进一步将 30 批样品分为不同组别,在对钩藤药材品质一致性评价的同时进行差异性评价;并通过正交偏最小二乘判别分析筛选对样品分组影响较大的色谱峰。通过指纹图谱相似度评价和模式识别方法相结合,我们发现导致批次间差异的主要是一 3(绿原酸)、7(异帽柱木菲碱)、9、12(缝籽嗪甲醚)这几个成分引起的,提示在对钩藤药材质量进行评价时应重点关注这几个差异成分。1 号、9 号色谱峰,有必要结合质谱、核磁等技术或采用相关对照品,进一步加以指认。

#### 4 结论

采用化学模式识别技术结合指纹图谱的数据进行分析,可以更加客观完整的评价中药的真伪与优劣。本实验采用指纹图谱相似度评价和化学模式识别技术相结合的方法对不同来源的钩藤进行研究,与已有仅以含量测定或指纹图谱的品质评价与质量控制方法相比,不仅可有效评价钩藤药材品质的一致性,同时还可阐明钩藤药材品质差异形成的主要因素,因而为钩藤的品质评价与质量控制提供了更为丰富的信息,为钩藤的质量控制和后续开发提供了一定参考。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I* (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:268.
- 2 Jiang F, Guo N, Tong WQ, et al. Progress of the genus *Uncaria* [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2017, 29:5-13.
- 3 Lin XL, Luo CH, Mo ZX. Inhibitory effect of the leaves of *Uncaria hirsuta* Havil. on CNS in mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2009, 20:2132-2133.
- 4 Hsieh CL, Chen MF, Li TC, et al. Anticonvulsant effect of *Uncaria rhynchophylla* (Miq) Jack. in rats with kainic acid-induced epileptic seizure [J]. Am J Chin Med, 1999, 27: 257-264.
- 5 Wang JK, Liu JL. Research progresses of indole alkaloids in *Uncaria* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2011, 23:776-788.
- 6 Wu WM, Li ZF, Ou-yang H, et al. Chemical constituents of *Uncariae Ramulus Cum Uncis* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2015, 21:56-58.

- 7 Deng MC, Jiao W, Dong WW, et al. Study on chemical constituents of *Uncaria rhynchophylla*[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2009, 21:242-245.
- 8 He Y, Hong XK, Wang ZH. Pharmacological development of Ramulus Uncariae Cum Uncis and its active ingredients[J]. *Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志)*, 2003, 11: 57-60.
- 9 Huang YP, Liu H. HPLC fingerprint of Ramulus Uncariae Cum Uncis[J]. *Tradit Chin Drug Res Pharmacol(中药新药与临床药理)*, 2010, 21:406-409.
- 10 He Y, Huang JW, Yang W. Establishment of HPLC fingerprint of Ramulus Uncariae Cum Uncis [J]. *J China Pharm(中国药房)*, 2011, 22:1007-1009.
- 11 Cui GQ, Cha YF, Wang KY. Comparison on HPLC fingerprint of Uncariae Ramulus Cum Uncis 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.
- 12 Tan CY, Wang HB, Wang D. Study on Uncariae Ramulus Cum Uncis by HPLC-fingerprints[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2012, 18:63-65.
- 13 Yang XL, Zhang JL, Wang JF, et al. Research progress in anti-tumor and mechanism of chlorogenic acid[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2018, 19:237-242.
- 14 Wang QH, Wang HB, Wang D, et al. Advances in research on the pharmacological effects and mechanism of action of chlorogenic acid[J]. *Acta Pharm Sin(药学学报)*, 2020, 55:1-16.
- 15 Bacher N, Tiefenthaler M, Sturm S, et al. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-arrested and Bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells[J]. *Br J Haematol*, 2010, 132:615-622.
- 16 Song CQ, Fan Y, Huang WH, et al. Different hypotensive effects of various active constituents isolated from *Uncaria rhynchophylla*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2000, 31:762-764.
- 17 Imamura S, Tabuchi M, Kushida H, et al. The blood-brain barrier permeability of geissoschizine methyl ether in *Uncaria hook*, a galenical constituent of the traditional Japanese medicine yokukansan[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31:787-793.
- 18 Nishi A, Yamaguchi T, Sekiguchi K, et al. Geissoschizine methyl ether, an alkaloid in *Uncaria hook*, is a potent serotonin 1A receptor agonist and candidate for amelioration of aggressiveness and sociality by yokukansan[J]. *Neuroscience*, 2012, 207:124-136.
- 19 Shimada Y, Goto H, Itoh T, et al. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51:715-722.
- 20 Lou CH, Yokoyama S, Saiki I, et al. Selective anticancer activity of hirsutine against HER<sub>2</sub>-positive breast cancer cells by inducing DNA damage[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33:2072-2076.
- 21 Lou CH, Yokoyama S, Abdelhamed S, et al. Targeting the ataxia telangiectasia mutated pathway for effective therapy against hirsutine-resistant breast cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12:295-300.