

基于 UHPLC 指纹图谱和多成分定量的海风藤、浙海风藤基源与质量分析

李彬, 王琼芬, 刘祖望, 张梦奇, 张红萍, 郑国平 (舟山市食品药品检验检测研究院, 浙江 舟山 316000)

摘要: 目的 建立海风藤、浙海风藤 UHPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法, 并结合聚类分析法进行药材基源及质量分析评价, 为药材基源扩大及质量控制提供参考。方法 采用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 乙腈-甲醇-水 (25 : 20 : 55) 为流动相, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 检测波长 380、235、215 nm, 柱温 35 °C, 建立海风藤、浙海风藤 UHPLC 指纹图谱, 并进行相似度评价和聚类分析, 同时测定 3 个新木脂素类成分含量。结果 海风藤、浙海风藤指纹图谱共分别标定了 15 个共有峰, 并指出其中 3 个共有峰, 分别为 11 号峰海风藤酮、13 号峰白玉兰亭 B 和 15 号峰风藤奎醇, 相似度评价结果海风藤 0.811~0.958、浙海风藤 0.737~0.996; 所建立的多成分含量测定方法具有良好的线性关系 ($r \geq 0.9997$), 平均加样回收率为 98.37%~99.46%, RSD < 3% ($n=6$), 含量测定结果显示, 不同批次样品所含新木脂素类成分差异较大; 相似度评价、聚类分析和多成分定量分析结果表明海风藤、浙海风藤二者间呈现较高的化学一致性。结论 指纹图谱、多成分含量测定结合聚类分析方法适用于海风藤、浙海风藤的基源分析和整体质量评价, 为药材质量控制、海风藤资源扩大与综合利用提供实验依据。

关键词: 海风藤; 浙海风藤; UHPLC; 指纹图谱; 聚类分析; 多成分定量; 基源分析; 质量评价

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)19-0001-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20233669

引用本文: 李彬, 王琼芬, 刘祖望, 等. 基于 UHPLC 指纹图谱和多成分定量的海风藤、浙海风藤基源与质量分析[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(19): 1-7.

Analysis of the Origin and Quality of Piperis Kadsurae Caulis, Zhehaifengteng Based on UHPLC Fingerprint and Multi-component Quantitative Analysis

LI Bin, WANG Qiongfeng, LIU Zuwang, ZHANG Mengqi, ZHANG Hongping, ZHENG Guoping (Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan 316000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the UHPLC fingerprint and multi-component determination methods of Piperis Kadsurae Caulis and Zhehaifengteng, combined with cluster analysis method to analyze and evaluate the origin and quality of medicinal materials, in order to provide reference for expanding the origin and quality control. **METHODS** The UHPLC was performed on ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); mobile phase was acetonitrile-methanol-water (25 : 20 : 55); flow rate was 0.4 mL·min⁻¹; detection wavelengths were 380, 235 and 215 nm; column temperature was 35 °C. Fingerprints of Piperis Kadsurae Caulis and Zhehaifengteng were established respectively, and similarity evaluation and cluster analysis were performed. Furthermore, the contents of three new lignans were determined. **RESULTS** The established UHPLC fingerprints of Piperis Kadsurae Caulis and Zhehaifengteng defined 15 common peaks which 3 of them were identified, including kadsurenone (peak 11), denudatin B (peak 13) and futoquinol (peak 15). The similarity were 0.811~0.958 for Piperis Kadsurae Caulis and 0.737~0.996 for Zhehaifengteng. The established multi-component determination method had a good linear relationships ($r \geq 0.9997$). The average recoveries were 98.37%~99.46%, and RSD were < 3% ($n=6$). The determination results showed that there were significant differences in the content of new lignans among different batches of samples. The similarity evaluation, cluster analysis and multi-component quantitative analysis showed a high chemical consistency between Piperis Kadsurae Caulis and Zhehaifengteng. **CONCLUSION** The combination of fingerprint and multi-component determination, combined with cluster analysis method is suitable for the original analysis and overall quality evaluation of Piperis Kadsurae Caulis and Zhehaifengteng, which can provide experimental basis for quality control, expansion and comprehensive utilization of Piperis Kadsurae Caulis resources.

KEYWORDS: piperis kadsurae caulis; zhehaifengteng; UHPLC; fingerprints; cluster analysis; multi-component determination; origin analysis; quality evaluation

基金项目: 浙江省药品监督系统科技计划项目 (2022014)

作者简介: 李彬, 男, 副主任中药师 E-mail: 852914518@qq.com

海风藤为胡椒科植物风藤 *Piper kadsura* (Choisy) Ohwi 的干燥藤茎, 味辛、苦, 性微温, 收载于中国药典 2020 年版一部和《浙江省中药炮制规范》2015 年版 (以下简称《浙江炮规》)^[1-2]。风藤同科属植物山茱 *Piper hancei* Maxim 的干燥藤茎作为浙海风藤收载于《浙江炮规》中, 临床上常作为海风藤习用品使用。海风藤和浙海风藤均具有祛风湿、通经络、止痹痛之功效, 主要用于风寒湿痹, 肢节疼痛, 筋脉拘挛, 屈伸不利, 是临床治疗痛风、类风湿关节炎常用中药之一^[3-4]。

课题组从目前药材市场调查和样品收集情况来看, 现市场上海风藤药材主要源于胡椒属植物风藤及山茱, 尤以山茱为多; 从资源分布来看, 风藤主要分布于南部沿海各省区, 尤以福建、浙江、广东、台湾为多, 广西、安徽、云南、四川、贵州也有分布。山茱资源分布更加广泛密集, 在湖南、湖北、江苏、海南等地也有分布^[5]。因二者在植物学特性上难以有效区分, 标准收载检验项目也基本一致, 以至于市场上以浙海风藤标示为海风藤现象屡见不鲜, 海风藤药材品种的鉴定存在较为混乱的现状。现行海风藤和浙海风藤质量标准中, 显微鉴别均为粉末鉴别, 该鉴别方法存在一定的局限性, 在区分同科属来源的药材饮片时, 区分难度较大。为实现 2 种药材样本的有效区分, 课题组查阅相关文献^[6-7], 采用横切面显微鉴别, 在显微镜下通过观察有无非腺毛、皮部和髓部有无分泌细胞以及维管束数目的多少等特征, 对海风藤和浙海风藤药材进行区分鉴定。

风藤、山茱化学成分较为复杂, 主要含有新木脂素、酰胺类生物碱、挥发油、黄酮、萜类等活性成分^[8-9]。现代药理研究表明, 其新木脂素类成分 (海风藤酮、风藤奎醇、白玉兰亭 B、细叶青筵藤素、南五味子素 A 等) 为药材的主要活性成分。这类成分具有抗炎、镇痛、抗氧化、抑制血小板活化因子等多种药理作用^[10-12]。因此, 对药材中活性新木脂素类成分进行分析, 将有助于了解海风藤、浙海风藤成分差异和质量优劣。迄今为止, 有关海风藤、浙海风藤指纹图谱和含量测定相关报道甚少^[13-14], 仅有报道中指纹图谱共有峰信息量少, 含量测定仅限于海风藤酮单一指标成分。指纹图谱结合统计分析及多成分含量测定研究尚未见报道。为此, 本研究拟采用超高效液相

色谱 (UHPLC) 法, 对市售和自采海风藤、浙海风藤化学成分进行分析, 建立 UHPLC 指纹图谱和 3 个新木脂素类成分含量测定方法, 结合聚类分析, 评价二者化学一致性以及不同产地、不同批次样品的质量差异, 以期对海风藤、浙海风藤的整体质量控制和药材基源扩大提供方法和数据支撑。

1 仪器与试药

Agilent 1260 液相色谱仪 (美国安捷伦公司, 配 DAD 检测器); XSE205DU 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); SP-1002 制样碎研机 (天津拓至明实验仪器设备有限公司); KQ-250DV 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

海风藤酮 (批号: PS013474; 纯度: 99.68%)、白玉兰亭 B (批号: 020275-202309; 纯度: 98.77%) 由上海鸿永生物科技有限公司提供; 风藤奎醇 (成都德思特生物技术有限公司, 批号: DST210806-118; 纯度: 99.93%); 乙腈、甲醇均为色谱纯, 来自德国 Merck 公司; 水为超纯水; 16 批海风藤样品 (编号 H1~H16)、16 批浙海风藤样品 (编号 Z1~Z16) 经浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师鉴定为胡椒科植物风藤 *Piper kadsura* 和同属不同种植物山茱 *Piper hancei* 的干燥藤茎, 来源有市售和自采。样品具体信息见表 1。

表 1 样品信息
Tab. 1 Sample information

编号	批号	产地	编号	批号	产地
H1	221019	浙江	Z1	230601	浙江
H2	221106	浙江	Z2	20221021	浙江
H3	230501	浙江	Z3	230426	浙江
H4	220801	浙江	Z4	230701	浙江
H5	221101	浙江	Z5	220808	浙江
H6	20221108	浙江	Z6	221107	浙江
H7	220623	浙江舟山	Z7	20221003	浙江
H8	220817	浙江舟山	Z8	20221215	浙江
H9	20220507	四川	Z9	20220223	浙江
H10	220601	四川	Z10	220526	浙江
H11	221202	湖北	Z11	220622	浙江舟山
H12	230304	安徽	Z12	220816	浙江舟山
H13	20230505	安徽	Z13	220920	浙江舟山
H14	20220621	广东	Z14	20220622	安徽
H15	20220901	广东	Z15	221217	安徽
H16	220702	江西	Z16	230214	安徽

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-甲醇-水(25:20:55); 流速: 0.4 mL·min⁻¹; 检测波长: 0~2 min 为 380 nm、2~34 min 为 235 nm、34~40 min 为 215 nm; 柱温: 35 ℃; 进样体积为 4 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取海风藤酮、白玉兰亭 B、风藤奎醇对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇溶解并制成质量浓度为 385.96、367.42、383.73 μg·mL⁻¹ 单一对照品贮备液。精密吸取贮备液各适量, 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释制成质量浓度依次为 30.877、22.045、38.373 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液 I; 再精密吸取贮备液各适量, 置同一 200 mL 量瓶中, 加甲醇稀释制成质量浓度依次为 11.579、7.348、15.349 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液 II。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品, 粉碎, 过 3 号筛, 精密称取粉末约 1.0 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)60 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 海风藤和浙海风藤指纹图谱研究

为全面分析、比较海风藤和浙海风藤中各成分组成情况, 首先采用 UHPLC 法对 16 批海风藤和 16 批浙海风藤成分进行分析, 分别建立相应的对照指纹图谱。

2.3.1 精密度试验 取样品(H1)按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 以海风藤酮(11 号峰)为参照峰, 分别计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均<2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取样品(H1)按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 以海风藤酮为参照峰, 分别计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均<3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 样品(H1)按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别在 0、4、8、12、18、24 h 测定, 记录色谱图, 以海风藤酮为参照峰, 分别计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均<3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 对照指纹图谱的建立及相似度评价 将 16 批海风藤和 16 批浙海风藤样品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。将所得色谱数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”软件。分别选取 H1 和 Z1 样品色谱图作为参照图谱, 采用平均数法, 时间窗为 0.1 s, 经多点校正后, 进行色谱图的匹配, 建立海风藤和浙海风藤对照指纹图谱(R), 并标定了 15 个相同共有峰, 结果见图 1。通过与对照品进行 DAD 比对, 指认了其中 3 个色谱峰, 分别为 11 号峰海风藤酮、13 号峰白玉兰亭 B 和 15 号峰风藤奎醇, 并选取了稳定性好、响应值较大的 11 号峰(海风藤酮)作为参照峰。

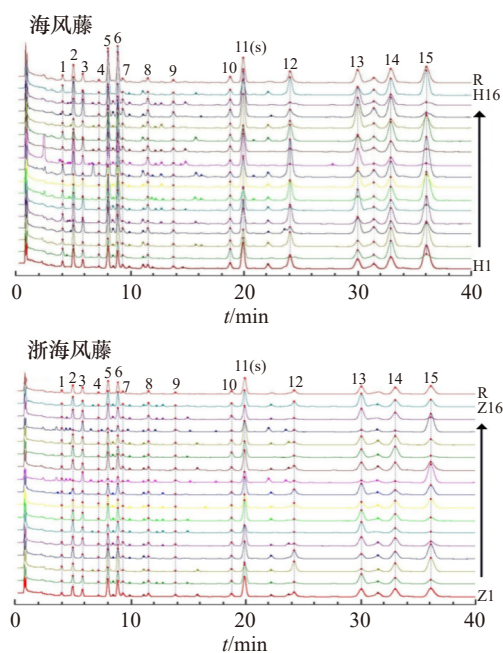


图 1 海风藤与浙海风藤 UHPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱(R)

11-海风藤酮; 13-白玉兰亭 B; 15-风藤奎醇; S-参照峰; 1~10, 14-共有峰; R-对照指纹图谱。

Fig.1 UHPLC superimposed fingerprints and reference fingerprint(R) of *Piperis kadsurae caulis* and *Zhehaifengteng*
11-kadsurenone; 13-denudatin B; 15-futoquinol; S-reference peak; 1~10, 12, 14-common peaks; R-reference fingerprint.

将 16 批海风藤和 16 批浙海风藤图谱分别与

各自对照指纹图谱进行相似度评价，评价结果分别以相似度 a 和相似度 b 表示；同时将 16 批浙海风藤图谱与海风藤对照指纹图谱进行相似度评价，评价结果以相似度 c 表示，见表 2。结果显示相似度 a、相似度 b 组内差异均较大，表明同基源、不同批次样品成分差异明显，差异主要体现在各成分含量上，相似度 c 与相似度 b 组间相对偏差 (RD) 均小于±5.0%，RD 值较小，表明同属植物风藤和山茱萸化学一致性较好。本研究所建立的指纹图谱方法为风藤和山茱萸整体成分组成一致性研究提供数据支持。

表 2 样品指纹图谱相似度评价结果
Tab. 2 Similarity evaluation results of fingerprint of Samples

海风藤		浙海风藤		相似度c
样品编号	相似度a	样品编号	相似度b	
H1	0.958	Z1	0.996	0.984
H2	0.866	Z2	0.945	0.911
H3	0.951	Z3	0.850	0.891
H4	0.958	Z4	0.941	0.949
H5	0.932	Z5	0.954	0.910
H6	0.889	Z6	0.808	0.781
H7	0.902	Z7	0.939	0.901
H8	0.958	Z8	0.981	0.980
H9	0.893	Z9	0.976	0.950
H10	0.811	Z10	0.737	0.712
H11	0.866	Z11	0.990	0.984
H12	0.925	Z12	0.880	0.857
H13	0.921	Z13	0.952	0.911
H14	0.877	Z14	0.739	0.712
H15	0.852	Z15	0.906	0.880
H16	0.949	Z16	0.973	0.957

2.3.5 聚类分析 为进一步探究海风藤和浙海风藤两种不同基源药材的化学一致性，在指纹图谱相似度评价基础上，以 32 批样品各共有峰的峰面积为变量，导入 SPSS 26.0 软件，采用组间联接和平方欧式距离作为分类依据进行系统聚类分析，结果见图 2。当欧氏距离为 15 时，样本被分为 2 类，H9 单独为 1 类，其余 31 个样品聚成 1 大类；当欧氏距离为 10 时，31 个样品随机被分成 2 类。聚类分析结果提示海风藤和浙海风藤无法有效区分，二者存在高度化学一致性，这进一步验证了相似度评价结果。

2.4 海风藤、浙海风藤多成分含量测定

UHPLC 指纹图谱指出 3 个共有峰，均为新

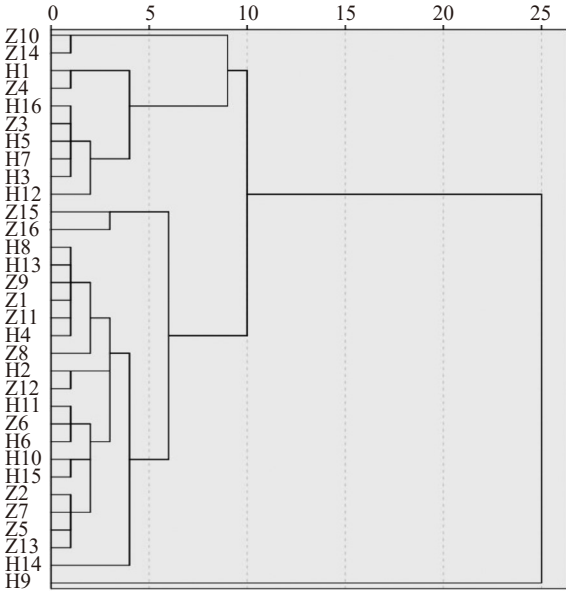


图 2 32 批样品聚类分析结果
Fig. 2 Cluster analysis result of 32 batches of samples

木脂素类成分 (海风藤酮、白玉兰亭 B、风藤奎醇)，由指纹图谱可见，不同样品间成分峰高差异较大。因此，为进一步明确各样品中以新木脂素为代表的主要活性成分的含量差异，本研究采用 UHPLC 法建立了多成分含量测定方法，对所指认的 3 个新木脂素类成分进行含量测定。

2.4.1 系统适用性试验 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 I 及供试品溶液各 4 μL，按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果显示待测目标峰与相邻峰之间分离度良好，分离度均>1.5，理论板数均>10 000。色谱图见图 3。

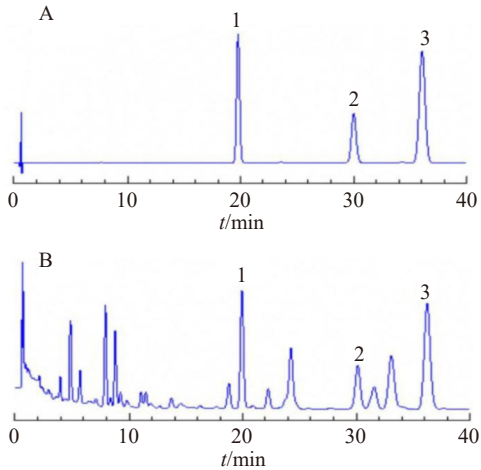


图 3 混合对照品和样品 UHPLC 图
A-混合对照品；B-供试品。1-海风藤酮；2-白玉兰亭 B；3-风藤奎醇。
Fig. 3 UHPLC chromatograms of mixed reference and sample
A-mixed reference; B-sample. 1-kadsurenone; 2-denudatin B; 3-futoquinol.

2.4.2 线性关系、定量限和检测限考察 分别吸取“2.2.1”项下海风藤酮、白玉兰亭 B、风藤奎醇对照品贮备液适量，加甲醇制成 6 份不同浓度的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，以峰面积 (Y) 为纵坐标，质量浓度 (X) 为横坐标，绘制标准曲线，得到各成分的线性回归方程和线性范围， $r \geq 0.999\ 7$ ，表明各成分线性关系良好。取线性范围中最低质量浓度的混合对照品溶液，加甲醇进一步稀释，进样测定，以信噪比 $S/N=10$ 和 $S/N=3$ 时各成分的质量浓度作为定量限和检测限。3 个成分的回归方程、线性范围、定量限和检测限见表 3。

表 3 各成分的线性关系、定量限和检测限
Tab. 3 Linear relationships, limit of quantitation and limit of detection of various components

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
海风藤酮	$Y=35.267X+2.972\ 2$	0.999 8	0.771 9~77.19	0.08	0.03
白玉兰亭 B	$Y=29.303X+0.231\ 1$	0.999 7	0.551 1~55.11	0.55	0.17
风藤奎醇	$Y=47.304X+2.765\ 9$	0.999 8	0.959 3~95.93	0.18	0.05

2.4.3 精密度试验 取同一供试品溶液 (H1)，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录峰面积，结果海风藤酮、白玉兰亭 B、风藤奎醇峰面积的 RSD 分别为 0.16%、0.28%、0.24%，表明仪器精密度良好。

表 4 样品含量测定结果
Tab. 4 Results of content determination of samples

编号	海风藤酮	白玉兰亭 B	风藤奎醇	总量
H1	0.054	0.037	0.070	0.161
H2	0.043	0.031	0.022	0.096
H3	0.035	0.021	0.070	0.126
H4	0.074	0.064	0.037	0.175
H5	0.030	0.022	0.081	0.133
H6	0.049	0.082	0.018	0.149
H7	0.043	0.015	0.085	0.143
H8	0.064	0.064	0.037	0.165
H9	0.038	0.025	0.119	0.182
H10	0.066	0.062	0.007	0.135
H11	0.045	0.064	0.010	0.119
H12	0.032	0.019	0.072	0.123
H13	0.070	0.084	0.037	0.191
H14	0.098	0.071	0.017	0.186
H15	0.070	0.068	0.011	0.149
H16	0.030	0.031	0.071	0.132
$\bar{x} \pm s$	0.053 $\pm$ 0.019	0.048 $\pm$ 0.024	0.048 $\pm$ 0.034	0.148 $\pm$ 0.027

2.4.4 重复性试验 取同一样品 (H1) 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，依据标准曲线计算样品中各成分含量，并计算 RSD。结果海风藤酮、白玉兰亭 B、风藤奎醇的 RSD 分别为 1.92%、2.04%、0.43%，表明该方法有良好的重复性。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品 (H1) 溶液，按“2.1”项下色谱条件，室温下分别于 0、4、8、12、16、24 h 进样测定，记录峰面积。结果海风藤酮、白玉兰亭 B、风藤奎醇的 RSD 分别为 0.50%、0.32%、0.29%，表明供试品溶液室温下 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 (H1) 粉末 0.5g，置具塞锥形瓶中，平行 6 份，精密加入混合对照品溶液 II 25 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算海风藤酮、白玉兰亭 B、风藤奎醇的平均加样回收率分别为 98.65%、98.37%、99.46%，RSD 分别为 2.54%、2.25%、1.93%，表明方法准确度良好。

2.4.7 样品测定 按“2.2.2”项下方法制备各批次供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，依据标准曲线计算 32 批样品中海风藤酮、白玉兰亭 B、风藤奎醇百分含量，并计算 3 个成分总量，结果见表 4。

编号	海风藤酮	白玉兰亭 B	风藤奎醇	总量
Z1	0.073	0.057	0.046	0.176
Z2	0.051	0.036	0.070	0.157
Z3	0.024	0.017	0.071	0.112
Z4	0.063	0.033	0.076	0.172
Z5	0.076	0.062	0.025	0.163
Z6	0.027	0.071	0.005	0.103
Z7	0.076	0.070	0.018	0.164
Z8	0.049	0.042	0.047	0.137
Z9	0.064	0.073	0.051	0.188
Z10	0.042	0.017	0.138	0.197
Z11	0.073	0.055	0.046	0.174
Z12	0.058	0.053	0.010	0.120
Z13	0.086	0.057	0.031	0.174
Z14	0.040	0.012	0.095	0.147
Z15	0.047	0.066	0.011	0.124
Z16	0.058	0.083	0.037	0.178
$\bar{x} \pm s$	0.057 $\pm$ 0.018	0.050 $\pm$ 0.022	0.049 $\pm$ 0.035	0.155 $\pm$ 0.028

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本研究考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲醇-水 3 种不同体系流动相,结果显示,采用甲醇-水体系时,新木脂素类成分出峰时间过长,峰形较差,检测灵敏度低;采用乙腈-水体系时,各成分出峰时间明显缩短,但目标峰与相邻峰之间无法实现基线分离;采用乙腈-甲醇-水体系时,新木脂素类成分出峰时间适中、峰形好、分离效果佳、灵敏度高,故最终选择三元溶剂体系作为流动相。

本研究采用 DAD 检测器在 200~400 nm 内对供试液中各成分进行检测,并着重考察新木脂素类成分的色谱信息。结果显示海风藤酮和白玉兰亭 B 及附近相邻峰均在 235 nm 左右有最大吸收,且该波长处其他成分色谱峰信息最为丰富。因风藤奎醇在样品中含量差异大,为尽可能提高该成分定量检测灵敏度,故将其检测波长设为吸收更大的 215 nm。另外,图谱显示在保留时间 0~2 min 处,在 235 nm 波长下呈现众多响应值远高于目标成分峰的强极性成分色谱峰,显著影响指纹图谱拟合效果,为此将 0~2 min 时的检测波长设置为 380 nm,以降低峰响应。故本研究最终采用在线波长切换方法,设置检测波长为 0~2 min, 380 nm; 2~34 min, 235 nm; 34~40 min, 215 nm。

3.2 提取条件的优化

为最大限度提高海风藤中新木脂素类成分的提取效率,本研究首先比较了 3 个新木脂素成分在不同提取溶剂(甲醇、乙醇)中的提取效果,结果甲醇优于乙醇,故选择甲醇作为提取溶剂。进一步比较了不同提取方式(超声、回流)的提取效果,结果超声与回流提取效果基本一致,考虑到超声提取操作的便捷性,选择了超声提取。比较了不同浓度甲醇(40%、60%、80%、100%)的提取效果,结果 3 个成分提取效果随甲醇浓度的升高而逐渐增大,100% 时最佳,故选择纯甲醇作为提取溶剂。最后比较了不同超声时间(15、30、45、60、75、90 min)对提取效率的影响,结果显示 3 个成分在 60 min 前,含量均随着时间的延长逐渐增大,60 min 后则趋于平缓,故确定提取时间为 60 min。

3.3 含量测定结果分析

由表 4 可见,16 批海风藤和 16 批浙海风藤样品的 3 个新木脂素类成分平均含量($\bar{x}$)及其离散程

度(标准差 s) 均呈现高相似性,且总量均在 0.10%~0.20%,提示二者在活性成分组成及含量上具有较高的一致性。但 s 值总体较大,表明不同批次样品间成分含量差异较大,究其原因除了与原植物生长环境有关外,与生长年份、采收季节(标准规定夏、秋二季采割)、生长形态(攀援或匍匐)等因素存在一定程度的相关性^[15]。

目前,海风藤和浙海风藤现行质量标准中均未收载含量测定项,检验项目存在缺失。自 1985 年 SHEN 等报道了海风藤中海风藤酮作为血小板活化因子特异性受体拮抗剂的分离和表征后^[16],海风藤酮受到广泛关注,并成为海风藤药材中最具代表性的新木脂素类成分和主要药理活性成分。文献[14]所示供试品 HPLC 图目标峰峰形差,分离不佳,本研究得到的 UHPLC 图中海风藤酮峰形佳,与相邻峰之间分离良好。表 4 显示海风藤酮在 3 个新木脂素类成分中总体含量最高,综合分析认为,该成分适宜作为海风藤药材定量指标成分用于质量控制。后续课题组将探索建立简便、快捷、高专属性海风藤酮检测方法,对现有标准进行完善和补充。

3.4 对现行标准的探讨

3.4.1 山茱萸纳入海风藤基源探讨 通过查阅《中药志》、《常用中药材品种整理与质量研究》,并通过市场调查、专家咨询及现场考证,风藤植物资源分布狭窄,药材资源匮乏,市场上销量较少,而同科属习用品山茱萸则分布广,资源广泛。尽管通过横切面显微鉴别可以有效区分 2 种药材,但现行标准收载的显微鉴别为粉末鉴别,该方法无法将海风藤和浙海风藤药材加以区分,因此,市场上实际销售的商品海风藤的主要来源为山茱萸。同时本研究得到的化学及统计学分析结果也均无法将二者予以区分。另外,课题组对 2 种药材和植物原株开展了 PCR 鉴别研究,通过 DNA 条形码和 SSR 分子标记技术对 23 批海风藤、浙海风藤药材及 8 批风藤、山茱萸植物原株进行分子鉴定,结果显示风藤和山茱萸的 psbA-trnH 序列高度一致,也无法对 2 种植物药材进行鉴别^[17]。鉴于我国野生风藤资源紧缺,因此,为扩大资源利用度,课题组后续将在以上研究的基础上,进一步开展 2 种药材药效一致性方面的相关研究,为药典标准中将山茱萸增列为海风藤的植物来源提供更为全面的技术依据。

3.4.2 直径规定合理性探讨 海风藤在中国药典2020年版[性状]项下规定直径为0.3~2 cm,海风藤和浙海风藤在《浙江炮规》2015年版[炮制]项下对于直径要求的描述为除去<1 mm的原药材。由此可见,海风藤直径要求在不同标准中存在差异。本课题组随机抽取海风藤和浙海风藤样品各3批,每批筛选出3种直径(<1 mm、1~3 mm、>3 mm)样品组,分别按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,测定海风藤酮、白玉兰亭B、风藤奎醇含量,结果发现直径<1 mm和1~3 mm样品中3个成分含量均高于直径>3 mm样品,其中直径1~3 mm样品成分含量为最高。分析原因认为直径>3 mm的药材,生长年份较长,茎已老化,部分裂隙化,其化学成分呈现下降趋势。故从海风藤和浙海风藤主要活性成分含量以及资源利用的角度分析,药典对直径的规定存在一定程度的不合理性,建议对药典[性状]项下的直径规定进行修订。

综上所述,本研究采用指纹图谱、多成分定量分析,并结合聚类分析综合评价了海风藤、浙海风藤化学成分组成及含量的相似性,结果显示二者呈现较高的一致性。历版中国药典虽只收载风藤 *P. kadsura* 为海风藤药材正品基源,但实际上其同属植物山茱 *P. hancei* 可能一直是其主流基源,由于二者原药材无法有效区分,导致市售饮片存在着较为突出的基源混乱现象。因此,后续课题组将在化学一致性评价的基础上,进一步开展药效一致性评价研究,为有效扩大药用基源,解决风藤野生资源匮乏现状提供实验依据。针对不同产地、不同批次样品存在的明显质量差异,有必要从标准层面进行规范,对现行质量标准进行提高,对现有收载项目进行修订和完善,增补定量指标并制定合理限度,有效提高临床用药的可靠性和量效性。

致谢:感谢浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师在药材鉴定方面提供的帮助。

REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[S]. 2020: 306.
- [2] 浙江省中药炮制规范[S]. 2015: 327.
- [3] CHEN T, XU H, SHI Q, et al. Network pharmacological study of *Piperis kadsurae caulis* in treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2020, 31(2): 192-198.
- [4] ZHOU J L, SU D X, LI X Z, et al. Research progress on analgesic effect of *Piper* genus native to Yunnan Province[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2022, 40(12): 255-258.
- [5] MENG J, WANG L, ZHUANG Y X, et al. Herbal textual research on *Piperis Kadsurae Caulis* in famous classical formulas[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2023, 29(8): 93-102.
- [6] DIAO X B, WANG H Y, CHAI F Y, et al. Quality analysis of decoction pieces of *Piperis Kadsurae Caulis*[J]. *Food Drug*(食品与药品), 2021, 23(4): 366-370.
- [7] 李吉莹. 中药海风藤的生药学研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2007.
- [8] 宋敬丽, 袁林, 刘艳菊, 等. 海风藤化学成分和药理作用的研究进展[J]. *湖北中医学院学报*, 2007, 9(3): 70-72.
- [9] LEI H P, CHEN X Q, QIAO C F, et al. Chemical constituents from twigs of *Piper hancei*[J]. *J Chin Med Mater*, 2014, 37(1): 69-71.
- [10] XIN H X. Separation and analysis of chemical components *Piper kadsura* based on supercritical fluid chromatography[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2018.
- [11] YANG F. Studies on the chemical constituents of *Piper hancei* and their bioactivities[D]. Guangxi: Guangxi Normal University, 2017.
- [12] KIM K H, CHOI J W, HA S K, et al. Neolignans from *Piper kadsura* and their anti-neuroinflammatory activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(1): 409-412.
- [13] LIU Y J, WANG G Z, GU C Y. Study on HPLC fingerprints of *Piper kadsura* from different habitats[J]. *China Pharm*(中国药师), 2009, 12(11): 1525-1527.
- [14] XIE C, LI L, DUAN S T, et al. Determination of kadsurenone in caulis *Piper kadsura* by HPLC[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2010, 22(6): 1077-1080.
- [15] LI N. Quality Evaluation and pharmacodynamics of *Piper kadsura* (Choisy) Ohwi in Fujian province[D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2014.
- [16] SHEN T Y, HWANG S B, CHANG M N, et al. The isolation and characterization of kadsurenone from Haifenteng (*Piper futokadsura*) as an orally active specific receptor antagonist of platelet-activating factor[J]. *Int J Tissue React*, 1985, 7(5): 339-343.
- [17] YAN Z Y, XIA Y Y, CUI J, et al. Identification of *Piper kadsura* and *Piper hancei* based on DNA barcode and SSR technology[J]. *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践), 2023, 37(2): 23-27.

收稿日期: 2023-12-19
(本文责编: 蔡珊珊)