

鸡血藤干、鲜品黄酮部位的高效液相指纹图谱比较

李小莹, 周龙颖珍, 赖丽嫦, 陈丰连*

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立鸡血藤黄酮部位的 HPLC 指纹图谱,通过比较同一产地鸡血藤干、鲜品药材的指纹图谱,考察两者化学成分种类和含量上的差异。方法:采用高效液相色谱法, Diamonsil® C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.2% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,检测时间 80 min。结果:分别建立了干、鲜鸡血藤黄酮部位的 HPLC 指纹图谱共有模式,标定了 11 个共有指纹峰,并指认了 4 个共有峰,发现干、鲜品在成分和含量上均有差异。结论:该方法简便、准确,具有良好的重复性,可为鸡血藤化学成分深入研究及其加工利用提供科学依据。

[关键词] 鸡血藤干鲜品; 黄酮部位; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0072-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200072

Comparison of HPLC Fingerprint of Flavonoid in Dry and Fresh Spatholobi Caulis LI Xiao-ying, ZHOU Long-ying-zhen, LAI Li-chang, CHEN Feng-lian* (School of Chinese Materia Medica Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of flavonoid in Spatholobi Caulis, and observe the difference in chemical compositions and content between dry and fresh Spatholobi Caulis from the same origin by comparing the fingerprint of them. **Method:** HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil® C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile -0.2% phosphoric acid water solution as eluent gradient at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 280 nm. The detection time was 80 min. **Result:** The common mode of HPLC fingerprint of flavonoid in dry and fresh Spatholobi Caulis was set up respectively. There were 11 common peaks in the fingerprint of dry and fresh herbs. Four of them were recognized. **Conclusion:** The method is simple, accurate and has a good repeatability. It can provide scientific basis for processing and utilization of Spatholobi Caulis.

[Key words] dry and fresh Spatholobi Caulis; flavanoid; fingerprint

鸡血藤具有补血、活血、通络之效,常用于月经不调、血虚萎黄等^[1],其活性成分主要有黄酮、萜类等^[2-3]。某些药材的干、鲜品在化学成分和功效方面有差异。目前,对于干鲜品成分的比较研究越来越多^[4-6]。孟江等^[5]研究三白草科 5 种成分,发现干鱼腥草中,其含量明显低于鲜品。Hossain 等^[7]分析唇形科植物干、鲜品的抗氧化活性,鲜薄荷科植物具有最强的抑制亚油酸的过氧化作用,其中柠檬香酯和类胡萝卜素的含量比干品高。Li 等^[8]研究丹参根收获后干燥过程丹酚酸 B 含量变化,结果发现

丹酚酸 B 少量存在新鲜丹参中。在 50~160 °C 干燥过程中,丹酚酸 B 含量变化曲线呈倒 V 形,并且 130 °C 干燥 40 min 后含量达最大值。有些药材成分在干制过程中,出现黄酮成分的流失^[9-10]。本实验通过建立鸡血藤干品、鲜品黄酮部位的 HPLC 指纹图谱的测定方法,比较鸡血藤干、鲜品黄酮成分的差异,可为鸡血藤化学成分深入研究及其加工利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20A 系列高效液相色谱仪(配自动

[收稿日期] 20141125(010)

[基金项目] 广州中医药大学薪火计划项目(A1-AFD015142Z13);广东省科技计划项目(2012B091202024,2012B040500032)

[第一作者] 李小莹,在读硕士,从事中药质量评价与开发研究,Tel:020-39356210,E-mail:xiaoyinglee@yeah.net

[通讯作者] *陈丰连,博士,副教授,从事中药资源开发与质量研究,Tel:020-39358081,E-mail:chenfenglian@21cn.com

进样器,恒温箱,检测器,脱气机,日本岛津公司),FA-1004型精密电子分析天平(南京精密科学有限公司)。

1.2 试药 磷酸(AR),乙腈、甲醇(Ocean PAK),聚酰胺(60~100目,浙江省台州厂家)。儿茶素(批号121210),表儿茶素(批号121120),染料木素(批号131105),芒柄花素(批号130601)对照品均购自成都普菲德生物技术有限公司,纯度 $\geq 98\%$ 。

鸡血藤药材采于广东省梅州市平远县鸡血藤GAP生产基地,S1~S6为干品,S7~S12为鲜品。经广州中医药大学中药学院刘军民教授鉴定为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* 的藤茎,保存于广州中医药大学中药分析实验室。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取儿茶素,表儿茶素,染料木素,芒柄花素对照品适量,精密称定,加甲醇制成各含50,50,25,20 mg·L⁻¹的混合对照品溶液,即得。

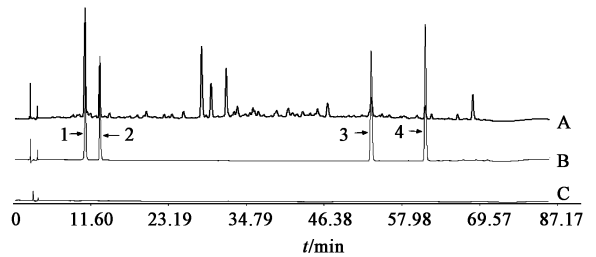
2.2 供试品溶液的制备 取鸡血藤干、鲜品粉末约5 g(过60目筛),精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%乙醇60 mL,超声(220 W,55 kHz)处理2次,每次25 min,滤过,合并滤液,回收乙醇,浓缩至干,残渣加10%乙醇10 mL使溶解,过聚酰胺柱(5.0 g,内径2 cm,湿法装柱),用5 BV蒸馏水洗脱除杂后,11 BV乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,浓缩至干,残渣加甲醇溶解并定容至5 mL,摇匀,即得。

2.3 色谱条件 Diamonsil® C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温25℃,检测波长280 nm,进样量20 μL。梯度洗脱(0~5 min,10%~17% A;5~10 min,17%~18% A;10~18 min,18%~19% A;18~30 min,19%~25% A;30~40 min,25%~28% A;40~65 min,28%~47% A)。见图1。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度试验 取同一份混合对照品溶液,按2.3项色谱条件连续进样5次,记录色谱图。结果对照品相对峰面积和相对保留时间的RSD均<3%,表明仪器精密密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批鸡血藤粉末共5份,分别制备供试品溶液,进样分析,记录色谱图。结果各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均<5%,表明方法重复性良好。



1. 儿茶素;2. 表儿茶素;3. 染料木素;4. 芒柄花素;A. 鸡血藤供试品;B. 对照品;C. 空白

图1 鸡血藤 HPLC

Fig.1 HPLC fingerprints of *Spatholobi Caulis*

2.4.3 稳定性试验 取同一份鸡血藤供试品溶液分别在0,2,6,14,24 h进样分析。测得各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均<3%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5 鸡血藤干、鲜品 HPLC 指纹图谱测定 取各批鸡血藤样品,按2.2项下方法制备成供试品溶液,记录色谱图。图谱导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A版,得出鸡血藤干、鲜品 HPLC 指纹图谱,见图2,3;各批鸡血藤共有峰峰面积见表1,2。

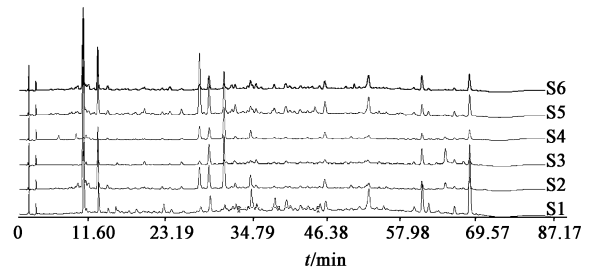


图2 6批鸡血藤干品黄酮部位指纹谱

Fig.2 Fingerprint of flavonoid in 6 batches of dry *Spatholobi Caulis*

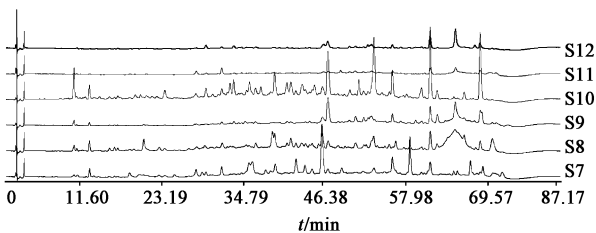


图3 6批鸡血藤鲜品黄酮部位指纹谱

Fig.3 Fingerprint of flavonoid in 6 batches of fresh *Spatholobi Caulis*

3 分析与讨论

3.1 鸡血藤干、鲜品 HPLC 指纹图谱共有模式比较 各批药材图谱导入分析软件后,得出鸡血藤干、鲜品 HPLC 指纹图谱共有模式,见图4,5。选其稳

表 1 6 批鸡血藤干品黄酮部位共有峰峰面积

Table 1 Peak area of common peaks in 6 batches of dry *Spatholobi Caulis*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6
1	697 462	1 317 525	150 964	37 422	957 157	824 529
2	276 240	537 793	122 396	14 055	385 300	372 721
3	189 456	277 405	48 960	168 317	774 956	88 645
4	196 428	292 903	245 648	157 424	360 760	163 338
5	104 542	602 086	44 559	394 053	509 101	100 422
6	81 736	65 989	47 590	36 722	147 357	71 210
7	233 552	137 649	69 211	104 262	190 606	111 119
8	514 610	73 795	44 167	44 328	303 018	257 985
9(S)	352 859	106 673	200 598	77 178	148 352	185 918
10	15 650	100 548	296 527	40 815	18 058	9 497
11	867 664	159 171	88 275	123 117	278 412	212 658

表 2 6 批鸡血藤鲜品黄酮部位共有峰峰面积

Table 2 Peak area of common peaks in 6 batches of fresh *Spatholobi Caulis*

峰号	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	14 156	33 354	28 176	172 841	5 154	6 075
2	39 400	47 911	16 386	70 584	5 591	23 158
3	58 628	22 610	8 883	44 047	25 248	6 075
4	27 290	27 549	1 315	64 773	6 524	23 158
5	60 531	50 883	16 978	80 527	39 722	9 472
6	5 245	15 630	17 765	114 180	4 502	17 101
7	40 692	67 822	221 655	373 809	8 452	62 918
8	51 538	102 963	14 269	687 517	15 889	21 199
9(S)	101 752	141 293	133 631	477 593	46 852	92 035
10	29 734	809 510	404 667	13 306	53 511	170 460
11	27 764	69 295	91 255	452 720	23 054	45 472

定、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰。鸡血藤干、鲜品图谱共有峰分别 17, 16 个, 其中 1 ~ 11 号峰在干鲜品中均存在。Y1 ~ Y6 是鸡血藤干品特征峰, N1 ~ N5 为鸡血藤鲜品特征峰。通过与对照品对照, 指认了其中 4 个色谱峰, 即 1 号峰为儿茶素, 2 号峰为表儿茶素, 8 号峰为染料木素, 9 号峰为芒柄花素。

鸡血藤黄酮部位在保留时间 80 min 后基本无色谱峰, 将样品 HPLC 指纹图谱划分为两个区域: 0 ~ 35 min 为①区, 35 ~ 80 min 为②区。鸡血藤干品共有模式在①区内峰数较多, 而②区峰数较少。其中, ①区共有峰 11 个, ②区共有峰 6 个; 鸡血藤鲜品在①区峰数较少, 而②区内出现较多的峰。其中, ①

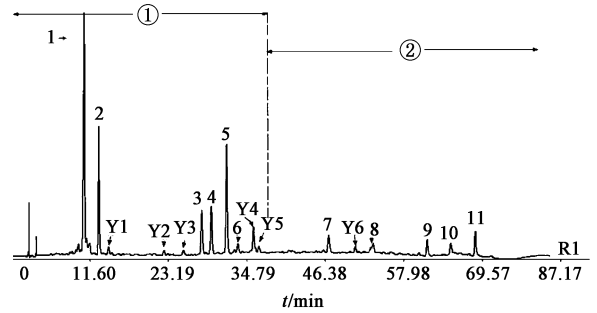


图 4 鸡血藤干品 HPLC 指纹谱共有模式

Fig. 4 Common mode of HPLC fingerprint of dry *Spatholobi Caulis*

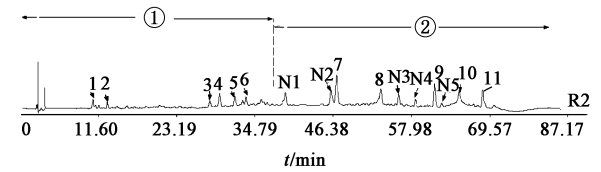


图 5 鸡血藤鲜品 HPLC 指纹谱共有模式

Fig. 5 Common mode of HPLC fingerprint of fresh *Spatholobi Caulis*

区共有峰 6 个, ②区共有峰 10 个, 干、鲜品在成分种类上有差别。

3.2 鸡血藤干、鲜品 HPLC 指纹图谱共有峰相对含量比较 比较各批鸡血藤干鲜品的共有峰峰面积, 可以看出鸡血藤干品 1 ~ 5, 11 号峰高于鲜品, 10 号峰成分含量低于鲜品。说明干鲜品共有峰的含量存在差异。

在鸡血藤干、鲜品指纹图谱共有模式中, 以芒柄花素(9 号峰)为基准峰, 计算鸡血藤干、鲜品共有峰的相对峰面积, 结果见表 3。

表 3 鸡血藤 HPLC 指纹图谱共有模式共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks on the HPLC fingerprint of in *Spatholobi Caulis*

峰号	干品	鲜品
1	3.72	0.26
2	1.59	0.18
3	1.27	0.17
4	1.32	0.12
5	1.64	0.26
6	0.34	0.17
7	0.79	0.78
8	1.16	0.86
9(S)	1.00	1.00
10	0.45	1.45
11	1.61	0.71

从表 3 看出干品 1~5, 11 号峰相对峰面积较鲜品的大, 说明干品中这 6 个共有峰的相对含量较高; 鲜品中 10 号峰相对峰面积较干品中的大, 说明鲜品中该成分的相对含量较高。6~8 号峰相对峰面积差值在 2 倍之内, 说明干鲜品中这些成分含量变化不大。由此可看出鸡血藤鲜品在晒干过程中, 其某些化学成分的含量发生变化。

通过水分测定, 得知鸡血藤鲜品含水量为 50%, 鸡血藤鲜品取样时, 计算其相对于等量干品的质量进行实验; 在预实验中, 鸡血藤 80% 乙醇进样后色谱难分离, 本实验采用聚酰胺树脂吸附、乙醇洗脱的方法, 富集所得的鸡血藤总黄酮, 达到较好的分离效果。

4 小结

刘屏等^[11]研究鸡血藤中提取的 9 个单体化合物对骨髓抑制小鼠造血祖细胞增殖的影响, 发现儿茶素、没食子儿茶素、丁香酸、表儿茶素的含药血清对 CFU-E, BFU-E 和 CFU-Meg 的刺激增殖作用与对照组比较, 有显著性差异。其中儿茶素的刺激增殖活性相对最强, 可能是鸡血藤补血活血的主要物质基础。因此, 检测鸡血藤干、鲜品中主要活性成分的含量是否发生变化, 具有实际的指导作用。

鸡血藤干品容易保存, 但结果显示, 鸡血藤鲜品在晒干过程中, 由于温度、水分等条件变化, 引起部分化学成分含量的改变。本实验确证鸡血藤干品中, 儿茶素和表儿茶素相对含量较鲜品高, 从而为鸡血藤的临床应用提供科学依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京: 中国医药科技出版社, 2010: 180.

- [2] 徐任生. 天然产物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 526-571.
- [3] 张夏辉. 鸡血藤中黄酮类化合物提取及抗氧化性的研究[D]. 南宁: 广西科技大学, 2013.
- [4] 林丽, 晋玲, 李应东, 等. 当归干、鲜品中游离阿魏酸和总阿魏酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 94-97.
- [5] 吴怡, 李国信, 尤献民, 等. 射干及鸢尾属植物鲜品干品的异黄酮成分变化及含量比较[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(2): 317-318.
- [6] 孟江, 董晓萍, 姜志宏, 等. 鲜鱼腥草的黄酮类化合物研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(16): 1335-1338.
- [7] Hossain M B, Barry Ryan C, Martin Diana A B, et al. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs[J]. Food Chem, 2010, 123(1): 85-88.
- [8] Li X B, Wang W, Zhou G J, et al. Production of salvianolic acid B in roots of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) during the post-harvest drying process[J]. Molecules, 2012, 17(3): 2388-2407.
- [9] Diaz M M, Perez C M, Cabezudo M. Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.) [J]. Eur Food Res Technol, 2002, 21(5): 227-230.
- [10] 王宝华, 高增平, 江佩芬, 等. 鲜泡桐花与阴干泡桐花化学成分的对比较研究[J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(3): 56-57.
- [11] 刘屏, 王东晓, 陈桂芸, 等. 鸡血藤单体化合物对造血祖细胞增殖的调控作用研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(6): 741-745.

[责任编辑 顾雪竹]