

## 见血青 HPLC 指纹图谱研究

赵颖<sup>1\*</sup>, 胡少南<sup>1</sup>, 宋丹<sup>2</sup>, 王昌华<sup>3</sup>, 郑一敏<sup>1</sup>, 胥秀英<sup>1</sup>

(1. 重庆理工大学 药学与生物工程学院, 重庆 400054;

2. 重庆市药品技术审评认证中心, 重庆 400014; 3. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

**[摘要]** 目的:建立见血青药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,为科学评价及控制见血青质量提供依据。方法:采用 HPLC 法,色谱条件为 Welchrom-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.2% 三乙胺水溶液(10% 磷酸水溶液调 pH 2.5)进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 254 nm,柱温 30 ℃。建立 10 个不同产地见血青指纹图谱,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件进行相似度评价,并采用 SPSS 19.0 统计软件进行聚类分析。结果:从指纹图谱中标定了 28 个共有峰,并指认了其中 6 个共有峰(3 个生物碱,3 个黄酮),经相似度评价,10 个产地中有 8 个产地的见血青与共有模式图谱比较相似度均在 0.9 以上,整体相似度好,聚类分析结果与相似度评价结果基本一致。而广东梅县和四川雅安两产地药材的相似度仅为 0.173 和 0.320,这些差异可能是因气候条件、地域差异、采收季节的不同所致。结论:该方法灵敏度高、重复性好,简单可靠,可用于见血青药材的质量评价与控制。

**[关键词]** 见血青; 高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度评价; 聚类分析

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0065-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070065

## Fingerprints of *Liparis nervosa* by HPLC

ZHAO Ying<sup>1\*</sup>, HU Shao-nan<sup>1</sup>, SONG Dan<sup>2</sup>, WANG Chang-hua<sup>3</sup>, ZHENG Yi-min<sup>1</sup>, XU Xiu-ying<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

2. Chongqing Technical Center for Drug Evaluation & Certification, Chongqing 400014, China;

3. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish HPLC fingerprints of *Liparis nervosa* and provide the basis for scientific evaluation and quality control of *L. nervosa*. **Method:** HPLC method was used on Welchrom-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) chromatographic column, with Acetonitrile-0.2% triethylamine solution (10% phosphoric acid solution, pH adjusted to 2.5) as gradient elution. The wavelength was detected as 254 nm; the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the column temperature was 30 ℃. The HPLC fingerprints were established for the *L. nervosa* from 10 different origins. At the same time, the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (2004A version) was applied for similarity evaluation. Besides, cluster analysis was done by using SPSS 19.0 software. **Result:** Twenty-eight common peaks were calibrated from the HPLC fingerprints of *L. nervosa*, six of which were identified by reference substances (3 alkaloids and 3 flavonoids). In the similarity evaluation, *L. nervosa* from 8 of 10 origins had a similarity ratio of more than 0.9 when compared with the mutual mode HPLC fingerprints. The overall similarity was good, and the cluster analysis result was basically the same as the similarity evaluation result. However, the similarity ratio of the materials from Mei county in Guangdong was only 0.173 and that of Ya'an in Sichuan was 0.320. These differences may be caused due to weather conditions, regional differences and different harvest seasons. **Conclusion:** This method is highly sensitive, reproducible, simple and

**[收稿日期]** 20151113(014)

**[基金项目]** 重庆市教委科学技术研究项目(KJ110802);重庆理工大学科研启动基金项目(2010ZD07)

**[通讯作者]** \* 赵颖,博士,副教授,从事中药新药研究,Tel:13996490562,E-mail:zhy@cqut.edu.cn

reliable, and can be used for quality control of *L. nervosa*.

[Key words] *Liparis nervosa*; HPLC; fingerprint; similarity evaluation; cluster analysis

兰科植物中有很多药用价值很高,如“救命仙草”石斛、“息风,定惊”的天麻等药材,见血青也是其中之一。见血青为兰科 Orchidaceae 羊耳蒜属脉羊耳兰 *Liparis nervosa* 的全草,功效凉血止血、清热解毒,主要用于治疗肺热咳嗽、疮疡肿毒、毒蛇咬伤及各类出血证<sup>[1]</sup>,在民间已有广泛运用,在我国主要分布于江西、湖南、福建、台湾、广东、广西、云南等地区,多为野生资源,由于环境污染和人为破坏的原因,现已属于濒危植物,分布范围在逐渐缩小,对这类中草药应进行科学保护、合理利用。目前对见血青的研究尚不全面和系统,主要集中在化学成分和药效研究两方面,已有文献报道的化学成分包括生物碱类<sup>[2-3]</sup>、神经酸<sup>[4]</sup>,已证实的药效有止血、抗氧化和抑菌作用<sup>[5-6]</sup>,尚缺乏对见血青药材的质量控制和评价方法。在前期研究中,本课题组已经完成了见血青止血作用的机制研究<sup>[7]</sup>、化学成分系统分离(共分离鉴定 20 种单体成分,主要为黄酮类、生物碱类和三萜类成分<sup>[8-10]</sup>,其中黄酮和三萜类为首次分离得到)及 2 种黄酮类成分含量测定等工作。为进一步合理利用和保护性开发见血青药材资源,结合分离鉴定的化学成分,本文拟采用高效液相色谱(HPLC)法对收集的川渝黔湘粤四省一市 10 批不同产地见血青进行指纹图谱研究,为今后见血青药材的人工栽培、全面评价和控制见血青的质量提供科学依据。

### 1 仪器与材料

Waters 1500 Series 高效液相色谱仪(美国沃特世公司),Delta 320 型 pH 计(Mettler-Toledo 仪器公司),电热鼓风干燥箱(重庆银河试验仪器有限公司),H-1650 型离心机(湖南湘仪仪器有限公司),METTLER AE200S 型电子天平(美国梅特勒-托利多仪器有限公司),KQ-50B 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

当药黄素,芹菜素-8-*C*- $\alpha$ -*L*-阿拉伯糖苷,芹菜素-6-8-二-*C*- $\alpha$ -*L*-阿拉伯糖苷,脉羊耳兰碱 B, (hexahydro-1H-pyrrolizin-1-yl) methyl-3-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-5-(3-methylbut-2-en-1-yl) benzoate, nervosine VI 均由实验室制备,采用峰面积归一化法计算,纯度均大于 95%,其中,芹菜素-8-*C*- $\alpha$ -*L*-阿拉伯糖苷和芹菜素-6-8-二-*C*- $\alpha$ -*L*-阿拉伯糖苷纯度大于 98%;乙腈为色谱纯(安徽时联特种溶剂股份有

限公司),其余试剂均为分析纯。

见血青药材课题组采收或购买信息见表 1,经重庆市中药研究院王昌华副研究员鉴定为兰科植物脉羊耳兰 *L. nervosa*,各产地药材鲜品采集或购买后 60 °C 烘干,除去杂质,备用。

表 1 样品来源及采集时间

Table 1 Sources and collection time of samples

No.	药材产地	收集时间	收集方式
S1	贵州惠水	2011-07	采收
S2	四川成都	2010-09	购买
S3	四川石棉	2011-09	采收
S4	湖南桑植	2011-09	采收
S5	四川阿坝	2011-08	采收
S6	四川乐山	2011-08	采收
S7	广东梅县	2011-10	购买
S8	四川雅安	2011-08	购买
S9	重庆巫溪	2011-05	采收
S10	贵州遵义	2011-07	购买

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Welchrom-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.2% 三乙胺水溶液(10% 磷酸水溶液调 pH 2.5)(B),梯度洗脱,0 ~ 40 min, 87% ~ 84% B; 40 ~ 42 min, 84% ~ 81% B; 42 ~ 87 min, 81% ~ 71% B; 87 ~ 102 min, 71% ~ 60% B; 102 ~ 135 min, 60% ~ 55% B; 135 ~ 140 min, 55% ~ 45% B; 140 ~ 150 min, 45% ~ 35% B; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量 20 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 取当药黄素,芹菜素-8-*C*- $\alpha$ -*L*-阿拉伯糖苷,芹菜素-6-8-二-*C*- $\alpha$ -*L*-阿拉伯糖苷,脉羊耳兰碱 B, (hexahydro-1H-pyrrolizin-1-yl) methyl-3-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-5-(3-methylbut-2-en-1-yl) benzoate, nervosine VI 适量,精密称定,甲醇溶解定容,得到质量浓度分别为 0.24, 0.28, 0.22, 0.24, 0.22, 0.24 g · L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取不同产地见血青药材全草,粉碎,过 40 目筛。于 60 °C 恒温干燥箱中干燥 2 h,放凉,取药材粉末 10 g,精密称定,置于平底烧瓶,精密加入甲醇 100 mL,称重,置 80 °C 水浴回流提取 2 h,再称重,用甲醇补足失重,摇匀,10 000

$r \cdot \text{min}^{-1}$  离心后,过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

#### 2.4 方法学考查

**2.4.1 精密度试验** 取同批见血青药材(S2)1份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,并且按 2.1 项下色谱条件重复进样 5 次,各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别为  $0.2\% \sim 0.6\%$ ,  $0.4\% \sim 2.9\%$ ,符合指纹图谱要求。

**2.4.2 稳定性试验** 取同 1 份供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 按 2.1 项下色谱条件进样,记录指纹图谱。结果表明,各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别为  $0.1\% \sim 1.1\%$ ,  $0.1\% \sim 1.8\%$ ,说明样品在 24 h 内稳定。

**2.4.3 重复性试验** 取同批见血青药材(S2)5 份,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,并且按 2.1 项下色谱条件进样,结果表明,各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别为  $0.1\% \sim 1\%$ ,  $0.4\% \sim 1.8\%$ ,说明方法重复性良好。

**2.4.4 见血青指纹图谱数据处理** 分别取不同产地的 10 批见血青药材,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,并且按 2.1 项下色谱条件进行测定,得到不同产地 10 批见血青药材指纹图谱,见图 1。采集 10 批见血青药材的 HPLC 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系统 2004A 版”软件(以下简称相似度评价系统 A 版),采用中位数法生成见血青药材指纹图谱的共有模式,见图 2,得到共有峰 28 个,以 13 号峰为参照峰(保留时间和峰面积为 1),分别求出各峰的相对保留时间和相对峰面积。以部分从药材中分离得到的已鉴定名称和化学结构式的单体化合物作为对照品指认了 6 个峰:1 号峰为当药黄素,保留时间为 39.373 min;2 号峰为芹菜素-8-C- $\alpha$ -L 阿拉伯糖苷,保留时间为 41.109 min;3 号峰为芹菜素-6-8-二-C- $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷,保留时间为 43.789 min;23 号峰为脉羊耳兰碱 B,保留时间为 94.902 min;27 号峰为(hexahydro-1H-pyrrolizin-1-yl) methyl-3-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-5-(3-methylbut-2-en-1-yl) benzoate,保留时间为 113.846 min;28 号峰为 nervosine VI,保留时间为 128.951 min。

**2.5 不同产地 10 批见血青药材的相似度分析** 采用相似度评价系统 A 版对不同产地 10 批见血青药材指纹图谱进行数据处理,进行相似度评价,各不同产地见血青药材与对照指纹图谱的相似度见表 2。不同产地的 10 批药材指纹图谱中主要峰群的整体

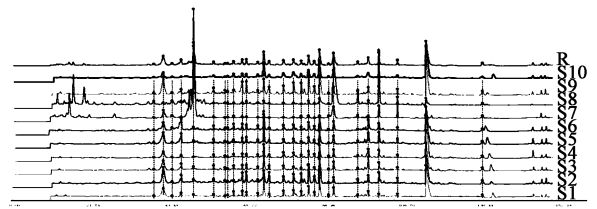


图 1 不同产地 10 批见血青药材指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 10 batches of *Liparis nervosa* from different origins

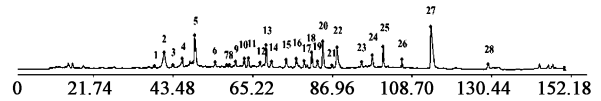


图 2 不同产地 10 批见血青药材共有模式的对照指纹谱

Fig. 2 Mutual mode HPLC fingerprint of 10 batches of *Liparis nervosa* from different origins

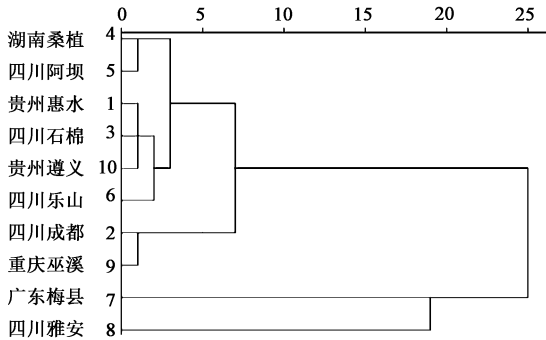
图貌基本一致,其中,贵州惠水、四川成都、四川石棉、湖南桑植、四川阿坝、四川乐山、重庆巫溪和贵州遵义这 8 个产地的见血青药材与共有模式图谱比较相似度均在 0.9 以上,差异较小。广东梅县和四川雅安药材与共有模式图谱比较相似度仅为 0.173 和 0.320,证明不同产地的见血青药材具有一定的差异性。相同色谱条件下,广东梅县和四川雅安两产地 1~5 号峰的峰面积要远大于其他产地,说明两产地见血青中黄酮类含量为 10 个产地中最大。但是广东梅县和四川雅安产见血青 23~28 号峰积分峰面积为 10 个产地中最小,说明两产地见血青中生物碱类含量为 10 个产地中最少。从总体来看,广东梅县和四川雅安产见血青药材生物碱和黄酮苷这两大类成分总含量都明显区别于其他产地,这些差异可能是因气候条件、地域差异、采收季节的不同所致。

**2.6 不同产地 10 批见血青药材的聚类分析** 将 10 个不同产地药材的 HPLC 图谱中的 28 个共有峰相对峰面积值数据为对照模版,输入 SPSS 19.0 数据统计软件中,选用组间联接法,利用欧式距离作为样品的测度进行聚类,聚类结果见图 3。从树状聚类图中看到,在一级聚类中,将广东梅县和四川雅安产药材聚为 1 组(相似度分别为 0.175, 0.318),其他产地药材聚为 1 组(相似度在 0.911~0.965)。结合色谱图观察,此两产地主含 5 号峰成分,其峰面积要远大于其他产地,而其余峰峰面积整体小于其他产地,因此聚为一类,此与相似度计算结果也是一致的。在二级聚类中,主要将剩余 8 产地中的四川成都与重庆巫溪产药材聚为 1 组(相似度分别为 0.913, 0.911),其他 6 产地聚为 1 组,结合色谱图观

表 2 不同产地 10 批见血青药材 HPLC 指纹图谱共有峰的相似度

Table 2 Common peaks similarity of HPLC fingerprints for 10 batches of *Liparis nervosa* from different origins

产地	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	相似度
S1	1										0.965
S2	0.916	1									0.913
S3	0.914	0.880	1								0.929
S4	0.949	0.861	0.884	1							0.964
S5	0.923	0.883	0.911	0.937	1						0.960
S6	0.916	0.868	0.896	0.902	0.906	1					0.942
S7	0.139	0.150	0.206	0.108	0.152	0.146	1				0.175
S8	0.251	0.229	0.303	0.228	0.282	0.281	0.587	1			0.318
S9	0.903	0.958	0.847	0.854	0.879	0.882	0.136	0.212	1		0.911
S10	0.962	0.895	0.882	0.954	0.916	0.904	0.102	0.226	0.898	1	0.961



左侧 1~10 为 10 批见血青样品编号

图 3 10 批见血青样品聚类分析树形

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis for 10 batches of *Liparis nervosa*

察,此两产地所含成分虽然整体风貌与其余 6 个产地相差不大,但是 28 个共有峰峰面积整体大于其他产地,从 6 个指认成分来看结果亦是如此。所以在此 8 产地药材中,重庆巫溪与四川成都产药材品质为最好,由于 5 号峰成分未知,所以品质无法与四川雅安和广东梅县产药材做出比较。在三、四级聚类中,因各成分的微小差距,而将湖南桑植与四川阿坝、四川乐山、剩余 3 个产地聚为三类,这与相似度计算结果也是一致的。从聚类分析树状图的整体来看,四川产见血青药材遍布 4 个级别的聚类,即有主含 5 号峰成分的四川雅安,也有药材品质比较好的四川成都,在三四级聚类中四川产药材各自被聚成不同的类别,推测此与四川省面积较大,不同产地气候条件、地域差异较大有关。指纹图谱聚类分析结果与相似度评价结果基本一致。

### 3 讨论

考察了不同色谱柱,在同一色谱条件下, Welchrom-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 的基线最平

稳,分离度最好,故选其为本实验色谱柱。

对流动相系统进行筛选,结果发现乙腈-0.2% 三乙胺水(10% 磷酸水溶液调 pH 2.5) 分离效果最好,基线最平稳,可较好的改善生物碱类成分的拖尾现象,故选定此系统为见血青药材指纹图谱检测的流动相。

见血青醇提物成分主要包括生物碱类和黄酮苷类等成分,用紫外分光光度计测定供试品溶液的最大吸收波长为 220, 254 nm。分别对 220, 254, 270, 285, 325 nm 处进行考察<sup>[11-12]</sup>。结果发现在 254 nm 下色谱峰信息最多,且各个色谱峰的响应值相当,所以选择检测波长为 254 nm。

分别考察了回流、索氏提取和超声 3 种提取方法,从 HPLC 主要峰的积分面积优选出回流提取作为提取方法。

分别以不同浓度的甲醇、乙醇和丙酮为提取溶剂进行考察<sup>[13-14]</sup>。从 HPLC 图谱分析选择甲醇作为提取溶剂。

分别对料液比为 1:8, 1:10, 1:12, 1:15 进行考察。料液比从 1:10 之后,随着提取溶剂的增加,对于主要峰峰面积几乎无影响,故选择 1:10 为最佳料液比。

分别对提取时间和提取次数进行考察。其主要峰积分峰面积总值回流提取 2, 3 h 要大于回流 1 h, 但回流 3 h 主要峰峰面积总值和回流 2 h 相差无几,且提取次数对各主要色谱峰的影响不大,最终选择回流提取 2 h, 提取 1 次。

比较 10 个不同产地见血青药材的 HPLC 指纹图谱,相似度和聚类分析结果基本一致。从各特征峰的紫外吸收光谱发现,1, 2, 3, 4, 5 号峰均出现黄

酮类化合物特征吸收,且紫外吸收一致,推测为黄酮类化合物。23,24,25,26,27,28 号峰紫外吸收一致,推断为脉羊耳兰生物碱类成分。在见血青药材中,黄酮和生物碱类化合物可作为见血青的一个重要鉴别和质量评价手段,对于见血青药材的品质评价以及化学系统学方面的研究均具有一定的意义。本课题组从见血青药材(购买于四川成都荷花池药材市场)分离鉴定的 3 个黄酮类成分和 3 个生物碱类成分(还有 2 个生物碱结构待确定)均在指纹图谱中进行了指认,其余成分多数为三萜和三萜苷类成分,在 254 nm 检测波长下基本没有紫外吸收。指纹图谱中峰面积较大的 5 号峰由于在成都的见血青药材中含量较低,未分离得到。因此,下一步工作尚需采集更多产地的样本,进行归类、比较,并进一步研究其化学成分与药理、药效来综合评价药材品质。

#### 4 结论

本研究建立了见血青药材的 HPLC 指纹图谱分析方法,标定 28 个共有峰,并指认了其中的 6 个共有峰,能够较好地反映见血青药材中化学成分的特征;并运用相似度计算软件与聚类分析系统 2 种不同的数据统计软件同时评价共有模式的可行性,较直观地反映了不同产地的见血青化学成分类型及其组成的差异,为有效控制和较全面评价见血青药材质量提供了可靠的方法。

#### [参考文献]

[1] 王旭红,余国奠. 中国兰科药用植物[J]. 中国野生植物资源,1993,11(4):15-22.  
[2] Nishikawa K, Hirata Y. Chemotaxonomical alkaloid studies I. structure of nervosine[J]. Tetrahedron Lett, 1967,27(5):2591-2596.  
[3] Nishikawa K, Miyamara M, Hirata Y. Chemo-

taxonomical alkaloid studies structures of *Liparis alkaloids* [J]. Tetrahedron Lett, 1969, 25 ( 13 ): 2723-2741.

[4] Huang S, Pan M F, Zhou X L, et al. Five new nervogenic acid derivatives from *Liparis nervosa* [J]. Chin Chem Lett,2013,24(8):734-736.  
[5] 董艳芳,李伟阳,叶睿超,等. 见血青总生物碱的抑菌活性和抗氧化性研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2010,47(3):669-673.  
[6] 董艳芳,陈法志,郭彩霞,等. 见血青多糖的抑菌活性与抗氧化性[J]. 湖北农业科学,2012,51(12):2570-2573.  
[7] 赵颖,胡少南,王昌华,等. 见血青提取物止血作用的实验研究[J]. 中国药房,2013,24(31):2884-2886.  
[8] 赵颖,胡少南,王昌华,等. 见血青化学成分研究[J]. 中草药,2013,44(21):2955-2959.  
[9] 赵颖,胡少南,王昌华,等. 兰科药用植物见血青乙酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):111-113.  
[10] 赵颖,郑一敏,胥秀英,等. 脉羊耳兰提取物单体化合物、制备方法及其应用[P]. 中国专利,103214447B,2014-12-03.  
[11] 丁亚平,邢少青,张成森,等. 不同品种荷叶 HPLC 指纹图谱研究[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(12):41-44.  
[12] 杨立芳,李小燕,尹显洪. 中药吴茱萸中生物碱类成分的 HPLC 指纹图谱 [J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(10):631-635.  
[13] 王祝枝,王晓华,朱玉,等. 不同产地瓜蒌皮药材中槲皮素及总黄酮含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(19):86-89.  
[14] 赵祥军,程丹红,赵艳玲,等. 左金丸不同提取方法的比较研究[J]. 中草药,2011,42(6):1105-1108.

[责任编辑 邹晓翠]