

# 鸡血藤 UPLC 指纹图谱及模式识别研究

刘静<sup>1,2</sup>, 苏建春<sup>1</sup>, 甘林建<sup>1</sup>, 尹蓉莉<sup>1\*</sup>, 李化<sup>2\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 建立鸡血藤药材 UPLC 指纹图谱方法。方法: 采用 UPLC-DAD 检测, 以甲醇-0.1% 甲酸为流动相, 进行梯度洗脱。色谱柱为 Aquity BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C, 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>。采用聚类分析和主成分分析对 18 批鸡血藤指纹图谱进行模式识别研究。结果: 筛选出 10 批样品建立了鸡血藤指纹图谱的共有模式。结论: 该方法为鸡血藤药材的质量控制提供了一种快速、简便和全面的评价方法。

**[关键词]** 鸡血藤; 指纹图谱; 超高效液相色谱; 聚类分析; 主成分分析

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0087-04

**[doi]** 10.11653/syjf2014040087

## UPLC Fingerprint Analysis and Pattern Recognition of *Spatholobus suberectus*

LIU Jing<sup>1,2</sup>, SU Jian-chun<sup>1</sup>, GAN Lin-jian<sup>1</sup>, YIN Rong-li<sup>1\*</sup>, LI Hua<sup>2\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the fingerprint of *Spatholobus suberectus* by UPLC. **Method:** The UPLC-DAD method was performed on Aquity BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) column with the gradient mobile phase of methanol (A) and 0.1% formic acid (B) solution at flow rate of 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 280 nm. The column temperature was 30 °C. Eighteen samples from various places were analyzed. Clusters analysis and principal component analysis (PCA) were applied to study the chemical pattern recognition of UPLC fingerprints. **Result:** Ten samples were selected to establish the common pattern of *S. suberectus*. **Conclusion:** The method provides a fast, simple and comprehensive method for the quality control of *S. suberectus*.

**[Key words]** *Spatholobus suberectus*; fingerprint; UPLC; cluster analysis; principal component analysis (PCA)

鸡血藤为豆科植物密花豆的干燥藤茎, 具有补

血、活血、通络的功效, 用于治疗月经不调、血虚萎黄等症<sup>[1]</sup>。鸡血藤的主要成分是黄酮类成分, 如儿茶素、表儿茶素等<sup>[2-4]</sup>。现代研究表明, 儿茶素和表儿茶素具有激活造血系统、降血脂、抗动脉粥样硬化等生理活性, 是鸡血藤补血活血的主要物质基础<sup>[5-6]</sup>。

鸡血藤分布区域主要集中在广西、广东, 四川和云南也有零星分布。作为鸡血藤用的植物达 26 种, 分属于 6 科 12 属, 代用品种多, 来源复杂, 导致鸡血藤市售品种的混乱<sup>[7]</sup>。目前文献中鸡血藤指纹图谱研究主要是采用 HPLC<sup>[8-10]</sup>, 但该法运行时间一般在 60 min 以上, 耗时较长, 且溶剂消耗较大。超高

**[收稿日期]** 20130828(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81202903); 中国中医科学院自主选题研究项目(Z55)

**[第一作者]** 刘静, 硕士研究生, 从事中药新制剂研究, Tel: 010-64014411-2848, E-mail: liujing\_anny@126.com

**[通讯作者]** \*尹蓉莉, 硕士, 博士生导师, 从事中药新制剂研究, Tel: 028-68289191, E-mail: yinronglili@163.com

\*李化, 博士, 助理研究员, 从事药物的质量研究与控制, Tel: 010-64014411-2848, E-mail: lihua621@hotmail.com

效液相色谱(UPLC)与传统的 HPLC 技术相比,能获得更高的分离度、灵敏度和速度。本实验对 18 批不同产地鸡血藤开展了 UPLC 指纹图谱研究,结合相似度评价、主成分分析和聚类分析,建立合理可靠的鸡血藤药材指纹图谱共有模式,进而评价了不同产地鸡血藤药材的质量。

### 1 仪器与试剂

Waters Alliance 2695 型高效液相色谱仪(2695 四元梯度泵,2996 PDA 检测器,真空脱气机,自动进样器,柱温箱,Empower II 色谱工作站),Waters ACQUITY H-Class UPLCTM 型超高效液相色谱仪(四元高压梯度泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器,Empower II 色谱工作站),SPS202F 型奥豪斯电子天平(梅特勒-托利多称重设备系统有限公司),KQ5200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),EYELA N-1100 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),Milli-Q 型超纯水制备仪(法国 Millipore 公司)。

原儿茶酸购自中国食品药品检定研究院、儿茶素和表儿茶素购自 Sigma 公司。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,超纯水由 Milli-Q 纯水机制备。

本试验收集了 18 批不同产地鸡血藤药材,药材来源见表 1。经成都中医药大学药学院卢先明教授鉴定为密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的根。

表 1 鸡血藤药材来源

No.	药材来源	No.	药材来源	No.	药材来源
S1	江西	S7	广东惠州	S13	广东广州
S2	四川成都	S8	广东惠州	S14	广东广州
S3	四川成都	S9	云南	S15	广东广州
S4	四川成都	S10	广西桂林	S16	广东广州
S5	广东惠州	S11	广西桂林	S17	广东广州
S6	广东惠州	S12	广西玉林	S18	广西

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Aquity BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相 A 为甲醇,B 为 0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱(0 ~ 3 min, 5% A; 3 ~ 20 min, 5% ~ 15% A),检测波长 280 nm,柱温 30 °C,流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 1 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别取原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素等对照品适量,置 2 mL 量瓶中,加甲醇溶解,定容至刻度,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 取样品粉末(过 40 目筛)1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入 50% 甲

醇 30 mL,称重,放置 30 min 后,超声提取 1 h,放冷,补足减失质量,摇匀,滤过。滤液减压浓缩至干,残渣用 15 mL 超纯水溶解,以乙酸乙酯萃取 4 次,每次 15 mL,合并乙酸乙酯层,减压浓缩至干,用 50% 甲醇溶解,转移至 5 mL 棕色量瓶中,定容至刻度。0.22 μm 微孔滤膜滤过即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取同一供试品溶液(S10),连续进样 6 次,结果显示,各共有峰峰相对保留时间 RSD 均 < 1.6%,相对峰面积 RSD 均 < 2.6%,说明各主要色谱峰的保留时间和峰面积基本一致,符合指纹图谱的检测要求。

**2.4.2 重复性试验** 取同一批药材(S10)粉末 6 份,按照 2.3 项下方法制备成供试品溶液,测定,各共有色谱峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.6%,相对峰面积的 RSD 均 < 3.4%,重复性较好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液(S10),室温放置,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24 h 测定,各共有色谱峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.3%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.5 样品测定** 取不同产地鸡血藤样品(S1 ~ S18),按 2.3 项下方法制备成供试品溶液,进样量为 1 μL,记录 UPLC 色谱图。共获得 18 个共有峰,通过对照品指认,其中共有峰的 3 号、8 号、15 号峰分别为原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素。对照品和鸡血藤药材代表性 UPLC 图(图 1)。

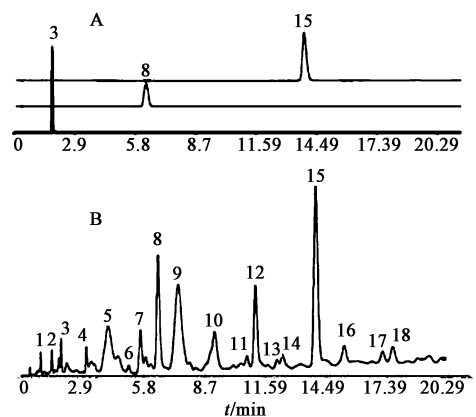


图 1 对照品(A)和鸡血藤药材(B)UPLC

### 3 数据分析

**3.1 参照峰的选择** 8 号色谱峰(儿茶素)在各批次样品图谱中均能检测到,分离度较好,且保留时间适中,故以其为参照峰,计算相对保留时间和相对峰面积。

**3.2 主成分分析** 各鸡血藤样品经过上述实验方法获得色谱数据,以相对保留时间定位,以对应的峰面积积分值作为数据源,形成 18 个样本的数据矩阵。对数据矩阵进行主成分分析(PCA)后,分别以其第一、第二、第三主成分建立坐标系,进行投影即可得到所有样本的 3D 投影图和平面图(图 2,3)。结合图 2,3,将 S5, S6, S7, S9, S10, S11, S12, S15, S16, S18 号样品选作备选样品。与样品色谱图进行比较,发现排除的样品在 5, 8, 9, 12, 15, 16 号峰这 6 个主要共有峰含量与其他样品差异较大。

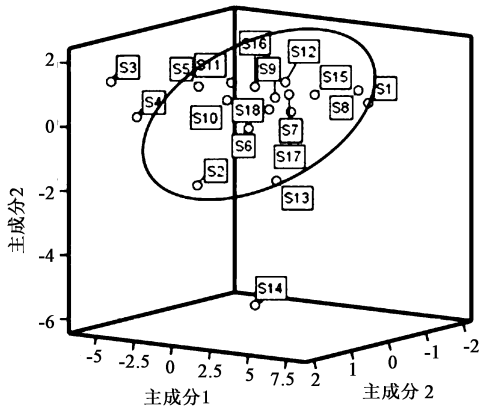


图 2 主成分分析 3D 投影

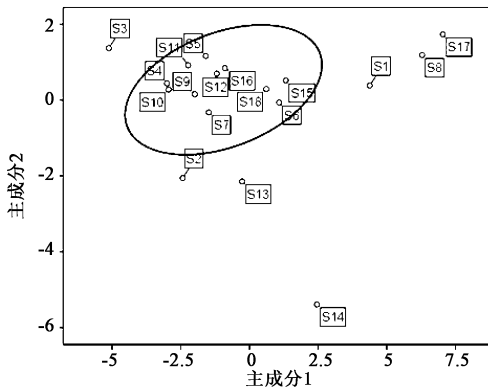


图 3 主成分分析平面投影

**3.3 系统聚类分析** 以相对保留时间定位,以对应的峰面积积分值作为数据源,对 18 批样品进行系统聚类分析,采用组间距离法 (between-groups linkage)、欧式距离的平方 (squared euclidean distance) 作为测量的距离变量,聚类分析将鸡血藤样品分为 4 类(图 4)。

**3.4 鸡血藤药材标准指纹图谱的建立** 经上述分析,参考主成分分析和系统聚类分析结果,确定 10 批投影距离较近的鸡血藤药材建立药材的标准指纹图谱。10 批鸡血藤样品的编号为 S5, S6, S7, S9, S10, S11, S12, S15, S16, S18。将上述 10 批样品色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A

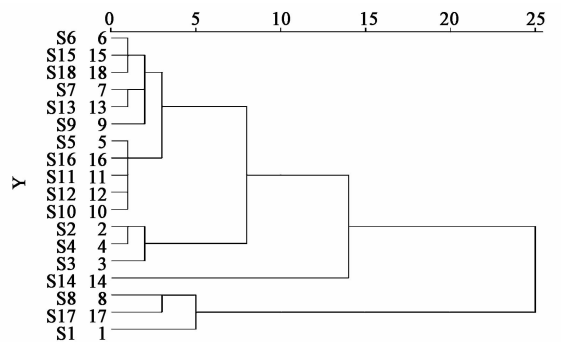


图 4 聚类分析

版》软件,以第 S5 批药材色谱图做为参照谱,进行匹配,确定了 18 个共有峰,生成药材的色谱指纹图谱共有模式(图 5),并进行了相似度评价,各批药材相似度见表 2。结果表明 10 批药材与对照图谱比较,相似度均 > 0.966,可为鸡血藤药材的质量评价提供科学依据。

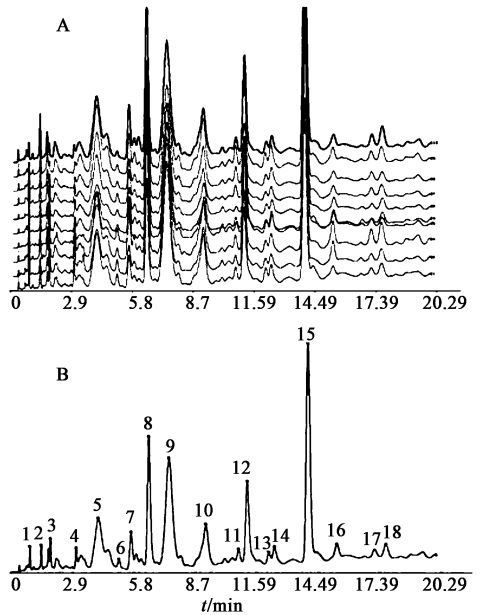


图 5 10 批鸡血藤药材 UPLC 指纹图谱叠加(A) 和对照指纹图谱(B)

#### 4 讨论

考察了甲醇、乙醇、乙酸乙酯、50% 甲醇、50% 乙醇等提取溶剂,比较了超声、回流、冷浸等提取方法,又对不同提取时间(30, 60, 90 min)进行筛选,确定以 50% 甲醇超声 60 min,样品中色谱峰信息最为丰富,灵敏度较高。

比较了甲醇-甲酸水体系和乙腈-甲酸水体系,当甲醇-甲酸水体系进行梯度洗脱,样品出峰较多,分离效果较好。

分别对 260, 280 nm 检测波长进行考察,结果表明在 280 nm 色谱峰信息量最大,灵敏度高,基线较

表 2 鸡血藤药材 UPLC 指纹图谱相似度计算

样品	S5	S6	S7	S9	S10	S11	S12	S15	S16	S18
S5	1	0.982	0.977	0.92	0.97	0.963	0.972	0.976	0.993	0.982
S6	0.982	1	0.98	0.961	0.979	0.993	0.987	0.994	0.983	0.993
S7	0.977	0.98	1	0.971	0.994	0.975	0.988	0.982	0.982	0.965
S9	0.92	0.961	0.971	1	0.976	0.974	0.978	0.965	0.927	0.934
S10	0.97	0.979	0.994	0.976	1	0.971	0.987	0.975	0.972	0.96
S11	0.963	0.993	0.975	0.974	0.971	1	0.988	0.994	0.971	0.983
S12	0.972	0.987	0.988	0.978	0.987	0.988	1	0.99	0.978	0.977
S15	0.976	0.994	0.982	0.965	0.975	0.994	0.99	1	0.982	0.988
S16	0.993	0.983	0.982	0.927	0.972	0.971	0.978	0.982	1	0.984
S18	0.982	0.993	0.965	0.934	0.96	0.983	0.977	0.988	0.984	1
对照指纹图谱	0.986	0.994	0.991	0.966	0.987	0.99	0.995	0.994	0.989	0.988

平稳,因此选定 280 nm 为测定波长。

对样品的 HPLC 指纹图谱进行了初步探讨,发现流动相为甲醇-50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠 (pH 2.85) 进行梯度洗脱,流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 40 °C,检测波长 280 nm,进样量 20 μL,HPLC 分析的运行时间需要 50 min,共有峰数目较少,只有 10 个,且灵敏度低,因此选择 UPLC 方法进行鸡血藤的指纹图谱研究。

聚类分析和 PCA 分析的结果表明,不同产地鸡血藤药材成分组成基本一致,但成分含量存在差异,其原因与产地、采收期、贮存方法有关,有待进一步探讨。

[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] 崔艳君,刘屏,陈若芸. 鸡血藤有效成分研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(2):121.

[3] 郑岩,王邠,王京丽,等. 高效液相测定不同产地鸡血

藤药材中黄酮类化合物的含量[J]. 中国中药杂志, 2008,33(15):1920.

[4] 刘超,马林,陈若芸,等. 反相高效液相色谱法测定鸡血藤中儿茶素类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2005,30(18):1433.

[5] 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]. 中国药理通报, 2007,23(6):741.

[6] 毛伟峰,李宁. 茶对心血管疾病预防作用的研究进展[J]. 国外医学:卫生学分册,2005,32(4):227.

[7] 郑立雄,丁艳芬,杨崇仁. 鸡血藤的品种与考证[J]. 中国现代中药,2012,14(2):22.

[8] 严启新,李萍. 鸡血藤高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药,2004,35(5):556.

[9] 丁平,仰铁锤,林振坤,等. 鸡血藤化学成分的指纹图谱研究[J]. 华西药学杂志,2010,25(4):461.

[10] 王宏,刘艺娜,曾祖平,等. 鸡血藤抗肿瘤活性部位 SSCE 指纹图谱的研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(18):2525.

[责任编辑 顾雪竹]