

# 大血藤药材的 UPLC 指纹图谱分析

徐锋, 杨焯, 舒秋娥, 王远敏, 王祥培\*

(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

**[摘要]** 目的: 研究大血藤药材的 UPLC 指纹图谱。方法: 采用色谱法, Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 洗脱系统 0.05% 乙酸水-甲醇梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C。测定 10 批大血藤、2 批鸡血藤及 1 批五香血藤的指纹图谱。结果: 建立了大血藤药材 UPLC 指纹图谱分析方法, 确立了 19 个共有峰, 指认了 4 个峰。10 批大血藤药材相似度 > 0.837, 大血藤与混淆品 (鸡血藤和五香血藤) 的指纹图谱具有明显差异。结论: 建立的方法快速、准确、重复性好, 为评价和控制大血藤药材的质量提供参考。

**[关键词]** 大血藤; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 鉴别

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0108-04

**[doi]** 10.11653/syfyj2013120108

## UPLC Fingerprint Analysis of *Sargentodoxa cuneata*

XU Feng, YANG Ye, SHU Qiu-e, WANG Yuan-min, WANG Xiang-pei\*

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC fingerprint method of *Sargentodoxa cuneata*. **Method:** Chromatography was carried out on a Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) with gradient eluting system of 0.05% acetic acid water-methanol at a flow rate of 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength was 280 nm, column temperature was at 35 °C. Ten batches of *S. cuneata*, two batches of *S. suberectus* and a batch of *Schisandra sphenunthera* were determined for similarity comparison. **Result:** UPLC fingerprint analysis method of *S. cuneata* was established, there were 19 common peaks, four of them were identified. Similarity of 10 batches *S. cuneata* was more than 0.837, and fingerprint of *S. cuneata* had a significant difference to *S. suberectus* and *S. sphenunthera*. **Conclusion:** This method was rapid, accurate and reproducible, it could provide a reference for quality evaluation and control of *S. cuneata*.

**[Key words]** *Sargentodoxa cuneata*; UPLC; fingerprint; identify

大血藤具有清热解毒、活血、祛风等作用, 常用于肠痈腹痛, 经闭痛经, 风湿痹痛, 跌扑肿痛等

症<sup>[1-2]</sup>。研究表明其还具有抗肿瘤和抑制细菌等活性<sup>[3-4]</sup>。大血藤在使用过程中, 由于来源和使用习惯的原因, 常与鸡血藤、五香血藤等混淆<sup>[5-6]</sup>, 且化学组分复杂<sup>[7-8]</sup>, 现有的形态鉴别<sup>[5]</sup>、单成分定量<sup>[9]</sup>等方法不能对大血藤药材的品种及质量进行较为完整的评价。而中药指纹图谱技术能标示药材特征的共有峰图谱, 借以辨别真伪、评价原料药材、半成品及成品质量的均一性和稳定性<sup>[10-12]</sup>。UPLC 相对于 HPLC 具有更好的分离效率、峰容量及灵敏度<sup>[13]</sup>。因此, 本实验建立了大血藤药材的 UPLC 指纹图谱分析方法, 为高效、快速地评价大血藤药材的质量提供参考。

**[收稿日期]** 20130109(024)

**[基金项目]** 贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(黔省专合字[2011]60号)

**[第一作者]** 徐锋, 在读硕士, 从事中药、民族药的品种鉴定与质量控制研究, Tel: 18286036768, E-mail: 810230331@qq.com

**[通讯作者]** \*王祥培, 博士, 教授, 从事中药及民族药品种品质与资源开发研究, Tel: 13809494182, E-mail: wxp0123@126.com

## 1 材料

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

原儿茶酸、红景天苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 20120301,20120106),芦荟大黄素、大黄酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110795-200504,0757-200206),甲醇、乙腈为色

谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。大血藤、鸡血藤及五香血藤经贵阳中医学院王祥培教授鉴定分别为木通科植物大血藤 *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils. 的干燥藤茎、豆科植物鸡血藤 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎和五味子科植物华中五味子 *Schisandra sphenunthera* Rehd. et Wils. 的干燥藤茎,药材来源见表 1。

表 1 大血藤及其易混淆品药材的来源和相似度

| No. | 样品   | 药材来源          | 收集时间    | 相似度   |
|-----|------|---------------|---------|-------|
| S1  | 大血藤  | 四川 成都 杏林大药房   | 2012-07 | 0.962 |
| S2  | 大血藤  | 贵州 贵阳 花果园药材市场 | 2012-08 | 0.846 |
| S3  | 大血藤  | 贵州 贵阳 芝林大药房   | 2012-07 | 0.837 |
| S4  | 大血藤  | 贵州 贵阳 同济堂药房   | 2012-07 | 0.932 |
| S5  | 大血藤  | 贵州 贵阳 同仁堂药房   | 2012-07 | 0.965 |
| S6  | 大血藤  | 河北 保定 安国药材市场  | 2012-03 | 0.968 |
| S7  | 大血藤  | 湖南 长沙 青苹果健康药房 | 2012-06 | 0.842 |
| S8  | 大血藤  | 河南 郑州 千禧大药房   | 2012-08 | 0.935 |
| S9  | 大血藤  | 河南 郑州 张仲景大药房  | 2012-08 | 0.918 |
| S10 | 大血藤  | 四川 成都 太极大药房   | 2012-07 | 0.916 |
| S11 | 鸡血藤  | 四川 成都 杏林大药房   | 2012-07 | 0.433 |
| S12 | 鸡血藤  | 四川 成都 太极大药房   | 2012-07 | 0.528 |
| S13 | 鸡血藤  | 云南 大理 一心堂药房   | 2012-01 | 0.451 |
| S14 | 五香血藤 | 贵州 贵阳 万东桥药材市场 | 2012-07 | 0.097 |

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 采用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相甲醇(A)-0.05% 乙酸水溶液(B)梯度洗脱(0~2 min,5%~15% A;2~7 min,15%~20% A;7~11 min,20%~25% A;11~12 min,25%~30% A;12~13 min,30%~35% A;13~15 min,35%~40% A;15~17 min,40%~45% A;17~20 min,40%~60% A;20~22 min,60%~80% A;22~24 min,100% A),流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm,柱温 35 ℃,进样量 1.5 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 取各对照品适量,精密称定,用甲醇配制成红景天苷、芦荟大黄素、原儿茶酸和大黄酸质量浓度分别为 46.7, 28.9, 66.7, 43.8 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液,备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 精确称取样品粉末 1.0 g,置圆底烧瓶中,加入 50% 乙醇 50 mL,加热回流 1.5 h,滤过,药渣加 50% 乙醇 50 mL 回流提取 1.5 h,滤过,合并滤液。滤液置蒸发皿中挥干,残渣加

甲醇溶解并定容至 100 mL,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取大血藤供试品(S1)溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,结果发现各共有峰与参比峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取大血藤药材(S1)6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样分析,记录色谱图,测得各共有峰与参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明该方法重复性良好,符合指纹图谱要求。

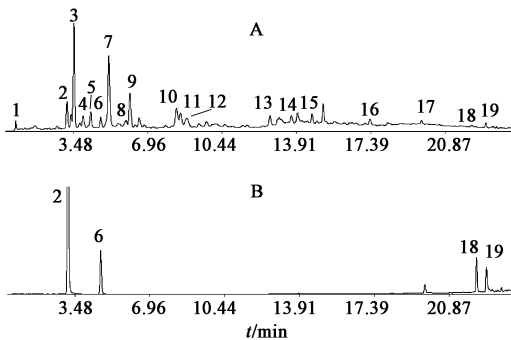
**2.4.3 稳定性试验** 取大血藤供试品(S1)溶液,按 2.1 项下方法分别在 0,3,6,9,12 h 进样测定,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

### 2.5 指纹图谱分析

**2.5.1 大血藤指纹图谱相似度评价** 将收集于贵州、四川、河南、河北、湖南的 10 批大血藤药材与 4

批易混淆品的图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版相似度软件,进行相似度的评价,结果见表 1。

**2.5.2 大血藤共有峰的确立** 以红景天苷的色谱峰(6 号峰)作为参照峰 S,对 10 批大血藤药材的指纹图谱进行考察,共确立了 19 个共有峰,指认了其中 4 个共有峰,分别为原儿茶酸(2 号峰)、红景天苷(6 号峰)、芦荟大黄素(18 号峰)和大黄酸(19 号峰),见图 1。



2. 原儿茶酸;6. 红景天苷;18. 芦荟大黄素;19. 大黄酸

图 1 大血藤(A)与混合对照品(B)的 UPLC

**2.5.3 指纹图谱比较** 建立大血藤与鸡血藤和五

香血藤的指纹图谱,结果可直观发现,大血藤与鸡血藤、五香血藤的指纹图谱明显不同,其特征峰数目、相对保留时间、积分值都有差异,见图 2,表 2,3。

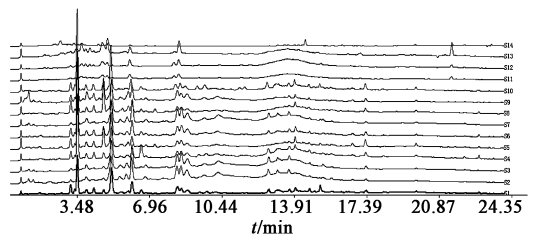


图 2 大血藤与其混淆品的 UPLC 比较

### 3 讨论

通过 Agilent DAD 多通道波长检测,结果表明 280 nm 检测波长信息量丰富,特征峰较明显,故选择 280 nm 为检测波长。考察了不同体积流量(0.1, 0.2, 0.3 mL·min<sup>-1</sup>)对色谱峰分离度的影响,发现 0.3 mL·min<sup>-1</sup>分离度良好,压力适中。考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙酸水和乙腈-乙酸水等流动相系统,结果发现采用甲醇-乙酸水流动相系统,各峰的分离度较好,且基线平稳,有利于指纹图谱的分析。

选择提取溶剂时,曾比较甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇等,结果发现 50% 乙醇提取的样品色谱峰

表 2 大血藤与其混淆品 UPLC 共有峰的相对保留时间

| 共有峰  | S1      | S2      | S3      | S4      | S5      | S6      | S7      | S8      | S9      | S10     | S11     | S12     | S13     |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1    | 0.251 0 | 0.244 0 | 0.246 2 | 0.251 8 | 0.248 9 | 0.252 6 | 0.246 7 | 0.249 7 | 0.245 5 | 0.252 6 | 0.247 4 | 0.245 3 | 0.240 3 |
| 2    | 0.668 8 | 0.670 4 | 0.670 3 | 0.669 2 | 0.668 8 | 0.669 5 | 0.670 0 | 0.669 4 | 0.668 2 | 0.671 7 | -       | -       | 0.675 2 |
| 3    | 0.736 1 | 0.736 4 | 0.735 9 | 0.736 4 | 0.736 1 | 0.736 6 | 0.736 0 | 0.736 2 | 0.734 9 | 0.736 8 | 0.732 3 | 0.733 4 | 0.732 5 |
| 4    | 0.826 0 | 0.826 9 | 0.825 9 | 0.824 8 | 0.825 5 | 0.826 0 | 0.826 3 | 0.826 8 | 0.830 4 | 0.825 2 | -       | 0.850 7 | -       |
| 5    | 0.901 3 | 0.901 3 | 0.901 2 | 0.900 7 | 0.901 0 | 0.901 0 | 0.898 6 | 0.900 2 | 0.905 5 | 0.900 7 | 0.900 7 | 0.909 9 | 0.908 4 |
| 6(S) | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 |
| 7    | 1.078 3 | 1.078 2 | 1.077 4 | 1.079 4 | 1.077 2 | 1.076 6 | 1.077 2 | 1.078 2 | 1.075 6 | 1.077 6 | 1.100 2 | -       | -       |
| 8    | 1.286 1 | 1.286 0 | 1.286 0 | 1.286 1 | 1.286 4 | 1.286 9 | 1.285 8 | 1.286 3 | 1.284 2 | 1.281 1 | 1.278 1 | 1.281 7 | -       |
| 9    | 1.427 2 | 1.425 1 | 1.425 1 | 1.425 5 | 1.427 8 | 1.427 2 | 1.424 5 | 1.426 9 | 1.422 9 | 1.421 7 | -       | 1.425 1 | 1.426 3 |
| 10   | 1.782 7 | 1.783 9 | 1.783 9 | 1.780 5 | 1.783 9 | 1.786 3 | 1.781 6 | 1.783 1 | 1.779 2 | 1.780 8 | -       | -       | -       |
| 11   | 1.843 8 | 1.845 0 | 1.839 5 | 1.844 1 | 1.846 0 | 1.841 8 | 1.843 6 | 1.839 0 | 1.833 9 | 1.845 0 | -       | -       | -       |
| 12   | 2.871 7 | 2.871 7 | 2.871 7 | 2.872 3 | 2.875 5 | 2.864 2 | 2.869 5 | 2.865 1 | 2.882 5 | 2.886 8 | 2.871 0 | 2.874 2 | 2.872 1 |
| 13   | 3.073 5 | 3.080 7 | 3.080 7 | 3.072 9 | 3.075 1 | 3.078 5 | 3.072 8 | 3.070 4 | 3.067 8 | 3.087 9 | -       | -       | -       |
| 14   | 3.642 7 | 3.647 6 | 3.647 6 | 3.642 1 | 3.645 0 | 3.647 7 | 3.639 1 | 3.641 0 | 3.637 8 | 3.660 1 | -       | -       | -       |
| 15   | 4.148 0 | 4.155 4 | 4.155 4 | 4.149 5 | 4.157 4 | 4.156 7 | 4.146 2 | 4.152 0 | 4.147 7 | 4.174 0 | -       | -       | -       |
| 16   | 4.639 6 | 4.645 9 | 4.645 9 | 4.636 4 | 4.645 6 | 4.646 8 | 4.634 9 | 4.645 1 | 4.636 5 | 4.670 5 | 4.695 0 | 4.643 6 | -       |
| 17   | 4.885 0 | 4.893 6 | 4.893 6 | 4.887 6 | 4.897 5 | 4.895 0 | 4.882 9 | 4.890 7 | 4.883 9 | 4.920 1 | -       | 4.955 5 | 4.894 3 |
| 18   | 5.464 1 | 5.465 9 | 5.467 6 | 5.462 7 | 5.468 4 | 5.783 2 | 5.461 5 | 5.463 6 | 5.463 3 | 5.462 5 | -       | -       | -       |
| 19   | 5.756 8 | 5.755 6 | 5.756 3 | 5.753 6 | 5.756 2 | 5.756 2 | 5.752 4 | 5.752 9 | 5.752 6 | 5.756 7 | -       | -       | -       |

表3 大血藤药材与其混淆品 UPLC 共有峰的相对峰面积

| 共有峰  | S1      | S2      | S3      | S4      | S5      | S6      | S7      | S8      | S9      | S10     | S11     | S12     | S13     |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1    | 0.185 1 | 0.320 3 | 1.557 6 | 1.236 2 | 0.574 2 | 0.957 3 | 0.585 1 | 1.208 2 | 0.561 9 | 0.470 9 | 5.198 3 | 1.874 8 | 3.785 7 |
| 2    | 0.277 2 | 0.042 5 | 2.314 1 | 1.319 4 | 0.077 2 | 0.191 3 | 0.108 5 | 1.025 3 | 0.113 5 | 2.400 8 | -       | -       | 0.135 2 |
| 3    | 0.743 3 | 1.444 8 | 1.161 6 | 1.111 7 | 1.175 7 | 1.490 6 | 1.225 6 | 0.838 5 | 1.596 7 | 0.697 5 | 1.892 1 | 1.605 2 | 2.370 1 |
| 4    | 0.816 0 | 5.552 5 | 5.182 3 | 3.980 7 | 9.627 1 | 7.166 5 | 9.672 9 | 3.932 2 | 6.349 9 | 4.733 0 | -       | 1.311 7 | -       |
| 5    | 0.916 5 | 0.777 8 | 3.918 4 | 2.657 2 | 0.849 4 | 1.003 1 | 0.958 3 | 3.239 5 | 0.803 5 | 1.270 6 | 2.134 3 | 1.867 0 | 2.734 9 |
| 6(S) | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 |
| 7    | 1.108 0 | 0.576 1 | 1.040 1 | 1.673 7 | 0.892 6 | 3.086 8 | 1.234 0 | 1.179 3 | 3.967 1 | 2.256 3 | 8.259 7 | -       | -       |
| 8    | 1.199 4 | 5.193 9 | 15.6170 | 17.3750 | 6.258 3 | 6.896 4 | 7.103 8 | 10.5620 | 5.460 6 | 2.949 2 | 1.063 1 | 0.532 6 | -       |
| 9    | 1.422 2 | 2.297 2 | 11.6560 | 12.2430 | 2.076 8 | 1.843 5 | 2.715 4 | 9.206 2 | 1.498 8 | 1.828 0 | -       | 5.630 8 | 0.538 1 |
| 10   | 1.584 4 | 0.179 4 | 1.815 6 | 2.019 0 | 0.420 3 | 0.453 9 | 0.393 9 | 1.240 2 | 0.237 0 | 0.334 2 | -       | -       | -       |
| 11   | 1.975 5 | 1.254 3 | 8.390 2 | 9.157 4 | 1.402 2 | 1.493 7 | 2.228 6 | 6.799 6 | 0.971 7 | 1.049 0 | -       | -       | -       |
| 12   | 2.047 7 | 1.127 7 | 7.964 6 | 7.361 8 | 1.352 8 | 1.124 3 | 1.847 4 | 5.782 6 | 0.850 5 | 1.341 4 | 0.531 7 | 0.754 4 | 1.846 2 |
| 13   | 3.187 9 | 0.440 5 | 1.594 3 | 1.658 8 | 0.500 9 | 0.298 8 | 0.480 1 | 1.122 5 | 0.270 6 | 0.254 8 | -       | -       | -       |
| 14   | 3.420 1 | 0.534 2 | 0.358 7 | 0.509 0 | 0.416 9 | 0.276 0 | 0.262 9 | 0.385 3 | 0.207 2 | 0.161 8 | -       | -       | -       |
| 15   | 4.052 6 | 0.364 5 | 0.909 5 | 1.372 0 | 0.899 6 | 1.118 5 | 0.593 2 | 0.556 8 | 0.461 9 | 0.352 9 | -       | -       | -       |
| 16   | 4.615 7 | 0.202 3 | 0.353 7 | 0.403 5 | 0.193 9 | 0.444 8 | 0.170 6 | 0.356 1 | 0.165 1 | 0.105 8 | 0.112 4 | 0.137 2 | -       |
| 17   | 5.162 9 | 0.103 6 | 0.221 7 | 0.236 9 | 0.299 0 | 0.275 5 | 0.076 6 | 0.227 6 | 0.073 5 | 0.049 6 | -       | 0.420 7 | 0.390 9 |
| 18   | 0.111 0 | 0.014 6 | 0.042 4 | 0.052 1 | 0.034 8 | 0.027 8 | 0.023 2 | 0.011 2 | 0.021 2 | 0.047 4 | -       | -       | -       |
| 19   | 0.126 4 | 0.008 1 | 0.016 5 | 0.015 3 | 0.007 5 | 0.011 0 | 0.006 7 | 0.007 2 | 0.007 6 | 0.014 2 | -       | -       | -       |

个数较多,峰面积较大,故选择 50% 乙醇。对超声、回流等不同提取方法的考察结果表明,回流提取的信息量较完整,优于超声提取。

通过对 10 批大血藤的指纹色谱图的比较,建立了大血藤药材的指纹图谱,发现不同来源的大血藤整体色谱峰峰形相似,平均相似度 0.912。将鸡血藤和五香血藤、大血藤的指纹图谱比较发现,鸡血藤和五香血藤、大血藤的相似度均  $< 0.60$ ,且大血藤与鸡血藤、五香血藤的指纹图谱在峰高和峰面积上均有一定差异。其中图谱中 18 号峰(芦荟大黄素)和 19 号峰(大黄酸)为大血藤所共有,而鸡血藤和五香血藤图谱中 18 号峰和 19 号峰均未检测出,借此可用于鉴别大血藤与鸡血藤、五香血藤。

#### [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,2010:19.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2002:682.
- [3] 崔承彬,毛水春,顾谦群,等. 中药大血藤中酚类化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学杂志,2004,14(6):326.

- [4] 王宇歆,李惠芳,周静,等. 大血藤有效部位含量测定及对腹腔感染细菌的抑制活性的研究[J]. 中成药,2008,30(8):1230.
- [5] 朱小兵. 大血藤及其易混品的对比研究[J]. 时珍国医国药,2005,16(9):892.
- [6] 国家中药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 6 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:918.
- [7] 陈智仙,高文远,刘岱琳,等. 大血藤的化学成分研究[J]. 中草药,2010,41(6):867.
- [8] 高玉琼,赵德刚,刘建华,等. 大血藤挥发性成分研究[J]. 中成药,2004,26(10):843.
- [9] 施伶俐,桂双英,周金凤. HPLC 法测定大血藤中红景天苷的含量[J]. 安徽医学,2011,15(4):441.
- [10] 王孝勋,张守平,辛华. 毛花柱忍冬 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):76.
- [11] 林华,邓广海. 川乌 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):73.
- [12] 谭超元,王海波,王东. 钩藤饮片 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):63.
- [13] 金高娃,章飞芳,薛兴亚,等. 超高效液相色谱在复杂体系中中药分离分析中的应用[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2006,8(3):106.

[责任编辑 仝燕]