

丰城鸡血藤活性成分 HPLC 指纹图谱研究*

★ 张凌** 刘亚丽 饶志军 (江西中医学院教育部重点实验室 南昌 330006)

摘要:目的:建立丰城鸡血藤和鸡血藤黄酮类化合物的 HPLC 指纹图谱。方法:采用反相高效液相色谱法,选用 Hypersil ODS-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱;流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液梯度洗脱;分析时间:75 min;检测波长:249 nm。结果:建立了丰城鸡血藤和鸡血藤药材黄酮类化合物的 HPLC 指纹图谱,标定了鸡血藤药材的共有指纹峰,方法学考察结果符合指纹图谱技术要求。结论:方法稳定、可靠、重复性好,可为丰城鸡血藤药材质量控制标准的制定提供参考。

关键词:丰城鸡血藤;HPLC;指纹图谱

中图分类号:R 284.1 文献标识码:A

HPLC Fingerprint Spectrum of *Millettia nitida* Benth var *hirsutissima* Z Wei

ZHANG Ling LIU Ya-li RAO Zhi-jun

Key Laboratory of Ministry of Modern Preparation of TCM, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To establish the HPLC fingerprint spectrum of *Millettia nitida* Benth var *hirsutissima* Z Wei. Methods: The RP-HPLC method was used; Hypersil ODS-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was employed; the acetonitrile-0.1% Meth acid was used as mobile phase; analytic time was 75 mins, and detective wavelength was 249 nm. Result: The HPLC fingerprint spectrum of *Millettia nitida* Benth var *hirsutissima* Z Wei was set up. The common peaks in different sources were pointed out. The results of method validation met technical standard of fingerprints. Conclusion: The method is stable and reliable with a good reproducibility and provides a reference standard for the quality control of *Millettia nitida* Benth. var. *hirsutissima* Z. Wei.

Key words: *Millettia nitida* Benth var *hirsutissima* Z Wei; Fingerprint spectrum; HPLC

鸡血藤,功能主要为补血活血、舒筋活络,主治月经不调、血虚萎黄、麻木瘫痪、风湿痹痛。据文献记载^[1],鸡血藤的植物来源复杂,品种混乱,有 6 科约 30 余种,《中国药典》(2005 年版)仅收载豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎作鸡血藤用。丰城鸡血藤(豆科植物 *Millettia nitida* Benth. var. *hirsutissima* Z. Wei 根,藤茎)作为鸡血藤主要品种之一,江西中药材标准(1996 年)收载,具有悠久的人药历史,民间广泛应用。丰城鸡血藤在鸡血藤片、养血解毒散、复方鸡血藤膏、益气补血散、类风湿灵、舒关温经冲剂、苓枣冲剂等为君、臣主药,但对其化学成分和理化分析报道较少,尤其是地方标准没有对其主要成分进行定性定量质量控制标准,造成使用中药效无法得到根本保证的现状。

为了全面控制丰城鸡血藤质量,并对含鸡血藤和丰城鸡血藤的中药方剂的物质基础和配伍规律进行深入研究,我们在十五攻关课题制定了其定性定量质量控制标准基础上,本文进一步建立了丰城鸡血藤及鸡血藤品种药材高效液相指纹图谱。

1 仪器与药材

1.1 仪器

美国 Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪:四元泵,在线脱气机,柱温箱,紫外可变波长检测器(VWD);十万分之一电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)等。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯)、甲醇(分析纯和色谱纯)、甲酸(分析纯)、双蒸水。

* 基金项目:江西省财政厅和教育厅 2004 科技项目

** 通讯作者:张凌, Tel: 0791-7118825, Fax: 0791-7118825, E-mail: dw64810@163.com

1.3 药品

药材共 25 个样品,1~12 号收集于全国各地,13~16、25 号为丰城鸡血藤 GAP 基地,17~22 号为采集于南昌市湾里区梅岭山脉,以上样品都经江西中医学院中药系赖学文教授鉴定(部分采集)。对照

品:刺芒柄花素(formononetin,上海康九化工有限公司提供,纯度 98%)、大豆黄素(daidzein,上海康九化工有限公司提供,纯度 98%)、染料木素(genistein,中国生物样品鉴定所,纯度 98%);样品的主要信息见表 1。

表 1 样品主要信息

序号	样品来源	产地	归属	时间
1	四川	商品	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	
2	江西樟树	安徽亳州	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-02
3	江西樟树	湖南	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-03
4	广西桂林	商品	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-03
5	吉林长春	商品	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-03
6	江西南丰	云南	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-02
7	江西丰城	江西	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-02
8	陕西西安	商品	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-02
9	江西新余	广西	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-02
10	江西赣州	商品	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-02
11	江西井冈山	商品	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-02
12	江西遂川	商品	密花豆 <i>spatholobus suberectus</i> Dunn	2007-02
13	丰城基地送检	江西丰城	光叶崖豆藤 <i>Millettia nitida</i> Benth. var. <i>hirsutissima</i> Z. Wei	2002-06
14	赣州中药饮片厂	江西丰城	亮叶崖豆藤 <i>Millettia nitida</i> Benth	2001-09
15	丰城基地送检	江西丰城	光叶崖豆藤 <i>Millettia nitida</i> Benth. var. <i>hirsutissima</i> Z. Wei	2003-03
16	丰城基地送检	江西丰城	光叶崖豆藤 <i>Millettia nitida</i> Benth. var. <i>hirsutissima</i> Z. Wei	2003-06
17	采集	江西南昌	网络崖豆藤 <i>Millettia reticulata</i> Benth	2006-09
18	采集	江西南昌	网络崖豆藤 <i>Millettia reticulata</i> Benth	2006-09
19	采集	江西南昌	网络崖豆藤(疑) <i>Millettia reticulata</i> Benth	2006-09
20	采集	江西南昌	网络崖豆藤(疑) <i>Millettia reticulata</i> Benth	2006-10
21	采集	江西南昌	网络崖豆藤(疑) <i>Millettia reticulata</i> Benth	2006-10
22	采集	江西南昌	南五味子 <i>Schisandra Chinensis</i> (Turcz.) Baill	2006-10
23	采集	江西南昌	大血藤 <i>Sargentodoxa cuneata</i> (Oliv) Rehd et Wils	2006-10
24	采集	江西南昌	常春油麻藤 <i>Mucuna Sempervirens</i> Hemsl.	2006-10
25	丰城基地送检	江西丰城	香花崖豆藤 <i>Millettia dielsiana</i> Harm S	2003-01

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取刺芒柄花素 8.02 mg、染料木素 1.86 mg、大豆黄素 7.90 mg,分别用甲醇溶解于 50 ml 容量中,稀释至刻度,作为储备液。分别取储备液刺芒柄花素、染料木素和大豆黄素各 2.0 ml,置 10 ml 容量中混匀,甲醇稀释到刻度并摇匀,作为对照品溶液。则对照品溶液中含刺芒柄花素 32.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$,染料木素 7.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$,大豆黄素 31.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取鸡血藤粉末 2.000 0 g,置 150 ml 圆底烧瓶中,加入 80 ml 分析纯甲醇,置水浴上 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热回流 1 小时,滤过,提取液挥干,用氯仿分 3 次萃取,取氯仿层,萃取液浓缩至干,甲醇溶解,转移至 5 ml 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 有机微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.3 提取溶剂的考察

分别用甲醇、乙醇、水、体积分数为 50% 的甲醇、体积分数为 50% 的乙醇、氯仿、氯仿-甲醇(4:1)

作为提取溶剂,加热回流,乙腈-水梯度洗脱,紫外检测器考察 200~400 nm 的出峰情况。结果表明氯仿-甲醇(4:1)提取出峰最少,甲醇出峰最多,故选择甲醇作为提取溶剂。

2.4 提取物前处理的考察

样品提取液经 HPLC 分析,在 0~30 min 色谱峰始终无法分开,尝试用不同比例的甲醇-水、乙腈-水系统,仍然无法消除该现象,考虑到没分开的这一位置主要是水溶性成分,而鸡血藤所含黄酮类成分,为中等极性,故采用氯仿萃取,去除提取液中的水溶性成分,结果分离良好。

2.5 检测波长的考察

在 3 个对照品中,大豆黄素、染料木素和刺芒柄花素的紫外最大吸收波长分别为 248、260、249 nm,分别选取 249、254、260 nm 作为测定波长,结果显示,取 249 nm 作为测定波长出峰最多。

2.6 流动相系统的考察

用甲醇作为提取溶剂,加热回流 1 h,氯仿萃取,分别比较甲醇-水,乙腈-水,乙腈-0.1% 甲酸,乙腈-

0.1%磷酸4种流动相的出峰情况.结果表明以乙腈-0.1%甲酸系统洗脱,可使色谱峰较好分离,且峰形对称.故选乙腈-0.1%甲酸作为流动相系统。

2.7 洗脱时间的考察

在该色谱条件下,黄酮类成分的出峰时间在10~30分钟,根据2小时色谱图,在70分钟左右色谱峰全部出完,故色谱图的记录时间设定为75分钟。

2.8 色谱条件

色谱柱: ODS- C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 25 μ m); 流速: 1.0 ml $\cdot$ min $^{-1}$; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ l; 检测波长: 249 nm; 流动相系统配比和梯度程序见表2。

表2 梯度洗脱条件

时间/min	流速/ml $\cdot$ min $^{-1}$	乙腈(%)	水(%)
0~10	1	20~30	80~70
10~28	1	30	70
28~70	1	30~100	70~0
70~75	1	100	0

3 指纹图谱的建立与相似度评价

3.1 指纹图谱的制备

精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μ l, 注入高效液相色谱仪, 按2.1色谱条件进行分析, 测定, 以刺芒柄花素的色谱峰为参照, 计算相对保留时间和相对峰面积。HPLC 色谱分离图见图1~图3

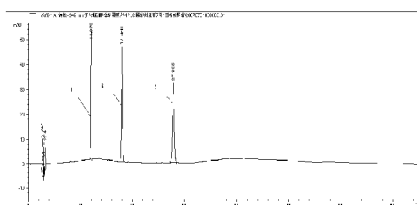


图1 对照品色谱图

(峰1为大豆黄素, 峰2为染料木素, 峰3为刺芒柄花素)。

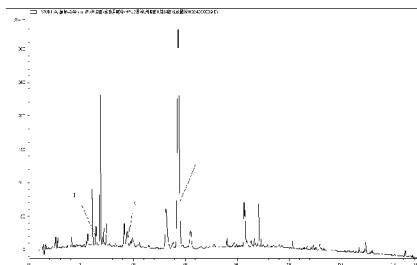


图2 样品色谱图

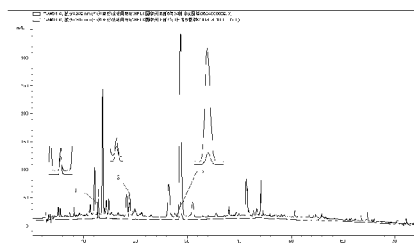


图3 对照品和样品重叠图

3.2 共有模式的建立

将样品的HPLC指纹图谱的结果导入计算机辅助相似性评价系统, 采用“中位数法”导出样品指纹图谱的总共有模式。由于伪品鸡血藤的特征峰有所缺失, 对共有模式的获得和分析影响较大, 故笔者将其单列评价, 在本次共有模式计算中采用了21批样品药材。见图4。

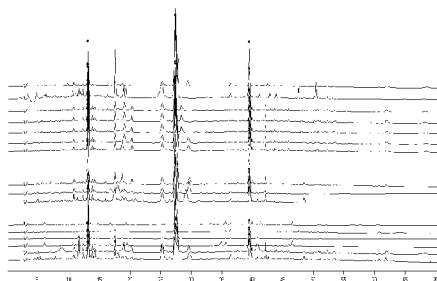


图4 21批药材的指纹图谱及其共有模式

3.3 共有峰的确定 根据共有模式可以获得样品的共有峰的相对保留时间和相对峰面积。以13号样品为代表, 其共有峰见图5。结果见表3~5。

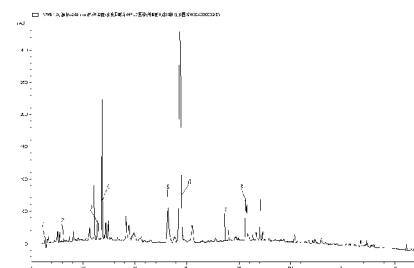


图5 共有峰

表 3 鸡血藤样品 8 个共有峰的相对保留时间

样品	共有峰 1	共有峰 2	共有峰 3	共有峰 4	共有峰 5	共有峰 6	共有峰 7	共有峰 8
1	0.0961	0.2157	0.4472	0.4748	0.9196	1.0000	1.2999	1.4543
2	0.0978	0.2200	0.4537	0.4820	0.9213	1.0000	1.3139	1.4674
3	0.0972	0.2202	0.4526	0.4811	0.9210	1.0000	1.3080	1.4687
4	0.0968	0.2227	0.4528	0.4832	0.9212	1.0000	1.3297	1.4685
5	0.0969	0.2187	0.4493	0.4790	0.9199	1.0000	1.3166	1.4661
6	0.0973	0.2185	0.4485	0.4788	0.9195	1.0000	1.3126	1.4714
7	0.0968	0.2227	0.4528	0.4832	0.9212	1.0000	1.3297	1.4685
8	0.0981	0.2219	0.4541	0.4833	0.9210	1.0000	1.3148	1.4683
9	0.0975	0.2206	0.4538	0.4823	0.9212	1.0000	1.3131	1.4558
10	0.0979	0.2210	0.4540	0.4831	0.9210	1.0000	1.3161	1.4702
11	0.0981	0.2220	0.4542	0.4838	0.9210	1.0000	1.3159	1.4699
12	0.0984	0.2220	0.4544	0.4838	0.9210	1.0000	1.3153	1.4697
13	0.0955	0.2174	0.4456	0.4756	0.9195	1.0000	1.2971	1.4419
14	0.0979	0.2212	0.4544	0.4838	0.9219	1.0000	1.3256	1.4629
15	0.0946	0.2173	0.4445	0.4744	0.9195	1.0000	1.2937	1.4445
16	0.0975	0.2201	0.4535	0.4822	0.9209	1.0000	1.3128	1.4656
17	0.0981	0.2216	0.4523	0.4824	0.9212	1.0000	1.3461	1.4705
18	0.0978	0.2212	0.4516	0.4917	0.9212	1.0000	1.3132	1.4658
20	0.0953	0.2183	0.4477	0.4772	0.9209	1.0000	1.3054	1.4541
24	0.0987	0.2211	0.4540	0.4840	0.9216	1.0000	1.3193	1.4810
25	0.0949	0.2160	0.4437	0.4732	0.9187	1.0000	1.2978	1.4458
平均值	0.0971	0.2200	0.4512	0.4811	0.9207	1.0000	1.3141	1.4634

表 4 鸡血藤样品 8 个共有峰的相对峰面积

样品	共有峰 1	共有峰 2	共有峰 3	共有峰 4	共有峰 5	共有峰 6	共有峰 7	共有峰 8
1	0.0134	0.0112	0.0513	0.1412	0.1587	1	0.0551	0.1893
2	0.0229	0.0268	0.0646	0.343	0.1251	1	0.0171	0.1763
3	0.0332	0.0102	0.0291	0.1148	0.052	1	0.0065	0.1592
4	0.0252	0.0221	0.0903	0.3551	0.2658	1	0.0322	0.1512
5	0.0266	0.0148	0.0844	0.192	0.1557	1	0.0249	0.2567
6	0.0178	0.0105	0.0629	0.1205	0.0691	1	0.0136	0.1351
7	0.0252	0.0221	0.0903	0.3551	0.2658	1	0.0322	0.1502
8	0.0217	0.0134	0.0639	0.3651	0.1234	1	0.0543	0.178
9	0.0255	0.0245	0.0611	0.3336	0.127	1	0.0426	0.1762
10	0.0241	0.0246	0.0626	0.3412	0.1264	1	0.0472	0.2559
11	0.0278	0.0262	0.0606	0.343	0.1257	1	0.0681	0.1825
12	0.0254	0.0146	0.0672	0.3382	0.1289	1	0.0561	0.1867
13	0.0249	0.017	0.0751	0.2371	0.2855	1	0.0441	0.099
14	0.0169	0.0266	0.0812	0.3562	0.169	1	0.0418	0.1743
15	0.1284	0.0448	0.0704	0.0985	0.0884	1	0.0385	0.1974
16	0.0234	0.0268	0.0664	0.3426	0.1254	1	0.0467	0.2345
17	0.1206	0.125	0.1913	0.183	0.0721	1	0.367	0.4925
18	0.1576	0.1423	0.2168	0.2338	0.0575	1	0.0842	0.1664
20	0.275	0.1229	0.1633	0.141	0.0653	1	0.5064	0.4488
24	0.0178	0.1187	0.0899	0.2521	0.1155	1	0.0089	0.3473
25	0.0297	0.0131	0.0611	0.3466	0.1204	1	0.0325	0.1748

表5 鸡血藤混淆品相对峰面积

样品	共有峰 1	共有峰 2	共有峰 3	共有峰 4	共有峰 5	共有峰 6	共有峰 7	共有峰 8
19	0.283	0	0.0815	0.0892	0.1007	1	0.0629	0.1604
21	0.4436	0.6485	0	0.3922	0	1	0	0.1297
22	0.1443	0.0857	0	0.2237	0.1086	0	0	0
23	0.2223	0.242	0.3668	0.286	0.0867	0	0	0.2864

3.4 相似度计算

根据共有模式进行比较,得到 21 批正品药材的相似度结果。见表 6。

表6 相似度计算结果

样品编号	相似度	样品编号	相似度	样品编号	相似度
1	0.9422	8	0.8712	15	0.9442
2	0.9596	9	0.8712	16	0.9581
3	0.9543	10	0.8829	17	0.6923
4	0.8896	11	0.8863	18	0.6493
5	0.8638	12	0.8911	20	0.6627
6	0.8619	13	0.9324	24	0.8733
7	0.8896	14	0.9373	25	0.9497

3.5 方法学考察

3.5.1 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别在 0、2、4、8、24 h 检测,其相对保留时间 $RSD < 3\%$,主要共有峰面积 $RSD < 5\%$,说明溶液至少在 24 小时内稳定。

3.5.2 精密度考察 取同一份供试品溶液,连续进样 5 次,考察各色谱峰保留时间的相对标准偏差,结果 $RSD < 3\%$ 。表明仪器精密度良好。

3.5.3 重现性试验 取同一批次的供试品 5 份,同法制备和检测,考察色谱峰相对保留时间和相对保留面积的一致性,结果各色谱峰相对保留时间的 $RSD < 3\%$,相对保留面积 $RSD < 3\%$ 。表明该实验方法稳定。

4 讨论

4.1 结果分析

从表 3~5 可以看出:1~25 类药材可以分为 3 类。第一类为相似度在 0.8619~0.9581,相似度较高,有 18 个药材,为 1~16、24、25 号药材,而这些药材中,13~16 和 25 为丰城基地送检药材,其相似度均在 0.9 以上,24 号药材为采集药材常春油麻藤,为鸡血藤的常用品种,其余 12 个均为各地商品鸡血藤。第二类为相似度在 0.6493~0.6923 之间,有 3 个药材,为个人采集药材。第三类药材与其余 21 个药材差异较大,为 19~23 号药材,在共有峰的位置

都出现了不同程度的缺省,具体结果见表 5,此类药材都为个人采集药材。

从样品收集来源看,主要有丰城基地送检药材,各地商品鸡血藤,个人采集药材。首先,丰城基地送检药材,编号 13~16 和 25,主要为鸡血藤中的崖豆藤属,这类药材的相似度在 0.9324~0.9497。其次,各地商品药材,编号 1~12,包含药典收载密花豆属鸡血藤和其余习用品种,其相似度也在 0.8619~0.9596 之间,可见其所含主要成分与丰城鸡血藤之间差异较小。第三,个人采集药材,编号 17~24,其中 24 号常春油麻藤,是鸡血藤常用药材,故其相似度与丰城鸡血藤和药典收载密花豆属鸡血藤接近,为 0.8733,而 22 和 23 号药材为南五味子和大血藤,虽然也有地方用做鸡血藤入药,但通过指纹图谱相似度评价可以看出,其与正品鸡血藤差异较大,刺芒柄花素相应峰缺省,故可以归为伪品。

根据分析结果,我们可以得出:首先,丰城鸡血藤与药典收载密花豆属鸡血藤差异较小,相似度较高,可以代替密花豆属鸡血藤入药;其次,相似度分析结果与收集途径和样品性状鉴别基本一致;再次,建议将相似度大于 0.85 作为判断鸡血藤药材是否合格的限度;最后,可以将南五味子和大血藤归为鸡血藤伪品。

4.2 丰城鸡血藤的质量评价

针对第二类丰城产地药材,即样品 13~16 和 25,其在大豆黄素、染料木素和刺芒柄花素的相应位置都有色谱峰出现,且峰面积大豆黄素在 1.010%~1.828% 之间,染料木素在 1.392%~1.668% 之间,刺芒柄花素在 28.086%~34.697% 之间,符合药典规定。故可以为丰城鸡血藤药材质量控制标准的制定提供参考。

参考文献

- [1]李静,许津.鸡血藤的研究概况[J].中草药,1997,28(增刊):129-131.

(收稿日期:2007-10-24)