

## · 药材与资源 ·

## 鸡血藤高效液相色谱指纹图谱研究

严启新, 李 萍\*

(中国药科大学 生药学教研室, 江苏 南京 210038)

**摘 要:** 目的 建立鸡血藤的高效液相色谱指纹图谱, 以评价鸡血藤的质量。方法 用 HPLC 法获得鸡血藤药材的色谱图, 再用聚类分析方法进行考察。结果 鸡血藤共有 11 个峰, 其中非共有峰 6 个, 共有峰 5 个, 共有峰的相对保留时间分别为: 0.046, 0.664, 1.000, 1.198, 1.383; 相对峰面积分别为: 0.819, 0.221, 1.000, 0.331, 0.458。鸡血藤及其混淆品种的色谱指纹图谱存在明显差异, 所提取的 11 个色谱峰可作为指纹特征。结论 HPLC 色谱指纹图谱分析技术可用于鸡血藤药材的鉴别。

**关键词:** 鸡血藤; 高效液相; 指纹图谱

**中图分类号:** R 282.710.03

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2004)05-0556-04

Study on HPLC fingerprint of *Caulis Spatholobi*

YAN Q i-xin, L I Ping

(Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

**Abstract:** **Object** To establish HPLC fingerprint for the identification and evaluation of *Caulis Spatholobi*. **Methods** HPLC system was used to obtain the chromatograms of *Caulis Spatholobi* and the clustering analysis was applied for data analysis. **Results** There are 11 peaks in total, among them five are common, the relative retention time is 0.046, 0.664, 1.000, 1.198, 1.383, the relative peak area is 0.819, 0.221, 1.000, 0.331, 0.458. There was obvious difference among chromatographic fingerprints of *Caulis Spatholobi* and its easily-confused species. The 11 measured peaks could be used as the fingerprint features. **Conclusion** Chromatographic fingerprint of HPLC can be used for identifying the *Caulis Spatholobi* and its easily-confused species.

**Key words:** *Caulis Spatholobi*; HPLC; fingerprint

鸡血藤, 别名过江龙、血枫藤(《中药志》); 马鹿藤、紫梗藤(《云南思茅中草药选》); 猪血藤、血龙藤、过岗龙、五层血(广西); 九层风(《广西植物名录》); 野奶豆、红藤、大血藤(广西、云南); 血风(广东)等。《中华人民共和国药典》2000 年版收载为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎, 具有补血、活血、通络之功, 用于月经不调, 风湿痹痛, 麻木瘫痪等症<sup>[1]</sup>, 为一常用中药, 鸡血藤主产于广西、广东。市场上所用鸡血藤品种较为复杂, 各书记载和各地使用差别很大, 涉及 6 个科 30 余种。有的是地方习用品种, 有的是生产鸡血藤膏的原料药。鉴于鸡血藤市售品种的混乱, 为全面控制鸡血藤的质量, 在建立鸡血藤主成分分析方法(另文发表)的基础上, 建立了鸡血藤高效液相色谱指纹图谱, 提取图谱中的 11 个色谱峰作为指纹峰, 并用聚类分析进行

考察。研究结果表明, 这 11 个色谱指纹峰可用于鉴别鸡血藤及其混乱品种。

## 1 实验材料

1.1 仪器: HP1100 系列高效液相色谱仪(美国惠谱公司), 包括二元泵 GB12A, Rheodyne 7725i 手动进样器, 二极管阵列检测器(DAD), HPA.06.01 化学工作站; 25  $\mu$ L 微量进样器; HS3120 型超声波提取仪(淮阴汉邦科技有限公司); 十万分之一天平(上海天平仪器厂)。

1.2 试剂与药品: 对照品原儿茶酸(3, 4-dihydroxybenzoic acid), 对羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid), 大黄素(emodin), 刺芒柄花素(formononetin), 大豆黄素(daidzein), 樱黄素(prunetin), 均从鸡血藤中分离制备, 结构经 UV, IR, MS, NMR 鉴定。化合物经 HPLC 检测纯度均达

\* 收稿日期: 2003-08-29

基金项目: 国家重点科技攻关项目(99-929-01-31)

作者简介: 严启新(1971—), 男, 河南省信阳市人, 助理研究员, 博士, 2002 年 9 月毕业于中国药科大学生药学专业, 研究方向为新药研究与开发。

\* 通讯作者 Tel: (025) 85322256, 13505142632 E-mail: lipingli@public1.ptt.js.cn

到 98% 以上。色谱纯乙腈 Fisher 公司生产; 蒸馏水为乐百氏公司生产, 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材: 收集于全国不同区域, 均经笔者鉴定, 见

表 1(样品序号为 1~ 18, 其中 2, 6, 7, 8, 10 为其主产区样品)。

## 2 方法与结果

表 1 鸡血藤及其混淆品样品

Table 1 Samples of *Caulis Spatholobi* and its easily-confused species

| 序号 | 样品来源 | 产地   | 鉴定结果                                                 | 收集日期    |
|----|------|------|------------------------------------------------------|---------|
| 1  | 湖南长沙 | 商品   | 密花豆 <i>Spatholobus suberectus</i> Dunn               | 2001-08 |
| 2  | 江苏南京 | 广西南宁 | 密花豆 <i>S. suberectus</i>                             | 2000-03 |
| 3  | 贵州贵阳 | 商品   | 密花豆 <i>S. suberectus</i>                             | 2001-03 |
| 4  | 江西南昌 | 商品   | 密花豆 <i>S. suberectus</i>                             | 2000-04 |
| 5  | 四川成都 | 商品   | 密花豆 <i>S. suberectus</i>                             | 2001-12 |
| 6  | 广西钦州 | 商品   | 密花豆 <i>S. suberectus</i>                             | 2001-11 |
| 7  | 广西百色 | 广西百色 | 密花豆 <i>S. suberectus</i>                             | 2000-04 |
| 8  | 广西柳州 | 广西柳州 | 密花豆 <i>S. suberectus</i>                             | 2000-07 |
| 9  | 河南商城 | 商品   | 密花豆 <i>S. suberectus</i>                             | 2000-08 |
| 10 | 广东韶关 | 商品   | 密花豆 <i>S. suberectus</i>                             | 2000-09 |
| 11 | 广东广州 | 广东连县 | 厚果鸡血藤 <i>M. illettia pachycarpa</i> Benth.           | 2000-09 |
| 12 | 广东广宁 | 广宁   | 白花油麻藤 <i>M. ucuna birdw oodiana</i> Tutchet          | 2000-10 |
| 13 | 江西九江 | 江西九江 | 亮叶崖豆藤 <i>M. illettia nitida</i> Benth.               | 2001-12 |
| 14 | 江西九江 | 江西九江 | 光叶崖豆藤 <i>M. illettia hirsutissima</i> Z. Wei         | 2001-12 |
| 15 | 福建南安 | 福建南安 | 香花崖豆藤 <i>M. illettia dielsiana</i> Ham s             | 2001-04 |
| 16 | 海南   | 商品   | 红血藤 <i>Spatholobus sinensis</i> Chun et T. Chen      | 2001-07 |
| 17 | 四川峨眉 | 四川峨眉 | 大血藤 <i>Sargentodoxa cuneata</i> (Oliv.) Rehd et Wils | 2001-10 |
| 18 | 云南昆明 | 商品   | 网络崖豆藤 <i>M. illettia reticulata</i> Benth.           | 2001-11 |

2.1 色谱条件: 色谱柱: HP-Hypersil BDS-C<sub>18</sub> (250 mm × 4 mm, 5 μm), Pellicular C<sub>18</sub> 预柱; 流动相: 乙腈(B)-水(A), 梯度洗脱 99% A-1% B (0~ 5 min), 80% A-20% B (5~ 12 min), 60% A-40% B (12~ 40 min), 30% A-70% B (40~ 50 min), 20% A-80% B (50~ 55 min), 0% A-100% B (55~ 60 min); 流速: 1 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 250 nm。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取原儿茶酸, 对羟基苯甲酸, 大黄素, 刺芒柄花素, 大豆黄素, 樱黄素各 1 mg, 分别用甲醇定容于 5 mL 量瓶中, 摇匀, 作为储备液, 分别量取储备液原儿茶酸, 对羟基苯甲酸, 大黄素, 刺芒柄花素各 1.0 mL, 大豆黄素 0.5 mL, 樱黄素 0.5 mL 置 2 mL 量瓶中混合, 甲醇定容并摇匀, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取药材粉末 500 mg, 精密称定, 用氯仿-甲醇(4:1) 50 mL 加热回流提取 8 h, 提取液浓缩至 30 mL, 加 100 mL 醋酸乙酯分 3 次萃取, 萃取液浓缩至干, 甲醇溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 取续滤液 0.4 mL 置 1 mL 量瓶中定容即得。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 检测, 其相对保留时间 RSD < 3%, 主要共有峰面积 RSD 不超过 5%, 说明溶液至少在

10 h 内稳定。

2.4.2 精密度考察: 取同一份供试品溶液, 连续进样 3 次, 考察色谱峰保留时间的一致性, 计算各色谱峰保留时间的相对标准偏差, 结果 RSD < 2%。

2.4.3 重现性试验: 取同一批号的供试品 3 份, 同法检测, 考察色谱峰相对保留时间的一致性, 结果各色谱峰相对保留时间的 RSD < 2%。

2.5 HPLC 图谱分析: 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL, 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(fomononetin) 为内标, 计算相对保留时间和相对峰面积。HPLC 色谱分离图见图 1(图 1-A 对照品峰 1 为原儿茶酸, 峰 2 为对羟基苯甲酸, 峰 5 为大豆黄素, 峰 7 为刺芒柄花素, 峰 8 为樱黄素和峰 9 为大黄素)。

2.6 各峰相对保留时间和相对峰面积: 以刺芒柄花素(fomononetin, 峰 7) 为内标, 计算各样品的所有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果见表 2, 3。

表 2, 3 说明, 样品中有 5 个共有峰, 分别是: 峰 1, 5, 7, 8, 10, 5 个共有峰相对峰面积和在 1.821~ 4.508。共有峰的相对保留时间和相对峰面积的均值可以作为鸡血藤 HPLC 指纹的特征。

鸡血藤混淆品 5 个共有峰相对峰面积与正品有明显区别, 结果见表 4。

## 3 聚类谱系图的建立<sup>[2]</sup>

将样品分析中所获得的 18 个样品的 11 个色谱

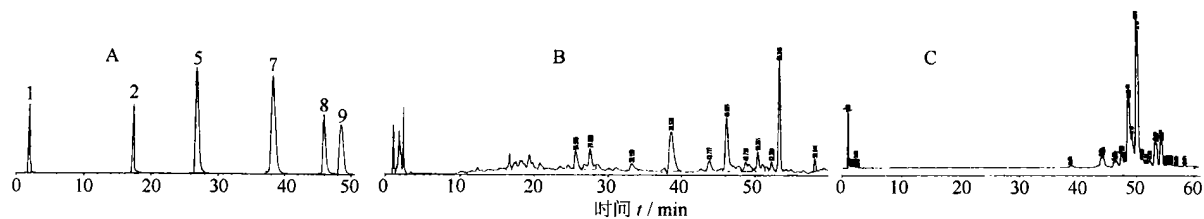


图 1 对照品(A)、鸡血藤(B)和鸡血藤混淆品(C)HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), Caulis Spatholobi (B), and its easily-confused species (C)

表 2 鸡血藤样品 11 个峰的相对保留时间 (n= 2)

Table 2 Relative retention time of 11 peaks of Caulis Spatholobi (n= 2)

| 样品 | 峰 1   | 峰 2   | 峰 3   | 峰 4   | 峰 5   | 峰 6   | 峰 7   | 峰 8   | 峰 9   | 峰 10  | 峰 11  |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1  | 0.044 | 0     | 0     | 0     | 0.664 | 0.715 | 1.000 | 1.195 | 1.275 | 1.380 | 1.509 |
| 2  | 0.043 | 0.428 | 0.447 | 0.514 | 0.666 | 0.695 | 1.000 | 1.198 | 1.277 | 1.383 | 1.510 |
| 3  | 0.046 | 0.427 | 0.446 | 0.467 | 0.664 | 0.715 | 1.000 | 1.194 | 1.275 | 1.406 | 0     |
| 4  | 0.046 | 0.430 | 0     | 0     | 0.664 | 0.699 | 1.000 | 1.194 | 1.304 | 1.377 | 0     |
| 5  | 0.046 | 0     | 0.453 | 0.514 | 0.665 | 0     | 1.000 | 1.204 | 0     | 1.389 | 0     |
| 6  | 0.046 | 0.429 | 0.457 | 0.516 | 0.668 | 0.700 | 1.000 | 1.194 | 1.305 | 1.379 | 0     |
| 7  | 0.045 | 0.430 | 0.446 | 0.496 | 0.664 | 0.717 | 1.000 | 1.200 | 1.305 | 1.387 | 1.536 |
| 8  | 0.044 | 0.428 | 0.448 | 0.516 | 0.663 | 0.720 | 1.000 | 1.198 | 1.292 | 1.381 | 0     |
| 9  | 0.051 | 0.423 | 0.447 | 0.510 | 0.661 | 0.692 | 1.000 | 1.190 | 1.263 | 1.367 | 0     |
| 10 | 0.045 | 0.427 | 0.451 | 0.514 | 0.652 | 0.714 | 1.000 | 1.207 | 1.270 | 1.375 | 1.499 |
| 均值 | 0.046 | 0.427 | 0.449 | 0.505 | 0.664 | 0.637 | 1.000 | 1.198 | 1.157 | 1.383 | 1.501 |

样品序号同表 1

Sample's No. are same to Table 1

表 3 鸡血藤样品 11 个峰的相对峰面积 (n= 2)

Table 3 Relative peak area of 11 peaks of Caulis Spatholobi (n= 2)

| 样品 | 峰 1   | 峰 2   | 峰 3   | 峰 4   | 峰 5   | 峰 6   | 峰 7   | 峰 8   | 峰 9   | 峰 10  | 峰 11  |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1  | 0.449 | 0     | 0     | 0     | 0.147 | 0.208 | 1.000 | 0.988 | 0.178 | 0.643 | 0.043 |
| 2  | 0.198 | 0.037 | 0.049 | 0.036 | 0.082 | 0.058 | 1.000 | 0.074 | 0.036 | 0.468 | 0.029 |
| 3  | 0.553 | 0.107 | 0.089 | 0.210 | 0.325 | 0.434 | 1.000 | 0.798 | 0.196 | 1.093 | 0     |
| 4  | 0.879 | 0.064 | 0     | 0     | 0.284 | 0.368 | 1.000 | 0.210 | 0.320 | 0.074 | 0     |
| 5  | 0.818 | 0     | 0.107 | 0.070 | 0.132 | 0     | 1.000 | 0.026 | 0     | 0.149 | 0.029 |
| 6  | 0.522 | 0.137 | 0.182 | 0.216 | 0.147 | 0.200 | 1.000 | 0.156 | 0.066 | 0.049 | 0     |
| 7  | 1.823 | 0.210 | 0.241 | 0.300 | 0.256 | 0.199 | 1.000 | 0.504 | 0.145 | 0.927 | 0.125 |
| 8  | 2.209 | 0.174 | 0.255 | 0.306 | 0.252 | 0.483 | 1.000 | 0.053 | 0     | 0.287 | 0     |
| 9  | 0.358 | 0.159 | 0.157 | 0.247 | 0.285 | 0.384 | 1.000 | 0.247 | 0.098 | 0.803 | 0     |
| 10 | 0.384 | 0.171 | 0.169 | 0.274 | 0.301 | 0.404 | 1.000 | 0.258 | 0.101 | 0.084 | 0     |
| 均值 | 0.819 | 0.106 | 0.125 | 0.166 | 0.221 | 0.274 | 1.000 | 0.331 | 0.114 | 0.458 | 0.023 |

表 4 鸡血藤混淆品相对峰面积

Table 4 Relative peak area of easily-confused

species of Caulis Spatholobi

| 样品序号 | 名称    | 峰 1   | 峰 5   | 峰 7 | 峰 8   | 峰 10  |
|------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|
| 11   | 厚果鸡血藤 | -     | -     | -   | -     | -     |
| 12   | 白花油麻藤 | 3.590 | 0     | 1   | 0.361 | 0.360 |
| 13   | 亮叶崖豆藤 | 0     | 0.285 | 1   | 0.025 | 0.010 |
| 14   | 光叶崖豆藤 | 0     | 0.273 | 1   | 0.016 | 1.0   |
| 15   | 香花崖豆藤 | 0.548 | 0.285 | 1   | 0     | 0     |
| 16   | 红鸡血藤  | 0.806 | 0     | 1   | 0     | 3.470 |
| 17   | 大血藤   | -     | -     | -   | -     | -     |
| 18   | 昆明鸡血藤 | 1.646 | 0     | 1   | 0     | 0.657 |

样品序号同表 1

Sample's No. are same to Table 1

峰, 采用模糊聚类分析方法。在进行模糊聚类分析之

前, 为消除由于数据变换的幅度和范围以及数据分布的非正态性对聚类结果的影响, 对原始数据进行中心化变换, 原始数据经中心化变换后, 采用绝对指数来描述样本之间的距离。根据样本之间的绝对指数计算结果, 选择绝对指数最近的两个样本并类, 不断将距离最小者并类, 直到所有样本都归为一类。结果见图 2。

从图 2 中可以看出, 1~ 18 号样品分为两大类, 第一类: 1~ 10 为正品鸡血藤, 他们之间差异较小。第二类: 11~ 18 为鸡血藤混淆品。该结果和形态鉴定基本是一致。

4 小结和讨论

4.1 通过对 18 批不同产地和不同商品的鸡血藤的

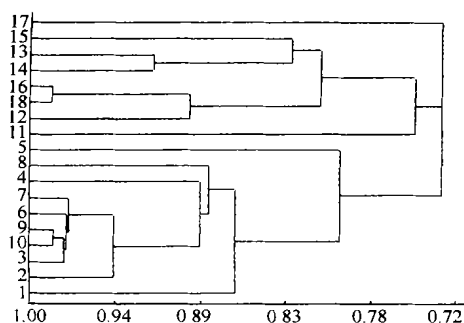


图2 鸡血藤聚类树状图

Fig 2 Clustering analysis of Caulis Spatholobi

HPLC 指纹图谱分析, 结果表明正品鸡血藤中有 11 个峰, 和已知对照品相比较, 其中, 峰 1, 2, 5, 7, 8 和 9 分别是原儿茶酸、对羟基苯甲酸、大豆黄素、刺芒柄花素、樱黄素和大黄素。

4.2 11 个峰中, 其中非共有峰 6 个, 共有峰 5 个: 分别是峰 1(原儿茶酸)、峰 5(大豆黄素)、峰 7(刺芒柄花素)、峰 8(樱黄素)、峰 10(大黄素); 共有峰的相对保留时间分别为: 0.046, 0.664, 1.000, 1.198, 1.383, 相对峰面积分别为: 0.819, 0.221, 1.000, 0.331, 0.458。11 个色谱峰作为鸡血藤色谱峰的特性, 可作为鸡血藤的 HPLC 指纹图谱的特征。

4.3 鸡血藤及其混淆品的 HPLC 指纹图谱特征有一定差别, 5 个共有峰在各混淆品中是缺失的, 故各自相对保留时间和相对峰面积都有不同, 从而达到鉴别的目的。如厚果鸡血藤和大血藤 5 个共有峰都没有, 白花油麻藤缺峰 5, 亮叶崖豆藤缺峰 1, 光叶崖豆藤缺峰 1 和峰 10, 香花崖豆藤缺峰 8 和 10, 红鸡血藤、昆明鸡血藤均缺峰 5 和峰 8。

4.4 以 11 个色谱峰为特征峰, 运用模糊聚类对其进行分析, 结果表明 18 个样品能较好地分成两大类, 很明显地区分鸡血藤的正品及其混淆品种。

4.5 聚类方法曾采用了系统聚类方法, 数据运用对数转换、平方根、标准化等, 聚类距离运用了欧氏距离、马氏距离、兰氏距离、卡方; 运算方法采用离差平方和等多种方法, 其结果均不理想。后采用模糊聚类分析方法, 以中心化转换数据, 绝对指数计算聚类距离。其结果较好, 与经典形态鉴定具有一致性, 能达到鉴定的目的。

#### References

- [1] Chen D, Xu G J, Xu L S. Study on the properties of *Spatholobus suberectus* Dunn [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1993, 16(8): 21-24.
- [2] Kang Q Y, Feng M G. *Practical Statistics and DPS Data Processing System* (实用统计分析及其 DPS 数据处理系统) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2002.

## 牛膝的 rDNA ITS 序列分析

王淑美<sup>1</sup>, 梁生旺<sup>1\*</sup>, 周开亚<sup>2</sup>, 刘忠权<sup>2</sup>, 冯卫生<sup>1</sup>, 吴明侠<sup>1\*</sup>

(1. 河南中医学院 药物分析学科, 河南 郑州 450008; 2. 南京师范大学遗传资源研究所, 江苏 南京 210097)

**摘要:** 目的 探讨不同产地牛膝的 ITS 的序列变异, 为鉴别牛膝提供 DNA 分子标记。方法 利用特异性 PCR 技术对牛膝的 rDNA ITS 区碱基序列进行测定, 报道了牛膝的 rDNA ITS 区的碱基序列。结果 得到核糖体 DNA 中的 ITS 及 5.8 S rDNA 完全序列, 18 S 和 26 S rDNA 部分序列, 共约 650 bp。牛膝与川牛膝及土牛膝碱基序列有明显差异, 不同产地、不同栽培品种牛膝碱基序列无差异。结论 此法可用于牛膝种间及真伪品鉴别。

**关键词:** 分子鉴定; 牛膝; PCR; 序列分析

中图分类号: R 282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)05-0559-04

### Ribosomal rDNA ITS sequence analysis of root of *Achyranthes bidentata*

WANG Shu-mei<sup>1</sup>, LIANG Sheng-wang<sup>1</sup>, ZHOU Kai-ya<sup>2</sup>, LIU Zhong-quan<sup>2</sup>,  
FENG Wei-sheng<sup>1</sup>, WU Ming-xia<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** **Object** To study the correlation between ITS sequence variation of root of *Achyranthes*

\* 收稿日期: 2003-08-11

基金项目: “九五”国家科技攻关项目(99-929-01-06)

作者简介: 王淑美(1966—), 女, 山东省海阳市人, 1990 年毕业于上海医科大学药化专业, 2001 年获硕士学位, 河南中医学院药物分析学副教授, 硕士生导师, 主要从事药物质量控制研究。Tel: (0371) 5680562 E-mail: ShmWang@Sina.Com

\* 通讯作者 Tel: (0371) 5961380 E-mail: SwLiang371@163.com