

鸡血藤的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

杨冉冉^{1,2}, 姬蕾^{1,2}, 李二文^{1,2}, 代一航^{1,2}, 倪媛媛^{1,2}, 韩红园^{1,2}, 梅雪^{1,2}, 林瑞超^{1,2*}, 邹迪新^{1,3*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中药品质评价北京市重点实验室, 北京 100102

3. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110

摘要:目的 建立鸡血藤 *Spatholobus suberectus* 的 HPLC 指纹图谱分析方法, 为其质量控制提供依据。方法 采用 ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A) -0.2%磷酸水溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 1 mL/min, 检测波长 260 nm, 柱温为 30 °C。并运用聚类分析和主成分分析对鸡血藤指纹图谱进行模式识别研究。结果 建立了鸡血藤药材 HPLC 指纹图谱的共有模式, 确定 35 个共有峰, 并根据对照品指认 6 个共有峰。17 批药材的相似度分析结果与聚类分析、主成分分析结果基本一致。结论 HPLC 指纹图谱结合聚类分析、主成分分析可以快速、高效地评价不同产地鸡血藤药材的质量差异。

关键词: 鸡血藤; 高效液相色谱; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)21-4530-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.026

HPLC fingerprint analysis and pattern recognition of *Spatholobus suberectus*

YANG Ran-ran^{1,2}, JI Lei^{1,2}, LI Er-wen^{1,2}, DAI Yi-hang^{1,2}, NI Yuan-yuan^{1,2}, HAN Hong-yuan^{1,2}, MEI Xue^{1,2}, LIN Rui-chao^{1,2}, ZOU Di-xin^{1,3}

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Materia Medica Quality Evaluation, Beijing 100102, China

3. College of Pharmacy Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the fingerprint analysis of *Spatholobus suberectus*, so as to provide evidence for the quality control of it. **Methods** Separation was performed on a ZORBAX SB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) and the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid with gradient elution. The flow rate was 1 mL/min and the wavelength was 260 nm. The column temperature was 30 °C. The cluster analysis (CA) and principal component analysis (PCA) were applied to studying the HPLC fingerprint and chemical pattern recognition. **Results** The HPLC fingerprint of *S. suberectus* has been established with 35 common peaks, and six of common peaks were identified. The values of similarity evaluation mostly agreed with the result of CA and PCA. **Conclusion** The application of HPLC combined with CA and PCA could quickly and objectively evaluate the quality of *S. suberectus* from different regions.

Key words: *Spatholobus suberectus* Dunn.; HPLC; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

鸡血藤是我国常用的活血化瘀中药,《中国药典》2015 年版收载其为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn. 的干燥藤茎,性温,味苦、甘,归肝、肾经,具有活血补血、调经止痛、舒筋活络的功效^[1]。其主要化学成分有黄酮类、香豆素类、三萜类和蒽醌等^[2]。鸡血藤主产于广西、广东,但市场上所用的鸡血藤品种较为复杂,除《中国药典》收

载的密花豆外,还有豆科、五味子科、木通科等共 6 个属 15 种和变种的植物,如香花崖豆藤、厚果鸡血藤、大血藤等,它们的有效成分不尽相同,其主治功效也不同,因此临床上不可混淆^[3]。为全面控制鸡血藤的质量,本实验采用高效液相色谱法对 17 批鸡血藤药材和 4 批鸡血藤混伪品进行分析,建立 HPLC 指纹图谱,确定了 35 个共有峰,并结合聚

收稿日期: 2017-09-04

基金项目: 2015 年度中医药行业科研专项——中药饮片质量保障系统研究 (一) (201507002)

作者简介: 杨冉冉 (1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药品质评价研究。Tel: 18811792061 E-mail: onlyyr0@163.com

*通信作者 林瑞超 (1954—), 博士, 教授, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药品质评价研究。E-mail: linrch307@sina.com

邹迪新 (1983—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: 15047734762@163.com

类分析和主成分分析 (PCA) 2 种数理统计方法进行模式识别研究。

1 材料与试剂

1.1 材料

鸡血藤药材及其混伪品收集于广东、广西等地, 经北京中医药大学中药学院中药鉴定系刘春生教授鉴定为鸡血藤 *Spatholobus suberectus* Dunn.、大血藤 *Sargentodoxa cuneata* (Oliv) Rthd et Wils.、山鸡血藤 *Millettia dielsiana* Harms、白花油麻藤 *Mucuna birdwoodiana* Tutchter, 见表 1。

表 1 鸡血藤及其混伪品

序号	品名	产地
S1	鸡血藤	广西十万大山
S2	鸡血藤	广东
S3	鸡血藤	越南
S4	鸡血藤 (大片)	广西上思
S5	鸡血藤	越南
S6	鸡血藤	广西大新
S7	鸡血藤	广西
S8	鸡血藤 (小片)	越南
S9	鸡血藤 (统货)	越南
S10	鸡血藤	广西
S11	鸡血藤	云南
S12	鸡血藤	云南
S13	鸡血藤	广东
S14	鸡血藤	广西
S15	鸡血藤	广西
S16	鸡血藤	云南
S17	鸡血藤	广西
S18	大血藤	湖南廉桥
S19	山鸡血藤	四川彭州
S20	白花油麻藤	湖南廉桥
S21	大血藤	河南

1.2 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪 (包括 2695 四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、2489 紫外检测器、Empower 色谱工作站); 医用数控超声仪 (KQ-250DE 型, 昆山市超声仪器有限公司); New Classic MF 电子分析天平 (Mettler Toledo 公司)。N-1000 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司)。

对照品原儿茶酸 (批号 PS001118, 质量分数 > 98.0%)、儿茶素 (批号 PS1000-0025, 质量分数 > 99.0%)、表儿茶素 (批号 PS000001, 质量分数 > 99.0%)、芒柄花素 (批号 PS0215-0025, 质量分数 > 98.0%) 均购自成都普思生物科技有限公司; 甘草素 (批号 CHB160309, 质量分数 ≥ 98.0%)、紫檀素 (批号 CHB160910, 质量分数 ≥ 98.0%)、山柰酚 (批

号 CHB160407, 质量分数 > 98.0%) 均购自成都克洛玛生物科技有限公司; 乙腈为色谱纯; 磷酸为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 蒸馏水为广州屈臣氏公司生产。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件

色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) 和 0.2% 磷酸水溶液 (B); 梯度洗脱 (表 2), 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 15 μL。

表 2 梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0	3	97
10	10	90
18	10	90
50	20	80
100	45	55
120	85	15

2.2 供试品溶液的制备

称取不同产地鸡血藤药材粉末 (过 40 目筛) 约 3 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加入氯仿-甲醇 (4 : 1) 80 mL 加热回流 1.5 h, 滤过, 滤渣再加氯仿-甲醇 (4 : 1) 50 mL 加热回流 1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至干, 甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即可。

2.3 精密度试验

取同一批 (S7) 鸡血藤样品, 按 “2.2” 项下的方法制备, “2.1” 项色谱条件测定, 连续进样 6 次, 检测指纹图谱, 结果各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.27%~3.81%, 相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.69%, 表明仪器精密度良好。

2.4 重复性试验

取同一批 (S7) 鸡血藤样品, 按 “2.2” 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, “2.1” 项色谱条件测定, 检测指纹图谱, 结果各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.73%~3.12%, 相对保留时间的 RSD 为 0.01%~1.28%, 表明重复方法性较好。

2.5 稳定性试验

取同一批 (S7) 鸡血藤样品, 按 “2.2” 项下的方法制备供试品溶液, “2.1” 项色谱条件测定, 分别在 0、4、8、14、20、24 h 检测指纹图谱, 结果各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.25%~3.09%, 相对保留时间的 RSD 为 0.01%~2.58%, 表明样品稳

定性良好。

2.6 鸡血藤指纹图谱的建立及共有峰的鉴定

分别取鸡血藤药材和混伪品药材,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项色谱条件测定,共得到 17 批鸡血藤样品和 4 批混伪品的 HPLC 指纹图谱,见图 1。将其导入至《中药色谱特征图谱相似度评价系统软件》(2012 版 A),设定 S1 为参照图谱,选取时间窗宽度为 0.2 min,采用平均数法生成共有模式图,共确定 35 个共有色谱峰,见图 2。通过与对照品对照,指认其中 6 个色谱峰,即 6 号峰为原儿茶酸,11 号峰为儿茶素,15 号峰为表儿茶素,20 号峰为甘草素,27 号峰为山柰酚,30 号峰为芒柄花素。

2.7 共有峰的相对保留时间和相对峰面积

在所建立的色谱条件下,鸡血藤的共有峰有较好的分离,保留时间较为稳定,同时 35 个共有峰均能稳定出现,以 18 号峰为对照峰,计算其他 34 个共有峰的相对峰面积和相对保留时间,见表 3、4。

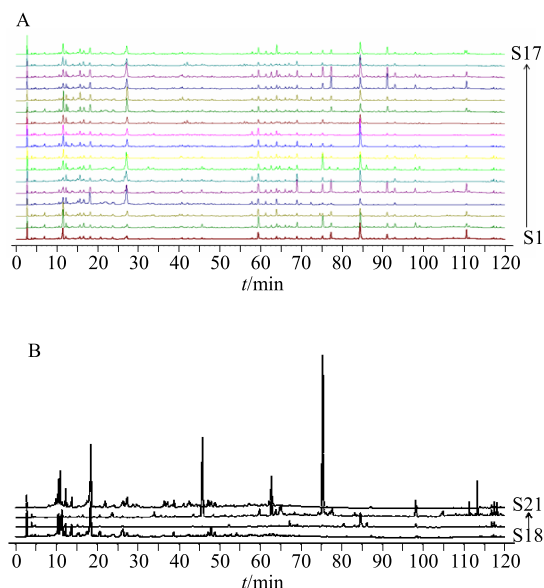


图 1 鸡血藤 (A) 及其混伪品 (B) 的 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprint chromatograms of *Spatholobus suberectus* (A) and its counterfeits (B)

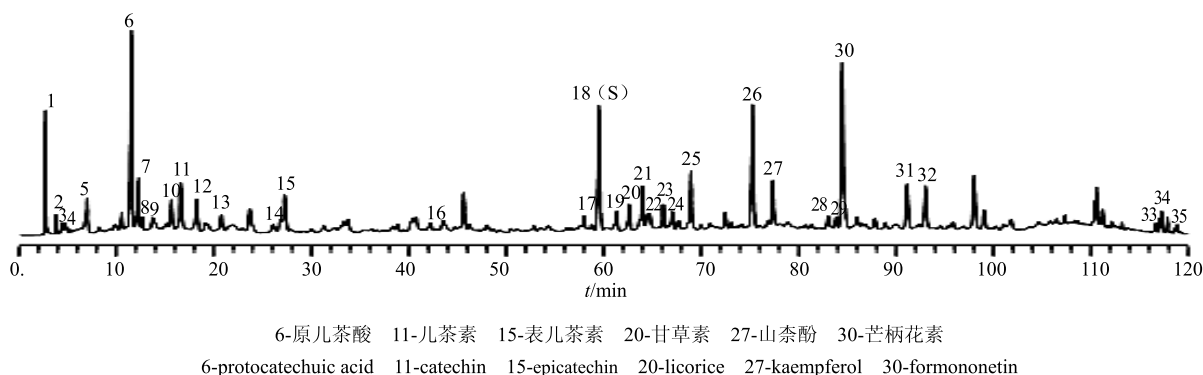


图 2 鸡血藤药材 HPLC 指纹图谱共有模式

Fig. 2 Common pattern of HPLC fingerprint chromatogram of *S. suberectus*

表 3 17 批样品共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks for 17 batches of samples

共有峰	相对峰面积																	均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17		
1	0.95	0.41	1.01	0.90	0.59	0.74	1.01	0.62	1.08	1.02	1.34	0.72	0.86	1.09	0.75	1.53	0.98	0.92	29.79
2	0.11	0.05	0.11	0.04	0.06	0.04	0.12	0.13	0.08	0.07	0.15	0.06	0.08	0.07	0.05	0.12	0.07	0.08	39.71
3	0.12	0.04	0.10	0.12	0.06	0.10	0.16	0.11	0.18	0.18	0.24	0.13	0.12	0.11	0.08	0.19	0.11	0.13	39.34
4	0.18	0.08	0.17	0.15	0.13	0.10	0.16	0.15	0.25	0.25	0.30	0.20	0.27	0.27	0.13	0.28	0.20	0.19	35.07
5	0.55	0.23	0.41	0.13	0.07	0.04	0.07	0.23	0.30	0.35	0.13	0.62	0.11	0.14	0.13	0.15	0.33	0.24	72.48
6	0.16	0.12	0.25	0.26	0.22	0.17	0.28	0.18	0.36	0.13	0.33	0.38	0.40	0.38	0.26	0.30	0.20	0.26	35.04
7	1.45	1.41	1.86	1.02	0.39	0.46	1.27	1.00	1.63	1.36	2.01	2.63	0.85	1.32	0.96	2.07	1.36	1.35	42.34
8	0.35	0.33	0.49	0.79	0.35	0.58	0.68	0.33	0.57	0.37	1.08	0.87	0.91	0.88	0.59	1.15	0.43	0.63	42.84
9	0.05	0.08	0.14	0.21	0.12	0.12	0.22	0.07	0.13	0.10	0.14	0.56	0.24	0.33	0.20	0.12	0.16	0.18	69.58
10	0.39	0.21	0.41	0.66	0.21	0.58	0.40	0.25	0.53	0.53	0.47	0.79	1.53	0.86	0.66	0.57	0.61	0.57	54.34
11	0.46	0.36	0.46	0.87	0.26	0.26	0.67	0.38	0.36	0.31	0.95	0.88	0.56	0.58	0.35	1.02	0.52	0.54	45.70

续表 3

共有峰	相对峰面积																		均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17			
12	0.43	0.26	0.64	2.03	0.63	0.47	0.81	0.43	0.90	0.63	0.58	1.39	1.57	1.51	1.13	0.80	1.06	0.90	54.21	
13	0.36	0.13	0.27	0.16	0.13	0.22	0.14	0.22	0.25	0.35	0.19	0.27	0.20	0.20	0.13	0.18	0.25	0.21	32.90	
14	0.08	0.07	0.10	0.20	0.06	0.17	0.08	0.11	0.12	0.06	0.16	0.07	0.13	0.10	0.11	0.22	0.07	0.11	43.54	
15	0.58	0.34	1.01	4.63	0.90	1.63	3.92	0.60	1.33	1.19	2.14	2.86	3.36	3.19	2.90	2.71	1.50	2.05	62.67	
16	0.12	0.05	0.25	0.37	0.06	0.08	0.10	0.17	0.23	0.28	0.89	0.29	0.35	0.24	0.25	1.00	0.24	0.29	90.73	
17	0.09	0.05	0.07	0.14	0.06	0.08	0.10	0.05	0.04	0.05	0.17	0.06	0.14	0.12	0.08	0.13	0.11	0.09	43.49	
18 (S)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0	
19	0.23	0.18	0.47	0.49	0.27	0.21	0.45	0.21	0.25	0.19	0.40	0.26	0.55	0.55	0.38	0.44	0.48	0.35	37.55	
20	0.12	0.19	0.14	0.10	0.23	0.08	0.61	0.24	0.13	0.25	0.40	0.15	0.22	0.47	0.66	0.49	0.21	0.28	65.27	
21	0.39	0.29	0.79	0.75	0.27	0.08	0.48	0.53	0.60	0.51	0.55	0.36	0.83	0.68	0.87	0.40	1.13	0.56	46.79	
22	0.23	0.19	0.15	0.12	0.25	0.14	0.75	0.23	0.14	0.25	0.52	0.13	0.21	0.58	0.43	0.45	0.29	0.30	61.80	
23	0.18	0.12	0.09	0.15	0.24	0.14	0.05	0.18	0.16	0.04	0.32	0.23	0.37	0.33	0.09	0.27	0.09	0.18	55.76	
24	0.16	0.14	0.20	0.10	0.17	0.05	0.42	0.32	0.13	0.09	0.45	0.13	0.30	0.43	0.37	0.64	0.18	0.25	65.06	
25	0.35	0.41	0.30	0.59	0.97	0.80	0.65	0.62	0.62	0.24	0.70	0.41	0.98	0.71	0.82	0.94	0.31	0.61	39.70	
26	0.52	0.98	0.36	0.29	0.84	0.52	2.75	0.81	0.50	0.31	1.09	0.32	0.51	1.21	1.34	0.74	0.58	0.80	74.09	
27	0.94	0.31	0.62	0.24	1.06	0.05	0.13	0.23	0.24	0.05	0.30	0.89	0.80	2.48	1.21	0.11	0.55	0.60	102.13	
28	0.17	0.12	0.11	0.06	0.11	0.06	0.30	0.12	0.09	0.05	0.26	0.14	0.18	0.34	0.29	0.34	0.12	0.17	59.01	
29	0.14	0.09	0.11	0.07	0.18	0.12	0.21	0.17	0.08	0.15	0.21	0.10	0.20	0.37	0.31	0.20	0.27	0.17	47.58	
30	2.89	1.49	1.42	1.28	1.18	1.49	2.86	1.20	4.25	2.74	2.70	1.85	2.64	3.25	3.50	3.27	2.35	2.37	39.33	
31	0.80	0.39	0.59	0.14	1.01	0.07	0.20	0.46	0.29	0.29	0.21	1.15	0.85	3.51	1.38	0.40	1.07	0.75	107.94	
32	0.29	0.37	0.23	0.40	0.47	0.41	0.55	0.35	0.24	0.21	0.44	0.29	0.33	1.08	0.60	0.65	0.27	0.42	50.69	
33	0.10	0.05	0.06	0.07	0.04	0.12	0.08	0.08	0.09	0.09	0.10	0.06	0.06	0.12	0.06	0.10	0.05	0.08	31.85	
34	0.15	0.10	0.05	0.10	0.11	0.19	0.21	0.23	0.09	0.08	0.13	0.07	0.03	0.22	0.07	0.12	0.08	0.12	50.87	
35	0.08	0.04	0.07	0.07	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.12	0.06	0.08	0.11	0.04	0.12	0.10	0.07	34.77	

表 4 17 批样品共有峰的相对保留时间

Table 4 Relative retention time of common peaks for 17 batches of samples

共有峰	相对保留时间																		
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	均值	RSD/%
1	0.045 7	0.045 6	0.045 5	0.045 5	0.045 5	0.045 9	0.045 8	0.045 8	0.045 5	0.045 4	0.045 4	0.045 6	0.045 3	0.045 3	0.045 5	0.045 5	0.045 5	0.045 6	0.352
2	0.064 3	0.064 2	0.064 4	0.064 3	0.064 2	0.064 2	0.064 4	0.064 2	0.064 3	0.064 2	0.064 2	0.064 1	0.064 2	0.064 3	0.064 2	0.064 1	0.064 1	0.064 2	0.156
3	0.073 8	0.073 7	0.074 3	0.074 1	0.074 2	0.073 4	0.073 9	0.074 3	0.073 6	0.073 1	0.073 2	0.073 7	0.073 4	0.073 2	0.073 5	0.072 1	0.072 1	0.073 5	0.893
4	0.079 1	0.079 0	0.079 4	0.079 3	0.079 4	0.078 7	0.079 0	0.080 1	0.079 5	0.079 1	0.079 0	0.079 6	0.081 5	0.079 3	0.079 3	0.078 1	0.078 1	0.079 3	0.966
5	0.117 7	0.117 7	0.118 3	0.117 8	0.118 4	0.117 8	0.117 9	0.118 8	0.118 4	0.118 0	0.118 1	0.118 7	0.118 1	0.118 1	0.118 4	0.117 0	0.117 0	0.118 0	0.418
6	0.176 8	0.177 3	0.177 4	0.177 0	0.177 5	0.177 2	0.177 1	0.178 2	0.177 8	0.177 6	0.178 0	0.178 6	0.178 0	0.177 8	0.177 8	0.176 1	0.176 1	0.177 4	0.383
7	0.193 6	0.193 7	0.194 1	0.193 8	0.194 1	0.193 8	0.193 8	0.195 1	0.194 3	0.194 1	0.194 2	0.194 9	0.194 4	0.194 1	0.194 1	0.192 9	0.192 9	0.194 0	0.290
8	0.206 1	0.206 4	0.206 5	0.206 3	0.206 3	0.206 5	0.206 2	0.207 3	0.206 6	0.206 7	0.206 6	0.207 3	0.207 0	0.206 8	0.206 5	0.205 2	0.205 2	0.206 4	0.283
9	0.213 3	0.213 1	0.213 4	0.213 0	0.213 4	0.213 1	0.213 2	0.213 9	0.213 5	0.213 2	0.213 3	0.213 8	0.213 7	0.213 4	0.213 2	0.211 9	0.211 9	0.213 2	0.252
10	0.263 6	0.263 0	0.263 9	0.263 5	0.264 2	0.263 5	0.263 4	0.264 9	0.264 1	0.263 9	0.264 1	0.264 2	0.264 2	0.264 2	0.263 7	0.262 5	0.262 5	0.263 7	0.240
11	0.279 1	0.278 9	0.279 5	0.279 9	0.279 5	0.279 0	0.278 8	0.280 6	0.279 6	0.279 3	0.279 3	0.280 2	0.280 4	0.279 6	0.279 3	0.277 9	0.277 9	0.279 3	0.262
12	0.306 5	0.306 2	0.306 5	0.304 4	0.305 8	0.305 1	0.304 8	0.307 3	0.306 5	0.306 3	0.305 9	0.305 7	0.306 3	0.305 4	0.304 8	0.304 1	0.304 1	0.305 6	0.309

续表 4

共有峰	相对保留时间																	均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17		
13	0.349 4	0.349 3	0.349 6	0.348 7	0.349 1	0.348 5	0.348 4	0.350 9	0.349 4	0.349 2	0.349 3	0.350 4	0.349 9	0.349 1	0.348 7	0.347 9	0.347 9	0.349 2	0.229
14	0.438 3	0.438 7	0.439 1	0.438 4	0.437 4	0.436 8	0.438 2	0.440 2	0.438 7	0.438 8	0.439 1	0.439 5	0.440 0	0.438 6	0.437 7	0.438 0	0.438 0	0.438 5	0.202
15	0.457 3	0.457 9	0.459 0	0.455 4	0.455 9	0.454 6	0.454 8	0.459 4	0.457 7	0.458 1	0.458 0	0.456 8	0.457 7	0.456 8	0.455 2	0.456 9	0.456 9	0.457 0	0.310
16	0.709 5	0.709 9	0.709 4	0.708 4	0.708 8	0.709 2	0.705 6	0.710 5	0.709 6	0.709 4	0.706 1	0.706 8	0.710 6	0.709 1	0.709 6	0.706 6	0.706 6	0.708 6	0.223
17	0.987 4	0.987 6	0.988 3	0.988 4	0.987 5	0.988 3	0.986 8	0.988 1	0.988 1	0.988 3	0.987 0	0.988 2	0.987 8	0.987 8	0.987 8	0.987 3	0.987 3	0.987 8	0.048
18 (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	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.000
19	1.031 0	1.030 9	1.031 2	1.031 2	1.030 8	1.031 0	1.026 2	1.031 0	1.030 6	1.031 1	1.026 8	1.031 0	1.030 9	1.031 0	1.030 9	1.026 6	1.026 6	1.029 9	0.188
20	1.052 5	1.052 5	1.052 6	1.052 6	1.052 5	1.052 8	1.052 5	1.053 3	1.052 3	1.052 9	1.052 9	1.052 4	1.052 5	1.052 7	1.052 7	1.052 5	1.052 5	1.052 6	0.023
21	1.075 9	1.075 6	1.076 0	1.076 1	1.075 6	1.075 9	1.075 5	1.076 0	1.075 3	1.075 8	1.070 9	1.075 8	1.075 4	1.075 7	1.075 6	1.075 7	1.075 7	1.075 4	0.110
22	1.086 4	1.087 3	1.087 5	1.086 8	1.086 5	1.085 2	1.087 6	1.087 6	1.086 5	1.086 6	1.087 6	1.087 1	1.087 2	1.087 5	1.087 4	1.087 4	1.087 4	1.087 0	0.059
23	1.111 3	1.111 0	1.111 8	1.111 9	1.111 2	1.111 4	1.111 3	1.111 7	1.110 9	1.111 7	1.111 5	1.111 3	1.110 7	1.111 3	1.111 2	1.111 2	1.111 2	1.111 3	0.029
24	1.127 3	1.127 2	1.128 0	1.129 1	1.127 2	1.128 4	1.127 0	1.127 9	1.127 9	1.128 0	1.127 4	1.127 5	1.127 8	1.127 1	1.127 2	1.127 3	1.127 3	1.127 6	0.048
25	1.159 4	1.159 3	1.159 9	1.160 0	1.159 5	1.159 5	1.159 1	1.160 0	1.159 3	1.159 8	1.159 7	1.159 7	1.159 0	1.159 4	1.159 3	1.159 5	1.159 5	1.159 5	0.024
26	1.265 1	1.265 0	1.265 9	1.265 9	1.265 4	1.265 4	1.264 9	1.265 8	1.264 9	1.265 5	1.265 6	1.265 3	1.264 7	1.265 0	1.265 1	1.265 2	1.265 2	1.265 3	0.029
27	1.300 2	1.300 2	1.301 1	1.301 3	1.300 4	1.300 4	1.300 2	1.301 1	1.300 1	1.301 0	1.301 0	1.300 8	1.300 0	1.300 2	1.300 2	1.300 4	1.300 4	1.300 5	0.032
28	1.395 6	1.395 5	1.396 4	1.396 5	1.395 8	1.396 0	1.395 3	1.396 4	1.395 2	1.395 9	1.395 8	1.396 0	1.395 3	1.395 7	1.395 4	1.395 7	1.395 7	1.395 8	0.028
29	1.409 7	1.409 5	1.410 5	1.410 6	1.409 8	1.410 0	1.409 9	1.410 4	1.409 3	1.410 2	1.410 4	1.410 2	1.409 5	1.409 8	1.409 5	1.410 3	1.410 3	1.410 0	0.029
30	1.420 1	1.420 2	1.420 9	1.421 0	1.420 3	1.420 4	1.420 0	1.421 1	1.419 7	1.420 4	1.420 4	1.420 4	1.419 7	1.420 3	1.419 9	1.420 4	1.420 4	1.420 3	0.028
31	1.531 9	1.532 0	1.532 7	1.532 7	1.531 9	1.532 1	1.531 6	1.532 5	1.531 4	1.532 3	1.532 2	1.532 6	1.531 6	1.531 6	1.531 7	1.532 8	1.532 8	1.532 1	0.031
32	1.563 6	1.563 6	1.564 5	1.564 8	1.563 7	1.564 1	1.563 2	1.564 5	1.563 1	1.564 2	1.563 8	1.563 4	1.563 5	1.563 5	1.563 6	1.564 4	1.564 4	1.563 9	0.032
33	1.962 1	1.961 3	1.963 7	1.963 6	1.962 8	1.962 4	1.961 5	1.962 8	1.961 0	1.962 6	1.962 2	1.961 3	1.961 2	1.961 3	1.961 1	1.963 3	1.963 3	1.962 2	0.048
34	1.972 1	1.971 2	1.973 7	1.973 6	1.972 7	1.972 4	1.971 5	1.972 8	1.971 0	1.972 6	1.972 1	1.971 3	1.971 1	1.971 3	1.971 0	1.973 3	1.973 3	1.972 2	0.048
35	1.999 3	1.998 4	2.000 9	2.000 9	1.999 9	1.999 6	1.998 7	2.000 1	1.998 3	1.999 9	1.999 4	1.998 6	1.998 4	1.998 5	1.998 2	2.000 6	2.000 6	1.999 4	0.048

3 数据分析

3.1 指纹图谱的相似度评价

采用国家药典委员会《中药色谱特征图谱相似度评价系统软件》(2012 版 A),以指纹图谱共有模式为对照,计算 17 批鸡血藤样品的相似度,结果见表 5。结果表明,各批次相似度在 0.816~0.968,相似度在 0.9 以上的药材占 64.70%,说明药材中化学成分相似度较高,但可能由于鸡血藤药材生产过程中受到气候、土壤、环境等因素以及采收加工过程中诸多因素的影响,表现出一定的差异。

3.2 聚类分析

以 35 个共有峰的峰面积为变量,运用 SAS 9.3 数据处理软件对 17 批鸡血藤样品进行聚类分析,采用离差平方和法,以欧氏距离作为样品相似度的测度,结果见图 3。当分类距离为 8 时,可分为 2 类,样品 S1、S10、S9、S3、S17、S2、S8、S6、S11、

表 5 17 批样品相似度分析结果

Table 5 Similarity of common peaks for 17 batches of samples

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.900	S10	0.925
S2	0.890	S11	0.932
S3	0.912	S12	0.916
S4	0.816	S13	0.918
S5	0.880	S14	0.896
S6	0.898	S15	0.968
S7	0.890	S16	0.936
S8	0.912	S17	0.965
S9	0.908		

S16、S4、S13、S12 聚为一类,样品 S5、S14、S7、S15 聚为一类。聚类趋势与相似度计算结果基本一致,2 种方法的结果得到了相互验证。

3.3 PCA

分别以鸡血藤指纹图谱的共有峰的峰面积为变

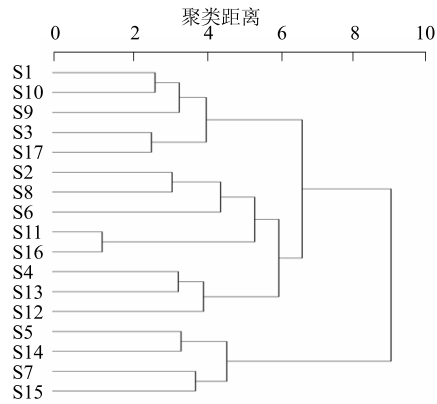


图 3 17 批鸡血藤药材聚类分析树状图
Fig. 3 Hierarchical cluster analysis for 17 batches of *S. suberectus*

量, 通过 SAS 9.3 数据处理软件对原始数据做标准化处理后进行 PCA, 以主成分的特征值和贡献率作为选择主成分的主要依据, 抽取的主成分特征值及贡献率见表 6。根据主成分个数的提取原则^[4]——取特征值大于 1 的主成分, 本实验可提取 9 个主成分, 其累积方差贡献率达 91.10%, 由于变量诸多, 不利于处理数据。经分析, 若取前 5 个主成分其累积方差贡献率达 69.82%, 具有很好的代表性。因此, 分别取第 1、2、3、4、5 个因子作为主成分 1、2、3、4 和 5, 可代表鸡血藤指纹图谱共有峰的大部分信息。

通过 SIMCA-P 13.0 软件, 以 35 个共有峰的峰面积为变量, 完成 PCA 模式图, 见图 4。由图 4 可见, 17 批药材可分为 2 类, 样品 S1、S10、S9、S3、S17、S2、S8、S6、S11、S16、S4、S13、S12 为一类, 样品 S5、S14、S7、S15 为一类, 与聚类分析结果一致。由图 4 还可以看出, 不同产地样品存在

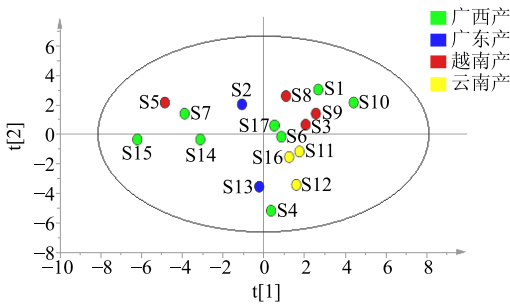


图 4 鸡血藤 PCA 分析模式图
Fig. 4 PCA result of *S. suberectus*

差异性, 相同产地样品也存在差异性。产地为广西的样品离散度较大, 差异性较大; 产地为广东的两个样品 S2 和 S13 差异性也较大; 产地为越南的样品 S3、S8、S9 分布较为集中, 差异性较小, 但样品 S5 的分布较为分散, 与 S3、S8、S9 的差异性较大; 产地为云南的样品 S11、S12、S16 分布较为集中, 差异性较小。

4 讨论

4.1 提取方法的考察

本实验考察了回流法、超声提取法、索氏提取法和浸渍法, 结果发现, 回流法的提取率较其他 3 种方法的提取率高, 因此选择回流提取法。同时对提取溶剂进行考察, 分别选择了氯仿、醋酸乙酯、不同浓度 (50%、70%、90%、100%) 甲醇、乙醇以及不同比例氯仿与甲醇为提取溶剂, 发现以氯仿-甲醇 (4:1) 为提取溶剂时, 色谱峰基线较为平稳、提取率最高、杂质干扰较少, 因此选择氯仿-甲醇 (4:1) 为提取溶剂。

4.2 色谱条件的优化

本实验比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-甲酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液, 实验结果表明乙腈-磷酸水溶液的分离效果较好, 本实验又进一步比较了乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.3%磷酸水溶液的影响, 结果表明乙腈-0.2%磷酸水溶液作为流动相时, 峰的对称性最好, 因此本实验选择乙腈-0.2%磷酸水溶液作为流动相。

综合对鸡血藤最大吸收波长的文献报道^[5-8], 采用 PDA 检测器在 210~400 nm 内扫描, 并比较波长 210、260、270、280 nm 的色谱图, 结果表明, 260 nm 处的色谱峰信息较其他波长的信息全面, 杂质干扰小, 色谱图特征性强, 因此选择 260 nm 为检测波长。

表 6 相关矩阵的特征值

Table 6 Eigenvalues of correlation matrix				
主成分	特征值	距离	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	8.441 3	2.856 1	0.241 2	0.241 2
2	5.585 2	1.683 5	0.159 6	0.400 8
3	3.901 7	0.276 1	0.111 5	0.512 2
4	3.625 6	0.743 0	0.103 6	0.615 8
5	2.882 6	0.327 7	0.082 4	0.698 2
6	2.554 9	0.315 4	0.073 0	0.771 2
7	2.239 6	0.749 7	0.064 0	0.835 2
8	1.489 9	0.326 3	0.042 6	0.877 7
9	1.163 6	0.213 5	0.033 2	0.911 0

4.3 HPLC 指纹图谱结果分析

本实验通过比较 17 批不同产地正品鸡血藤和 4 批鸡血藤混伪品的 HPLC 指纹图谱,发现 4 批混伪品与正品鸡血藤的 HPLC 指纹图谱的整体轮廓差别很大。木通科大血藤的 HPLC 指纹图谱中 70 min 后色谱峰较少;来源于豆科的山鸡血藤的 HPLC 指纹图谱中色谱峰较少,主要集中在 60 min 以后;豆科植物白花油麻藤的 HPLC 指纹图谱中色谱峰相对较多,但与正品鸡血藤的指纹图谱的整体轮廓差别很大。通过以分析可知,以上 3 种混伪品不能作为鸡血藤药用。

本实验收集了 17 批不同产地的鸡血藤药材,优化色谱条件,建立了鸡血藤药材的 HPLC 指纹图谱,可以反映鸡血藤药材的整体性与特异性,为其质量控制提供参考依据。在 35 个共有峰中,其中有 6 个色谱峰经指认分别为原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、甘草素、山柰酚、芒柄花素。使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统分析得各批次样品与共有模式的相似度为 0.816~0.968,相似度较高,差异相对较小。指纹图谱中共有峰的相对保留时间的 RSD 值差异较小,但相对峰面积的 RSD 值差异较大,可能是由于药材再生产过程中受到温度、湿度、气候等环境因素以及在加工运输过程中人为因素的影响。

本实验利用了聚类分析和 PCA 2 种方法对鸡血藤药材的 HPLC 指纹图谱进行分析。聚类分析是将相似的样品或变量归类的常用方法,以 35 个共有峰的峰面积为变量试用了类平均法、离差平方和法、最大相似系数法对 17 批鸡血藤药材进行聚类分析,结果分析,离差平方和法所得结果较为合理,与相似度结果一致,所以采用了离差平方和法,以欧氏距离作为样品相似度的测度,将 17 批样品分成 2 类,样品 S1、S10、S9、S3、S17、S2、S8、S6、S11、S16、S4、S13、S12 聚为一类,样品 S5、S14、S7、S15 聚为一类。

PCA 是利用降维的思想,将多个变量(指标)化为几个互不相关的综合变量(指标),通过信息处理找出合适的方法对样本进行分类,用多元分析方法建立样本之间的相互关系^[9]。本实验将 35 个特征变量降维至 9 个主成分,选择前 5 个主成分代表鸡血藤指纹图谱共有峰的大部分信息。由图 3 可知样品 S1、S10、S9、S3、S17、S2、S8、S6、S11、S16、S4、S13、S12 为一类,样品 S5、S14、S7、S15 为一类,与聚类分析结果一致,与相似度结果一致。

本实验建立了鸡血藤的 HPLC 指纹图谱,共确定了 35 个共有峰,中药指纹图谱具有整体性和模糊性的特点,单纯地比较色谱峰的相似度可能会产生歧义,因此本实验采用指纹图谱结合聚类分析和 PCA 对不同产地的鸡血藤进行质量评价,为鸡血藤药材的质量控制和质量鉴别提供可靠的依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 崔艳君, 刘 屏, 陈若芸, 等. 鸡血藤化学成分研究 [J]. 药学学报, 2002, 37(10): 784-786.
- [3] 陈道峰, 徐国钧, 徐路珊, 等. 中药鸡血藤的原植物调查与商品鉴定 [J]. 中草药, 1993, 24(1): 34-37.
- [4] 孙振球. 医学统计学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [5] 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): 461-463.
- [6] 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): 556-559.
- [7] 陈红英, 严 萍, 张 敏, 等. 不同产地鸡血藤药材高效液相指纹图谱及芒柄花素含量分析 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(5): 923-927.
- [8] 符 影, 程 悦, 陈建萍, 等. 鸡血藤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1229-1234.
- [9] 王 黎, 高苏亚, 李 华. 不同产地粉葛的指纹图谱及 PVA 模式识别分析研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(4): 450-451.