

# 鸡血藤抗肿瘤活性部位 SSCE 指纹图谱的研究

王宏<sup>1</sup>, 刘艺娜<sup>2</sup>, 曾祖平<sup>1</sup>, 何薇<sup>1\*</sup>

(1. 首都医科大学 附属北京中医医院 北京市中医研究所, 北京 100010;

2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010)

**[摘要]** 目的: 建立鸡血藤黄酮类抗肿瘤活性部位(SSCE)的 HPLC-DAD 色谱指纹图谱, 全面完整的反映了本部位内在的化学信息, 并初步指认其中的主要化学成分。方法: 采用 HPLC-DAD 检测, 梯度洗脱的分析方法。Kromasil 100-5PHENYL 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 0.5% 冰醋酸水溶液-甲醇; 检测波长 254 nm。结果: 建立了 10 批鸡血藤药材中 SSCE 的 HPLC-DAD 色谱指纹图, 获得了 16 个共有峰, 并有 10 个色谱峰被指认。其中, 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 16 号分别被确定为原儿茶酸, 对羟基苯甲酸, 表儿茶素, 葛根素, 大豆苷元, 甘草素, 毛蕊异黄酮, 染料木素, 芒柄花素和樱黄素。结论: 方法简便, 精密度、重现性和稳定性良好, 能有效控制中药鸡血藤黄酮类抗肿瘤活性部位(SSCE)的质量, 为筛选鸡血藤抗肿瘤活性成分、进行药理研究提供质量保证。

**[关键词]** HPLC; 鸡血藤; 中药指纹图谱; 活性部位

鸡血藤为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎。具有活血补血, 调经止痛, 舒筋活络之功效; 用于月经不调, 痛经, 经闭, 风湿痹痛, 麻木瘫痪, 血虚萎黄等症<sup>[1]</sup>。现代药理研究, 其具有激活造血系统、降血压、抗心律失常、抗病毒、抗肿瘤以及抗脂质过氧化的生理活性<sup>[2]</sup>。

首都医科大学附属北京中医医院院内制剂“固本抑瘤 II 号”(京药制字 Z20053351) 治疗 340 例肿瘤患者, 取得较好疗效<sup>[3]</sup>, 通过对“固本抑瘤 II 号”的拆方研究, 发现方中行气活血组中药鸡血藤具有明显的抑瘤作用<sup>[4]</sup>。本课题组成功地从中分离纯化出富含黄酮类化合物的有效组分 SSCE(鸡血藤柱色谱提取物), 并通过体外、体内药效学实验对其进行抗肿瘤作用研究。结果显示: SSCE 具有直接抗肿瘤作用, 细胞周期阻滞是其确切抗肿瘤作用机制之一, 阻滞肺癌细胞系 A549 于 S 和 G<sub>2</sub>/M 期, 阻滞肠癌细胞系 HT229 于 G<sub>2</sub>/M 期<sup>[5]</sup>; 低剂量 SSCE 对小鼠 Lewis 肺癌的抑制率最高, 为 28.6%, 同时具有抗

转移作用, 作用细胞周期为 G<sub>1</sub> 期, 凋亡率各组无显著性差异。刺激骨髓造血, 且无骨髓抑制作用<sup>[6]</sup>。

为有效控制 SSCE 质量, 保证药理研究的重现性、可靠性, 本文建立了鸡血藤抗肿瘤活性部位色谱指纹图谱测定方法。

## 1 材料

Agilent1200 高效液相色谱仪(包括四元泵, 脱气机, 自动进样器, 二极管阵列紫外检测器); METTLER AJ150 分析电子天平(METTLER); ZK-072 型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂); LDZ5-2 离心机(北京医用离心机厂); KODUS SK7210HP 超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

对照品原儿茶酸(P5630)、大豆苷元(D7802)、白芷内酯(A0956)、染料木素(G6649)购于 Sigma 公司; 芒柄花素(47752)、樱黄素(82415)购于 Fluka 公司; 大豆苷(E-0004)、甘草素(E-0309)、毛蕊异黄酮(E-0156)、异甘草素(E-0044)等购于同田生物科技有限公司; 对羟基苯甲酸(H20059)购于 Aldrich 公司; 表儿茶素(110878-200102)、葛根素(110752-200912)购于中国药物生物制品检定所(以上对照品纯度均在 98% 以上, 符合含量测定标准)。甲醇、乙醇为色谱纯, 购自 Fisher 公司; 水为蒸馏水, 本院制剂室提供; 其余试剂均为分析纯; 10 批鸡血藤药材为本院中药房收集提供, 样品信息见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性实验

Kromasil 100-5

[稿件编号] 20101126001

[基金项目] 北京市科技项目(H010910190119)

[通信作者] \* 何薇, 主任药师, 主要从事中药化学、中药制剂方面的工作, Tel: (010) 52176674, Tax: (010) 52176849, E-mail: he-wei1124@sina.com.cn

[作者简介] 王宏, E-mail: whpgsl030701@sina.com

表 1 10 批不同来源鸡血藤药材信息

No.	生产厂家	产地	批号
1	北京盛世龙药业有限公司	广东	0807053
2	北京丰泰金源药业有限公司	广西	08062001
3	北京仟草中药饮片有限公司	广西	090212001
4	北京卫仁中药饮片厂	广东	603309101
5	北京华邈中药技术开发中心	广西	081106
6	北京华邈中药技术开发中心	广西	080306
7	北京人卫中药饮片厂	广西	09031806
8	北京太阳树康中药饮片厂	广西	0906098
9	北京盛世龙药业有限公司	广西	090713
10	北京盛世龙药业有限公司	广东	0806088

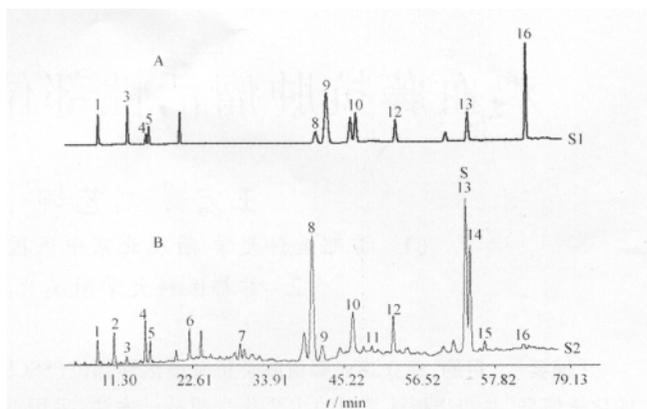
phenyl 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相 0.5% 醋酸水溶液(A)-甲醇溶液(B) 梯度洗脱,条件见表 2 检测波长 254 nm,柱温 25 °C,流速 1 mL · min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序 %

t/min	A	B
0	20	80
20	45	55
40	45	55
45	55	45
55	55	45
80	80	20
85	100	0
90	100	0

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取各对照品适量于 10 mL 量瓶中,甲醇超声溶解后,定容,摇匀,制成鸡血藤对照品混合溶液,按上述色谱条件依法测定,见图 1。按出峰时间依次为原儿茶酸、对羟基苯甲酸、表儿茶素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、甘草素、白芷内酯、毛蕊异黄酮、染料木素、异甘草素、芒柄花素、樱黄素。另 3 个对照品大豆苷、白芷内酯及异甘草素因在样品中含量极低,因此未在图 1 中标出。

**2.3 供试品溶液的制备** 称取鸡血藤药材 100 g,加入 500 mL 80% 乙醇溶液浸泡过夜,加热回流提取 3 次,每次 2 h,放置室温后 180 目筛滤过,合并滤液,浓缩至稠膏后真空干燥,得鸡血藤粗提物。精密称取 1 g 鸡血藤粗提物,以去离子水分次溶解,离心(3 500 r · min<sup>-1</sup>, 20 min),取上清液置于已处理好的聚酰胺柱(Φ=1 cm,柱高 11 cm,聚酰胺 5 g,去离子水洗涤备用),



A. 对照品 HPLC 图; B. 有效部位 HPLC 图; 1. 原儿茶酸; 3. 对羟基苯甲酸; 4. 表儿茶素; 5. 葛根素; 8. 大豆苷元; 9. 甘草素; 10. 毛蕊异黄酮; 12. 染料木素; 13. 芒柄花素; 16 樱黄素。

图 1 鸡血藤对照品混合溶液色谱图及其指纹图共有模式

得鸡血藤抗肿瘤活性有效部位 SSCE。将得到的 SSCE 以适量去离子水溶解,乙醚振荡提取 3 次(10, 10, 5 mL),合并乙醚层,挥净乙醚后,残渣用甲醇使溶解,转移至 2 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

**2.4 精密度试验** 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,考察被确认为是共有峰的相对保留时间和相对保留峰面积的一致性,结果各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.5%,相对保留峰面积的 RSD < 3%,表明仪器精密度良好。

**2.5 重复性试验** 取同一批次的供试品溶液 5 份,同法制备和检测,考察被确认共有峰的相对保留时间和相对保留峰面积的一致性,结果各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.5%,相对保留峰面积 RSD < 3%,表明该实验方法重复性良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别在 0, 3, 6, 10, 16, 24 h 检测,考察被确认共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各色谱峰相对保留时间 RSD < 0.5%,相对保留峰面积 RSD < 3%,说明溶液在 24 h 内基本稳定。

**2.7 专属性试验** 取不含供试品溶液的空白溶剂,按供试品溶液测定方法测定,结果空白溶剂无干扰,无严重基线漂移现象,专属性良好。方法学考察结果见表 3。

**2.8 鸡血藤活性部位指纹图谱共有模式及主要色谱峰的指认** 取上述鸡血藤对照品混合溶液,同法测定,得对照品混合溶液色谱图,与供试品溶液色谱

表 3 方法学考察 %

No	相对保留时间 RSD			相对峰面积 RSD		
	精密度	稳定性	重复性	精密度	稳定性	重复性
1	0.16	0.25	0.18	1.6	2.5	1.6
2	0.12	0.23	0.25	0.91	1.2	2.1
3	0.20	0.31	0.23	1.0	1.5	1.9
4	0.20	0.27	0.18	2.1	2.8	1.3
5	0.21	0.31	0.35	0.9	1.2	1.5
6	0.20	0.32	0.41	1.3	1.2	1.6
7	0.21	0.29	0.33	1.7	2.5	1.9
8	0.11	0.16	0.21	1.0	1.4	0.64
9	0.14	0.16	0.20	1.5	1.6	1.4
10	0.10	0.06	0.08	1.8	2.1	1.6

图(16个共有峰依次以阿拉伯数字1~16表示)对比,10个色谱峰分别被指认。其中,8号及13号色谱峰相对含量较高,10号及12号色谱峰次之,3号及16号色谱峰相对含量较少。对照品混合溶液色谱图及其指纹图共有模式,见图1。

2.9 10批鸡血藤 SSCE 样品溶液的测定 将10批供试品溶液,按色谱条件测定,得10批 SSCE 色谱数据,导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”中,中位数法计算,得中药鸡血藤 SSCE HPLC 指纹图,并获得了16个共有峰,

见图2。附相似度软件评价结果见表4,共有峰相对保留时间和相对峰面积结果见表5,表6。

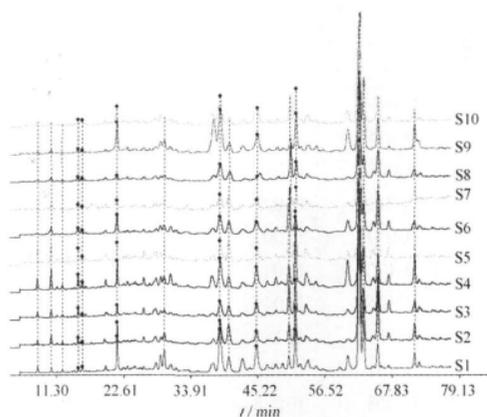


图 2 10 批鸡血藤 SSCE HPLC 指纹图

表 4 相似度评价结果

No.	相似度	No.	相似度
1	0.951	6	0.985
2	0.993	7	0.991
3	0.995	8	0.977
4	0.944	9	0.901
5	0.970	10	0.987

表 5 SSCE 样品中 16 个共有峰的相对保留时间

共有峰	供试品									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.129	0.129	0.129	0.129	0.129	0.129	0.130	0.129	0.130	0.129
2	0.166	0.166	0.166	0.166	0.166	0.167	0.168	0.167	0.167	0.167
3	0.197	0.197	0.197	0.197	0.197	0.196	0.197	0.197	0.197	0.197
4	0.240	0.240	0.240	0.240	0.239	0.239	0.240	0.240	0.240	0.240
5	0.250	0.260	0.250	0.250	0.250	0.249	0.251	0.250	0.251	0.250
6	0.345	0.346	0.345	0.345	0.345	0.345	0.345	0.345	0.346	0.345
7	0.473	0.473	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472
8	0.626	0.625	0.624	0.623	0.623	0.624	0.621	0.621	0.621	0.621
9	0.650	0.648	0.648	0.647	0.648	0.648	0.646	0.646	0.645	0.645
10	0.726	0.725	0.724	0.724	0.724	0.725	0.722	0.715	0.722	0.722
11	0.812	0.812	0.811	0.811	0.811	0.811	0.812	0.812	0.812	0.812
12	0.829	0.828	0.828	0.828	0.828	0.828	0.828	0.828	0.828	0.828
13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	1.011	1.011	1.011	1.012	1.011	1.011	1.011	1.012	1.012	1.012
15	1.049	1.050	1.051	1.051	1.050	1.050	1.051	1.051	1.051	1.051
16	1.147	1.148	1.149	1.149	1.147	1.147	1.151	1.150	1.150	1.150

### 3 讨论

鸡血藤属传统的活血化瘀中药,始见于清·《本草纲目拾遗》,为临床常用中药。现代药理研究

显示,鸡血藤黄酮类组分具有直接抗肿瘤活性,而且表现出低毒、副作用小等特点。作为天然抗肿瘤药物,近年来学者对其化学成分和抗肿瘤作用分子机

制分别研究的较多,但未将其化学成分和药理作用 联系起来,建立起具有实际意义的“谱效关系”<sup>[7]</sup>。

表6 SSCE样品中16个共有峰的相对峰面积

共有峰	供试品									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.019	0.014	0.016	0.043	0.039	0.011	0.019	0.011	0.022	0.002
2	0.015	0.034	0.025	0.089	0.087	0.026	0.017	0.019	0.010	0.008
3	0.008	0.010	0.008	0.018	0.017	0.022	0.006	0.017	0.001	0.017
4	0.012	0.022	0.027	0.061	0.061	0.015	0.014	0.018	0.012	0.012
5	0.019	0.007	0.007	0.031	0.022	0.038	0.029	0.013	0.031	0.012
6	0.170	0.021	0.031	0.109	0.073	0.076	0.034	0.018	0.140	0.050
7	0.105	0.049	0.025	0.070	0.066	0.038	0.058	0.020	0.059	0.012
8	0.385	0.184	0.125	0.362	0.242	0.144	0.141	0.177	0.453	0.219
9	0.131	0.150	0.077	0.124	0.217	0.105	0.138	0.112	0.081	0.042
10	0.208	0.078	0.085	0.210	0.135	0.089	0.079	0.012	0.160	0.101
11	0.064	0.084	0.143	0.124	0.219	0.225	0.082	0.308	0.065	0.108
12	0.217	0.175	0.160	0.354	0.310	0.067	0.133	0.141	0.217	0.134
13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	0.297	0.230	0.148	0.308	0.238	0.153	0.150	0.220	0.493	0.152
15	0.129	0.265	0.216	0.222	0.387	0.252	0.133	0.292	0.190	0.110
16	0.067	0.079	0.067	0.188	0.096	0.056	0.069	0.053	0.137	0.051

本实验在确定了鸡血藤抗肿瘤活性有效部位的基础上,对该部位建立指纹图谱。实验目的明确,方法简便,精密度、稳定性、重现性良好,基本符合指纹图谱研究的相关技术要求。获得了16个共有峰,并指出了其中10个黄酮类成分,较全面的揭示了该部位的化学物质基础,为其质量控制提供了一定的依据,可有效控制该部位的质量。

实验中制备供试品溶液时,将SSCE部位依次用氯仿、乙醚、乙酸乙酯萃取,得氯仿、乙醚、乙酸乙酯层和水层部位。按上述色谱条件测定各部位,结果乙醚层供试品出峰数目多且分离度良好,具有代表性,能较为全面的反映出该活性部位(SSCE)化学成分的基本概况。

实验中对4种流动相体系(水-甲醇、水-乙腈、0.5%醋酸水-甲醇、0.5%醋酸水-乙腈)、4种不同型号色谱柱(Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>, 4.6 mm × 150 mm; Kromasil 100-5NH<sub>2</sub>, 4.6 mm × 150 mm; Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 4.6 mm × 150 mm; Kromasil 100-5PHENYL, 4.6 mm × 250 mm)进行了优化,结果以本实验所选用的流动相及色谱柱对供试品溶液分

离度好,色谱峰数目多。

选择光谱采集范围190~400 nm,分别测定13个对照品溶液最大吸收波长,均匀分布在245~280 nm,靠近254 nm较多。因此选取254, 280 nm作为检测波长双波长检测。结果以254 nm作为检测波长较为合理,供试品出峰数目多且分离度良好。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2005:134.

[2] 冯雪娇. 鸡血藤抗肿瘤活性成分的分离纯化与结构鉴定[D]. 北京:北京工商大学, 2009.

[3] 张青, 郁仁存, 唐武军. 固本抑瘤II号抗肿瘤的临床研究[J]. 中国中医药信息杂志 2000, 7(7): 41.

[4] 张甘霖, 李萍, 王笑民. 固本抑瘤II号及其拆方对A549抑瘤及与化疗联合用药的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(1): 35.

[5] 唐勇, 何薇, 王笑民. 鸡血藤黄酮类组分抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志 2007, 13(2): 51.

[6] 付琦, 唐勇, 何薇. 鸡血藤SSCE体内抗肿瘤作用及机制研究[J]. 中国中药杂志 2009, 34(12): 1570.

[7] 顾英, 冯怡, 李玉敏. 指纹图谱在中药物质基础研究中的应用[J]. 中成药, 2007, 29(7): 1048.

## Study on HPLC chromatographic fingerprint of anti-tumor active site SSCE of *Caulis spatholobi*

WANG Hong<sup>1</sup>, LIU Yina<sup>2</sup>, ZENG Zuping<sup>1</sup>, HE Wei<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine  
Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China;

2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

**[Abstract] Objective:** To establish the chromatographic fingerprints for the anti-tumor flavonoids of *Caulis spatholobi* (SSCE). It could used to reflect the chemical information in this part comprehensively, and identify the chemical constituents preliminarily. **Method:** The HPLC-DAD analysis method was performed on the column Kromasil 100-5PHENYL (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was water(0.5% acetic acid)–methanol in gradient elution and the detection wavelength was 254 nm. **Result:** The chromatographic fingerprint of SSCE was established, which showed 16 characteristic peaks from 10 batches of medicinal materials. Among them, the peaks 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, and 16 were identified 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-Hydroxybenzoic Acid, epicatechin, puerarin, daidzein, liquiritigenin, calycosin, genistein, formononetin, and prunetin, respectively. **Conclusion:** The method is convenient, reproducibility and stability. It can used for quality control of the anti-tumor flavonoids of *C. spatholobi* (SSCE).

**[Key words]** HPLC; *Caulis Spatholobi*; Fingerprints; active site

doi: 10.4268/cjcm20111816

[责任编辑 丁广治]

### 《中国中药杂志》现状简介

国际检索和收录: SCI-E 总被引频次达到 443(285 篇文献); 被美国《医学索引》(Medline/PubMed) 收录, 在被 Medline 收录的中国期刊中排名第 4 位, 居我国药学和中医药学期刊首位; 被美国《化学文摘(网络版)》(CA, Chemical Abstracts Web) 在千刊表中排名第 232 位。同时, 还被荷兰爱思唯尔公司《斯高帕斯数据库》(Scopus), 美国《生物学文摘(预评)》(BAP, BIOSIS Previews), 俄罗斯《文摘杂志》(AJ, Abstracts Journal, VINITI), 英国《国际农业与生物科学研究文摘》(CABI, Centre for Agriculture and Bioscience Abstracts), 美国《国际药学文摘》(IPA, International Pharmaceutical Abstracts), 美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD, Ulrich's Periodicals Directory), 《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》[JSTChina, Japan Science & Technology Agency(Chinese Bibliographic Database)], 《英国皇家化学学会系列文摘》(RSC, Royal Society of Chemistry), 英国《全球健康》(GH, Global Health), 荷兰《医学文摘》(EM, Excerpta Media), 菲律宾《西太平洋地区医学索引》(WPRIM, Western Pacific Region Index Medicus) 等 14 家权威性专业文摘或数据库收录。

国内收录: 为“中国科学引文数据库”、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊, 中国自然科学核心期刊, 中国中文核心期刊, 中国科技核心期刊, 并被《中国学术期刊文摘》中、英文版收录。

据中国知网(CNKI)“中国科技期刊影响因子年报”公布《中国中药杂志》目前总被引频次达到 17036, 影响因子 1.421, 基金论文比例 0.72, 下载量达到 39.69 万次, 国内外发行达到机构用户 3192 个, 分布在 15 个国家和地区, 个人读者分布在 23 个国家和地区。

据中国科学技术信息研究所最新发布的《中国科技期刊引证报告》(核心版) 期刊检索统计结果表明《中国中药杂志》总被引频次为 5544, 影响因子 0.707, 基金论文比 0.68, 全年发表文章达 800 余篇。期刊综合总排名从 2010 年的第 52 位跃居第 39 位, 在药学类以及中医药学类期刊中位居第一, 全部指标保持多年持续上升, 在我国药学以及中医药学等学科领域科技期刊中均名列前茅。