

# 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别分析相思子叶质量

何翠敏， 黄伟斌， 邱 雨， 袁旭江\*  
(广东药科大学新药研发中心/国家中医药管理局中药制剂三级实验室/广东省教育厅现代中药重点实验室，广东 广州 510006)

**摘要：**目的 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别分析相思子 *Abrus precatorius* L. 叶质量。方法 相思子叶 50% 乙醇提取物的分析采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm× 250 mm, 5 μm)；流动相 0.1% 甲酸- (甲醇-乙腈) (8 : 2)，梯度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 275 nm；柱温 25 ℃。运用聚类分析、主成分分析和热图分析，开展 14 批样品质量及其与成分之间关系的分析。结果 14 批样品指纹图谱中有 14 个共有峰，相似度均大于 0.949。聚类分析和主成分分析结果显示，样品可分成 3 类，与各成分含量及其比例的稳定有关，但与地域无关；热图分析显示，不同来源样品质量差异依次与峰 12、5、6、11、7、14、13、2、1 有关，特别是前 5 种成分。结论 该方法稳定、准确、可靠，可用于相思子叶的质量评价。

**关键词：**相思子；指纹图谱；化学模式识别；HPLC

中图分类号：R284.1 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2021)06-1521-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.024

## Quality analysis of the leaves of *Abrus precatorius* based on HPLC fingerprints and chemical pattern recognition

HE Cui-min, HUANG Wei-bin, QIU Yu, YUAN Xu-jiang\*  
(Key Laboratory of Modern Chinese Medicine of Education Department of Guangdong Province, Guangdong Pharmaceutical University/Class III Laboratory of Modern Chinese Medicine Preparation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the P. R. C./Center for Drug Research and Development, Guangzhou 510006, China)

**KEY WORDS:** *Abrus precatorius* L.; fingerprints; chemical pattern recognition; HPLC

相思子 *Abrus precatorius* L. 为豆科蝶形花亚科相思子属植物的带根全草，俗称印度甘草，原产于印尼，现广泛分布于世界各地的热带和亚热带地区，我国广东、广西等地均有分布，为习用中草药，首载于《千金要方》，其味甘性凉，归肺、肝、肾经，具有清热解毒、利尿消炎、润肺护肝的功效，民间常用于治疗咽喉肿痛、肺热咳嗽、疥疮乳痈、肝炎等<sup>[1-4]</sup>。现代研究发现，相思子富含黄酮<sup>[5-6]</sup>，如牡荆素<sup>[5]</sup>、相思子素<sup>[5]</sup>、芒柄花黄素<sup>[5]</sup>、滨藜黄素<sup>[6]</sup>、滨藜黄苷<sup>[6]</sup>、异柚葡萄糖苷<sup>[5]</sup>等；生物碱<sup>[6]</sup>，如刺桐碱、相思子碱等；三萜<sup>[6-8]</sup>，如甘草酸<sup>[6]</sup>，麦角固醇<sup>[7]</sup>，豆甾醇<sup>[7]</sup>，abrusoside A、B、

C、D<sup>[8]</sup>等；醌<sup>[9-10]</sup>，如 abruquinone A、B、D、J、K、L、I、H；氨基酸<sup>[11]</sup>，如赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等，具有镇痛抗炎<sup>[12]</sup>、抗氧化<sup>[13]</sup>、免疫调节<sup>[14]</sup>、杀虫抑菌<sup>[15-16]</sup>、抗肿瘤<sup>[17]</sup>等活性。但相思子尚未纳入《中国药典》中，而相思藤载录于 2004 年《广东省中药材标准》第 1 版第 2 册，缺乏先进的质控标准，也未见相思子叶指纹图谱研究，因此，建立先进全面的药材质量分析和控制方法尤为重要。

指纹图谱具有系统性、特征性和稳定性，能比较全面地反映中药所含化学成分的种类和数量，为评价中药质量、阐明复杂的药效物质基础提供科学的技术手段<sup>[18]</sup>。化学模式识别主要分析数据的差

收稿日期：2020-09-09  
基金项目：广东省自然科学基金资助项目 (2018A030313312)  
作者简介：何翠敏 (1996—)，女，硕士生，从事中药质量分析与评价研究。Tel：(020) 39352540，E-mail：cuimin827@163.com  
\* 通信作者：袁旭江 (1979—)，男，博士，副研究员，硕士生导师，从事中药开发利用及质量分析。Tel：(020) 39352540，E-mail：xjyuan.xj@163.com

异性,近年来广泛应用于中药鉴别、定性表征、质量控制、组效关系等研究中,它对 HPLC、UPLC-Q-TOF/MS、IR、NMR 等多种现代仪器分析获取的数据进行客观分析,既可对多个指标进行统计,又可将整个图谱信息数量化,被计算机识别与处理,从而可以更加客观地反映中药质量信息,达到全面控制评价的目的<sup>[19-20]</sup>。前期已经开展了相思子叶成分分离、提取工艺、含量测定等相关研究<sup>[6,21-23]</sup>,本实验将在此基础上采用 HPLC 技术建立药材指纹图谱,结合聚类分析、主成分分析评价不同来源药材质量情况,进一步结合热图分析揭示其质量差异与成分的关系,以期为其质量评价和今后开发研究提供参考。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (含 DAD 检测器,美国 Agilent 公司);JJ500Y 型电子分析天平 (0.01 g,广州市晶博电子有限公司);BS124S 型电子分析天平 (0.000 1 g,德国 Sartorius 公司);KQ3200 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。滨蓟黄苷对照品为广东药科大学新药研发中心自制,纯度>99%。甲醇、乙腈为色谱纯;甲酸等其余试剂均为分析纯;水为超纯水。14 批相思子叶采自广东、广西和越南,经广东药科大学新药研发中心袁旭江副研究员鉴定为豆科植物相思子 *Abrus precatorius* L. 的干燥叶子。具体信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	批号	产地	采收期
S1	XSYP-20190501	广西崇左市凭祥县	2019. 05
S2	XSYP-20190502	广西南宁	2019. 05
S3	XSYP-20190601	广东湛江	2019. 06
S4	XSYP-20190602	广西玉林	2019. 06
S5	XSYP-20190603	广西玉林	2019. 06
S6	XSYP-20190604	广东河源	2019. 06
S7	XSYP-20190605	广东梅州	2019. 06
S8	XSYP-20190606	广东广州	2019. 06
S9	XSYP-20190607	越南	2019. 06
S10	XSYP-20191001	广西百色	2019. 10
S11	XSYP-20191002	广西钦州市灵山县	2019. 10
S12	XSYP-20200601	广西百色	2020. 06
S13	XSZ-20200602	广西玉林	2020. 06
S14	XSZ-20200701	广西玉林市陆川县	2020. 07

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 0.1% 甲酸 (A) - (甲醇-乙腈) (8 : 2) (B),梯度洗脱,程序见表 2;体积流量 1.0 mL/min;柱温 25 ℃;检

测波长 275 nm;进样量 10 μL。

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution programs

时间/min	A 0.1% 甲酸/%	B 甲醇-乙腈(8 : 2)/%
0~5	80~75	20~25
5~30	75~50	25~50
30~40	50~5	50~95
40~50	5	95

2.2 供试品溶液制备 取干燥相思子叶粉末 1 g,精密称定,置于锥形瓶中,加 50%乙醇 50 mL,加热回流提取 2 次,每次 1 h,合并 2 次滤液并浓缩,50%乙醇定容至 50 mL 量瓶中,即得 (质量浓度为 20 mg/mL)。

2.3 对照品溶液制备 取 105 ℃烘箱中干燥至恒定质量的滨蓟黄苷对照品适量,精密称定,加 50%乙醇溶解并定容至 50 mL,即得 (质量浓度为 0.05 mg/mL)。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 以滨蓟黄苷色谱峰为参照峰 (S),取供试品溶液 (S1),在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次,计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.35%,相对峰面积 RSD 小于 2.4%;取同一供试品溶液 (S1),在“2.1”项色谱条件下连续进样 3 次,重复 3 d,测得各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.49%,相对峰面积 RSD 小于 3.8%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 以滨蓟黄苷色谱峰为参照峰 (S),取供试品溶液 (S1),在“2.1”项色谱条件下于 0、1、2、4、6、8、12 h 进样测定,测得各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.30%,相对峰面积 RSD 小于 2.7%,表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 以滨蓟黄苷色谱峰为参照峰 (S),取同一批药材 (S1) 6 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,测得各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.48%,相对峰面积 RSD 小于 3.4%,表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱建立

2.5.1 图谱生成 取 14 批样品的供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)”,以 S12 号色谱图为参考,中位数法建立对照图谱,时间窗宽设为 0.1 min,采用多点校正 Mark 峰匹

配，建立指纹图谱，见图 1。

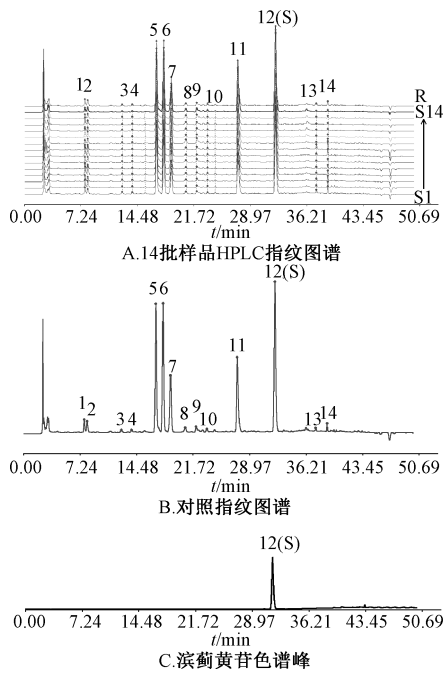


图 1 14 批样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of fourteen batches of samples

2.5.2 特征峰标定 根据保留时间标定特征指纹峰，对 14 批样品 HPLC 指纹图谱进行分析，发现 14 个特征峰为其共有峰，由此确定为特征指纹峰，峰面积总和大于 90%。通过对 14 个特征峰的紫外光谱图进行分析归类，可知除了峰 1 和峰 2 为生物碱外，其余均为黄酮类成分，峰 3~7、10 为二氢黄酮，峰 8~9、11~14 为黄酮，进一步查阅文献和对照品比对，标认峰 1 为相思子碱，峰 2 为刺桐碱，峰 12 为滨藜黄苷，峰 14 为滨藜黄素。由于滨藜黄苷（图 1 中 12 号）色谱峰的峰面积和峰高适中，峰型对称，分离度高，故以其为参照峰（S），测得共有峰相对保留时间 RSD 为 0.14%~0.45%，相对峰面积 RSD 为 19%~118%，见表 3，表明不同来源样品成分种类稳定，但在含量方面具有差异。

2.6 指纹图谱评价

2.6.1 相似度分析 将 14 批样品指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A 版）”，计算相似度，结果见表 4，可知 S1、S6、S10~S14 相似度最高，均在 0.99 以上；S2、S3、S4、S7、S9 样品次之，介于 0.949~0.985 之间；S5、S8 最低，分别为 0.879、0.858，表明不同来源样品的整体质量较为稳定，但个别存在一定差异。

表 3 14 批样品 14 个共有峰的相对保留时间、相对峰面积 RSD

Tab. 3 Relative retention time and relative peak area RSDs of fourteen common peaks in fourteen batches of samples

编号	相对保留时间 RSD/%	相对峰面积 RSD/%	编号	相对保留时间 RSD/%	相对峰面积 RSD/%
S1	0.45	55	S8	0.26	20
S2	0.37	54	S9	0.26	28
S3	0.40	30	S10	0.22	23
S4	0.40	27	S11	0.14	22
S5	0.37	21	S12	0.00	0.00
S6	0.33	22	S13	0.26	118
S7	0.32	23	S14	0.28	101

表 4 14 批样品相似度

Tab. 4 Similarities of fourteen batches of samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.994	S8	0.858
S2	0.961	S9	0.985
S3	0.949	S10	0.992
S4	0.974	S11	0.992
S5	0.879	S12	0.992
S6	0.994	S13	0.991
S7	0.978	S14	0.992

2.6.2 聚类分析 采用 SPSS 26.0 软件进行聚类分析，将 14 批样品 HPLC 色谱图中的 14 个共有峰峰面积标准化，形成 14×14 原始数据矩阵，采用 Ward 联接方法（离差平方和法），以平方欧氏距离为测度，根据样品的相似程度进行分类，结果见图 2。由此可知，当判别距离为 12 时，14 批样品分为 3 类，S9、S11~14 为第 I 类，除 S9 产自越南，其余均产自广西；S2、S4、S6~S7、S10 为第 II 类，S6~S7 产自广东，其余均产自广西；S1、S3、S5、S8 为第 III 类，S3、S8 产自广东，其余均产自广西，表明两广药材质量没有明显地域分类；产自广西玉林的样品（S5、S4、S13、S14）在 I~III 类中均有分布，批间稳定性有差异，可能与栽培、采收、加工方式等不同有关。

2.6.3 主成分分析 将 14 批样品 14 个共有峰的峰面积进行标准化处理后，导入 SPSS 26.0 软件进行主成分分析，结果见图 3、表 5。根据特征值>1 提取出 4 个主成分（Principal Component，PC），累积贡献率为 85.99%，包含了该指纹图谱的大部分信息。碎石图显示，4 种主成分坡度较陡，是评价药材质量的标志性成分。由于 PC1、PC2、PC3 的累积贡献率达 74.24%，可代表药材指纹图谱的大部分信息，反映了其基本特征，故以三者得分绘

表 5 主成分初始特征值和方差

Tab. 5 Initial eigenvalues and variances of principal components

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比	累积/%	总计	方差百分比	累积/%
1	4.334	30.96	30.96	4.334	30.96	30.96
2	3.463	24.74	55.69	3.463	24.74	55.69
3	2.406	17.19	72.88	2.406	17.19	72.88
4	1.836	13.12	85.99	1.836	13.12	85.99

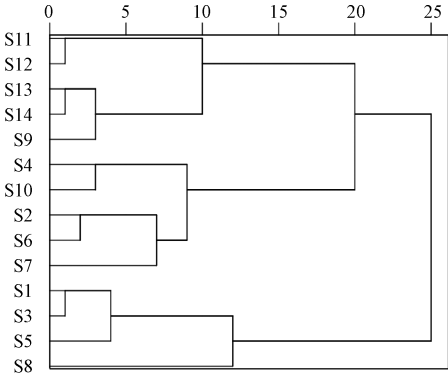


图 2 14 批样品聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of fourteen batches of samples

制三维散点图，见图 4，可见样品大多数聚在一起，其中 S5、S8 和其他样品的距离相对较远，与指纹图谱相似度、聚类分析结果一致。

2.6.4 热图分析 由图 5 可知，275 nm 波长下色

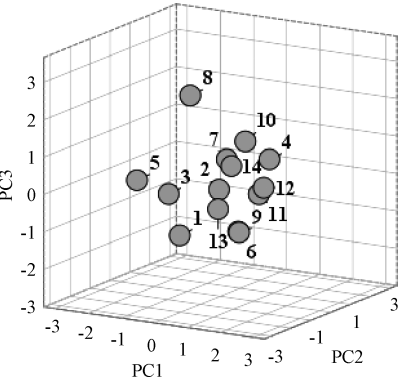


图 4 14 批样品主成分分析图

Fig. 4 Principal component analysis plot for fourteen batches of samples

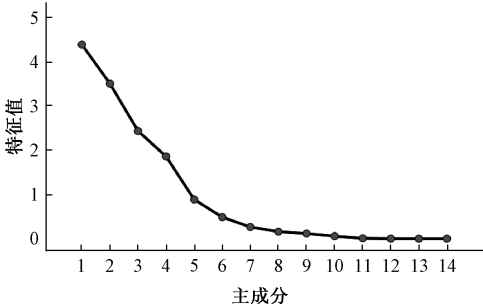


图 3 14 批样品主成分分析碎石图

Fig. 3 Gravel graph of principal component analysis for fourteen batches of samples

谱图最具代表性，各色谱峰分离度均大于 1.5，塔板数大于 10 000；共有峰 5~7、11~12 的峰面积之和占总共有峰峰面积的 92.41%；峰 12 峰面积颜色变动最大，其次为峰 5、6、11、7，其余各色谱峰峰面积较小，颜色变化不明显，影响程度依次为峰 12>5>6>11>7，其余 9 个小峰影响程度依次为峰

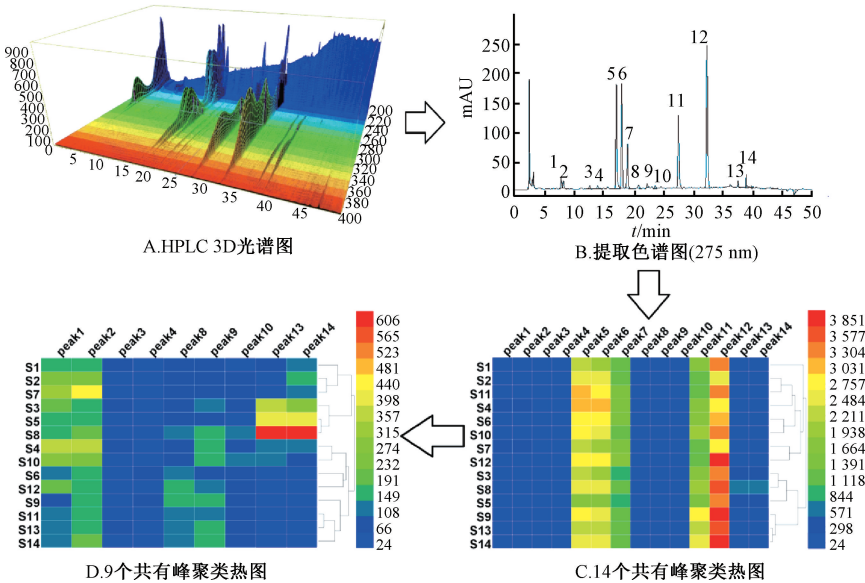


图 5 14 批样品共有峰峰面积聚类热图

Fig. 5 Cluster heat maps of the peak areas of fourteen batches of samples



14>13>2>1>9>8>10>3>4。

综上所述，峰 5~7、11~12 是药材最主要成分，其次为 1~2、13~14，可作为质量评价指标。

### 3 讨论

本实验考察了不同型号色谱柱 Hypersil BDS C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Hypersil BDS C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、JADE-PAK ODS-AQ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)，有机相甲醇、乙腈、甲醇-乙腈 (8：2)，流动相纯水、0.1% 甲酸、0.3% 甲酸、0.5% 甲酸、1.0% 甲酸，体积流量 0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min 对色谱峰分离度的影响，并比较了不同检测波长下色谱峰数量及峰高，最终确定为“2.1”项下条件。

在 14 批样品 HPLC 指纹图谱中，以滨蓟黄苷为参照峰 (S) 确定了 14 个共有峰，相似度除了 2 批相对较低外，其余均在 0.949 以上，表明相思子叶整体质量相对稳定。聚类分析、主成分分析结果显示，样品质量差异可分成 3 类，但与地域无关，关键在于各成分含量及其比例是否稳定，而这种稳定可能与采收期有关。热图分析结果显示，样品质量差异依次与 9 种成分色谱峰有关，可作为日后相思子叶质量控制和评价的候选指标。

综上所述，本研究首次建立了相思子叶 HPLC 指纹图谱评价和化学模式识别分析，该方法稳定、快速、可靠，能够有效、准确地评价相思子叶质量情况及其与成分的关系。

#### 参考文献：

[ 1 ] Shafi Sofi M, Sateesh M K, Bashir M, *et al.* Cytotoxic and proapoptotic effects of *Abrus precatorius* L. on human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB-231 [ J ]. *Cytotechnology*, 2013, 65(3): 407-417.

[ 2 ] 张 平, 李春阳, 袁旭江. 相思子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(5): 654-658.

[ 3 ] 南京中医药大学. 中药大辞典 (上册) [ M ]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 2223-2224.

[ 4 ] 《中华本草》编委会. 中华本草 [ M ]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 303.

[ 5 ] 付振贺, 黄玉凤, 黄超君, 等. HPLC-TOF/MS 快速鉴别相思藤中的化学成分[J]. 第二军医大学学报, 2018, 39(3): 329-333.

[ 6 ] 李春阳, 张 平, 袁旭江. 相思子叶化学成分研究 [ J ]. 广东药学院学报, 2014, 30(1): 24-27.

[ 7 ] Parthasarathy V, Ajay Kumar T V. Screening of potential GCMS derived antimigraine compound from the leaves of *Abrus*

*precatorius* Linn to target “ calcitonin gene related peptide” receptor using *in silico* analysis[ J ]. *Food Sci Hum Well*, 2019, 8(1): 34-39.

[ 8 ] Choi Y H, Hussain R A, Pezzuto J M, *et al.* Abrusosides A-D, four novel sweet-tasting triterpene glycosides from the leaves of *Abrus precatorius* [ J ]. *J Nat Prod*, 1989, 52(5): 1118-1127.

[ 9 ] Hata Y, Ebrahimi S N, De Mieri M, *et al.* Antitrypanosomal isoflavan quinones from *Abrus precatorius* [ J ]. *Fitoterapia*, 2014, 93(1): 81-87.

[ 10 ] 宋纯清, 胡之璧. 相思子根化学成分研究——相思子醌 A, B, D, E, F, G [ J ]. 植物学报, 1998, 40(8): 734-739.

[ 11 ] 黄 平, 莫建光. 相思子属三种药材中的氨基酸分析比较 [ J ]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32(2): 35-37.

[ 12 ] Mutmainnah B, Matuzahroh N, Baktir A. Antimicrobial activity of ethanol extract of *Abrus precatorius* L. roots against planktonic cells and biofilm of urine and blood methicillin sensitive staphylococcus aureus (MSSA) isolate [ J ]. *Earth Environ Sci*, 2019, 217(1): 1-4.

[ 13 ] Asija R, Baheti H, Kumawat R S, *et al.* Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Abrus precatorious* leaves on albino rats [ J ]. *J Pharm Biol Sci*, 2015, 5(1): 20-24.

[ 14 ] Tilwari A, Shukla N P, Pathirissery U D. Immunomodulatory activity of the aqueous extract of seeds of *Abrus precatorius* Linn. (Jequirity) in mice [ J ]. *Iran J Immunol*, 2011, 8 ( 2 ): 96-103.

[ 15 ] Pavithra K, Satgibabu Uddandrao V V, Mathavan S, *et al.* Identification of bioactive factors from *Abrus precatorius* by GC-MS, NMR and evaluation of its antioxidant activity [ J ]. *Materials Today: Proceedings*, 2020, 26(4): 3518-3521.

[ 16 ] Saganuwan S A, Onyeyili P A. Haematonic and plasma expander effects of aqueous leaf extract of *Abrus precatorius* in *Mus musculus* [ J ]. *Comp Clin Path*, 2012, 21(6): 1249-1255.

[ 17 ] Wan-Ibrahim W S, Ismail N, Mohd-Salleh S F, *et al.* Methanolic extract of *Abrus precatorius* promotes breast cancer MDA-MB-231 cell death by inducing cell cycle arrest at G0/G1 and upregulating Bax [ J ]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2019, 9 ( 6 ): 249-256.

[ 18 ] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [ J ]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.

[ 19 ] 孙立丽, 王 萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [ J ]. 中 草 药, 2017, 48 ( 20 ): 4339-4345.

[ 20 ] 赵 娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [ J ]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1): 82-86.

[ 21 ] 李春阳, 张 平, 袁旭江. HPLC 测定相思子叶中滨蓟黄苷含量 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 79-81.

[ 22 ] 张 平, 李春阳, 袁旭江. HPLC 测定相思子叶中滨蓟黄素含量 [ J ]. 海峡药学, 2015, 27(1): 35-37.

[ 23 ] 刘亚迪, 何翠敏, 邱 雨, 等. 相思子叶中滨蓟黄苷提取工艺及其不同生长期含量变化的研究 [ J ]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(6): 724-728.