

不同产地金银花药材高效液相指纹图谱的研究

★ 杨雪萍¹ 袁红英¹ 李峰² (1. 中国人民解放军第88医院药剂科 泰安 271000; 2. 山东中医药大学 济南 260014)

摘要:目的:研究并建立三个不同产地金银花药材的指纹图谱。方法:采用岛津 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱,流速 1.0 ml/min,柱温 40 ℃,检测波长 254 nm。结果:建立了金银花药材 HPLC 指纹图谱共有模式,三个不同产地金银花相似度均在 0.95 以上。结论:该方法特征性强、简便。

关键词:不同产地;金银花;HPLC;指纹图谱

中图分类号:R 284.1 文献标识码:A

HPLC fingerprints of *Lonicera japonica* Thunb from different places

YANG Xue-ping¹, YUAN Hong-ying¹, LI feng²

1. Department of Pharmacy, 88 Hospital of PLA, Taian 271000;

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 260014

Abstract: Objective: To study and establish the fingerprints of *Lonicera japonica* Thunb from different places by HPLC. Methods: The fingerprints of *Lonicera japonica* Thunb was built by using Diamonsil C₁₈ as analytical column and acetonitrile-0.05 H₃PO₄ aqueous in gradient as a mobile phase. The flow rate was 1.0 ml/min. Detecting wavelength was set at 254nm. The temperature of column was at 40 ℃. Results: The mutual mode to HPLC fingerprints was set up, the similarities in 3 batches of *Lonicera japonica* Thunb samples were all above 0.95. Conclusion: This methods is simple, stable and reproducible.

Key words: different places; *Lonicera japonica* Thunb; HPLC; The Fingerprint Atlas

金银花为临床常用中药。《中国药典》2005 年版一部规定金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或初开的花^[1]。以山东的“东银花”或“济银花”和河南的“密银花”或“南银花”产量最高、质量好。故对山东平邑、河北、河南三个不同产地的市售金银花药材进行了高效液相指纹图谱研究。为评价不同产地金银花质量异同,以及更好的对金银花质量进行控制提供方法学依据。

1 试验材料

1.1 仪器 岛津高效液相仪 2010;岛津 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);索氏提取器;KQ-250B 型超声清洗仪;离心机等。

1.2 试剂 甲醇、乙腈为色谱纯;超纯水为二次蒸馏水;磷酸为分析纯。

1.3 对照品 绿原酸对照品(中国生物制品检定所,供含量测定用,批号:0753-200111)。

1.4 样品 分别购取产自山东平邑、河北、河南的金银花药材。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 岛津 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长 254 nm,进样量 10 μl,流速 1.0 ml/min,柱温 40 ℃。流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱,梯度如表 1。

表 1 流动相梯度

时间 /min	乙腈	0.1% 磷酸水溶液
0	5	95
20	10	90
40	15	85
55	25	75
75	50	50
76	5	95
80	5	95

2.2 对照品溶液的制备 分别取绿原酸对照品,精密称定,加甲醇制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对

照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取供试品粗粉 2.0 g,精密称定,加水 100 ml,回流提取 3 h,放冷,滤过。取滤液 50 ml 加无水乙醇 50 ml,摇匀,于 0 ℃ 静置醇沉 3 h,离心(3 000r/min)10 min。取上清液 50 ml,蒸干,残渣加 50% 乙醇溶解,定量转移至 10 ml 容量瓶,并稀释至刻度,摇匀,以微孔滤膜(0.45 μm)滤

过,即得。

2.4 精密度试验 取金银花药材(平邑产)粗粉 2.0 g,精密称定,以优选出的试验方法制备样品液,连续进样 5 次,进行测定。各峰面积为总峰面积 2% 以上的峰,其色谱峰的相对保留时间和相对积分峰面积比值没有明显变化(*RSD* 均在 3% 以内),见表 2。

表 2 精密度试验中以绿原酸为内标峰求得 R_{RT} 、 R_{Ra} 的 *RSD*

峰号	<i>RSD</i> (%)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RRT	0.7831	0	0.9477	0.3598	0.4433	0.6397	0.4185	0.4659	0.2391	0.5371	0.2456	0.5209
RRa	0.5758	0	0.2632	0.3287	0.4305	0.4038	0.3141	0.6682	0.8418	0.6985	0.4837	0.6181

2.5 稳定性试验 取金银花药材(样品 1)2.0 g,精密称定,以优选出的方法制备样品液,分别在 0、4、8、16、24 h 检测。峰面积占总峰面积 2% 以上的

峰,其色谱峰的相对保留时间和相对积分峰面积比值没有明显变化(*RSD* 均在 3% 以内),见表 3。

表 3 稳定性试验中以绿原酸为内标峰求得 R_{RT} 、 R_{Ra} (*RSD*%)

峰号	<i>RSD</i> (%)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RRT	0.1980	0	0.2876	0.3639	0.2900	0.2711	0.1792	0.0583	0.1366	0.1621	0.1212	0.1300
RRa	0.1337	0	0.0662	0.0789	0.0143	0.0331	0.0587	0.0758	0.0272	0.0227	0.0132	0.0267

2.6 重现性试验 取金银花药材(平邑产)粗粉 2.0 g,共取五份,精密称定,以优选出试验方法制备样品液,分别进行测定,考察色谱峰的相对保留时间、相对积分峰面积比值的一致性。峰面积占总峰

面积 2% 以上的峰,其色谱峰的相对保留时间和峰面积的比值没有明显变化(*RSD* 均在 3% 以内),见表 4。

表 4 重现性试验中以绿原酸为内标峰求得 R_{RT} 、 R_{Ra} (*RSD*%)

峰号	<i>RSD</i> (%)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RRT	0.1363	0	0.0473	0.0300	0.0662	0.0698	0.0935	0.2812	0.1182	0.1306	0.2098	0.2880
RRa	0.4128	0	0.0920	0.0511	0.5943	0.1074	0.4648	0.2929	0.2919	0.0320	0.3509	0.1585

3 试验结果

3.1 不同产地金银花药材指纹图谱的建立 取三个不同产地金银花按 2.3 方法制备供试品溶液,进

样,记录各样品在 80 min 内的指纹图谱,12 个共有峰被标定,其中 2 号峰为绿原酸特征峰,见图 1。

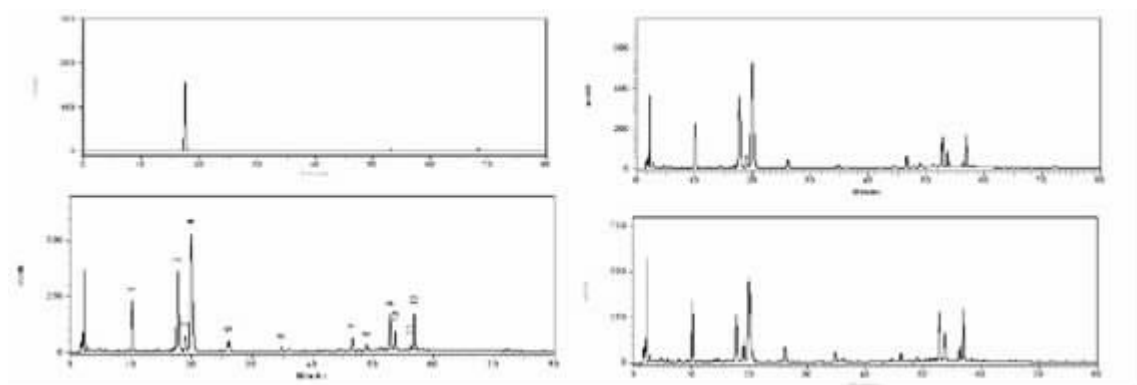


图 1 平邑、河北、河南金银花 HPLC 指纹图谱

3.2 指纹图谱各项技术参数 见表 5、表 6。

表 5 三批不同产地金银花共有峰相对保留时间

产地	共有峰相对保留时间												
	峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
山东		0.5741	1	1.0693	1.126	1.4752	1.9667	2.6348	2.7662	2.9833	3.0317	3.1813	3.2137
河北		0.5748	1	1.0692	1.126	1.4746	1.9661	2.6315	2.7653	2.9821	3.0302	3.1803	3.2126
河南		0.5749	1	1.0693	1.1261	1.4751	1.9665	2.6337	2.7651	2.9819	3.0303	3.1797	3.2119

表 6 三批不同产地金银花共有峰相对峰面积积分值

产地	共有峰相对峰面积积分值												共有峰占总峰面积(%)
	峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
山东	0.4808	1	0.2033	1.8580	0.1486	0.0534	0.2075	0.0796	0.3237	0.1879	0.0422	0.2825	97.6932
河北	0.3517	1	0.1117	1.4459	0.0915	0.1076	0.1865	0.0630	0.4368	0.2328	0.0975	0.5718	96.8317
河南	0.8262	1	0.3752	2.3828	0.3473	0.206	0.175	0.0931	0.7029	0.5642	0.188	0.6428	96.7049

3.3 相似度分析

3.3.1 参照峰的选择 因绿原酸分离较好、较为稳定、为已知成分峰,故选择其为内标参照峰。

3.3.2 相似度计算 以山东平邑十批金银花中的指纹图谱为对照,参照文献^[2]计算比较三个不同产地金银花指纹图谱的相似度

$$S = \frac{\sum (X_i W_j - \bar{X} \bar{W}_j) (Y_i W_j - \bar{Y} \bar{W}_j)}{\sqrt{\sum (X_i W_j - \bar{X} \bar{W}_j)^2} \sqrt{\sum (Y_i W_j - \bar{Y} \bar{W}_j)^2}}$$

其中, X_i 为样品指纹图谱参数 R_a ; Y_i 为对照品指纹图谱参数 R_a ; W_j 为权重系数(默认时 = 1)。以绿原酸为参照计算相似度:

河北金银花 $S = 0.9602$

河南密银花 $S = 0.9664$

二者与平邑产金银花的指纹图谱的相似度均在 95% 以上。

3 讨论

在研究过程中发现柱温是影响成分保留和分离的一个重要因素。试验过程中分别采用柱温为 30、40℃ 进行比较。柱温为 30℃ 时,峰保留时间较长,绿原酸对应的色谱峰在 30 min 以后出峰,且各峰间分离不好,峰形稍差。柱温为 40℃ 时能够提前各出

峰时间,绿原酸对应的色谱峰在 18 min 左右出峰,峰形较好,各峰间分离较好。

对色谱图谱进行分析可以看出,各样品中主要的色谱峰基本一致,但各峰的面积差异较大。可见,不同产地金银花成分基本上一致,但各成分的含量有一定的差异。

4 结论

以优选出的方法对山东平邑、河北、河南产的金银花进行分析,以绿原酸为参照物、山东平邑金银花为标准,对三个不同产地的金银花相似度进行计算,其相似度均在 95% 以上。HPLC 指纹图谱鉴别金银花具有重复性好、特征性强、方法简便等特点,为金银花高效液相指纹图谱鉴别研究提供了方法学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005 年版一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:152.
- [2] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京:化学工业出版社,2002,8:1.

(收稿日期:2009-04-23)

专题征稿

《江西中医药》为中医药核心期刊,新设重点栏目《明医心鉴》,以介绍名老中医经验和中医临证心得为主,重点刊载中医关于疑难病的诊疗经验,要求观点、方法新,经验独到。涉及的病种主要有:小儿麻疹后遗症、红斑狼疮、类风湿性关节炎、慢性肾炎、哮喘、糖尿病、老年痴呆、高血压、中风、盆腔炎、萎缩性胃炎、癌症疼痛。欢迎广大中西医临床工作者不吝赐稿。