

河南连翘不同极性部位的 HPLC 指纹图谱

周琳琳, 郝敏, 白雁, 雷敬卫*, 谢彩侠, 胡小莉, 张迪文
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**建立河南连翘饮片不同极性部位的 HPLC 指纹图谱,比较不同提取部位化学成分之间的差异,为全面评价河南连翘饮片的质量提供参考。**方法:**将河南连翘饮片用 75% 乙醇制备总提取物后,分别用石油醚、乙酸乙酯、三氯甲烷、正丁醇、水依次萃取,浓缩至浸膏,减压干燥制得粉末样品,建立 HPLC 指纹图谱,并采用相似度评价系统软件进行数据分析。**结果:**连翘饮片石油醚部位 HPLC 指纹图谱确定了 18 个共有峰,指认了 3 个指纹峰;三氯甲烷部位 HPLC 指纹图谱共确定了 25 个共有峰,指认了 4 个指纹峰;乙酸乙酯部位 HPLC 指纹图谱共确定了 20 个共有峰,指认了 3 个指纹峰;正丁醇部位 HPLC 指纹图谱共确定了 17 个共有峰,指认了 3 个指纹峰;水部位 HPLC 指纹图谱共确定了 17 个共有峰,指认了 2 个指纹峰。连翘饮片同一极性部位指纹图谱相似度较高,不同极性部位之间化学成分有明显差异。**结论:**该实验方法准确、可靠、重复性高,所建指纹图谱可以全面反映连翘饮片的化学成分分布,为连翘饮片的整体质量评价提供参考。

[关键词] 连翘; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 极性部位

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0052-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070052

HPLC Fingerprints of Different Polarity Fractions from Henan Forsythia Fructus

ZHOU Lin-lin, HAO Min, BAI Yan, LEI Jing-wei*, XIE Cai-xia, HU Xiao-li, ZHANG Di-wen
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprints of different polarity fractions from Henan Forsythia Fructus, compare their chemical compositions between the different polarity fractions, and provide a reference for comprehensive evaluation of the quality of Henan Forsythia Fructus. **Method:** Henan Forsythia Fructus was extracted by 75% ethanol to obtain the total extract, and then it was extracted by petroleum ether, ethyl acetate, chloroform, *n*-butanol, and water respectively; concentrated to extractum, and dried under reduced pressure to obtain powder samples. The samples were analyzed by HPLC fingerprints, and the similarity evaluation software was used for data analysis. **Result:** Eighteen common peaks were determined in HPLC fingerprints of petroleum ether fraction, and 3 peaks of them were identified; 25 common peaks were determined in HPLC fingerprints of chloroform extract fraction, and 4 peaks of them were identified; 20 common peaks were determined in the HPLC fingerprints of ethyl acetate fraction, and 3 peaks of them were identified; 17 common peaks were determined in HPLC fingerprint of *n*-butyl alcohol fraction, and 3 peaks of them were identified; 17 common peaks were determined in HPLC fingerprints of water extract, and 2 peaks of them were identified. The fingerprint similarity of the same polarity fractions of Forsythia Fructus was high, with significant differences in chemical compositions between different polarity fractions. **Conclusion:** The experimental method is accurate, reliable, and highly repeatable, and can fully reflect the distribution of the chemical composition of Forsythia Fructus, providing a reference for the comprehensive quality evaluation of Forsythia Fructus decoction pieces.

[收稿日期] 20160611(002)

[基金项目] 河南省中药开发工程技术研究中心项目(142102313109);郑州市重点科技攻关计划项目(121PPTGG509)

[第一作者] 周琳琳,在读硕士,从事中药质量研究,Tel:13849013671,E-mail:691871850@qq.com

[通讯作者] *雷敬卫,博士,教授,从事中药质量研究,Tel:0371-65575596,E-mail:ljwei@hactem.edu.cn

[Key words] Forsythia Fructus; HPLC; fingerprint; polarity fractions

连翘具有清热解毒、消肿散结、疏散风热之功效,为双黄连口服液、清热解毒口服液、银翘解毒片等中药制剂的主要原料,临床应用广泛,是一味常用中药^[1]。现代药理研究表明,连翘主要具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、降血脂等药理作用^[2-6]。

连翘的主要化学成分有连翘苷、连翘酯苷等。目前,以连翘苷、连翘酯苷为指标成分,评价连翘质量的研究较多^[7-8]。但越来越多的研究认为,指标成分不能完全反映中药材的内在质量^[9],中药指纹图谱旨在根据其模糊属性,宏观地反映中药所含内在化学成分的种类与数量,进而反映中药的质量^[10-11]。目前,国内外有诸多对不同产地或不同采收期连翘指纹图谱的研究,其样品处理方法多采用乙醇^[12],甲醇^[13],水回流^[14]等提取方法,其处理方法单一,指纹图谱信息不够全面。本实验室长期以来从事连翘质量标准研究,前期已经对不同产地,不同采收期连翘 HPLC 指纹图谱进行了深入研究。然而关于连翘不同极性部位的指纹图谱研究尚为少数。连翘含有多种类型的化学成分,各化学成分的极性不尽相同,并且产地加工前后化学成分是否发生相应变化,这些都有待进一步研究,因此,本文建立了不同连翘饮片不同极性部位的指纹图谱,对连翘饮片的化学多组分展开研究,为合理应用该药用植物资源提供依据。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国沃特斯科科技公司),CPA225D 型 1/10 万分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),FW-100 型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),AL204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),Milli-Q Academic A10 型超纯水机(美国 Millipore 公司),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),101A-2B 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司)SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂),日本 EYELA N-1100 型斜式旋转蒸发器, EYELA SB-1100 水浴锅, VOS-30A 真空干燥箱(施都凯仪器设备有限公司)。

对照品连翘苷(批号 MUST-14052103,纯度 ≥ 98%),连翘酯苷 A(批号 MUST-14060118,纯度 ≥ 98%),芦丁(批号 MUST-13040302,纯度 ≥ 98%),均购自于成都曼思特生物科技有限公司;对照品槲皮素(批号 10081-9905,中国食品药品鉴定研究院,

纯度 ≥ 98%);乙腈和冰乙酸均为色谱级试剂,甲醇为分析纯,纯水(中美纯水有限公司),蒸馏水(自制)。样品为 2014 年 8 月底采集于河南洛阳野生连翘保护基地,经实验室炮制加工得到 12 份连翘饮片样品,由河南中医学院陈随清教授鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* 的干燥果实。样品批号及加工方式见表 1。

表 1 连翘样品信息

Table 1 Sample information of Forsythia Fructus

| No. | 加工方式 | 方法 |
|----------|------|--------------------------------------|
| S1 ~ S4 | 生晒品 | 日光下晾晒,晚间收于室内,反复数日至干 |
| S5 ~ S8 | 蒸晒品 | 蒸 20 min,于日光下晾晒,晚间收于室内,反复数日至干 |
| S9 ~ S12 | 煮晒品 | 加 6 倍水,煮 15 min,于日光下晾晒,晚间收于室内,反复数日至干 |

2 方法与结果

2.1 不同极性提取物的制备 取表 1 中 3 种不同连翘饮片各 1.5 kg,粉碎成粗粉,加 75% 乙醇回流提取 3 次,4 h/次,合并滤液,浓缩至浸膏,减压干燥成粉末,即得总提取物。取总提取物经水悬浮后,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、饱和正丁醇萃取(萃取比例 1:1)3 次,得到各部位萃取相及萃取后的水相,减压干燥成粉末,保存备用。连翘各部位提取物信息见表 2。

2.2 HPLC 指纹图谱分析

2.2.1 对照品溶液的配制 分别精密称取连翘酯苷 A 和连翘苷、槲皮素、芦丁适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.394,0.596,0.342,0.217 mg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取不同极性部位提取物各 0.1 g,置 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解,超声 15 min,定容,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm,5 μm),进样量 10 μL,流动相水(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min,90% ~ 75% A;10 ~ 30 min,75% ~ 68% A;30 ~ 40 min,68% ~ 65% A;40 ~ 45 min,65% ~ 60% A;45 ~ 50 min,60% A;50 ~ 75 min,60% ~ 45% A;75 ~ 80 min,45% A);检测波长 235 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,分别精密吸取供试品及对照品溶液,进样测定,记录色谱图,见图 1。

2.2.4 方法学考察 重复性试验:取连翘粉末

表 2 不同加工方式连翘各部位提取物质量

Table 2 Weight of Forsythia Fructus extracts of different processing methods

| 生晒品 | 质量 | 蒸晒品 | 质量 | 煮晒品 | 质量 |
|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| 石油醚部位 | 22.6 | 石油醚部位 | 35.1 | 石油醚部位 | 30.9 |
| 三氯甲烷部位 | 34.2 | 三氯甲烷部位 | 43.3 | 三氯甲烷部位 | 42.1 |
| 乙酸乙酯部位 | 61.7 | 乙酸乙酯部位 | 82.0 | 乙酸乙酯部位 | 76.8 |
| 正丁醇部位 | 203.9 | 正丁醇部位 | 287.4 | 正丁醇部位 | 265.6 |
| 水部位 | 253.0 | 水部位 | 310.3 | 水部位 | 344.5 |

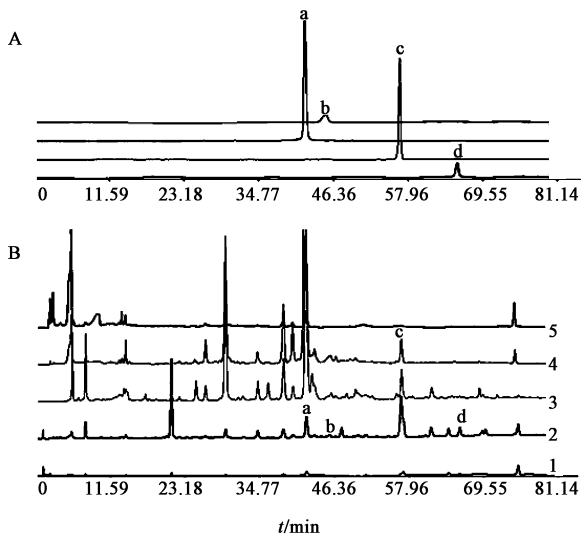


图 1 连翘不同提取部位 HPLC 色谱
A. 对照品; B. 煮晒品; 1. 石油醚部位; 2. 三氯甲烷部位; 3. 乙酸乙酯部位; 4. 正丁醇部位; 5. 水部位; a. 连翘酯苷 A; b. 芦丁; c. 连翘苷; d. 槲皮素

Fig. 1 HPLC chromatogram of Forsythia Fructus different extracts

(S3), 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录 HPLC 色谱图, 计算得各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 2.6%, 1.9%, 表明该方法重复性良好。

精密度试验: 取连翘粉末 (S9), 同法制备供试品溶液 6 份, 分别进样, 记录 HPLC 色谱图, 计算得各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 2.0%, 表明该仪器精密度良好。

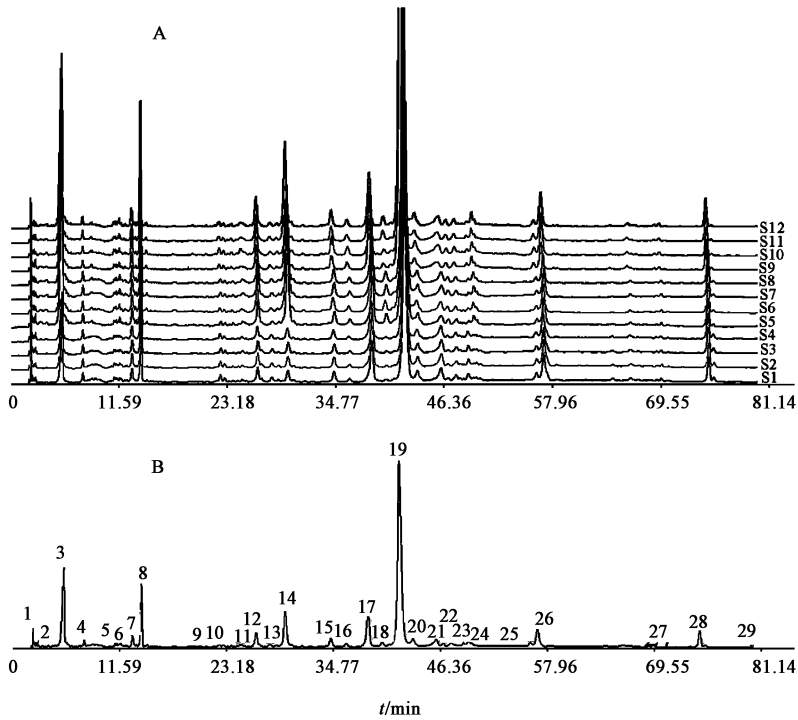
稳定性试验: 取连翘粉末 (S11), 同法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 记录 HPLC 色谱图, 计算得各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 2.7%, 3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内质量稳定。

2.3 不同连翘饮片总提取物指纹图谱 分别取 12 份不同加工方法连翘饮片乙醇总提取物, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样测定。将色谱图输入到国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2004A 版)”中, 得到 12 份连翘饮片

总提物的 HPLC 色谱峰叠加。对 12 份总提取物的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配, 设定时间窗宽度为 0.4, 以中位数法生成对照图谱, 并确定了 12 份连翘总提取物的 HPLC 指纹图谱共有模式及叠加, 见图 2。12 份连翘总提取物指纹图谱共标定共有峰 29 个。

2.4 不同连翘饮片石油醚部位指纹图谱 分别取 12 份不同加工方法连翘饮片石油醚部位提取物, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件进样测定, 记录 HPLC 色谱图。将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2004A 版)”中, 得到 12 批不同连翘饮片石油醚部位指纹图谱叠加, 见图 3。以 S4 的指纹图谱为参照图谱, 对 S1 ~ S12 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配, 设定时间宽度为 0.4, 按中位数法生成对照图谱, 共标定 18 个共有峰, 其中 9, 13, 15 号峰分别与连翘酯苷 A 和连翘苷、槲皮素对照品保留时间相一致。计算 12 批石油醚提取物指纹图谱与共有模式相似度, 见表 3。结果可见, 不同加工方法的样品的相似度有差异, 生晒品石油醚提取物的指纹图谱相似度较低, 蒸晒品与煮晒品石油醚提取物的指纹图谱相似度接近 0.9, 性质相对稳定。

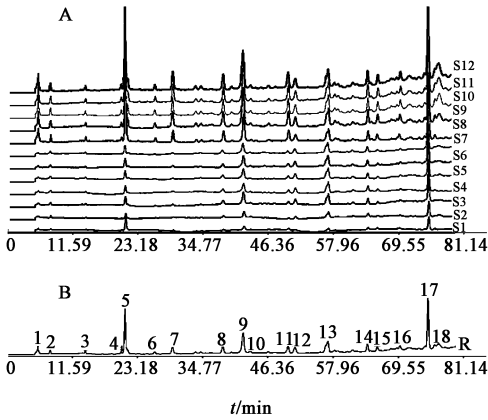
2.5 不同连翘饮片三氯甲烷部位指纹图谱 分别取 12 份不同加工方法连翘饮片三氯甲烷部位提取物, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件进样测定, 记录 HPLC 色谱图。将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2004A 版)”中, 得到 12 批不同连翘饮片三氯甲烷部位指纹图谱叠加, 见图 4。以 S6 的指纹图谱为参照图谱, 对 S1 ~ S12 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配, 设定时间宽度为 0.4, 按中位数法生成对照图谱, 共标定 25 个共有峰, 其中 12 号, 14 号, 18 号, 21 号分别与连翘酯苷 A, 芦丁, 连翘苷, 槲皮素对照品保留时间相一致。计算 12 批三氯甲烷提取物指纹图谱与共有模式相似度, 见表 4。可见, 不同加工方法的样品相似度有差异, 生晒品三氯甲烷



A. 12 份连翘饮片总提取物; B: 共有模式

图 2 不同连翘饮片总提取物的 HPLC 指纹谱

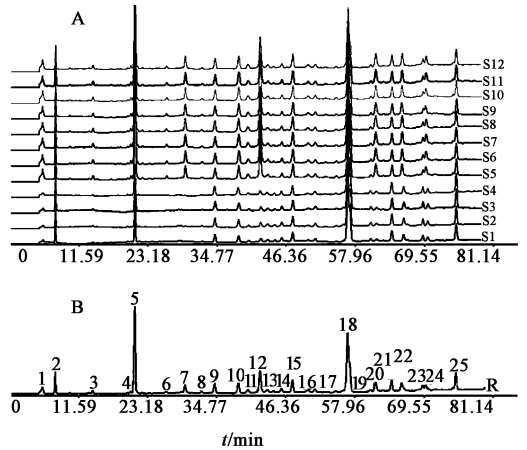
Fig. 2 HPLC fingerprint of total extracts of different Forsythia Fructus



A. 不同连翘饮片石油醚部位叠加; B: 共有模式 R

图 3 不同连翘饮片石油醚部位 HPLC 指纹谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of petroleum ether extracts of different Forsythia Fructus



A. 不同连翘饮片三氯甲烷部位叠加; B: 共有模式 R

图 4 不同连翘饮片三氯甲烷部位 HPLC 指纹谱

Fig. 4 HPLC fingerprint of chloroform extracts of different Forsythia Fructus

提取物的指纹图谱相似度接近 0.8, 蒸晒品与煮晒品石油醚提取物的指纹图谱相似度 > 0.9, 性质相对稳定, 该结果与石油醚部位相似度结果相一致。

2.6 不同连翘饮片乙酸乙酯部位指纹图谱 分别取 12 份不同加工方法连翘饮片乙酸乙酯部位提取物, 按 2.2.2 项下制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件进样测定, 记录 HPLC 色谱图。将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2004A

版)”中, 得到 12 批不同连翘饮片乙酸乙酯部位指纹图谱叠加, 见图 5。以 S2 的指纹图谱为参照图谱, 对 S1 ~ S12 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配, 设定时间宽度为 0.4, 按中位数法生成对照图谱, 共标定 20 个共有峰, 其中 12 号, 14 号, 17 号分别与连翘酯苷 A, 芦丁, 连翘苷对照品保留时间相一致。计算 12 批乙酸乙酯提取物指纹图谱

表 3 不同连翘饮片石油醚部位共有模式相似度

Table 3 Similarity of petroleum ether extracts of different Forsythia Fructus

| No. | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | R |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1 | 1.000 | 0.982 | 0.384 | 0.374 | 0.391 | 0.386 | 0.372 | 0.575 | 0.552 | 0.836 | 0.900 | 0.786 | 0.645 |
| S2 | 0.982 | 1.000 | 0.493 | 0.475 | 0.492 | 0.501 | 0.491 | 0.662 | 0.657 | 0.903 | 0.949 | 0.864 | 0.752 |
| S3 | 0.384 | 0.493 | 1.000 | 0.971 | 0.958 | 0.952 | 0.937 | 0.941 | 0.818 | 0.719 | 0.657 | 0.751 | 0.854 |
| S4 | 0.374 | 0.475 | 0.971 | 1.000 | 0.982 | 0.952 | 0.939 | 0.911 | 0.807 | 0.698 | 0.633 | 0.729 | 0.828 |
| S5 | 0.391 | 0.492 | 0.958 | 0.982 | 1.000 | 0.944 | 0.934 | 0.918 | 0.819 | 0.700 | 0.642 | 0.734 | 0.826 |
| S6 | 0.386 | 0.501 | 0.952 | 0.952 | 0.944 | 1.000 | 0.988 | 0.904 | 0.798 | 0.703 | 0.645 | 0.736 | 0.835 |
| S7 | 0.372 | 0.491 | 0.937 | 0.939 | 0.934 | 0.988 | 1.000 | 0.884 | 0.796 | 0.699 | 0.634 | 0.730 | 0.834 |
| S8 | 0.575 | 0.662 | 0.941 | 0.911 | 0.918 | 0.904 | 0.884 | 1.000 | 0.837 | 0.807 | 0.778 | 0.829 | 0.880 |
| S9 | 0.552 | 0.657 | 0.818 | 0.807 | 0.819 | 0.798 | 0.796 | 0.837 | 1.000 | 0.858 | 0.815 | 0.911 | 0.948 |
| S10 | 0.836 | 0.903 | 0.719 | 0.698 | 0.700 | 0.703 | 0.699 | 0.807 | 0.858 | 1.000 | 0.967 | 0.966 | 0.932 |
| S11 | 0.900 | 0.949 | 0.657 | 0.633 | 0.642 | 0.645 | 0.634 | 0.778 | 0.815 | 0.967 | 1.000 | 0.957 | 0.893 |
| S12 | 0.786 | 0.864 | 0.751 | 0.729 | 0.734 | 0.736 | 0.730 | 0.829 | 0.911 | 0.966 | 0.957 | 1.000 | 0.957 |
| R | 0.645 | 0.752 | 0.854 | 0.828 | 0.826 | 0.835 | 0.834 | 0.880 | 0.948 | 0.932 | 0.893 | 0.957 | 1.000 |

表 4 不同连翘饮片三氯甲烷部位相似度

Table 4 Similarity of chloroform extracts of different Forsythia Fructus

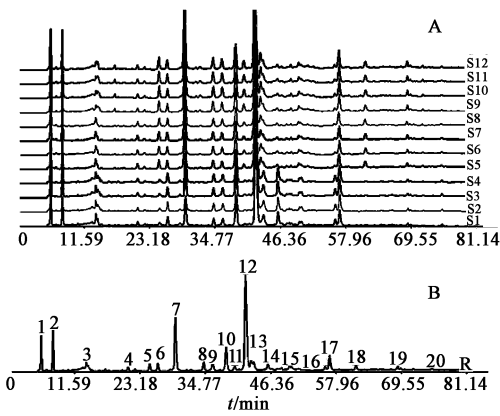
| No. | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | R |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1 | 1.000 | 0.996 | 0.997 | 0.995 | 0.731 | 0.736 | 0.730 | 0.747 | 0.796 | 0.801 | 0.805 | 0.801 | 0.837 |
| S2 | 0.996 | 1.000 | 0.997 | 0.997 | 0.727 | 0.730 | 0.727 | 0.742 | 0.793 | 0.799 | 0.802 | 0.797 | 0.833 |
| S3 | 0.997 | 0.997 | 1.000 | 0.996 | 0.741 | 0.745 | 0.740 | 0.756 | 0.800 | 0.806 | 0.809 | 0.804 | 0.845 |
| S4 | 0.995 | 0.997 | 0.996 | 1.000 | 0.729 | 0.732 | 0.727 | 0.743 | 0.797 | 0.803 | 0.806 | 0.802 | 0.837 |
| S5 | 0.731 | 0.727 | 0.741 | 0.729 | 1.000 | 0.986 | 0.985 | 0.986 | 0.909 | 0.910 | 0.913 | 0.911 | 0.969 |
| S6 | 0.736 | 0.730 | 0.745 | 0.732 | 0.986 | 1.000 | 0.997 | 0.997 | 0.895 | 0.895 | 0.896 | 0.892 | 0.973 |
| S7 | 0.730 | 0.727 | 0.740 | 0.727 | 0.985 | 0.997 | 1.000 | 0.997 | 0.896 | 0.896 | 0.896 | 0.893 | 0.971 |
| S8 | 0.747 | 0.742 | 0.756 | 0.743 | 0.986 | 0.997 | 0.997 | 1.000 | 0.901 | 0.903 | 0.902 | 0.899 | 0.977 |
| S9 | 0.796 | 0.793 | 0.800 | 0.797 | 0.909 | 0.895 | 0.896 | 0.901 | 1.000 | 0.999 | 0.998 | 0.998 | 0.937 |
| S10 | 0.801 | 0.799 | 0.806 | 0.803 | 0.910 | 0.895 | 0.896 | 0.903 | 0.999 | 1.000 | 0.998 | 0.998 | 0.939 |
| S11 | 0.805 | 0.802 | 0.809 | 0.806 | 0.913 | 0.896 | 0.896 | 0.902 | 0.998 | 0.998 | 1.000 | 0.999 | 0.940 |
| S12 | 0.801 | 0.797 | 0.804 | 0.802 | 0.911 | 0.892 | 0.893 | 0.899 | 0.998 | 0.998 | 0.999 | 1.000 | 0.937 |
| R | 0.837 | 0.833 | 0.845 | 0.837 | 0.969 | 0.973 | 0.971 | 0.977 | 0.937 | 0.939 | 0.940 | 0.937 | 1.000 |

与共有模式相似度,结果见表 5。可见不同产地加工方法的样品相似度无较大差异,12 批连翘饮片乙酸乙酯提取物的指纹图谱与共有模式相似度均 > 0.9,性质相对稳定。

2.7 不同连翘饮片正丁醇部位指纹图谱 分别取 12 份不同加工方法连翘饮片正丁醇部位提取物,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.3 项下色谱条件进样测定,记录 HPLC 色谱图。将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A 版)”中,得到 12 批不同连翘饮片正丁醇部位指纹图谱叠加,见图 6。以 S2 的指纹图谱为参照图谱,对 S1 ~ S12 的指纹图谱相关参数进行多点校正并

自动匹配,设定时间宽度为 0.4,按中位数法生成对照图谱,共标定 17 个共有峰,其中 12 号,14 号,16 号分别与连翘酯苷 A,芦丁,连翘苷对照品保留时间相一致。计算 12 批正丁醇提取物指纹图谱与共有模式相似度,结果见表 6。可见,不同产地加工方法的正丁醇提取物的指纹图谱相似度无较大差异,12 批连翘饮片正丁醇提取物的指纹图谱与共有模式相似度均 > 0.9,性质相对稳定。

2.8 不同连翘饮片水部位指纹图谱 分别取 12 份不同加工方法连翘饮片的水部位提取物,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.3 项下色谱条件进样测定,记录 HPLC 色谱图。将图谱输入



A. 不同连翘饮片乙酸乙酯部位叠加; B. 共有模式 R

图 5 不同连翘饮片乙酸乙酯部位 HPLC 指纹谱

Fig. 5 HPLC fingerprint of ethyl acetate extracts of different Forsythia Fructus

表 5 不同连翘饮片乙酸乙酯部位相似度

Table 5 Similarity of ethyl acetate extracts of different Forsythia Fructus

| No. | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | R |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1 | 1.000 | 0.998 | 0.997 | 0.997 | 0.952 | 0.952 | 0.950 | 0.953 | 0.945 | 0.936 | 0.936 | 0.933 | 0.972 |
| S2 | 0.998 | 1.000 | 0.998 | 0.997 | 0.947 | 0.946 | 0.945 | 0.947 | 0.941 | 0.930 | 0.929 | 0.926 | 0.968 |
| S3 | 0.997 | 0.998 | 1.000 | 0.999 | 0.952 | 0.950 | 0.949 | 0.952 | 0.940 | 0.935 | 0.935 | 0.932 | 0.970 |
| S4 | 0.997 | 0.997 | 0.999 | 1.000 | 0.954 | 0.952 | 0.952 | 0.954 | 0.941 | 0.938 | 0.938 | 0.935 | 0.972 |
| S5 | 0.952 | 0.947 | 0.952 | 0.954 | 1.000 | 0.997 | 0.998 | 0.996 | 0.949 | 0.992 | 0.991 | 0.991 | 0.994 |
| S6 | 0.952 | 0.946 | 0.950 | 0.952 | 0.997 | 1.000 | 0.998 | 0.998 | 0.956 | 0.992 | 0.992 | 0.993 | 0.996 |
| S7 | 0.950 | 0.945 | 0.949 | 0.952 | 0.998 | 0.998 | 1.000 | 0.997 | 0.953 | 0.992 | 0.991 | 0.992 | 0.994 |
| S8 | 0.953 | 0.947 | 0.952 | 0.954 | 0.996 | 0.998 | 0.997 | 1.000 | 0.958 | 0.991 | 0.991 | 0.991 | 0.996 |
| S9 | 0.945 | 0.941 | 0.940 | 0.941 | 0.949 | 0.956 | 0.953 | 0.958 | 1.000 | 0.944 | 0.942 | 0.943 | 0.968 |
| S10 | 0.936 | 0.930 | 0.935 | 0.938 | 0.992 | 0.992 | 0.992 | 0.991 | 0.944 | 1.000 | 0.999 | 0.999 | 0.989 |
| S11 | 0.936 | 0.929 | 0.935 | 0.938 | 0.991 | 0.992 | 0.991 | 0.991 | 0.942 | 0.999 | 1.000 | 0.999 | 0.987 |
| S12 | 0.933 | 0.926 | 0.932 | 0.935 | 0.991 | 0.993 | 0.992 | 0.991 | 0.943 | 0.999 | 0.999 | 1.000 | 0.988 |
| R | 0.972 | 0.968 | 0.970 | 0.972 | 0.994 | 0.996 | 0.994 | 0.996 | 0.968 | 0.989 | 0.987 | 0.988 | 1.000 |

表 6 不同连翘饮片正丁醇部位相似度

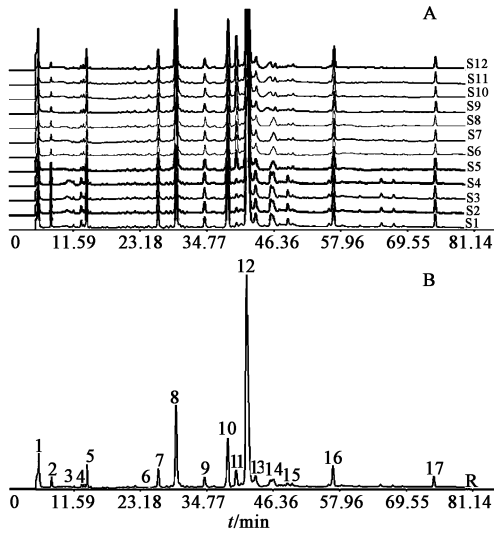
Table 6 Similarity of *n*-butanol extracts of different Forsythia Fructus

| No. | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | R |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1 | 1.000 | 0.993 | 0.993 | 0.992 | 0.966 | 0.968 | 0.966 | 0.967 | 0.965 | 0.964 | 0.967 | 0.965 | 0.969 |
| S2 | 0.993 | 1.000 | 0.991 | 0.999 | 0.977 | 0.978 | 0.976 | 0.979 | 0.972 | 0.968 | 0.971 | 0.971 | 0.978 |
| S3 | 0.993 | 0.991 | 1.000 | 0.999 | 0.978 | 0.980 | 0.978 | 0.980 | 0.973 | 0.969 | 0.972 | 0.972 | 0.979 |
| S4 | 0.992 | 0.999 | 0.999 | 1.000 | 0.978 | 0.978 | 0.976 | 0.979 | 0.972 | 0.969 | 0.972 | 0.971 | 0.977 |
| S5 | 0.966 | 0.977 | 0.978 | 0.978 | 1.000 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.996 | 0.995 | 0.995 | 0.996 | 0.994 |
| S6 | 0.968 | 0.978 | 0.980 | 0.978 | 0.999 | 1.000 | 0.999 | 0.999 | 0.997 | 0.995 | 0.996 | 0.996 | 0.999 |
| S7 | 0.966 | 0.976 | 0.978 | 0.976 | 0.999 | 0.999 | 1.000 | 0.998 | 0.996 | 0.995 | 0.995 | 0.995 | 0.998 |
| S8 | 0.967 | 0.979 | 0.980 | 0.979 | 0.999 | 0.999 | 0.998 | 1.000 | 0.996 | 0.994 | 0.995 | 0.995 | 0.999 |
| S9 | 0.965 | 0.972 | 0.973 | 0.972 | 0.996 | 0.997 | 0.996 | 0.996 | 1.000 | 0.998 | 0.998 | 0.999 | 0.998 |
| S10 | 0.964 | 0.968 | 0.969 | 0.969 | 0.995 | 0.995 | 0.995 | 0.994 | 0.998 | 1.000 | 0.976 | 0.999 | 0.997 |
| S11 | 0.967 | 0.971 | 0.972 | 0.972 | 0.995 | 0.996 | 0.995 | 0.995 | 0.998 | 0.976 | 1.000 | 0.999 | 0.993 |
| S12 | 0.965 | 0.971 | 0.972 | 0.971 | 0.996 | 0.996 | 0.995 | 0.995 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 1.000 | 0.998 |
| R | 0.969 | 0.978 | 0.979 | 0.977 | 0.994 | 0.999 | 0.998 | 0.999 | 0.998 | 0.997 | 0.993 | 0.998 | 1.000 |

到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A版)”中,得到 12 批不同连翘饮片水部位指纹图谱叠加,见图 7。以 S2 的指纹图谱为参照图谱,对 S1 ~ S12 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配,设定时间宽度为 0.4,按中位数法生成对照图谱,共标定 17 个共有峰,其中 11 号,12 号分别与连翘酯苷 A,连翘苷对照品保留时间相一致。计算 12 批水提取物指纹图谱与共有模式相似度,结果见表 7。可见,不同产地加工方法的水提取物的指纹图谱相似度无较大差异,12 批连翘饮片水提取物的指纹图谱与共有模式相似度均 > 0.9,性质相对稳定。

3 讨论

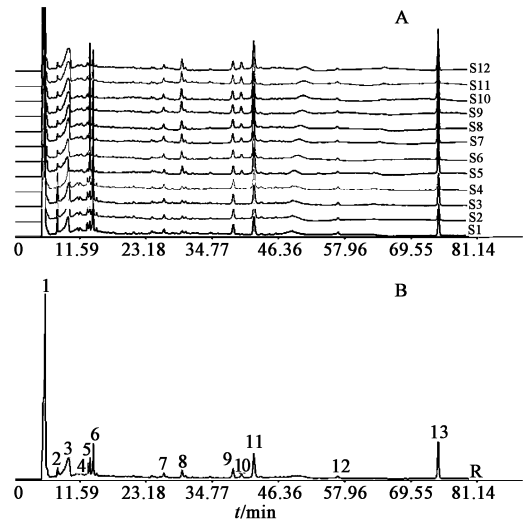
本实验优化了提取方法、流动相、梯度洗脱程序



A. 不同连翘饮片正丁醇部位叠加; B. 共有模式 R

图 6 不同连翘饮片正丁醇部位 HPLC 指纹谱

Fig. 6 HPLC fingerprint of *n*-butanol extracts of different *Forsythia Fructus*



A. 不同连翘饮片水部位叠加; B. 共有模式 R

图 7 不同连翘饮片水部位 HPLC 指纹谱

Fig. 7 HPLC fingerprint of aqueous extracts of different *Forsythia Fructus*

表 7 不同连翘饮片水部位相似度

Table 7 Similarity of aqueous extracts of different *Forsythia Fructus*

| No. | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | R |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1 | 1.000 | 0.899 | 0.914 | 0.912 | 0.884 | 0.938 | 0.944 | 0.942 | 0.949 | 0.806 | 0.946 | 0.883 | 0.919 |
| S2 | 0.899 | 1.000 | 0.984 | 0.978 | 0.923 | 0.922 | 0.910 | 0.918 | 0.902 | 0.815 | 0.894 | 0.929 | 0.952 |
| S3 | 0.914 | 0.984 | 1.000 | 0.973 | 0.920 | 0.919 | 0.908 | 0.915 | 0.899 | 0.815 | 0.891 | 0.925 | 0.949 |
| S4 | 0.912 | 0.978 | 0.973 | 1.000 | 0.915 | 0.914 | 0.908 | 0.914 | 0.904 | 0.806 | 0.897 | 0.915 | 0.946 |
| S5 | 0.884 | 0.923 | 0.920 | 0.915 | 1.000 | 0.953 | 0.920 | 0.939 | 0.923 | 0.868 | 0.916 | 0.987 | 0.972 |
| S6 | 0.938 | 0.922 | 0.919 | 0.914 | 0.953 | 1.000 | 0.984 | 0.993 | 0.984 | 0.849 | 0.981 | 0.944 | 0.983 |
| S7 | 0.944 | 0.910 | 0.908 | 0.908 | 0.920 | 0.984 | 1.000 | 0.989 | 0.984 | 0.848 | 0.981 | 0.922 | 0.964 |
| S8 | 0.942 | 0.918 | 0.915 | 0.914 | 0.939 | 0.993 | 0.989 | 1.000 | 0.993 | 0.866 | 0.989 | 0.934 | 0.980 |
| S9 | 0.949 | 0.902 | 0.899 | 0.904 | 0.923 | 0.984 | 0.984 | 0.993 | 1.000 | 0.859 | 0.993 | 0.920 | 0.968 |
| S10 | 0.806 | 0.815 | 0.815 | 0.806 | 0.868 | 0.849 | 0.848 | 0.866 | 0.859 | 1.000 | 0.842 | 0.862 | 0.877 |
| S11 | 0.946 | 0.894 | 0.891 | 0.897 | 0.916 | 0.981 | 0.981 | 0.989 | 0.993 | 0.842 | 1.000 | 0.913 | 0.961 |
| S12 | 0.883 | 0.929 | 0.925 | 0.915 | 0.987 | 0.944 | 0.922 | 0.934 | 0.920 | 0.862 | 0.913 | 1.000 | 0.966 |
| R | 0.919 | 0.952 | 0.949 | 0.946 | 0.972 | 0.983 | 0.964 | 0.980 | 0.968 | 0.877 | 0.961 | 0.966 | 1.000 |

以及检测波长,在同一色谱条件下建立河南不同连翘饮片不同极性部位的 HPLC 指纹图谱,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A 版)”分别生成了河南连翘饮片总提取物的指纹图谱及 5 个极性部位指纹图谱共有模式,通过比较 5 个指纹图谱共有模式可清晰地观察到不同极性部位的化学成分种类不同,且每个极性部位间化学成分含量差异明显,通过对每一极性部位的相似度分析,也可以看出每一个不同极性部位中生晒品的相似度均低于蒸晒品和煮晒品。总提取物共标定 29 个共有峰,化学成分更全面,经不同极性溶剂萃取后,化学成分表现出极性归属,且通过计算不同连翘饮片各部位指纹图谱

的相似度表明生晒品各部位指纹图谱相似度较低,蒸晒品与煮晒品各部位指纹图谱相似度均 > 0.9。

目前,国内外关于中药指纹图谱方面的研究都是仅考察单一极性部位指纹图谱,这样就掩盖了不同极性成分之间的差别^[15]。本研究通过建立不同连翘饮片不同极性部位的指纹图谱,从 2 个方面综合评价连翘质量,对连翘的合理采收加工及临床应用具有重要意义。

12 批连翘饮片石油醚部位 HPLC 指纹图谱确定了 18 个共有峰,指认了 3 个指纹峰(连翘酯苷 A,连翘苷,槲皮素)。12 批连翘饮片三氯甲烷部位 HPLC 指纹图谱共确定了 25 个共有峰,指认了 4 个

指纹峰(连翘酯苷 A, 芦丁, 连翘苷, 槲皮素)。12 批连翘饮片乙酸乙酯部位 HPLC 指纹图谱共确定了 20 个共有峰, 指认了 3 个指纹峰(连翘酯苷 A, 芦丁, 连翘苷)。12 批连翘饮片正丁醇部位 HPLC 指纹图谱共确定了 17 个共有峰, 指认了 3 个指纹峰(连翘酯苷 A, 芦丁, 连翘苷)。12 批连翘饮片水部位 HPLC 指纹图谱共确定了 17 个共有峰, 指认了 2 个指纹峰(连翘酯苷 A, 连翘苷)。由结果可以看出, 不同极性部位的指纹图谱差异较大, 但是单纯由指纹图谱来评价中药饮片的质量仍是不全面的, 可以考虑结合药理实验做更深入的研究。

[参考文献]

[1] 白雁, 段小彦, 雷敬卫, 等. 近红外光谱法在青翘含量测定中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 111-114.

[2] 简永耀, 靳龙文. 连翘的化学成分及药理学研究[J]. 淮海医药, 2009, 27(4): 349-350.

[3] 赵建平, 张玲, 王世伟, 等. 连翘临床新用简介[J]. 山西中医, 2004, 20(6): 53.

[4] 王金梅, 许启泰, 康文艺. 连翘化学成分及药理研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(5): 153-157.

[5] 李双, 王东强, 李志军. 连翘主要有效成分的提取与药理作用[J]. 黑龙江中医药, 2011, 40(2): 46-48.

[6] 吴国友. 连翘药理作用研究进展[J]. 中医学报,

2013, 28(10): 1508-1509.

[7] 秦宇, 张文丽, 林媛媛, 等. 连翘化学成分与抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 149-152.

[8] 郭强, 王智民, 林丽美, 等. 连翘属药用植物化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 74-78.

[9] 彭锐, 谭均, 马鹏, 等. 太白贝母生物碱的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(1): 152-155.

[10] 李保明, 古海锋, 李晔, 等. HPLC 测定不同产地灵芝中 9 种三萜酸[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3599-3603.

[11] 洪燕, 韩燕全, 夏伦祝, 等. 不同产地苍耳子 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1766-1771.

[12] 孙国祥, 慕善学, 等. 连翘的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2007, 29(2): 161-163.

[13] 张继全, 沈平嬢, 薛东升, 等. 连翘药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 上海中医药杂志, 2010, 94(5): 94-96.

[14] 麻秀芳, 李香串, 王进东, 等. 连翘药材化学成分指纹图谱研究[J]. 山西林业科技, 2011, 40(1): 1-3, 12.

[15] 刘小花, 白仲梅, 梁瑾, 等. 黄芩药材不同极性部位的指纹图谱[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2013, 49(4): 573-580.

[责任编辑 顾雪竹]