

基于 RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术的山东金银花 多指标定量指纹图谱分析

朱姮^{1,2}, 于金倩¹, 刘倩¹, 梁琰^{1,3}, 赵志国¹, 杨鹏⁴, 赵恒强^{1*}, 王晓^{1*}

(1. 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东省分析测试中心, 济南 250014;

2. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 3. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安 271018;

4. 济南三峰生物工程责任有限公司, 济南 250014)

[摘要] 目的:运用 RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术分析和测定金银花中主要化学成分,建立山东金银花多指标定量指纹图谱。方法:采用 RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术对金银花提取物进行快速分析,根据获得的精确相对分子质量和二级质谱碎片信息推断化合物分子式,结合数据库和文献对金银花中化学成分进行鉴别,采用 RRLC-DAD 法分析测定山东金银花、河南金银花和湖南金银花中主要化学成分含量,在此基础上建立了山东金银花多指标定量指纹图谱。结果:从山东金银花中检测到 51 种化学成分,鉴定了其中 32 种化学成分;对比测定了山东金银花、河南金银花和湖南金银花中 10 种主要化学成分(马钱酸、绿原酸、咖啡酸、马钱苷、断氧化马钱苷、芦丁、金桃苷、木犀草苷、异绿原酸 A 和异绿原酸 C)的含量;采用指纹图谱结合相似度分析可以实现不同品种金银花和湖南金银花的正确区分,所得结果与含量测定结果一致。结论:RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术分析速度快、灵敏度高、能够提供化合物及其碎片离子的精确质量信息,可以快速准确地鉴别和测定金银花中的化学成分。在此基础上建立的山东地道金银花的多指标定量指纹图谱,为山东金银花质量评价研究提供了技术支持。

[关键词] 金银花; 快速液相色谱-二极管阵列检测器-电喷雾-四级杆-飞行时间质谱; 有机酸类; 黄酮类; 环烯醚萜苷类; 多指标定量指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0082-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190082

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170629.0946.032.html>

[网络出版时间] 2017-06-29 9:46

Multiple Indicator Quantitative Fingerprint of *Lonicerae Japonicae* Flos from Shandong Province Based on RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS

ZHU Heng^{1,2}, YU Jin-qian¹, LIU Qian¹, LIANG Yan^{1,3},

ZHAO Zhi-guo¹, YANG Peng⁴, ZHAO Heng-qiang^{1*}, WANG Xiao^{1*}

(1. Shandong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Quality Control Technology, Shandong Academy of Sciences, Shandong Analysis and Test Center, Ji'nan 250014, China; 2. College of Pharmacy,

Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China; 3. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

4. Ji'nan Sanfeng Biological Engineering Co. Ltd., Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To identify and determine the main chemical constituents in *Lonicerae Japonicae*

[收稿日期] 20170109(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(811300700,81473298);山东省科技发展计划项目(2014GSF119031,2016GSF202014);中央本级重大增减支项目(2060302);山东省自然基金项目(ZR2013HM075)

[第一作者] 朱姮,在读硕士,从事天然产物分离与纯化工作,Tel:0531-82605319,E-mail:sdzbdz@sina.com

[通讯作者] *赵恒强,博士,副研究员,从事中药分析与质量控制研究,Tel:0531-82605319,E-mail:hqzhao2007@163.com;

*王晓,博士,研究员,从事中药质量控制研究,Tel:0531-82605319,E-mail:wjxn1998@126.com

Flos by RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS, and establish the quantitative fingerprint of *Lonicerae Japonicae* Flos of Shandong province. **Method:** The rapid analysis of *Lonicerae Japonicae* Flos extract was carried out by RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS. The chemical formula of *Lonicerae Japonicae* Flos was inferred by using the exact molecular weight and secondary mass spectrometry information. The chemical compositions of *Lonicerae japonicae* flos were identified by data base combined with literature reviewing. The contents of main chemical components in *Lonicerae Japonicae* Flos from Shandong and Henan as well as *Lonicerae* Flos were determined by using RRLC-DAD method, and the quantitative fingerprint was established on this basis for the quality evaluation of different samples. **Result:** The 51 chromatographic peaks were detected and 32 chemical constituents were identified from *Lonicerae Japonicae* Flos. The contents of 10 major chemical contents (loganic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, loganin, secoxyloganin, rutin, hyperoside, luteoloside, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C) in *Lonicerae Japonicae* Flos from Shandong and Henan as well as *Lonicerae* Flos were determined and compared. The differentiation of different species of *Lonicerae Japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos was achieved by RRLC fingerprint combined with similarity analysis, and the result was consistent with the content determination result. **Conclusion:** RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS technique is fast and accurate, providing accurate quality information for compounds and their fragment ions. It can quickly and accurately identify and determine the chemical compositions of *Lonicerae Japonicae* Flos, and the multiple indicator quantitative fingerprint based on this study could provide technology support for the quality evaluation of *Lonicerae Japonicae* Flos.

[**Key words**] *Lonicerae Japonicae* Flos; RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS; organic acids; flavonoids; iridoids; multiple indicator quantified fingerprint

金银花具有清热解毒和疏散风热的功效。可用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等证,为临床常用大宗中药材^[1-3]。目前,在山东、河南等地大量种植,其中,山东产区金银花产量占全国的 35%,是金银花道地产区^[4]。

金银花中化学成分复杂,主要有有机酸类、黄酮类和环烯醚萜苷类等^[5-6],具有成分种类多、极性大、含量差异大等特点。采用传统的分离、纯化、表征方式研究金银花中的药效成分难度大、耗时长,因此,高效、快速地分析、表征金银花中的化学成分,对提升其质量标准及进一步开发利用具有重要意义。高效液相色谱-高分辨质谱联用技术(HPLC-HRMS)^[5]结合了色谱的高分离能力和质谱的精确相对分子质量测定以及质谱碎片信息,避免了复杂的分离纯化过程,可以在没有对照品的情况下对中药复杂成分进行初步鉴别。特别是近年新发展起来的快速液相色谱-二极管阵列检测器-电喷雾-四级杆-飞行时间质谱联用技术(RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS),已广泛运用于中药及复方多成分的分析鉴定^[7-8]。该技术采用亚 2 微米色谱柱技术对复杂多样的成分进行快速分离,结合 ESI-Q-TOF-MS 技术获得的精确相对分子质量信息和二级质谱碎片信息推断化合物分子式,可以高效、快速对中药多成分进行准确鉴别。

2015 年版《中国药典》中有关金银花质量的评价标准主要是测定绿原酸和木犀草苷的含量。但是因受产地、栽培、产后加工等条件的影响,金银花的化学成分含量及药理作用有所差异^[9],仅以上述 2 种成分作为金银花的指标性成分,不能完全代表金银花的内在质量。目前,有关金银花的活性成分测定和指纹图谱研究已有大量报道,但采用多指标定量结合指纹图谱技术对其进行质量评价的研究报道相对较少^[10-13]。多指标定量指纹图谱技术在一定程度上体现了中药多成分、多靶点、整体作用的特点,是目前中药质量评价研究的重要方向。

本研究采用 RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术对山东产区金银花中的化学成分进行了快速、准确的分析鉴别,在此基础上建立了金银花多指标定量指纹图谱,并对不同产区和不同品种的金银花进行了对比。本研究为快速探明金银花中的化学成分及提高其质量标准研究提供了方法和技术支持。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,配有四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱和 DAD 检测器),G6520A 型飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司,配有电喷雾离子源),CPA225D 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司),SB-5200D 型高功率数控超声波仪(宁波新芝生物科技股份

有限公司), FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

对照品马钱酸(批号 Z25D7B27559), 绿原酸(批号 Y24J7K16726), 咖啡酸(批号 Y17D6C7672), 马钱苷(批号 R23D7F27552), 断氧化马钱苷(批号 Y21D7B30456), 芦丁(批号 Y19N7S25244), 金丝桃苷(批号 Y20J7X9353), 木犀草苷(批号 Y23S7H21785), 异绿原酸 A(批号 P28O7S23862), 异绿原酸 C(批号 P28D4S1), 购于上海源叶生物

科技有限公司(纯度均 > 98%)。甲醇、乙腈(美国 Tedia 公司, 色谱纯), 乙醇(国药集团, 分析纯), 甲酸(美国 ROE 公司, 色谱纯)。16 批金银花样品和 6 批山银花购于济南市药材市场和药店(表 1), 经山东中医药大学李佳教授鉴定分别为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的干燥花蕾或带初开的花和忍冬科植物灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* 或红腺忍冬 *L. hypoglauca* 的干燥花蕾或带初开的花(山银花)。

表 1 金银花及山银花样品来源信息

Table 1 Information of *Lonicerae Japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos

No.	样品名称	产地	购买地	购买时间	No.	样品名称	产地	购买地	购买时间
1	金银花	山东	漱玉平民大药房	2016-10-9	12	金银花	河南	建联药店	2016-10-12
2	金银花	山东	平嘉大药房	2016-10-9	13	金银花	河南	齐鲁大药房	2016-10-12
3	金银花	山东	建联药店	2016-10-9	14	金银花	河南	国泰大药房	2016-10-12
4	金银花	山东	历山药店	2016-10-9	15	金银花	河南	海洲大药房	2016-10-12
5	金银花	山东	协和大药房	2016-10-9	16	金银花	河南	老百姓大药房	2016-10-12
6	金银花	山东	汇英药店	2016-10-9	17	山银花	湖南	济南药王楼药材批发市场	2016-10-17
7	金银花	山东	齐鲁大药房	2016-10-9	18	山银花	湖南	济南药王楼药材批发市场	2016-10-17
8	金银花	山东	国泰大药房	2016-10-9	19	山银花	湖南	济南药王楼药材批发市场	2016-10-17
9	金银花	山东	海洲大药房	2016-10-9	20	山银花	湖南	济南药王楼药材批发市场	2016-10-17
10	金银花	山东	老百姓大药房	2016-10-9	21	山银花	湖南	济南药王楼药材批发市场	2016-10-17
11	金银花	河南	漱玉平民大药房	2016-10-12	22	山银花	湖南	济南药王楼药材批发市场	2016-10-17

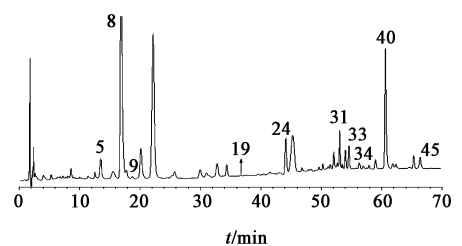
2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 取金银花药材, 粉碎, 过 4 号筛。精密称取金银花药材粉末 0.5 g, 加入 50% 甲醇水 50 mL, 称定质量, 超声(功率 250 W, 频率 20 kHz)提取 30 min, 用 50% 甲醇水溶液补足减失质量。提取药液过 0.22 μm 滤膜, 即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取马钱酸, 绿原酸, 咖啡酸, 马钱苷, 断氧化马钱苷, 芦丁, 金丝桃苷, 木犀草苷, 异绿原酸 A, 异绿原酸 C 对照品适量, 加甲醇配制成质量浓度分别为 1.02, 1.01, 1.00, 1.02, 1.03, 1.05, 1.01, 1.00, 1.04, 1.02 g·L⁻¹ 的对照品溶液, 储存于 4 °C, 备用。

2.3 色谱条件 Agilent 1260 系列高效液相色谱仪, Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm)。流动相 1.0% 甲酸乙腈溶液(A)-1.0% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~2 min, 4%~6% A; 2~15 min, 6% A; 15~25 min, 6%~7% A; 25~30 min, 7%~9% A; 30~40 min, 9%~11% A; 40~45 min, 11%~14% A; 45~50 min, 14%~16% A; 50~60 min, 16%~18% A; 60~70 min, 18%~22% A;

70~75 min, 22%~40% A), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL, 检测波长 254 nm。金银花 50% 甲醇提取物的 HPLC 色谱图见图 1。



5. 马钱酸; 8. 绿原酸; 9. 咖啡酸; 19. 马钱苷; 24. 断氧化马钱苷; 31. 芦丁; 33. 金丝桃苷; 34. 木犀草苷; 40. 异绿原酸 A; 45. 异绿原酸 C

图 1 金银花 50% 甲醇提取物的 HPLC

Fig. 1 HPLC of 50% methanol extract of *Lonicerae Japonicae* Flos

2.4 质谱条件 G6520A 型液相色谱-质谱联用仪, 流速 0.3 mL·min⁻¹。正离子电离模式, 雾化气压力 241.3 kPa, 干燥气(N₂)流速 12.0 mL·min⁻¹, 干燥气体温度 325 °C, 毛细管电压 4 500 V, 裂解电压 120 V, 锥孔电压 65 V, 全扫描质荷比 *m/z* 50~1 000。负离子电离模式, 毛细管电压 3 500 V, 全

扫描质荷比(m/z)50 ~ 1 100,其他条件同正离子电离模式。

2.5 金银花化学成分的鉴别 在优化后的色谱条件下,采用 RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术,对金银花醇提取物中多种化学成分进行高分辨质谱鉴别,可以快速准确地获得化合物的精确相对分子质量

信息。ESI-Q-TOF-MS 的一级质谱给出化合物的准分子离子峰,由分子离子峰可以确定化合物相对分子质量,结合二级质谱的碎片信息,参考中国科学院上海有机所中药与化学成分数据库及相关文献^[14-15]可以进一步对各化合物进行确认。结果见表 2。

表 2 金银花提取物的 RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 测定 LL

Table 2 Determination result by RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS for extract of *Lonicerae Japonicae* Flos

峰号	t_R /min	化合物	选择离子	化学式	理论值 m/z	测定值 m/z	δ	二级碎片特征 离子峰
1	6.495	5- <i>O</i> -咖啡酰基奎宁酸	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 8	353.088 7	0.90	179.034 2
2	7.253	未知	[M + H] ⁺	C ₉ H ₁₇ NO ₃	218.103 4	218.102 6	-0.80	155.033 6
3	9.440	8-表马钱酸	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	377.144 2	377.143 8	-0.40	359.134 6,215.091 8
4	11.682	secologanoside-7-methyl ester 或未知	[M + H] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	405.139 6	405.140 6	1.00	243.086 7,225.076 8
5	13.363	马钱酸	[M + Na] ⁺	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	399.126 2	399.126 9	0.70	359.134 6,215.091 8
6	15.286	8-表马钱苷	[M + Na] ⁺	C ₁₇ H ₂₆ O ₉	413.141 8	413.142 5	0.70	373.149 6,229.107 8
7	16.132	7-表马钱苷	[M + Na] ⁺	C ₁₇ H ₂₆ O ₉	413.141 8	413.141 9	0.10	373.149 6,229.107 8
8	18.704	绿原酸	[M - H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 8	353.087 1	-0.70	179.034 9,191.055 6
9	20.176	咖啡酸	[M - H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 5	179.034 2	-0.30	135.044 8
10	22.330	未知	[M - H] ⁺	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₅	721.213 8	721.212 6	-1.20	519.168 6,357.119 9
11	23.078	未知	[M + H] ⁺	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	413.108 9	413.106 7	-2.20	211.060 4,151.038 4
12	25.133	secologanoside-7-methyl ester 或未知	[M + H] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	405.139 1	405.140 5	1.40	243.086 7,225.076 8
13	29.990	secologanic acid	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	375.128 6	375.129 1	0.50	213.075 9,195.065 4
14	32.039	4- <i>O</i> -咖啡酰基奎宁酸	[M - H] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 8	353.090 6	2.80	179.034 1
15	33.452	7- <i>O</i> -ethyl sweroside	[M + Na] ⁺	C ₄ H ₅ O ₂	425.143 5	425.143 9	0.40	263.101 1,193.962 2
16	34.144	未知	[M + H] ⁺	C ₃₀ H ₂₈ O ₉	531.166 1	531.165 5	-0.60	274.068 2
17	34.584	当药苷	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	359.133 7	359.134 3	0.60	197.080 5
18	35.067	未知	[M + H] ⁺	C ₃₃ H ₃₁ NO ₆	536.207 9	536.210 7	2.80	197.080 7
19	36.122	马钱苷	[M + H] ⁺	C ₁₇ H ₂₆ O ₉	391.159 9	391.160 5	0.60	373.149 6,229.107 8
20	37.968	未知	[M + H] ⁺	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₅	721.213 8	721.215 4	1.60	519.168 6,357.119 9
21	39.419	未知	[M + H] ⁺	C ₂₈ H ₂₈ O ₃	411.196 6	411.198 9	2.30	248.961 5
22	42.375	未知	[M + H] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ O ₁₂	435.150 8	435.154 5	3.70	179.069 4
23	43.024	未知	[M + H] ⁺	C ₂₅ H ₂₄ O ₃	371.165 3	371.166 2	0.90	248.961 5
24	44.496	断氧化马钱苷	[M + H] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	405.139 6	405.140 3	0.70	243.086 6,225.076 7
25	45.342	7-表 vogeloside	[M + H] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	389.144 7	389.144 1	-0.60	227.091 2,209.080 6
26	46.529	vogeloside	[M + H] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	389.144 7	389.144 0	-0.70	227.091 2,209.080 6
27	47.793	未知	[M + H] ⁺	C ₂₀ H ₃₈ O ₁₀	437.239 2	437.236 7	-2.50	415.252 9
28	51.485	未知	[M + H] ⁺	C ₂₈ H ₄₄ O ₆	475.306 5	475.308 3	1.80	459.280 3
29	52.914	未知	[M + H] ⁺	C ₂₅ H ₄₈ O ₈	475.327 6	475.326 9	-0.70	389.124 4
30	53.628	dimethyl-secologanoside	[M + H] ⁺	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₁	419.155 3	419.154 5	-0.80	257.102 1,209.080 7
31	54.332	芦丁	[M + H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.160 7	611.162 1	1.40	303.049 7,285.039 2
32	57.519	槲皮素-3- <i>O</i> - β -D 葡萄糖苷	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.102 8	465.103 5	0.70	173.060 5,153.018 6
33	55.156	金丝桃苷	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.102 8	465.101 9	-0.90	257.044 6,229.049 6
34	55.837	木犀草苷	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.107 8	449.106 7	-1.10	185.060 5,153.018 7
35	57.749	木犀草素-7- <i>O</i> - β -D 葡萄糖苷	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.107 8	449.108 7	0.90	287.055 7,269.044 6
36	59.189	未知	[M + H] ⁺	C ₄₂ H ₄₀ O ₁₄	767.234 5	767.234 8	0.30	608.385 6

续表 2

峰号	t_R/min	化合物	选择离子	化学式	理论值 m/z	测定值 m/z	δ	二级碎片特征 离子峰
37	59.541	忍冬苷	$[M+H]^+$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.165 8	595.166 0	0.20	241.049 6, 213.055 2
38	60.101	山柰酚-3-O-芸香糖苷	$[M+Na]^+$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.165 8	595.165 5	-0.30	287.055 3, 269.044 7
39	60.343	未知	$[M+H]^+$	$C_{40}H_{32}O_4$	575.222 8	575.223 7	0.90	713.270 7
40	61.189	异绿原酸 A	$[M-H]^-$	$C_{25}H_{22}O_{12}$	515.119 5	515.116 8	-2.70	353.087 2, 191.055 2
41	62.250	异绿原酸 B	$[M-H]^-$	$C_{25}H_{22}O_{12}$	515.119 5	515.120 4	0.90	353.087 2, 191.055 2
42	62.591	未知	$[M-H]^+$	$C_{33}H_{28}O_5$	503.186 4	503.183 7	-2.70	415.201 5
43	65.156	未知	$[M+H]^+$	$C_{27}H_{26}O$	365.191 1	365.190 4	-0.70	248.961 4
44	66.123	异绿原酸 C	$[M-H]^-$	$C_{25}H_{22}O_{12}$	515.119 5	515.120 3	0.80	353.087 2, 191.055 2
45	66.541	金圣草素-7-O- β -D	$[M+H]^+$	$C_{28}H_{34}O_{15}$	609.182 5	609.181 2	-1.30	301.070 9, 286.047 6
46	67.827	未知	$[M+H]^+$	$C_{16}H_8O_{11}$	377.013 7	377.016 4	2.70	362.222 5
47	68.684	未知	$[M+H]^+$	$C_{23}H_{35}NO$	340.264 6	340.262 2	-2.40	211.094 8
48	70.091	槲皮素	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{10}O_7$	303.049 9	303.050 1	0.20	155.034 2, 137.023 6
49	71.552	木犀草素	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{10}O_6$	287.055 0	287.055 6	0.60	241.049 8, 213.055 1
50	71.959	灰毡毛忍冬皂苷乙	$[M+H]^+$	$C_{65}H_{106}O_{32}$	1 399.674 5	1 399.676 5	2.00	1 237.619 7, 943.524 5
51	73.684	灰毡毛忍冬皂苷甲	$[M+H]^+$	$C_{59}H_{96}O_{27}$	1 237.621 7	1 237.618 9	-2.80	1 075.569 1, 943.526 6

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 分别精密吸取 10 种对照品溶液适量, 其中马钱酸, 绿原酸, 马钱苷, 断氧化马钱苷, 芦丁, 金丝桃苷, 木犀草苷, 异绿原酸 A, 异绿原酸 C 分别稀释 2.5, 5, 10, 20, 40, 100, 200, 500, 1 000, 2 000 倍, 得到不同质量浓度的对照品混合溶

液; 咖啡酸稀释 2, 4, 5, 10, 20, 40, 100, 200, 1 000 倍得到不同质量浓度的对照品混合溶液。按照 2.3 项下色谱条件进样分析, 以峰面积积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行回归计算, 各成分的回归方程、相关系数、线性范围、检测限、定量限见表 3。

2.6.2 精密度试验 取同一金银花样品提取液, 按

表 3 10 种成分回归方程、检出限和定量限

Table 3 Regression equations, limit of detection and limit of quantitation

峰号	化合物	回归方程	相关系数	线性范围/ $mg \cdot L^{-1}$	检测限/ $mg \cdot L^{-1}$	定量限/ $mg \cdot L^{-1}$
5	马钱酸	$Y = 17\ 656X - 26\ 300$	0.999 7	0.51 ~ 408.00	0.009	0.027
8	绿原酸	$Y = 32\ 516X + 13\ 031$	0.999 5	0.51 ~ 404.00	0.007	0.020
9	咖啡酸	$Y = 55\ 197X + 154\ 120$	0.999 5	1.00 ~ 500.00	0.016	0.053
19	马钱苷	$Y = 21\ 486X - 15\ 956$	0.999 8	0.51 ~ 408.00	0.010	0.031
24	断氧化马钱苷	$Y = 15\ 792X - 4\ 659$	0.999 9	0.52 ~ 412.00	0.014	0.042
31	芦丁	$Y = 54\ 484X + 73\ 212$	0.999 4	0.53 ~ 420.00	0.015	0.046
33	金丝桃苷	$Y = 71\ 407X + 161\ 670$	0.999 3	0.51 ~ 404.00	0.014	0.041
34	木犀草苷	$Y = 38\ 959X + 55\ 349$	0.999 3	0.50 ~ 400.00	0.018	0.060
40	异绿原酸 A	$Y = 72\ 565X + 147\ 195$	0.999 3	0.52 ~ 416.00	0.030	0.090
45	异绿原酸 C	$Y = 46\ 022X - 20\ 814$	0.999 9	0.51 ~ 408.00	0.027	0.082

2.3 项下 色谱条件连续进样 6 次, 分别测出选定的 10 种化合物的峰面积和保留时间, 计算出各个化合物的峰面积和保留时间的 RSD。10 种化合物峰面积 RSD 分别为 2.1%, 1.3%, 1.3%, 1.0%, 1.5%, 0.9%, 2.1%, 1.8%, 0.6%, 1.0%; 保留时间的 RSD

分别为 0.3%, 0.1%, 0.3%, 0.4%, 0.3%, 0.3%, 0.3%, 0.3%, 0.2%, 0.4%, 说明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 精密称定同一金银花样品 6 份, 分别用上述 2.1 项下方法制备供试品溶液, 后进样分析, 经过计算得到 10 个特征化合物峰面积的

RSD 分别为 2.2% , 1.6% , 1.8% , 2.1% , 1.2% , 2.0% , 1.6% , 1.9% , 2.4% , 1.4% ; 保留时间的 RSD 分别为 0.2% , 0.3% , 0.2% , 0.2% , 0.3% , 0.2% , 0.2% , 0.2% , 0.3% , 0.1% , 说明该方法的重复性较好。

2.6.4 稳定性试验 取同一金银花样品分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 检测和计算得到 10 个化合物峰面积的 RSD 分别为 2.7% , 2.6% , 2.2% , 2.6% , 2.4% , 2.9% , 1.9% , 2.0% , 2.9% , 2.6% ; 保留时间的 RSD 分别为 0.4% , 0.2% , 0.1% , 0.2% , 0.09% , 0.3% , 0.1% , 0.3% , 0.2% , 0.2% 。其保留时间的 RSD 均 < 1% , 峰面积的 RSD 均 < 5% , 说明该样品的化学性质在 24 h 内较稳定。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取金银花样品 6 份, 每份 1.0 g, 分别精密称定加入马钱酸, 绿原酸, 马钱苷, 断氧化马钱苷, 芦丁, 金丝桃苷, 木犀草苷, 异绿原酸 A, 异绿原酸 C, 对照品适量, 按上述供试品溶液制备方法处理后进样分析。其平均回收率分别为 97.32% , 101.09% , 98.85% , 98.06% , 98.97% , 102.02% , 99.19% , 102.08% , 98.12% , 99.08% ; RSD 分别为 2.2% , 2.1% , 2.0% , 2.1% , 1.9% , 2.0% , 2.3% , 2.2% , 2.2% , 2.9% 。

2.7 指纹图谱的建立 取 10 批次山东金银花样品, 按 2.1 项下方法将其制备成供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 建立金银花药材的 RRLC 特征指纹图谱见图 2。在本研究建立的分析系统下, 10 批金银花 50% 甲醇提取物化学成分出峰时间均在 75 min 之前, 主要有 26 个共有峰。选取特征性明显的 5 个色谱峰(分别为峰 8, 11, 25, 40, 44)作为特征峰。选择 8 号峰(峰面积最大, 化学性质较稳定, 保留时间以及峰面积重复性良好, 特征性强, 与其他相邻峰分离良好, 采用化学工作站计算该峰的纯度表明该峰为一纯化合物)为参照峰(相对保留时间和相对峰面积均设为 1), 用于计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果表明, 各色谱峰相对保留时间相差不大, 而相对峰面积有一定差距, 但各批次图谱的轮廓一致。

2.8 相似度分析 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)对 10 批湖南山东, 6 批河南产地的金银花和 6 批湖南山银花的指纹图谱进行相似度分析。结果表明, 河南、山东产区金银花药材相似度较高, 均 > 0.975; 湖南产区的山银花药材相似度较低, 均 < 0.635; 说明金银花药材质量存在明

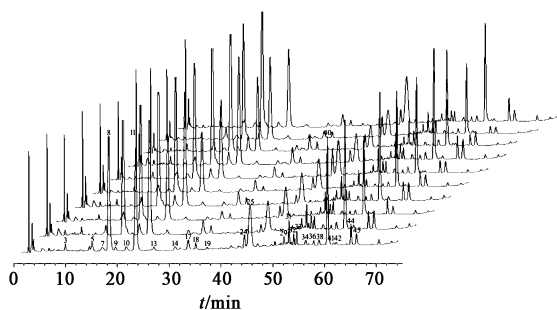


图 2 10 批次金银花 HPLC 指纹谱
Fig. 2 HPLC fingerprints of 10 batches of Lonicerae Japonicae Flos

显品种差别, 所得数据为金银花药材质量控制研究提供了参考和依据。见表 4。

表 4 不同产地金银花、山银花 HPLC 指纹图谱相似度计算
Table 4 Similarity calculation result of different areas Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos

No.	山东金银花	No.	河南金银花	No.	湖南山银花
1	0.982	1	0.975	1	0.575
2	0.978	2	0.997	2	0.599
3	0.986	3	0.989	3	0.596
4	0.990	4	0.995	4	0.632
5	0.992	5	0.968	5	0.592
6	0.985	6	0.984	6	0.625
7	0.987				
8	0.976				
9	0.982				
10	0.979				

2.9 样品的含量测定 取 10 批山东, 6 批河南金银花, 6 批山银花(湖南), 采用 2.1 项下方法制备供试品溶液, 采用 2.3 项下色谱条件分别进样分析, 得出上述 10 种化合物的相应峰面积, 回归方程算出各化合物的含量, 结果见表 5。

用上述多批次的金银花和山银花含量结果的平均值作图, 进一步对比山东金银花、河南金银花和山银花的主要化学成分含量, 见图 3。

结合表 5 和图 3 数据可以看出, 金银花和山银花中 10 种主要化学成分有相似的分布规律。山东、河南金银花和湖南山银花中绿原酸的质量分数依次为 16.21, 16.06, 16.57 mg·g⁻¹。金银花中马钱酸和芦丁的含量明显高于山银花; 金银花中绿原酸、断氧化马钱苷、异绿原酸 A 和 C 的含量明显低于山银花; 10 种成分的总质量分数依次为, 山东金银花(26.85 mg·g⁻¹) > 河南金银花(26.55 mg·g⁻¹) > 湖南山银花(24.91 mg·g⁻¹)。

表 5 不同产地金银花和山银花中 10 种成分的含量测定

Table 5 Content determination results of areas *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* mg·g⁻¹

产地	马钱酸	绿原酸	咖啡酸	马钱苷	断氧化马钱苷	芦丁	金丝桃苷	木犀草苷	异绿原酸 A	异绿原酸 C	总和
山东 1	0.95	18.31	0.32	0.22	1.36	2.02	0.82	0.74	2.55	0.63	27.91
山东 2	1.40	17.38	0.41	0.12	1.99	2.36	0.67	1.53	2.48	0.66	28.99
山东 3	1.05	16.23	0.31	0.19	1.29	2.76	0.76	0.83	2.36	0.50	26.28
山东 4	1.12	14.47	0.35	0.22	1.16	2.45	0.66	1.31	2.64	0.75	25.13
山东 5	1.15	16.24	0.41	0.13	2.52	2.07	0.85	0.85	2.46	0.64	27.31
山东 6	1.27	14.34	0.34	0.22	1.36	2.60	0.93	1.42	2.21	0.70	25.39
山东 7	1.35	17.49	0.39	0.23	1.41	2.21	0.77	0.93	2.24	0.59	27.61
山东 8	1.21	15.17	0.41	0.17	1.32	3.52	1.13	1.29	2.33	0.64	27.20
山东 9	1.31	17.03	0.42	0.13	1.12	1.01	1.25	1.67	2.17	0.58	26.68
山东 10	1.06	15.40	0.36	0.19	1.22	2.65	1.08	1.14	2.42	0.48	25.99
河南 1	0.99	17.19	0.43	0.22	1.13	2.81	1.06	1.07	2.20	0.65	27.73
河南 2	1.21	14.37	0.37	0.10	1.72	2.03	0.66	0.69	2.84	0.69	24.68
河南 3	0.99	15.02	0.31	0.22	1.42	2.55	0.74	1.27	2.48	0.48	25.48
河南 4	1.25	16.19	0.33	0.17	1.20	2.24	1.22	1.17	2.79	0.61	27.18
河南 5	0.84	15.22	0.41	0.13	1.25	2.81	0.67	1.39	2.55	0.74	26.02
河南 6	0.96	18.38	0.36	0.21	1.16	2.28	0.88	0.83	2.47	0.66	28.21
湖南 1	0.45	15.03	0.33	0.09	1.36	0.56	0.77	0.67	3.15	0.85	23.27
湖南 2	0.62	15.78	0.41	0.09	1.82	0.68	0.60	0.40	2.51	0.72	23.63
湖南 3	0.83	17.53	0.32	0.21	1.35	0.64	0.74	0.63	3.04	0.83	26.13
湖南 4	0.55	16.40	0.36	0.14	1.54	0.56	1.04	0.68	2.74	0.80	24.81
湖南 5	0.70	18.27	0.33	0.19	1.73	0.54	0.69	0.86	2.93	0.57	26.81
湖南 6	0.67	16.41	0.36	0.18	1.47	0.72	0.96	0.60	2.63	0.83	24.82

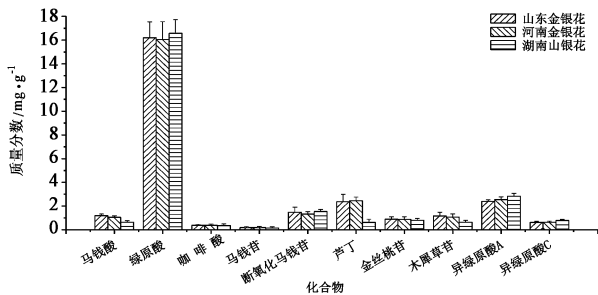


图 3 山东、河南金银花和湖南山银花的活性成分含量对比 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Comparison of active ingredient content of *Lonicerae japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3 讨论

3.1 提取条件的优化 超声提取法具有快速、高效等特点,在中草药有效成分的提取中具有广阔应用前景。本研究采用超声提取法用于金银花活性成分的提取,同时考察了提取溶剂、提取时间、提取次数等因素对提取效率的影响。

3.1.1 提取溶剂的选择 取金银花药材,粉碎,过

4 号筛。精密称取金银花粉末 8 份,每份 0.5 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,分别加入乙醇,70% 乙醇,50% 乙醇,30% 乙醇,甲醇,70% 甲醇,50% 甲醇和 30% 甲醇 50 mL,称重。超声提取 30 min,用提取溶剂补足减失质量。取提取溶液,摇匀,过 0.22 μm 有机滤膜,精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪分析。综合比较分析,采用 50% 甲醇作为提取溶剂时,色谱峰较多、信号较强,故本实验选择 50% 甲醇作为提取溶剂。

3.1.2 提取时间的优化 精密称取金银花粉末 3 份,每份 0.5 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇 50 mL,称重。分别超声提取 15,30,45 min,用提取溶剂补足减失的质量。取提取溶液,摇匀,过 0.22 μm 有机滤膜,精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪分析。结果显示 30 和 45 min 提取效率高于 15 min,但采用 30 和 45 min 提取无明显差别,故选择时间较短的 30 min 作为提取时间。

3.1.3 提取次数的优化 精密称取金银花粉末 3

份,每份 0.5 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇 50 mL,称重。超声提取 30 min,用提取溶剂补足减失的质量。取提取溶液作为样品 1,过滤后的残渣,同样方法再处理 2 次,分别作为样品 2 和 3。上述 3 种样品,分别摇匀,过 0.22 μm 有机滤膜,各精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪分析。结果显示,样品 2 和 3 的色谱图中几乎无明显的色谱峰出现,说明金银花超声提取 1 次已达到很好的提取效果。

3.2 色谱条件优化 本实验比较了 Unitary C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 2.8 μm), Agilent SB C_{18} (3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μm), Agilent XDB C_{18} (4.6 mm \times 50 mm, 1.8 μm) 和 Accucore C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 2.6 μm), 共 4 个不同类型 C_{18} 色谱柱对金银花提取物的分离效果,结果发现,采用 Agilent SB C_{18} 色谱柱(3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μm) 时分离度较好、色谱峰较多。因此,选用 Agilent SB C_{18} 色谱柱(3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μm) 对金银花提取物进行色谱分离分析。金银花提取物中化学成分复杂多样,化合物极性较强,故采用洗脱范围较广的乙腈-水作为流动相,梯度洗脱对金银花提取物进行分析。

由于金银花中含有有机酸类和黄酮类等酸性成分,色谱峰容易拖尾,考虑在流动相中加入酸来改善色谱峰峰型。考察了水相和乙腈相中分别加入不同比例的甲酸(0.2%, 0.5%, 0.8% 和 1.0%) 对金银花提取物色谱分离的影响,结果发现水相中加入 1.0% 甲酸和乙腈中加入 1.0% 甲酸时色谱峰对称性较好、峰型尖锐、顶端不分叉。另外,先后调节柱温箱温度在 25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$ 时比较得出,当柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 时,色谱峰分离度和峰型较好。在波长选择上,经二极管阵列检测器考察各类成分在不同波长(190 ~ 600 nm) 下的紫外吸收波长,结果表明,在 254 nm 下各类成分均具有吸收,且各化合物具有较好的分离度和灵敏度,因此选择 254 nm 作为金银花提取物的检测波长。

近年来,RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术被广泛运用于中药及复方多成分的分析鉴定,该技术可以高效、快速对中药多种成分进行准确鉴定。本研究利用 RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术对山东道地金银花化学成分进行了快速分析,并检测到 51 种化学成分,从中快速鉴别出 32 种化学成分。在此基础上建立了山东道地金银花的多指标定量指纹图谱,为进一步提高金银花质量标准提供了方法和技术支持。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M].

北京:中国医药科技出版社,2015:221.

[2] 陈继明,洪超群. 金银花药理作用分析[J]. 亚太传统医药,2015,11(5):43-44.

[3] 宋冬冬. 金银花药材研究进展[J]. 临床合理用药杂志,2014,7(4A):42,44.

[4] 王文炳. 山东道地药材金银花三种品系的鉴别研究[D]. 济南:山东中医药大学,2010.

[5] 丁春光,孙素琴,周群,等. 应用 HPLC-DAD 及 HPLC-HRMS 技术研究不同贮存年限陈皮的指纹图谱[J]. 中国新药杂志,2008,17(11):927-930.

[6] 赵媛媛,杨倩茹,郝江波,等. 金银花与忍冬藤及叶药理作用差异的研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(13):2422-2427.

[7] 张定堃,韩雪,李瑞煜,等. UPLC-Q-TOF-MS 分析不同产地泥附子化学成分的差异[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):463-469.

[8] YAN Y, CHAI C Z, WANG D W, et al. HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS analysis and HPLC quantitation of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Ge-Gen decoction [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013,80(3):192-202.

[9] DONG J, ZHU Y, GAO X, et al. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Dan-Lou tablet by ultra high performance liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013,80(3):50-62.

[10] 邵林,郭庆梅,冉蓉,等. 山东不同栽培品种金银花 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,19(17):117-121.

[11] 李峰. 山东道地药材金银花的多元多息指纹图谱鉴别研究[D]. 济南:山东中医药大学,2004.

[12] 何兵,杨世艳,张燕. 金银花提取物多指标成分含量及指纹图谱同时检测研究[J]. 中国药学杂志,2012,47(16):1280-1284.

[13] 周萍,胡俊扬,毛春芹,等. 金银花高效液相指纹图谱条件优化与建立[J]. 时珍国医国药,2013,24(1):97-99.

[14] 张丽媛,李遇伯,李利新,等. RRLC-Q-TOF/MS 分析金银花的化学成分[J]. 中南药学,2012,10(3):204-208.

[15] QI L W, CHEN C Y, LI P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos Lonicerae Japonicae by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009, 23(19):3227-3242.

【责任编辑 顾雪竹】