

# 不同产地金银花药材的 UPLC 指纹图谱分析

韩永成, 刘伟\*, 陈宁, 崔永霞, 黄丽杰  
(河南中医学院分析测试中心, 郑州 450008)

**[摘要]** **目的:** 建立不同产地金银花药材的超高效液相特征性指纹图谱, 为有效控制和科学评价金银花药材整体质量提供依据。**方法:** 采用 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流动相乙腈-0.2% 磷酸水, 以 0.4 mL·min<sup>-1</sup> 的流速进行梯度洗脱, 检测波长 238 nm, 柱温 30 ℃。**结果:** 在 21 min 内得到金银花药材的指纹图谱, 对其中 5 个色谱峰进行了初步归属, 并对 14 批药材样品进行了分析, 其相似度为 0.915 ~ 0.987。**结论:** UPLC 指纹图谱方法较 HPLC 大大缩短了分析时间, 可用于金银花药材的质量评价。

**[关键词]** 金银花; 超高效液相色谱; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0067-03

**[doi]** 10.11653/syfyj2014020067

## UPLC Fingerprint of *Lonicera japonica* from Different Areas

HAN Yong-cheng, LIU Wei\*, CHEN Ning, CUI Yong-xia, HUANG Li-jie  
(Center of Analysis and Measurement, Henan University of  
Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an UPLC method of determining the characteristic chromatographic profile of *Lonicera japonica* for controlling the drug quality quickly and accurately. **Method:** The analysis was performed on an Agilent C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) with acetonitrile-0.2% phosphoric acid as mobile phase in gradient elution mode. The flow rate was 0.4 mL·min<sup>-1</sup> and the injection volume was 2.0 μL with the detection wavelength of 238 nm. The column temperature was set at 30 ℃. **Result:** The fingerprint of *Lonicera japonica* was obtained within 21 min and five peaks in the fingerprint were designed. 14 samples were analyzed and the similarities were 0.915-0.987. **Conclusion:** The UPLC system enjoys the merits of a higher speed, sensitivity, and resolution, it can be used to control the quality of *L. japonica*.

**[Key words]** *Lonicera japonica*; UPLC; fingerprint

金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开的花<sup>[1]</sup>, 主产于山东、河南等地。由于受光照时间、降雨量、温度和生态环境等影响, 不同产地金银花药材质量差异较大。金银花化学成分研究表明, 其

富含挥发油, 此外含黄酮类、三萜类及有机酸等<sup>[2-4]</sup>。现代药理实验研究证明其具有广谱抗菌、解热消炎作用, 相关文献报道较多<sup>[5-7]</sup>。金银花药材的 HPLC 指纹图谱的研究已有报道<sup>[8-11]</sup>, 而还未见金银花的 UPLC 特征性指纹图谱研究报道。本实验根据国家药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版科研类), 建立了不同产地金银花药材 UPLC 指纹图谱, 同时标定了绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 5 种成分。

### 1 材料

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪(1290 二元梯度泵、1260DAD 检测器)(美国 Agilent 公司), BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平公司), KQ-

**[收稿日期]** 20130606(014)

**[基金项目]** 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2010A360016)

**[第一作者]** 韩永成, 硕士研究生, 从事药物分析研究, Tel: 0371-65575838, E-mail: hyc.ok.hi@163.com

**[通讯作者]** \* 刘伟, 学士, 教授, 硕士研究生导师, 从事中药质量标准 and 仪器分析方法的研究, Tel: 0371-65575838, E-mail: hnliuwei2088@sina.com

500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),METTLER AE240 型电子分析天平(瑞士)。对照品:绿原酸(批号 110753-200212),芦丁(批号 100080-200707),木犀草苷(批号 111520-200201)均购自中国药品生物制品检定所;异绿原酸 B(批号 MUST-09061602),异绿原酸 A(批号 MUST-09061601)均购自成都曼思特生物科技有限公司,含量均 $\geq 98$ 。乙腈(美国天地试剂公司),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。实验药材采自于各个不同产地,经河南中医学院董诚明教授鉴定为金银花 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花。14 批金银花药材的具体来源见表 1。

表 1 金银花药材来源

No.	产地来源	No.	产地来源
1	河南封丘贾庄	8	河南封丘小石桥
2	河南新密	9	河南封丘申庄
3	河南封丘杜庄	10	河南封丘北辛庄
4	河南焦作	11	河南封丘梁庄
5	河南封丘鸭固集	12	山东平邑
6	河南禹州	13	湖南隆回县
7	河南商丘	14	河南郑州

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Agilent ZORBAX RH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流动相 0.2% 磷酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~4 min, 95% A; 4~4.1 min, 95%~92% A; 4.1~10 min, 92% A; 10~10.1 min, 92%~88% A; 10.1~13 min, 88% A; 13~15 min, 88%~86% A; 15~21 min, 86%~65% A), 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 238 nm, 柱温 30 °C, 进样量 2.0 μL。

**2.2 供试品溶液的制备** 取各产地金银花粉末(过 60 目)约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 的乙醇 30 mL, 称定, 超声处理 45 min, 放冷至室温, 称定, 加 70% 乙醇补足失量, 摇匀, 滤过, 即得, 置于 4 °C 的冰箱中冷藏, 备用。临用时用 0.22 μm 微孔滤膜过, 作为供试品溶液。

**2.3 对照品溶液的制备** 精密取绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B 对照品适量, 置棕色量瓶中, 加 70% 的乙醇配制成浓度分别为 39.6, 39.8, 39.4, 44.7, 39.3, 40.2 μg·mL 的混合对照品溶液, 即得, 冷藏备用。临用时用 0.22 μm 微孔滤膜过, 作为对照品溶液。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取同一份供试品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件进样, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 测得 21 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2.0%, 结果表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取同一批样品 6 份, 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 记录色谱图, 测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值 RSD 均 < 2.8%, 结果表明该方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一份供试品溶液, 在相同的条件下分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行测定, 记录色谱图, 结果表明各共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值 RSD 均 < 2.7%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

**2.5 样品测定** 取 14 批金银花药材样品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件依次进样测定, 记录色谱图, 共获得 21 个共有峰, 并指认其中 5 个共有峰, 分别为绿原酸(8 号峰)、芦丁(16 号峰)、木犀草苷(17 号峰)、异绿原酸 B(19 号峰)、异绿原酸 A(20 号峰)。混合对照品 UPLC 色谱图见图 1; 金银花样品指纹图谱参照色谱图见图 2。

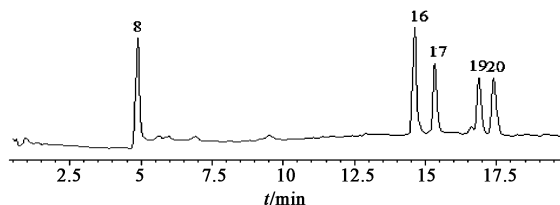


图 1 混合对照品 UPLC

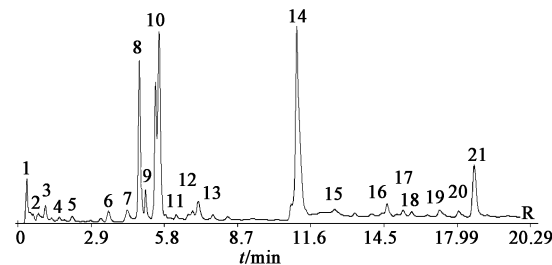


图 2 金银花样品指纹图谱参照

## 2.6 特征指纹图谱的建立

**2.6.1 参比峰的选择** 在各批次样品指纹图谱中, 绿原酸分离度良好, 峰位相对居中, 峰面积较大, 并且所有样品共有, 所以确定绿原酸为参照峰。

**2.6.2 特征指纹图谱的建立及相似度评价** 将所得的 14 批金银花药材 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入国家药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版科研类)软件, 以 S1 批药材

图谱作为参照谱进行指纹匹配,确定了 21 个共有峰,建立了金银花药材特征指纹图谱,并进行了相似度计算,14 批药材的相似度分别为 0.929,0.974,0.990,0.915,0.947,0.996,0.961,0.915,0.936,0.938,0.973,0.942,0.924,0.987 各批药材相似度较好,见图 3。

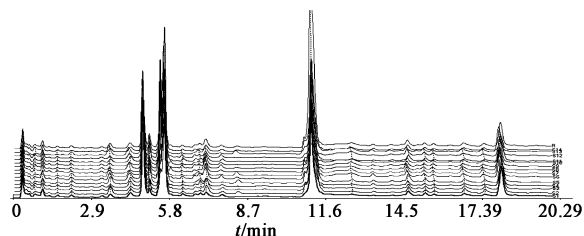


图 3 14 批金银花样品指纹图谱共有模式色谱

**2.6.3 各产地药材指纹图谱的聚类分析** 对 14 个产地的金银花做指纹图谱分析,获得包括绿原酸峰(8 号峰)的 21 个共有色谱峰,将各个共有峰相对于参比峰的峰面积量化,得到  $14 \times 21$  阶数据矩阵,由软件 SPSS 19.0 版作聚类分析,采取选用欧氏距离作为样品间的相似性测度,采用可变类平均法进行聚类分析<sup>[8]</sup>,结果见图 4。聚类分析将 14 个产地的金银花药材分为了两类,S1,S2,S3,S5,S8,S9,S10,S11,S12,S14 样品为一类;S4,S6,S7,S13 样品为一类。把指纹图谱与相似度及聚类分析相结合来综合评价金银花药材质量,结果更科学、更全面、更准确,对药材的质量鉴定有重大意义。

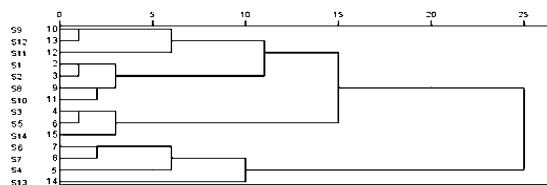


图 4 不同产地金银花样品的聚类分析

### 3 讨论

以 50% 甲醇、70% 甲醇、50 乙醇和 70% 乙醇作为提取溶剂进行考察,结果发现 70% 甲醇和 70% 乙醇所提取的样品出峰相对较多及峰面积大,由于甲醇有毒,故采用 70% 乙醇作为提取溶剂。

考察了用超声和水浴回流两种提取方法进行试验,结果发现回流和超声提取所得色谱峰及峰面积相当,采用相对简便的超声提取。对超声时间、超声频率、溶剂用量进行考察,结果表明超声时间为 45 min,80% 超声频率(250 W,35 kHz)和溶剂用量为 30 mL 时效果较好。

用多种流动相梯度洗脱系统进行洗脱,选用了

甲醇-水、甲醇-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.2% 磷酸水溶液流动相进行梯度洗脱,结果发现乙腈-0.2% 的磷酸水溶液流动相系统,各色谱峰的分度度相对较好,基线平稳,有利于指纹图谱的分析,因此流动相洗脱系统采用乙腈-0.2% 磷酸水溶液梯。

根据 3D 光谱图,在 238 nm 波长下色谱图的色谱峰最多、基线噪音较低,各成分的分度度相对较好,因此选择 238 nm 作为检测波长。

由于 UPLC 较小颗粒度的色谱柱填料,增加了分析的通量、灵敏度及色谱峰容量,能显著提高分离的效率从而达到显著缩短分析时间的目的<sup>[12]</sup>,本实验与本实验室的研究<sup>[13]</sup>及文献报道<sup>[8-11]</sup>比较共有峰明显增多。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:205.
- [2] 冯卫生,陈欣,郑晓珂,等. 金银花化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(5):338.
- [3] 赵国玲,刘佳佳,林丹,等. 金银花化学成分及药理研究进展[J]. 中成药,2002,24(12):973.
- [4] 黄丽瑛. 中药金银花化学成分的研究[J]. 中草药,1996,27(11):645.
- [5] 刘恩荔,李青山. 金银花的研究进展[J]. 山西医科大学学报,2006,37(3):331.
- [6] 庞瑞. 金银花有效成分的药理学研究进展[J]. 陕西中医学院学报,2011,34(3):77.
- [7] 罗中华. 几种中药对烫伤小鼠中性粒细胞的作用[J]. 解放军医学杂志,1994,19(4):271.
- [8] 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,2011,17(19):117.
- [9] 王孝勋,张守平,辛华. 毛花柱忍冬 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):76.
- [10] 白雪梅,罗强,贾天军,等. 金银花 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药,2004,26(7):521.
- [11] 郑晓珂,魏悦,冯卫生. 化学模式识别分析不同采收期金银花 HPLC 指纹图谱[J]. 中药材,2007,30(10):1203.
- [12] 王文琼. 超高压液相在药物分析领域中的应用[J]. 中国医药导报,2012,9(11):13.
- [13] 刘伟,茹凡书,崔永霞,等. 烘干与硫熏金银花药材 HPLC 指纹图谱对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):111.

[责任编辑 顾雪竹]