

华南忍冬藤 HPLC 指纹图谱研究

梁远园, 卢瑞琦, 张言, 肖国丽, 李业荣, 李国卫, 桂蜀华*
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立华南忍冬藤的 HPLC 指纹图谱, 为华南忍冬藤质量评价提供理论依据。方法: 采用 RP-HPLC。Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.3% 甲酸溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 238 nm。图谱用国家药典委员会“相似度评价软件(2004A)”处理分析。结果: 确立了 12 个共有峰的共有模式, 10 批红腺忍冬藤样品指纹图谱相似度高。结论: 方法简便、准确、重复性好, 为评价华南忍冬藤药材的质量提供了依据。

[关键词] 华南忍冬藤; 指纹图谱; 高效液相色谱; 马钱苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0138-04

[doi] 10.11653/syjf2013100138

Study on HPLC Fingerprints in Stem of *Lonicera confusa*

LIANG Yuan-yuan, LU Rui-qi, ZHANG Yan, XIAO Guo-li, LI Ye-rong, LI Guo-wei, GUI Shu-hua*
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC fingerprint analysis method for stem of *Lonicera confusa*, and to offer evidence for quality evaluation in stem of *Lonicera confusa*. **Method:** RP-HPLC method was performed on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with CH₃CN-0.3% CH₃OOH as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was kept at 30 °C; the detection wavelength was set at 238 nm. Similarity evaluation system for HPLC fingerprint of traditional Chinese medicine (2004A) was used in data analysis. **Result:** The common modes for the HPLC fingerprints were set up by ensuring sixteen common peaks in the chromatograms. Stem of *L. confusa* from ten batches samples were of high similarity in HPLC fingerprint. **Conclusion:** The established method is simple and accurate, and have a good repeatability, which will supply evidence for the quality evaluation in stem of *L. confusa*.

[Key words] stem of *Lonicera confusa*; fingerprints; HPLC; loganin

2005年版《中国药典》将华南忍冬定为山银花3种来源植物之一^[1]。山银花具有清热解毒、疏散风热之功效,常用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热,其化学成分复杂,主要含有挥发油类、黄酮类、有机酸类和三萜类等^[2-4];柴兴云等对华南忍冬的酚酸类及皂苷类成分进行了研

究分离得到30余个化合物^[5-7]。市面上华南忍冬的藤广泛作为忍冬藤的替用品,以“银花藤”为名大量流通并在临床上大量使用。目前,对山银花是质量研究集中在花蕾部位,王孝勋等对毛花柱忍冬花蕾进行了HPLC指纹图谱研究^[8];辛宁等对灰毡毛忍冬及华南忍冬花蕾的HPLC指纹图谱作了研究^[9-10];辛华等则对红腺忍冬叶的HPLC指纹图谱进行了研究^[11],但对山银花的藤茎研究未曾见报道。本实验通过10批华南忍冬藤的HPLC指纹图谱的研究及分析,从而为区别其他品种及华南忍冬藤的质量控制提供依据。

1 材料

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪 (LC-20AT 泵、自动进样器、UV-VIS 检测器) (日本岛津公司), L-

[收稿日期] 20120514(014)

[第一作者] 梁远园, 实验师, 从事中药新药的研究开发, Tel: 020-39358103, E-mail: Liang_yy_2004@126.com

[通讯作者] * 桂蜀华, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药新药的研究与开发, Tel: 020-39358183, E-mail: guiguihuahua@163.com

530 型台式低速离心机(湖南湘仪公司),KQ5200DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);sartorius CP225D 型电子天平(广州市正一科技有限公司),LE-500 型电子天平(佛山市华天力电子天平厂)。

马钱苷对照品(批号 111640-201005),绿原酸对照品(批号 110753-200413),咖啡酸对照品(批号

110885-200102)均购自中国药品生物制品检定所。乙腈,色谱纯,德国 MERCK 试剂公司,甲醇、甲酸,分析纯,广州化学试剂厂,水为纯净水,怡宝食品饮料有限公司。10 批华南忍冬藤药材购自全国各地药店及药材市场,由广州中医药大学中药学院张丹雁教授鉴定,为红腺忍冬藤 *Lonicera hypoglauca* DC,具体来源见表 1。

表 1 华南忍冬藤药材来源

No.	产地	来源	采集日期	指纹图谱编号
1	广西	广州采芝林药业连锁店	2011-09-08	S1
2	广西	广东和翔制药有限公司	2011-09-12	S2
3	广西桂林	桂林建干路六合路药材市场	2011-09-15	S3
4	广西玉林	玉林中药材市场	2011-09-05	S4
5	广西荔浦	荔浦市野外采集	2011-08-06	S5
6	广西南宁	南宁生源中药饮片有限公司	2011-09-20	S6
7	广西	广州清平药材市场	2011-08-12	S7
8	福建厦门	厦门燕来福制药有限公司	2011-10-07	S8
9	云南昆明	昆明菊花村药材市场	2011-09-01	S9
10	重庆	成都荷花池药材市场	2011-09-08	S10

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.3% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 6 min, 7% ~ 10% A; 6 ~ 20 min, 10% ~ 16% A; 20 ~ 25 min, 16% A; 25 ~ 41 min, 16% ~ 30% A; 41 ~ 50 min, 30% A; 50 ~ 55 min, 30% ~ 36% A; 55 ~ 60 min, 36% ~ 7% A); 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 238 nm, 记录时间 60 min, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 取马钱苷对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度。摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 备用。

2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量。静置 15 min, 超声提取 30 min, 取出, 放凉, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足缺失质量, 置于离心管中离心(4 000 r·min⁻¹) 5 min, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 备用。

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 2.1 项下条件重复进样 5 次, 以马钱苷为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.2%, 相对峰面积的 RSD < 2.0%, 采用国家药典委员会“相似度评价软件(2004A)”进行评价, 相似度为 0.99, 表明仪器精

密度好。

2.4.2 重复性试验 精密称取 6 份同一批药材粉末, 每份 2.0 g, 按 2.3 项方法平行制得 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 以马钱苷为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.1%, 相对峰面积的 RSD < 2.1%, 相似度为 0.98, 表明该方法重复性好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 按 2.1 项条件下于 0, 2, 6, 12, 18, 24 h 进样, 以马钱苷为参照峰, 计算其各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.8%, 相对峰面积的 RSD < 3.5%, 相似度为 0.99, 表明 24 h 内供试品溶液的成分稳定。符合对指纹图谱的要求。

2.5 指纹图谱的建立与分析 取 10 批华南忍冬藤供试品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 在 2.1 项下的色谱条件下依次进样检测, 记录色谱图, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》(研究版) 软件进行数据分析处理, 设定 S1 为参照图谱, 将其他供试品的色谱峰与参照图谱进行自动匹配, 生成华南忍冬藤指纹图谱共有模式(图 1), 并确定了 12 个共有特征峰, 12 个共有特征峰的面积总和占总面积的比例 > 90%, 故以此构建华南忍冬藤药材图谱的指纹特征, 计算 10 批供试品的相似度, 分别为 0.904, 0.943, 0.911, 0.943, 0.887, 0.932,

0.830, 0.953, 0.827, 0.921。由此可见, 华南忍冬藤指纹图谱相似度较高, 供试品叠加图谱(见图 2)。以马钱苷为参照峰(S 号峰), 马钱苷对照品图谱(图 3), 计算其他各共有峰的相对保留时间、相对峰面积, 见表 2, 3。

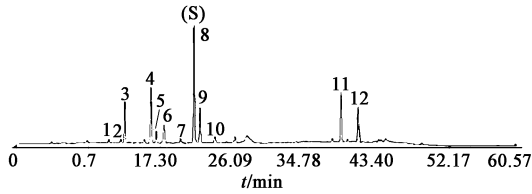


图 1 华南忍冬藤对照图谱

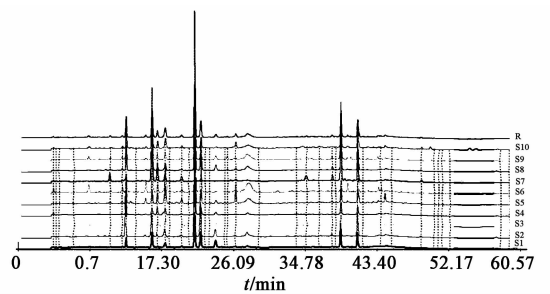


图 2 10 批红腺忍冬藤药材指纹图谱叠加

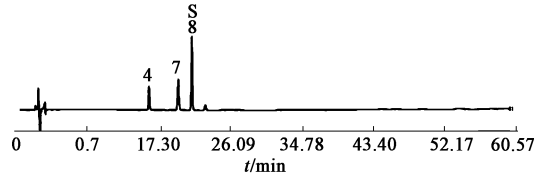


图 3 绿原酸、咖啡酸及马钱苷对照品色谱

3 讨论

3.1 提取溶剂选择 分别对水, 95% 乙醇, 50% 乙醇, 甲醇, 50% 甲醇进行了考察, 结果发现 50% 甲醇提取得到的图谱的峰的信息最为丰富, 所以选择 50% 甲醇作为提取溶媒。

3.2 提取方法的选择 通过对超声提取、回流提

取、索氏提取方法进行考察表明, 超声提取得到的色

表 2 10 批华南忍冬藤药材共有峰的相对保留时间

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.522	0.518	0.522	0.520	0.519	0.522	0.518	0.521	0.521	0.523
2	0.590	0.586	0.590	0.589	0.587	0.587	0.589	0.587	0.589	0.589
3	0.612	0.608	0.612	0.610	0.609	0.611	0.609	0.611	0.611	0.611
4	0.759	0.757	0.758	0.757	0.757	0.757	0.756	0.758	0.758	0.758
5	0.788	0.787	0.788	0.787	0.787	0.788	0.787	0.789	0.788	0.788
6	0.832	0.831	0.832	0.831	0.831	0.832	0.830	0.832	0.832	0.832
7	0.926	0.925	0.924	0.924	0.924	0.924	0.923	0.926	0.926	0.925
8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	1.034	1.034	1.033	1.033	1.033	1.033	1.033	1.034	1.034	1.033
10	1.118	1.119	1.118	1.118	1.118	1.122	1.125	1.119	1.119	1.119
11	1.826	1.831	1.824	1.827	1.826	1.826	1.825	1.828	1.827	1.825
12	1.921	1.927	1.919	1.922	1.921	1.921	1.920	1.922	1.922	1.920

表 3 10 批华南忍冬藤药材共有峰的相对峰面积

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.020	0.019	0.035	0.015	0.024	0.037	2.505	0.019	0.020	0.040
2	0.029	0.029	0.072	0.022	0.046	0.102	0.148	0.021	0.021	0.067
3	0.235	0.423	0.611	0.432	0.406	0.308	1.391	0.234	0.225	0.575
4	0.491	0.356	0.330	0.186	0.282	0.714	21.649	0.280	0.280	0.588
5	0.034	0.031	0.215	0.162	0.182	0.148	5.119	0.040	0.040	0.243
6	0.177	0.158	0.531	0.228	0.466	0.664	2.398	0.102	0.101	0.472
7	0.047	0.017	0.110	0.019	0.106	0.065	1.840	0.013	0.013	0.106
8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	0.495	0.512	0.459	0.198	0.299	0.770	0.350	0.361	0.360	0.421
10	0.269	0.134	0.154	0.083	0.085	0.033	0.143	0.081	0.086	0.067
11	0.512	0.183	0.645	0.298	0.264	0.203	20.058	0.277	0.263	0.554
12	0.402	0.307	0.359	0.181	0.318	0.340	9.152	0.258	0.248	0.572

谱峰的相应值较大,并且在 30 min 基本上能够提取完全,故选择超声 30 min 提取作为样品的提取方法。

3.3 色谱条件的选择 甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.3% 甲酸水及乙腈-0.4% 磷酸等不同流动相组合考察结果显示,以乙腈-0.3% 甲酸水为流动相,能较好地使样品中各色谱峰分离,基线平稳,并且在柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹ 条件下得到的效果最佳。

3.4 波长的选择 使用 Shimadzu 的 DAD 检测器进行紫外区全波长扫描,结果在 238 nm 检测到的色谱峰最多,基线平缓,干扰峰少,基本能够反应组分的全貌,故选择 238 nm 为检测波长。

3.5 色谱柱的选择 考察了 Phenomex 的 Luna C₁₈(2) 柱、Kromasil C₁₈ 柱及 Agilent Eclipse XDB C₁₈ 柱,结果表明 3 个品牌的 C₁₈ 柱得到的图谱在基线,峰数,峰形以及峰的对称性上没有明显变化,选择 Kromasil C₁₈ 柱进行指纹图谱研究。

3.6 参照物的选择 对共有峰做了部分标定,均为华南忍冬藤的有效成分,其中马钱苷是 HPLC 色谱图中较强的峰,并且与其他成分完全分离,响应稳定;另外马钱苷是中国药品生物制品检定所供应的对照品,有稳定的来源,故选择该化合物作为指纹图谱测定的参照物,以标定其他指纹峰。

由于中药成分的复杂性,仅仅以某一个单纯成分作为指标难以体现中药作用的整体性,但指纹图谱作为一种综合的、整体的鉴定手段,可以全面地反映中药的成分信息,准确且量化地对药材进行鉴别和质量评价。通过 10 批不同产地的华南忍冬藤样品的 HPLC 图谱发现,共有峰的相对保留时间具有较

好的重复性,图谱相似度较高,但是共有峰的相对峰面积差异较大,说明其化学成分相似,但是不同产地华南忍冬藤药材的指纹图谱在共有峰及特征指纹峰的相对比例大小上有一定的差异,该差异的产生与药材的种植区域有一定关联。

[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,2010:28.
- [2] 银胜高,辛宁. 山银花的研究概况[J]. 时珍国医国药,2007,18(12):2920.
- [3] 王志萍,邓家刚,王勤,等. 山银花研究的最新进展[J]. 广西中医学院报,2008,11(4):59.
- [4] 栗时颖,郑兴,廖端芳. 山银花研究进展[J]. 南华大学学报:医学版,2009,37(6):744.
- [5] 柴兴云,李萍,唐力英. 山银花化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(9):865.
- [6] 柴兴云,窦静,贺清辉,等. 山银花中酚酸类成分研究[J]. 中国天然药物,2004,2(6):339.
- [7] 柴兴云,李萍,窦静,等. 山银花中皂苷类成分研究[J]. 中国天然药物,2004,2(2):83.
- [8] 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.
- [9] 辛宁,丰杰,黄陆良,等. 灰毡毛忍冬药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材,2008,31(8):1138.
- [10] 辛宁,黄陆良,丰杰,等. 广西产山银花 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材,2009,32(2):185.
- [11] 辛华,张守平,程若敏,等. 红腺忍冬叶 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):103.

[责任编辑 顾雪竹]