

烘干与硫熏金银花药材 HPLC 指纹图谱对比

刘伟*, 茹凡书, 崔永霞, 韩永成

(河南中医学院分析测试中心, 郑州 450046)

[摘要] 目的: 建立不同产地烘干与硫熏金银花药材的指纹图谱, 对比分析硫熏对金银花内在成分的影响。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱条件: AichromBond-AQ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 238 nm。结果: 在选定的色谱条件下确定了 20 个共有峰构成 10 批烘干金银花药材的指纹特征指纹图谱, 各批样品的相似度均 >0.96; 16 个共有峰构成 10 批硫熏金银花药材的指纹特征指纹图谱, 各批样品的相似度均 >0.90。结论: 该法精密度高、重复性好, 可为烘干和硫熏金银花药材的指纹图谱评价提供依据。

[关键词] 金银花; 烘干; 硫熏; 高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0111-03

Comparison on Fingerprints of Drying and Sulphur Fumigated *Lonicera japonica* by HPLC

LIU Wei*, RU Fan-shu, CUI Yong-xia, HAN Yong-cheng

(Center of Analysis and Measurement of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC-FP analysis method for identification of drying and sulphur fumigated *Lonicera japonica* to comparison the impact on the internal components of sulphur fumigated *Lonicera japonica*. **Method:** The HPLC separation was performed on AichromBond-AQ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution with a mixture consisting of acetonitrile-0.1% phosphate acid; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; the column temperature was kept at 30 °C; the detective wavelength was 238 nm. **Result:** Twenty common peaks were obtained in 10 batches of samples and 16 common peaks were obtained in 10 batches of samples. The similarity of each fingerprint within one group was higher than 0.96 in drying *L. japonica* and 0.90 in sulphur fumigated *L. japonica*. **Conclusion:** This method shows high precision, good repeatability. It can be used for assessment the quality of drying and sulphur fumigated *L. japonica*.

[Key words] *Lonicera japonica*; drying; sulphur fumigated; HPLC; fingerprints

金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开的花^[1], 具有广谱抗菌、解热抗炎、利胆保肝等功效。金银花含有绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷、芦丁、槲皮素等成分^[2]。金银花经过硫磺熏蒸加工方法处理后, 能够达到干燥药材防腐防虫的目的。

2005 年版《中国药典》起虽然不再收载硫磺熏蒸方法, 但它仍作为一种传统的中药材防腐、防虫、杀虫的方法被广泛用于药材和食品加工贮藏。一些中药材经过硫磺后化学成分特别是有效成分会发生变化, 由此影响了中药材的质量, 有可能增加或降低药材的临床疗效。本实验采用反相高效液相色谱法, 对采自河南, 山东等产地的 10 批烘干和硫熏金银花药材进行了指纹图谱分析研究, 为进一步完善该药材的产地加工方法提供实验依据。

1 材料

DIONEX Summit 系统高效液相色谱仪,

[收稿日期] 20120821(002)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目 (2010A360016)

[通讯作者] * 刘伟, 教授, 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

FA2004A 1/万天平, 甲醇为色谱纯, 水为双蒸水, 其他试剂均为分析纯。中国药典会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(A/B 版)。试验所用金银花样品分别采自于封丘杜庄、封丘鸭固集、封丘小石桥、封丘贾庄、封丘牛所村、河南新乡、河南禹州、山东平邑、河南郑州、郑州密县, 以上 10 批鲜花样品均由河南中医学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。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 烘干金银花药材的制备 将采收或购买回的金银花置烘箱中烘干, 采用“四段升温法”, 初时温度一般 35 ℃ 左右, 烘 2 h 后, 温度升至 40 ℃, 鲜花排出水气, 经 5 ~ 10 h 后室内保持 45 ~ 50 ℃, 待烘 10 h 后鲜花水分大部分排出, 再把温度升至 55 ℃, 使花迅速干燥。

2.1.2 硫熏金银花药材的制备 将采收或购买回的金银花进行硫磺熏蒸, 硫熏方法为在密封的石砌炉中, 使用药材总量 1% 的硫磺量, 硫熏 1 次, 每次 60 min, 抽风 1 h, 阴干。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取各金银花样品粉末约 1 g(40 目筛), 精密称定, 置 100 mL 的圆底烧瓶中, 精密加入 50% 的甲醇 20 mL, 称定质量, 加热回流 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 抽滤, 并用 50% 甲醇洗涤。合并抽滤液, 用 50% 甲醇定容至 100 mL, 经微孔滤膜(0.45 μm) 过滤, 作为供试品溶液。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Agilent Technologies C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水^[3-4], 流动相比例见表 1; 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 238 nm, 记录时间 70 min, 进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱

t/min	B/%	A/%
0	5	95
20	10	90
40	15	85
55	22	78
70	50	50

2.2.2 样品测定 取 20 批供试品, 按 2.1.3 项下供试品制备方法制备并测定, 硫熏样品以 9 号峰, 烘干样品以 11 号峰的保留时间和色谱峰面积为内标

参照, 计算各指纹图谱的相对保留时间和相对共有峰面积值。

2.2.3 方法学考察

2.2.3.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 按照 2.2.1 项下色谱条件进样, 连续进样 5 次, 记录各共有峰保留时间和峰面积, 烘干样品以 11 号峰, 硫熏样品以 9 号峰分别作为内标准峰, 结果显示共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值的 RSD 分别为 0.07% ~ 0.27%, 0.96% ~ 3.00%; 0.01% ~ 0.44%, 0.25% ~ 2.94%。表明仪器精密程度良好。

2.2.3.2 重复性试验 精密称取同一批样品 5 份, 按照 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 进样, 记录各共有峰的保留时间和峰面积。结果显示烘干和硫熏样品各共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值的 RSD 分别为 0.04% ~ 0.35%, 0.26% ~ 2.80%; 0.03% ~ 0.99%, 0.47% ~ 2.93%。表明试验的重复性良好。

2.2.3.3 稳定性试验 取同一批供试品溶液, 在相同的条件下分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 测定, 记录各共有峰保留时间和峰面积, 结果显示共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值的 RSD 分别为 0.08% ~ 1.28%, 0.20% ~ 2.21%; 0.08% ~ 0.97%, 0.71% ~ 2.94%。表明样品在 24 h 内稳定。

2.2.4 指纹图谱的建立与比较

2.2.4.1 烘干金银花指纹图谱共有模式的建立 取 10 批烘干金银花样品粉末, 按照 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 分别取 10 μL 进样, 记录指纹图谱, 其相似度^[5] 分别为 0.967, 0.995, 0.962, 0.973, 0.995, 0.993, 0.988, 0.988, 0.982, 0.979。生成共有模式, 见图 1。

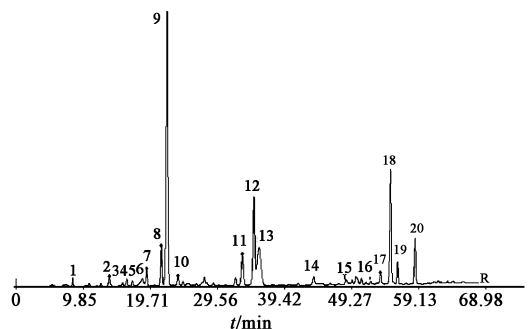


图 1 烘干金银花样品指纹图谱共有模式

2.2.4.2 硫熏金银花指纹图谱共有模式的建立 取 10 批烘干金银花样品粉末, 按按照 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 分别取 10 μL 进样, 记录指

纹图谱,其相似度分别为 0.928, 0.990, 0.975, 0.991, 0.989, 0.991, 0.992, 0.937, 0.994, 0.990。生成共有模式,见图 2。

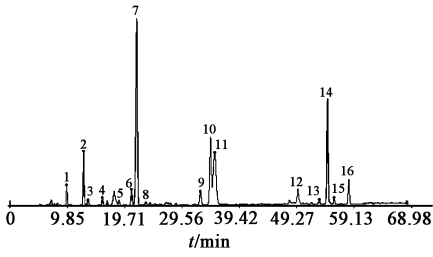


图 2 硫熏金银花样品指纹图谱共有模式

2.2.4.3 烘干与硫熏金银花指纹图谱的比较 通过中国药典会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(A/B版),得到烘干金银花样品与硫熏金银花样品的镜像对比图,见图 3。

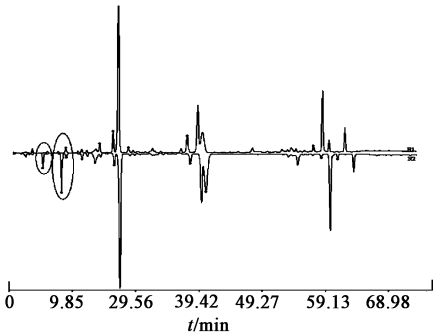


图 3 烘干标准图谱(上)和硫熏标准图谱(下)镜像对比图

通过图 3 可以看出,硫熏以后金银花药材在 10 min 前,明显多出 2 个峰,说明不同产地加工方法,对金银花药材的内在成分有一定的影响,具体原因还有待于进一步考证。

3 讨论

3.1 提取方法的选择 考察了 50% 甲醇作为提取溶剂用超声和水浴回流两种提取方法进行试验,结果发现超声提取所得色谱峰比回流所得色谱峰少、峰面积小。因此采用水浴回流提取法作为供试品溶液的提取方法。

3.2 流动相的选择 选用了甲醇-水、乙腈-水不

同比例变化的梯度洗脱,发现乙腈-水作为流动相时色谱峰分离效果比甲醇-水作为流动相峰的分离效果好,且基线较为平稳。为达到更好的分离效果,在水相中加入 0.1% 的磷酸来调节,最后确定流动相洗脱系统为乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱 70 min。

3.3 检测波长的选择 采用二极管阵列紫外检测器作为检测器,首先在上述色谱条件下采用全波长扫描进行测定,并同时在 200 ~ 400 nm 下采集其三维色谱图,通过对三维色谱图中所有波长下的出峰的情况、基线的平稳程度,以及各成分的分离情况等综合考虑,最终选定检测波长为 238 nm。

3.4 色谱图特征峰的标定及共有峰的选择 分别测定了 10 个产地的烘干和硫熏金银花样品,根据 HPLC 图谱给出的相关参数,考察了 70 min 内的色谱峰,分别选择硫熏样品共有峰中的 9 号峰($t_R = 33.86$ min),烘干样品共有峰中的 11 号峰($t_R = 33.35$ min)作为内参比峰,保留时间居于中间,分离度较好。

[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] 石俊英,张会敏,王颖,等. 山东道地药材金银花 HPLC 指纹图谱研究[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(1):69.
- [3] 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.
- [4] 辛华,单义旻,程若敏,等. HPLC 同时测定忍冬与红腺忍冬中 3 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):83.
- [5] 詹雪艳,史新元,段天璇,等. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):248.

[责任编辑 顾雪竹]