

山东不同栽培品种金银花 HPLC 指纹图谱的比较

邵林¹, 郭庆梅¹, 冉蓉², 周凤琴^{1*}, 张永清¹

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 齐鲁动物保健品有限公司兽药分厂, 济南 250100)

[摘要] 目的: 建立并比较山东不同栽培品种金银花的 HPLC 指纹图谱, 为考察其质量并对其品种鉴定与划分建立图谱标准。方法: 采用 HPLC, 以乙腈和 1% 醋酸水溶液进行梯度洗脱。使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”和 SPSS 软件进行数据处理, 对不同栽培品种金银花的 HPLC 指纹图谱进行了相似度和聚类分析。结果: 建立了山东不同栽培品种金银花的 HPLC 对照指纹图谱。结论: 山东产不同栽培品种金银花的指纹图谱有一定差异, 可为金银花的质量考察、品种鉴定及划分提供一定的参考依据。

[关键词] 金银花; 栽培品种; 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(2011)19-0117-05

Study on HPLC Fingerprint of *Lonicerae Japonicae* Flos from Shandong

SHAO Lin¹, GUO Qing-mei¹, RAN Rong², ZHOU Feng-qin^{1*}, ZHANG Yong-qing¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. Qilu Animal Health Products Co. Ltd, Jinan 250100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the HPLC fingerprint of *Lonicerae Japonicae* Flos and establish a chromatographic standard for the quality control as well as to comparative study the HPLC fingerprint among various farm cultivars. **Method:** The HPLC method was used. The gradient elution was adopted acetonitrile and 1% acetic acid. The similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM' algorithm was adopted in combination with the clustering analysis to study ten flos *Lonicerae*'s thirteen characteristic common peaks, and to evaluate the quality and dividide the farm cultivars of flos *Lonicerae*. **Result:** The HPLC fingerprint of *Lonicerae Japonicae* Flos were established and the differences of HPLC fingerprint among the farm cultivars of *Lonicerae Japonicae* Flos produced in Shandong were compared. **Conclusion:** The HPLC fingerprint method summaried in this article can be used as the typical chromatography and provide conference evidence for dividing the Cultivars resource of *Lonicerae Japonicae* Flos.

[Key words] *Lonicerae Japonicae* Flos; farm cultivars; HPLC; fingerprint

金银花为山东重要的道地药材,栽培历史悠久。长期的自然选择与人工筛选,金银花的种质表现出

显著的遗传多样性,形成了很多农家品种与品系,不同农家品种金银花的形态、产量及质量均存在着较大差异,其主要药效成分绿原酸与木犀草苷含量不完全一致^[1-3]。由于金银花的化学成分复杂,《中国药典》规定的 2 种成分含量尚不能完全代表不同种质金银花的内在质量。目前,中药材的质量控制大多以指纹图谱的方法进行监控,有关金银花的高效液相色谱指纹图谱法已有文献报道^[4-10],但是他们主要是对不同产地、不同加工方法或市售的不同批次金银花药材的 HPLC 指纹图谱进行的研究,均没

[收稿日期] 20110311(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973879)

[第一作者] 邵林, 专科, 主管药师, 研究方向: 临床中药学、中药鉴定学, Tel: 0531-82613269, E-mail: Shaolin090816@163.com

[通讯作者] * 周凤琴, 教授, 博士生导师, 从事中药鉴定学、中药商品学和中药资源学的教学与科研工作, Tel: 13553190263, E-mail: zfqsdzy@yahoo.com.cn

有涉及到农家栽培品种的种质资源划分与比较。本研究收集了金银花主产地 10 个传统农家品种进行了高效液相色谱指纹图谱研究,采集了金银花所共有的 13 个特征峰,应用相似度计算法,并结合聚类分析对金银花药材的质量进行了评价,对栽培农家品种进行了初步划分。

1 材料

1.1 样品 采自山东平邑种植的 10 个不同农家栽培品种,每个农家品种均取自同一个地块,其中种植面积最广的 9 号农家品种大毛花,取自 10 个不同地块。在生长发育正常的居群中随机取大小基本一致的 5 墩,于 2010 年 5 月采收二白期花蕾,阴干。经山东中医药大学周凤琴教授鉴定,均为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾。所有样品分别研细,过四号筛。见表 1。

表 1 金银花 10 个农家栽培品种名称及性状特征

No. 名称	性状特征
1 小毛花	黄白色,长 2.9~4.3 cm,较平直,被毛
3 小鸡爪	黄白色,长 2.8~4.4 cm,于上端 1/3 处内弯,被毛
4 细毛针	黄白色,长 2.5~3.3 cm,中上部微弯,被毛
5 红裤腿	黄白色,长 2.4~3.1 cm,中部内弯,中部以下淡红色
6 大麻叶	黄白色,长 2.7~3.4 cm,于上端 1/3 处弯折,被毛
7 麻针	黄白色,长 2.4~3.1 cm,细长平直,被毛
8 大鸡爪	黄白色,长 2.8~3.4 cm,先端膨大,微弯,被毛
9 大毛花	黄白色,长 2.8~3.8 cm,中上部弯曲,密被毛
11 犍牛儿腿	黄白色,长 2.4~3.3 cm,先端膨大形似火柴头,密被毛
19 红梗子	黄白色,长 2.4~3.3 cm,中部以上微弯,略膨大,密被毛

1.2 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(四元泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器),Agilent Chem Station 色谱工作站,FA2004N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.3 试剂 甲醇、乙腈(色谱纯,天津科密欧公司),醋酸(莱阳化工实验厂),绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0753-9910),木犀草苷对照品(北京禾原天然产物科技公司标准品供应中心)。

2 方法

2.1 色谱条件优选 Venusil XBP-C₁₈(L) 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 1% 醋酸水溶液-乙腈梯度洗脱,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 0~45 min,265 nm;45~70 min,350 nm,柱温 25℃,进样量 20 μL,理论塔板数按绿原酸计算不低于 1 000。洗

脱条件见表 2。

表 2 金银花指纹图谱梯度洗脱条件

t/min	1% 醋酸水溶液/%	乙腈
0	95	5
10	90	10
45	82	18
55	72	28
70	0	100

2.2 对照品溶液制备 精密称取对照品适量,置棕色量瓶中,精密加入 50% 的甲醇 100 mL 制成含绿原酸和木犀草苷的混合对照品溶液,摇匀,备用。

2.3 供试品溶液制备 分别取药材粉末约 1 g,精密称定后,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 按 2.3 项下制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件洗脱,连续进样 6 次,每次 25 μL,记录色谱图。对 6 次进样的色谱峰进行保留时间和峰面积的精密度考察,经测定 RSD≤2%,表明仪器的精密度良好。

2.4.2 稳定性考察 取供试品溶液,分别在 0,2,8,12,24,48 h 进样,按 2.1 项下色谱条件洗脱,记录色谱图,分别测定色谱峰的保留时间和峰面积,结果 RSD≤2%,表明样品至少在 48 h 内稳定。

2.4.3 重复性考察 将同一样品按 2.3 项下依法制成 6 份,依法测定保留时间与峰面积,结果 RSD≤2%,表明重复性良好。

2.5 HPLC 指纹图谱的建立 将对照品溶液按以上色谱条件分析,确定对照品的位置,见图 1。将 10 个不同地块的 9 号农家品种大毛花药材制成供试品溶液,按上述已考察的色谱条件进行分析,得到 HPLC 图谱,将图谱用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》软件进行处理,得到样品 9 的标准指纹图谱,其中有 13 个谱峰可以作为金银花指纹图谱的共有特征峰。见图 2~3,表 3。

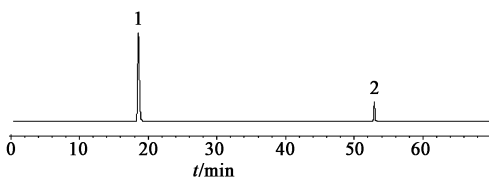
2.6 不同农家品种金银花指纹图谱比较 将 10 个不同农家栽培品种的药材制成供试品溶液,得到 HPLC 图谱,应用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004B 版》软件与样品 9 指纹图谱比较,见图 4,表 4。

表 3 10 个不同地块样品 9 大毛花的相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	SR
S1	1.000	0.993	0.998	0.998	0.987	0.941	0.995	0.981	0.996	0.997	0.998
S2	0.993	1.000	0.995	0.995	0.988	0.964	0.99	0.975	0.986	0.995	0.996
S3	0.998	0.995	1.000	0.999	0.989	0.954	0.995	0.976	0.993	0.997	0.999
S4	0.998	0.995	0.999	1.000	0.987	0.952	0.995	0.977	0.993	0.997	0.999
S5	0.987	0.988	0.989	0.987	1.000	0.947	0.989	0.97	0.985	0.991	0.99
S6	0.941	0.964	0.954	0.952	0.947	1.000	0.937	0.912	0.921	0.951	0.951
S7	0.995	0.99	0.995	0.995	0.989	0.937	1.000	0.972	0.995	0.996	0.997
S8	0.981	0.975	0.976	0.977	0.97	0.912	0.972	1.000	0.978	0.978	0.978
S9	0.996	0.986	0.993	0.993	0.985	0.921	0.995	0.978	1.000	0.994	0.995
S10	0.997	0.995	0.997	0.997	0.991	0.951	0.996	0.978	0.994	1.000	0.999
SR	0.998	0.996	0.999	0.999	0.99	0.951	0.997	0.978	0.995	0.999	1.000

表 4 10 个农家品种金银花的相似度评价

No.	R	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
R	1.000	0.947	0.959	0.982	0.965	0.975	0.954	0.979	0.963	0.966
S1	0.947	1.000	0.977	0.963	0.981	0.980	0.970	0.965	0.984	0.976
S2	0.959	0.977	1.000	0.971	0.980	0.990	0.962	0.977	0.988	0.958
S3	0.982	0.963	0.971	1.000	0.980	0.984	0.98	0.991	0.976	0.975
S4	0.965	0.981	0.980	0.980	1.000	0.990	0.987	0.987	0.985	0.976
S5	0.975	0.980	0.990	0.984	0.990	1.000	0.972	0.989	0.995	0.974
S6	0.954	0.970	0.962	0.98	0.987	0.972	1.000	0.976	0.967	0.977
S7	0.979	0.965	0.977	0.991	0.987	0.989	0.976	1.000	0.980	0.969
S8	0.963	0.984	0.988	0.976	0.985	0.995	0.967	0.980	1.000	0.969
S9	0.966	0.976	0.958	0.975	0.976	0.974	0.977	0.969	0.969	1.000



1. 绿原酸;2. 木犀草苷

图 1 混合对照品溶液 HPLC

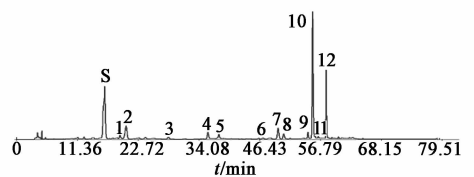


图 3 样品 9 大毛花的 HPLC 指纹图谱

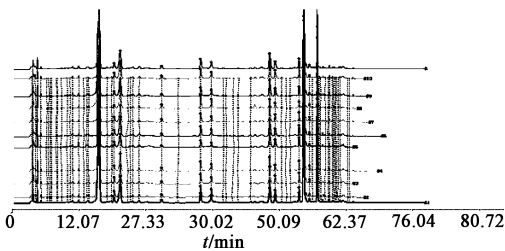
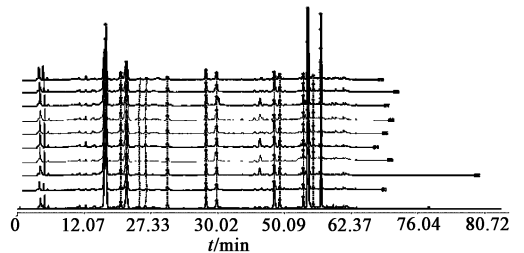


图 2 10 个不同地块样品 9 大毛花的谱峰匹配



R. 样品 9;S1. 样品 1;S2. 样品 3;S3. 样品 4;S4. 样品 5;S5. 样品 6;S6. 样品 7;S7. 样品 8;S8. 样品 11;S9. 样品 19

图 4 10 个农家品种金银花的 HPLC 指纹图谱匹配

结果表明,10 个不同地块产样品 9 的 HPLC 图谱相似度均大于 0.9,符合《中药注射剂指纹图谱研

究的技术要求(暂行)》2000 版之规定,因此,所建立

的样品 9 大毛花的 HPLC 对照指纹图谱合格。

将图 1 与图 3 对照可以确定图 3 中 S 峰为绿原酸,7 号峰为木犀草苷。

表 3,4 结果显示,10 个不同地块和 10 个传统农家品种金银花的 HPLC 指纹图谱相似度均在 0.9 以上,因此,该指纹图谱可作为山东道地药材金银花的标准图谱。

采用类间平均法作为聚类模式识别方法,取表 4 中 10 个农家品种金银花中的 13 个共有特征峰的相对峰面积值,使用组间平均联接进行聚类结果见图 5,10 个样品可以聚为 3 类,其中 1 号小毛花和 19 号红梗子为一类,9 号大毛花为一类,其他样品为一类。金银花 HPLC 指纹图谱中,6 号峰最具有显著性差异,根据其峰面积与峰高可将 10 个农家栽培品种分为两大类:样品 1,6,9,11,19 的 6 号峰不明显,峰高与峰面积较小;鸡爪花系列的样品 3,4,5,7,8 中 6 号谱峰明显,峰高与峰面积均较大,与聚类分析结果相符。其他谱峰的峰面积与峰高亦存在着差异。在较大的几个吸收峰中,绿原酸的 S 峰峰高与峰面积以样品 1,19 最小,而其他样品峰面积均在 8 300 以上。

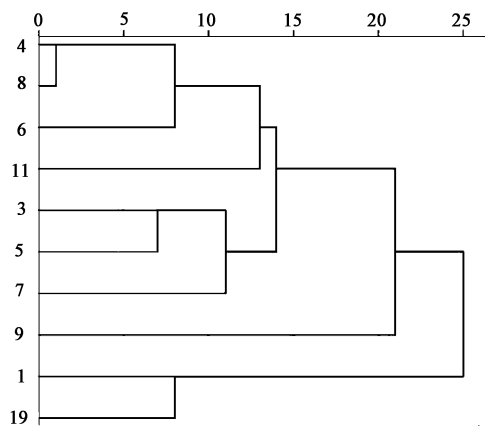


图 5 10 个农家品种金银花的树状聚类分析

3 小结与讨论

3.1 色谱条件的优选 根据 3D 光谱图,考察了 200 ~ 700 nm 不同流动相和不同洗脱梯度对色谱峰的分离效果。结果表明,以乙腈(A)和 1% 醋酸水液为流动相分离效果最好。在 0 ~ 45 min 时,265 nm 下色谱图中谱峰较多,分离度好;45 ~ 70 min 时,350 nm 下色谱图中谱峰吸收度较大且基线平稳。为此作者选定采取 2 个检测波长研制金银花的指纹图谱,即 0 ~ 45 min,265 nm;45 ~ 70 min,350 nm。

3.2 提取条件的优选 对提取溶剂的种类、提取条

件、提取时间以及溶剂用量等对谱图的影响进行了考察。结果以 50% 甲醇回流提取 1 h 所得色谱图谱峰较多,各谱峰分离效果较好。

3.3 山东产金银花标准指纹图谱的建立 以道地产区种植面积大、产量高的 10 个不同地块的样品 9 大毛花药材,采用优选的实验条件,以乙腈(A)和 1% 醋酸水液为流动相,流速 0.8 mL·min⁻¹,按 0 ~ 10 min,8% ~ 10% A;10 ~ 45 min,10% ~ 18% A;45 ~ 55 min,18% ~ 28% A;55 ~ 70 min,28% ~ 100% A 的条件梯度洗脱,建立起了山东道地药材金银花的对照指纹图谱,并确定了 13 个相对峰面积较大的谱峰作为金银花指纹图谱的特征峰,为山东道地药材金银花的质量控制提供了依据。

3.4 不同农家品种金银花指纹图谱的共性 比较发现,10 个样品金银花图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,13 个共有峰相对保留时间符合程度较好,非共有峰面积在图谱中所占比例相对较小,且 10 个农家品种金银花指纹图谱的相似度均在 0.9 以上,体现了山东道地药材金银花内在质量的相对稳定。

3.5 不同农家品种金银花指纹图谱的区别 农家品种金银花间各谱峰的峰面积与峰高具有一定的差异。其中鸡爪花系列的 3,4,5,7,8 号样品,在 45 ~ 47 min 均具有一显著的 6 号谱峰;样品 3 的 S₃ 号峰,样品 4 的 1,10,11 号峰,样品 5 的 6 号峰,样品 6 的 9,12 号峰,样品 7 的 3 号峰,样品 8 的 9 号峰,样品 11 的 1 号峰最强,农家品种间借此可以区分。

样品 9 大毛花是金银花道地产区主要的栽培品种,在 10 个主要谱峰中,有 2,4,5,7,8,9 等 6 个谱峰最大,也是 10 个不同农家品种中表现最优的,聚类分析的结果也说明了这一点。而样品 1 除了 5 号峰外,其余各峰的峰面积和峰高均在 10 个农家品种中为最小或较小,样品 19 的 S₃,6,7,11,12 等 6 个谱峰的峰面积或峰高也属于最小或较小,二者在化学指纹图谱中的表现和聚类分析结果与当地药农良种筛选的原则基本一致。把指纹图谱法与程度相似度和聚类分析相结合来综合评价金银花农家栽培品种药材质量,对其进行品种划分,判断结果更科学、更全面、更符合实际情况。

[参考文献]

[1] 周凤琴,张永清,张芳,等. 山东金银花种质资源的调查研究[J]. 山东中医杂志,2006,25(4):268.

藏药高山龙胆的化学成分

杨爱梅¹, 韩晗^{1*}, 孙静¹, 苗钟环², 史晓龙¹

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050;

2. 甘肃畜牧工程职业技术学院, 甘肃 武威 733006)

[摘要] 目的: 对购自青海的藏药高山龙胆 *Gentiana algida* Pall. 化学成分进行研究。方法: 用普通硅胶柱色谱和制备薄层色谱等方法进行分离、纯化, 并经核磁共振(NMR)、质谱(MS)、红外(IR)等现代波谱技术确定其结构。结果: 从高山龙胆的乙醇提取物中分离得到 11 个化合物, 主要运用超导核磁共振(NMR)技术, 结合文献中已报道的波谱数据等, 确定了它们的结构分别为 β -谷甾醇(1), β -香树脂醇(2), 乌苏酸(3), 齐墩果酸(4), 24-羟基- β -香树脂醇(5), 28-羟基- α -香树脂醇(6), 28-羟基- β -香树脂醇(7), 假蒲公英甾醇(8), 3 β -棕榈酸假蒲公英甾醇酯(9), 3 β -棕榈酸酯-28-羟基- α -香树脂醇(10), 3 β -棕榈酸酯-28-羟基- β -香树脂醇(11)。结论: 这 11 个化合物均为首次从该植物中分离得到。

[关键词] 龙胆属; 高山龙胆; 化学成分; 分离

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0121-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110809.1706.019 **[网络出版时间]** 2011-08-09 17:06

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1706.019.html>

Chemical Constituents from *Gentiana algida*

YANG Ai-mei¹, HAN Han^{1*}, SUN Jing¹, MIAO Zhong-huan², SHI Xiao-long¹

(1. College of Life and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China,

2. Gansu Polytechnic College of Animal Husbandry & Engineering, Wuwei 733006, China)

[收稿日期] 20110316(003)

[基金项目] 兰州理工大学优秀青年教师资助计划(Q200808); 教育部国家大学生创新项目

[第一作者] 杨爱梅, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 天然药物化学, Tel: 0931-2976703, E-mail: aimeiyang@163.com

[通讯作者] * 韩晗, 硕士, 研究方向: 天然药物化学, Tel: 0931-2976703, E-mail: hanhan520898@sina.com

- [2] 周凤琴, 冉蓉, 李佳, 等. 山东 10 个不同种质金银花中绿原酸含量及其品质评价[J]. 山东中医杂志, 2007, 26(7): 478.
- [3] 冉蓉, 孔庆悦, 周凤琴, 等. 山东 10 个不同种质金银花中木犀草苷的含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 753.
- [4] 向增旭, 高山林. HPLC 指纹图谱在金银花药材真伪鉴别中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9): 996.
- [5] 王跃飞, 文红梅, 程建明. 金银花药材高效液相指纹图谱研究[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(2): 128.
- [6] 熊艳, 高慧敏, 王智民, 等. 金银花不同干燥技术 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(8): 1015.
- [7] 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.
- [8] 胡海山, 余燕影, 万春花, 等. 金银花高效液相指纹图谱和聚类分析[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2009, 33(3): 253.
- [9] 成俊, 李桂生, 任召言, 等. 金银花药材对照指纹图谱的建立及质量评价[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 238.
- [10] 王倩, 王建新, 于治国, 等. 金银花药材高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中成药, 2005, 27(7): 751.

[责任编辑 邹晓翠]