

红腺忍冬叶 HPLC 指纹图谱研究

辛华¹, 张守平², 程若敏¹, 欧阳小光³, 周江煜^{1*}

(1. 广西中医学院药学院, 南宁 530001; 2. 山东东阿阿胶股份有限公司, 山东 聊城 252201;
3. 广西玉林制药有限责任公司, 广西 玉林 537000)

[摘要] 目的: 建立红腺忍冬叶指纹图谱, 探讨指纹图谱的建立方法和应用。方法: RP-HPLC 法, 采用 C₁₈ ODS2 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-乙腈-0.05% 磷酸梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长 328 nm, 柱温 25 °C。结果: 对 11 批红腺忍冬叶的样品图谱数据进行了数理统计, 建立红腺忍冬叶的指纹图谱标准, 并将其应用于其他种忍冬样品的定性鉴别和质量评价。结论: 扩展了中药指纹图谱的建立方法和在定性识别、定量、半定量评价其他样品的应用。

[关键词] 指纹图谱; 定性识别; 质量评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0103-04

Fingerprint Chromatogram of Leaf *Lonicera Hypoglauca*

XIN Hua¹, ZHANG Shou-ping², CHENG Ruo-min¹, OUYANG Xiao-guang³, ZHOU Jiang-yu^{1*}

(1. Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China;
2. Dong'e Ejiao Company Limited, Liaocheng 252201, China;
3. Guangxi Yulin pharmaceutical Company Limited, Yulin 537000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint chromatogram of leaf *Lonicera hypoglauca*, and research the establishment method and application to the fingerprint chromatogram. **Method:** RP-HPLC was used. The samples were separated on a C₁₈ ODS2 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and detected at 328 nm. The column temperature was set at 25 °C. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, methanol, acetonitrile and 0.05% phosphoric acid was used as a linear gradient elution of the mobile phase. **Result:** The fingerprint chromatogram based on the data of 11 batches of leaf *L. hypoglauca* was set up and had been applied in Samples-recognition and quality assessment. **Conclusion:** The method and application of fingerprint chromatogram in Chinese medicine were extended to recognize and access other samples.

[Key words] fingerprint chromatogram; qualitative recognition; quality assessment

红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq. 为忍冬科植

物红腺忍冬的干燥花蕾, 是广西山银花的主流品种, 但花期较短, 资源有限。红腺忍冬叶不受采收季节限制, 资源丰富, 且同样含有绿原酸、木犀草素等有机酸和黄酮类化合物, 与花相比仅含量不同^[1-2]。本文对 11 个产地的红腺忍冬叶的 HPLC 共有指纹特征进行了统计, 并用以区别其他品种, 为红腺忍冬叶的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 紫外检测器, Agilent 化学工作站, 德国赛多利斯公司 BP211D 型电子分析天平, Millipore

[收稿日期] 20110411(013)

[基金项目] 忻城金银花种源评价与资源可持续利用共性关键技术研究(桂科攻 0815005-2-5); 广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题(gzzc0905)

[第一作者] 辛华, 硕士, 从事药物分析, Tel: 0771-3111585, E-mail: iamhorse@126.com

[通讯作者] *周江煜, 讲师, 硕士, 从事中药分析及质量控制, Tel: 0771-3135848, E-mail: zjy@gxcmu.edu.cn

simplicity-185 型超纯水器(美国密理博公司), SB3200T 型超声波清洗器(上海必能信有限公司), 水系 0.45 μm 微孔滤膜(德国 MEMBRANA 公司), 微量取液器(北京表云仪表有限公司)。

1.2 试药 红腺忍冬叶、毛花柱忍冬叶和忍冬叶, 经广西中医学院刘寿养副教授鉴定分别为忍冬科忍冬属红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq.、毛花柱忍冬 *L. dasystyla* Rehd. 和忍冬 *L. japonica* Thunb. 的干燥叶, 甲醇、乙腈(色谱纯, 天津四友生物医学技术有限公司), 超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品的制备 精密称取约 1.000 0 g 忍冬叶粗粉, 置 250 mL 的锥形瓶中, 精密加 40% 的乙醇溶液 50 mL, 称定质量, 浸润 10 min, 超声 75 min, 放冷, 抹干瓶壁, 称重并补足质量, 滤纸过滤, 微孔滤膜滤过于高效液相进样瓶中, 即为药材质量浓度为 0.02 g · mL⁻¹ 的供试品溶液。

2.2 色谱条件 大连依利特公司 Hypersil C₁₈ ODS2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-甲醇-0.05% 磷酸 0 ~ 60 min(6:4:90 ~ 18:12:70) 线性梯度洗脱; 60 ~ 80 min 18:12:70 等度洗脱, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 检测波长 328 nm, 柱温 25 °C, 进样 10 μL。

2.3 数据处理及结果

2.3.1 取 11 批供试品溶液, 分别按 2.2 项下色谱条件进行 HPLC 分析, 记录各色谱图, 并导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”, 结果见图 1。生成共有模式指纹图谱, 见图 2。

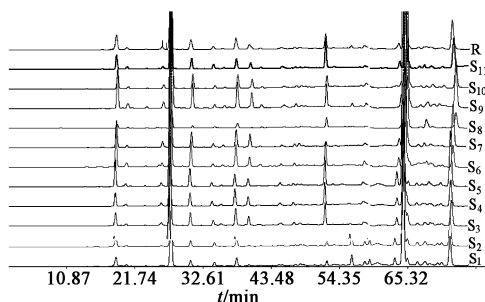


图 1 11 批广西红腺忍冬叶指纹图谱叠加

2.3.2 数据来源 本文数据表中保留时间、峰面积、峰高、峰宽的原始数据由高效液相导出, 分离度、相对保留时间由计算机程序计算添加。选取 2 个标志性强的 S_1, S_2 , 作为参照峰, 相对保留时间 t_R 由公

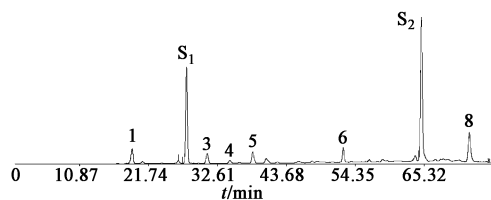


图 2 广西红腺忍冬叶指纹图谱共有模式

式(1)得

$$t_R = \frac{t_n - S_1}{S_2 - S_1} = \frac{(t_n + \alpha) - (S_1 + \alpha)}{(S_2 + \alpha) - (S_1 + \alpha)} = \frac{t_n - S_1}{S_2 - S_1} \quad (1)$$

式(1)中 $S_1, S_2 (S_1 < S_2)$ 为参照峰的保留时间, S'_1, S'_2 为调整保留时间, 其他色谱峰的保留时间为 t_n , 调整保留时间为 t_n' , 相对保留时间为 t_r , α 为高效液相仪死时间, 由公式(1)知, 相对保留时间与死时间无关, 故可以消除不同仪器的死体积不同而引起的误差。

2.3.3 标准指纹图谱建立 由原始样品表抽取每个样品数据表的各个物质峰数据, 并计算各指标的均数、标准偏差和 RSD, 可汇成 8 个物质峰表, 如绿原酸物质峰, 见表 1。

抽取每个物质峰表中的各指标的均数、标准偏差和 RSD, 汇成广西红腺忍冬叶指纹特征标准表, 如表 2, 指纹特征标准图谱模拟图见图 3。

2.3.4 样品识别和质量评价 以 2.3.3 项下表 2 作为定量标准, 比较待检测样品表中的各物质的含量, 并给出各个物质峰面积比值和检测到的总峰面积比值。如表 3, 4。由检测报告表知, 不同种的忍冬叶具有明显的差别。

广西忻城北更毛花柱忍冬叶有 6 个与红腺忍冬相同的物质峰, 对照原始图谱图 3 发现保留时间 38.2 min 左右的峰面积较高, 报告说明是标准的 2.113 44 倍, 而 64.8, 72.4 min 处的峰面积特别小, 分别为标准的 0.218 22, 0.333 85, 尚有其他较高的峰。见图 4。

河南开封忍冬叶有 7 个与红腺忍冬相同的物质峰, 对照原始图谱图 5 发现保留时间 27.8 min 左右的峰面积较高, 报告说明是标准的 1.533 58 倍, 而其他处的峰面积特别较小。

综上, 不同种的忍冬叶在化学成分及含量上有明显的差别。高效液相指纹图谱法不仅可以从有无色谱峰, 定性判断是否含有某物质, 还可通过峰面积或含量, 半定量或定量地控制中药的质量。见图 5。

表 1 绿原酸物质峰

共有峰表名	保留时间	峰面积	峰高	峰宽	分离度	相对保留时间
AZSP060414	27.514 07	7 961.521	367.656 5	0.34	13.604 14	0
AZSP060415	27.559 49	8 685.125	419.917 8	0.324 29	2.553 69	0
AZSP060417	27.703 05	7 084.77	371.092 7	0.298 45	2.486 55	0
AZSP060421	27.632 97	7 065.274	371.788 1	0.297 42	2.627 02	0
AZSP060423	27.599 9	13 119.63	737.646 1	0.275 93	2.583 99	0
AZSP060425	27.726 44	17 772.61	955.031 7	0.291 37	2.516 07	0
AZSP060429	27.802 55	7 939.959	437.245 2	0.283 2	2.560 41	0
AZSP060435	27.930 14	1 832.589	101.689 1	0.280 14	18.545 95	0
AZSP060436	27.896 6	20 513.25	1 063.342	0.300 78	2.398 67	0
AZSP060439	27.967 49	9 250.23	500.351 8	0.288 49	2.525 77	0
AZSP060441	27.796 83	7 348.506	398.191 3	0.288 1	2.360 54	0
均值	27.760 2	9 922.877	516.157 4	0.307 37	5.010 81	0
标准差	0.147 42	5 188.155	287.178 5	0.062 98	0.084 49	0
RSD	0.005 31	0.524 61	0.556 38	0.009	0.016 86	-

表 2 广西红腺忍冬叶指纹特征标准

峰号	参数	保留时间	峰面积	峰高	峰宽	分离度	相对保留时间
1	均值	19.103 07	1 970.489	108.333 5	0.291 01	24.044 11	-0.233 79
	标准差	0.182 92	1 072.016	63.407 43	0.026 92	0.083 12	0.001 8
	相对标准差	0.009 58	0.548 22	0.585 3	0.003 85	0.003 46	-0.007 71
S ₁	均值	27.760 2	9 922.877	516.157 4	0.307 37	5.010 81	0
	标准差	0.147 42	5 188.155	287.178 5	0.062 98	0.084 49	0
	相对标准差	0.005 31	0.524 61	0.556 38	0.009	0.016 86	-
3	均值	31.025 54	1 364.994	74.115 69	0.286 79	6.538 19	0.088 18
	标准差	0.215 58	662.649	37.280 78	0.013 07	0.098 2	0.001 74
	相对标准差	0.006 95	0.489 84	0.503 01	0.001 87	0.015 02	0.019 77
4	均值	34.569 23	385.959 1	18.728 6	0.318 79	6.893 88	0.183 88
	标准差	0.177 04	120.056 7	5.674 58	0.018 02	0.090 76	0.001 66
	相对标准差	0.005 12	0.313 45	0.302 99	0.002 57	0.013 16	0.009 04
5	均值	38.202 54	1 503.93	75.045 03	0.312 42	4.975 51	0.282
	标准差	0.181 98	640.456 1	31.610 08	0.015 8	0.096 29	0.000 74
	相对标准差	0.004 76	0.427 55	0.421 21	0.002 26	0.019 35	0.002 62
6	均值	52.448 99	1 624.436	97.158 75	0.259 93	9.451 35	0.666 74
	标准差	0.123 29	790.590 2	47.418 75	0.004 22	0.076 89	0.002 72
	相对标准差	0.002 35	0.486 69	0.488 05	0.000 6	0.008 13	0.004 08
S ₂	均值	64.789 91	15 575.27	744.058 3	0.325 22	1.88	1
	标准差	0.254 4	6 900.628	333.752 9	0.012 77	0.132 8	0
	相对标准差	0.003 93	0.442 25	0.448 56	0.001 82	0.070 64	-
8	均值	72.422 22	4 219.667	169.094 7	0.387 35	2.947 92	1.206 11
	标准差	0.345 39	1 455.616	58.993 92	0.007 61	0.130 56	0.001 97
	相对标准差	0.004 77	0.346 76	0.348 88	0.001 09	0.044 29	0.001 63

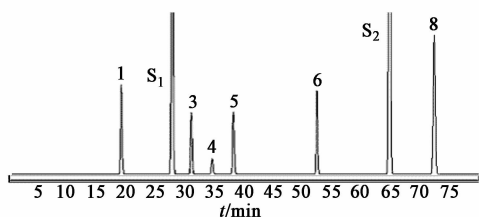


图 3 广西红腺忍冬叶指纹特征标准图谱模拟图

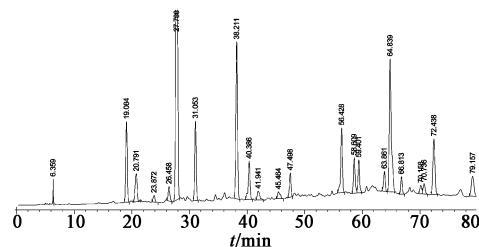


图 4 广西忻城北更毛花柱忍冬叶图谱

表 3 广西忻城北更毛花柱忍冬叶检测

峰号	保留时间	峰面积	相对保留时间	标准峰面积	相对标准分数
1	19.083 89	1 478. 278	-0. 234 91	1 970. 489	0. 750 21
S ₁	27. 787 65	10 965. 9	0	9 922. 877	1. 105 11
3	31. 052 81	1 483. 091	0. 088 12	1 364. 994	1. 086 52
5	38. 210 79	3 178. 472	0. 281 31	1 503. 930	2. 113 44
S ₂	64. 839 22	3 398. 909	1	15 575. 27	0. 218 22
8	72. 438 26	1 408. 733	1. 205 09	4 219. 667	0. 333 85
-	-	21 913. 38	-	34 557. 22	0. 634 12

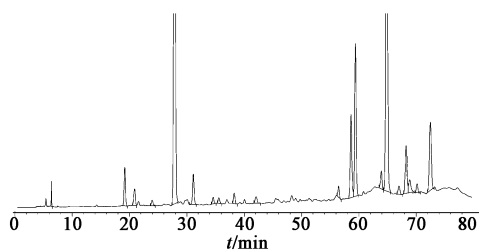


图 5 河南开封忍冬叶图谱

3 讨论

在统计样品共有特征峰各指标数据、图谱模拟时,运用了计算机程序处理,使整个过程程序化,可

视化、简易化。

表 4 河南开封忍冬叶检测

峰号	保留时间	峰面积	相对保留时间	标准峰面积	相对标准分数
1	19. 177 88	660. 076 1	-0. 234 35	1 970. 489	0. 334 98
S ₁	27. 848 39	15 217. 52	0	9 922. 877	1. 533 58
3	31. 138 76	588. 161 2	0. 088 93	1 364. 994	0. 430 89
4	34. 592 67	129. 027 9	0. 182 29	385. 9591	0. 334 3
5	38. 265 74	201. 695 4	0. 281 56	1 503. 93	0. 134 11
S ₂	64. 846 52	9 755. 126	1	15 575. 27	0. 626 32
8	72. 477 43	1 701. 264	1. 206 25	4 219. 667	0. 403 17
-	-	28 252. 87	-	34 943. 19	0. 808 54

在广西红腺忍冬叶指纹特征标准表中,各物质峰的保留时间、相对保留时间的标准差、RSD,反映了高效液相分离的稳定性;峰面积、峰高的标准差、RSD 反映了样品中各物质含量的均匀度,其值越大,则样品中该物质的含量越不均匀。

根据广西红腺忍冬叶指纹特征标准表中各物质峰的保留时间、相对保留时间的均值、标准差,设定识别范围,可用计算机识别待检测样品中是否有该物质峰;由于高效液相色谱峰面积的大小与物质的量成正比相关,对指纹图谱中不明确成分的含量,可用峰面积来半定量控制,对明确成分,如本文中的绿原酸,可通过建立该物质的标准曲线直接定量。本文将各样品中各物质峰的数据汇成单个物质峰如表 1,也是为将来指纹图谱中各物质明确后,通过建立标准曲线直接定量做准备。

[参考文献]

- [1] 景小琦. 金银花枝叶中粗黄酮、无机元素和蛋白质含量测定[J]. 河南中医,2001,21(4):66.
- [2] 张永清. 忍冬不同部位中绿原酸的含量测定[J]. 中国中药杂志,1996,21(4):204.

[责任编辑 蔡仲德]