

毛花柱忍冬 HPLC 指纹图谱

王孝勋^{1,2}, 张守平³, 辛华¹

(1. 广西中医学院药学院, 南宁 530001; 2. 成都中医药大学, 成都 611137;
3. 山东东阿阿胶股份有限公司, 山东 聊城 252201)

[摘要] 目的:探讨指纹图谱的建立方法和应用。方法:以毛花柱忍冬为例,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 12 个毛花柱忍冬的样品图谱进行数据处理,建立毛花柱忍冬的指纹图谱。结论:毛花柱忍冬的指纹图谱可应用于鉴别和定量或半定量质量控制的标准。

[关键词] 高效液相色谱;指纹图谱;毛花柱忍冬

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0076-04

Quantitative Fingerprint Chromatogram of *Lonicera Dasystyla*

WANG Xiao-xun^{1,2}, ZHANG Shou-ping³, XIN Hua¹

(1. Faculty of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;
2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
3. Dong'e Ejiao Company Limited, Liaocheng 252201, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint chromatogram of *Lonicera dasystyla*, and to probe and research the establishment method and application to the quantitative 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 with methanol, acetonitrile and 0.05% phosphoric acid as mobile phase by gradient elution. The column temperature was set at 25 °C. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. **Result:** The fingerprint chromatogram based on the data of 12 batches of *Lonicera dasystyla* was set up. **Conclusion:** The fingerprint chromatogram of *Lonicera dasystyla* can be used to recognize and access other samples as a standard.

[Key words] HPLC; fingerprint chromatogram; *Lonicera dasystyla* Rehd

毛花柱忍冬 *Lonicera dasystyla* Rehd. 原为大宗常用药材金银花的一个来源品种,主产广西^[1]。《中国药典》(2000 年版)记载,金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.、山银花 *Lonicera confusa* DC. 或毛花柱忍冬 *Lonicera dasystyla* Rehd. 的干燥花蕾或带初

开的花。具有清热解毒、凉散风热的功效,用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热。金银花主要含挥发油、黄酮类、有机酸和三萜类等化学成分;有抗病原微生物、抗炎、解热、保肝等药理作用^[2]。因其对多种致病菌均有很好的抑制作用,不少中成药均以其作为原料药。对于金银花药材,国内指纹图谱研究最多的品种是忍冬 *L. japonica*,但是主产广西的品种毛花柱忍冬 *L. dasystyla* 的研究未见有报道。为弄清毛花柱忍冬真正的质量品质,本研究采用自行研发的“中药指纹图谱标准数据库建立及样品识别系统”对实验数据进行处理,采用高效液相色谱法(HPLC),建立毛花柱忍冬的指纹

[收稿日期] 20101229(009)

[基金项目] 广西科技厅项目(桂科攻 0815005-2-5);广西中医学院高学历科研启动基金(G200308)

[第一作者] 王孝勋,讲师,硕士,研究方向:中草药品种、质量及资源开发, Tel:0771-3137535 E-mail:407977122@qq.com

图谱分析方法,建立能比较完整地反映其内在质量的质量控制方法,为指导金银花或山银花的规范化种植及正确采收提供依据。

1 仪器与试剂

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;Hypersil C₁₈ ODS2 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,大连依利特公司);BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司);Millipore simplicity-185 超纯水器(美国密理博

公司);SB3200T 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)。

毛花柱忍冬药材采自广西南宁、崇左、河池等地,经广西中医药研究院方鼎研究员鉴定为毛花柱忍冬 *L. dasystyla*,见表 1。绿原酸对照品购自中国药品生物制品检定所。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。

表 1 样品信息

No.	产地	加工	No.	产地	加工
1	南宁市双定镇古典村	晾、阴	7	横县云表职中旁	晾、晒
1	南宁市双定镇古典村	晾、阴	7	横县云表职中旁	晾、晒
2	扶绥县山圩镇政府旁	晾、晒	8	龙州金龙乡双蒙村	晾、晒
2	扶绥县山圩镇政府旁	晾、晒	8	龙州金龙乡双蒙村	晾、晒
3	南宁市伶俐镇石塘村	晾、晒	9	宁明县亭亮镇火车站旁	晾、晒
3	南宁市伶俐镇石塘村	晾、晒	9	宁明县亭亮镇火车站旁	晾、晒
4	南宁市双定镇古典村	晾、晒	10	马山县古寨乡古寨	晾、晒
4	南宁市双定镇古典村	晾、晒	10	马山县古寨乡古寨	晾、晒
5	南宁市双定镇古典村	晾、晒	11	都安县澄江乡六里村	晾、晒
5	南宁市双定镇古典村	晾、晒	11	都安县澄江乡六里村	晾、晒
6	横县南乡镇大塘村	晾、晒	12	马山县古寨乡	熏硫
6	横县南乡镇大塘村	晾、晒	12	马山县古寨乡	熏硫

2 方法与结果

2.1 供试品的制备 精密称取 1.000 0 g 毛花柱忍冬(过 40 目筛),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,微孔滤膜滤于高效液相进样瓶中,即为药材浓度为 0.02 g·mL⁻¹ 的供试品溶液。

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

2.3 数据处理及结果

2.3.1 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。选取两个标

志性强的 s_1, s_2 , 作为参照峰,相对保留时间 rt 由公式(1)得

$$rt = \frac{tn - s_1}{s_2 - s_1} = \frac{(tn' + \alpha) - (s_1' + \alpha)}{(s_2' + \alpha) - (s_1' + \alpha)} = \frac{tn' - s_1}{s_2' - s_1'} \quad (1)$$

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 tn ,调整保留时间为 tn' ,相对保留时间为 rt , α 为高效液相死时间,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。

2.3.2 标准指纹图谱建立 抽取每个样品共有峰表的各个物质峰数据,包括保留时间、峰面积、峰高、峰宽、分离度、相对保留时间,并计算各指标的均数、标准偏差和相对标准偏差,汇成物质峰表,如表 2 为绿原酸物质峰表。抽取每个物质峰表中的各指标的均数、标准偏差和相对标准偏差,汇成广西毛花柱忍冬指纹特征标准表,见表 3,模拟图谱见图 1。

表 2 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
mhz060302	28.033 5	3 066. 14	165. 032 3	0. 288 10	17. 939 26	0
mhz060306	28.020 16	3 079. 035	167. 083 3	0. 286 34	18. 024 86	0
mhz060309	27.961 86	21 283. 21	1 149. 454 0	0. 287 36	7. 077 93	0
mhz060310	27.981 64	21 301. 63	1 139. 719 0	0. 289 40	6. 979 32	0
mhz060311	28.017 73	9 588. 28	512. 334 6	0. 289 68	2. 525 10	0
mhz060312	28.023 30	9 586. 39	522. 627 3	0. 285 34	2. 533 90	0
mhz060313	28.029 02	6 494. 553	350. 542 2	0. 287 49	1. 871 36	0
mhz060314	28.003 93	6 495. 652	354. 534 2	0. 285 10	1. 870 74	0
mhz060315	27.882 13	7 548. 316	415. 711 5	0. 283 18	1. 847 94	0
mhz060316	27.908 26	7 540. 354	415. 972 9	0. 281 37	1. 826 88	0
mhz060317	28.049 45	12 366. 27	666. 110 8	0. 289 39	1. 728 56	0
mhz060322	28.160 89	12 455. 53	670. 557 7	0. 289 51	1. 716 94	0
mhz060319	28.247 92	5 740	304. 948 2	0. 292 40	12. 995 23	0
mhz060325	28.173 12	5 778. 48 5	308. 836 5	0. 291 09	13. 083 61	0
mhz060321	28.222 32	5 517. 706	297. 658 1	0. 287 61	13. 205 65	0
mhz060326	28.179 77	5 535. 759	296. 312 4	0. 290 76	13. 155 29	0
mhz060328	28.185 74	7 040	377. 059 1	0. 290 63	13. 065 47	0
mhz060330	28.396 76	7 197. 193	383. 621 0	0. 291 68	13. 089 26	0
mhz060329	28.405 50	15 775. 42	833. 356 7	0. 295 11	12. 371 72	0
mhz060331	28.453 27	15 832. 78	843. 825 0	0. 291 70	12. 601 63	0
mhz060332	28.484 28	5 234. 422	280. 053 5	0. 292 32	13. 676 07	0
mhz060334	28.512 99	5 250. 546	282. 125 1	0. 289 92	12. 996 6	0
mhz060336	28.458 73	40 692. 27	2 120. 602 0	0. 301 04	9. 318 91	0
mhz060337	28.472 41	40 818. 22	2 115. 977 0	0. 302 22	9. 310 58	0
均值	28.177 70	11 717. 42	623. 918 9	0. 289 95	8. 950 53	0
标准差	0.204 74	10 269. 95	533. 615 0	0.004 76	0.112 40	0
相对标准差	0.007 27	0.876 47	0.855 26	0.000 68	0.012 56	0

表 3 广西毛花柱忍冬指纹特征标准

	保留时间	峰面积	峰高	峰宽	分离度	相对保留时间
均值	19.599 72	683. 513	37. 746 74	0. 284 29	39. 951 30	-0. 231 54
标准差	0.206 25	324. 174 3	17. 827 98	0.006	0.096 13	0.001 09
相对标准差	0.010 52	0.474 28	0.472 3	0.000 86	0.002 41	-0.004 7
均值	28.177 7	11 717. 42	623. 918 9	0. 289 95	8. 950 53	0
标准差	0.204 74	10 269. 95	533. 615	0.004 76	0.112 40	0
相对标准差	0.007 27	0.876 47	0.855 26	0.000 68	0.012 56	0
均值	31.590 67	390. 210 1	21. 092 24	0. 287 55	6. 462 57	0. 092 12
标准差	0.267 54	180. 947	9. 760 81	0.002 59	0.108 06	0.001 83
相对标准差	0.008 47	0.463 72	0.462 77	0.000 37	0.016 72	0.019 82
均值	35.154 93	729. 012 6	33. 091 1	0. 335 59	6. 736 21	0. 188 34

续表

	保留时间	峰面积	峰高	峰宽	分离度	相对保留时间
标准差	0.282 07	743.457 2	33.437 99	0.008 3	0.104 42	0.002 24
相对标准差	0.008 02	1.019 81	1.010 48	0.001 19	0.015 5	0.011 92
均值	56.708 84	274.154 8	13.635 78	0.325 33	19.134 7	0.770 14
标准差	0.308 17	75.389 19	4.599 85	0.097 94	0.103 25	0.009 09
相对标准差	0.005 43	0.274 99	0.337 34	0.013 99	0.005 4	0.011 8
均值	64.330 16	409.991 7	18.999 38	0.329 63	8.964 05	0.975 86
标准差	0.244 47	180.323 5	9.033 64	0.015 32	0.098 65	0.001 56
相对标准差	0.003 8	0.439 82	0.475 47	0.002 19	0.011	0.001 6
均值	65.225	11 559.39	557.593 3	0.320 7	1.621 43	1.000 01
标准差	0.221 88	7 257.22	350.776	0.001 86	0.103 53	0.000 06
相对标准差	0.003 4	0.627 82	0.629 09	0.000 27	0.063 85	0.000 06
均值	72.885 22	2 758.889	106.181	0.402 85	8.091	1.206 78
标准差	0.212 99	1 286.994	49.515 46	0.004 28	0.099 49	0.001 12
相对标准差	0.002 92	0.466 49	0.466 33	0.000 61	0.012 3	0.000 93

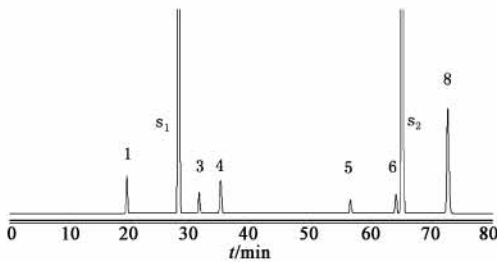


图1 毛花柱忍冬指纹特征标准图谱模拟

3 讨论

目前多采用单参照峰法计算相对保留时间,无法消除死时间,而本文采用的双参照峰的相对保留时间计算法可以消除死时间的影响。

本文中的毛花柱忍冬与同属其他种忍冬的图谱具有较大的相似性,这也说明了它们之间的亲缘关系。为达到种间的鉴别,还需对大量样品进行统计,从种之间所含化学物质的多少上找到种之间的指纹鉴别特征。

广西毛花柱忍冬指纹特征标准表由每个物质峰表中的各指标的均数、标准偏差和 RSD 汇成。其中标准偏差和 RSD 差反映了样品间各指标的稳定性、重复性。

广西毛花柱忍冬指纹特征标准表作为对比标准,对明确成分,如本文中的绿原酸,可通过建立标准曲线,直接计算含量进行对比,对不明确成分,如其他物质,可以用峰面积半定量地对比,达到多指标控制质量的目的,从而指导毛花柱忍冬的规范化种植及正确采收和加工。

本文没有采用药典委员会推荐的中药指纹图谱相似度计算软件,主要为了便于图谱数据导入与导出,及增加其他如含量测定数据批量处理、保留时间矫正等的功能,本方法更注重单个成分之间与纵向比较,而不是模糊的横向相似度的比较,特别适用于样本时间跨度长、空间范围小的明确成分定量、不明确成分半定量的内部质量控制。为中药指纹图谱在不同领域应用及数据重复应用提供的思路及实例。

[参考文献]

- [1] 李家实. 中药鉴定学[M]. 上海:上海科学出版社, 1996:355.
- [2] 于生兰,张龙,孙玲. 金银花的研究进展[J]. 时珍国医国药,2002,13(8):498.

[责任编辑 蔡仲德]