

重庆秀山地区灰毡毛忍冬的HPLC指纹图谱研究[△]

马 鹏*,李隆云#,张 应(重庆市中药研究院中药种植研究所/重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心,重庆 400065)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1392-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.16

摘 要 目的:建立重庆秀山地区灰毡毛忍冬药材的指纹图谱。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A C₁₈(250 mm×4.6 mm, 4 μm),流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1 ml/min,柱温为35 ℃,检测波长为327 nm。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对样品进行相似度评价。结果:来自重庆秀山地区28个不同产地的灰毡毛忍冬药材的HPLC指纹图谱相似度较高(均大于0.96)、分离度较好,共标定出8个共有指纹峰,符合中药色谱指纹图谱研究的技术要求。结论:该方法准确、可靠,可为灰毡毛忍冬药材的质量控制提供科学依据。

关键词 灰毡毛忍冬;高效液相色谱法;指纹图谱;重庆秀山地区

Study on HPLC Fingerprints of *Lonicera macranthoides* from Chongqing Xiushan Area

MA Peng, LI Long-yun, ZHANG Ying (Chongqing Academy of Chinese Materia Medica/Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding and Evaluation Techniques of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of *Lonicera macranthoides* from Chongqing Xiushan area. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 4 μm) with mobile phase consisted of acetonitril-0.5% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1 ml/min. The column temperature was 35 ℃, and detective wavelength was set at 327 nm. The similarity of samples was evaluated by using *TCM chromatographic Fingerprint Similarity Evaluatio System* (2004 A edition). RESULTS: HPLC fingerprints of *L. macranthoides* from 28 producing areas of Chongqing Xiushan area was established with good similarity (>0.96) and separation; 8 peaks in the chromatogram were common, which was in line with the requirements of TCM chromatographic fingerprints. CONCLUSIONS: The method is accurate and reliable, and can provide scientific basis for the quality control of *L. macranthoides*.

KEYWORDS *Lonicera macranthoides*; HPLC; Fingerprint; Chongqing Xiushan area

灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides* Hand. - Mazz.)为忍冬科忍冬属植物,其花蕾主要含有绿原酸类有机酸、黄酮等多种成分,具有清热解毒、抗菌消炎的功效^[1],在中医临床及民间广泛应用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温热发病等证的治疗,在我国西南、中南地区常作为金银花使用^[1-2]。2010年版《中国药典》将其与红腺忍冬、华南忍冬等同列入山银花项下。

作为灰毡毛忍冬的主要有效成分,绿原酸常作为其质量控制的主要指标,但灰毡毛忍冬还含有其他有机酸类、黄酮、皂苷、挥发油等有效成分^[3-5],对药材质量的优劣也会产生影响^[6]。为全面、客观、有效地评价和控制灰毡毛忍冬的质量,确保灰毡毛忍冬临床使用的安全、有效,笔者采用高效液相色谱

(HPLC)法对产于重庆秀山地区不同地点的28批灰毡毛忍冬药材进行指纹图谱研究^[7-9]。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,含SPD-M20A二极管阵列检测器、LC Solution色谱工作站(日本岛津公司);1200型HPLC仪,含PAD二极管阵列检测器、Chemstation色谱工作站(美国Agilent公司);BT-224S型万分之一电子天平(德国Sartorius公司);LIBROR AEG-45S型十万分之一电子天平(日本岛津公司);KQ-250B型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);水浴锅(北京市长风仪器仪表公司)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:10753-200413);甲醇、95%乙醇[重庆川东化工(集团)有限公司,批号分别为20080526、20080612];乙腈为色谱纯,磷酸等其他试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.3 药材

所有供试样品(来源见表1)经重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定,均为忍冬科忍冬属植物灰毡毛忍冬*L. macranth-*

[△] 基金项目:国家科技支撑计划子课题(No.2006BAI06A12-14);国家科技重大专项子课题(No.2012ZX09304006-102);重庆市科技惠民项目(No.CSTC,2013jcsf1009);重庆市卫生局中医药科技项目(No.ZY20132070)

* 助理研究员。研究方向:中药材质量分析。电话:023-89029062。E-mail:7215462@qq.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:中药材栽培技术、良种选育及质量评价。电话:023-89029118。E-mail:lilongyun8@163.com

oides Hand. - Mazz.的干燥花蕾或带初开的花。

表1 重庆秀山地区不同产地28批灰毡毛忍冬药材来源

Tab 1 Sources of 28 batches of *L. macranthoides* from different producing areas in Chongqing Xiushan area

样品编号	采集时间	采集地点
1	2012-06-15	干川乡干川村猴梨洞刘家窑对面
2	2012-06-15	干川乡杉木村杉木园组凉凉坪
3	2012-06-15	干川乡河口村田家院子
4	2012-06-15	干川乡水源村旧屋基组大小堰
5	2012-06-16	清溪镇平阳村常郎组天锅田
6	2012-06-16	清溪镇南龙村南龙组浅水湾
7	2012-06-16	清溪镇凉亭村良马场
8	2012-06-16	清溪镇南龙村南龙组大华路前坡
9	2012-06-16	清溪镇凉亭村良马场
10	2012-06-16	涌洞乡楠木村川河盖组川河盖
11	2012-06-16	隘口镇坝芒村坝芒组大土坳
12	2012-06-16	隘口镇坝芒村老木组张家
13	2012-06-16	隘口镇新院村饮水组龙秀坡
14	2012-06-16	隘口镇新院村油炭组大华路
15	2012-06-16	隘口镇富裕村老木组黄白坳
16	2012-06-16	隘口镇坝芒村老木组张胜海加工厂
17	2012-06-18	钟灵乡马路村马路组
18	2012-06-18	钟灵乡云隘村杨柳村山组
19	2012-06-18	钟灵乡马路村湾头组麻湾后坡
20	2012-06-18	钟灵乡凯贺村矮梯组麻湾
21	2012-06-18	钟灵乡凯贺村矮梯组大湾沟
22	2012-06-18	钟灵乡云隘村杨柳村三组
23	2012-06-18	钟灵乡云隘村黑桃坪组
24	2012-06-20	青田乡水车村
25	2012-06-20	塘坊乡葛麻村塘湾组大湾基地
26	2012-06-20	孝溪乡上屯村八组赵家坪
27	2012-06-20	孝溪复兴村十一组大尖坡
28	2012-06-20	孝溪乡复兴村五组

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取灰毡毛忍冬药材粉末约0.5 g,精密称定,精密加入50%甲醇50 ml,称定质量,摇匀,超声提取(频率:40 kHz,功率:250 W)30 min,取出,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液,备用。

2.2 对照品溶液的制备

取绿原酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为0.49 mg/ml的绿原酸对照品溶液,备用。

2.3 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A C₁₈(250 mm×4.6 mm,4 μm);流动相:乙腈-0.5%磷酸水溶液,梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1 ml/min;柱温:35 ℃;检测波长:327 nm。

表2 流动相梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure of mobile phase

时间,min	乙腈,%	0.5%磷酸水溶液,%
0~10	14	86
>10~18	14→20	86→80
>18~30	20	80
>30~40	20→70	80→30
>40~45	70→90	30→10
>45~60	90→14	10→86

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取供试品溶液10 μl,按上述色谱条件连续进样测定5次,检测指纹图谱。结果显示,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别在0.153%~0.685%和1.328%~2.193%范围内,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 重复性试验 取同一灰毡毛忍冬药材粉末适量,共6份,分别按“2.1”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样10 μl,检测指纹图谱。结果显示,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别在0.221%~1.569%和1.735%~2.412%范围内,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液10 μl,分别于0、4、8、12、24、48 h按上述色谱条件进样,检测指纹图谱。结果显示,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别在1.125%~2.212%和1.869%~2.531%范围内,表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.5 灰毡毛忍冬指纹图谱的建立

2.5.1 共有指纹峰的标定与参照指纹峰的指认 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液10 μl,注入HPLC仪,按上述色谱条件测定,记录90 min内的色谱图。28批灰毡毛忍冬药材的指纹图谱见图1。采用国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)软件生成灰毡毛忍冬药材共有模式的对照指纹图谱,详见图2。由图2可知,28批不同产地灰毡毛忍冬药材指纹图谱中有8个共有指纹峰(出峰时间分别约为5.116、8.277、13.103、18.067、29.867、32.787、40.113、46.308 min),通过与对照品图谱比对,指认其中的2号峰为有机酸类成分绿原酸(S1),6号峰为黄酮类成分木犀草苷(S2)。

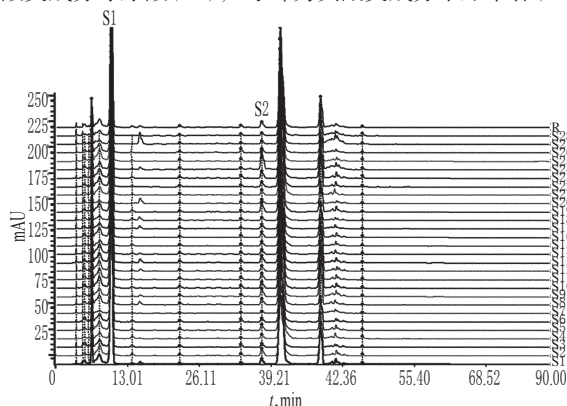


图1 28批灰毡毛忍冬药材的指纹图谱

Fig 1 Fingerprints of 28 batches of *L. macranthoides*

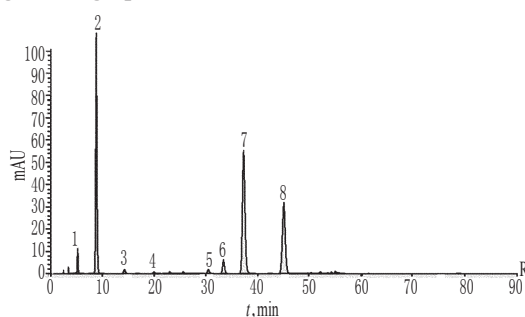


图2 28批灰毡毛忍冬药材共有模式对照指纹图谱

Fig 2 Fingerprints of mutual mode of 28 batches of *L. macranthoides*

2.5.2 相似度评价 采用国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)软件对28批不同产地的灰毡毛忍冬药材进行全谱相似度评价,可得编号为1~28的药材相似度分别为0.961、0.989、0.995、0.993、0.997、0.995、0.986、0.972、0.994、0.997、0.990、0.996、0.999、0.996、0.978、0.983、0.997、0.991、0.994、0.989、0.983、0.991、0.988、0.993、0.998、0.987、0.963、0.979,均大于0.96,表明相似度良好。

2.5.3 相对保留时间和相对峰面积的计算 将绿原酸色谱峰(S1)的保留时间与峰面积设为1,计算各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积,分别见表3、表4。

表3 28批灰毡毛忍冬药材指纹图谱中各共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peaks in fingerprints of 28 batches of *L. macranthoides*

批次	峰号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.618	1.000	1.581	2.191	3.622	4.037	4.865	5.616
2	0.621	1.000	1.567	2.183	3.596	3.997	4.809	5.613
3	0.623	1.000	1.576	2.188	3.630	4.034	4.865	5.624
4	0.622	1.000	1.580	2.197	3.645	4.057	4.889	5.648
5	0.621	1.000	1.574	2.197	3.631	4.040	4.875	5.636
6	0.623	1.000	1.577	2.199	3.640	4.047	4.882	5.665
7	0.617	1.000	1.580	2.172	3.614	4.031	4.853	5.589
8	0.618	1.000	1.577	2.187	3.616	4.028	4.852	5.600
9	0.618	1.000	1.579	2.190	3.625	4.039	4.863	5.614
10	0.618	1.000	1.581	2.189	3.627	4.044	4.867	5.616
11	0.619	1.000	1.580	2.193	3.640	4.057	4.886	5.641
12	0.617	1.000	1.578	2.190	3.627	4.045	4.871	5.602
13	0.623	1.000	1.576	2.198	3.642	4.051	4.885	5.670
14	0.623	1.000	1.575	2.200	3.643	4.051	4.887	5.669
15	0.622	1.000	1.575	2.195	3.631	4.039	4.869	5.643
16	0.611	1.000	1.582	2.196	3.626	4.042	4.865	5.674
17	0.625	1.000	1.577	2.184	3.576	4.084	4.839	5.633
18	0.627	1.000	1.573	2.198	3.629	4.034	4.876	5.644
19	0.619	1.000	1.586	2.194	3.641	4.051	4.870	5.652
20	0.621	1.000	1.571	2.196	3.635	4.037	4.873	5.661
21	0.618	1.000	1.577	2.189	3.646	4.047	4.869	5.675
22	0.611	1.000	1.590	2.171	3.618	4.032	4.846	5.576
23	0.618	1.000	1.573	2.184	3.674	4.026	4.874	5.570
24	0.613	1.000	1.579	2.192	3.639	4.036	4.853	5.627
25	0.621	1.000	1.583	2.187	3.638	4.042	4.864	5.639
26	0.619	1.000	1.561	2.191	3.646	4.055	4.872	5.641
27	0.616	1.000	1.576	2.190	3.632	4.045	4.887	5.673
28	0.621	1.000	1.573	2.196	3.649	4.058	4.859	5.659

3 讨论

重庆秀山地区作为我国南方山银花的主产区之一,在山银花的栽培和种植方面有着得天独厚的条件。本研究首次对秀山不同产地收集的28批灰毡毛忍冬药材进行指纹图谱分析及相似度评价,指认了以绿原酸为代表的有机酸类成分和以木犀草苷为代表的黄酮类成分,基本反映了山银花中主要的活性物质。

笔者结合被分析物质的性质和不同色谱柱的分离特性,比较了5个厂家和型号的色谱柱——Ultimate C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A C₁₈(250 mm×4.6 mm, 4 μm)、Suplco C₁₈(250 mm×4.6

表4 28批灰毡毛忍冬药材指纹图谱中各共有峰的相对峰面积

Tab 4 Relative peak area of common peaks in fingerprints of 28 batches of *L. macranthoides*

批次	峰号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.085	1.000	0.023	0.008	0.090	1.041	0.667	0.007
2	0.102	1.000	0.014	0.004	0.045	2.740	0.275	0.019
3	0.082	1.000	0.002	0.010	0.040	1.124	0.222	0.011
4	0.070	1.000	0.002	0.009	0.023	0.750	0.129	0.006
5	0.072	1.000	0.002	0.009	0.029	0.833	0.147	0.007
6	0.059	1.000	0.001	0.008	0.023	0.793	0.123	0.005
7	0.115	1.000	0.046	0.010	0.108	0.900	0.444	0.006
8	0.119	1.000	0.043	0.008	0.109	0.696	0.441	0.004
9	0.080	1.000	0.033	0.008	0.050	0.850	0.346	0.005
10	0.071	1.000	0.017	0.014	0.023	0.979	0.127	0.007
11	0.133	1.000	0.071	0.007	0.119	0.924	0.390	0.006
12	0.131	1.000	0.074	0.010	0.094	0.861	0.265	0.005
13	0.085	1.000	0.002	0.010	0.042	0.871	0.192	0.007
14	0.078	1.000	0.002	0.010	0.031	0.972	0.165	0.009
15	0.081	1.000	0.006	0.010	0.041	0.969	0.197	0.010
16	0.086	1.000	0.036	0.011	0.092	1.046	0.339	0.009
17	0.922	1.000	0.025	0.007	0.036	1.135	0.455	0.013
18	0.076	1.000	0.003	0.013	0.043	1.124	0.256	0.006
19	0.076	1.000	0.013	0.006	0.028	0.639	0.329	0.006
20	0.072	1.000	0.002	0.009	0.031	0.713	0.290	0.008
21	0.064	1.000	0.006	0.007	0.027	0.835	0.273	0.005
22	0.095	1.000	0.027	0.012	0.091	0.777	0.412	0.006
23	0.079	1.000	0.047	0.006	0.079	0.870	0.381	0.008
24	0.072	1.000	0.032	0.008	0.062	0.813	0.386	0.005
25	0.078	1.000	0.029	0.012	0.023	0.779	0.277	0.009
26	0.066	1.000	0.063	0.013	0.069	0.965	0.362	0.006
27	0.111	1.000	0.032	0.006	0.091	0.863	0.283	0.004
28	0.067	1.000	0.019	0.009	0.053	0.862	0.230	0.007

mm, 5 μm),发现在同样的条件下,Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A C₁₈(250 mm×4.6 mm, 4 μm)分离效果最好,故选其作为本研究的色谱柱。

试验中曾比较甲醇-水、甲醇-磷酸水溶液、甲醇-醋酸钠/醋酸缓冲液、乙腈-水、乙腈-磷酸水溶液、乙腈-醋酸钠/醋酸缓冲液等流动相系统等度和梯度洗脱的试验结果,发现以乙腈-0.5%磷酸水溶液梯度洗脱的分离效果最佳,故选其作为流动相。

在提取溶媒的比较试验中,分别考察了30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、100%甲醇等7种溶剂的提取效果,发现以50%甲醇提取样品时绿原酸含量最高,故确定提取溶媒为50%甲醇。试验还对提取方法(超声、回流、索氏提取、冷浸)进行了比较,发现超声提取法最方便、省时,但要注意提取温度不宜过高,因甲醇易挥发,会使提取液中各成分的含量变高,影响出峰面积。在提取时间(30、45、60、90 min)的考察中,发现提取30 min的效率最高,故选择采用50%甲醇超声提取30 min。

根据相似度评价结果可知,28批样品药材中各成分分布稳定,相似度均在0.96以上,表明重庆秀山地区不同产地的灰毡毛忍冬药材虽然在个别成分含量上有一定差异,但总体成分差异不大、质量相对稳定;所得到的共有模式具有代表性,可反映重庆秀山地区灰毡毛忍冬药材的内在指纹特征。

传统药对附子-炮姜的配伍研究[△]

叶强^{1*}, 付昆², 彭成¹, 郭力^{1#} (1. 成都中医药大学药学院, 成都 610072; 2. 成都市第三人民医院, 成都 610031)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1395-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.17

摘要 目的: 以附子、炮姜为对象, 研究温热药对配伍前后关键组分的变化, 探讨传统药对附子-炮姜配伍的科学意义。方法: 采用紫外分光光度法测定附子总生物碱、酯型生物碱含量在配伍前后的变化, 结合高效液相色谱指纹图谱研究附子与炮姜配伍前后附子总体成分的变化。结果: 附子与炮姜配伍后, 附子总生物碱与酯型生物碱含量均大幅减少; 从指纹图谱分析可知, 附子与炮姜配伍后, 附子各成分总加权变化率为81.00%, 即总体上附子成分有所减少, 为配伍前的81.00%。结论: 附子与炮姜配伍后抑制了附子的热性, 增强了炮姜的温性, 主要用于温经止血。

关键词 附子; 炮姜; 配伍; 总生物碱; 酯型生物碱; 高效液相色谱指纹图谱

Study on the Compatibility of Traditional Herbs Couple about *Aconitum carmichaelii* and *Zingiber officinale* Preparata

YE Qiang¹, FU Kun², PENG Cheng¹, GUO Li¹ (1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China; 2. Chengdu Municipal Third People's Hospital, Chengdu 610031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the significance of the compatibility of traditional herbs couple via studying the changes of key components before and after compatibility of warm-hot herbs couple about *Aconitum carmichaelii* and *Zingiber officinale* Preparata. METHODS: UV spectrophotometry was adopted to determine the contents of total alkaloid and ester alkaloids before and after compatibility; HPLC fingerprinting was used to study the main components of *A. carmichaelii* before and after compatibility. RESULTS: The contents of total alkaloids and ester alkaloids were reduced greatly after compatibility; the fingerprint indicated the percentage of weighting change in each component of *A. carmichaelii* was 81.00% after compatibility, in other words, the component of *A. carmichaelii* decreased to some extent after compatibility and was 81.00% of previous component. CONCLUSIONS: The compatibility of *A. carmichaelii* and *Z. officinale* Preparata suppress hot property of *A. carmichaelii*, but enhance the warm property of *Z. officinale* Preparata, which is mainly used for warming meridian to stop bleeding.

KEYWORDS *Aconitum carmichaelii*; *Zingiber officinale* Preparata; Compatibility; Total alkaloids; Ester alkaloids; HPLC fingerprint

复方用药是中医药的特点和优势, 是在中医药理论指导下将药物进行合理的组织, 调其偏性, 制其毒性, 增强或改变原有功能, 消除或缓解其对人体的不良因素, 发挥其相辅相成

或相反相成的综合作用, 从而使各具特性的群药组合成一个新的有机整体的过程^[1-2]。炮姜为姜科多年生草本植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎的炮制品, 以干姜砂烫至

参考文献

- [1] 石钺, 石任兵, 陆蕴如. 我国药用金银花资源、化学成分及药理研究进展[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(11): 724.
- [2] 许小方, 李会军, 李萍, 等. 灰毡毛忍冬花蕾中的化学成分[J]. 中国天然药物, 2006, 4(1): 45.
- [3] 刘敏彦, 高淑丽, 刘丽华, 等. HPLC同时测定不同产地金银花和山银花中6种有机酸成分[J]. 中药材, 2013, 36(2): 196.
- [4] 李锦焱, 吴洪文. 山银花化学成分与药理活性成分研究进展[J]. 北方药学, 2014, 11(2): 73.
- [5] 张尊建, 余静, 杨春华, 等. 忍冬、山银花HPLC/UV/MS指纹图谱研究[J]. 中成药, 2003, 25(11): 863.
- [6] 黄雄, 李萍, 张重义, 等. HPLC同时分析金银花中绿原酸和黄酮类成分的方法建立及其应用[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(10): 781.
- [7] 王跃飞, 文红梅, 程建明, 等. 金银花药材HPLC指纹图谱研究[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(2): 128.
- [8] 郑晓珂, 魏悦, 冯卫生. 化学模式识别分析不同采收期金银花HPLC指纹图谱[J]. 中药材, 2007, 30(10): 1 203.
- [9] 李红霞, 王雪芹, 李振国, 等. 不同产地金银花与山银花主要成分的含量比较[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2 935.

(收稿日期: 2013-05-21 修回日期: 2013-08-19)

△ 基金项目: 四川省教育厅科研项目(No.11ZA066); 四川省教育厅中国盐文化研究中心项目(No.YWHY13-01)

* 讲师, 博士。研究方向: 中药化学。E-mail: strongyeah@126.com

通信作者: 教授。研究方向: 中药化学。E-mail: gli64@tom.com