

金银花超微粉体不同极性部位的指纹图谱及其与抑菌活性相关性研究

张水寒¹, 袁清照¹, 蔡光先^{1,2*}, 冯小燕², 邵怡²

1. 湖南省中医药研究院 医药粉体技术教育部工程研究中心, 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室, 湖南长沙 410013

2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410007

摘要: 目的 建立金银花超微粉体不同极性部位的指纹图谱, 并研究其与抑菌活性的相关性。方法 采用系统溶剂提取法得到6个不同极性部位, 分别采用HPLC法进行测定, 同时选择体外抑菌药理指标进行活性测定; 用多元线性回归分析揭示化学信息与抑菌指标的相关关系, 寻找与药理指标密切相关的物质群。结果 确定以醋酸乙酯提取部位的HPLC指纹图谱来制定金银花的抑菌活性指纹图谱。结论 应用该方法建立的金银花粉体的质量标准科学、合理、实用。

关键词: 金银花; 中药粉体; 极性部位; HPLC; 指纹图谱; 抑菌活性

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2226-05

Fingerprint of different polarity extracts from superfine powder of *Lonicera japonica* and its correlation of antibacterial activity

ZHANG Shui-han¹, YUAN Qing-zhao¹, CAI Guang-xian^{1,2}, FENG Xiao-yan², SHAO Yi²

1. Hunan Key Laboratory of Chinese Materia Medica Powder and Innovation Drug Province Department Co-construction, Engineering Research Center of Chinese Materia Medica Powder Technology, Ministry of Education, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: **Objective** To establish the fingerprint of *Lonicera japonica* superfine powder with different polarity and study its correlation of antibacterial activity. **Methods** Six different polarity extracts were obtained using the solvent system extraction and then were detected by HPLC with gradient elution. Pharmacological activities were detected by antibiotic indexes *in vitro*. The correlation between the pharmacological indexes and the information of HPLC fingerprint was discovered by multiple linear regression analysis and compound groups related to pharmacological indexes were obtained. **Results** Antibacterial effect fingerprint of *L. japonica* can be established by HPLC fingerprint of ethyl acetate fraction. **Conclusion** The method developed is practical and can be used for evaluating the quality control of *L. japonica* powder.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb.; Chinese materia medica powder; polarity fraction; HPLC; fingerprint; antibacterial activity

金银花 *Lonicera japonica* Thunb. 是忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开的花, 味甘, 性寒。《本草纲目》载“金银花, 善于化毒, 故治痈疽、肿毒、疮癣……”。目前认为金银花的化学成分主要包括有机酸、黄酮类、三萜类和挥发油等4类化合物。《中国药典》2010年版一部载金银花仅以绿原酸和木犀草苷为定量指标^[1]。相比采用几个指标成分控制中药的质量, 指纹图谱更能直接分析中药的化学成分且能体现中药的复杂性和整体性^[2-3]。中药的药效取

决于其所含的化学物质, 将中药的生物活性与化学成分相关联, 将指纹图谱中体现的有效物质群与生物活性信息建立相关性称之为“谱-效学研究”^[4-6]。本实验通过建立金银花超微粉体不同极性部位的指纹图谱, 同时与各部位的抑菌活性指标相关联, 筛选出真正发挥抑菌活性的有效物质群, 为有效控制金银花粉体的质量提供技术标准。

1 仪器与材料

BFM—T6BI 型贝利微粉机(济南倍力粉体技术

收稿日期: 2011-02-16

基金项目: 国家财政部社会公益类行业科研专项(200807054)

作者简介: 张水寒, 女, 研究员, 研究方向为中药新制剂与新技术。Tel: (0731)88881651 E-mail: zhangshuihan0220@126.com

*通讯作者 蔡光先 Tel: (0731)88854261 E-mail: qzyuan601@126.com

工程有限公司); LC—10A 高效液相色谱仪 (含二元泵 DAD 检测器、CLASSVP 色谱工作站, 日本岛津公司); T—214 型北京赛多利斯分析天平; HS—3120 超声清洗器 (江苏汉邦科技有限公司); 超纯水机 (上海默克科技公司); HH—S112 型水浴锅; 上海跃进电热恒温鼓风干燥箱; SPX—250 型恒温培养箱; HH—S112 型水浴锅; 牛津杯 (10 mm×7.8 mm×6 mm); 无菌陶瓦盖、培养皿; 无菌棉棒; 游标卡尺。

10 批金银花药材分别购自河南、河北、山东及湖南等地, 经湖南省中医药研究院生药室温俊达副研究员鉴定, 均为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thumb. 的干燥花蕾, 见表 1。

表 1 10 批不同产地金银花样品

Table 1 Ten batches of *L. japonica* from different origins

批 次	产 地	购买地
20090711	山东济南	湖南省中医药研究院
20091020	湖南新宁	湖南省新宁县基地
20090519	河北巨鹿	河北金银花市场
2009091601	河南封丘	河南封丘金银花研究所
200911060	山东费县	长沙市芝林大药房
20091010	山东平邑	长沙市高新大药房
20091101	山东沂蒙	长沙市老百姓大药房
2009102401	山东耒阳	长沙市双舟大药房
20091104	山东济南	长沙市华盛大药房
20090425	河北安国	长沙市养天和大药房

绿原酸 (批号 110753-200612)、盐酸四环素 (批号 130488-200403)、氯霉素 (批号 130555-200501) 对照品均购自中国药品生物制品检定所。

甲醇 (色谱纯, Tedia 公司); 磷酸 (色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 甲醇、石油醚、三氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇、乙醇 (分析纯, 天津市恒兴化学试剂有限公司); 分析用水为超纯水; 聚山梨酯-80 (分析纯, 天津恒兴化学试剂有限公司); 无菌氯化钠溶液、灭菌蒸馏水 (单位自制)。

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* [CMCC (B) 26003]、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* [CMCC (B) 10104] 均购于湖南省药品检验所。

肉汤琼脂培养基 (批号 090919, 用于金黄色葡萄球菌培养)、麦康凯琼脂培养基 (批号 090422, 用于铜绿假单胞菌培养), 均购自上海信然生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 金银花超微粉体样品制备 称取金银花药材 300 g 于贝利粉碎机中, 在 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行超微粉碎 7 min, 即得金银花超微粉体。粒径 (D) 分布为 $0.84\sim 107.33\text{ }\mu\text{m}$, $D_{50}\leq 16\text{ }\mu\text{m}$, $D<75\text{ }\mu\text{m}$ 的颗粒累积在 98% 以上。

精密称定已制备的金银花超微粉体样品 0.5 g 于具塞锥形瓶中, 加 50% 甲醇 50 mL 称定质量, 静置 30 min, 然后超声提取 30 min, 放冷, 称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 离心, 取上清液适量, 用微孔滤膜 ($0.45\text{ }\mu\text{m}$) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 单一极性部位样品制备^[7] 精密称取金银花超微粉体 0.5 g, 按照次序进行单一溶剂提取, 分别精密加入石油醚、三氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇、乙醇、水各 50 mL, 称定质量, 索式提取到管内样品无色为止, 放冷, 再称定质量, 用相应的溶剂补足减失的质量, 取出样品挥干至无上次溶剂残留, 再进行下次提取。提取液滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 水浴蒸干, 各极性部位的残渣分别用甲醇充分洗涤并定容至 5 mL, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得单一极性部位样品。

2.1.3 参照物溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量, 加 50% 甲醇配成绿原酸质量浓度为 $76\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的参照物溶液。

2.2 6 个极性部位指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Lichrospher5 C_{18} 柱 ($200\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相为甲醇 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: $0\sim 10\text{ min}$, 15%~20% A; $10\sim 20\text{ min}$, 20%~25% A; $20\sim 30\text{ min}$, 25%~32% A; $30\sim 35\text{ min}$, 32%~40% A; $35\sim 40\text{ min}$, 40%~41% A; $40\sim 50\text{ min}$, 41% A; $50\sim 55\text{ min}$, 41%~15% A; $55\sim 60\text{ min}$, 15% A; 体积流量 1 mL/min ; 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$; 检测时间 60 min; 检测波长为 240 nm。

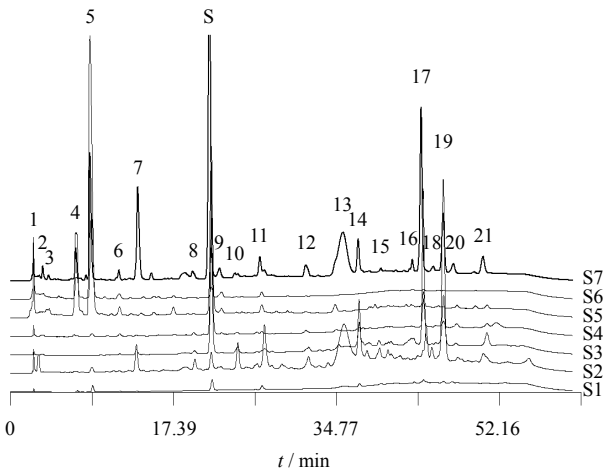
2.2.2 精密度试验 取“2.1.2”项下醋酸乙酯部位的样品 $10\text{ }\mu\text{L}$, 按以上色谱条件连续进样 6 次, 用“中药指纹图谱相似度计算软件”计算, 所得相似度为 0.998 5、0.997 8、0.996 6、0.996 5、0.988 7、0.996 8, 相似度极高, 说明供试品进样精密度良好。

2.2.3 重现性试验 平行取样品 5 份, 按“2.1.2”项下方法制备 5 份醋酸乙酯部位样品, 进样 $10\text{ }\mu\text{L}$, 相似度计算结果为 0.994 3、0.954 7、0.995 8、0.997 2,

0.993 4, 相似度高, 说明方法的重现性良好。

2.2.4 稳定性试验 取醋酸乙酯部位供试液 10 μ L, 分别在 0、6、12、24、48 h 进样, 在同台仪器测得的色谱指纹图谱与其对照指纹图谱的相似度评价结果分别为 0.992 8、0.995 3、0.993 4、0.996 5、0.994 4, 相似度高, 说明 48 h 内供试品溶液稳定性较好。结果表明样品指纹图谱各色谱峰相对迁移时间和峰面积基本一致, 符合指纹图谱研究的技术要求。

2.2.5 供试品溶液的测定 取“2.1.2”项下各极性部位样品及超微粉体样品各 10 μ L, 按照上述色谱条件进行检测, 记录 60 min 的色谱峰, 即得金银花超微粉体及单一极性部位的 HPLC 指纹图谱(图 1)。



S1-石油醚部位 S2-三氯甲烷部位 S3-醋酸乙酯部位 S4-正丁醇部位
S5-乙醇部位 S6-水溶性部位 S7-50%甲醇提取液 S-绿原酸
S1-petroleum ether extracts S2-chloroform extracts S3-ethyl acetate
extracts S4-butanol extracts S5-ethanol extracts S6-water solution
parts S7-50% methanol extracts S-chlorogenic acid

图 1 金银花超微粉体及单一极性部位的 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprint of superfine powder of *L. japonica*
and single polarity fraction

2.2.6 相对保留值 α 的计算 选择峰面积较大, 出峰时间居中且分离度好, 各样品均存在的绿原酸的色谱峰为参照峰 S, 其 α 值为 1, 求出样品所有峰的相对保留值 α_i 。 $\alpha_i = t_{Ri}/t_{Rs}$, t_{Ri} 为各组分的调整保留时间(调整保留时间为 10 批样品的各个特征峰的平均保留时间), t_{Rs} 为绿原酸的调整保留时间。

2.2.7 相对峰面积 R_i 的计算 按照 α 值大小次序排列, 在每个 α 项下标出该组分的相对面积比值 R_i 。 R_i 为各峰与参照物峰的峰面积比值, 以衡量样品中各成分相对量稳定情况, 评价样品中成分的稳定性。

$$R_i = \text{峰面积} / \text{参照物峰面积}$$

根据样品的 HPLC 图谱, 计算 α_i 和 R_i , 凡是 α_i 值相同或相近(误差 $< 1\%$) 的峰即可认为是同一化合物峰。将各个样品每个峰的 R_i 值列在相应的 α_i 值项下, 其 α_i 项下无相应峰的样品, 其 R_i 值计为 0, 这样, 由 α_i 值和 R_i 值组成 6 个极性部位样品的 HPLC 相对保留值指纹谱, 见表 2。

表 2 6 个极性部位样品的 HPLC 相对保留值指纹谱
Table 2 HPLC fingerprint of relative peak area of six
different polarity fraction samples

峰号	α_i	极性部位主要特征峰 R_i					
		S1	S2	S3	S4	S5	S6
1	0.116	0.054	0.346	0	0.038	0.227	1.449
2	0.163	0	0	0	0	0	0.740
3	0.189	0	0	0	0	0	0
4	0.324	0.068	0	0	0.131	0.286	1.785
5	0.395	0.331	0	0	0.034	2.510	3.656
6	0.543	0.066	0	0	0.029	0.049	0.805
7	0.629	0.062	1.165	0.032	0.021	0	0
8	0.912	0	0.345	0	0.033	0	0
S	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	1.049	0.057	0.419	0	0.051	0.083	0.892
10	1.125	0	1.144	0.064	0.073	0	0.488
11	1.251	0.094	1.804	0.033	0	0.078	0.720
12	1.478	0.050	0.418	0.036	0.045	0	0
13	1.660	0	6.212	0	0.056	0.086	0
14	1.738	0.096	2.222	0.200	0	0	0
15	1.842	0	0.405	0.031	0	0	0
16	1.997	0.074	0.043	0.082	0	0.055	0.614
17	2.040	0.131	1.419	1.517	0.226	0.066	0
18	2.131	0	0.395	0	0	0	0
19	2.156	0.062	9.145	0.386	0.070	0	0
20	2.205	0	0	0.036	0.066	0	0
21	2.352	0	0.405	0.123	0.041	0	0

2.3 不同极性部位的抑菌活性对比研究

2.3.1 抑菌活性样品制备 称取金银花超微粉体适量, 分别加单一提取溶剂石油醚、三氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇、乙醇、水进行索式提取, 每次提取到管内样品无色为止, 提取液滤过, 置于水浴锅蒸干, 得到各单一溶剂提取部位, 用 0.1% 聚山梨酯-80 溶液充分振摇溶解, 制成每毫升相当于 1 g 药材的药液, 灭菌备用。

2.3.2 菌液的配制 分别接种金黄色葡萄球菌新鲜

培养物至肉汤琼脂斜面培养基上，接种铜绿假单胞菌新鲜培养物至麦康凯琼脂培养基上，均在 35℃ 下培养 18~24 h。用 0.9% 无菌氯化钠溶液 1~2 mL 将菌苔洗下，然后用灭菌水稀释，制成 100 cfu/mL 的两种菌悬液。

2.3.3 阳性对照溶液的制备 取盐酸四环素、氯霉素适量，精密称定，分别加蒸馏水稀释成含四环素、氯霉素 50 μg/mL 的溶液。

2.3.4 体外抑菌实验 取培养皿 3 个为一组，在第 1 培养皿中对角均匀放置 2 个牛津杯（共 4 个），第 1 管滴满阳性对照溶液，对角第 2 管滴满空白对照溶液（0.1% 聚山梨酯-80 溶液），另 2 个牛津杯中分别滴满 2 个供试品溶液。在规定条件下（温度 37℃，时间 17 h）培养后，测量形成的抑菌圈直径。样品共 10 批，实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，测定结果见表 3。

表 3 6 个极性部位对供试菌的抑菌圈直径 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 3 Average diameters of six polarity fraction samples against bacteria tested ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	抑菌圈直径/mm	
	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
阴性对照	—	—
阳性对照	21.23±1.20	19.21±1.40
石油醚部位	8.10±0.08	10.02±0.11
三氯甲烷部位	16.15±0.22	14.32±0.92
醋酸乙酯部位	18.78±1.30	16.98±0.48
正丁醇部位	15.58±1.60	13.18±0.06
乙醇部位	14.55±0.40	13.65±0.07
水溶性部位	13.11±0.30	9.28±1.34

2.4 6 个极性部位抑菌活性结果与指纹图谱相关性研究^[8]

将金银花粉体不同极性部位的抑菌活性结果与 $R_f-\alpha_i$ 数据带入 SPSS 13.0 软件进行多元线性回归分析，以抑菌圈平均值为 Y 值，以 R_i 数据为 X 值，并按照出峰顺序表示为 $X_1, X_2, X_3, \dots$ ，进行 Stepwise 回归分析，分析结果见表 4、5。

其中，醋酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌抑菌活性的回归方程为 $Y=17.844-0.202 X_7+1.039 X_5+0.153 X_{11}+0.225 X_{12}+2.209 X_{14}+1.124 X_{16}+1.479 X_{17}-0.348 X_{19}+0.966 X_{20}-1.171 X_{21}$ ；醋酸乙酯部位对铜绿假单胞菌抑菌活性的回归方程为 $Y=39.74-0.382 X_7+1.395 X_5+0.255 X_{11}+0.919 X_{12}+2.434 X_{14}+0.999 X_{16}+3.901 X_{17}-0.154 X_{19}+0.927$

表 4 金黄色葡萄球菌抑菌活性结果与 $R_f-\alpha_i$ 数据相关性分析
Table 4 Correlation analysis between anti-*S. aureus* activity and $R_f-\alpha_i$ data

不同部位	正相关 峰数/个	负相关 峰数/个	非相关 峰数/个	($\sum S_{\text{有效}}/\sum S_{\text{总}}$)/%
石油醚部位	6	2	5	72.37
三氯甲烷部位	6	3	7	63.61
醋酸乙酯部位	7	3	2	95.51
正丁醇部位	4	3	8	69.08
乙醇部位	4	0	6	26.25
水溶性部位	3	0	7	18.84

表 5 铜绿假单胞菌抑菌活性结果与 $R_f-\alpha_i$ 数据相关性分析
Table 5 Correlation analysis between anti-*P. aeruginosa* activity and $R_f-\alpha_i$ data

不同部位	正相关 峰数/个	负相关 峰数/个	非相关 峰数/个	($\sum S_{\text{有效}}/\sum S_{\text{总}}$)/%
石油醚部位	5	2	6	65.28
三氯甲烷部位	6	4	6	70.32
乙酸乙酯部位	7	3	2	95.51
正丁醇部位	4	3	8	69.08
乙醇部位	4	0	6	26.25
水溶性部位	3	0	7	18.84

$X_{20}-1.571 X_{21}$ (Y 为药效指标， X_i 为色谱峰)。分别对回归方程进行方差假设检验， F 值分别为 30.86、10.01 ($P<0.01$)，有显著差异。

根据药效指纹图谱分析原则，选用 240 nm 处醋酸乙酯有效部位的指纹图谱来建立金银花粉体的“药效指纹图谱”，见图 2，10 批醋酸乙酯有效部位的叠加图谱见图 3。以醋酸乙酯有效部位有效峰的相对峰面积比值来建立金银花粉体的相对保留值“药效指纹图谱”见表 6。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

色谱条件的选择不仅要达到全谱分离，还要保证抑菌活性效果显著的部位达到最佳的分离度和灵敏度，并要求与抑菌效应成正相关的峰最多，总峰面积最大，使有效成分峰的峰面积占总图谱峰面积的比例最大^[8]。金银花的成分复杂，本实验采用二极管阵列检测器，在波长 200~400 nm 进行全谱扫描以获得最佳检测波长；还考察了不同流动相体系及不同洗脱方式对全谱分离效果的影响；综合考虑各影响因素后，选择检测波长 240 nm，以甲醇-0.1%

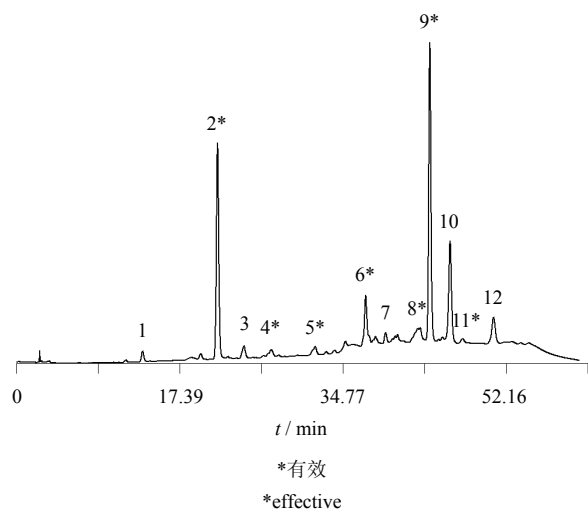


图 2 金银花粉体的抑菌活性指纹图谱
Fig. 2 Antibacterial effect fingerprint
for *L. japonica* powder

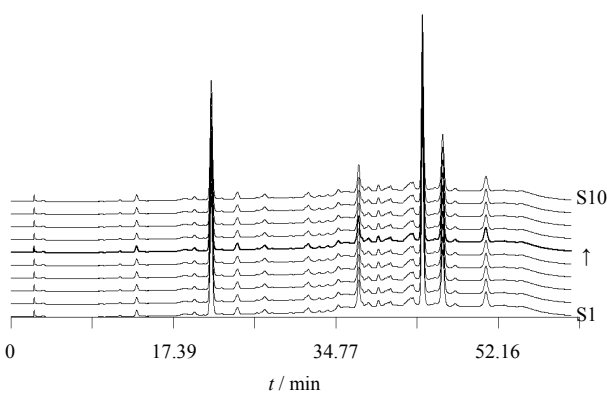


图 3 10 批醋酸乙酯部位的 HPLC 指纹图谱
Fig. 3 HPLC fingerprint of ethyl acetate fraction
of ten batches of samples

磷酸水溶液梯度洗脱进行金银花超微粉体的药效指纹图谱分析。

3.2 相关性分析原则

醋酸乙酯部位 HPLC 图谱含有与抑菌活性呈正相关的峰最多，而且有效峰面积之和最大，分离度较好。由 10 批样品指纹图谱可得有效峰的峰面积总和及均值为 13 664 856，占色谱图总峰面积的均值为

表 6 金银花粉体保留值抑菌活性指纹谱
Table 6 Antibacterial effect fingerprint of relative
peak area for *L. japonica* powder

批 次	不同 α_i 值的 R_i						
	1.000	1.251	1.478	1.738	1.997	2.040	2.205
20090711	1.000	0.040	0.025	0.199	0.089	1.531	0.021
20091020	1.000	0.031	0.034	0.208	0.079	1.498	0.021
20090519	1.000	0.031	0.029	0.191	0.070	1.522	0.051
2009091601	1.000	0.041	0.041	0.199	0.094	1.523	0.032
200911060	1.000	0.034	0.038	0.189	0.088	1.526	0.043
20091010	1.000	0.028	0.036	0.199	0.084	1.512	0.045
20091101	1.000	0.032	0.037	0.199	0.077	1.525	0.034
2009102401	1.000	0.024	0.037	0.204	0.069	1.519	0.045
20091104	1.000	0.033	0.038	0.205	0.083	1.509	0.038
20090425	1.000	0.035	0.041	0.210	0.087	1.506	0.032

95.51%。从而确立了具代表性的金银花粉体有效部位的抑菌活性指纹图谱，这对于金银花粉体的工业化生产及推广应用具有积极的指导意义。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[2] 李春来, 李俊松, 刘 丹, 等. 赭石炮制品 X 射线衍射分析及指纹图谱的建立 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 701-703.
[3] 林武霖, 王如伟, 孙柳燕. 延胡索质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 409-412.
[4] 赵渤海, 于宗渊, 丁晓彦, 等. 黄芩质量评价谱-效相关模式的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 380-383.
[5] 孙国祥, 崔翠霞, 任培培, 等. 中药指纹图谱学体系的构建 [J]. 中南药学, 2007, 5(1): 70-74.
[6] 韦 辉, 刘素香, 刘 毅, 等. 丹参药材的综合质量评价研究 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 343-347.
[7] 赵琰玲, 尹 莲. 金银花化学成分与有效成分提取研究进展 [J]. 医药导报, 2007, 26(5): 521-523.
[8] 周立艳, 梁生旺, 王淑美, 等. 牡丹皮高效液相色谱“药效指纹图谱”研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1337-1339.