

金银花与山银花的 HPLC 指纹图谱鉴别研究

刘亚楠¹, 石典花², 雷留成¹

1. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003

2. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

摘要: 目的 建立金银花的 HPLC 对照指纹图谱, 并在相同色谱条件下测定山银花的 HPLC 指纹图谱, 通过计算相似度来区分山银花与金银花。方法 色谱柱 Phenomenex Luna 5 μm C₁₈ (2) 100 A (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 以乙腈-0.5%磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 检测波长为 350 nm, 相似度计算采取屏蔽大峰积分的方法。结果 建立了金银花的 HPLC 对照指纹图谱, 12 批金银花相似度均在 0.95 以上, 山银花相似度均小于 0.80。结论 350 nm 下金银花的 HPLC 指纹图谱能有效区分金银花与山银花药材, 屏蔽大峰积分的相似度评价方法比较准确地反映了金银花与山银花间化学成分的差异。

关键词: 金银花; 山银花; HPLC 指纹图谱; 屏蔽大峰积分; 相似度评价

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)04-0773-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.04.025

HPLC fingerprint identification of *Lonicera Japonica Flos* and *Lonicera Flos*

LIU Ya-nan¹, SHI Dian-hua², LEI Liu-cheng¹

1. Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China

2. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To compare the differences between *Lonicera Japonica Flos* and *Lonicera Flos* by establishing HPLC fingerprint and calculating the similarity. **Methods** The columns was Phenomenex Luna 5 μm C₁₈ (2) 100A, 250 mm \times 4.6 mm; The column temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$. The mobile phase was acetonitrile-0.5% phosphoric acid, the flow rate was 1 mL/min, and the wavelength was 350 nm. **Results** HPLC fingerprint of *Lonicera Japonica* and similarity evaluation by screening large peak integration were established. The similarity of 12 batches of *Lonicera Japonica Flos* were all above 0.95, and four batches of *Lonicera Flos* were less than 0.80. **Conclusion** HPLC fingerprint profiles under 350 nm can reflex the differences between *Lonicera Japonica Flos* and *Lonicera Flos* effectively; Similarity evaluation by screening large peak integration shows the tiny differences of chemical component.

Key words: *Lonicera Japonica Flos*; *Lonicera Flos*; HPLC-fingerprint profiles; screening large peak integration; similarity evaluation

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 干燥的花蕾或者初开的花, 能清热解毒、疏散风热, 并表现出抗菌消炎、抗病毒、抗氧化等药理活性^[1]。常用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、瘟疫发热, 有中药中的抗生素之称。金银花以山东平邑、河南封丘县为金银花的主产区^[2]。忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.、华南忍冬 *Lonicera confusa* DC. 或黄褐毛忍冬 *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng 的干燥花蕾或带初开的花为山银花, 山银花是最常见的金银花的民间习

用品种, 具有与金银花相似的药理特性, 主要产于湖南、湖北、广东、贵州等地。但是山银花中含有大量皂苷类成分^[3], 如用于生产中药注射剂, 则可能存在溶血等安全隐患。

通过指纹图谱法和定量测定鉴别金银花与山银花的文献报道也有不少^[4-6], 但这些文献中山银花与金银花评价相似度差别较小, 不能有效区分二者。本实验建立的金银花 HPLC 指纹图谱, 通过对提取方法及检测波长的选择, 以及相似度计算方法的优选, 评价金银花和山银花的相似度存在明显差异, 为准确、快速地鉴别金银花与山银花提供了科学依据。

收稿日期: 2016-08-29

作者简介: 刘亚楠, 主管中药师, 研究方向为中药分析。Tel: (0371)65566039

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪-Waters996 二极管阵列检测器, Precisa XR 205SM-DR 分析天平; 上海跃进数显式电热恒温水浴锅。

1.2 试剂及试药

甲醇、乙腈为色谱纯 (Merck 公司); 磷酸为分析纯; 水为去离子水; 对照品绿原酸 (批号 110753-200413)、木犀草苷 (批号 111720-200905) 均购于中国食品药品检定研究院。

金银花样品经河南省食品药品检验所中药标本室雷留成副主任药师鉴定, J1~J12 号药材均为忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.。J13~J16 号均为山银花 *Lonicerae Flos*, 其中 J13、J14 号为灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz., J15、J16 号为红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.。见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	产地	编号	产地
J1	山东平邑	J9	河北巨鹿
J2	山东平邑	J10	山东平邑
J3	河南封丘	J11	河南新密
J4	山东平邑	J12	河南新密
J5	山东平邑	J13	湖南隆回
J6	河南封丘	J14	湖南隆回
J7	河北巨鹿	J15	湖北
J8	山东平邑	J16	广西

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Phenomenex Luna C₁₈ (2) 100 A (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) -0.5% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 7% A; 5~20 min, 7%~14% A; 20~35 min, 14%~18% A; 35~49 min, 18%~60% A); 检测波长为 350 nm; 柱温为 40 °C; 体积流量为 1 mL/min。理论板数按绿原酸峰计算不低于 10 000。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸与木犀草苷适量, 加甲醇制成含绿原酸和木犀草苷均为 30 μg/mL 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 2 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (样品编号 J1), 连续进样 5 次, 分别对各共有峰的保留时间和峰面积进行考察, 结果 11 个共有峰的保留时间的 RSD 小于 0.5%, 峰面积 RSD 小于 1.5%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批样品 (样品编号 J1) 2 g, 精密称定 5 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 分别对各共有峰的保留时间和峰面积进行考察, 结果 11 个共有峰的保留时间的 RSD 小于 0.5%, 峰面积 RSD 小于 3%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 取同一供试品溶液 (样品编号 J1), 分别在 0、3、6、12、15 h 进样测定, 分别对各共有峰的保留时间和峰面积进行考察, 结果 11 个共有峰的保留时间的 RSD 小于 0.5%, 峰面积 RSD 小于 3%, 表明供试品溶液在 15 h 内基本稳定。

2.5 结果与分析

2.5.1 金银花 HPLC 指纹图谱 取 12 批金银花样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 并按照“2.1”项下的色谱条件进样, 记录 49 min 内各溶液的色谱图, 12 张图谱中, 以绿原酸和木犀草苷为对照, 在 10~49 min 内共有 11 个共有峰。经过各对照品保留时间定位及光谱确认, 1、2、5、7、10、11 号峰依次为新绿原酸、绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A 及异绿原酸 C, 见图 1。

2.5.2 金银花指纹图谱相似度评价结果 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 2004A 版》对 12 张图谱进行数据处理, 屏蔽 2 个最大的色谱峰绿原酸及异绿原酸 A, 使之不参与积分, 其余 9 个共有峰多点校正, 对照图谱生成方法为中位数法, 时

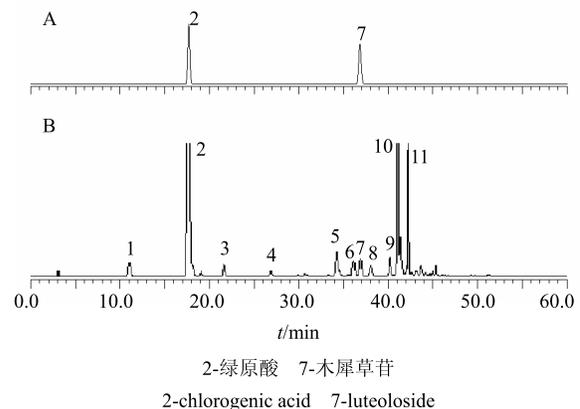


图 1 对照品 (A) 和金银花样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of standard substance (A) and *L. japonica* sample (B)

间窗宽度 0.1 min, 自动匹配, 计算 12 批金银花样品的相似度系数, 12 批金银花样品与生成的对照指纹图谱相似度均在 0.95 以上, 见图 2 和表 2。

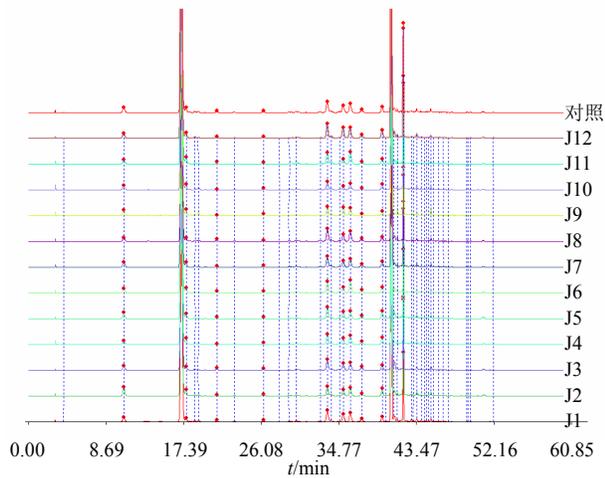


图 2 金银花 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 2 HPLC fingerprints of *L. japonica* samples

表 2 12 批金银花 HPLC 指纹图谱与对照指纹图谱相似度

Table 2 Similarities of HPLC fingerprints of *L. japonica*

样品编号	相似度	样品编号	相似度
J1	0.996	J7	0.992
J2	0.989	J8	0.999
J3	0.991	J9	0.985
J4	0.982	J10	0.985
J5	0.991	J11	0.979
J6	0.996	J12	0.989

2.5.3 山银花指纹图谱相似度评价结果 取 4 批山银花样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 以绿原酸和木犀草苷为对照品, 并按照“2.1”项下的色谱条件进样, 记录 49 min 内各溶液的色谱图, 以生成的金银花对照指纹图谱为对照, 屏蔽绿原酸及异绿原酸 A 积分, 多点校正, 自动匹配, 进行相似度评价, 计算 4 批山银花的相似度, 结果 4 批山银花的相似度均小于 0.80, 与金银花指纹图谱差异明显, 见图 3、4 和表 3。

3 讨论

3.1 关于样品的收集

虽然学术上有金银花与山银花之分, 但在市场上, 常常皆作金银花出售。收集样品的过程中, 笔者发现, 河南、河北及山东等北方几省所售金银花多为正品金银花, 而湖南、湖北等南方城市所售金银花有混淆山银花的情况, 而这种掺有混淆品的样品, 实验前都进行了细致的鉴别分类, 以便实验使

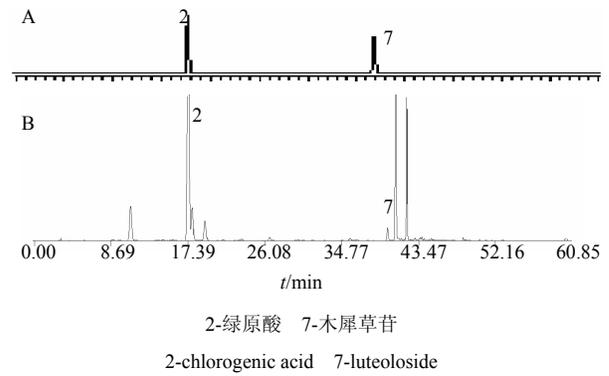


图 3 对照品 (A) 和山银花样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of reference substance (A) and *Lonicerae Flos* samples (B)

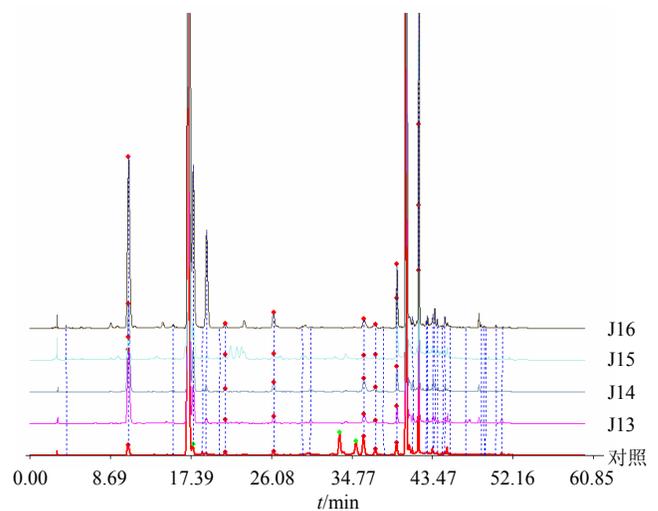


图 4 山银花指纹图谱叠加图

Fig. 4 HPLC fingerprints of *Lonicerae Flos*

表 3 4 批山银花 HPLC 指纹图谱相似度

Table 3 Similarities of HPLC fingerprints of *Lonicerae Flos* samples

样品编号	相似度
J13	0.733
J14	0.752
J15	0.322
J16	0.363

用。因此虽然灰毡毛忍冬和红腺忍冬样品各只有 2 批, 却是经过多批样品鉴别分类的结果, 也具有较强的代表性。

3.2 提取溶剂及提取方法的考察

比较了超声与回流 2 种方法分别在水、50% 甲醇溶液、甲醇 3 种溶剂的条件下对金银花药材化学成分的提取效果, 结果表明在溶剂选用纯甲醇用回流法提取的情况下, 提取效果较好, 故采用纯甲醇

做提取溶剂, 采用回流的方法提取。

3.3 色谱柱的选择

在相同的色谱条件下, 考察了 CAPCELL PAK C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 及 Phenomenex Luna 5 μm C₁₈ (2) 100 A (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 3 个不同品牌的色谱柱, 以 Phenomenex Luna 5 μm C₁₈ (2) 100 A (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱所得到的色谱图峰形最好, 峰数最多。

3.4 检测波长的确定

在相同的色谱条件下, 通过全波长扫描筛查, 重点考察了 350 nm 和 238 nm 2 个检测波长。350 nm 与 238 nm 条件下的所得的色谱峰峰形均较好, 238 nm 条件下的色谱峰较多, 但 350 nm 下小面积色谱峰峰形和分离效果更好。但 238 nm 条件下 12 批金银花之间的相似度差异较大, 在 0.27~0.99, 说明 238 nm 检测波长下不同产地及批次的金银花检出的化学成分不稳定。而 350 nm 检测波长下所得 12 批金银花色谱图相似度均在 0.95 以上, 能够较稳定地反映不同产地金银花的共性特征, 因此选用 350 nm 作为检测波长。

3.5 相似度计算方法的考察

由于金银花与山银花中均含有绿原酸和异绿原酸 A, 且这 2 种分量较高, 在相似度计算时, 权重较大, 但指纹图谱间的细微差异可能才是质量评价的关键^[7]。在绿原酸与异绿原酸 A 2 个大峰参与

积分的条件下, 金银花与山银花 HPLC 指纹图谱的相似度均在 0.9 以上, 无明显差异; 而在绿原酸与异绿原酸 A 2 个大峰不参与积分的条件下, 金银花与山银花相似度差异较大, 能达到很好的鉴别效果。因此, 在金银花对照指纹图谱中, 绿原酸及异绿原酸 A 作为特征峰必须存在, 但在相似度计算中, 可以通过屏蔽 2 峰积分的方法, 更好地体现金银花与山银花之间微量化学成分的差异。而这种屏蔽强峰的相似度评价方法对于化学成分差异细微的药材有更好的鉴别意义。

参考文献

- [1] 庞 瑞. 金银花有效成分的药理学研究进展 [J]. 陕西中医学院学报, 2011, 34(3): 77-78.
- [2] 康 帅, 张 继, 魏爱华, 等. 金银花的本草再考证 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 1913-1921.
- [3] 柴兴云, 李 萍, 窦 静, 等. 山银花中皂苷类成分研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(2): 83-87.
- [4] 熊 艳, 朱晶晶, 王智民, 等. 金银花与山银花 HPLC 指纹图谱比较研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9): 90-92.
- [5] 李 淼, 王永香, 孟 谨, 等. HPLC 法测定金银花中新绿原酸等 8 种成分的量 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 1006-1010.
- [6] 向增旭, 高山林. HPLC 指纹图谱在金银花药材鉴别中的应用研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9): 996-998.
- [7] 詹雪艳, 史新元, 段天璇, 等. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 248-251.