

苗琦,罗光明,罗扬婧,等. 栀子全国生产区划中指标成分多波长 HPLC 方法建立[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):300-302.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.098

栀子全国生产区划中指标成分多波长 HPLC 方法建立

苗琦,罗光明,罗扬婧,葛菲,朱玉野,付小梅,胡生福,朱继孝,邵坚,胡燕珍

(江西中医药大学/江西省中药种质资源工程技术研究中心,江西南昌 330004)

摘要:以栀子为研究对象,建立了多波长高效液相色谱法对栀子中京尼平苷酸、京尼平 1- β -D 龙胆二糖苷、绿原酸、栀子苷、西红花苷-I、西红花苷-II 等 6 种有效成分的测定方法,并将此方法应用于不同产地栀子成分含量的测定,为栀子全国生产区划提供了可靠指标。

关键词:HPLC;栀子;生产区划

中图分类号: O657.7⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0300-03

栀子茜草科常绿灌木植物栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)的干燥成熟果实,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒的功效。栀子主要生长在长江以南各省,主产于江西省、湖南省、湖北省、浙江省等地,是江西省地道药材,也是市场上广泛销售的大宗药材。中药区划研究中药资源及其地域系统的空间分异规律,对特定环境下药材的适生性进行评价,并以适当的方式表示出来,它是选择中药材引种栽培适生地的基本依据^[1-2]。不同地区间中药资源的差异性是中药区划的前提。中药区划研究中通常选取有效成分含量等可以量化的要素作为区划指标^[1]。2010 年版《中国药典》中只对中药栀子中的栀子苷这一有效成分进行了明确规定,但中药成分的复杂性决定了单一成分或指标难以客观评价中药质量,只将栀子苷单一成分含量作为栀子药材的区划指标是无法对栀子进行生产区划的。栀子苷并不能代表栀子药材的所有药效,栀子中主要含有环烯醚萜苷类、西红花苷类、有机酸等化合物,主要有效成分包括京尼平苷酸、京尼平 1- β -D 龙胆二糖苷、绿原酸、栀子苷、西红花苷-I、西红花苷-II。其中栀子苷具有抗炎、解热、利胆、轻泻的作用;京尼平苷酸具有抗肿瘤、抗氧化的作用;京尼平 1- β -D 龙胆二糖苷能改善戊巴比妥钠引起的心力衰竭;绿原酸具有显著的抗癌及保肝利胆作用;西红花苷-I、西红花苷-II 是西红花和栀子中共有的色素类成分,具有去黄疸、利胆及明显的降血脂作用^[3]。本研究以栀子为对象,建立了多波长高效液相色谱法测定对栀子中京尼平苷酸、京尼平 1- β -D 龙胆二糖苷、绿原酸、栀子苷、西红花苷-I、西红花苷-II 等 6 种有效成分的方法,旨在为栀子区划提供更加合理可靠的指标。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪,Empower 工作站(美国 Waters 公司),BP224S 电子天平(万分之一)(北京赛多利斯仪器系统有限公司),KQ-300E 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 材料

甲醇色谱纯(美国天地有限公司);乙腈色谱纯(美国 ACS 公司);甲醇分析纯(西陇化工股份有限公司);娃哈哈纯净水;标准品:京尼平苷酸(111828-201102,纯度按 96.0% 计算)、绿原酸(110753-201314,纯度按 96.6% 计算)、栀子苷(110749-201316,纯度按 97.5% 计算)、西红花苷-I(111588-201202,纯度按 91.1% 计算)、西红花苷-II(111589-201304,纯度按 92.4% 计算)购于中国药品生物制品检定所,京尼平 1- β -D 龙胆二糖苷(批号为 ZM0501BA14,纯度>98.0%)购于上海源叶生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 供试品溶液的制备 称取 0.1 g 栀子粉末(过 4 号筛)置具塞锥形瓶中,加入 75% 甲醇 25 mL,称定质量,超声处理 40 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足损失的质量,摇匀,过滤。量取续滤液 10 mL,置于 25 mL 容量瓶中,加 75% 甲醇至刻度,摇匀即得。

1.3.2 对照溶液的制备 称定适量各对照品,分别置于 50 mL 棕色容量瓶中,用适量 75% 甲醇溶液溶解并定容至刻度,分别制成含京尼平苷酸 10.176 μ g/mL、京尼平 1- β -D 龙胆二糖苷 201.292 μ g/mL、绿原酸 4.443 6 μ g/mL、栀子苷 311.61 μ g/mL、西红花苷-I 175.276 4 μ g/mL、西红花苷-II 17.371 2 μ g/mL 的对照品储备液。

1.3.3 色谱条件 Durashell C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B);梯度洗脱:0~18 min(8%~15% A);18~25 min(15%~23% A);25~40 min(23%~35% A);40~50 min(35%~50% A);检测波长:238,330,440 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:0.8 mL/min;进样量:10 μ L。

收稿日期:2014-09-17

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2011BAI04B01);中央本级重大增减支项目(编号:20603020110、20603020213);江西中医药大学校级研究生创新专项(编号:JZYC14C09)。

作者简介:苗琦(1989—),男,陕西宝鸡人,硕士研究生,主要从事中药资源开发与应用研究。E-mail:miaoqi6213963@126.com。

通信作者:罗光明,博士,教授,主要从事中药资源开发与应用研究。

Tel:(0791)7118982;E-mail:jzlgm11@163.com。

2 结果与分析

2.1 对照品溶液、供试品溶液多波长 HPLC 分析

分别得到 238 nm(图 1)、330 nm(图 2)、440 nm(图 3)下对照品、样品的 HPLC 色谱图,与相应对照品色谱峰保留时间及紫外光谱图进行比对,确认了 6 个色谱峰的归属。

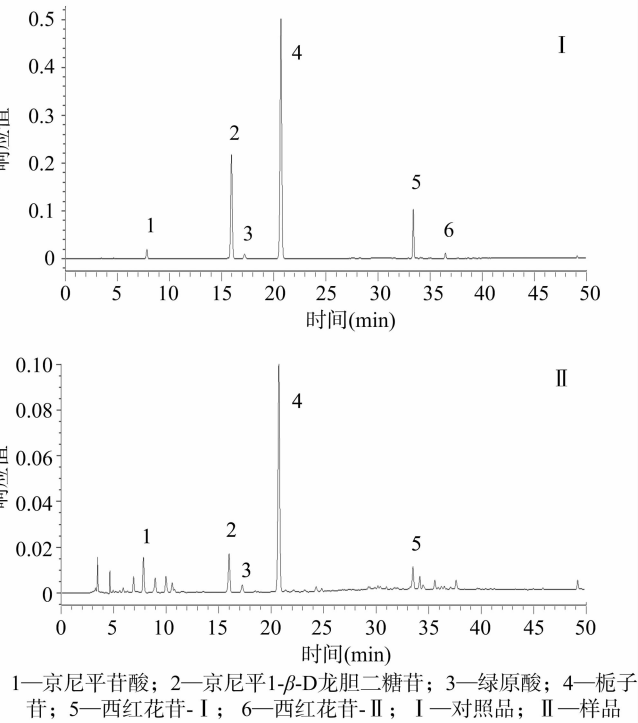


图1 栀子238 nm HPLC 指纹图

由此可知,京尼平苷酸、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷、栀子苷在 238 nm 处有最大吸收波长;绿原酸在 330 nm 处有最大吸收波长;西红花苷-I、西红花苷-II在 440 nm 处有最大吸收波长。故将 238、330、440 nm 定为 6 种有效成分的检测波长。

2.2 线性关系考察

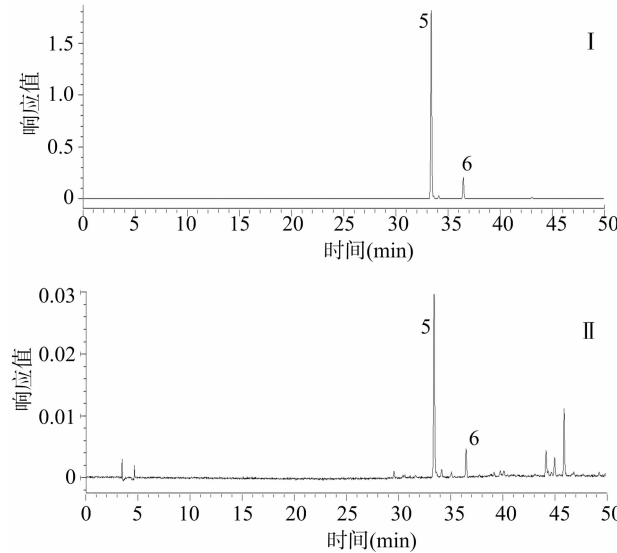
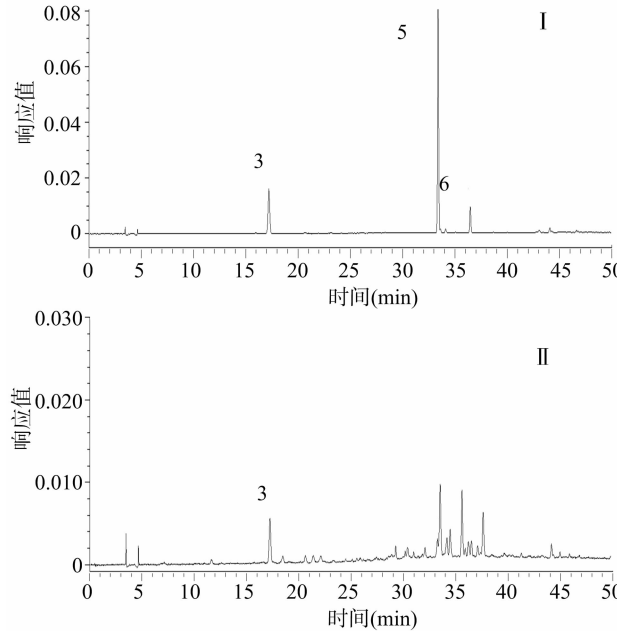
将“1.3.2”节的混合对照品储备液,分别用 75% 甲醇稀释 2、4、8、16、32、64 倍,按“1.3.3”节的色谱条件测定,进样 10 μL,以进样量 10 μL 中对照品质量(μg)为横坐标,最佳检测波长下的峰面积为纵坐标绘制标准曲线,结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果

对照品	标准曲线	相关系数 <i>r</i>	线性范围(μg)
京尼平苷酸	$y = 1\ 610\ 765x - 95$	0.999 9	0.101 76 ~ 0.001 59
京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷	$y = 1\ 144\ 290x - 1\ 123$	0.999 9	2.012 92 ~ 0.031 45
绿原酸	$y = 4\ 025\ 629x + 744$	0.999 7	0.044 44 ~ 0.000 69
栀子苷	$y = 1\ 859\ 824x + 117$	0.999 9	3.116 10 ~ 0.048 68
西红花苷-I	$y = 7\ 633\ 873x + 10\ 739$	0.999 9	1.752 76 ~ 0.027 38
西红花苷-II	$y = 8\ 706\ 055x + 576$	0.999 9	0.173 71 ~ 0.002 71

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取稀释 2 倍的混合对照品溶液 10 μL,在“1.3.3”节的色谱条件下,连续进样 5 次,测定峰面积。栀子苷、西红花苷-I、西红花苷-II、绿原酸、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷、京尼平苷酸的 *RSD* 分别为 0.55%、0.50%、



0.41%、0.48%、0.49%、0.54%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取稀释 2 倍的混合对照品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μL,测定峰面积,栀子苷、西红花苷-I、西红花苷-II、绿原酸、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷、京尼平苷酸的 *RSD* 分别为 1.21%、1.33%、0.97%、

1.74%、1.51%、1.82%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批药材，按“1.3.1”节的方法平行处理 5 份，同法制成供试品溶液，测定峰面积，栀子苷、西红花苷 - I、西红花苷 - II、绿原酸、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷、京尼平苷酸的 *RSD* 分别为 1.36%、1.89%、0.59%、1.30%、0.77%、1.43%，表明此法重复性良好。

2.3.4 加样回收率试验 称取已知含量的样品，共 5 份，加入 2 mL 混合对照品溶液，按照“1.3.1”节的方法制备供试品

溶液，按照“1.3.3”节的色谱条件，进样 10 μL，依次测定 6 种有效成分的峰面积并计算平均加样回收率，平均回收率分别为 99.32%、99.48%、99.19%、99.34%、99.51%、99.65%，表明此方法回收率较好。

2.3.5 样品的含量测定 按“1.3.1”节的方法制备 12 个不同产地的栀子样品，经 0.45 μm 有机滤头过滤后进样 10 μL，按“1.3.3”节的色谱条件，根据标准曲线计算栀子中 6 种有效成分的含量，结果见表 2。

表 2 不同产地的栀子样品有效成分含量

产地	含量(%)					
	京尼平苷酸	京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷	绿原酸	栀子苷	西红花苷 - I	西红花苷 - II
江西省九江市	0.340 9	0.646 8	0.071 5	4.885 0	0.851 3	0.096 4
江西省吉安市	0.024 5	0.359 7	0.014 0	3.691 1	1.030 6	0.110 9
福建省宁德市	0.017 6	0.817 9		1.398 4	1.079 5	0.299 4
福建省龙岩市	0.030 8	0.495 8	0.021 9	4.378 2	0.900 6	0.197 7
重庆市	0.018 4	0.466 2	0.024 6	5.613 9	1.384 3	0.163 7
四川省内江市	0.035 5	0.754 1	0.011 1	5.684 6	1.768 0	0.154 4
四川省资阳市	0.028 9	0.648 2		6.611 9	0.431 6	0.079 4
广西区南宁市	0.072 9	1.083 5	0.008 0	3.134 1	0.470 5	0.037 6
广西区玉林市	0.026 4	0.299 0	0.129 1	3.659 0	0.665 5	0.093 4
浙江省温州市	0.018 7	0.928 5		1.118 9	0.699 0	0.206 5
湖南省浏阳市	0.039 5	0.876 6	0.015 1	3.090 3	0.766 2	0.165 3
湖北省孝昌县	0.033 8	0.865 3	0.031 5	4.861 7	1.226 8	0.140 7

3 结论与讨论

3.1 提取方法的选择

本研究采用了 20、30、40、50、60 min 提取时间下回流、超声 2 种提取方法，综合分离度、峰形、峰数目、峰面积、重复性等因素，结果表明，回流 40 min 与 50、60 min 提取效果几乎无差异，回流 40 min 为最佳回流提取时间；超声 40 min 与超声 50、60 min 提取效果也几乎无差别，提示超声 40 min 为最佳超声提取时间；超声 40 min 与回流 40 min 提取效果几乎一致，但由于回流重复性较差，同法制备样品 *RSD* 较超声高出很多，而且超声较回流操作方法简单，故选择超声 40 min 为样品的提取方法。

3.2 流动相的选择

试验过程中尝试了甲醇-水、乙腈-水等体系，比较了在水中加入磷酸或甲酸峰形、分离度的差别，在确定流动相后，尝试了多个梯度洗脱方法，结果表明，乙腈分离效果较甲醇更好，而且随着乙腈比例的增加，保留时间显著缩短，但分离度有所下降；加入磷酸或者甲酸使溶剂体系呈弱酸性，能改善峰形、分离度，但磷酸、甲酸之间并无明显差别。

3.3 检测波长的选择

大多数研究人员采用 254 nm 或者其他单一波长作为栀子成分的检测波长，由于中药成分复杂，采取单一检测波长会出现峰组成单一、峰面积普遍偏小以及特征峰数量少等情况，后续的栀子指纹图谱相似度计算也无法客观反映栀子药材的成分。栀子中主要含有环烯醚萜苷类、有机酸类、西红花苷等化合物。本试验使用 DAD 检测器对样品进行 190~500 nm 全波长扫描，并对各波长下的色谱进行分析。结果表明，3 类

化合物的最佳检测波长分别是 238、330、440 nm。中药成分的复杂性决定了单一成分或指标难以客观评价中药质量，如果只选取单一波长进行检测，可能造成峰面积信息丢失或残缺，所以本试验选择 238、330、440 nm 作为检测波长，各峰分离良好，特征峰明显且峰形较好，3 个波长图谱最大可能地获取了色谱组分信息。

3.4 不同产地栀子中 6 种有效成分的含量

研究表明，不同产地的栀子中均含有栀子苷、西红花苷 - I、西红花苷 - II、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷、京尼平苷酸，部分产地栀子中由于绿原酸含量极少无法检出，不同产地栀子中各成分含量既有相似之处，也存在很大的差别。栀子苷含量最高，其次含量较高的是西红花苷 - I、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷等。各成分的含量范围波动较大，这可能是由于不同地区的土壤、气候、水分、矿物质分布情况、药材采收期及药材种源等都会对中药材质量产生影响。各地不同的自然生态环境条件直接影响生物的种类、数量、形态结构、生理功能等，自然生态环境与中药资源的质量、数量密切相关^[4]。

参考文献：

[1] 张小波, 郭兰萍, 周 涛, 等. 关于中药区划理论和区划指标体系的探讨[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2350-2354.

[2] 郭兰萍, 黄璐琦, 蒋有绪, 等. 2 种不同模式中药适宜性区划的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 718-721.

[3] 孟祥乐, 李红伟, 李 颜, 等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(11): 959-967.

[4] 徐 燕, 曹 进, 王义明, 等. 多波长高效液相色谱法同时测定栀子中的三类成分[J]. 药学报, 2003, 38(7): 543-546.