

不同产地栀子 HPLC 指纹图谱研究

罗娜, 王雪, 黄丽佳, 郭亚东, 刘华银, 邓亮*

(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500)

摘要: 为对栀子样品进行相似度评价, 以及为其质量评价提供依据. 采用色谱柱为 ZORBAX SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱, 流速 1 mL/min, 检测波长 265 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL, 使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”建立 7 批不同产地栀子样品的指纹图谱, 并确定了 28 个共有峰. 结果表明, 不同产地栀子指纹图谱相似度在 0.878 ~ 0.982 之间. 说明所建立的 HPLC 指纹图谱可为栀子的质量控制提供参考依据.

关键词: 栀子; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度评价

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2021) 03 - 0105 - 05

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2021.03.021

Study on HPLC Fingerprint of Gardenia from Different Origins

LUO Na, WANG Xue, HUANG Lijia, GUO Yadong, LIU Huayin, DENG Liang*

(School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products,
Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: In order to conduct the similarity evaluation from the samples of Gardenia and provide the basis for quality evaluation, HPLC fingerprints of 7 batches of Gardenia from different producing areas were established with the chromatographic column ZORBAX SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution with gradient elution, 1 mL/min flow rate, 265 nm detection wavelength, 35 °C column temperature, and 10 μL injection volume. The fingerprint similarity evaluation system of traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint was also used to establish the fingerprint of 7 batches of gardenia samples from different producing areas, and 28 common peaks were identified. The calculated results showed that the fingerprint similarity of gardenia from different producing areas ranged from 0.878 to 0.982. The establishment of HPLC fingerprint can provide reference for the quality control.

Key words: Gardenia; HPLC; fingerprint; similarity evaluation

栀子为茜草科植物栀子属绿灌木的近圆形果实^[1], 其具有悠久的药食同源历史. 栀子中含有黄酮类、环烯醚萜类、三萜类、有机酸酯类等多种化学成分^[2-3], 被广泛应用于中医临床, 如: 栀子中的西红花苷成分具有治疗心血管疾病和保护内脏器官等作用^[4]; 栀子苷具有降血糖、降血脂、抗炎镇痛等药理作用^[5]; 栀子中的京尼平苷具有利胆功能, 对防止胆结石形成有一定的作用^[6]. 栀子分布广泛, 主产于我国江西、湖北、福建、湖南、广西、广东、云南、四川、贵州等地^[7]. 由于其化学成分含量可

能与地理环境因素有关, 造成不同产地的栀子样品中化学成分含量不同^[8]. 因此, 本研究建立了栀子 HPLC 指纹图谱, 并对其进行相似度评价, 以期为栀子的鉴定及质量控制提供参考.

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (Agilent 1100 型); 可变波长扫描紫外检测器 (VWD); 超声波清洗器 (Grant XUB25); 色谱柱为 ZORBAX SB-C18

收稿日期: 2021 - 01 - 06

基金项目: 云南省科技厅基金资助项目 (2018FB150).

作者简介: 罗娜 (1997—), 女, 云南红河人, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析研究.

* 通讯作者: 邓亮 (1979—), 女, 湖北恩施人, 副教授, 主要从事药物分析研究, E-mail: dengliangkmmc@163.com.

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm).

1.2 试药

栀子苷对照品 (编号 A0178, 纯度 ≥ 98%), 西红花苷 I 对照品 (编号 A0211, 纯度 ≥ 98%), 西红花苷 II 对照品 (编号 A0212, 纯度 ≥ 98%), 均购自成都曼思特生物科技有限公司; 甲醇、乙醇为色谱纯, 磷酸为优级纯, 均购自默克股份有限公司; 水为超纯水; 7 批不同产地的栀子样品 (表 1) 均从当地中药店购买.

表 1 栀子样品的来源

编号	产地
S1	云南
S2	四川
S3	江西
S4	河南
S5	贵州
S6	广西
S7	安徽

2 结果与分析

2.1 色谱条件

色谱柱 ZORBAX SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水 (B), 梯度洗脱程序见表 2, 检测波长 265 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL.

表 2 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	5	95
15	10	90
30	15	85
35	20	80
40	25	75
45	30	70
50	35	65
55	40	60
60	50	50

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备

分别精密称定栀子苷对照品、西红花苷 I 对照品、西红花苷 II 对照品各 10 mg, 加入体积分数为 70% 甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液.

2.2.2 供试品溶液制备

精密称定各样品 0.2 g, 放入具塞锥形瓶里, 再精密加入 10 mL 甲醇 (体积分数为 70%), 并称

其质量, 超声 60 min, 然后放冷, 再称其质量, 并补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 将滤液过 0.22 μm 微孔滤膜, 用于 HPLC 进样分析.

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度实验

取 1 号栀子样品, 精密称定, 制成供试品溶液, 根据上述色谱条件, 连续重复进样 6 次, 并记录色谱指纹图谱. 结果显示, 28 个共有峰相对保留时间的 *RSD* 值 < 3%, 相对峰面积的 *RSD* 值 < 5%, 说明仪器的精密度较好, 能够满足实验要求.

2.3.2 稳定性实验

取 1 号栀子样品, 精密称定, 制成供试品溶液, 根据上述色谱条件, 在 0, 2, 4, 8, 12 h 进样分析, 记录色谱指纹图谱. 结果表明, 28 个共有峰相对保留时间的 *RSD* 值 < 2%, 相对峰面积的 *RSD* 值 < 2%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好, 所测结果可靠.

2.3.3 重复性实验

取 1 号栀子样品 6 份, 精密称定, 制成供试品溶液, 按上述色谱条件进样. 结果表明, 28 个共有峰相对保留时间的 *RSD* 值 < 2%, 相对峰面积的 *RSD* 值 < 5%, 说明本方法重复性较好.

2.4 栀子 HPLC 指纹图谱的建立

精密称定 7 批栀子样品, 制成供试品溶液, 按上述色谱条件, 采用“中药指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)”进行数据分析, 建立 7 批样品的叠加指纹图谱 (图 1) 及对照图谱 (图 2), 7 批不同产地的栀子共有色谱峰为 28 个. 通过与对照品进行比较, 10 号为栀子苷峰, 20 号为西红花苷 I 峰, 23 号为西红花苷 II 峰, 见图 3. 由于 10 号峰栀子苷峰分离效果较好, 峰位居中, 并且以栀子苷作为栀子的主要有效成分, 其含量高, 因此选择栀子苷为参照峰计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值, 如表 3 和表 4 所示, 各色谱峰之间的相对保留时间差异不大, 但相对峰面积之间存在一定的差异.

2.5 相似度计算和数据分析

由表 5 可知, 不同产地栀子指纹图谱相似度在 0.878 ~ 0.982 之间, 其中: 以产地为云南和贵州的栀子差异最大, 相似度为 0.878; 产地为安徽和江西的栀子差异最小, 相似度为 0.982, 表明不同产地间以及生长条件对栀子会有一定的影响.

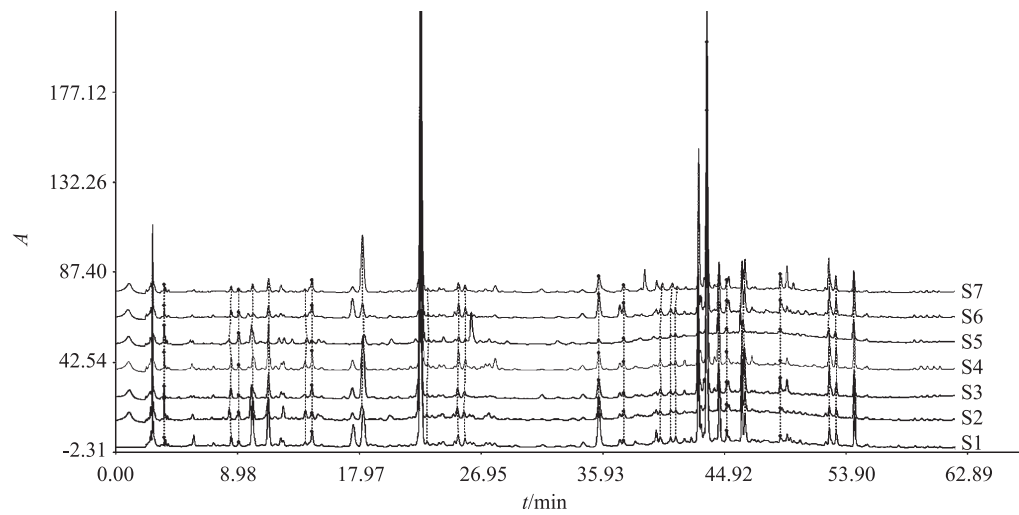


图1 7批栀子样品的HPLC叠加图谱

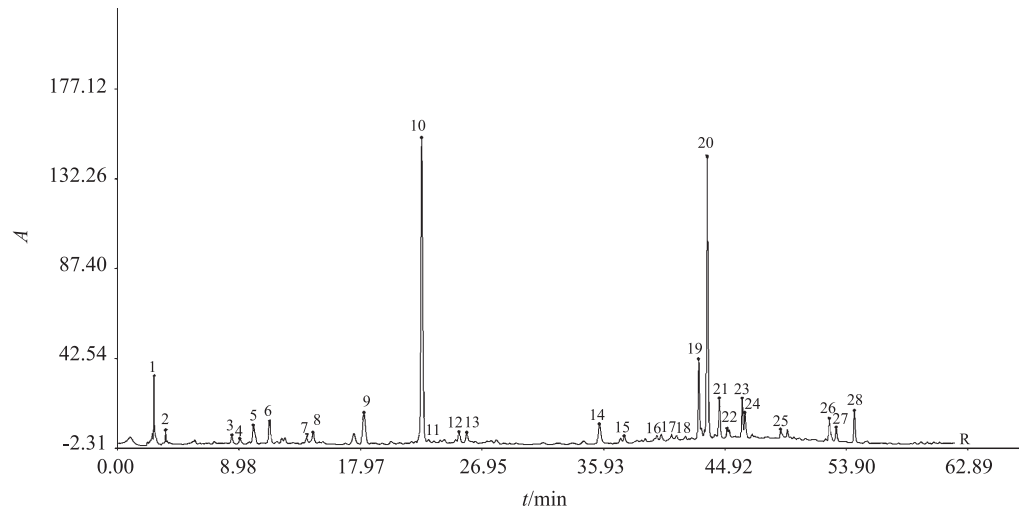


图2 栀子指纹图谱的对照图谱

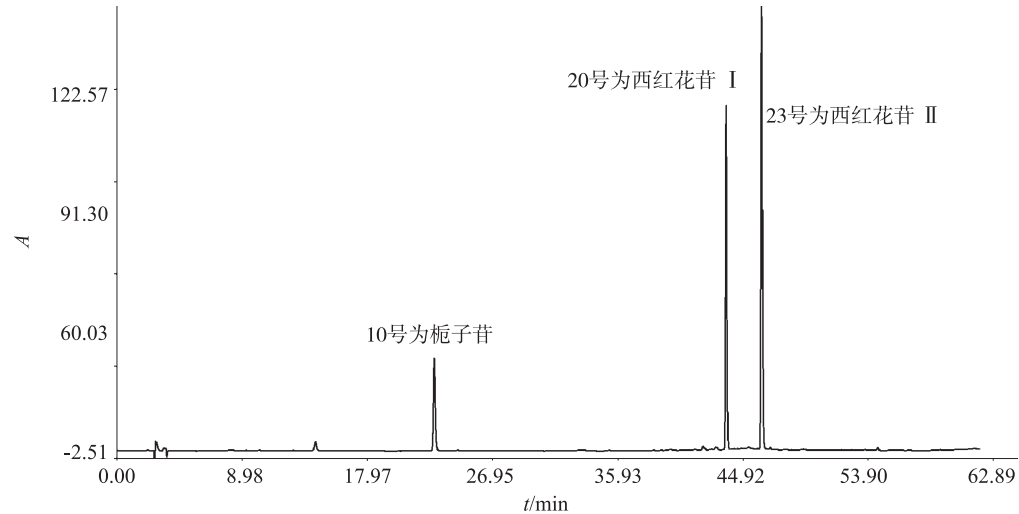


图3 对照品HPLC色谱图

表 3 梔子指纹图谱共有峰相对保留时间

共有峰	云南	四川	江西	河南	贵州	广西	安徽	RSD/%
1	0.120	0.121	0.120	0.120	0.121	0.120	0.120	0.019
2	0.159	0.159	0.159	0.158	0.161	0.159	0.158	0.083
3	0.377	0.376	0.377	0.376	0.376	0.376	0.378	0.071
4	0.402	0.408	0.403	0.402	0.408	0.401	0.403	0.312
5	0.446	0.448	0.448	0.448	0.448	0.448	0.448	0.076
6	0.499	0.501	0.502	0.500	0.500	0.500	0.502	0.097
7	0.622	0.622	0.622	0.622	0.622	0.621	0.623	0.055
8	0.645	0.644	0.645	0.645	0.638	0.644	0.646	0.258
9	0.814	0.808	0.813	0.811	0.810	0.809	0.810	0.197
10（参照峰）	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
11	1.022	1.023	1.022	1.023	1.022	1.023	1.023	0.029
12	1.126	1.123	1.122	1.123	1.122	1.123	1.123	0.138
13	1.149	1.146	1.145	1.145	1.144	1.145	1.144	0.162
14	1.590	1.592	1.584	1.581	1.584	1.582	1.581	0.451
15	1.672	1.675	1.666	1.666	1.668	1.667	1.652	0.729
16	1.790	1.793	1.785	1.786	1.787	1.788	1.784	0.311
17	1.823	1.828	1.818	1.820	1.821	1.821	1.818	0.355
18	1.840	1.844	1.833	1.836	1.837	1.837	1.834	0.364
19	1.913	1.917	1.907	1.910	1.911	1.911	1.907	0.341
20	1.913	1.926	1.934	1.938	1.938	1.939	1.935	0.940
21	1.980	1.985	1.973	1.979	1.977	1.981	1.976	0.371
22	2.005	2.010	1.999	2.005	2.003	2.013	2.008	0.427
23	2.054	2.059	2.048	2.054	2.053	2.057	2.051	0.361
24	2.064	2.069	2.057	2.063	2.062	2.066	2.060	0.378
25	2.180	2.185	2.174	2.180	2.180	2.190	2.178	0.516
26	2.341	2.345	2.334	2.341	2.340	2.345	2.339	0.369
27	2.363	2.368	2.358	2.364	2.363	2.368	2.362	0.367
28	2.423	2.428	2.416	2.423	2.422	2.427	2.420	0.392

表 4 梔子指纹图谱共有峰相对峰面积

共有峰	云南	四川	江西	河南	贵州	广西	安徽	RSD/%
1	0.135	0.114	0.091	0.133	0.189	0.141	0.068	3.880
2	0.018	0.045	0.021	0.022	0.101	0.033	0.011	3.063
3	0.029	0.033	0.027	0.025	0.067	0.028	0.012	1.701
4	0.015	0.033	0.014	0.012	0.080	0.023	0.006	2.525
5	0.164	0.171	0.052	0.047	0.203	0.026	0.025	7.740
6	0.178	0.067	0.076	0.105	0.034	0.050	0.031	5.112
7	0.020	0.042	0.023	0.027	0.040	0.016	0.005	1.311
8	0.068	0.033	0.056	0.048	0.022	0.064	0.036	1.698
9	0.186	0.072	0.280	0.087	0.102	0.091	0.192	7.683
10（参照峰）	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
11	0.013	0.011	0.013	0.013	0.024	0.013	0.007	0.531
12	0.039	0.038	0.038	0.045	0.040	0.054	0.024	0.908
13	0.028	0.028	0.035	0.033	0.032	0.055	0.022	1.049
14	0.205	0.111	0.089	0.051	0.029	0.137	0.068	5.924
15	0.021	0.027	0.016	0.018	0.025	0.062	0.022	1.583
16	0.027	0.020	0.028	0.020	0.020	0.036	0.017	0.673
17	0.026	0.020	0.022	0.015	0.027	0.035	0.023	0.645
18	0.027	0.017	0.016	0.015	0.031	0.025	0.008	0.807
19	0.346	0.079	0.310	0.151	0.097	0.108	0.236	10.783
20	0.878	0.444	0.780	0.669	0.442	0.924	0.542	19.964

续表 4

共有峰	云南	四川	江西	河南	贵州	广西	安徽	RSD/%
21	0.180	0.112	0.072	0.114	0.101	0.161	0.049	4.612
22	0.043	0.017	0.022	0.033	0.041	0.034	0.013	1.175
23	0.143	0.115	0.078	0.052	0.103	0.139	0.042	3.990
24	0.087	0.059	0.111	0.032	0.078	0.088	0.059	2.556
25	0.025	0.011	0.042	0.015	0.042	0.071	0.034	2.038
26	0.058	0.038	0.082	0.086	0.049	0.114	0.068	2.554
27	0.048	0.031	0.036	0.038	0.045	0.059	0.028	1.095
28	0.104	0.101	0.064	0.081	0.126	0.116	0.038	3.105

表 5 不同产地栀子 HPLC 指纹图谱的相似度

样品名称	云南	四川	江西	河南	贵州	广西	安徽	对照指纹图谱
云南	1.000	0.930	0.978	0.965	0.878	0.967	0.950	0.965
四川	0.930	1.000	0.968	0.968	0.957	0.934	0.960	0.955
江西	0.978	0.934	1.000	0.976	0.891	0.965	0.982	0.974
河南	0.965	0.968	0.976	1.000	0.922	0.975	0.980	0.990
贵州	0.878	0.957	0.922	0.922	1.000	0.885	0.914	0.908
广西	0.967	0.934	0.975	0.975	0.885	1.000	0.944	0.990
安徽	0.950	0.960	0.980	0.980	0.914	0.944	1.000	0.966
对照指纹图谱	0.965	0.955	0.990	0.990	0.908	0.990	0.966	1.000

3 讨论

本研究考察了 8 种提取溶剂 30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、100% 甲醇, 30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、100% 乙醇, 以及 3 种不同的提取时间 20, 40, 60 min. 结果表明, 采用 70% 甲醇超声提取 60 min 的提取效果最好. 同时, 对乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸水 3 种流动相系统和 25, 35, 40 ℃ 这 3 种柱温进行了考察. 结果显示, 在柱温为 35 ℃ 时, 采用乙腈-0.1% 磷酸水系统分离效果较好, 基线平稳, 有利于指纹图谱的分析. 此外, 考察了 238, 254, 265, 330 nm 处的特征图谱, 发现在 265 nm 处可检测出的成分较多且基线平稳, 因此选用该波长为检测波长.

本研究对 7 种不同产地栀子样品建立了指纹图谱, 确定了 28 个共有峰, 7 批栀子样品的指纹图谱相似度在 0.878~0.982 之间, 表明不同产地和生长条件对栀子有一定的影响. 综上所述, HPLC 图谱结合相似度评价可为栀子的质量控制以及对其进一步研究提供参考.

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 248.

[2] 付小梅, 俞桂新, 王峰涛. 栀子的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2008, 6 (6): 418-420.

[3] 邹毅, 周敏. 栀子化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 江西化工, 2019 (5): 47-48.

[4] 夏诗琪, 彭逸珍, 贾全全, 等. 栀子来源藏红花苷类成分研究进展 [J]. 南方林业科学, 2018, 46 (6): 51-54.

[5] 袁源见, 王小青, 陈超, 等. 栀子苷的药理作用研究新进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38 (6): 20-23.

[6] 朱振家, 钱之玉, 陆莉, 等. 栀子提取物京尼平苷和西红花苷利胆作用的研究 [J]. 中草药, 1999 (11): 841-843.

[7] 付小梅, 赖学文, 葛菲, 等. 中药栀子类药材资源调查和商品药材鉴定 [J]. 中国野生植物资源, 2002 (5): 23-25.

[8] 罗光明, 袁源见, 苗琦, 等. 基于地形因子对栀子中 6 种成分含量的影响与生态适宜度研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (12): 2992-2995.