

· 化学与分析 ·

## 不同采收期栀子有机酸类成分 HPLC 指纹图谱

闫光军, 范建伟\*, 苏瑞强, 赵志全

(鲁南制药集团股份有限公司, 中药制药共性技术国家重点实验室,  
山东省中药制药新技术重点实验室, 山东 临沂 276006)

**[摘要]** **目的:**比较不同采收期栀子中有机酸类成分的 HPLC 指纹图谱,探讨该类成分在不同采收期内的动态变化。**方法:**采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以 0.05% 三氟乙酸水溶液-乙腈为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 327 nm,柱温 40 °C。运用相似度评价法对各样品指纹图谱进行化学模式识别研究。**结果:**以建立的栀子对照指纹图谱为基准,分别对不同采收期的样品图谱进行相似度评价,计算样品相似度为青栀子 0.94 ~ 1.00,黄栀子 0.81 ~ 0.92,红栀子 0.53 ~ 0.74。**结论:**栀子中各有机酸类成分随采收期不同而各异,不同生长期内采集的样品中该类成分的积累具有一定规律。本研究所建立的方法可为栀子药材质量控制及实现规范化种植提供了科学参考。

**[关键词]** 栀子; 不同采收期; 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]** 1005-9903(2015)11-0039-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110039

### HPLC Fingerprint Analysis of Organic Acids in Gardeniae Fructus at Different Collecting Stages

YAN Guang-jun, FAN Jian-wei\*, SU Rui-qiang, ZHAO Zhi-quan (Lunan Pharmaceutical Group Co. Ltd., State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Shandong Provincial Key Laboratory of New Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Linyi 276006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare HPLC fingerprints of organic acids in Gardeniae Fructus at different collecting stages for determining the dynamic changes of these compounds. **Method:** The chromatographic separations were obtained on a Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a gradient elution using the mobile phase consisting of 0.05% trifluoroacetic acid aqueous solution and acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 327 nm, and the column temperature was 40 °C. The HPLC fingerprints were analyzed by similarity evaluation analysis to conduct the chemical pattern recognition. **Result:** Using the established reference fingerprint of Gardeniae Fructus as standard, all sample fingerprints for green, yellow and red Gardeniae Fructus were evaluated, with the ranges of similarity 0.94-1.00, 0.81-0.92 and 0.53-0.74, respectively. **Conclusion:** The study offers the basis of quality control of Gardeniae Fructus and the realization of good agricultural practice.

**[Key words]** Gardeniae Fructus; different collecting stages; HPLC fingerprint; similarity evaluation analysis

栀子具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒及外用消肿止痛的功效,临床治疗热病心烦、湿热黄疸、淋证涩痛、血热吐衄等<sup>[1]</sup>。栀子药材主产于江西、湖北、福建、湖南、广西等省区<sup>[2]</sup>。栀子所含化学成分多样,包括萜类(又以环烯醚萜类、西红花酸类为

主)、有机酸类、黄酮类、挥发油类等成分<sup>[3-4]</sup>。对栀子成分进行指纹图谱研究已有文献报道<sup>[5-7]</sup>,但主要是环烯醚萜类、西红花酸类这两类成分,而对于有机酸类成分则未有涉及。以绿原酸和异绿原酸 A, B, C 等为代表的有机酸类作为栀子中一大类成分,

**[收稿日期]** 20141129(005)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2012CB724001)

**[第一作者]** 闫光军, 硕士, 从事新药研究与开发, Tel:0539-8336639, E-mail: menglianguren@163.com

**[通讯作者]** \* 范建伟, 硕士, 从事中药新药研发与质量控制, Tel:0539-8336639, E-mail: vanvitamin@163.com

具有广泛的药理活性<sup>[8]</sup>。为了更全面地评价栀子药材质量和控制其质量的稳定性,本研究根据“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2004 A 版),比较了不同采收期栀子有机酸类成分的 HPLC 指纹图谱,并探讨了该类成分在药材不同采收期内的动态变化,以期对栀子质量控制及实现规范化种植提供了理论参考。

## 1 材料

**1.1 仪器** 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent,包括四元泵,DAD 检测器和 Agilent Chemstation 工作站),AG285 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

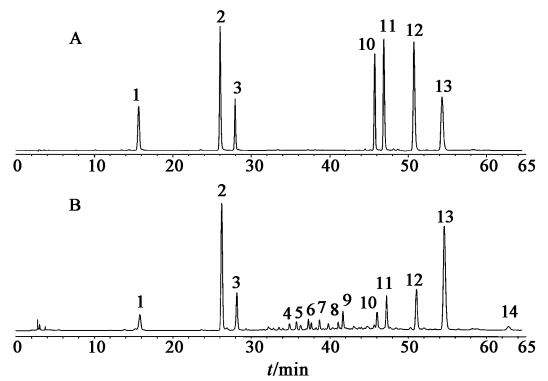
**1.2 试药** 绿原酸(纯度  $\geq 98\%$ ,批号 110753-200413)购自中国食品药品检定研究院,新绿原酸、隐绿原酸(纯度均  $\geq 98\%$ ,批号 MUST-10091501, MUST-10091811)购自成都曼思特生物科技有限公司;异绿原酸 A(3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸,批号 12040507),异绿原酸 B(3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸,批号 D100624),异绿原酸 C(4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸,批号 12022804)购自成都普瑞法科技开发有限公司,纯度均  $\geq 98\%$ ;3,5-二-O-咖啡酰-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰奎宁酸(CGQA)自制,经 HPLC 面积归一化法测定纯度  $\geq 98\%$ 。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

栀子样品共 30 批,分别于 2012 年 8 月—12 月采收于江西樟树,经鲁南制药集团高级工程师李守信鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* 的干燥果实。上述样品按果实生长期采收时间的早晚,根据其果皮颜色变化大致分为“青栀子”、“黄栀子”、“红栀子”3 类,各为 10 批,所有凭证标本均存放于鲁南制药集团中药制药共性技术国家重点实验室。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相 0.05% 三氟乙酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~15 min,5%~6% B;15~23 min,6%~10% B;23~42 min,10%~20% B;42~65 min,20% B),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 327 nm,柱温 40 ℃。见图 1。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别取绿原酸 10.22 mg,新绿原酸 3.26 mg,隐绿原酸 3.34 mg,异绿原酸 A 6.31 mg,异绿原酸 B 6.14 mg,异绿原酸 C 6.26 mg 和 CGQA 5.91 mg 对照品适量,精密称定,置同一 25 mL 量瓶中,用 50% 甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。



A. 混合对照品;B. 青栀子;1. 新绿原酸;2. 绿原酸;3. 隐绿原酸;10. 异绿原酸 B;11. 异绿原酸 A;12. 异绿原酸 C;13. 3,5-二-O-咖啡酰-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰奎宁酸(CGQA)

图 1 青栀子样品 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of sample of green Gardeniae Fructus

**2.3 供试品溶液的制备** 取栀子粉末(过 4 号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,用 50% 甲醇补足失重,摇匀,10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,取上清液 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取同一供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,重复进样 6 次,记录色谱图。结果色谱图中各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均  $< 2.0\%$ ,表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取同一批次样品 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果色谱图中各色谱峰的相对保留时间 RSD  $< 2.0\%$ ,相对峰面积 RSD  $< 2.8\%$ ,表明该方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液,在相同条件下分别于制备后 0,2,4,8,12,24 h 进样测定,记录色谱图。结果色谱图中各色谱峰的相对保留时间 RSD  $< 2.0\%$ ,相对峰面积 RSD  $< 2.6\%$ ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.5 指纹图谱的建立与分析

**2.5.1 指纹图谱的建立** 取 10 批青栀子样品,分别按上述确立的方法进行样品测定。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2004 A 版)对 10 批青栀子样品的图谱数据进行分析、比较,经多点校正和自动匹配后,标定其中匹配数目为 10 的 14 个峰为共有峰,采用中位数法生成对照指纹图谱,并对建立的指纹图谱特征峰进行指认,确认了其中 7 个有机酸成分。见图 2。

**2.5.2 不同采收期栀子的分析** 分别取青栀子、黄

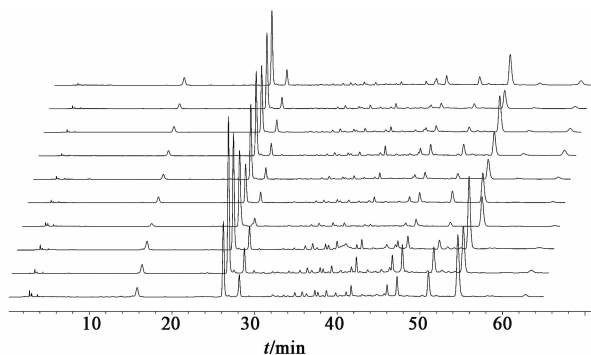
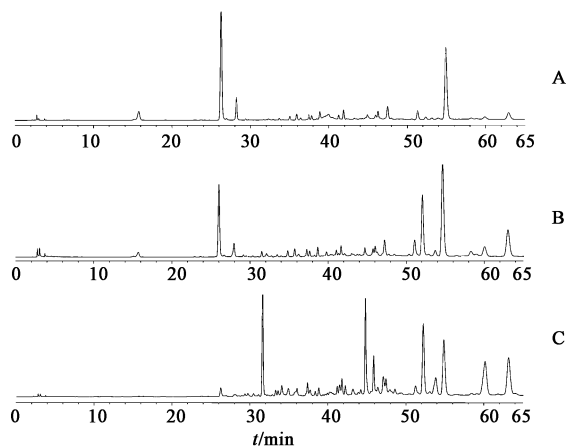


图 2 10 批青栀子样品的 HPLC 叠加  
Fig. 2 Multi-chromatogram of 10 samples of green Gardeniae Fructus

栀子、红栀子样品,按供试品溶液的制备方法处理,进样测定。结果青栀子、黄栀子二者色谱图中均能检测出绿原酸等 7 个已知有机酸类成分,且上述成分色谱峰面积以青栀子普遍较大,黄栀子次之;红栀子样品色谱图中仅出现绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、CGQA 等 4 或 5 个已知有机酸类成分色谱峰,且其峰面积普遍较小,见图 3。以建立的对照指纹图谱为基准,分别对不同采收期的样品图谱进行相似度评价,结果青栀子样品相似度在 0.94 ~ 1.00,黄栀子在 0.81 ~ 0.92,而红栀子在 0.53 ~ 0.74,见表 1。该相似度评价分类结果与仅凭外观把药材简单区分为青栀子、黄栀子、红栀子的分类结果基本一致,表明采用本研究所建立的分析方法可对栀子药材的采收期进行大体鉴定。



A. 8 月下旬至 9 月中旬采收; B. 9 月下旬至 10 月下旬采收; C. 11 月下旬至 12 月下旬采收

图 3 不同采收期栀子中有机酸的 HPLC  
Fig. 3 HPLC chromatograms of organic acid compounds in Gardeniae Fructus at different collecting stages

### 3 讨论

比较甲醇和 50% 甲醇 2 种提取溶剂,结果无明显

表 1 不同采收期栀子样品相似度

Table 1 Results of similarity of HPLC chromatograms of Gardeniae Fructus at different collecting stages

	青栀子	黄栀子	红栀子
1	0.994	0.922	0.661
2	0.942	0.874	0.745
3	0.986	0.860	0.638
4	0.984	0.918	0.582
5	0.985	0.905	0.556
6	0.977	0.832	0.707
7	0.995	0.856	0.594
8	0.943	0.829	0.606
9	0.985	0.845	0.534
10	0.975	0.806	0.579

差别,故选用毒性稍小的 50% 甲醇作为提取溶剂;比较了乙腈-三氟乙酸、乙腈-磷酸和甲醇-磷酸 3 种流动相系统,结果乙腈-三氟乙酸系统最好,各成分分离良好,基线稳定;绿原酸等有机酸类在 238, 327 nm 下均有较大吸收,在 238 nm 下,栀子中环烯醚萜类成分对有机酸类干扰较为严重,在 327 nm 下,有机酸类成分有较大吸收,环烯醚萜类成分又基本无干扰,故以 327 nm 作为检测波长。

根据本研究所建立的方法对不同采收期的栀子样品进行分析,鉴定了绿原酸等 7 个有机酸类成分,发现了有机酸类成分在果实生长期内的积累大体呈现逐渐下降的趋势,同时其他一些未知成分在量的积累上,大体呈现出与前者相反的趋势,从而为栀子质量控制及实现规范化种植提供了理论参考

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:231-232.
- [2] 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, 21(5):23-25.
- [3] 苗明三,李振国. 现代实用中药质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:708-715.
- [4] 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.
- [5] 曹敏,陈玉英. 栀子药材西红花苷类 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(7):553-555.
- [6] 陈阳,贾琳,蔡乐,等. 四川纳溪地区栀子指纹图谱及红花苷和栀子苷含量的研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(4):458-460.
- [7] 王莎,周小琴,司徒少金,等. 栀子药材环烯醚萜类和西红花酸类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19):85-88.
- [8] 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(5):77-79.

[责任编辑 顾雪竹]