

不同产地栀子药材中8种主要药效成分的 含量测定及聚类分析

王永香, 米慧娟, 李淼, 吴云, 王振中, 萧伟*

(江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

[摘要] **目的:**比较不同产地栀子药材中京尼平苷酸、去乙酰车叶草酸甲酯、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸及西红花苷 I 共 8 种药效成分的含量,为栀子药材最佳产地的确定提供理论依据。**方法:**采用 HPLC 测定各指标成分含量,流动相乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,5%~10% A;10~20 min,10%~18% A;20~30 min,18%~45% A,40~50 min,45%~5% A),检测波长分别 238,324,440 nm。并以各成分作为指标进行聚类分析,采用 SPSS 20.0 中主成分分析法提取 4 个主因子。**结果:**累计方差贡献率 95.98%,聚类分析结果显示江西泰和县和江西樟树县 GAP 基地的栀子药材质量较好。**结论:**不同产区栀子药材中主要药效成分的含量有较大差异,各成分含量与产地呈一定的相关性。

[关键词] 栀子; 主成分分析法; 聚类分析; 栀子苷; 新绿原酸; 京尼平苷酸

[中图分类号] R284.1;R284.2;R282.4;R931.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0044-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200044

Determination and Cluster Analysis of Eight Effective Components in Gardeniae Fructus from Different

Localities WANG Yong-xiang, MI Hui-juan, LI Miao, WU Yun, WANG Zhen-zhong, XIAO Wei* (State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To compare contents of eight medicinal components (geniposidic acid, deacetyl asperulosidic acid methyl ester, genipin 1-gentiobioside, gardenoside, crocin I, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenin acid) in Gardeniae Fructus from different localities, and provide a reference for selecting its optimal locality. **Method:** HPLC was performed on a Kromasil C₁₈ column with mobile phases of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution in a gradient mode at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength was 238, 324, 440 nm. Taking each component as indexes for cluster analysis, four main factors were extracted by principal component analysis in SPSS 20.0. **Result:** Four principal component which accounted for over 95% of the total variance, qualities and uniformities of Gardeniae Fructus from GAP bases of Zhangshu county and Taihe county were higher than others. **Conclusion:** Contents of medicinal components in Gardeniae Fructus from different localities are significant different. There is correlation between contents of each component and localities.

[Key words] Gardeniae Fructus; principal component analysis; cluster analysis; gardenoside; neochlorogenic acid; geniposidic acid

栀子具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒等作用,主治热病心烦、湿热黄疸、淋证涩痛、血热吐衄、目赤肿痛、火毒疮疡,外治扭挫伤痛^[1]。栀子主产

于浙江、江西、湖北、湖南等地^[2],主要成分为环烯醚萜类、三萜类、黄酮类等,具有保肝利胆、抗炎镇痛、抗氧化、抗动脉粥样硬化等药理活性^[3-4]。已从

[收稿日期] 20150706(002)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 王永香, 硕士, 高级工程师, 从事中药新药及制药新技术研究, Tel:0518-81152328, E-mail: xiaoyu99201@163.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel:0518-81152367, E-mail: kanionlunwen@163.com

梔子药材中分离出的环烯醚萜类、三萜类、黄酮类成分有梔子苷、京尼平龙胆双糖苷、京尼平苷酸、去乙酰车叶草酸甲酯、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、西红花苷 I 等^[5-7]。

热毒宁注射液是江苏康缘药业股份有限公司重点培育品种,梔子药材为其处方中 3 味药材之一。由于受地理因素和生长环境的影响,不同产区的栽培和野生梔子中化学组成不尽相同。为了进一步固定药材来源,本实验共采集 7 个主要产区 21 批梔子样品,采用 HPLC 同时测定样品中梔子苷、京尼平龙胆双糖苷、京尼平苷酸、去乙酰车叶草酸甲酯、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、西红花苷 I 共 8 个主要药效成分的含量,并对检测结果进行主成分分析和聚类分析,考察不同产区梔子药材的质量,为热毒宁注射液中梔子药材最佳来源的确定提供理论依据。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), F-100 型粉碎机(上海高致精密仪器有限公司), XP6 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), GT10-1 型高速台式离心机(北京时代北利离心机有限公司)。梔子苷、京尼平苷酸、去乙酰车叶草酸甲酯、绿原酸、西红花苷 I 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110749-200512, 111828-201203, 111786-200801, 110753-201114, 110588-200102), 京尼平龙胆双糖苷(成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-111120), 新绿原酸、隐绿原酸(美国 Sigma 公司,批号分别为 101212168, 101245643), 甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

梔子药材分别购自江西吉安市新干县梔子产区(3 批样本),江西吉安市永丰县梔子产区(3 批样本),江西樟树县中药材生产质量规范(GAP)基地(3 批样本),江西泰和县 GAP 基地(3 批样本),湖南梔子主要产区(3 批样本),湖北梔子主要产区(3 批样本),浙江梔子主要产区(3 批样本),共计梔子 21 批样本。均经康济大药房中药执业药师吴舟经理鉴定为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 精密称取梔子粉末(过 60 目筛)约 0.5 g,置于锥形瓶中,精密加入 30% 甲醇 25 mL,称定质量,超声处理 40 min,放冷,补足失重,摇匀,过滤。取续滤液 1 mL 于 5 mL 量瓶中,用 50% 甲醇稀释并定容至刻度,10 000 r·min⁻¹ 离心 3

min,即得。

2.2 混合对照品溶液的配制 分别精密称量梔子苷 14.012 mg,京尼平苷酸 0.160 mg,去乙酰车叶草酸甲酯 0.200 mg,京尼平龙胆双糖苷 2.502 mg,西红花苷 I 0.045 0 mg,新绿原酸 0.079 mg,绿原酸 0.410 mg 和隐绿原酸 0.097 mg,置于同一个 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

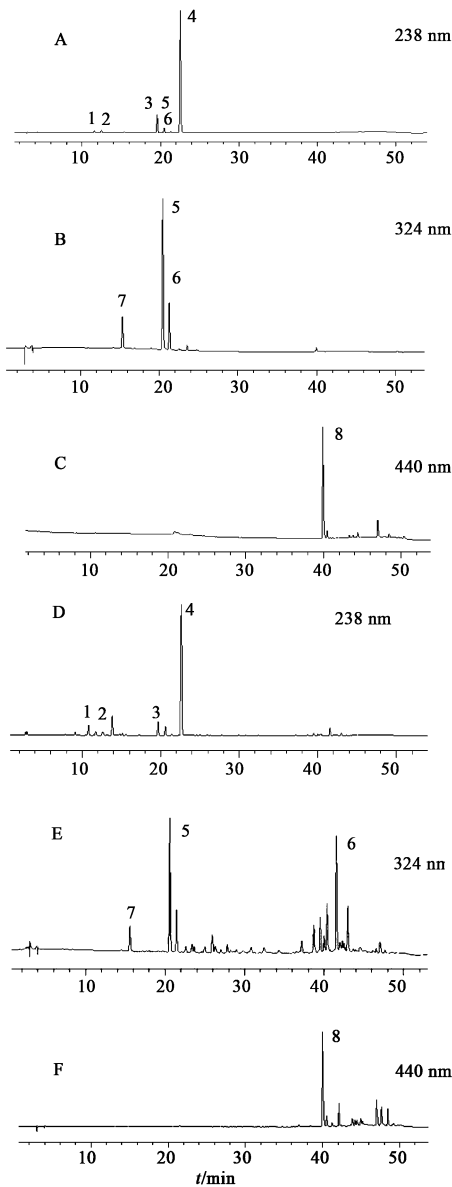
2.3 色谱条件^[8-9] Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 10% A; 10 ~ 20 min, 10% ~ 18% A; 20 ~ 30 min, 18% ~ 45% A, 40 ~ 50 min, 45% ~ 5% A),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长分别 238, 324, 440 nm,进样量 10 μL。见图 1。

2.4 线性关系考察 分别精密称取梔子苷 50 mg,京尼平苷酸 1 mg,去乙酰车叶草酸甲酯 1 mg,京尼平苷龙胆双糖苷 5 mg,西红花苷 I 0.05 mg,新绿原酸 0.1 mg,绿原酸 1 mg,隐绿原酸 0.1 mg,置于 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得混合对照品溶液。混合对照品溶液分别稀释 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 倍,得系列对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 4.521X - 8.715$ ($r = 0.999$), $Y = 3.190X - 7.623$ ($r = 1.000$), $Y = 6.524X - 3.451$ ($r = 0.999$), $Y = 3.987X - 3.451$ ($r = 0.999$), $Y = 5.460X - 4.651$ ($r = 1.000$), $Y = 8.791X - 6.542$ ($r = 0.999$), $Y = 7.512X - 6.132$ ($r = 0.999$), $Y = 4.765X - 2.75$ ($r = 0.999$),线性范围依次为 50 ~ 2 000, 1 ~ 40, 1 ~ 40, 50 ~ 200, 0.05 ~ 2, 0.1 ~ 4.0, 1 ~ 40, 0.1 ~ 4.0 mg·L⁻¹。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取 2.4 项下混合对照品溶液 10 μL,按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次,计算梔子苷、京尼平苷酸、去乙酰车叶草酸甲酯、京尼平苷龙胆双糖苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸及西红花苷 I 峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.8%, 0.3%, 0.6%, 0.9%, 0.5%, 0.7%, 0.4%。

2.5.2 重复性试验 取编号 12 的梔子样品适量,按 2.1 项下方法制备供试品溶液 6 份,按 2.3 项下色谱条件测定,结果梔子苷、京尼平苷酸、去乙酰车叶草酸甲酯、京尼平苷龙胆双糖苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸及西红花苷 I 峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 1.6%, 1.1%, 1.8%, 0.9%, 1.4%, 1.5%, 1.0%。



A, B, C. 对照品; D, E, F. 供试品; 1. 京尼平昔酸; 2. 去乙酰车叶草酸甲酯; 3. 京尼平龙胆双糖苷; 4. 栀子苷; 5. 绿原酸; 6. 隐绿原酸; 7. 新绿原酸; 8. 西红花苷 I

图 1 栀子 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Gardeniae Fructus

2.5.3 稳定性试验 取编号 12 的栀子样品适量,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 按 2.3 项下色谱条件测定,结果栀子苷、京尼平昔酸、去乙酰车叶草酸甲酯、京尼平昔龙胆双糖苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸及西红花苷 I 峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.8%, 0.6%, 0.6%, 0.9%, 0.8%, 1.0%, 0.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.4 加样回收率试验 精密称取已知 8 种成分含量的的栀子药材(栀子苷、京尼平昔酸、去乙酰车

叶草酸甲酯、京尼平昔龙胆双糖苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸及西红花苷 I 质量分数分别为 74.84, 0.83, 1.98, 15.13, 0.17, 1.76, 0.31, 0.58 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 6 份,每份 0.5 g,分别精密加入混合对照品溶液(栀子苷、京尼平昔酸、去乙酰车叶草酸甲酯、京尼平昔龙胆双糖苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸及西红花苷 I 质量浓度分别为 400, 4, 4, 60, 0.6, 7, 1.2, 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 mL,按 2.3 项下色谱条件测定,8 种成分的加样回收率均在 92.5% ~ 107.2%, RSD 均 < 2.1%。

2.6 样品测定 精密称取各栀子样品粉末(过 60 目筛)约 0.5 g,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,见表 1。结果显示栀子苷质量分数最高达 100.11 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,最低为 44.33 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,21 个样本中栀子苷含量均高于 2010 年版《中国药典》的要求;新绿原酸在栀子药材中含量基本为最低,有的样本中基本检测不到。由栀子苷、京尼平昔龙胆双糖苷 2 个成分含量数据可以初步判断二者之间可能存在转化关系。

2.7 栀子药材中 8 种药效成分的主成分分析 如果 8 种药效成分均参与聚类,无疑会增加分析过程中的计算工作量,故采用 SPSS 20.0 软件的因子分析,把 8 个变量综合成少数几个能够反映原有变量绝大部分信息的公共因子,以公共因子为变量对不同产地栀子药材进行聚类分析^[9-10]。由于 8 种药效成分具有不同的数量级,首先对 8 种药效成分含测值进行标准化处理,再进行主成分分析,观察 8 个变量间的线性相关性,判断是否合适进行因子分析。原有变量的相关系数矩阵见表 2。结果显示大部分的相关系数都较高,各变量呈较强的线性关系,能够从中提取公共因子,适合进行因子分析。

根据原有变量相关系数矩阵,为了防止数据信息丢失,对原有 8 个变量采用主成分分析法提取特征根,经多次尝试,指定特征根的标准为 0.6,此时提取 4 个公共因子,因子分析初始解、因子解释原有变量总方差情况见表 3。结果显示 4 个公共因子对原有 8 个变量的提取率均 > 90% (京尼平昔酸、去乙酰车叶草酸甲酯、京尼平昔龙胆双糖苷、栀子苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸及西红花苷 I 的提取率分别为 99.2%, 99.0%, 99.2%, 91.8%, 96.4%, 97.7%, 92.6%, 91.9%),并且解释了原有变量总方差的 95.98%,原有变量的信息丢失较少,因子分析效果较为理想。

2.8 聚类分析 7 个不同产地 21 个栀子药材以主

表 1 不同产地栀子药材中 8 种有效成分的含量测定

Table 1 Determination of eight medicinal components in Gardeniae Fructus from different localities mg·g⁻¹

产地	京尼平苷酸	去乙酰车 叶草酸甲酯	京尼平 龙胆双糖苷	栀子苷	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	西红花苷 I
江西新干县-1	0.83	1.98	15.13	74.84	0.17	1.76	0.31	0.58
江西新干县-2	1.05	1.31	11.40	74.64	0.25	2.13	0.40	0.36
江西新干县-3	1.14	1.72	14.42	82.82	0.30	2.37	0.46	0.63
江西泰和县 GAP 基地-1	1.94	1.92	10.34	94.46	0.41	3.07	0.59	0.48
江西泰和县 GAP 基地-2	0.92	1.13	14.13	83.78	0.44	2.91	0.63	0.42
江西泰和县 GAP 基地-3	1.24	1.52	12.89	90.59	0.36	2.54	0.50	0.45
江西樟树县 GAP 基地-1	1.20	1.53	10.65	89.57	0.37	2.85	0.47	0.33
江西樟树县 GAP 基地-2	1.21	1.56	8.87	100.11	0.40	3.21	0.59	0.14
江西樟树县 GAP 基地-3	0.92	1.71	8.73	94.88	0.31	3.15	0.49	0.16
江西永丰县-1	0.94	1.33	12.14	83.32	0.32	2.77	0.49	0.71
江西永丰县-2	0.92	1.13	14.13	83.78	0.44	2.91	0.63	0.42
江西永丰县-3	0.67	2.30	11.06	67.10	0.18	1.30	0.30	1.54
湖南省长沙市-1	1.07	1.51	14.71	71.81	0.38	2.11	0.50	0.34
湖南省长沙市-2	1.68	1.91	11.46	63.04	0.27	2.18	0.40	0.65
湖南省长沙市-3	1.92	1.70	10.65	59.57	0.17	1.60	0.27	0.73
湖北省孝感市-1	0.45	1.34	8.66	56.00	0.08	0.92	0.29	4.47
湖北省孝感市-2	1.26	1.80	14.35	89.91	0.39	2.75	0.58	0.47
湖北省孝感市-3	0.43	1.75	7.32	44.33	0.07	0.91	0.27	3.09
浙江省杭州市-1	0.00	1.41	9.81	53.88	0.11	1.32	0.35	4.19
浙江省杭州市-2	1.46	1.95	8.18	49.71	-	1.20	0.26	4.03
浙江省杭州市-3	0.45	1.20	9.80	54.71	0.07	0.75	0.18	4.47

表 2 栀子药材中 8 种有效成分含量的原有变量相关系数矩阵

Table 2 Correlation matrix of contents of eight medicinal components in Gardeniae Fructus from different localities

项目	京尼平苷酸	去乙酰车 叶草酸甲酯	京尼平 龙胆双糖苷	栀子苷	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	西红花苷 I
京尼平苷酸	1.000	0.176	-0.029	0.020	0.047	-0.097	-0.274	-0.274
去乙酰车叶草酸甲酯	0.176	1.000	-0.079	-0.225	-0.140	-0.257	-0.091	-0.091
京尼平龙胆双糖苷	-0.002	-0.111	0.401	0.562	0.380	0.465	-0.569	-0.569
栀子苷	-0.029	-0.079	1.000	0.879	0.936	0.845	-0.798	-0.798
新绿原酸	0.020	-0.225	0.879	1.000	0.923	0.949	-0.840	-0.840
绿原酸	0.047	-0.140	0.936	0.923	1.000	0.921	-0.834	-0.834
隐绿原酸	-0.097	-0.257	0.845	0.949	0.921	1.000	-0.716	-0.716
西红花苷 I	-0.274	-0.091	-0.798	-0.840	-0.834	-0.716	1.000	1.000

成分分析获得的 4 个公共因子使用 SPSS 20.0 统计软件处理,采用组间联接聚类方法,距离的计算方法为 Euclidean distance,进行层次聚类分析,见图 2。结果显示 21 个样本共分为 3 类,其中 5 号(江西泰和县 GAP 基地-2),11 号(江西永丰县-2),8 号(江

西樟树县 GAP 基地-2),17 号(湖北省孝感县-2),3 号(江西新干县-3),9 号(江西樟树县 GAP 基地-3),6 号(江西泰和县 GAP 基地-3),7 号(江西樟树县 GAP 基地-1),13 号(湖南省长沙市-1),10 号(江西永丰县-1),4 号(江西泰和县 GAP 基地-1),2 号

表 3 梔子药材中 8 种有效成分含量的因子解释原有变量总方差情况

Table 3 Total variance case explained contents of eight medicinal components in Gardeniae Fructus from different localities

公共因子	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差质量分数/%	累积质量分数/%	合计	方差质量分数/%	累积质量分数/%
1	4.786	59.828	59.828	4.786	59.828	59.828
2	1.311	16.382	76.209	1.311	16.382	76.209
3	0.825	10.306	86.516	0.825	10.306	86.516
4	0.757	9.461	95.976	0.757	9.461	95.976
5	0.159	1.983	97.959			
6	0.108	1.353	99.312			
7	0.042	0.520	99.832			
8	0.013	0.168	100.000			

(江西新干县-2)12 个样品聚为第一类;1 号(江西新干县-1),14 号(湖南省长沙县-2),12 号(江西永丰县-3),15 号(湖南省长沙市-3)4 个样品聚为第二类;16 号(湖北省孝感市-1),21 号(浙江省杭州市-3),19 号(浙江省杭州市-1),18 号(湖北省孝感市-3),20 号(浙江省杭州市-2)5 个样品聚为第三类。从表 1 和图 2 可知,质量较好的样本聚成了第一类,江西泰和县 GAP 基地和江西樟树县 GAP 基地样品均聚在了这一类中,由此可以判断出以上两地的梔子药材质量较好并较稳定。

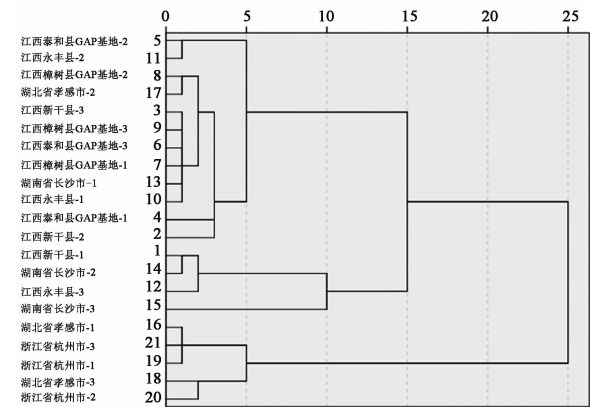


图 2 不同产地梔子药材的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of Gardeniae Fructus from different localities

3 讨论

梔子为常用中药材,使用广泛。药材质量的差异直接影响成方制剂的质量,因此控制梔子药材的质量是控制和保障其制剂质量的有效手段之一。热毒宁注射液由青蒿、金银花、梔子 3 味药材组成,梔子药材质量的稳定是本制剂安全和有效的必要条件。影响中药材质量的因素很多,主要有产地、采收

期、加工方法、药材流通过程及贮藏条件控制等多个方面,其中产地对药材质量的影响又显得尤为重要。由于不同产地的气候条件及地理条件差异导致不同产地药材质量差异较大。为了稳定药材质量,本文采集了 7 个梔子药材主要产区共 21 个梔子样本,应用 HPLC 同时测定了梔子药材中 8 个主要药效成分的含量,并通过主成分分析法对实验过程中大量的数据进行降维处理,获得能代表原有变量中 95% 信息的公共因子变量,以公共因子进行聚类分析,提高数据处理效率。聚类分析结果把江西泰和县和江西樟树县 GAP 基地梔子药材聚为一类,由 8 种成分含量检测结果可以看出,这 2 个产地梔子药材质量较为均一,药效成分含量较高。本文研究结果为热毒宁注射液梔子药材产地的确定提供了理论依据。

本文选择 7 个梔子药材主要产区共 21 个样本,每个产区只收集了 3 个样本,样本数量较少,且每个样本中 8 种成分含量之间存在的关联性缺乏研究,一定程度上影响了研究的深度,后续将扩大样本量并对各成分含量之间的关联性开展更深入研究。

[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.
- [2] 吕茂平,周莉,闫静,等. 不同产地梔子生品种梔子苷的含量测定[J]. 中国中药杂志,2002,27(10):785-786.
- [3] 于洋,高昊,戴毅,等. 梔子属植物化学成分的研究进展[J]. 中草药,2010,41(1):148-153.
- [4] 孟祥乐,李红伟,李颜,等. 梔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] 蔡妙婷,左月明,张忠立,等. 梔子化学成分(IV)[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):88-91.
- [6] 左月明,张忠立,杨雅琴,等. 梔子化学成分研究[J]. 中药材,2013,36(2):225-227.
- [7] 廖辉,王林,单晓庆,等. 梔子中五个环烯醚萜苷的研究[J]. 西南民族大学学报,2009,35(6):1228-1232.
- [8] 吴莎,刘启安,吴亚男,等. 近红外光谱对热毒宁注射液梔子萃取过程中的可行性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(1):53-56.
- [9] 陈军辉,谢明勇,傅博强,等. 西洋参中无机元素的主成分分析和聚类分析[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(7):1326-1329.
- [10] 张强,陈秋生,李波,等. 不同产地金银花无机元素的主成分分析和聚类分析[J]. 辽宁中医杂志,2014,41(11):2426-2429.

[责任编辑 刘德文]