

不同产地栀子的 UPLC 指纹图谱

吴亚超¹, 刘佩文², 李德坤³, 张文生¹, 赵万顺¹, 鞠爱春^{3*}, 叶正良^{4*}

(1. 天士力制药集团股份有限公司, 天津 300410; 2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193;
3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402; 4. 天士力控股集团有限公司, 天津 300410)

[摘要] 目的:建立不同产地栀子的 UPLC 指纹图谱,为其质量控制提供比较全面快速的评价方法。方法:实验对 26 批不同产地的栀子和 1 批水栀子样品进行 UPLC 指纹图谱的检测,采用 ACQUITY UPLCHSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),乙腈-0.05% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱,流速 0.4 mL·min⁻¹,检测波长 265 nm,采用相似度分析,聚类分析和主成分分析方法对 27 批样品的指纹图谱进行分析。结果:建立了 26 批栀子样品的共有图谱,确定了 23 个共有峰,对 8 个峰进行了指认,26 批栀子与对照图谱相似度 >0.96,栀子对照图谱与水栀子相似度为 0.935,聚类分析在已有样本间也可以将水栀子与栀子分开,主成分分析结果江西产栀子水平较高,质量较一致。结论:该实验建立的栀子 UPLC 指纹图谱可以为栀子的质量控制提供科学的评价。

[关键词] 栀子; 超高压液相色谱; 指纹图谱; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析

[中图分类号] R284.1; R2-03; R255 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0074-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020074

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1818.012.html>

[网络出版时间] 2017-11-02 18:18

UPLC Fingerprint of Gardeniae Fructus from Different Origins

WU Ya-chao¹, LIU Pei-wen², LI De-kun³, ZHANG Wen-sheng¹, ZHAO Wan-shun¹,
JU Ai-chun^{3*}, YE Zheng-liang^{4*}

(1. *Tasly Pharmaceutical Group Company Limited, Tianjin 300410, China;*
2. *First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;*
3. *Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 300402, China;*
4. *Tasly Holding Group Company Limited, Tianjin 300410, China*)

[Abstract] **Objective:** To establish the UPLC fingerprints of Gardeniae Fructus from different origins, and provide a more comprehensive and rapid evaluation method for the quality control of Gardeniae Fructus. **Method:** The batches of Gardeniae Fructus from different origins and 1 batch of *Gardenia jasminoides* var. *grandiflora* were analyzed by UPLC fingerprints by using an ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), with acetonitrile-0.05% phosphoric acid as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 265 nm. The similarity analysis, cluster analysis and principal component analysis were used to evaluate the fingerprints of the 27 batches of samples. **Result:** The common fingerprints for the 26 batches of Gardeniae Fructus samples were established, among which 23 peaks were common fingerprint peaks, and 8 main compounds were identified. The similarity between the fingerprint of 26

[收稿日期] 20170710(004)

[第一作者] 吴亚超,在读硕士,从事中药学和药物分析研究,Tel:15822540973,E-mail:1063644928@qq.com

[通信作者] *鞠爱春,高级工程师,Tel:022-86342096,E-mail:juach@tasly.com;

*叶正良,博士,研究员,Tel:022-86342066,E-mail:yezl@tasly.com

batches of Gardeniae Fructus and the control fingerprint was more than 0.96, and the similarity between the control fingerprint and the fingerprint of *G. jasminoides* var. *grandiflora* was 0.935. Gardeniae Fructus and *G. jasminoides* var. *grandiflora* between the existing samples can also be separated by cluster analysis. Principal component analysis showed a higher level of Gardeniae Fructus from Jiangxi, and the quality was basically the same.

Conclusion: The UPLC fingerprint can provide a scientific evaluation for the quality control of Gardeniae Fructus.

[Key words] Gardeniae Fructus; UPLC; fingerprint; similarity analysis; cluster analysis; principal component analysis

栀子采收期为 9~11 月份,果实呈红黄色^[1],味苦,寒,归心、肺、三焦经。最早记载于《神农本草经》,有降血糖和血脂、抗氧化、炎症、病原体、护肝等^[2-4]多种药理活性。栀子中主要含有环烯醚萜苷、有机酸脂、黄酮类以及二萜色素等成分^[5-7],在中药现代化的过程中,中药的质量控制标准直接影响到中药的国际化问题。人们对药材化学成分的定量检测正在逐渐深入,但尚不能完整地表征药材内在化学成分质量,指纹图谱法以其能全面、系统地中药材进行多组分分析,克服了单组分定量分析的缺点^[8]。尤其“中药指纹图谱超信息特征数字化评价系统”软件开发后^[9],指纹图谱技术正在逐渐向多指标成分定量定性分析方向发展^[10]。闫光军等^[11-12]分别对栀子中的有机酸类成分和水溶性成分建立了 HPLC 指纹图谱,龚宁波等^[13-14]分别建立了栀子的傅里叶指纹图谱和毛细管电泳指纹图谱。本实验运用中药指纹图谱技术,建立了栀子的主要成分的 UPLC 指纹图谱,使用相似度分析和聚类分析对不同产地栀子样品进行评价,以期对中药材质量研究提供借鉴作用。

1 材料

ACQUITY UPLC™ 超高效液相色谱仪(包括 TUV 检测器,四元高压泵系统,自动进样器,Empower3.0 色谱工作站,柱温箱和在线脱气系统,数据采集系统,美国 Waters 公司),Milli-Q 型纯水仪(美国 Millipore 公司);XP6 型微量天平和 XS204 型分析天平(美国 Mettler Toledo 公司),KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

西红花苷 I (批号 111588-201202,纯度 91.1%),西红花苷 II (批号 111589-201304,纯度 92.4%),绿原酸(批号 110753-201314,纯度 96.6%),栀子苷(批号 110749-201316,纯度 97.5%)均购自中国食品药品检定研究院;山栀苷(批号 15030421,纯度 98%)购自 Shanghai Tauto Biotech Co Ltd;栀子新苷、栀子苷酸、羟异栀子苷由鲁南制药集团刘武占老师提供经峰面积归一化法测

定,光度分别为 95%,98%,98%。磷酸色谱纯(天津市光复精细化工研究所),色谱级乙腈、甲醇(德国 Merck 公司)。

栀子样品分别由沪漕饮片厂、金木药业集团等提供,所有栀子样品均由南京农业大学郭巧生教授鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实,各产地样品见表 1。S27 为产自江西的水栀子,作为伪品,经常出现在市场流通过程中。

表 1 栀子样品的来源及产地

Table 1 Origin of Gardeniae Fructus samples

No.	省份	地区	No.	省份	地区
S1	江西	樟树 1	S14	江西	金溪
S2	江西	樟树 2	S15	湖南	长沙
S3	江西	南昌	S16	江西	永丰
S4	江西	吉安	S17	广西	柳州
S5	江西	宜春	S18	四川	广元
S6	江西	抚州	S19	浙江	台州
S7	湖南	永州	S20	浙江	金华
S8	四川	成都	S21	陕西	西安
S9	安徽	亳州	S22	四川	巴中
S10	湖北	武汉	S23	江苏	南京
S11	福建	泉州	S24	江西	乐安
S12	福建	福鼎	S25	江西	崇仁
S13	河南	南阳	S26	江苏	常州

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 称取过 3 号筛的栀子粉末约 0.1 g,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加入 57% 甲醇,超声提取 16 min(功率 150 W,频率 40 kHz),加入 57% 甲醇适量定容至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,备用。

2.2 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水(B),梯度洗脱(0~0.5 min,5% A; 0.5~1 min,5%~10% A;1~4 min,10%~11% A; 4~7 min,11%~21% A;7~10 min,21%~24% A;

10~11 min, 24%~30% A; 11~14 min, 30%~40% A; 14~15 min, 40%~100% A), 检测波长 265 nm, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 2 μL。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度考察 取 S7 号样品按照 2.1 项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 各共有峰相对峰面积 RSD 在 3% 以内且各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.5%; 将 6 次进样图谱导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.1) 软件进行处理, 与对照图谱相似度均 > 0.99, 表明精密度良好。

2.3.2 重复性考察 分别取 S7 号样品 6 份, 按照 2.1 项下方法制备供试品溶液 6 份, 分别进样分析, 测得各共有峰的相对峰面积 RSD 在 3% 以内, 各共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.5%; 将 6 份样品图谱导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.1 版) 软件进行处理, 与对照图谱的相似度均 > 0.99, 说明所用方法重复性良好。

2.3.3 稳定性考察 取 S7 号样品按照 2.1 项下方法制备供试品溶液 1 份, 分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样检测, 测得各共有峰的相对峰面积 RSD < 3%, 各共有峰的相对保留时间 RSD < 0.5%; 将样品图谱通过国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.1 版本) 软件进行处理, 与对照图谱的相似度均 > 0.99, 说明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 耐用性考察 通过轻微调整色谱柱的柱温(29, 30, 31 ℃), 流速(0.35, 0.40, 0.45 mL·min⁻¹), 流动相中磷酸比例(0.045%, 0.050%, 0.055%), 实验室的温度(22, 24, 26 ℃), 湿度(30%, 40%, 50%) 对色谱条件进行系统耐用性考察。测得各共有峰的相对峰面积 RSD 均 < 3%, 相对保留时间 RSD 均 < 3%; 将各条件下所得图谱通过国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.1 版) 软件进行处理, 与对照图谱的相似度均 > 0.99, 说明液相方法耐用性良好。

2.4 样品测定及栀子指纹图谱的建立 取 26 批不同产地栀子样品按照 2.1 项下方法制备成供试品溶液, 于 2.2 项色谱条件下进行检测。将 26 个色谱图统一积分后数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.1 版) 软件进行处理。S7 号样品的色谱峰分离度和峰形较好, 基线平整, 因此选择该样品图谱做为参照指纹图谱。为防止极端数据对分析结果的影响, 选择平均数法作为

对照指纹图谱的生成方法, 使用多点校正的方法对色谱峰进行全谱峰匹配, 见图 1, 并生成对照指纹图谱(R)。

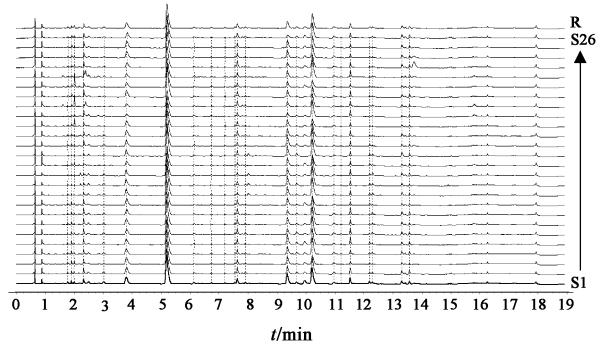


图1 26批栀子叠加 UPLC

Fig.1 UPLC fingerprint of Gardeniae Fructus

以第 S1 批药材图谱作为参照谱进行指纹匹配, 其中共有色谱峰 23 个, 见图 2。通过液质联用技术和对照品的比对指认了 23 个峰中的 8 个峰, 1 号峰为栀子新苷峰(1.782 min), 2 号峰为山栀子苷峰(1.911 min), 3 号峰为栀子苷酸峰(2.003 min), 4 号峰为羟异栀子苷峰(2.331 min), 6 号峰为绿原酸峰(3.805 min), 7 号峰为栀子苷峰(5.201 min), 14 号峰为西红花苷 I(9.355 min), 15 号峰为西红花苷 II 峰(9.676 min)。其中 7 号峰栀子苷分离度好, 峰位居中, 是 2015 年版《中国药典》对栀子规定的指标性成分且含量较高, 故以其作为参照峰计算其余各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

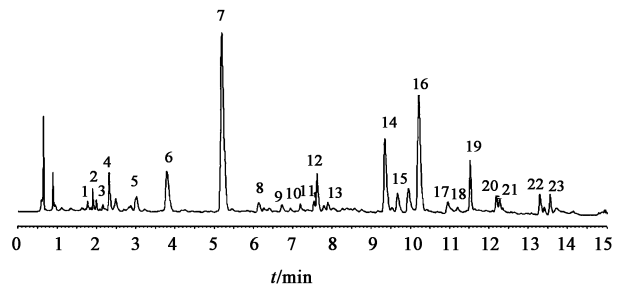


图2 栀子药材的共有模式

Fig.2 Total pattern diagram of Gardeniae Fructus

2.5 栀子指纹图谱的效果评价

2.5.1 相似度评价 在上述数据处理的基础上, 利用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.1 版) 软件对 26 批栀子进行相似度评价, 结果见表 2, 相似度均 > 0.96 说明栀子样品相互之间相似度较好。将生成的栀子的对照图谱与 S27 号水栀子样品进行相似度比较结果为 0.935。

2.5.2 聚类分析 将 1 批水栀子和 26 批栀子的指

表 2 栀子指纹图谱相似度评价

Table 2 Similarity of Gardeniae Fructus using fingerprint chromatography

No.	相似度	No.	相似度	No.	相似度
S1	0.994	S10	0.995	S19	0.966
S2	0.997	S11	0.993	S20	0.979
S3	0.980	S12	0.990	S21	0.969
S4	0.997	S13	0.990	S22	0.969
S5	0.993	S14	0.995	S23	0.972
S6	0.975	S15	0.983	S24	0.995
S7	0.993	S16	0.997	S25	0.987
S8	0.983	S17	0.973	S26	0.987
S9	0.978	S18	0.979	S27	0.935

纹图谱中的 23 个共有峰的峰面积相对于称样量进行量化,形成 23 × 27 阶数据矩阵,导入 SPSS 13.0 软件进行 Q 型聚类分析。运用组间连接法进行系统聚类分析,其中样品间距离的计算采用欧氏距离法,聚类结果见图 3。

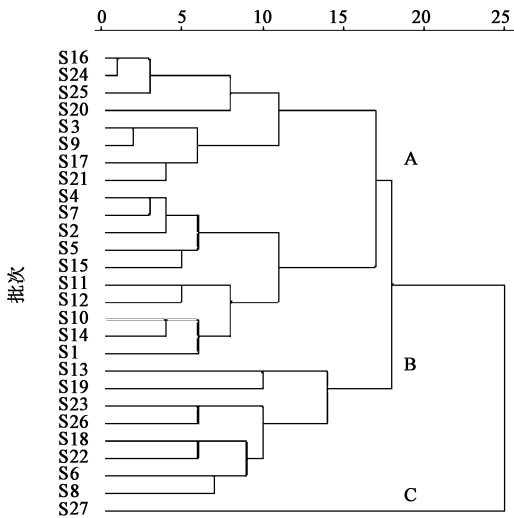


图 3 栀子指纹谱聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of Gardeniae Fructus fingerprint

当判别距离为 25 时通过聚类发现 S27 号样品水栀子单独为一类 C,其他各产地栀子样品聚为一类。当判别距离为 18 剩余 26 批栀子可以分为 A, B 两部分,其中 A 部分样品除 S17 和 S21 共 2 批栀子其余均为江西产栀子及江西周边省份产栀子,另外除 S6 号江西抚州产栀子外其余江西产栀子均在 A 部分,说明江西产栀子质量较一致。

2.5.3 主成分分析 通过 SPSS 13.0 软件对量化后的共有峰峰面积进行标化处理,对 26 批样品图谱的 23 个共有峰进行主成分分析,求出相关矩阵的方

差和特征值,见表 3,4。前 5 个因子的累积方差贡献率达到 83.949%,特征根大于 1,可以代表栀子指纹图谱中 23 个共有峰的大部分信息。

表 3 主成分特征值及方差

Table 3 Eigenvalue and total variance of principal component

主成分	特征根值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	6.461	28.090	28.090
2	4.873	21.185	49.275
3	4.150	18.044	67.320
4	2.401	10.439	77.759
5	1.424	6.190	83.949

表 4 主成分载荷矩阵

Table 4 Component matrix

共有峰号	成分 1	成分 2	成分 3	成分 4	成分 5
1	0.401 0	0.541 2	0.231 8	0.516 4	-0.309 8
2	0.083 3	0.644 6	0.032 4	0.563 5	-0.121 9
3	-0.585 9	0.216 0	-0.369 8	-0.198 1	0.257 5
4	0.403 2	0.557 6	0.007 3	0.529 1	-0.313 4
5	0.880 7	-0.359 5	0.165 1	0.044 5	-0.067 9
6	0.107 2	0.450 7	0.812 1	0.150 7	0.184 5
7	0.135 2	-0.274 0	0.631 6	0.408 5	0.334 0
8	0.723 9	-0.408 5	-0.419 1	0.137 8	-0.156 2
9	-0.200 4	-0.512 4	-0.244 0	0.684 6	0.331 1
10	0.097 1	-0.207 6	0.854 9	0.010 3	-0.017 3
11	0.291 8	0.898 5	-0.132 9	-0.000 9	0.223 4
12	0.328 8	0.767 5	0.062 5	-0.288 0	0.276 2
13	0.451 9	0.598 7	-0.114 4	-0.380 8	0.455 9
14	0.110 3	-0.135 4	0.900 5	-0.136 8	-0.122 6
15	0.790 7	-0.200 6	0.191 4	-0.158 8	0.157 4
16	0.758 0	-0.550 8	-0.133 2	-0.052 1	-0.201 1
17	0.487 9	0.707 5	0.110 9	0.039 6	-0.093 6
18	0.730 4	0.143 6	-0.422 1	-0.153 3	-0.093 6
19	0.710 0	-0.033 0	-0.168 2	-0.250 9	-0.227 5
20	0.147 9	-0.352 4	0.770 9	-0.243 4	0.103 4
21	0.810 2	-0.086 1	0.009 9	-0.406 5	-0.035 2
22	0.714 2	-0.227 1	-0.051 7	0.279 0	0.502 3
23	0.578 4	-0.323 3	-0.437 2	0.391 5	0.340 6

对主成分载荷值进行计算,得出各主成分的线性模型:成分综合总得分 = 0.161X₁ + 0.126X₂ - 0.091X₃ + 0.141X₄ + 0.092X₅ + 0.175X₆ + 0.107X₇ + 0.006X₈ - 0.035X₉ + 0.079X₁₀ + 0.141X₁₁ + 0.132X₁₂ + 0.114X₁₃ + 0.076X₁₄ + 0.098X₁₅ + 0.006X₁₆ + 0.154X₁₇ + 0.05X₁₈ +

$0.038X_{19} + 0.047X_{20} + 0.063X_{21} + 0.116X_{22} + 0.046X_{23}$, 综合得分越高说明质量越好。

江西产栀子整体评分较高,水平较好,其中江西樟树产栀子评分最高,质量最好,河南南阳、浙江台州、四川广元、四川巴中和陕西产栀子评分较低,水平较差。

3 讨论

本实验分别对色谱条件中的检测波长及流动相进行了考察。考察了乙腈-磷酸、乙腈-水两种流动相体系,发现以乙腈-水为流动相,样品的分离效果较差;以乙腈-0.05%磷酸为流动相图谱效果最佳。对238,265,330,440 nm不同波长进行考察,发现在265 nm下,图谱的色谱峰信息较为全面故选择265 nm作为检测波长。

本实验依次运用相似度分析,聚类分析和主成分分析方法对栀子类样品UPLC指纹图谱进行分析。由相似度评价结果发现,各产地栀子样品间相似度均>0.96,相似度良好,生成的对照图谱有较好的代表性,使用生成的栀子对照图谱与水栀子图谱进行比较相似度为0.935,聚类分析时也发现水栀子单独聚为一类,栀子聚为一类,说明水栀子与栀子的化学成分虽然比较相近,但使用本实验建立的栀子UPLC指纹图谱在已有样本间还是可以将其区分开。

通过主成分分析结果可以看出几乎所有江西产栀子的质量都在平均水平以上,且聚类分析时除S6号抚州产栀子外其余栀子均在A类,说明江西产栀子质量较为一致,且水平较高。而评分较低的几批栀子S13,S19,S18,S22和S21,除S19样品外其余各产地均距江西较远,说明江西周边的土壤气候较适宜栀子化学成分的积累,有研究表明植物组织中萜类及有机酸类等次生代谢产物在中度干旱条件下含量升高,且栀子适宜生长于山地红壤地带,这是由于红壤有较好的维持氮素的能力,而非结构性碳水化合物增加可以提高萜类化合物等含碳次生代谢产物的产生^[15]。红土在中国主要分布于长江以南的低山丘陵区,包括江西、湖南两省的大部分地区,江西的降水年际化差别较大也可能是适宜栀子生长的原因。综上所述本实验结果表明江西产栀子水平整体较高,质量较一致,适宜作为医药企业的主

供应产地。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:231-232.
- [2] 姚冬冬,舒雯,杨蕾,等. 栀子及其活性成分栀子苷防治糖尿病作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1368-1373.
- [3] Debnath T, Park P J, Nath N, et al. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts [J]. Food Chem,2011,128(3):697-703.
- [4] 朱江,蔡德海,芮菁. 栀子的抗炎镇痛作用研究[J]. 中草药,2000,31(3):198-200.
- [5] 高凤阳,高晓燕,卢建秋,等. HPLC测定栀子中色素类化合物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):68-69.
- [6] 于洋,高昊,戴毅,等. 栀子属化学成分的研究进展[J]. 中草药,2010,41(1):148-153.
- [7] 张忠立,左月明,杨雅琴,等. 栀子中的黄酮类化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):79-81.
- [8] 韩晔华,霍凤飞,杨悠悠,等. 中药指纹图谱研究的某些进展与展望[J]. 色谱,2008,26(2):142-152.
- [9] 孙国祥,侯志飞,董鸿晔,等. 超复方中药指纹图谱多维多息特征数字化评价方法研究[M]. 杭州:浙江大学出版社,2006:127-134.
- [10] 王雷琛,周婷婷,范国荣. 中药栀子中指标性成分定量分析在其质量评价中的应用[J]. 药学服务与研究,2010,10(4):286-288.
- [11] 闫光军,范建伟,苏瑞强,等. 不同采收期栀子有机酸类成分HPLC指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(11):39-41.
- [12] 罗光明,陈岩,张晓云,等. 不同品种及产地栀子水溶性成分指纹图谱研究[J]. 中成药,2008,30(4):475-479.
- [13] 龚宁波,郑笑为,王钢力. 中药材栀子的X射线衍射傅立叶指纹图谱鉴定研究[J]. 现代仪器,2007,13(3):22-31.
- [14] 侯志飞,孙国祥,刘唯芬. 栀子的毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中成药,2006,28(11):1561-1564.
- [15] 阎秀峰,王洋,李一萌. 植物次生代谢及其与环境的关系[J]. 生态学报,2007,27(6):2554-2562.

[责任编辑 顾雪竹]