

在线紫外光谱对栀子及其炮制品 HPLC 指纹图谱的定性研究

侯志飞¹, 于文国¹, 王刚¹, 陈晶¹, 孙国祥^{2*}

(1. 河北化工医药职业技术学院, 石家庄 050026; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:对栀子及其炮制品 HPLC 指纹图谱指纹峰进行定性归属研究。方法:采用反相高效液相色谱法,使用 CenturySIL C₁₈ BDS 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),以 1% 醋酸水-1% 醋酸乙腈为流动相,低压线性梯度洗脱,检测波长 265 nm,柱温(30.0 ± 0.15)℃,进样量 5 μL,测定栀子及其炮制品的 HPLC 指纹图谱,并应用 DAD 检测器记录指纹峰在线紫外光谱。结果:以栀子苷峰为参照物峰,确定 35 个共有峰,根据各指纹峰紫外光谱特点进行定性归属,并计算栀子及其炮制品中各类指纹峰的面积归一化值。结论:环烯醚萜苷类、有机酸酯类和西红花苷类成分是栀子的主要成分,但在不同产地栀子中各类成分所占比例有一定差异,栀子经炮制后各类成分所占比例也发生了变化。

[关键词] 在线紫外光谱; 指纹峰定性归属; 栀子及其炮制品; 高效液相色谱指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0098-04

[doi] 10.11653/syfj2013110098

Study on Qualitative Belonging of Fingerprint Peaks of HPLC Fingerprints for Gardeniae Fructus and the Prepared Medical Materials

HOU Zhi-fei¹, YU Wen-guo¹, WANG Gang¹, CHEN Jin¹, SUN Guo-xiang^{2*}

(1. Pharmaceutical Engineering Department, Hebei Chemical and Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China;

2. College of pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the belonging of fingerprint peaks of HPLC fingerprints for Gardeniae Fructus and the prepared medical materials. **Method:** The chromatographic fingerprints were obtained by injecting the sample solution each time on a CenturySIL C₁₈ BDS column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) with the gradient elution solvent system composed of 1% acetate acid -water and 1% acetate acid -acetonitrile. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was maintained at (30 ± 0.15)℃ and the DAD detection wavelength was set at 265 nm. **Result:** 35 co-possessing peaks were selected as the fingerprint peaks by taking Geniposide peak as the reference peak. The fingerprint peaks were classified according to the characters of their UV-spectrum. The normalization value of fingerprint peak of Gardeniae Fructus and the prepared medical materials were calculated. **Conclusion:** The iridoid glycosides, organic acids and saffrons were the main compositions in Gardeniae Fructus, but their proportion varied among the crude drugs from different areas and their proportion also varied as they were prepared in different conditions.

[Key words] UV-spectrum; qualitative belonging; Gardeniae Fructus and the prepared medical materials; HPLC digital fingerprint

[收稿日期] 20120723(015)

[基金项目] 河北省中医药管理局科研项目(2011109)

[第一作者] 侯志飞, 硕士, 讲师, 从事中药化学成分及质量标准研究, Tel: 0311-85110165, E-mail: houzhifei1982@163.com

[通讯作者] * 孙国祥, 博士, 教授, 从事中药指纹图谱研究, Tel: 024-23986286, E-mail: gxswmws@163.com

中药指纹图谱技术是国内外公认的鉴别中药品种和评价中药质量的最有效手段^[1],文献中有很多关于中药材及中药制剂指纹图谱的报道,由于药材成分不同及色谱条件的差异,其指纹峰的数目从几个到几十个不等,目前一般通过对照品定位实验指认少数指纹成分^[3]。对中药 HPLC 指纹图谱指纹峰进行化学成分分析的最好方法是通过 LC-MSⁿ 法获得各峰的多级碎片信息,进行质谱解析,再结合相关文献资料和对照品定性等方法进行归属^[2],对于一些未知的化学成分,还需 NMR, IR 等仪器手段佐助。但相比之下, HPLC-DAD 更便于普及应用。本文以栀子及其炮制品 HPLC 指纹图谱为例,应用在线紫外光谱对指纹峰进行定性归属研究,可衡量不同产地栀子药材及其炮制品中各类指纹成分的含量,为栀子药材的质量控制提供参考。

1 材料

Agilent 1100 型液相色谱仪(配有二极管阵列检测器、低压四元梯度泵、在线脱气装置、自动进样器), ChemStation 工作站(Agilent 科技有限公司)。KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), RE52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), Sartorius-BS110S 型分析天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

栀子苷(批号 110749-200410, 中国药品生物制品检定所), 乙腈(色谱纯, 山东禹王实业有限公司), 冰醋酸(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心), 其他试剂均为分析纯, 所用水为去离子水。

收集了 10 批栀子药材。栀子仁、栀子皮、炒栀子、焦栀子、栀子炭均由栀子药材(产自 S2 贵州铜仁)自制。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 样品供试液制备 栀子药材或栀子炮制品于 60 °C 干燥 40 min, 粉碎后取约 2.5 g, 精密称定, 加水 50 mL, 回流提取 2 h, 滤过, 残渣加水 30 mL, 继续回流 1.5 h, 合并两次滤液, 减压浓缩至 20 mL, 加乙醇至 80%, 冷处避光放置、醇沉 24 h, 滤除沉淀,

减压回收乙醇至无醇味, 残液再用水定容至 25 mL, 摇匀, 即得。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取栀子苷对照品 5.0 mg, 置 25 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件 CenturySIL C₁₈ BDS 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相 A-水(含 1% 醋酸), B-乙腈(含 1% 醋酸), 低压线性梯度洗脱(0 ~ 9 min, 5% ~ 5% B; 9 ~ 22 min, 5% ~ 10% B; 22 ~ 30 min, 10% ~ 12.5% B; 30 ~ 45 min, 12.5% ~ 30% B; 45 ~ 50 min, 30% ~ 36% B; 50 ~ 75 min, 36% ~ 86% B); 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温(30 ± 0.15) °C, 进样量 5 μL, 紫外检测波长 265 nm。

2.3 指纹图谱方法学考察 经指纹图谱方法学考察, 各项指标均符合要求^[4]。

2.4 栀子及其炮制品 HPLC 指纹图谱测定 按 2.2 项条件分别将栀子药材及栀子炮制品供试液在 HPLC 仪上进样分析, 比较分析并以出现率 100% 计, 确定 35 个共有峰^[3]。将栀子苷对照品溶液和栀子样品供试液分别进样 5 μL。对比保留时间及在线紫外光谱图可知栀子苷峰在 23.6 min 左右。由于栀子苷峰与相邻峰分离很好, 在测定时比较稳定, 峰面积较大, 因此选作参照物峰, 标号为 18(S), 其他共有峰依次为 1, 2, 3, …, 35, 见图 1。

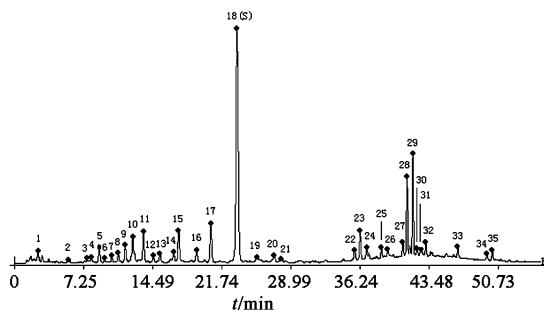


图 1 栀子 HPLC 指纹图谱标号

2.5 栀子共有指纹峰的紫外吸收光谱类型 栀子共有指纹峰在线紫外光谱见图 2, 根据光谱特点将其分类并通过对照品指认及查阅文献^[5-10], 初步判断了各组分的归属类别见表 1。

表 1 栀子共有指纹峰的紫外吸收光谱类型

类别	峰号	λ_{\max}/nm	UV 图	发色团结构
环烯醚萜苷	2, 6, 7, 9, 10, 1, 13, 14, 17, 18, 20	239	No. 18	图 3(A)
有机酸酯	15, 16, 25, 26, 27, 32	246, 329	No. 15	图 3(B)
西红花苷	28, 29, 30, 31, 34, 35	250 ~ 260, 320 ~ 340, 400 ~ 500	No. 30	图 3(C)
其他	1, 3, 5, 8, 12, 24	250	No. 12	未知

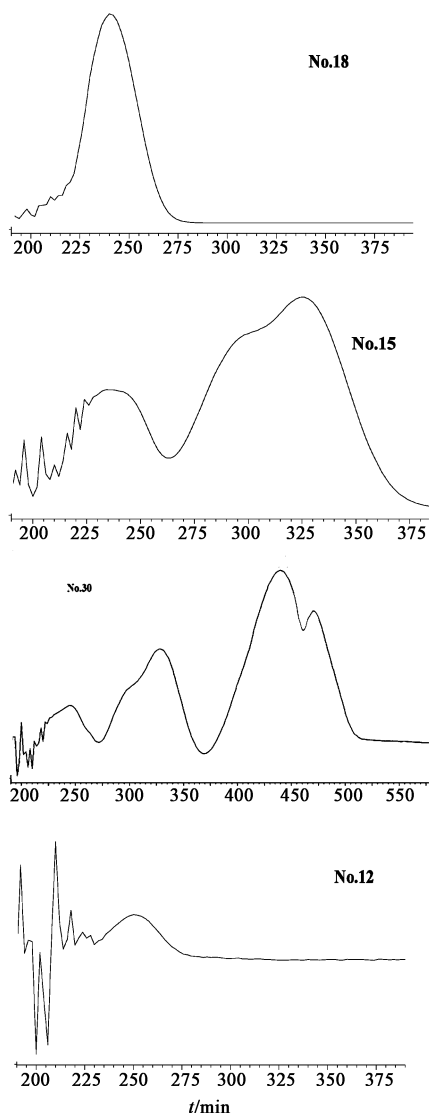


图 2 栀子 HPLC 指纹图谱中指纹峰典型紫外吸收光谱

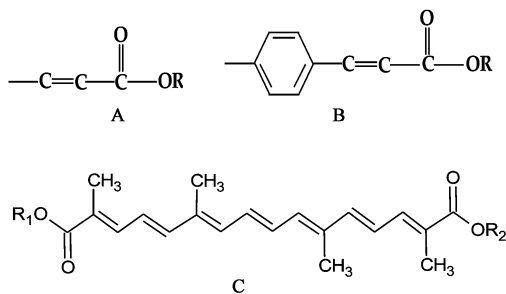


图 3 栀子中化合物的典型发色团结构

第 1 类是环烯醚萜苷类色谱峰(2,6,7,9,10,11,13,14,17,18,20 号峰), λ_{\max} 239 nm, 见 No. 18; 第 2 类是有机酸酯类色谱峰(15,16,25,26,27,32 号峰), λ_{\max} 246,329, 300 nm 处有特征肩峰出现, 见 No. 15; 第 3 类是西红花苷类色谱峰(28,29,30,31,34,35 号峰), λ_{\max} 250 ~ 260, 320 ~ 340, 400 ~ 500 nm, 其中 250 ~ 260 nm 吸收最弱, 400 ~ 500 nm 吸收最强, 见 No. 30。

2.6 栀子及炮制品各类指纹峰的面积归一化值按归一化法(忽略不同物质响应值的差异)分别计算 10 批栀子及炮制品指纹图谱中各类指纹峰的归一化值, 见表 2,3。

从表 2 可以看出, 10 批栀子中, 环烯醚萜苷类色谱峰的峰面积归一化值均为最大, 约占总峰面积的 54.7%; 有机酸酯类色谱峰和西红花苷类色谱峰的峰面积归一化值次之, 其中有机酸酯类色谱峰的峰面积和约占总峰面积的 10.5%, 西红花苷类色谱峰的峰面积和约占总峰面积的 18.7%。这 3 类成分 是 栀 子 药 理 作 用 的 主 要 物 质 基 础, 但 在 不 同 产 地

表 2 10 批栀子各类指纹峰的面积归一化值

ΣA_i , %	S1 河南唐河	S2 贵州铜仁	S3 安徽东至	S4 河南桐柏	S5 云南威信	S6 云南红河	S7 浙江 五凤乡	S8 四川达县	S9 江西金溪	S10 广西鹿寨	Mean
环烯醚萜苷类	48.8	59.3	56.9	52.0	50.6	60.0	56.7	56.8	51.6	54.0	54.7
有机酸酯类	9.4	8.0	15.9	12.7	9.3	9.5	8.2	12.2	8.9	10.4	10.5
西红花苷类	23.1	19.5	10.0	19.5	22.5	20.0	21.4	18.3	18.4	14.4	18.7
第四类	8.0	6.6	7.1	7.5	8.0	5.3	6.5	6.3	10.1	8.9	7.4
未知	10.8	6.6	10.1	8.3	9.6	5.2	7.2	6.4	11.0	12.3	8.8

表 3 栀子炮制品各类指纹峰的面积归一化值

ΣA_i , %	栀子仁	栀子皮	生栀子	炒栀子	焦栀子	栀子炭
环烯醚萜苷类	52.7	41.0	59.3	54.4	52.3	59.7
有机酸酯类	4.5	12.8	8.0	9.5	10.2	7.1
西红花苷类	29.6	15.1	19.5	17.4	10.3	7.8
第四类	5.5	17.9	6.6	9.4	17.9	8.9
未知	7.7	13.3	6.6	9.3	9.3	16.6

栀子中各类成分所占比例各不相同。1,3,5,8,12,24号峰是第4类, λ_{\max} 250 nm 见 No.12,峰面积和约占总峰面积的8.8%,但深入的结构判断仍需进一步的研究。其余的组分(4,19,21,22,23,33)类别为未知。

从表3可以看出,环烯醚萜苷类成分在栀子仁中的含量高于栀子皮中的含量,栀子经加热炮制后随炮制条件加剧,环烯醚萜苷类成分含量呈先降低后升高趋势;有机酸酯类成分在栀子皮中的含量远高于栀子仁中的含量,栀子经加热炮制后随炮制条件加剧,有机酸酯类成分含量呈先升高后降低趋势;西红花苷类成分在栀子仁中的含量明显高于栀子皮中的含量,栀子经加热炮制后随炮制条件加剧,西红花苷类成分含量呈降低趋势。

3 讨论

环烯醚萜苷类、有机酸酯类和西红花苷类成分是栀子的主要成分,但在不同产地栀子中各类成分所占比例有一定差异,这与产地、气候、采收等都有一定关系。

栀子经炮制后各类成分所占比例也发生了变化,西红花苷类成分随炮制条件加剧含量减少,说明该类成分随温度升高结构被破坏。环烯醚萜苷类成分和有机酸酯类成分含量则分别出呈先降低后升高趋势和呈先升高后降低趋势,说明这2类成分在不同温度下结构被破坏或转变成同类化合物中其他指纹成分。

由于紫外吸收光谱是分子中外层价电子的跃迁而产生的,若同一类化合物结构相近,具有相同发色团,其紫外吸收光谱就具有相同的特点。因此在线紫外光谱不仅能对指纹峰的紫外吸收特性给以鲜明描述,还可按发色团类型对指纹峰进行定性归属。但在200~400 nm的近紫外区,只能观察 $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁,也就是说紫外光谱只适用于分析分子中具有不饱和结构的化合物。对于没有紫外吸收或紫外吸收较弱的成分,该方法的应用受到一定限制。

因中药自身的复杂性以及研究水平和仪器设备的限制,现有技术水平无法将所有指纹峰指认且没有足够的对照品对各指纹峰进行含量测定。在各类指纹图谱中,以HPLC-UV指纹图谱应用最为广泛,利用在线紫外光谱对指纹峰进行定性归属研究来考察结构相类似成分的总含量,不失为衡量各类指纹化学成分含量的一个较好方法,同时可为进一步进行中药炮制工艺考察及药理研究等提供了客观性的量化指标。

[参考文献]

- [1] 罗国安,王义明. 中药指纹图谱的分类和发展[J]. 中国新药杂志,2002,11(1):46.
- [2] 邓仕任,夏林波,董倩,等. 芫花药材的HPLC指纹图谱及ESI-MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):32.
- [3] 王黎明,梁建宁,黄晓燕,等. 灯盏花素分散片及灯盏花素原料的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):77.
- [4] 侯志飞,孙国祥. 栀子HPLC数字化指纹图谱相对定量方法研究[J]. 中成药,2009,31(3):329.
- [5] 彭密军,周春山,李宇萍. 高效液相色谱法同时测定栀子中3种活性成分[J]. 理化检验-化学分册,2003,39(8):448.
- [6] 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.
- [7] 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份[J]. 药学学报,2003,38(7):543.
- [8] 马希汉,张康健,尉芹,等. 从杜仲叶中提取绿原酸纯品的研究[J]. 西北林学院学报,1996,11(2):58.
- [9] 高凤阳,卢建秋,乔延江,等. 高效液相色谱法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):261.
- [10] 周素娣,周锦祥. 国产西红花化学成分的研究[J]. 中草药,1997,28(12):715.

[责任编辑 顾雪竹]