

栀子药材环烯醚萜类和西红花酸类成分 HPLC 指纹图谱研究

王莎,周小琴,司徒少金*,罗建明,刘顺国,陈育娟
(广药集团广州白云山明兴制药有限公司,广州 510250)

[摘要] 目的:建立栀子药材中环烯醚萜类和西红花酸类两大类主要成分的 HPLC 指纹图谱,为全面评价栀子药材质量和整体控制提供依据。方法:采用 Inertsil ODS-SP (4.6 nm×250 mm, 5 μm) 色谱柱,甲醇-0.1% 甲酸水变波长梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃。采用相似度评价软件(2004 药典版)对 10 批栀子商品药材指纹图谱进行相似度计算。结果:指纹图谱中共确立了 20 个共有峰,并通过与标准品比对,两个主峰分别鉴定为栀子苷和西红花苷-1,10 批栀子药材的相似度在 0.95~0.99。结论:该方法具有良好的精密度、重复性和稳定性,可较全面地反映栀子的化学成分,为有效控制该药材的内在质量提供了科学依据。

[关键词] 栀子;环烯醚萜类;西红花酸类;指纹图谱;高效液相色谱法
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)19-0085-04
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1139.012.html>
[网络出版时间] 2012-07-31 11:39

HPLC Fingerprint Analysis of Iridoids and Crocetin Derivatives in Gardenia Fructus

WANG Sha, ZHOU Xiao-qin, SITU Shao-jin*, LUO Jian-ming, LIU Shun-guo, CHEN Yu-juan
(Guangzhou Baiyunshan Mingxing Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510250, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC fingerprint of iridoids and crocetin derivatives in Gardenia Fructus (GF) for the evaluation of the intrinsic quality. **Method:** Chromatographic separation was carried out by an Inertsil ODS-SP column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) and gradient elution was performed by mobile phase containing MeOH and 0.1% formic acid aqueous solution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was maintained at 25 ℃, and the separated compounds were detected at a variable wavelength. The similarity evaluation software was adopted to analyze the similarities of 10 batches of commercial GF. **Result:** A consistent HPLC fingerprint pattern containing 20 common peaks was obtained and two major components were identified as geniposide and crocin-1, and the results of similarities of ten batches were range from 0.95 to 0.99. **Conclusion:** The established fingerprint method which reflect more chemical composition information of GF had good precision, reproducibility, stability, and could provide as an effective tool for the quality control of GF.

[Key words] Gardenia Fructus; iridoids; crocetin derivatives; fingerprint; HPLC

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功效,为清开灵系列制剂等名优中成药的重要原料药材^[1]。研究表明,栀子中存在较多且具

有较强药理活性的成分主要有两大类,即以栀子苷为代表的环烯醚萜类和西红花苷为代表的西红花酸类成分^[2-4]。为了从源头保证药品成品的质量,建立原药材全面的质量控制方法至关重要。本研究选

[收稿日期] 20120329(004)
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09201-201-07,2011ZX09401-404);广州市科技计划项目(2007Z1-E5035)
[第一作者] 王莎,工程师,从事新药开发,Tel:020-84333948,E-mail:wangsha0429@yahoo.com.cn
[通讯作者] *司徒少金,高级工程师,从事新药开发和项目管理,Tel:020-84333948,E-mail:shaojinst@163.com

择 10 批来自道地产区江西樟树的栀子商品药材,按照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[5]建立了栀子药材中环烯醚萜类和西红花酸类的变波长指纹图谱测定方法,为保证原药材的质量提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 高效液相系统为 Aglient 1100 HPLC system,包括具有在线脱气四元泵,自动进样器,紫外检测器, Inertsil ODS-SP 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), MUS/1006 型超声波提取器(深圳市现代超声实业有限公司), A&D ER-180A 型分析天平(日本 A&D 公司)。

1.2 试药 栀子苷(批号 110749-200714)、西红花苷-1(批号 111588-200501),均购于中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯(Merk 公司),甲酸为分析纯(广州市化学试剂厂),水为注射用水。

1.3 药材 10 批栀子药材均购自道地产区江西樟树,为本公司生产清开灵制剂原料药材,批号 110113, 110114, 110211, 110213, 110405, 110410, 110507, 110605, 110608, 110701。并经企业质量管理部门检验符合中国药典标准和企业内控标准。将 10 批栀子药材按顺序分别编号为 1~10 号,粉碎,备用。

2 方法与结果

2.1 溶剂制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称定栀子苷、西红花苷-1 对照品 4.0 mg 和 3.0 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成混标溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取栀子药材干燥粉末 0.1 g,精密称定,分别置具塞锥形瓶中,加入 80% 甲醇 25 mL,密塞,摇匀,称定质量,超声处理 40 min,放冷,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液即得。

2.2 色谱条件 Inertsil ODS-SP 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长程序设定为 0~30 min, 238 nm; 30.1~60 min, 440 nm。流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25℃,进样量 10 μL。流动相 甲醇(A 相), 0.1% 甲酸水溶液(B 相),梯度洗脱顺序见表 1。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度试验 取 1 号栀子药材,按 2.1.2 制备供试品溶液,连续进样 6 次,分别对共有峰的相对保留时间和峰面积比值进行考察,结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD < 1%,相对保留峰面积

表 1 流动相梯度变化

t/min	甲醇/%	0.1% 甲酸水溶液(v/v)/%
0	10	90
15	25	75
25	40	60
30	57	43
40	70	30
50	100	0
60	100	0

RSD < 3%,符合《技术要求》规定。

2.3.2 重复性试验 取 1 号栀子药材,平行制备 6 份供试品溶液,进样分析。结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD < 1%,相对保留峰面积 RSD < 3%,符合《技术要求》规定。

2.3.3 稳定性试验 取 1 号栀子药材制备供试品溶液,按 2.2 色谱条件分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进行测定。结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 1%,相对保留峰面积 RSD 小于 3%,表明栀子供试品溶液在 24 h 内稳定,符合《技术要求》规定。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 共有峰的标定 按 2.1.1 色谱条件进样分析对照品溶液,记录对照品色谱图。分别将 1~10 号样品制备为供试品溶液,按同样方法进样分析,记录色谱图。通过与对照品色谱图比较,确认样品中的 8 号峰为栀子苷,11 号峰为西红花苷-1(图 1)。由于栀子苷含量最高且较稳定,故将其定为参照峰(S 峰),计算其他各峰与 S 峰的相对保留时间(表 1),比较 10 批样品色谱图,确定共有峰 20 个(图 2)。

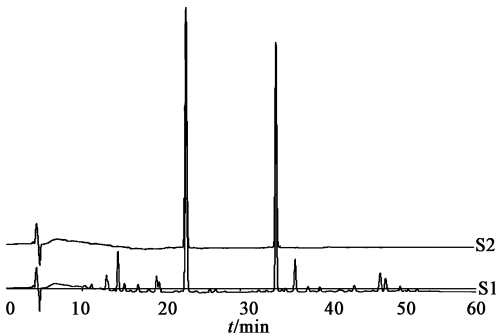


图 1 对照品(S2)与栀子样品(S1)

2.4.2 共有峰的相对峰面积 以栀子苷峰为参照峰,将各共有峰峰面积与同一图谱中参照峰的峰面积进行比较,其比值为各共有峰的相对峰面积,结果见表 2。

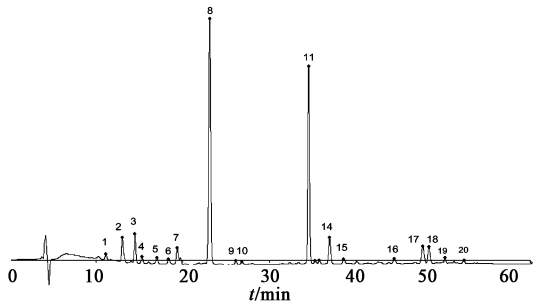


图 2 栀子样品 HPLC

2.4.3 非共有峰峰面积 计算非共有峰总面积占总峰面积的比值,结果表明其比值 <5%,符合《技术要求》规定。

2.4.4 指纹图谱相似度评价 采用中国药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价》软件(2004 年 A 版),将 10 批栀子药材图谱导入,以 1 号为参照图

谱,经多点校正和自动匹配后,以中位数法自动生成对照图谱。10 批药材的相似度分别为 0.997, 0.966, 0.985, 0.989, 0.991, 0.979, 0.957, 0.967, 0.973, 0.964,均在 0.95 以上,表明各批样品来源稳定,质量均一(图 3)。

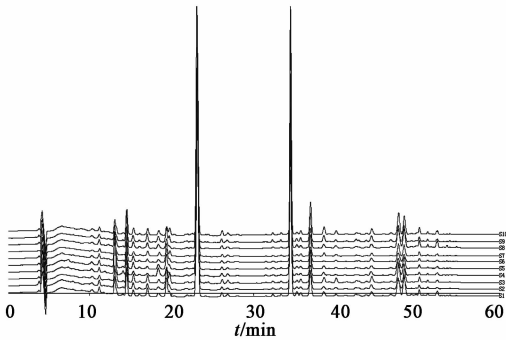


图 3 10 批栀子样品的指纹图谱

表 1 10 批样品共有峰相对保留时间

峰号	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10	平均值	RSD/%
1	0.484	0.483	0.484	0.484	0.483	0.483	0.484	0.484	0.483	0.484	0.484	0.107
2	0.564	0.564	0.565	0.566	0.566	0.565	0.565	0.564	0.565	0.565	0.565	0.131
3	0.628	0.628	0.628	0.629	0.629	0.628	0.627	0.628	0.628	0.628	0.628	0.090
4	0.662	0.662	0.663	0.663	0.663	0.662	0.663	0.663	0.663	0.663	0.663	0.073
5	0.737	0.737	0.737	0.737	0.737	0.737	0.737	0.738	0.737	0.737	0.737	0.043
6	0.795	0.795	0.796	0.795	0.795	0.795	0.798	0.796	0.795	0.796	0.796	0.121
7	0.839	0.838	0.839	0.839	0.839	0.839	0.839	0.839	0.839	0.839	0.839	0.038
s	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
9	1.131	1.131	1.131	1.132	1.132	1.131	1.129	1.130	1.131	1.130	1.131	0.081
10	1.161	1.161	1.161	1.162	1.162	1.162	1.159	1.161	1.161	1.160	1.161	0.081
11	1.493	1.493	1.491	1.494	1.494	1.494	1.490	1.491	1.493	1.495	1.493	0.108
12	1.526	1.526	1.525	1.527	1.527	1.527	1.523	1.524	1.527	1.528	1.526	0.102
13	1.547	1.547	1.545	1.547	1.547	1.548	1.543	1.545	1.548	1.548	1.547	0.107
14	1.597	1.598	1.596	1.598	1.598	1.599	1.594	1.596	1.598	1.599	1.597	0.098
15	1.668	1.668	1.667	1.668	1.668	1.669	1.666	1.668	1.668	1.671	1.668	0.077
16	1.920	1.920	1.919	1.920	1.920	1.916	1.916	1.919	1.920	1.923	1.919	0.106
17	2.061	2.061	2.061	2.061	2.061	2.062	2.057	2.061	2.062	2.065	2.061	0.094
18	2.092	2.092	2.090	2.093	2.093	2.093	2.086	2.090	2.093	2.095	2.092	0.119
19	2.172	2.173	2.170	2.174	2.174	2.173	2.167	2.170	2.173	2.175	2.172	0.112
20	2.268	2.270	2.266	2.271	2.271	2.270	2.263	2.266	2.269	2.272	2.269	0.125

表 2 10 批样品共有峰相对保留峰面积

峰号	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10
1	0.017	0.019	0.016	0.022	0.024	0.018	0.020	0.023	0.022	0.016
2	0.066	0.082	0.075	0.204	0.170	0.103	0.073	0.090	0.077	0.067
3	0.083	0.108	0.140	0.036	0.112	0.071	0.101	0.107	0.085	0.106

续表 2

峰号	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10
4	0.023	0.023	0.028	0.024	0.030	0.024	0.023	0.033	0.032	0.028
5	0.034	0.025	0.034	0.019	0.017	0.011	0.034	0.038	0.026	0.034
6	0.016	0.015	0.019	0.055	0.031	0.015	0.026	0.029	0.023	0.030
7	0.094	0.108	0.105	0.063	0.103	0.101	0.076	0.078	0.059	0.083
s	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	0.013	0.011	0.016	0.021	0.014	0.012	0.016	0.030	0.017	0.013
10	0.012	0.009	0.018	0.024	0.011	0.012	0.015	0.019	0.014	0.014
11	0.698	0.534	0.735	0.590	0.617	0.362	0.716	0.986	0.615	0.777
12	0.021	0.007	0.007	0.007	0.007	0.006	0.008	0.010	0.013	0.011
13	0.016	0.008	0.015	0.012	0.012	0.008	0.013	0.021	0.012	0.014
14	0.104	0.080	0.139	0.067	0.093	0.073	0.132	0.177	0.106	0.113
15	0.022	0.011	0.031	0.019	0.021	0.007	0.021	0.045	0.020	0.031
16	0.026	0.024	0.035	0.038	0.021	0.021	0.023	0.041	0.026	0.028
17	0.096	0.054	0.096	0.110	0.072	0.051	0.091	0.150	0.126	0.082
18	0.094	0.058	0.067	0.073	0.066	0.036	0.078	0.112	0.101	0.078
19	0.016	0.015	0.016	0.017	0.013	0.015	0.022	0.032	0.033	0.013
20	0.022	0.006	0.010	0.015	0.013	0.009	0.014	0.020	0.029	0.010

3 讨论

中药成分复杂多样,指纹图谱恰巧能较为全面地反应中药中所含化学成分的种类和数量。因此,其在中药的研究和质量控制方面越来越重要^[6],2010 年版《中国药典》一部已收录指纹图谱质量标准,如注射用双黄连。可见,中药指纹图谱技术已日趋成熟,并突显实用性。本研究建立的栀子中环烯醚萜类成分与西红花酸类两大主要成分的指纹图谱,重复性好,代表性强,操作简单,可行性强,可作为制药企业栀子药材质量评价的常规分析技术。

在检测波长的选定中,全波长(200 ~ 600 nm)扫描发现栀子苷在 240 nm 有最大吸收,而西红花苷在 442 nm 呈最大吸收,在 467 nm 处还有一肩峰。与参考文献^[7]所述基本一致。结合《中国药典》一部(2010 年版)和两类成分在该色谱条件下的洗脱顺序,确定前 30 min 检测波长为 238 nm,后 30 min 检测波长为 440 nm。

大部分研究多采用乙腈作为流动相的有机相,而本实验采用甲醇-0.1% 甲酸水为流动相,成本大大降低。梯度洗脱采用普通紫外检测器的可变波长功能,实现了最大吸收波长不同的两类物质的同时检测,且无需使用二极管阵列检测器,使检测更加稳定、方便,在实际的检验工作中应用性强。

10 批样品的相似度,均 > 0.95,说明在该地区的栀子药材质量基本一致。该产区的栀子药材为广州白云山明兴制药有限公司拳头产品清开灵系列制剂(注射液、口服液、胶囊和颗粒剂)的主要原料药之一,企业要求药材产地来源固定,质量稳定,采用本研究建立的指纹图谱方法对 10 批原料药材进行研究,结果表明栀子原料药材质量稳定可控,为最终成品的质量提供了可靠的保障。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010: 231.

[2] 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.

[3] 杨军宣,张海燕,赵成城,等. 栀子环烯醚萜苷治疗脑缺血损伤的作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(6): 277.

[4] 张海燕,邬伟魁,杨军宣,等. 栀子对心脑血管系统的作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):294.

[5] 国家食品药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S]. 2000.

[6] Liang Y, Xie P, Chau F. Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines[J]. J Sep Sci 2010, 33(3): 410.

[7] 毕志明,周小琴,汤丹,等. 内标校正法在中药栀子多成分同时定量分析中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(1): 50.

[责任编辑 顾雪竹]