HPLC 测定栀子中色素类化合物的含量

高凤阳，高晓燕*，卢建秋，乔延江
（北京中医药大学，北京 100029）

［摘要］ **目的**：建立栀子中西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ的含量测定方法。**方法**：采用 HPLC-DAD 法，Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm），流动相 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈梯度洗脱，流速 1 mL·min^{-1}，检测波长 440 nm。**结果**：西红花苷-Ⅰ在 10.272 ~ 256.8 mg·L^{-1}线性关系良好；平均回收率 96.68%，RSD 1.2%。西红花苷-Ⅱ在 2.544 ~ 63.6 mg·L^{-1}线性关系良好；平均回收率 102.94%，RSD 0.87%。**结论**：该方法可靠，重复性好，可作为栀子质量控制的进一步补充。

［关键词］ 栀子；高效液相色谱法；西红花苷-Ⅰ；西红花苷-Ⅱ
［中图分类号］ R284.1 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2012)17-0068-03
［网络出版地址］ http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1744.034.html
［网络出版时间］ 2012-07-04 17:44

Determination of the Concentration of Crocin-Ⅰ and Crocin-Ⅱ in *Gardenia* jasminoides by HPLC

GAO Feng-yang, *GAO Xiao-yan**, *LU Jian-qiu*, *QIAO Yan-jiang*
(*Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To establish the method for determination of crocin-Ⅰ and crocin-Ⅱ in the *Gardenia jasminoides*. **Method**: High performance liquid chromatography was applied on a Dikma Diamonsil C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column at temperature 30 ℃ with 0.1% formic acid-acetonitrile as the mobile phase in gradient elution for 30 min. The flow rate was 1.0 mL·min^{-1}, detected wavelength of 440 nm. **Result**: The sample quality of crocin-Ⅰ and crocin-Ⅱ with the peak area showed good linear relationship; the average recoveries were 96.68% (n = 6) and 102.94% (n = 6). **Conclusion**: The method is simple, accurate and reproducible; it can provide the basis of rational application, quality control and the standards for *G. jasminoides*.

［**Key words**］ *Gardenia jasminoides*; HPLC; crocin-Ⅰ; crocin-Ⅱ

栀子来源于茜草科植物栀子的干燥成熟果实[1]，具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒的功效。主要含有 3 类活性成分：环烯醚萜苷、有机酸及西红花素类色素成分。其中西红花素是珍稀中药西红花及栀子中共有的水溶性胡萝卜素类的活性成分，具有清热、保肝[2]、抗癌、降血脂[3]之功效，是一种集着色、营养、保健多功能为一体的天然植物色素。西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ是栀子中色素类的主要成分，目前报道的西红花苷类的含量测定方法主要为分光光度法[4]，薄层扫描法[5]及高效液相色谱法[6]。本研究采用高效液相色谱法对栀子中西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ的含量进行了测定，与已报道的西红花苷类含量测定方法[7]：保留时间西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ分别为 35.1，35.2 min，线性范围 0.142 ~ 1.775，0.026 ~ 0.325 mg·L^{-1}，精密度 RSD 分别为 1.52%，1.50%，重复性 RSD 1.68%，1.63% 相比，出峰时间明显缩短，线性范围广，精密度和重复性显著提高。本方法可作为栀子质量控制

［收稿日期］ 20120424(011)
［基金项目］ 国家“重大新药创制”科技重大专项(2010ZX09502-002)；国家自然科学基金项目(81173649/H2817)；北京中医药大学自主选题项目(0100601055)
［第一作者］ 高凤阳，在职硕士，从事中药分析与质量控制研究，Tel：010-64286301，E-mail：gfengy@sohu.com
［通讯作者］ *高晓燕，副教授，从事中药分析与质量控制研究，Tel：010-64286412，E-mail：gaoxiaoyan0913@sina.com

的进一步补充。

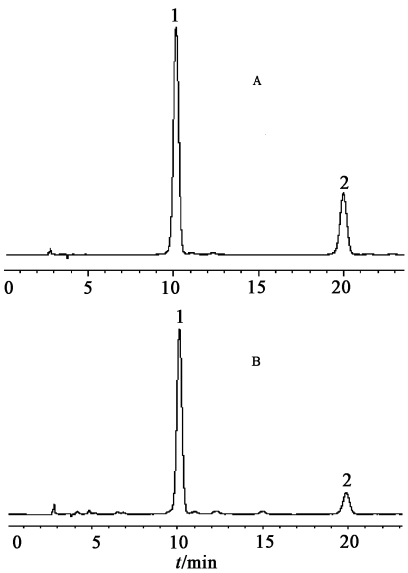
1 材料

Agilent 1100 系统,包括在线真空脱气机、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器。乙腈为色谱纯(德国默克公司),甲酸(美国 ROE 公司 HPLC 级试剂),高纯水来自 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore)。

栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 药材取自亚宝北中大(北京)制药有限公司,经北京中医药大学杨瑶珺副研究员鉴定。西红花苷-Ⅰ对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111588-200501)和西红花苷-Ⅱ对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111589-201103)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液,B 为 0.1% 甲酸-乙腈。梯度洗脱(0 ~ 6 min,25% ~ 25% B;6 ~ 16 min,25% ~ 26% B;16 ~ 17 min,26% ~ 27% B;18 ~ 30 min,27% ~ 31% B)。流速 1 mL·min^{-1},柱温 30 ℃,检测波长 440 nm。对照品和样品色谱图见图 1。



A. 对照品;B. 药材;1. 西红花苷-Ⅰ;2. 西红花苷-Ⅱ

图 1 栀子药材中 2 种成分的 HPLC

2.2 样品的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 称取栀子药材粉末(40 目)1.02 g,加 70% 甲醇 100 mL,超声提取 40 min,冷却后称定,用 70% 甲醇补足减失质量,摇匀,静置后取上清液过滤,即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 取西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ对照品适量,精密称定,加 70% 甲醇制成每 1 mL 含 0.256 8,0.063 6 mg 的溶液,即得。

2.3 标准曲线的绘制 精密吸取已配制好的对照品溶液 0.2,0.5,1,2,5 mL,分别置于 5 mL 棕色量瓶中,70% 甲醇稀释至刻度,每次进样 10 μL,按照上述色谱条件测定西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ的峰面积,以面积为纵坐标,进样浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果线性关系良好。西红花苷-Ⅰ:$Y = 56.371X - 14.435$ ($r = 0.999\ 9$);西红花苷-Ⅱ:$Y = 69.25X - 17.718$ ($r = 0.999\ 8$),西红花苷-Ⅰ质量浓度的线性范围为 10.272 ~ 256.8 mg·L^{-1},西红花苷-Ⅱ质量浓度的线性范围为 2.544 ~ 63.6 mg·L^{-1}。

2.4 精密度试验 取同一份对照品溶液,按上述 **2.1** 色谱条件下,连续进样 5 次,测定峰面积。西红花苷-Ⅰ的 RSD 0.7% ($n = 5$),西红花苷-Ⅱ的 RSD 0.3% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取统一供试品溶液,分别与样品制备后的 0,2,4,8,12,24 h 进样 10 μL,测峰面积,西红花苷-Ⅰ的 RSD 1.14%,西红花苷-Ⅱ的 RSD 0.78%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取同一批栀子,按 **2.2.1** 平行处理 6 份,同法制成供试品溶液,测峰面积并计算西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ的含量,结果西红花苷-Ⅰ的平均含量为 60.8 μg,RSD 1.2% ($n = 6$),西红花苷-Ⅰ的平均含量为 7.5 μg,RSD 0.8% ($n = 6$)。

2.7 回收率试验 精密称取已知含量的样品 1.245 g,精密加入西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ对照品适量,按按 **2.2.1** 项下的方法制备供试品溶液,依法测定峰面积并计算含量和回收率,结果见表 1,2。

表 1 西红花苷-Ⅰ加样回收率试验

样品含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
69.03	41.5	108.71	95.6	96.68	1.2
69.03	41.5	109.5	97.5		
69.03	41.5	109.2	96.8		
69.03	41.5	108.7	95.6		
69.03	41.5	108.9	96.0		
69.03	41.5	109.96	98.6		

2.8 供试品的含量测定 按拟定方法测定 3 批样品,结果样品中的西红花苷-Ⅰ质量分数为 59.71,59.41,59.86 μg·g^{-1};西红花苷-Ⅱ的质量分数为 7.42,7.21,7.48 μg·g^{-1}。

黄芪药材的 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱研究

梁瑾[1],刘小花[1],任远[2],梁建娣[1],党子龙[1],封德梅[3],封士兰[1*]
(1. 兰州大学药学院,兰州 730000; 2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室(培育基地),兰州 730000; 3. 甘肃省第二人民医院,兰州 730000)

[摘要] **目的**:采用高效液相色谱法-二极管阵列检测器-蒸发光检测器(HPLC-DAD-ELSD)联用技术对黄芪药材进行指纹图谱研究。**方法**:采用 Waters 2695-Spursil™ C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-水梯度洗脱,流速 1.0 mL·min^{-1},柱温 25 ℃,进样量 20 μL,检测波长 254 nm。蒸发光散射检测器的条件为:漂移管温度 112.8 ℃,载气流速 3.2 L·min^{-1}。**结果**:10 批药材 HPLC-DAD 指纹图谱找到 14 个共有峰,鉴别了毛蕊异黄酮和芒柄花素;HPLC-ELSD 指纹图谱找到 9 个共有峰,鉴别了毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅲ、黄芪皂苷Ⅱ。**结论**:方法准确可靠,为全面控制黄芪药材质量提供了一种方法。

[关键词] 黄芪; 中药指纹图谱; 高效液相色谱法-二极管阵列检测器-蒸发光检测器
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)17-0070-05
[网络出版地址] http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1741.025.html
[网络出版时间] 2012-07-04 17:41

[收稿日期] 20120220(004)
[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金(Lzujbky-2011-137);甘肃省科技重大专项项目(1002FKDA048);甘肃省中药药理与毒理学重点实验室开放基金项目(ZDSYS-KJ-2012-007)
[第一作者] 梁瑾,硕士,Tel:0931-8915685,E-mail:jinjinliang1989@163.com
[通讯作者] * 封士兰,教授,博士生导师,从事中药中化学成分分离分析及中药新药研究,Tel:13993162172,E-mail:fengshl@lzu.edu.cn

表 2 西红花苷-Ⅱ加样回收率试验

样品含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
8.46	7.44	16.02	101.6		
8.46	7.44	16.1	102.7		
8.46	7.44	16.16	103.5		
8.46	7.44	16.21	104.16	102.94	0.87
8.46	7.44	16.08	102.42		
8.46	7.44	16.14	103.26		

3 讨论

3.1 流动相的考察 考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 乙酸水、乙腈-0.05% 磷酸水、0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水等,结果表明 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水系统最佳,色谱峰型好,峰型较为尖锐并改善拖尾现象,虽然乙腈-0.05% 磷酸水的峰型更佳、分离效果更好,但考虑对栀子进一步研究时需适用于离子阱质谱检测系统,最终采用了上述的色谱条件。

3.2 供试品溶液的处理方法考察 选择用 70% 甲醇提取,分别采用加热回流、超声 40 min 和冷浸处理 3 种方法进行比较,结果所得的西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ含量差别不大,因超声提取较为方便,且重复性好,故采用超声方法提取。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 231.
[2] 董婉茹, 刘洪毓, 丁雅光, 等. 栀子在治疗肝脏疾病中的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 250.
[3] 郑书国, 钱之玉, 王宏婷. 西红花酸对高脂血症家兔 LDL 氧化易感性及血清 Ox-LDL 水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6): 50.
[4] 周素娣. 分光光度法测定西红花多甙片中西红花总甙含量[J]. 海峡药学, 1997, 9(2): 3.
[5] 金蓉鸾,叶玉兰,周锦祥,等. 番红花质量研究[J]. 南京药学院学报, 1986, 17(4): 247.
[6] 刘瑛, 张浩. RP-HPLC 法测定栀子中西红花苷-1 和西红花总苷含量[J]. 中国民族民间医药, 2007, 89(6): 337.
[7] 张留记, 刘钦松, 屠万倩, 等. RP-HPLC 法同时测定不同产地栀子中栀子苷、西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(7): 63.

[责任编辑 邹晓翠]