

## 不同产地栀子药材 HPLC 指纹图谱研究<sup>\*</sup>

□ 韩建萍<sup>\*\*</sup> 陈士林 (中国医学科学院药用植物研究所 北京 100094)

张文生 杜树山 王永炎<sup>\*\*</sup>

(北京师范大学资源学院资源药物与中药资源研究所 北京 100875)

**摘要:**采用高效液相色谱(HPLC)方法建立了江西道地药材栀子的 HPLC 指纹图谱,并将不同产地的栀子药材进行了指纹图谱相似度计算,为科学评价和有效控制栀子质量提供了新方法。色谱条件: C<sub>18</sub>柱(250mm×4.6mm,5μm),流动相为乙腈-水,检测波长为 258nm,体积流量为 0.8mL/min,柱温 30℃;线性梯度洗脱。该方法能简便、快速地鉴别和区分不同来源的栀子药材,为全面控制栀子药材的质量提供了依据。

**关键词:**栀子 指纹图谱 高效液相色谱法

作为有着悠久文明史的中药,其安全性、有效性早已经过历史的验证,但其质量可控的问题则是制约其走向国际市场的瓶颈。中药指纹图谱(Fingerprint)能全面反映中药所含内在化学成分的种类与数量,进而反映中药的质量。在现阶段,中药的有效成分绝大多数没有明确,采用中药指纹图谱的方式将会有效地表征中药质量。同时指纹图谱也已成为国际上所认可,这有利于中药及其产品进入国际市场<sup>[1]</sup>。目前,关于指纹图谱研究的报道越来越多<sup>[2,3]</sup>。栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)是茜草科(*Rubiaceae*)栀子属(*Gardenia*)栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实,具有

泻火除烦,清热利湿,凉血散淤的功能。临床上用于保肝利胆,抗炎镇痛,降压调脂,抗菌消炎,抑制中枢,促进胰腺分泌的治疗<sup>[4]</sup>,是我国中医临床常用大宗药材品种之一,主产于江西、湖南等地。栀子的化学成分复杂,其中含有 11 种环烯醚萜类化合物,包括栀子苷、羟异栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷酸、京尼平等,栀子苷是主要的环烯醚萜苷化合物,是栀子的重要有效成分<sup>[5]</sup>。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栀子的化学组成不尽相同。水栀子 *G. jasminoides* Ellis f. *longicarpa* z w. xie et o Kada 为栀子的一个变种,含有栀子苷等成分。本实验采用的高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)法梯度洗脱,建立了栀子药材的指纹图谱,该方法样品处理简单,重现性和精密度良好,有助于栀子道

收稿日期:2006-09-10

修回日期:2007-04-30

\* 科技部“十一·五”科技支撑计划(2006BAI09B02):道地药材生态适宜性分析技术研究及生产区划,负责人:陈士林。

\*\* 联系人:王永炎,本刊编委会副主任,教授、主任医师,中国工程院院士,中医内科学专家,Tel:010-64014411;韩建萍,博士,主要从事中药资源研究,Tel:010-62205282, E-mail: jphan@implad.ac.cn。

地药材的质量控制。同时,本研究对不同产地的栀子进行了指纹图谱相似度分析,以区分不同产地栀子药材质量的异同,并为《中药材生产质量管理规范》(GAP)实施和发展道地药材生产提供依据。

### 一、仪器与材料

Waters液相色谱仪(配有紫外检测器)为Waters2487、Waters 1525 高效液相色谱泵,Waters 717 自动进样器,Millennium<sup>32</sup> 色谱工作站;KD-250DB 型数控超声波清洗器为昆山市超声仪器有限公司产品,Milli-Q 超纯水净化器为 Millipore 公司产品,MELLTER TOLEDO AG204 为万分之一天平。乙腈为色谱纯 acetonitrile(美国迪马公司产品),甲醇为分析纯,水为双蒸水。栀子苷对照品(749-200208)由中国药品生物制品检定所提供。不同产地栀子药材样品来源见表1,经中医研究院生药鉴定室人员鉴定为栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 和水栀子 *G. jasminoides* Ellis f. *longicarpa* z w. xie et o Kada。

### 二、方法与结果

#### 1. 对照品溶液的制备

取栀子苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定容于10mL容量瓶中,对照品浓度为0.297mg/mL。分别吸取1 $\mu$ L,2 $\mu$ L,4 $\mu$ L,6 $\mu$ L,8 $\mu$ L,10 $\mu$ L,12 $\mu$ L注入高效液相色谱,进样量与峰面积的相关系数为0.9994。

线性方程为  $Y = 806.1X - 24620.4$ ,线性范围为0.297~2.97 $\mu$ g。

#### 2. 供试品溶液的制备

取栀子药材粉末(过60目筛)0.1g,精密称定,置25mL量瓶中,加甲醇20mL,摇匀,称定质量,超声提取20min,取出,放冷,用甲醇补重,摇匀,用微孔滤膜(0.45 $\mu$ m)滤过,即可进行HPLC分析。

#### 3. 栀子道地药材指纹图谱的建立

色谱柱为 Diamonsil<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 柱(250mm × 4.6mm, 5 $\mu$ m)(美国迪马公司);流动相:A相为乙腈,B相为水;检测波长为258nm;体积流量0.8mL/min;柱温30 $^{\circ}$ C;进样量10 $\mu$ L。线性梯度洗脱时间程序如下:开始时(12%A-88%B),15min时(15%A-85%B),30min时(30%A-70%B),40min时(32%A-68%B),47min时(50%A-50%B),52min时(12%A-88%B),保持13min。所有组分均在65min内被检测完。对照色谱和药材色谱图分别见图1和图2。

#### 4. 方法学考察

##### (1) 稳定性试验。

取江西栀子药材粉末,精密称定,按上述方法制备供试液,分别于0h、2h、4h、12h、16h、24h、36h、48h检测指纹图谱。结果表明,栀子苷含量无明显变化,相对保留时间的(RSD)范围为0.18%~1.13%,符合指纹图谱要求,稳定性良好。

##### (2) 精密度试验。

表1 栀子样品来源

| 样品号 | 学名  | 采样地             | 经度                 | 纬度                |
|-----|-----|-----------------|--------------------|-------------------|
| S1  | 栀子  | 湖南长沙野生种         | 113 $^{\circ}$ 6'  | 28 $^{\circ}$ 12' |
| S2  | 栀子  | 江西樟树汇仁基地家种      | 115 $^{\circ}$ 22' | 27 $^{\circ}$ 59' |
| S3  | 栀子  | 河南南阳家种          | 112 $^{\circ}$ 56' | 32 $^{\circ}$ 42' |
| S4  | 栀子  | 江西樟树天齐堂基地家种     | 115 $^{\circ}$ 20' | 28 $^{\circ}$ 01' |
| S5  | 栀子  | 江西抚州天顺生态农业基地家种  | 116 $^{\circ}$ 18' | 27 $^{\circ}$ 57' |
| S6  | 水栀子 | 江西抚州天顺生态农业基地家种  | 116 $^{\circ}$ 18' | 27 $^{\circ}$ 57' |
| S7  | 栀子  | 江西新干中药材开发公司基地家种 | 115 $^{\circ}$ 24' | 27 $^{\circ}$ 44' |
| S8  | 栀子  | 江西新干野生种         | 115 $^{\circ}$ 48' | 27 $^{\circ}$ 45' |
| S9  | 栀子  | 湖南长沙栽培种         | 113 $^{\circ}$ 6'  | 28 $^{\circ}$ 12' |
| S10 | 栀子  | 河南南阳野生种         | 112 $^{\circ}$ 56' | 32 $^{\circ}$ 42' |

取江西栀子药材粉末,精密称定,按上述方法制备供试液,重复进样6次,记录指纹图谱。结果表明,栀子苷含量无明显变化。相对保留时间的(RSD)范围为0.15%~0.89%,符合指纹图谱要求,精密度良好。

(3) 重现性试验。

取江西栀子药材粉末6份,精密称定0.1g,按上述方法制备供试液,记录指纹图谱。结果表明,栀子苷含量无明显变化,相对保留时间的RSD范围为0.50~0.79%,符合指纹图谱要求,重现性良好。

5. 不同产地栀子药材指纹图谱的比较及相关技术参数

分别取不同产地的栀子药材,按供试品溶液方法制备供试液,记录指纹图谱(见图3),比较各共有峰的相对峰面积,见表2。从表2中可以看出,不同产地栀子药材指纹图谱存在一定的差异,其共有峰相对保留时间基本一致,相对峰面积比

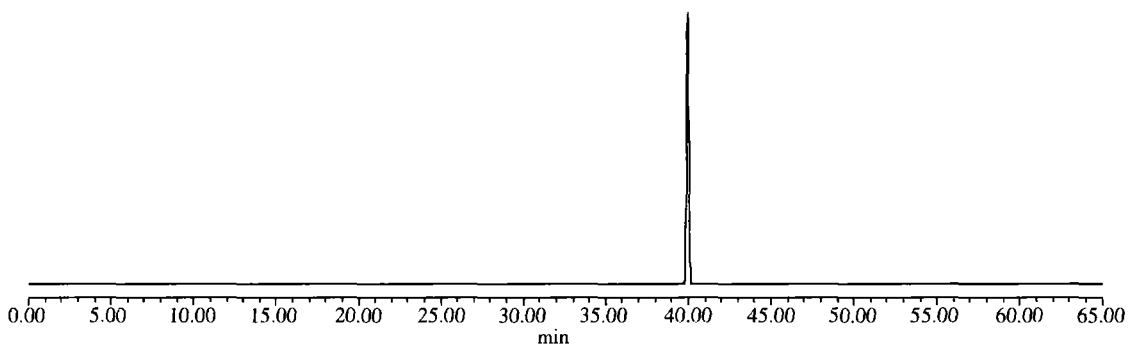


图1 栀子苷指纹图谱

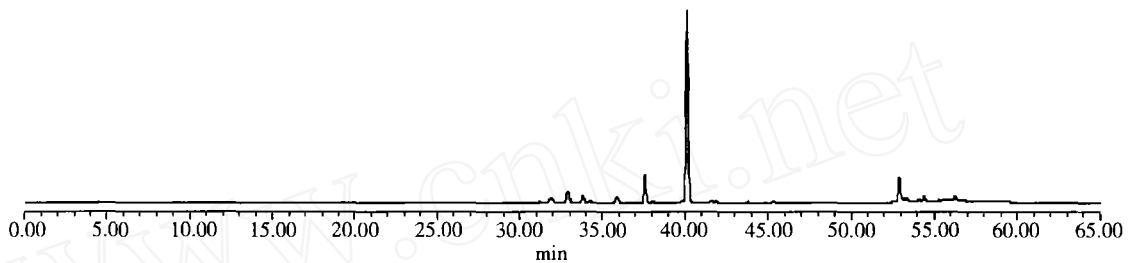


图2 栀子药材指纹图谱

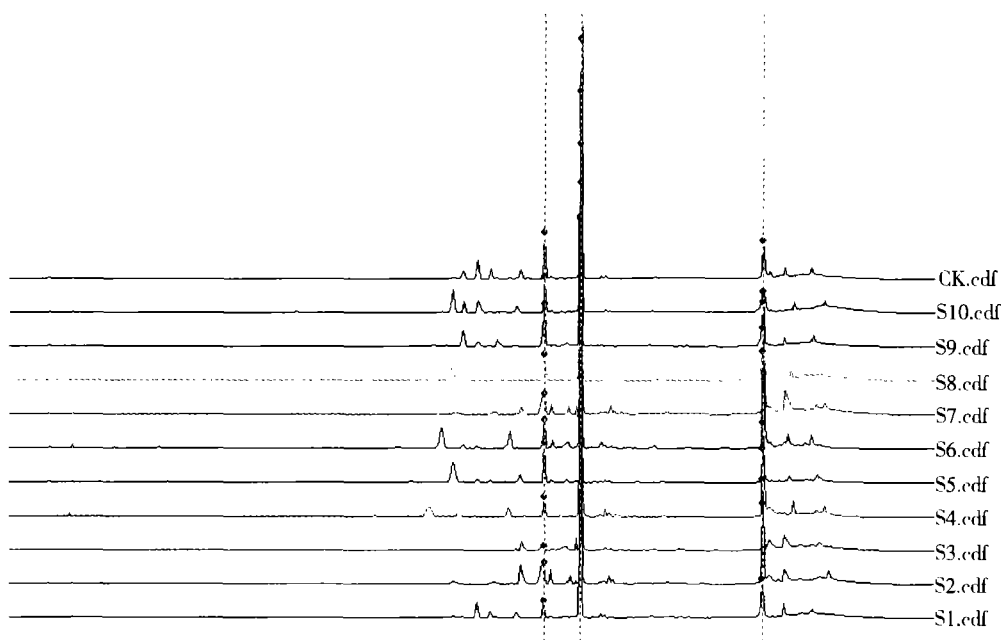


图3 不同产地栀子样品的指纹图谱

值存在一定的差异,可用来鉴别和区分不同产地的栀子药材。

表2 栀子药材共有峰相对峰面积值

| 峰  | 保留时间  | 样品号     |         |        |         |         |         |         |        |         |         |         |
|----|-------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|
|    |       | S1      | S2      | S3     | S4      | S5      | S6      | S7      | S8     | S9      | S10     | CK      |
| 1  | 32.54 | 104.91  | 96.01   | 56.68  | 144.37  | 234.607 | 215.92  | 109.40  | 187.10 | 102.90  | 213.63  | 146.55  |
| 2  | 33.7  | 38.90   | 111.18  | 22.07  | 36.117  | 22.58   | 22.70   | 52.71   | 31.49  | 6.37    | 4.74    | 12.66   |
| 3  | 36.02 | 40.49   | 82.61   | 26.73  | 78.07   | 125.10  | 59.28   | 16.49   | 34.15  | 48.99   | 4.28    | 96.49   |
| 4  | 37.76 | 95.49   | 108.42  | 129.81 | 107.90  | 152.99  | 228.77  | 123.01  | 144.40 | 216.46  | 196.36  | 150.36  |
| 5  | 40.36 | 1123.77 | 1333.00 | 942.09 | 1088.45 | 1276.58 | 1816.19 | 1299.79 | 940.87 | 579.40  | 1456.77 | 1185.69 |
| 6  | 41.83 | 21.96   | 49.32   | 17.92  | 37.80   | 33.66   | 12.15   | 52.60   | 13.94  | 13.80   | 10.09   | 10.49   |
| 7  | 45.65 | 13.02   | 11.25   | 6.87   | 12.34   | 20.09   | 12.00   | 21.44   | 15.40  | 4.07    | 6.42    | 15.72   |
| 8  | 53.07 | 286.30  | 472.12  | 206.13 | 404.42  | 600.34  | 212.40  | 445.54  | 252.35 | 362.624 | 236.92  | 347.92  |
| 9  | 54.61 | 54.42   | 49.37   | 51.80  | 61.15   | 68.80   | 23.628  | 94.76   | 51.13  | 47.723  | 47.18   | 37.72   |
| 10 | 56.47 | 21.77   | 45.97   | 21.22  | 48.90   | 72.857  | 27.62   | 31.65   | 35.36  | 28.219  | 32.85   | 36.46   |

### 6. 数据处理

应用中国药品生物制品检定所编写的“中药色谱图分析和数据管理软件”对色谱图进行分析,运用SPSS10.0软件对其进行系统聚类分析。

#### (1) 相似度分析。

运用中药指纹图谱相似度计算软件分析,将实验数据导入指纹图谱相似度计算软件,经选峰,设定匹配模式,将谱峰自动匹配,然后按中位数法生成对照指纹图谱(CK),各样品图谱与对照图谱进行谱峰差异性评价和整体相似度评价。其相似度结果见表3。不同方法所得相似度结果趋于一致,以夹角余弦峰法为测度,各样品的相似度在0.9697~0.9949间。样品S2、S7、S8、S5聚为一类,其相似度在0.9813~0.9907间,S3、S10、S1、S9、S4与对照CK聚为一类,其相似度在0.9919~0.9949间。表明相似度结果与聚类结果存在相关性。

#### (2) 系统聚类分析。

对包括栀子苷在内的10个共有峰的峰面积进行量化,得到10×11阶原始数据矩阵,运用SPSS10.0软件对其进行系统聚类分析,采用离差平方和法Ward's Method方法,利用欧氏距离Euclidean作为样品的测度,包括指纹图谱软件生成的对照指纹图谱(CK)在内的9个指纹图谱峰进行聚类分析,结果见图4。9份材料基本可以分为三大类,S2、S7、S8、S5为一类,S3、S10、S1、S11、S9、S4为第二类,水栀子种群S6单为一类,与栀子的距离最远,与其它样品的相似度最低。

表3 与对照模式比较的栀子样品的相似度评价

| 样品号 | 相关系数法  | 夹角余弦法  |
|-----|--------|--------|
| S1  | 0.9969 | 0.9949 |
| S2  | 0.9910 | 0.9867 |
| S3  | 0.9943 | 0.9922 |
| S4  | 0.9945 | 0.9931 |
| S5  | 0.9933 | 0.9907 |
| S6  | 0.9804 | 0.9697 |
| S7  | 0.9927 | 0.9901 |
| S8  | 0.9915 | 0.9813 |

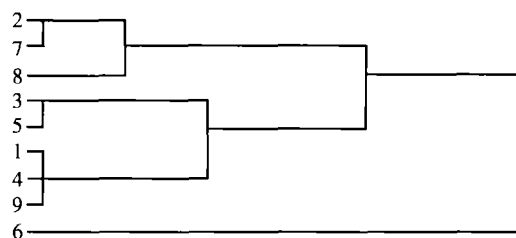


图4 栀子样品聚类图

### 三、讨论

本实验采用258nm作为检测波长,是为了兼顾其他峰的吸收。文献报道多用238nm或240nm测定栀子苷的含量。栀子中栀子苷含量很高,在色谱图中占

绝对优势,为了反应药材化学成分,可使用不同的检测波长,突出其他特征峰,相互参照辨认,并可避免图谱中仅有一种成分偏高的现象。本研究的图谱中除突出栀子苷色谱峰特征外,也同时突出其他峰的特征,故选258nm检测。

在流动相的选择中,分别以甲醇-水、甲醇-0.25%磷酸、乙腈-水等不同体积分数、不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱试验。结果表明,用乙腈-水进行梯度洗脱的指纹峰较好,基线平稳、不易漂移,有利于指纹图谱的分析。

本研究建立的指纹图谱可快速鉴别区分不同来源的栀子药材,通过指纹图谱对栀子药材进行综合宏观分析,有利于全面控制药材品质,从而实现中药栀子的现代化生产。

对于化学成分复杂的中药来讲,指纹图谱比测定任何一种单一成分所提供的信息均要丰富和有用得多,如果将指纹图谱与药效有关的信息进行量化,这将更好地解决中药的整体性和复杂性难题。

### 参考文献

- 1 周玉新. 中药指纹图谱研究技术. 北京: 化学工业出版社, 2002. 7.
- 2 王花红, 郭五保, 顾莹. 山茱萸药材指纹图谱的研究. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1922 ~ 1928.
- 3 纪兰菊, 保怡, 马玉花, 等. 藏药抱茎獐牙菜 HPLC 指纹图谱研究. 西北植物学报, 2004, 24(11): 2092 ~ 2095.
- 4 谢学建, 张俊慧, 马爱华. 中药栀子研究进展. 时珍国医国药, 2000, 11, 945 ~ 947.
- 5 Hendry G A F, Houghton J D. Natural Food Colorants, 2nd ed. Chapman & Hall: London, 1996, 318 ~ 321.

### Fingerprints of *Gardenia Jasminoides* Ellis in Different Habitats

Han Jianping, Chen Shilin

(Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Zhang Wensheng, Du Shushan, Wang Yongyan

(Institute of Natural Medicine and Chinese Medicine Resources, College of Resource Science & Technology, BNU, Beijing 100875, China)

Authors established HPLC fingerprints for *Gardenia jasminoides* Ellis collected from Jiangxi province, and compared them with *Gardenia jasminoides* Ellis grown in other habitats. HPLC fingerprints of *Gardenia jasminoides* Ellis were collected from eight different places. HPLC separation was performed on a Diamonsil™ C<sub>18</sub> analytical column gardenia, eluted with acetonitrile - water at a flow rate of 0.8mL/min. The temperature of column was set at 30℃, with UV detection wavelength at 258nm. The HPLC fingerprints were established, and compared with similar *Gardenia jasminoides* Ellis grown in other habitats. The method has been proved simple and rapid in identifying and differentiating *Gardenia jasminoides* Ellis collected from different places, with a secured quality control.

Keywords: *Gardenia jasminoides* Ellis; fingerprint; HPLC

(责任编辑:张述庆,责任译审:邹春申)