

栀子炒制前后有效成分含量测定及其质量评价研究

刘瑞连¹ 李 鑫² 欧少福³ 曾普华^{1*}

(1. 湖南省中医药研究院附属医院 湖南 长沙 410006;

2. 湖南中医药大学 湖南 长沙 410208; 3. 张家界市中医医院 湖南 张家界 427000)

摘要:目的 建立栀子炒制前后的 HPLC 指纹图谱,比较栀子、焦栀子(炒制后)的指纹图谱差异并计算栀子炒制前后有效成分的含量变化,为栀子、焦栀子质量评价提供新思路。方法 于江西和福建两个不同产地分别取样,经适当炮制得焦栀子备用;使用水提醇沉法提取栀子、焦栀子中的有效成分,采用 HPLC 法建立栀子、焦栀子水提液指纹图谱,利用指纹图谱相似评价软件比较栀子、焦栀子的指纹图谱差异,并计算有效成分的含量变化。结果 栀子与焦栀子水提液指纹图谱中共有 12 个共有色谱峰,其中 1~10 号色谱峰具有较为显著的变化,而 11、12 号色谱峰变化不明显,与栀子相比,焦栀子中 8'、13 号均为新出现的色谱峰;栀子中栀子苷、绿原酸含量分别为 0.379~2.121、1.68~7.740 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,焦栀子中相对应的含量为 0.268~1.949、0.552~3.268 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论 栀子与焦栀子水提液的指纹图谱具有显著性差异,栀子炮制后栀子苷及绿原酸的含量均明显降低,表明炒制对栀子中的化学成分影响显著,可结合指纹图谱信息和有效成分的含量变化对栀子与焦栀子进行相关质量评价研究。

关键词: 栀子; 焦栀子; 栀子苷; 绿原酸; HPLC 指纹图谱; 质量评价

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.12.025

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2020)12-2915-03

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。其性味苦寒,为临床常用中药^[1]。现代研究表明栀子中主要含有栀子苷、异栀子苷、绿原酸等化学成分,具有泻火利湿、凉血解毒等功效。且已证明栀子具有很明显的抗病原微生物的致细胞病变作用,此外还具有护肝利胆、降压、解热镇静、抗炎抗菌、止血消肿、抗肿瘤等作用,在临床上应用广泛^[2]。

栀子苷、绿原酸是栀子的主要有效成分,其中栀子苷是现行中国药典中栀子含量的检测指标,其具有抗炎、清热、镇痛和利胆等药理作用。临床上使用栀子有生栀子和制栀子之分,生栀子具苦寒之性,易伤中气,且对胃肠道有刺激性,焦栀子是制栀子成品之一,为生栀子经中火炒至焦黄制得,缓和了其苦寒之性,且保留了栀子本身大部分药理作用。近年研究发现,栀子苷对肝脏具有一定的毒性^[3],但这种毒性要达到一定剂量浓度才会产生,而栀子苷经高温处理后含量会有所下降,但其余有效成分并不受明显影响,故栀子的炮制使用就显得尤为重要^[4]。

中药是国宝,是中华五千年历史文化的沉淀,为炎黄子孙的繁衍作出了巨大贡献。可是近年来中药在“质量”、“质量标准”和“质量评价与控制”等方面频频出现了一些不良状况,已涉及到了中药安全、有效、可控的中医药科学问题,影响到了中药现代化国际化事业,亟待解决。为提高饮片质量和安全性,确保中药饮片的标准应用,本研究从栀子炒制前后指纹图谱信息差异及有效成分的含量变化出发,对栀子、焦栀子的质量控制进行研究,以期为栀子、焦栀子的质量评价提供可靠的理论实验基础。

收稿日期: 2019-12-10; 修订日期: 2020-09-07

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2019JJ40172);

湖南省中医药科研计划重点项目(201811);

湖南省中医药科研计划项目(201876);

湖南省长沙市科技计划重点项目(kq1801034)

作者简介: 刘瑞连(1975-),女(汉族),湖南湘潭人,湖南省中医药研究院附属医院主任药师,硕士学位,主要从事中药制剂与炮制研究工作。

* 通讯作者简介: 曾普华(1977-),男(汉族),湖南娄底人,湖南省中医药研究院附属医院主任医师,博士学位,主要从事中医药研究工作。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent ZORBAX SB-C18 液相色谱柱(880975-902, 4.6mm×250mm, 5 μm)、Agilent 高效液相色谱仪、Agilent 1260 色谱分析工作站、Agilent UV 检测器(Agilent1260,美国 Agilent 公司)、MS205DU 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多); DZTW 型调温电热套(北京市永光明医疗仪器有效公司); 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有效公司); RE-52AA 旋转蒸发器(上海雅荣生化仪器设备有限公司); 超纯水机(长沙市科临电子科技有限公司)。

1.2 材料 福建栀子(批号: 180510, 180613, 180702, 180820, 181016); 江西栀子(批号: 180510, 180613, 180702, 180820, 181016); 福建焦栀子(进行规范炮制后备用,批号: 180510, 180613, 180702, 180820, 181016); 江西焦栀子(同炮制后备用,批号: 180510, 180613, 180702, 180820, 181016)。均购自湖南中医研究院。

栀子苷标准品(110749-200714,中国药品生物制品检定所)、绿原酸标准品(110753-201817,中国食品药品研究院)、乙腈(AS1122-801,美国 TEDIA 公司,LC)、甲醇(10014118,美国 TEDIA 公司,LC)、超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取栀子苷、绿原酸对照品各 0.500mg,加纯甲醇定容至 25mL,即得 0.020mg·mL⁻¹ 混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 栀子的炮制 取不同批次的生栀子适量,照《中国药典》2015 版中清炒法(通则 0213)用中火炒至表面焦褐色或焦黑色,果皮内表面和种子表面为黄棕色或棕褐色,取出,放凉即得^[5]。

2.2.2 样品处理 分别称取各产地不同批次栀子、焦栀子 10g,加 8 倍量纯化水,使用 DZTW 型调温电热套调温至 100℃ 加热 1.5h 后,趁热过滤,使用旋转蒸发器浓缩提取液至约 30ml。浓缩液加乙醇至乙醇体积分数达 80% 醇沉,搅匀,冷却避光静置 24h 至无沉淀析出^[6]。过滤除去沉淀后,取滤液用旋转蒸发器减压回收乙醇至无醇味,加超纯水稀释至生药量为 1g·mL⁻¹,加纯

甲醇至甲醇含量为 50% (v/v) 摇匀 即得供试品溶液。

2.3 色谱条件 Agilent ZORBAX SB - C18 色谱柱 (4.6mm × 250mm 5μm) 流动相为水(A) - 乙腈(B): 0 ~ 80min 5% ~ 35% B 90 ~ 100min 100% ~ 5% B。柱温 30℃; 流速 1mL · min⁻¹, 检测波长为 238nm; 进样量 10μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 使用自动进样器精密吸取“2.1”项下配制得混合对照品溶液 0.5、10、15、20、25μL, 分别注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以栀子苷、绿原酸标准品进样量(μg) 为横坐标 X, 峰面积为纵坐标 Y, 绘制得标准曲线分别为: $Y = 5841.28X + 13.67$ $r = 0.9993$ 、 $Y = 397.16X + 7.12$ $r = 0.9995$, 结果表明栀子苷、绿原酸的线性范围良好^[7]。

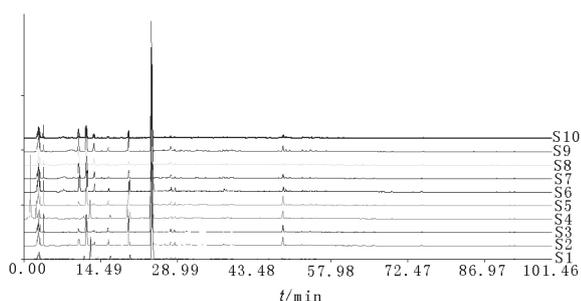
2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.1”项下配制得混合对照品溶液 10μL, 按“2.3”项下方法连续进样 6 次, 计算栀子苷、绿原酸色谱峰的相对保留时间和对应峰面积的 RSD 分别为 3.22%、2.65% 和 4.23%、2.31%, 说明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取 6 份同一批次栀子饮片(福建, 批号: 180510) 各 10g, 按“2.2”项下方法制备样品进行测定, 计算栀子苷色谱峰的相对保留时间和峰面积的 RSD 分别为 1.39% 和 2.36%, 说明样品及仪器重复性良好, 可用于实验检测。

2.4.4 稳定性试验 取栀子(福建, 批号: 180510) 供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、12、24 h 进行测定, 以栀子苷为参照峰, 计算其指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 3.16% 和 2.17%, 说明样品稳定性良好, 可用于实验检测。

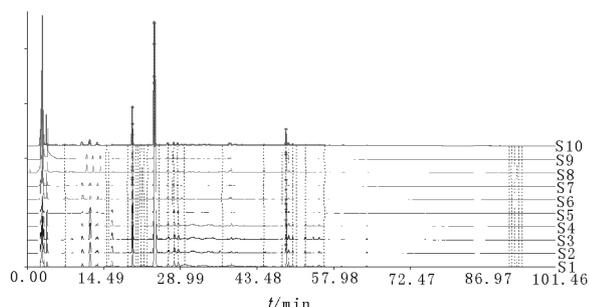
2.5 实验结果

2.5.1 栀子与焦栀子指纹图谱的建立 取“2.2”项下分别制备得样品供试液, 按“2.3”项下色谱条件进行测定, 福建、江西两产地栀子、焦栀子各 10 批(S1 - S10) 的指纹图谱见图 1、图 2。



S1 - S5: 福建栀子; S6 - S7: 江西栀子

图 1 栀子的 HPLC 指纹图谱



S1 - S5: 福建焦栀子; S6 - S7: 江西焦栀子

图 2 焦栀子的 HPLC 指纹图谱

2.5.2 指纹图谱相似度评价 分别将栀子 10 批样品所得色谱图和焦栀子 10 批样品所得色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评

价软件中(2004A 版), 分别以栀子第一批样品色谱图和焦栀子第一批样品色谱图为对照图谱, 通过色谱峰多点校正自动匹配计算出相应对照图谱与样品图谱的相似度数据。所得结果分别见表 1、表 2。

表 1 10 批栀子样品的指纹图谱相似度

样品	相似度
S1	1
S2	0.974
S3	0.968
S4	0.939
S5	0.980
S6	0.973
S7	0.964
S8	0.957
S9	0.977
S10	0.977

表 2 10 批焦栀子样品的指纹图谱相似度

样品	相似度
S1	1
S2	0.996
S3	0.954
S4	0.985
S5	0.975
S6	0.977
S7	0.966
S8	0.962
S9	0.988
S10	0.988

由表 1 及表 2 的相似度结果可知, 栀子和焦栀子样品的指纹图谱相似度较高, 分别在 0.939 ~ 0.980、0.954 ~ 0.996 之间, 表明所建立的栀子和焦栀子的 HPLC 指纹图谱具有良好的重复性和稳定性, 实验数据准确可靠, 此指纹图谱可用于栀子及焦栀子的质量评价研究。

2.5.3 栀子 - 焦栀子有效成分的含量分析 取“2.1”项下配制得混合标准品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进行测定。测得栀子苷与绿原酸标准品的 HPLC 色谱图见图 3。

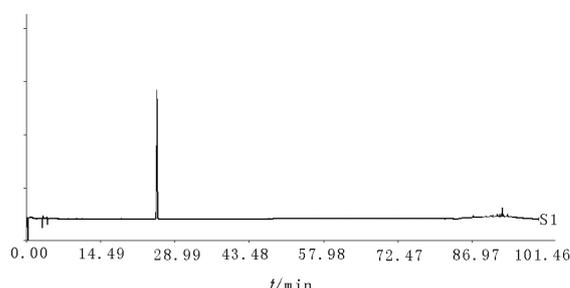


图 3 栀子苷与绿原酸标准品的 HPLC 色谱图

据“2.5.1”中测得的栀子、焦栀子指纹图谱信息, 通过分析相对应色谱峰的保留时间及峰面积, 计算栀子炒制前后栀子苷及绿原酸的含量。结果见表 3、表 4。

表 3 栀子中栀子苷及绿原酸含量 μg · g⁻¹

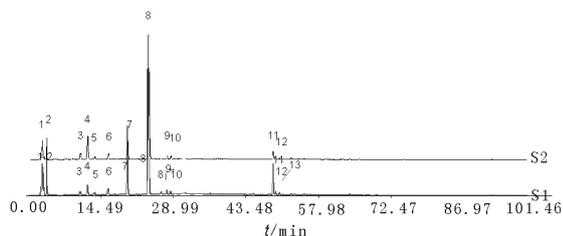
成分	福建					江西				
	180510	180613	180702	180820	181016	180510	180613	180702	180820	181016
栀子苷	4.007	2.977	3.923	3.141	4.74	2.243	1.974	2.964	1.648	2.440
绿原酸	1.125	0.379	1.123	1.5	1.122	0.754	1.870	2.121	1.878	1.875

表 4 焦栀子中栀子苷及绿原酸含量 μg · g⁻¹

成分	福建					江西				
	180510	180613	180702	180820	181016	180510	180613	180702	180820	181016
栀子苷	2.302	2.888	3.268	2.906	1.993	2.182	0.552	2.126	0.688	1.651
绿原酸	1.003	0.268	1.022	1.269	0.892	0.444	1.678	1.949	1.058	1.263

根据表 3 可知, 焦栀子中栀子苷与绿原酸的含量均低于生栀子, 说明高温炒制使其含量减少。其中福建栀子中栀子苷与绿原酸变化幅度均较大, 推测因福建栀子本身栀子苷含量较高, 炮制对其影响较大。相同产地栀子炮制前后栀子苷与绿原酸含量的变化程度也相差较大, 推测其在炮制过程中温度、时长等不一对其造成了一定影响^[8]。

2.6 栀子-焦栀子的质量评价 将“2.5.1”中建立的同批次栀子与焦栀子指纹图谱(福建栀子, 批号: 180510) 导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件中(2004A 版), 对比栀子与焦栀子指纹图谱相对应色谱峰的差异。结果见图 4。



福建 180510 S1: 焦栀子 S2: 栀子
图 4 栀子与焦栀子的 HPLC 指纹图谱

由图 4 可知, 栀子组与焦栀子组共有色谱峰 12 个(1~12), 焦栀子中 1、2、9、10 号色谱峰的峰高及峰面积没有明显差别, 3、4、5、7、8 号色谱峰峰高及峰面积显著减少, 而 11、12 号色谱峰峰高及峰面积增加。其中 7、8 号色谱峰分别为绿原酸和栀子苷的特征峰, 8' 号和 13 号色谱峰为焦栀子中新生成的峰。

3 讨论

HPLC 法是目前建立中药指纹图谱及检测其有效成分的最主要方法, 该方法分析快、灵敏度、分离度较高, 选择性强, 绝大多数中药饮片可通过该法来研究^[9]。本实验采用 HPLC 法建立了栀子及焦栀子的指纹图谱并检测了栀子及焦栀子中栀子苷、绿原酸的含量变化, 方法学考察均良好, 实验过程严格控制, 结果相对准确有效^[10]。

目前临床常用的栀子炮制品包括 4 种: 炭栀子、炒栀子、焦栀子、姜炙品, 其中生栀子及焦栀子临床应用最为广泛^[11]。本次实验首先使用炒制法炮制生栀子得焦栀子备用, 而后使用反相高效液相色谱法建立了 10 批次栀子炒制前后(即栀子和焦栀子)的指纹图谱, 并将数据导入中药指纹图谱评价软件分析了栀子与焦栀子的相似度及相对应色谱峰的变化及其差异。由实验结果可知, 栀子与焦栀子的指纹图谱存在较为明显的差异, 其 12 个共

有色谱峰的峰面积变化较为显著, 与栀子相比焦栀子中产生了两个新的色谱峰, 即 8' 号和 13 号色谱峰, 说明栀子炒制前后化学成分种类及含量存在显著性差异, 栀子炒制后生成了新的化学成分, 这为栀子与焦栀子饮片的质量控制提供了新的思路和方法。

由测定结果可知, 江西、福建栀子中栀子苷与绿原酸的含量差异较为明显, 江西栀子及焦栀子中栀子苷和绿原酸含量均低于福建, 这两种差异是否与产地、采收、加工有关还有待进一步考察。本次实验没有使用中国药典规定的甲醇提取法提取栀子、焦栀子中的有效成分, 而是使用常规中药煎煮方法处理, 因高温对栀子苷含量有所影响, 故检测得栀子苷含量并未达到中国药典规定标准, 但提取试剂以及煎煮温度在实验过程中保持一致, 此实验结果作为评价依据较为可靠。故结合所建立的栀子与焦栀子的指纹图谱相关信息及其有效成分的含量数据, 可用于栀子、焦栀子质量评价的相关研究, 为栀子更为安全有效的应用于临床治疗提供理论依据。

参考文献:

- [1] 李兆星, 申洁, 毕武, 等. 中国栀子属植物资源及利用研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(2): 498.
- [2] 万亮琴, 张子剑, 谭琰, 等. 栀子及栀子苷抗炎作用机制的最新研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(3): 80.
- [3] 栀子、连翘等中药配方颗粒体外肝细胞毒性研究[J]. 河北中医学报, 2017, 32(1): 43.
- [4] 吕辰子, 张晓燕, 王勃, 等. 栀子炮制的现代研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(6): 1245.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 第四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 209.
- [6] 肖兰英, 刘洋, 吴东, 等. 多指标综合评分法优选黄芪通便颗粒水提醇沉工艺[J]. 江西中医药, 2019, 50(3): 57.
- [7] 张艳. HPLC 法同时测定泻肝安神丸中龙胆苦苷、栀子苷、黄芩苷的含量[J]. 中国药师, 2017, 20(6): 1125.
- [8] 梁献葵, 王艳慧, 雷敬卫. 不同产地加工炮制方法对栀子质量的影响[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3285.
- [9] 吴佳菲, 姚映芷, 尹刚, 等. HPLC 对黄芪和莪术单煎、单煎后合并及共煎的有效成分含量分析[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1567.
- [10] 邵琼, 张广琴, 严敢意. HPLC 法测定金银花炒炭前后芦丁等 6 种有效成分的含量变化[J]. 四川中医, 2018, 36(7): 82.
- [11] 胡金梅. 焦栀子炮制工艺优化及其止血凝血效果研究[J]. 中药与临床, 2018, 9(4): 9.