

西红花特征图谱研究及真伪鉴别

姚建标^{1,2}, 金辉辉^{1,2}, 何厚洪^{1,2}, 王如伟^{1,2*}

1. 浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江 杭州 310052

2. 浙江省中药制药技术重点实验室, 浙江 杭州 310052

摘要: 目的 建立一种西红花 *Crocus sativus* 特征图谱分析方法, 并用以鉴别西红花中掺假栀子 *Gardenia jasminoides*。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 ZorBax XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.5% 醋酸水溶液-0.5% 醋酸甲醇溶液梯度洗脱, 检测波长为 254 nm, 分析时间为 45 min, 体积流量为 1.0 mL/min。结果 通过多批样品的检测, 共标出 8 个特征峰, 建立的分析方法有较好的重复性, 能够显著区分西红花和栀子。结论 方法稳定、可靠、简便, 为西红花质量控制和真伪鉴别提供参考。

关键词: 西红花; 西红花苷; 栀子; 高效液相色谱; 特征图谱

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)09-1378-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.022

Study on specific chromatograms of *Crocus sativus* and authenticity identification

YAO Jian-biao^{1,2}, JIN Hui-hui^{1,2}, HE Hou-hong^{1,2}, WANG Ru-wei^{1,2}

1. Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052, China

2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Chinese Materia Medica Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China

Abstract: Objective To establish the method for the specific chromatograms analysis of *Crocus sativus*, so as to distinguish the active constituents between saffron and gardenia. **Methods** HPLC with ZorBax XDB-C₁₈ column was used, the mobile phase was a linear gradient of methanol containing 0.5% acetic acid and water containing 0.5% acetic acid in 45 min, the detection wavelength was set at 254 nm and the flow-rate was 1.0 mL/min. **Results** Multi batches of samples were analyzed to establish the specific chromatograms. Eight marked peaks were separated. The methodological evaluation showed that the method had a good repeatability. The active constituents between saffron and gardenia could be significantly distinguished by this method. **Conclusion** The method is simple, rapid, and accurate with good reproducibility and can be used for the quality control and identification of *C. sativus*.

Key words: *Crocus sativus* L.; crocin; *Gardenia jasminoides* Ellis; HPLC; specific chromatograms

西红花 *Crocus sativus* L. 属鸢尾科 (Iridaceae) 多年生草本植物, 为鸢尾科植物番红花的干燥柱头, 有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神之功效, 用于经闭、产后瘀阻、温毒发斑、忧郁痞闷、惊悸发狂等症^[1]。因其经印度转入中国西藏再销往内地, 又称藏红花、番红花^[2]。西红花的主要成分为西红花苷, 这类化合物是胡萝卜烯类化合物在植物体内被氧化的产物, 包括西红花苷 I、西红花苷 II、西红花苷 III 和西红花酸等^[3-4]。由于西红花产地较多, 各产品质量差异较大, 又因其价格昂贵, 致使本品参伪和伪品时有发生^[5]。本实验选取 5 批不同年份建德产西红

花药材及 2 批国外产西红花药材, 采用 HPLC 法, 建立了西红花药材的特征指纹图谱, 为西红花药材的质量控制和鉴别提供科学依据。同时对西红花药材中掺假栀子的情况进行研究, 并初步建立了一种行之有效的鉴别方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪, 配置 G1311B 四元泵, G4212B DAD 检测器, G1329B 自动进样器, Chemstation (Rev.C.01.05) 色谱工作站。色谱甲醇 (Merck 公司), 二次重蒸水, 其余试剂均为分析纯。西红花药材均由建德市三都西红花专业

收稿日期: 2014-11-16

基金项目: 浙江省中药现代化项目 (2013 年)

作者简介: 姚建标 (1980—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要从事中药新药开发工作。Tel: (0571)87774836 E-mail: yaojb@conbagroup.com

*通信作者 王如伟, 男, 教授级高级工程师, 博士生导师, 主要从事中药新药开发工作。Tel: (0571)87774766 E-mail: wangrw@conbagroup.com

合作社提供,符合《中国药典》2010 年版一部西红花项下有关各项规定,经浙江工业大学王平教授鉴定为西红花 *Crocus sativus* L. 样品信息见表 1。栀子苷、西红花苷 II、西红花苷 I 对照品(批号 111588-200501)、栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 对照药材(批号 120986-200303)均购自中国食品药品检定研究院。

表 1 样品信息

Table 1 Samples of information

样品编号	产地	年份
1	建德	2005
2	建德	2006
3	建德	2007
4	建德	2010
5	建德	2011
6	美国	2003
7	伊朗	2005

2 方法与结果

2.1 检测波长的确定

吸取上述样品溶液 10 μL 进样,以 0.5%醋酸甲醇溶液-0.5%醋酸水溶液为流动相,利用 DAD 检测器进行全波段扫描检测分析,结果表明,供试品溶液中的有效成分西红花苷 I、西红花苷 II 在 440 nm 吸收最强,但其他成分在该波长下相应较小,而在 254、312 nm 波长下,还有较多的其他特征峰出现,可见 440 nm 不合适作为特征图谱的检测波长。相比于 312、254 nm 波长条件下,所反映的各特征峰响应值更大,信息更清晰,且各特征峰分离较好,通过综合评估,确定 254 nm 为最佳检测波长。

2.2 色谱条件

参考相关文献方法^[6],对色谱条件进行了优化。色谱柱: Zorbax XDB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相为 0.5%醋酸水(A)-0.5%醋酸甲醇(B)溶液,采用梯度洗脱: 0~40 min, 70% A; 40~45 min, 100% A。体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 分析时间 45 min; 进样量 10 μL。

2.3 对照品溶液的配制

取西红花苷 I 对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为 30 μg/mL 的对照品溶液,即得。

2.4 供试品溶液的制备

取西红花药材粉末约 100 mg,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇水溶液 20 mL,称定质

量,超声处理 30 min,取出,放冷,称定质量。用 50%甲醇水溶液补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.5 参照峰的选择

西红花所含苷类活性成分主要为西红花苷 I、西红花苷 II、西红花 III、西红花苷 IV。其中以西红花苷 I 量较高,紫外吸收较强,且有法定的对照品供应。因此,本法确定西红花苷 I 为特征图谱的参照峰(S)。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取同一批西红花,按“2.3”项方法制备,连续进样 6 次。结果显示,各特征峰的峰面积西红花苷 I 参照峰的比值的 RSD 均小于 5%,说明仪器精密度良好。

2.6.2 稳定性试验 取同一批西红花,按“2.3”项方法制备,分别于 0、2、4、8、12、24 h 内进行测定,结果显示,各特征峰与西红花苷 I 的峰面积比值 RSD 良好,显示溶液中各特征成分在 24 h 内稳定。

2.6.3 重复性试验 取同一批西红花供试品 6 份,精密称定,按“2.3”项方法制备,结果表明,6 次试验中,各特征峰的峰面积与西红花苷 I 参照峰的比值的 RSD 均小于 5%,说明该法重复性良好。

2.7 特征图谱的建立

按“2.2”项条件同时测定多批不同年份、不同产地西红花药材,通过对比特征图谱,发现不同产地与不同年份的西红花药材虽然有效成分的量略有差异,但其特征图谱基本一致;254 nm 条件下检测,各色谱峰分离良好,其中 8 个特征峰比较明确。西红花药材的特征峰图谱见图 1。

2.8 西红花的真伪鉴别

按“2.4”项方法制备栀子对照药材溶液,采用

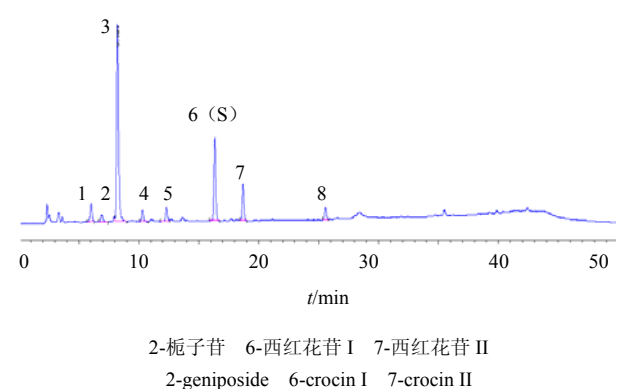


图 1 西红花药材特征图谱

Fig. 1 Specific chromatograms of *C. sativus*

上述特征图谱的分析方法对西红花药材与栀子对照药材在不同波长下进行比较研究,结果见图 2。图 2 显示,440 nm 条件下,西红花和栀子药材共同含有西红花苷类成分,其他特征峰也非常类似;但在 254 nm 条件下,除西红花苷特征峰以外,2 种药材各自还有其特征吸收峰。栀子苷在栀子药材中特征吸收最强,而在西红花药材中吸收较弱,通过比较各批西红花和栀子中 2、6 号峰的峰面积比,可初步判断是否掺入栀子。

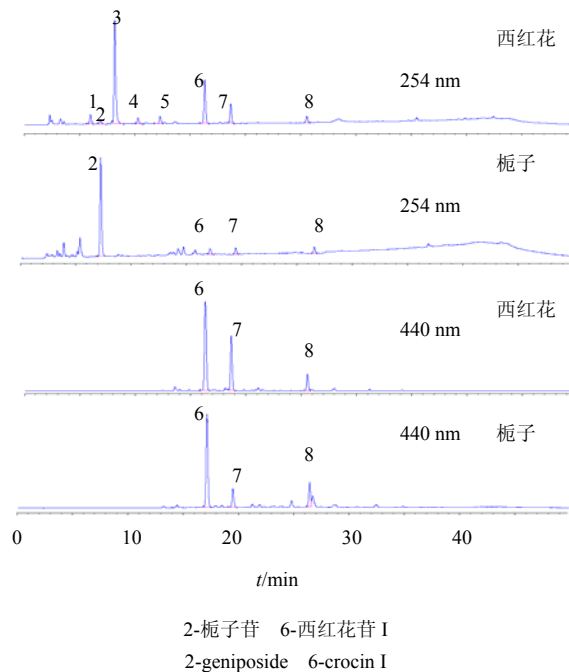


图 2 西红花与栀子药材 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of *C. sativus* and *G. jasminoides*

正常情况下栀子药材中的 2 号峰与 6 号峰的峰面积之比是西红花 2 号与 6 号峰峰面积比 50 倍以上,而不同产地及不同年份的西红花药材,只要保存得当,其栀子苷和西红花苷的量相对稳定,其峰面积比值一般在 0.05~0.30。因此,本研究把 2 号峰与 6 号峰的峰面积之比作为判断西红花中是否掺有栀子的一个参数,以正常西红花药材中栀子苷与西红花苷 I 峰比最大值上浮约 50%,暂定峰面积比(2 号/6 号) ≤ 0.5 为指标。该参数值越大,说明样品中掺入栀子的可能性越大。样品 1~7 的栀子苷与西红花苷 I 峰面积比分别为

0.11、0.07、0.08、0.10、0.07、0.31、0.07,栀子药材为 16.25。

3 讨论

特征图谱因其可从整体上实现质量控制,有利于中药质量稳定和有效,近几年在中药及中成药领域应用较广,《中国药典》2010 年版收载 HPLC 特征图谱就有 11 项。特征图谱利用一组特征峰进行中药质量控制,它继承了指纹图谱综合评价的优点又兼顾了中药成分的复杂和多变性,强调的是其特征性成分而非全部,较指纹图谱更加符合中药和中成药的具体实际,具有更广阔的发展空间。

西红花作为一种名贵药材,其疗效可靠,货源稀少,价格高昂,导致市场上伪品、掺杂品较多^[7]。本研究对比西红花药材在 2 种不同波长下的 HPLC 图,最终选择 254 nm 为本法的检测波长,通过比较多批作不同产地不同年份的西红花药材,以西红花苷 I 为参照峰,确定了 8 个特征峰,建立了一个完整的西红花特征图谱方法,为西红花药材的鉴别和质量控制提供了科学依据。

由于西红花药材和栀子药材在 440 nm 波长下液相色谱行为非常相似,而在 254 nm 条件下,西红花与栀子的特征峰存在显著差异,因此,通过本特征图谱方法,确定了一个有效区分这 2 种药材的鉴别方法,为西红花药材的真伪鉴别提供了又一种科学的方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 何常明,谢晓梅,何美莲,等. 西红花中西红花苷-1 和西红花苷-2 含量测定方法的建立 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1270-1273.
- [3] 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): 715-716.
- [4] 何美莲,陈家宽,周铜水. 番红花化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 466-470.
- [5] 王玉英,林慧萍,李水福. 西红花的真伪优劣检定 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1194-1195.
- [6] 曾水云. 西红花药材高效液相色谱指纹图谱研究及不同产地药材谱比较 [J]. 中成药, 2004, 26(9): 689-692.
- [7] 兰卫,陶宁. 新疆产西红花的质量评价 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 380-382.