

西红花甙-I 的高效液相色谱测定

刘璇 钱之玉 付健

(中国药科大学药理学教研室, 南京 210009)

摘要 报道了西红花甙的高效液相色谱的定量测定方法, Shim-pack CLCDS 柱(150×6.0 mm, I D, 10 μm), 前加一根预柱(Zorbax DIOL), 流动相为甲醇-0.5%醋酸液(50:50), 检测波长 440nm, 柱温 40℃。流速 0.8/min, 纸速 1 mm/min。加样回收率在 99%以上, RSD 小于 1%。本法适用于番红花(*Crocus sativus*)和梔子(*Gardenia jasminoides* Ellis)果实中西红花甙-I 的含量测定, 亦适用其提取物和制剂的质量控制。

关键词 西红花; 西红花甙; 梔子; HPLC

番红花 *Crocus sativus*, 又名藏红花、西红花, 是一味名贵的中药^[1], 番红花国际市场价格一直呈上升趋势, 由二十年前的每公斤 200 美元, 现已突破至 2000 美元^[2]。番红花除作药用外, 同时还作染料、天然色素和香料。流行病学调查表明, 西班牙一些地区心血管疾病发病率低, 可能与该地人几乎每天都食用不少番红花有关^[3]。值得强调指出的是, 一些学者发现西红花甙能保护 AFB₁(黄曲霉毒素 B₁)引起的大鼠肝损害^[4,5]和对小鼠实体瘤生长的抑制作用^[6,7], 并降低化疗药物的毒副反应^[7]。

番红花中主要含西红花甙类化合物, 为一种水溶性胡萝卜素化合物, 即西红花酸(Crocetin)与不同糖结合的一系列酯甙, 西红花甙-I 是甙类化合物中的主成分, 约占四分之三。目前, 国内外以西红花甙或其甙-I 的含量高低来衡量番红花的质量优劣。八十年代, 我国番红花主要依赖进口, 后虽经引种栽培成功, 但货源奇缺, 价格昂贵依旧。作者已成功从梔子果实中提取分离了西红花甙及其甙-I, 该甙-I 理化性质、光谱色谱分析、药理作用证明了其与番红花中提取成分相一致。

目前, 关于西红花甙定量分析方法有: 对比法^[8]、比色测定法^[9]、分光光度法^[10]、薄层紫外扫描法^[11]等。作者建立了以西红花甙-I 为基准对照物, 甲醇-0.5%醋酸液(50:50)作流动相, 可见-紫外检测的西红花甙的高效液相色谱定量法, 首次用于其提取物及各种制剂的含量测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-6A 单柱塞往复泵。SPD-6AV 紫外可见分光光度检测器。CTO-6A 柱温箱。SCL-6A 系统控制器, 均为日本岛津公司产品。7125 进样阀(20 μl 进样管), 美国 RHEODYNE 公司产品。

1.2 药品

西红花甙: 从梔子(*Gardenia jasminoides* Ellis)果实中提取分离, 我室自制, 为暗红色粉末, 含量为 55.6%, 其中含甙-I 37.1%; 西红花甙-I 标准对照品, 为我室自行分离精制, 经紫外、红外、核磁和质谱等确证, 含量为 97.8%。

1.3 试剂

甲醇: 分析纯, 上海振兴化工厂产品, 冰

醋酸: AR 蒸馏水, 我校药厂生产。

2 色谱条件

固定相选用 Shim-pack CLC-ODS 柱(150 × 6.0 mm I. D., 10 μm), 前加一根预柱(Zorbax DIOL) 流动相选用甲醇-0.5%冰醋酸(50 : 50), 流速为 0.8 ml/min, 检测波长 440 nm, 纸速 1 cm/min, 进样量 20 μl。

3 样品的含量测定

3.1 标准曲线的制备

精密称定 4.0 mg 西红花甙-1 对照品, 置于 50 ml 容量瓶中, 加入甲醇约 25 ml 振摇, 使溶解, 再加入甲醇定容, 作贮备液。准确吸取 25.0, 40.0, 55.0, 70.0, 85.0, 100.0 μl 贮备液分别置于 2 ml 容量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀精密吸取 20 μl 进样, 以测定液浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 求得回归方程。

标准曲线的回归方程: $A = 6.9671 \times 10^{-4}C - 5.0115$, $r = 0.9998$ ($n = 5$), 线性范围 1.02 ~ 3.48 μg。

3.2 精密度测定

取对照品液(0.2496 mg/L)精密吸取 100 μl 于 10 ml 容量瓶中, 以流动相稀释至刻度。连续进样 7 次, 进样量为 20 μl, 测定其峰面积。方法的精密度 $RSD(\%)$ 为 0.28。

在浓度为 0.66 μg/ml 和 2.64 μg/ml 两种浓度水平上测定日内和日间精密度, 结果见表 1。

Tab 1. Precision of the method in inter-day and intra-day.
 $\bar{x} \pm s, n = 5$

Concentration (μg/ml)	Inter-day		Intra-day	
	0.66	2.64	0.66	2.64
$\bar{x} \pm s$	0.69 ± 0.02	52 ± 0.08	66 ± 0.03	49 ± 0.05
$RSD(\%)$	2.89	1.19	4.54	2.00

3.3 加样回收率测定

称取供试品(梔子果实提取物), 精密称定, 53.4 mg, 于 100 ml 容量瓶中, 加甲醇适

量, 使其溶解, 加甲醇至刻度定容(0.534 mg/ml), 得溶液(1), 精密吸取(1)溶液 100 μl 于 10 ml 容量瓶中, 以流动相稀释至刻度, 进样测定。

另外分别称取原料 5 份约 25 mg(精密称定), 于 100 ml 量瓶中, 再称对照品西红花甙-1 约 6.25 mg(精密称定)5 份, 分别加入上述 100 ml 量瓶中, 加甲醇适量, 使其溶解, 再加甲醇至刻度定容, 精密吸取上述溶液 100 μl 于 10 ml 量瓶中, 以流动相稀释至刻度, 测定其含量, 同法, 再作一个低浓度, 结果见表 2。

Tab 2. The recovery of crocin-1, $n = 5$

Number	Added, mg	Found, mg	Recovery, %	Average, %	RSD%
1	6.608	6.734	101.9	100.1	1.3
2	7.434	7.302	98.2		
3	7.847	7.897	100.6		
4	7.847	7.856	100.1		
5	7.021	7.011	99.9		
1'	1.652	1.680	107.1	101.4	3.4
2'	2.065	1.735	105.0		
3'	2.065	2.109	102.1		
4'	1.234	1.181	95.7		
5'	1.734	1.777	102.5		

3.4 稳定性实验

取对照品液(0.2496 mg/l), 精密吸取溶液 100 μl 于 10 ml 量瓶中, 以流动相稀释至刻度, 每隔一定时间进样, 测定其峰面积。结果见表 3, 实验结果表明本品稀释后宜在 2 h 内测定。

Tab 3. Stability test of crocin-1

Time number	Peak area			
	2	4	8	24
1	114628	112345	106576	105644
2	105385	105167	104959	103262
3	128632	129015	129512	130137
4	105187	106038	105132	102223
5	109367	115432	106756	104465
$\bar{x}$	112639.8	113599.4	110607	109146.2
RSD	1.7%			

4 栀子提取物中西红花甙-1 的含量测定

将栀子果实提取物约 50 mg, 精密称定, 于 100.0 ml 容量瓶中, 加甲醇适量, 振摇, 使其溶解, 再加甲醇至刻度, 定容。用微量注射

器准确吸取 100.0 μ l, 于 10.0 ml 容量瓶中, 用流动相稀释定容, 摇匀后进样, 同一工艺生产的 10 个批号的测定结果见表 4。对照品西红花甙-1 和甙-2 栀子果实提取物的色谱图见图 1。

Tab 4. Analysis of 10 batch samples. $n=10$.

Batch	920618	921018	921206	921226	930328	930418	930504	930424	930510	930516
content	26.57	25.33	26.51	25.71	25.42	25.31	25.20	26.52	25.41	25.34
$\bar{x}$		25.73			RSD%		0.57%			

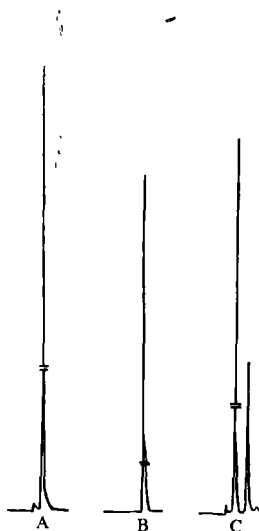


Fig 1. Chromatogram of crocin-1, crocin-2 standard and crocins sample

A: Crocin-1 standard; B: Crocin-2 standard; C: Crocins sample

5 讨论

目前, 有关西红花质量分析方法主要有对比法、比色测定法、分光光度法和薄层扫描法, 对比法和比色测定法因其固有的缺点, 基本不用于西红花的质量考察; 薄层扫描法尽管简便迅速, 但因点样和展开的误差、斑点定位和斑点因素的影响, 其准确度和精密度难以满意。贾宗才^[8]对进口和国产西红花质量进行考察后提出, 西红花 30 mg 甲醇提取液稀释 1000 倍后, 最大吸收波长均在 458 ± 1 nm 和 432 ± 1 nm, 质优品的吸光度均在 0.4

以上; 中国药典 1990 版规定 $A_{432 \text{ nm}}$ 应不低于 0.5, 显而易见, 这是一种限度试验, 不能明确定量; 金蓉鸾等^[11]以西红花甙-1 为基准物, 用分光光度法在波长 432 nm 测定西红花中总甙含量, 虽较好地解决了西红花甙的定量问题, 但西红花除了含甙类[甙-1 (crocin-1, α -crocin, β -digitobiobiose ester of crocetin), 甙-2 (crocin-2, β -monogentiobioside- β -D- monoglucoside ester of α -crocetin) 甙-3 和甙-4 外, 还含有西红花二甲酯(cis-crocetin dimethylester)和西红花酸(α -crocetin)等, 并在 432 nm 处也有吸光度。由此分光光度法测定依然不完全是甙类的含量。本文建立的以西红花甙-1 为对照品, 测定西红花甙中含量最高的甙-1 (14% 以上) 的高效液相色谱方法, 显然具有选择性强、准确性高、重复性好的特点。

西红花甙是由多个不饱和烯酸与糖结合而成, 极性很大, 易溶于水和极性高的溶剂。本文采用甲醇-0.5% HAc (50:50) 为流动相, 选用 0.5% HAc, 可以抑制甙中糖上酚醛基的氢离子解离, 从而减小拖尾, 使其出峰敏锐, 改善各峰的分离度。如果采用 A 液-甲醇从 20%-80% 线性梯度洗脱, 可以将西红花甙-1、甙-2、甙-3 和甙-4 完全分离, 以西红花甙-1 为基准物, 这样可以用 HPLC 法测西红花甙即总甙的含量。

HPLC 法测定西红花甙-1 或甙类含量的方法建立, 为西红花和栀子果实药物质量控制、其提取物中西红花甙的含量测定及其各

种药物制剂、天然着色剂和化妆品的质量分析等提供了一种准确、快速的测定方法。

参考文献

- 1 徐国钧主编. 生药学, 北京: 人民卫生出版社, 1988; 422
- 2 Sujata V. Ravishankar GA and Venkataraman LV. Methods for the analysis of saffron metabolites crocin, crocetin and saffranal for the determination of the quality of the spice using thin-layer chromatography high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 1992, 624: 497
- 3 倪学斌. 西红花研究概况. *中草药* 1992, 23(2): 100
- 4 Wang C.J. Effects of crocetin on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of AFB1 in rats. *Carcinogenesis*, 1991, (EYNSHAM) 12(3): 459
- 5 Wang C.J. Suppression of aflatoxin B1-induced hepatotoxic lesions by crocetin Carcinogenesis, (EYNSHAM), 1991. 12 (10): 1807
- 6 Nair SC. panikkar, B. and Panikkar K R. Antitumor activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Lett* 1991, 57: 109
- 7 Nair, S. C. and Panikkar, K. R. Protective effects of crocetin on the bladder toxicity induced by cyclophosphamide. *Cancer bioterapy*, 1993, 8(4): 339
- 8 贾宗才. 番红花的质量考察. *中药通报*, 1984, 9(2): 11
- 9 木村雄四郎, 西川洋一. *药学杂志*, 1993, 73(1): 25
- 10 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 103
- 11 金蓉鸾, 乔中平, 周素娣等. 番红花质量研究. *南京药学院学报*. 1986, 17(1): 245

Determination of Crocin- I by HPLC

Qian Zhiyu, Fu Jian, Peng Buyun

Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract The colouring components of saffron are crocins, which are unusual water-soluble carotenoids (glycosyl esters of crocetin). The major components are a crocin- I (β -digentiobiosyl ester of α -crocetin, ($C_{44}H_{64}O_{24}$, 8,8'-diapo- Ψ' , Ψ' -carotenedioic acid bis (6-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl) ester). A liquid chromatography method has been developed for determination of the quality of the medicinal materials preparations and the extracts containing crocins. The experimental conditions of HPLC were as follows: Shin-Pack CLC-ODS column (150 $\times$ 6.0 mm I. D., 10 μ m); mobile phase: methanol-0.5% acetic acid solution (50 : 50); wavelength of detection UV440 nm, column temperature of 40 $^{\circ}$ C, and flow-rate of 0.5 ml/min. The precision of the method was 0.91% (RSD) and the recovery of the method was $>99\%$. HPLC was most suitable for the detection of crocins and was simple and more efficient for qualitative analysis.

Key words *Crocus sativus* L.; crocins; crocin- I; HPLC