

泽泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的HPLC指纹图谱比较^Δ

林文津*, 徐榕青, 张亚敏, 李主泉, 张园秀 (福建省医学科学研究院/福建省医学测试重点实验室, 福州 350001)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2535-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.13

摘要 目的:建立并比较泽泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的高效液相色谱指纹图谱。方法:色谱柱为Inertsil ODS-SP(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(80:20, V/V),检测波长为208 nm,流速为0.4 ml/min。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对10批样品的相似度进行评价。结果:泽泻醇提取物指纹图谱的共有峰有13个,最大峰为14号峰;泽泻超临界CO₂萃取物指纹图谱的共有峰有16个,最大峰为12号峰(23-乙酰泽泻醇B)。10批样品的相似度均>0.900。结论:该方法稳定性、精密度、重复性较好,可为泽泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的鉴别及质量控制提供依据。

关键词 泽泻;醇提取物;超临界CO₂萃取物;高效液相色谱法;指纹图谱

Comparison of HPLC Fingerprints of Ethanol Extract Versus Supercritical CO₂ Extract from *Alisma orientalis*
LIN Wen-jin, XU Rong-qing, ZHANG Ya-min, LI Zhu-quan, ZHANG Yuan-xiu (Fujian Academy of Medical Sciences, Fujian Key Laboratory of Medical Measurement, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop and compare HPLC fingerprints of ethanol extract vs. supercritical CO₂ extract from *Alisma orientalis*. METHODS: The separation was performed on Inertsil ODS-SP column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase composed of acetonitrile-water (80:20, V/V) at flow rate of 0.4 ml/min. The detection wavelength was set at 208 nm. The similarity of 10 batches of samples was evaluated by using *TCM Fingerprints Similarity Evaluation System* (2004 A edition). RESULTS: There were 13 common peaks in fingerprints of ethanol extract from *A. orientalis*, and the largest peak in the fingerprint was No.14; there were 16 common peak in the fingerprints of supercritical CO₂ extract from *A. orientalis*, and the largest peak in the fingerprint was No.12 (which identified as 23-acetate alisol B). The similarity of 10 batches of samples was more than 0.900. CONCLUSIONS: The method is stable, accurate and reproducible, which provide reference for the identification and quality control of ethanol extract vs. supercritical CO₂ extract from *A. orientalis*.

KEYWORDS *Alisma orientalis*; Ethanol extract; Supercritical CO₂ extract; HPLC; Fingerprint

泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎,性寒,味甘、淡,入肾、膀胱经,具有利水渗湿、泄热、

化浊降脂的功效,临床用于治疗小便不利、水肿胀满、泄泻尿少、痰饮眩晕、热淋涩痛、高脂血症^[1]。现代医学研究表明,泽

综上所述,采用HPLC法同时测定参芎胃安颗粒中芍药苷和黄芩苷的含量,既比分开测定缩短了分析时间,提高了工作效率,还节约了流动相,减少了污染。本方法简便、快速、准确、灵敏度、专属性强,可用于参芎胃安颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 王松坡,张存钧,蒋勇,等.“萎胃安”对慢性萎缩性胃炎PCNA、P21ras表达的影响[J].上海中医药杂志,2006,40(9):35.
- [2] 李向阳,屠万倩,张留记.RP-HPLC法测定不同产地的牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的含量[J].中药新药与临床药理,2011,22(5):563.
- [3] 凌明,马安宇.HPLC测定胃肠合剂中芍药苷和黄芩苷的含量[J].中成药,2008,30(9):1311.

- [4] 周桂芳,夏建洪,凌明.HPLC法同时测定肠肛舒口服液中药药苷和黄芩苷的含量[J].中国药房,2007,18(24):1876.
- [5] 何建雄,赖小平,魏刚,等.HPLC测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷、黄芩苷[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):48.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:282.
- [7] 滕宇,卢静华.RP-HPLC法同时测定地榆槐角丸中芍药苷、橙皮苷和黄芩苷[J].中成药,2013,35(9):1929.
- [8] 刘阿静,齐广才,刘珍叶,等.RP-HPLC法测定防风通圣丸中芍药苷、栀子苷、黄芩苷和连翘苷的含量[J].西北药学杂志,2012,27(5):415.
- [9] 杨燕飞.RP-HPLC同时测定坤泰胶囊中芍药苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量[J].中成药,2010,32(6):958.

Δ 基金项目:国家自然科学基金(青年科学基金)资助项目(No.81102875);福建省科技计划项目(No.2013R0034-3)

* 副研究员。研究方向:中药资源开发利用与新药研发。电话:0591-87514999。E-mail:lwj680@139.com

(收稿日期:2013-07-03 修回日期:2014-01-06)

泻提取物具有降血脂、降血糖、抑制尿结石生成等作用^[2]。泻化学成分以萜类为主,且以三萜类为其主要成分,还含有倍半萜及二萜类等成分;另含挥发油(内含糖醛)、少量生物碱、天门冬素、植物甾醇、植物甾醇苷、脂肪酸,还含树脂、蛋白质和多种淀粉^[3]。关于泻指纹图谱的研究已有文献报道^[4-9],但未见泻超临界流体萃取物指纹图谱的报道。本试验采用高效液相色谱(HPLC)法建立了泻醇提取物、超临界CO₂萃取物的HPLC指纹图谱,并比较了泻这两种提取物化学成分种类及含量上的差异,可为制定泻标准提取物制备工艺提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪(日本岛津公司);HA220-50-06型超临界CO₂萃取装置(南通市华安超临界萃取有限公司);AL204型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];5L/H50w型超纯水机(重庆艾科浦有限公司);TYSP-100型高速多功能粉碎机(永康市红太阳机电有限公司)。

1.2 试剂

23-乙酰泻醇B对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111846-201102);乙腈为色谱纯,乙醇为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

泻药材于2012年3月购自福建省建瓯市吉阳镇泻药材GAP基地,经建瓯市吉阳镇农技站葛培盛高级农艺师鉴定为泻科植物泻*A. orientalis*(Sam.) Juzep.的干燥块茎。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取23-乙酰泻醇B对照品适量,加乙腈溶解,摇匀,制成每1 ml含1.05 mg 23-乙酰泻醇B的溶液,即得。

2.2 泻醇提取物的制备

精密称取泻粗粉50 g,置于圆底烧瓶中,加入12倍量的85%乙醇,加热回流提取2次,每次40 min,滤过,合并续滤液,转入旋转蒸发器中,减压浓缩成浸膏,即得。共制备10批。

2.3 泻超临界CO₂萃取物的制备

精密称取泻粗粉200 g,装入1 L的萃取罐中,萃取温度45℃,萃取压力25 MPa,萃取2 h,从解析釜中收集萃取物,即得。共制备10批。

2.4 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-SP(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(80:20, V/V);流速:0.4 ml/min;检测波长:208 nm;柱温:室温;进样量:20 μl。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 吸取同一泻醇提取物供试品溶液适量,按上述色谱条件连续进样测定6次,进样量为20 μl。结果,各共有峰相对保留时间的RSD≤0.20%,相对峰面积的RSD≤0.75%,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.5.2 重复性试验 吸取同一泻醇提取物供试品溶液适量,共6份,分别按上述色谱条件进样测定。结果,各共有峰相对保留时间的RSD≤0.83%,相对峰面积的RSD≤9.65%,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一份泻醇提取物供试品溶液20 μl,按上述色谱条件分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定。结

果,各共有峰相对保留时间的RSD≤0.80%,相对峰面积的RSD≤9.40%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 共有峰的确定 10批泻醇提取物各取40 mg、超临界CO₂萃取物各取10 mg,精密称定,分别用乙腈溶解并定容至10 ml量瓶中,按上述色谱条件进样测定。将测定结果导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版),选择相对含量较高,并且匹配数目为10的峰作为共有指纹峰。通过与对照品比对,确定12号峰(23-乙酰泻醇B)为参照峰(S)。泻醇提取物、超临界CO₂萃取物的HPLC图分别见图1(“*”表示仅在部分批次醇提取物中存在该峰)、图2。

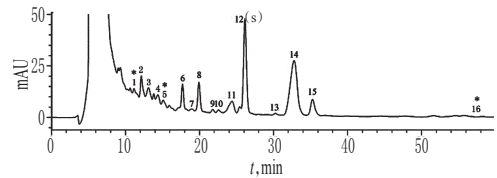


图1 泻醇提取物的HPLC图

Fig 1 HPLC fingerprints of ethanol extract from *A. orientalis*

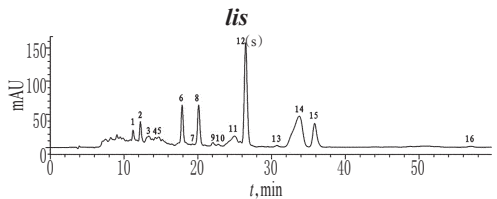


图2 泻超临界CO₂萃取物的HPLC图

Fig 2 HPLC fingerprints of supercritical CO₂ extract from *A. orientalis*

2.6.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对10批泻醇提取物、超临界CO₂萃取物进行相似度比较,得到泻醇提取物、超临界CO₂萃取物的对照指纹图谱(见图1、图2)。结果显示,泻醇提取物对照指纹图谱共有13个峰,超临界CO₂萃取物对照指纹图谱共有16个峰。10批泻醇提取物、超临界CO₂萃取物的HPLC叠加指纹图谱分别见图3、图4;相似度分析结果分别见表1、表2;泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的HPLC图共有峰比较见图5(“*”表示该共有峰仅在超临界CO₂萃取物中存在;“#”表示醇提取物此共有峰面积大于超临界CO₂萃取物)。

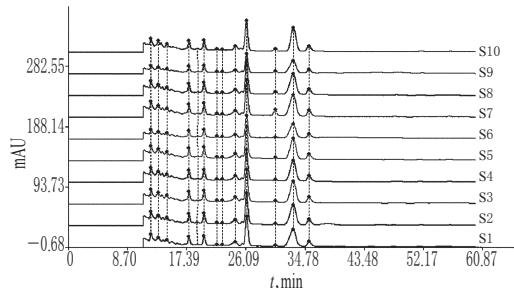


图3 10批泻醇提取物的HPLC叠加指纹图谱

Fig 3 Superimposed HPLC fingerprints of ethanol extract from *A. orientalis*

3 讨论

从泻醇提取物、超临界CO₂萃取物HPLC指纹图谱共有峰的峰数、峰形、峰位等可以看出,泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的HPLC指纹图谱非常相似,只是峰的大小上有较大差异。

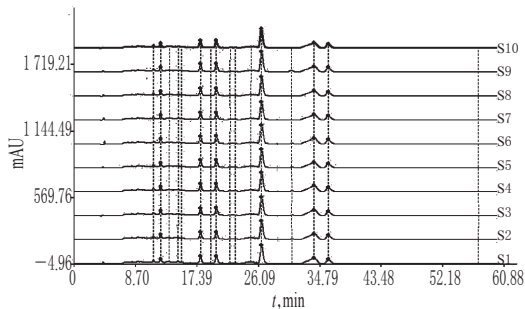


图4 10批泽泻超临界CO₂萃取物的HPLC叠加指纹图谱
Fig 4 Superimposed HPLC fingerprints of supercritical CO₂ extract from *A. orientalis*

表1 10批泽泻醇提取物HPLC指纹图谱的相似度分析结果
Tab 1 Similarity of HPLC fingerprints of ethanol extract from 10 batches of *A. orientalis*

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.992	S6	0.997
S2	0.992	S7	0.993
S3	0.997	S8	0.997
S4	0.996	S9	0.997
S5	0.997	S10	0.924

表2 10批超临界CO₂萃取物HPLC指纹图谱的相似度分析结果

Tab 2 Similarity of HPLC fingerprints of supercritical CO₂ extract from 10 batches of *A. orientalis*

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.942	S6	0.999
S2	0.999	S7	0.999
S3	0.999	S8	0.996
S4	0.999	S9	0.993
S5	0.999	S10	0.991

特别是1、5、16号共有峰仅在超临界CO₂萃取物中出现,醇提取物的7号峰大于超临界CO₂萃取物。但这是10批样品色谱图叠加分析的结果,每批样品色谱图结果并不完全符合这一规律,因为个别批次的醇提取物也存在1、5、16号峰,个别批次超临界CO₂萃取物的7号峰也有大于醇提取物的。

从图1、图2可以看出,泽泻醇提取物的HPLC图有很大的溶剂峰,而泽泻超临界CO₂萃取物则基本没有。为排除溶剂峰的干扰,相似度分析时将醇提取物的HPLC数据从10 min以后进行分析比较。值得一提的是,从图5及每批次提取物分析结果可以看出,各批次样品超临界CO₂萃取物最大峰均为12号峰(23-乙酰泽泻醇B),而醇提取物最大峰均为14号峰,这一显著区别可用于鉴别泽泻醇提取物与超临界CO₂萃取物。至于14号峰具体是什么成分,以及为何会有此区别,有待于下一步深入研究。

从图5可以看出,针对12号峰(23-乙酰泽泻醇B)的峰面积,超临界CO₂萃取物明显高于醇提取物,所以超临界CO₂萃取

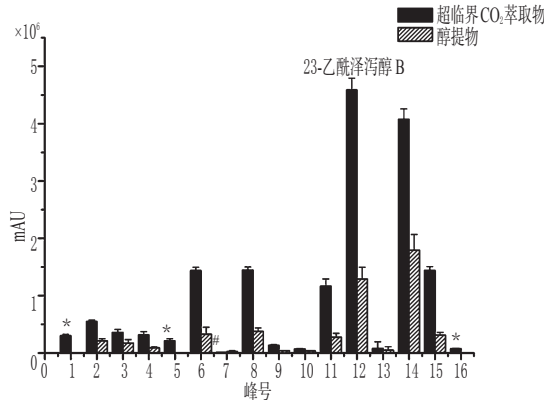


图5 泽泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的HPLC图共有峰比较

Fig 5 Comparison of common peak of HPLC fingerprints between ethanol extract and supercritical CO₂ extract from *A. orientalis*

法在提取23-乙酰泽泻醇B上明显优于醇提法。此外,从这10批次泽泻醇提取物、超临界CO₂萃取物的指纹图谱及相似度分析结果可以发现,不同批次样品间的峰数、峰形及峰面积大小基本相同,相似度均在0.900以上,说明所制备的提取物质量稳定。

综上所述,本方法稳定性、精密性、重复性较好,可为泽泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的鉴别及质量控制提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:212.
- [2] 林文津, 张亚敏, 徐榕青, 等. 泽泻提取物的药理作用及制备工艺研究进展[J]. 中国药房, 2009, 20(9):710.
- [3] 罗兰. 泽泻质量评价研究进展[J]. 海峡药学, 2012, 24(10):50.
- [4] 刘红昌, 杨文钰, 陈兴福. 四川地道药材泽泻指纹图谱的建立及其质量研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18):1844.
- [5] 巩丽萍, 王少云, 张克. 泽泻饮片的HPLC-ELSD指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(6):461.
- [6] 张敏娜, 王少云. 泽泻药材的GC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2007, 38(9):1406.
- [7] 谢普, 毕开顺, 俞悦, 等. 泽泻的双波长HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(10):1712.
- [8] 林文津, 徐榕青, 张亚敏. 泽泻提取物HPCE指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2010, 7(6):495.
- [9] 刘文琴, 周丽姣, 罗金龙, 等. 基于指纹图谱探讨泽泻不同炮制饮片的成分差异[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4):78.

(收稿日期:2013-07-27 修回日期:2013-09-12)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅