

HPLC-DAD-ELSD 测定泽泻药材中 4 种三萜类成分含量

丘建芳¹, 林婧², 许文¹, 黄鸣清¹, 赵万里¹, 罗奋熔¹, 李小艳¹, 吴水生^{1*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122;
2. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福州 350122)

[摘要] 目的: 建立泽泻药材中 23-乙酰泽泻醇 C、泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B 4 个三萜类成分的 HPLC-DAD-ELSD 同时测定的定量分析方法。方法: 采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(65:35), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 二极管阵列检测器检测波长 245 nm, 蒸发光散射检测器的漂移管温度 60 °C, 雾化器温度 55 °C, 气体(氮气)压力 20 psi, 柱温 30 °C。结果: 23-乙酰泽泻醇 C、泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B 4 个成分的线性范围分别为 1.869 ~ 29.90 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$), 3.731 ~ 74.62 mg·L⁻¹ ($r=0.9997$), 8.653 ~ 138.4 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$), 4.832 ~ 77.31 mg·L⁻¹ ($r=0.9995$), 平均加样回收率分别为 98.78% (RSD 2.63%), 98.05% (RSD 2.72%), 98.26% (RSD 2.86%), 97.65% (RSD 2.95%)。结论: 建立的 HPLC-DAD-ELSD 定量分析方法简便、快捷、准确, 可用于泽泻药材的多成分定量分析, 为综合评价泽泻的质量提供一种新的技术手段。

[关键词] 泽泻; 三萜; 高效液相色谱法-二极管阵列检测器-蒸发光检测器; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0042-05

[doi] 10.11653/syfyj2014020042

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131107.1026.001.html>

[网络出版时间] 2013-11-07 10:26

HPLC-DAD-ELSD Simultaneous Determination of Four Triterpenoids in Rhizoma Alismatis

QIU Jian-fang¹, LIN Jing², XU Wen¹, HUANG Ming-qing¹, ZHAO Wan-li¹,
LUO Fen-rong¹, LI Xiao-yan¹, WU Shui-sheng^{1*}

(1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;
2. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective:** An analytical method was developed for simultaneously determining alisol C 23-acetate, alisol A, alisol B, alisol B 23-acetate four triterpenoids in the rhizoma of *Alisma orientalis*. **Method:** The assay was performed on a Ultimate XB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile-water (65:35) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was at 30 °C and the optimum detection wavelength of DAD was set at 245 nm. The drift tube and atomizer temperature of ELSD were 60, 55 °C, with a carrier gas (N₂) pressure of 20 psi. **Result:** The linear range of alisol C 23-acetate, Alisol A, alisol B and alisol B 23-acetate were 1.869-29.90 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$), 3.731-74.62 mg·L⁻¹ ($r=0.9997$), 8.653-138.4 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$), 4.832-77.31 mg·L⁻¹ ($r=0.9995$), respectively. The average recoveries ($n=6$) were 98.78% (RSD 2.63%), 98.05% (RSD 2.72%), 98.26% (RSD 2.86%) and 97.65% (RSD

[收稿日期] 20130422(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(U1205022); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI01B06); 福建省科技厅重大科技专项(2009YZ0001-1-5)

[第一作者] 丘建芳, 在读硕士, 从事中药物物质基础研究, Tel:15806018723, E-mail:uu660538@qq.com

[通讯作者] * 吴水生, 教授, 博士生导师, 从事中药复方物质基础与药效相关性研究, Tel:0591-22861135, E-mail:wsstem@yahoo.cn

2.95%) respectively. **Conclusion:** The HPLC method is simple, rapid and accurate. This HPLC-DAD-ELSD verified method can be used for quantitative analysis of multi-component of Rhizoma Alismatis and provides a novel approach for evaluation of the quality of Rhizoma Alismatis comprehensively.

[**Key words**] Rhizoma Alismatis; triterpenoids; HPLC-DAD-ELSD; quality control

泽泻为泽泻科植物泽泻的干燥块茎,甘、淡、寒,归肾、膀胱经,功能利水渗湿,泄热,化浊降脂;用于小便不利,水肿胀满,泄泻尿少,痰饮眩暈,热淋涩痛,高脂血症^[1]。从20世纪60年代起至今,国内外学者从泽泻中分离得到的化学成分有近百种^[2],以萜类成分为主,其中又以原萜烷型四环三萜类成分为主。泽泻中三萜类化合物是其利尿、降血脂、抗动脉粥样硬化的主要有效成分^[3-4],但是其不够稳定,在不同产地、不同加工炮制方法下其三萜类成分容易相互转化^[5-7],在体内也容易发生相互转化^[8-9],均可能发挥药效活性,所以建立多指标的质量评价更具科学性。对泽泻中三萜类化合物的定量分析方法已有 HPLC-UV, HPLC-ESLD 方法被报道^[10-11],但泽泻活性三萜类化合物除了23-乙酰泽泻醇C类等少数化合物有较好紫外吸收外^[12],多数三萜类为末端吸收,采用 HPLC-UV 测定,波长一般多选择208 nm,杂质峰多,基线不稳,影响含量测定结果。本试验建立 HPLC-DAD-ELSD^[13]对泽泻药材中23-乙酰泽泻醇C(Alisol C 23-acetate)、泽泻醇A(Alisol A)、泽泻醇B(Alisol B)及23-乙酰泽泻醇B(Alisol B 23-acetate)4个成分含量进行同时测定,并用该方法对主产地闽产和川产泽泻药材进行对比评价,将有助于泽泻药材的标准化种植及道地药材的质量控制。

1 仪器与试剂

Waters 2695 Alliance 系统(包括四元泵、真空在线脱气机、自动进样器、Waters2998 二极管阵列检测器、Empower 工作站、Waters2420 蒸发光散射检测器),DV215CD 型1/10万分析天平(奥豪斯公司 OHAUS),KQ-500E 型台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),乙腈为色谱纯(德国 MERCK 公司),Milli-Q 型超纯水仪,其余试剂均为分析纯。

对照品23-乙酰泽泻醇C、泽泻醇A、泽泻醇B及23-乙酰泽泻醇B由本实验室柱色谱分离制备。¹H,¹³C,NMR 和 MS 数据与文献^[12]比较确认,纯度经 HPLC-UV 和 HPLC-ELSD(面积归一法)检测含量均>99.5%。

20批泽泻干燥块茎生药于2012年1月到2013年3月,分别采自福建建瓯GAP产地10批、四川灌县、乐山各2批、四川彭山、眉山各3批,20批次泽

泻样品经福建中医药大学药用植物实验室范世明高级实验师鉴定,均为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Samuels) Juzep. 的干燥块茎,样本存放于福建中医药大学药学院药用植物标本室。

2 方法与结果

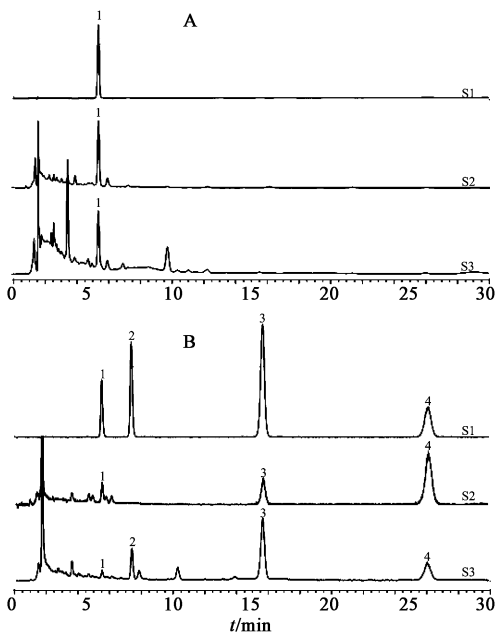
2.1 色谱条件 采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相乙腈-水(65:35),柱温30℃,流速1.0 mL·min⁻¹,DAD 检测波长245 nm,蒸发光散射检测器的漂移管温度60℃,雾化器温度55℃,气体(氮气)压力20 psi,柱温30℃,进样量10 μL。

2.2 对照品溶液制备 取23-乙酰泽泻醇C、泽泻醇A、泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇B对照品适量,精密称定,加入乙腈分别制备含233.60,233.20,270.40,241.60 mg·L⁻¹的单一对照品储备液。其他不同质量浓度的对照品溶液由乙腈稀释储备液得到。

2.3 供试品溶液制备 对泽泻分别进行处理,取泽泻药材粉碎,过60目筛得泽泻药材粉末。取泽泻0.8 g,精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入乙腈25 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用乙腈补足减失重,摇匀,滤过,取续滤液,即得。按2.1项下色谱条件测定,结果该条件下色谱峰分离良好,见图1。

2.4 测定方法 分别吸取对照品溶液、供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,采用外标法计算即得。

2.5 线性关系考察 取2.2项下方法制备的各对照品储备液,用乙腈稀释,配成23-乙酰泽泻醇C质量浓度分别为1.869,3.738,7.475,11.21,18.69,26.16,29.90 mg·L⁻¹,泽泻醇A质量浓度分别为3.731,7.462,14.92,22.39,37.31,52.24,59.70,74.62 mg·L⁻¹,泽泻醇B质量浓度分别为8.653,17.31,34.611,51.92,86.53,121.1,138.4 mg·L⁻¹,23-乙酰泽泻醇B质量浓度分别为4.832,9.664,19.33,28.99,48.32,67.65,77.31 mg·L⁻¹的7种系列对照品混合溶液。精密吸取10 μL,依次注入液相色谱仪,按2.1项下色谱条件测定峰面积,对于23-乙酰泽泻醇C以峰面积(Y)对分析物浓度(X)作



A. HPLC-DAD; B. HPLC-ELSD;

S1. 对照品; S2. 福建建瓯; S3. 四川彭山;

1. 23-乙酰泽泻醇 C; 2. 泽泻醇 A; 3. 泽泻醇 B; 4. 23-乙酰泽泻醇 B

图1 泽泻药材色谱

线性回归,对于泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B,以峰面积的对数值对分析物浓度的对数值作线性回归,结果见表1。

2.6 精密度试验 精密吸取同一份对照品混合溶液 10 μL,在 2.1 项色谱条件下连续进样 6 次,记录 23-乙酰泽泻醇 C、泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B 的峰面积,其峰面积的 RSD 分别为 0.89%、2.30%、2.11%、2.23%,表明精密度良好。

2.7 稳定性试验 按 2.3 项下制备一份供试品,取该供试品溶液分别于 0、2、6、10、12、24 h 进样 10 μL,记录 23-乙酰泽泻醇 C、泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B 的峰面积,其峰面积的 RSD 分别为 1.91%、2.73%、2.35%、2.50%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验 精密称取同一批泽泻样品(四川彭山)6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,依法测定峰面积,记录 23-乙酰泽泻醇 C、泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B 的峰面积,其峰面积的 RSD 分别为 2.32%、2.51%、2.60%、2.75%,表明重复性良好。

表1 泽泻中 4 种三萜类成分线性关系

分析物	回归方程	r	线性范围/mg·L ⁻¹
23-乙酰泽泻醇 C	$Y = 1.959 \times 10^4 X - 8 258$	0.999 8	1.869 ~ 29.90
泽泻醇 A	$\log Y = 1.402 \log X + 4.072$	0.999 7	3.731 ~ 74.62
泽泻醇 B	$\log Y = 1.401 \log X + 3.884$	0.999 9	8.653 ~ 138.4
23-乙酰泽泻醇 B	$\log Y = 1.360 \log X + 3.966$	0.999 5	4.832 ~ 77.31

2.9 回收率试验 精密称取 2.8 项下已知含量的泽泻粉末(四川彭山)6 份,约 0.4 g,精密加入近似

等量的 4 种对照品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,依法测定含量,结果见表 2。

表2 泽泻 4 个三萜回收率试验(n=6)

组分	样品中含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %	组分	样品中含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
23-乙酰泽泻醇 C	80.90	80.55	160.70	99.07	98.78	2.63	泽泻醇 B	897.59	811.20	1 699.86	98.90	98.26	2.86
	80.22	80.55	160.59	99.78				890.04	811.20	1 698.00	99.60		
	80.64	80.55	156.10	93.68				899.00	811.20	1 649.85	92.56		
	80.16	80.55	159.88	98.97				889.38	811.20	1 699.76	99.90		
	80.58	80.55	161.44	100.38				894.04	811.20	1 697.93	99.10		
	80.72	80.55	161.91	100.79				895.59	811.20	1 702.73	99.50		
泽泻醇 A	248.77	233.20	478.24	98.40	98.05	2.72	23-乙酰泽泻醇 B	600.68	604.00	1 195.02	98.40	97.65	2.95
	246.68	233.20	478.48	99.40				595.63	604.00	1 192.99	98.90		
	247.97	233.20	464.14	92.70				598.75	604.00	1 153.83	91.90		
	246.49	233.20	479.23	99.80				595.19	604.00	1 198.58	99.90		
	247.78	233.20	477.95	98.70				598.31	604.00	1 193.25	98.50		
	248.21	233.20	479.78	99.30				599.35	604.00	1 193.08	98.30		

2.10 样品含量测定 分别精密称取不同批次的20个泽泻样品粉末0.8 g,按2.3项下方法制备供试品溶液,进样10 μL测定峰面积,根据标准曲线计算其含量,结果见图3,表3。

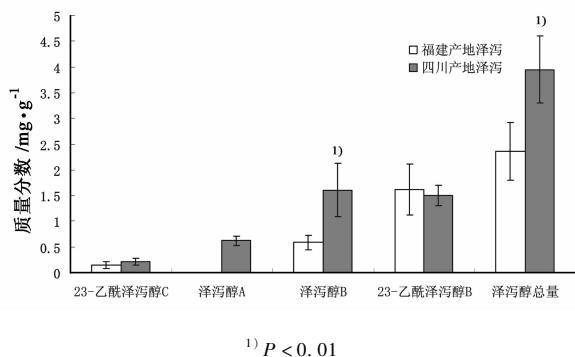


图3 两种产地泽泻4种三萜含量比较

表3 泽泻药材中4个三萜类成分的含量

No.	样品产地	23-乙酰泽泻醇 C	泽泻醇 A	泽泻醇 B	23-乙酰泽泻醇 B	合计
1	福建建瓯1(块茎)	0.216	-	0.641	1.778	2.635
2	福建建瓯2(块茎)	0.116	-	0.645	1.698	2.459
3	福建建瓯3(块茎)	0.257	-	0.649	1.114	2.020
4	福建建瓯4(块茎)	0.162	-	0.682	1.555	2.399
5	福建建瓯5(块茎)	0.147	-	0.715	1.826	2.688
6	福建建瓯6(块茎)	0.189	-	0.632	1.307	2.128
7	福建建瓯7(块茎)	0.128	-	0.399	1.484	2.011
8	福建建瓯8(块茎)	0.203	-	0.441	1.869	2.513
9	福建建瓯9(块茎)	0.058	-	0.333	0.818	1.210
10	福建建瓯10(块茎)	0.055	-	0.739	2.729	3.523
11	四川灌县1(块茎)	0.232	0.641	2.097	1.562	4.532
12	四川灌县2(块茎)	0.189	0.677	1.908	1.648	4.422
13	四川乐山1(块茎)	0.179	0.714	1.127	1.638	3.658
14	四川乐山2(块茎)	0.264	0.536	1.244	1.850	3.893
15	四川眉山1(块茎)	0.145	0.681	1.753	1.305	3.884
16	四川眉山2(块茎)	0.124	0.659	1.872	1.483	4.138
17	四川眉山3(块茎)	0.330	0.502	0.975	1.398	3.205
18	四川彭山1(块茎)	0.200	0.615	2.219	1.485	4.519
19	四川彭山2(块茎)	0.228	0.728	2.207	1.538	4.701
20	四川彭山3(块茎)	0.293	0.443	0.681	1.081	2.499

注:“-”为未检出。

随着气体压力升高,其响应信号也降低,最终权衡考虑响应和噪音,选择漂移管温度为60℃,雾化器温度55℃,气体(氮气)压力20 psi做为ELSD检测参数。

3.3 样品测定结果分析 对于20批泽泻生药,闽产泽泻、川产泽泻生药中4种泽泻醇含量上存在较大的差异。第一,10批次建泽泻中含量最高的是23-乙酰泽泻醇B,而川泽泻中含量最高的是泽泻醇

3 讨论

3.1 检测器的选择 23-乙酰泽泻醇C,其结构中13,16,17位有共轭双键,同时16位羰基的增色作用,使其最大吸收波长在245 nm,故以DAD(245 nm)做为23-乙酰泽泻醇C检测器。而泽泻醇A、泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇B没有共轭结构,最大吸收波长在197 nm,为末端吸收,在ELSD上基线噪音明显小于DAD,故选择ELSD做为泽泻醇A、泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇B的检测器。

3.2 检测条件的选择 考察了ELSD检测器的参数,分别比较了漂移管温度为50,60,70,80,90℃,雾化器温度为55,65,75,85℃,气体(氮气)压力20,40,60 psi,结果随着漂移管温度和雾化器温度升高,其响应信号降低,但是温度过低,信号噪音较大;

B或者23-乙酰泽泻醇B。第二,闽产泽泻中泽泻醇A均没有检测出,而川产泽泻生药块茎中泽泻醇A含量较高,达0.443~0.728 mg·g⁻¹。第三,闽产泽泻泽泻醇B含量显著低于川产泽泻,而23-乙酰泽泻醇C和23-乙酰泽泻醇B在两个产地无显著性差异。第四,在4个三萜总量上,川产泽泻含量达到2.499~4.701 mg·g⁻¹,而闽产泽泻含量在1.210~3.523 mg·g⁻¹,川产泽泻总三萜平均含量显著高于

闽产泽泻。第五,考察了不同产地泽泻生品,发现泽泻醇 A 在建泽泻生药材中未被检测,而川泽泻中则含量较高,可以作为区分两个产地生药的一个依据。但是有文献报道^[5]泽泻醇 B、23 乙酰泽泻醇 B 在泽泻高温加工或者炮制饮片过程中会转化为泽泻醇 A,本次实验来源的建泽泻均为建瓯 GAP 基地泽泻,每批次的加工过程严格按照 GAP 规范操作,并未发现转化现象。该特征可以做为两大产地泽泻生药的区分依据,也提示了不同产地土质、气候等因素,将造成化学成分间的差异^[14]。同时由于泽泻三萜类化合物不够稳定,不仅在加工炮制过程中容易相互转化^[5-7],在体内也容易发生相互转化^[8-9],均可能发挥药效活性,所以建立多指标的质量评价更具科学性。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:212.

[2] 肖飞艳,冯育林,杨世林,等. 泽泻化学成分的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(5):491.

[3] 吴水生. 泽泻的药学与临床研究[M]. 北京:中国中医药出版社,2009:161.

[4] 吴水生,郭改革,施红,等. 泽泻提取物 Alisol Monoacetate A 和 B 对 HepG2 细胞株胆固醇代谢的影响[J]. 中华中医药杂志,2007,22(7):475.

[5] 郑云枫,朱玉岚,彭国平. 泽泻炮制过程中 23-乙酰泽泻醇 B 的转化[J]. 中草药,2006,37(10):1479.

[6] 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.

[7] Bolat M, Yuying Z, Bin W, et al. Stability and structure studies on alisol A 24-Acetate [J]. Chem Pharm Bull, 2008, 56(1):41.

[8] 徐飞,陈军,谷巍,等. 泽泻有效成分在模拟人体胃肠道环境中的转化研究[J]. 药物分析杂志,2011,31(11):2035.

[9] Yu Y, Li Q, Bi K, Xie P, et al. A sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for simultaneous determination of alisol A and alisol A 24-acetate from *Alisma orientale* (Sam.) Juz. in rat plasma [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 399(3):1363.

[10] 罗张炎,周爱存,张朝凤,等. HPLC 同时测定泽泻中 4 种泽泻醇成分的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(24):3306.

[11] 张敏娜,王少云,聂磊,等. HPLC-ELSD 法测定泽泻药材与饮片中 2 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(7):1068.

[12] Yoshijiro N, Yohko S, Masumi K, et al. Terpenoids of *Alisma orientale* rhizome and the crude drug *alismatic rhizoma*[J]. Phytochemistry, 1994, 36(1):119.

[13] 涂艳艳. HPLC-DAD-ELSD 测定酸枣仁分散片中 4 种成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):152.

[14] Masayuki Yoshikawa, Hisashi Matsuda. Terpenoid constituents of *Alismatic Rhizoma* Structure, biological activity, and chemical change of terpenoids during processing[J]. J Trad Med, 2002(19):119.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2014 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已相继被《中国科学引文数据库》、波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等知名检索系统收录。

本刊是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、流行病学调查、临床论著、实验研究、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学、综述等。

本刊为月刊,大 16 开国际开本,136 页,国内外公开发售,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部,邮编:100700,电话:010-64014411-3278, E-mail:Lxx@mail.cintem.ac.cn。