

HPLC 指纹图谱技术对 3 种贯叶连翘提取物制备工艺的评价

李晓坤, 刘炯, 张杰, 张华锋, 刘富岗, 杨云*

(河南中医学院药学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:比较 3 种贯叶连翘提取物制备工艺的稳定性与重复性。方法:建立提取物的 HPLC 指纹图谱,对不同批次提取物进行相似度分析、聚类分析和模式识别。结果:3 种工艺均具有良好的稳定性与重复性,且酶解后优于酶解前,纯化后优于纯化前,以酶解后经大孔树脂 LSA-10 纯化所得提取物的制备工艺为最佳。不同批次提取物的镜像度较高,具有良好的相似性(>0.9)。结论:HPLC 指纹图谱可用于同类提取物的质量控制和制备工艺评价。

[关键词] 贯叶连翘提取物; HPLC 指纹图谱; 提取工艺; 评价

[中图分类号] R283.6, R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0010-04

[doi] 10.11653/syjf2013150010

Evaluation of Three Preparation Technologies for *Hypericum perforatum* Extract by HPLC Fingerprint

LI Xiao-kun, LIU Jiong, ZHANG Jie, ZHANG Hua-feng, LIU Fu-gang, YANG Yun*

(College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To compare stability and reproducibility of three preparation processes for *Hypericum perforatum* extract. **Method:** HPLC fingerprint of *H. perforatum* extract was established, and different batches of extract were analyzed by similarity analysis, cluster analysis and pattern recognition. **Result:** These three processes had good stability and reproducibility, and enzymatic hydrolysis was superior to before enzymatic hydrolysis, purification was superior to before purification, optimum preparation technology was purified by LSA-10 macroporous resin after enzymatic hydrolysis. Mirror degree of different batches of extract was high with good similarity (>0.9). **Conclusion:** HPLC fingerprint analysis method could be adopted for quality control and process evaluation of similar extract.

[Key words] extract of *Hypericum perforatum*; HPLC fingerprint; extraction process; evaluation

贯叶连翘广泛分布于我国西北和西南地区,其最具生物活性的成分为金丝桃素,具有多种药理活性^[1]。目前,贯叶连翘提取物中金丝桃素含量波动较大,原因是金丝桃素提取率过低。2010 年版《中国药典》一部对贯叶连翘的规定仅限于金丝桃苷、芦丁鉴别和金丝桃苷含量测定^[2]。前期以金丝桃素为指标优选了 3 种贯叶连翘提取物的制备工

艺^[3-5],为评价药材及提取工艺对贯叶连翘提取物质量的影响,本实验制备乙醇直接提取、酶解后乙醇提取、酶解乙醇提取后大孔树脂纯化的提取物各 10 批,并建立各工艺的 HPLC 指纹图谱^[6],考察 3 种工艺的稳定性 and 重复性,为贯叶连翘的资源利用提供参考。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), BS 210S 型电子天平(北京赛多利斯公司), AE 240 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), FW-80 型微型植物试样粉碎机(河北省黄骅市新兴电器厂)。

金丝桃素对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号 1158-080715,纯度 >98%),乙

[收稿日期] 20130327(005)

[基金项目] 2010 河南省郑州市科技攻关项目(10PTGS486-1)

[第一作者] 李晓坤,讲师,从事中药新药研究与开发, Tel: 13333825177, E-mail: li96052122@126.com

[通讯作者] * 杨云,硕士生导师,教授,从事药物化学研究, Tel: 0371-65680605, E-mail: Yyun@china.com.cn

腈为色谱纯,水为自制双蒸水,其余试剂均为分析纯。贯叶连翘药材购自陕西渭南,经河南中医学院药学院董诚明教授鉴定为藤黄科金丝桃属植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的地上部分。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 取同一批贯叶连翘药材粉末 30 份,每份 50 g,精密称定,均分为 3 组,每组 10 份,分别按优选的“乙醇提取工艺”、“贯叶连翘酶解 + 乙醇提取工艺”、“贯叶连翘酶解 + 乙醇提取 + 大孔树脂纯化工序”制备提取物。前两组每份提取物取 70 mg,第 3 组取 60 mg,精密称定,加甲醇使充分溶解,定容至 10 mL,0.22 μm 微孔滤膜滤过,得 A10 ~ A39 共 30 份供试品,备用。

2.2 对照品溶液的制备 取金丝桃素对照品 0.3 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 色谱条件 依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(5.0 mm × 200 mm,5 μm),进样量 10 μL,柱温 30 °C,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 254 nm,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 12 min,10% A;12 ~ 25 min,19% A;25 ~ 70 min,43% A),见图 1。

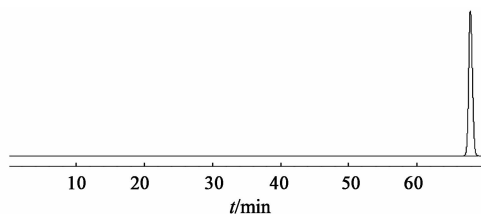


图 1 金丝桃素对照品 HPLC

2.4 方法学考察

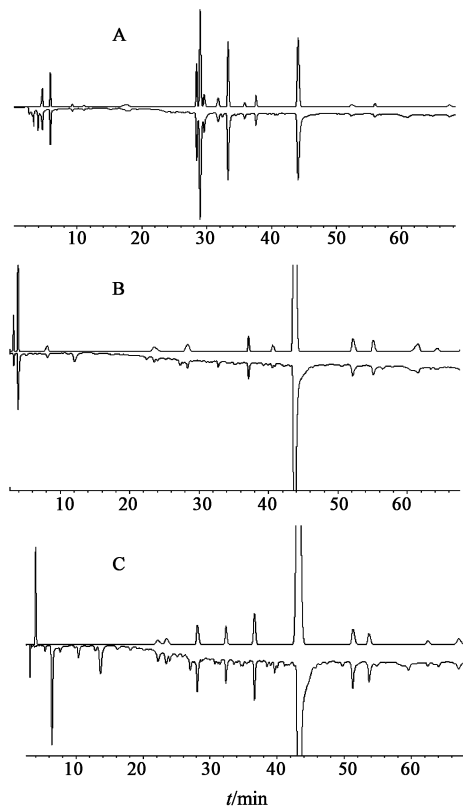
2.4.1 精密度试验 精密量取 A10 号供试品溶液适量,按上述色谱条件连续进样 5 次,记录色谱图,以金丝桃素色谱峰为内参照峰,计算共有峰相对保留时间 RSD < 3%,相对峰面积 RSD < 5%,说明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 A10 提取物样品 5 份,按 2.1 项下方法制备供试品溶液 5 份,按上述色谱条件测定,以金丝桃素色谱峰为内参照峰,计算相对保留时间 RSD < 3%,相对峰面积 RSD < 5%,说明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 A10 供试品溶液,分别于 0,6,10,14,18,24 h 按 2.3 项下色谱条件进行检测,记录色谱峰,以金丝桃素色谱峰为内参照峰,计算相对保留时间 RSD < 3%,相对峰面积 RSD < 5%,表明样品在 24 h 内保持稳定。

2.5 不同提取物比较

2.5.1 共有模式图谱镜像 分别量取 3 种工艺制备的样品适量,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,测定。运用 CHROMAP 1.5 指纹图谱软件处理,分别建立该 3 种工艺的 HPLC 共有指纹图谱模式,以各工艺 10 批样品的 HPLC 指纹图谱共有模式与编号 1 样品的指纹图谱进行对比,结果见图 2,表明镜像度比较高。



A. 乙醇提取物(A10);B. 酶解-乙醇提取物(A20);
C. 酶解-树脂纯化提取物(A30)

图 2 不同工艺制备的提取物与共有模式图谱镜像对比

2.5.2 相似度分析 以共有模式为参照,采用 CHROMAP 1.5 指纹图谱软件分别对 3 种工艺制备的 10 批样品检测结果进行相似度分析,相似度分析包括相关系数法和夹角余弦法^[7-8],结果见表 1,说明各制备工艺的不同批次提取物均具有良好的相似性(>0.9)。

2.5.3 聚类分析^[9-10] 通过 CHROMAP 1.5 指纹图谱处理软件对 3 种工艺的全部样品测试结果进行聚类分析,结果见图 3。将 3 种工艺制备的提取物按 CHROMAP 1.5 指纹图谱软件聚类分为 3 类,乙醇提取物集中在第 I 类,酶解-乙醇提取物集中在第 II 类,酶解-树脂纯化提取物集中在第 III 类,3 类样品均能较好地聚集在一起,且相聚较近,表明聚类较

表 1 不同工艺制备的提取物的相似度分析

| 样品 | 相关系数 | 夹角余弦 | 夹角/° |
|-----|---------|---------|------|
| A10 | 0.997 7 | 0.998 6 | 3.0 |
| A11 | 0.995 1 | 0.996 9 | 4.5 |
| A12 | 0.998 4 | 0.999 0 | 2.6 |
| A13 | 0.997 9 | 0.998 7 | 3.0 |
| A14 | 0.990 0 | 0.994 0 | 6.3 |
| A15 | 0.989 9 | 0.993 9 | 6.3 |
| A16 | 0.997 8 | 0.998 5 | 3.1 |
| A17 | 0.993 0 | 0.995 8 | 5.3 |
| A18 | 0.997 4 | 0.998 3 | 3.3 |
| A19 | 0.999 1 | 0.999 4 | 2.0 |
| A20 | 0.999 0 | 0.999 1 | 2.4 |
| A21 | 0.999 0 | 0.998 8 | 2.9 |
| A22 | 0.997 5 | 0.997 5 | 4.1 |
| A23 | 0.998 3 | 0.998 3 | 3.4 |
| A24 | 0.998 3 | 0.998 2 | 3.5 |
| A25 | 0.998 3 | 0.998 5 | 3.1 |
| A26 | 0.998 4 | 0.998 5 | 3.1 |
| A27 | 0.997 9 | 0.998 2 | 3.4 |
| A28 | 0.998 6 | 0.998 7 | 2.9 |
| A29 | 0.997 1 | 0.997 3 | 4.2 |
| A30 | 0.998 4 | 0.998 4 | 3.2 |
| A31 | 0.991 7 | 0.992 5 | 7.0 |
| A32 | 0.999 3 | 0.999 3 | 2.1 |
| A33 | 0.997 3 | 0.997 0 | 4.5 |
| A34 | 0.996 9 | 0.996 3 | 4.9 |
| A35 | 0.997 4 | 0.997 0 | 4.4 |
| A36 | 0.997 7 | 0.997 2 | 4.3 |
| A37 | 0.993 8 | 0.994 3 | 6.1 |
| A38 | 0.999 1 | 0.999 2 | 2.4 |
| A39 | 0.999 2 | 0.999 2 | 2.2 |

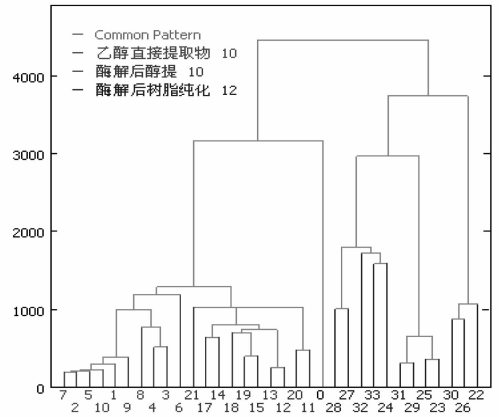


图 3 不同工艺制备的提取物样品聚类分析树状
乙醇提取、大孔树脂纯化提取物制备工艺的稳定性
与重复性良好。

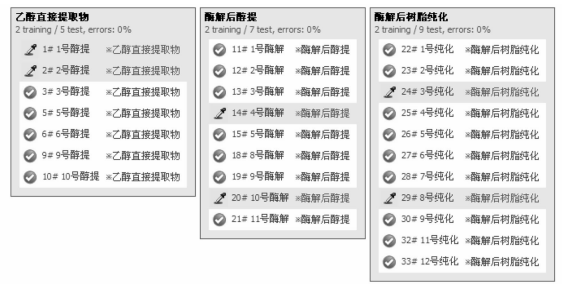


图 4 不同工艺制备的提取物模式识别组内测试



图 5 不同工艺制备的提取物模式识别混合测试

注: A10 ~ A19 为乙醇提取物; A20 ~ A29 为酶解-乙醇提取物;
A30 ~ A39 为酶解-树脂纯化提取物。

好,其中第Ⅲ类样品在分类距离 > 1 000 时,不同批次仍能较好地分离,说明此类样品的制备工艺稳定性和重复性最好。

2.5.4 模式识别 通过 CHROMAP 1.5 指纹图谱处理软件对 3 种工艺的全部样品测试结果进行模式识别,结果见图 4 ~ 5,表明贯叶连翘提取物的 3 种工艺所建立的识别模式正确性与稳定性均较好,均能正确指认本模式组内样品,准确识别组内混合的其他模式样品,同时进一步验证了贯叶连翘的酶解、

3 讨论

曾考察甲醇-水等梯度洗脱,结果发现效果远不如梯度洗脱,将甲醇改为乙腈后,效果明显提高,采用乙腈-水进行梯度洗脱,缩短了分析时间,色谱图基线更加平稳,金丝桃素色谱峰的分度度均 > 1.5^[11-12]。在考察紫外-可见吸收最大波长时,发现在 210,254,270,360 nm 处进行 HPLC 分析均有不错效果,但以 254 nm 出峰最多。

素馨花总环烯醚萜苷的大孔树脂富集纯化工艺优选

罗赛赛,郝婷,赵桂琴*

(承德医学院中药研究所,河北省中药研究与开发重点实验室,河北承德 067000)

[摘要] 目的:优选大孔树脂富集纯化素馨花总环烯醚萜苷的工艺条件。方法:采用 HPLC 测定橄榄苦苷含量。以橄榄苦苷为指标成分,通过静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号,通过单因素试验和正交试验考察大孔树脂富集纯化工艺。结果:XDA-16 型大孔树脂吸附洗脱性能最好,最佳纯化工艺条件为上样液生药质量浓度 $0.08 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,上样量 $0.7 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$,树脂柱径高比 1:3,吸附流速 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,加 8 BV 水洗除杂,用 70% 乙醇 4 BV 于 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱,收集洗脱液。结论:该工艺条件稳定可行,XDA-16 型大孔树脂可有效地富集纯化素馨花总环烯醚萜苷。

[关键词] 素馨花;总环烯醚萜苷;大孔树脂;正交试验;橄榄苦苷

[中图分类号] R283.6,R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0013-04

[doi] 10.11653/syfy2013150013

Optimization of Enrichment and Purification Technology for Total Iridoid Glycosides from *Jasminum officinale* by Macroporous Resin

LUO Sai-sai, HAO Ting, ZHAO Gui-qin*

(Institute of Chinese Traditional Medicine, Chengde Medical University, Hebei Provincial Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Chengde 067000, China)

[收稿日期] 20130110(011)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2010001354)

[第一作者] 罗赛赛,硕士,从事中草药有效成分提取分离研究,Tel:13398671073,E-mail:515277424@qq.com

[通讯作者] *赵桂琴,博士,副教授,从事天然抗病毒活性产物研究与开发,Tel:0314-2291908,E-mail:zhaoguiqin1971@sina.com.cn

[参考文献]

- [1] 李宏,姜怀春,邹国林.贯叶连翘活性成分研究新进展[J].中草药,2001,32(7):657.
- [2] 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,2010:215.
- [3] 张博.HPLC法测定贯叶连翘中贯叶金丝桃素含量[J].中草药,2001,32(4):35.
- [4] 王晓利,张俊松,罗谦,等.HPLC法测定贯叶连翘药材及提取物中贯叶金丝桃素的含量[J].中药材,2006,29(10):1047.
- [5] 郝鹏飞,卫冰,刘富岗,等.优化酶提取贯叶连翘药材活性成分工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):39.
- [6] 刘文,蒋世云.中药指纹图谱研究与应用进展[J].中国药房,2011,22(19):1819.
- [7] 关洪月,李林,刘晓,等.中药指纹图谱相似度计算方法探析[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282.
- [8] 宋小妹,杨新杰,王薇,等.珠子参的 HPLC 指纹图谱及模式识别[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):59.
- [9] 李治建,周露,古力娜·达吾提,等.地锦草洗脱部位指纹图谱特征与其抗真菌作用的灰关联度分析[J].中国中药杂志,2012,37(5):580.
- [10] 赵萍萍,霍仕霞,高莉,等.驱虫斑鸠菊提取物指纹图谱与其对人 A375 黑素瘤细胞增殖作用的灰关联度分析[J].中国中药杂志,2012,37(5):585.
- [11] 王冬梅,刘朝,杨得坡.指纹图谱技术对贯叶连翘提取物制备工艺过程的评价[J].中国中药杂志,2006,31(10):800.
- [12] 王启帅,杨云,肖功胜,等.北柴胡 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立及色谱数据的分析[J].中成药,2011,33(3):373.

[责任编辑 仝燕]