

泽泻提取物 HPCE 指纹图谱研究

林文津, 徐榕青, 张亚敏(福建省医学科学研究所福建省医学测试重点实验室, 福州 350001)

摘要: 目的 建立中药泽泻提取物毛细管电泳指纹图谱。方法 采用毛细管区带电泳模式, 压力进样: 0.5Psi×10 s, 分离电压 30 kV, 柱温 25 °C, DAD 检测波长为 202 nm, 带宽 8 nm, 参比波长 400 nm, 带宽 20 nm。运行缓冲液由 0.1 mol·L⁻¹ 硼砂-0.1 mol·L⁻¹ SDS-甲醇(4:6:2)构成, 检测结果用相似度评价软件分析其指纹图谱的相似度。结果 10 批次泽泻提取物毛细管电泳指纹图谱的相似度均在 0.9 以上, 表明其指纹图谱整体面貌基本一致。结论 所建立的泽泻提取物高效毛细管电泳指纹图谱稳定、可靠, 可作为泽泻提取物的特征指纹图谱, 该研究为泽泻提取物的定性鉴别及内在质量评价提供了新的参考依据。

关键词: 泽泻; 提取物; 毛细管电泳; 指纹图谱

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)06-0495-04

Study on Fingerprint Spectrum of *Rhizoma Alismatis* Extract by HPCE

LIN Wenjin, XU Rongqing, ZHANG Yamin(Fujian Institute of Medical Sciences, Fujian Key Laboratory of Medical Measurement, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the fingerprint spectrum of *Rhizoma Alismatis* extract by HPCE. **METHODS** Using Capillary Zone Electrophoresis (CZE) patterns, injection pressure: 0.5Psi×10 s, separation voltage 30kV, column temperature 25 °C, DAD detection wavelength 202nm. Running buffer 0.1 mol·L⁻¹ borax-0.1 mol·L⁻¹ SDS-methanol(4:6:2), and analysis the the similar by similar evaluated software. **RESULTS** All of the similarity are above 0.9, so the fingerprint integer feature of the 10 batches *Rhizoma Alismatis* extract are coincident essentially. **CONCLUSION** The established fingerprint spectrum is stable and credible, and could be used as characteristic fingerprint spectrum for *Rhizoma Alismatis* extract. And it will be a new reference for qualitation identification and quality evaluation of *Rhizoma Alismatis* extract.

KEY WORDS: *Rhizoma Alismatis*; extract; capillary electrophoresis; fingerprint spectrum

泽泻始载于《神农本草经》,列为上品,为常用中药材,历来被认为是药食之佳品,在传统中医药中占有重要的地位,为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎。其性味甘,寒。归肾、膀胱经。具有利小便,清湿热等功效。临床用于小便不利,水肿胀满,泄泻尿少,痰饮眩晕,热淋痛,高血脂^[1]。近年有文献报道采用 HPLC-ELSD、HPLC-UV、GC、ICP-MS 等方法进行了泽泻指纹图谱的研究^[2-6],但经 CBM、维普、同方等数据库检索,未见有毛细管电泳指纹图谱方面的研究报道,本实验采用毛细管区带电泳法对泽泻提取物指纹图谱进行了初步研究,以期有效控制泽泻提取物的质量提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

P/ACE MDQ 高效毛细管电泳仪(美国贝克曼库尔特有限公司)、未涂层熔融石英毛细管 57 cm×50 μm,有效长度为 47.5 cm(河北省永年锐沅色谱器件有限公司),AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),SK3310HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),艾科浦超纯水系统(重庆颐洋企业发展有限公司)。

1.2 试剂

泽泻药材产自建瓯市吉阳镇,由建瓯市吉阳镇农业技术推广站 2008 年 4 月提供,经福建省医学科学研究所中药资源开发与利用重点实验室徐

基金项目:福建省科技计划重点项目(2007Y0013);福建科技计划基本科研专项项目(2009R10017-3)

作者简介:林文津,男,助理研究员 Tel:(0591)87514999 E-mail:lwjin@sina.com

榕青研究员鉴定,系泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎,标本存于福建省医学科学研究所中药资源开发与利用重点实验室。10批泽泻提取物由本实验室提供,批号(样品号)为:20080414(S1),20080415(S2),20080416(S3),20080417(S4),20080418(S5),20080421(S6),20080422(S7),20080423(S8),20080424(S9),20080425(S10);泽泻醇B对照品由南京中医药大学朱国元博士提供,纯度:98.5%;色谱纯甲醇(上海星可生化有限公司),硼砂、SDS、NaOH(上海联试化工试剂有限公司)。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的制备

精密称取23-乙酰泽泻醇B对照品5.0 mg,至5 mL量瓶中,甲醇溶解定容,即得 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 23-乙酰泽泻醇B对照品液。

2.1.2 供试品溶液的制备

分别取10批本品粉末约100 mg,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇30 mL,超声提取30 min,滤过,加甲醇20 mL,超声提取30 min,滤过,合并2次提取液,并定容至50 mL量瓶中,摇匀,用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 HPCE色谱条件

按要求配置实验用操作缓冲液,运行前超声脱气10 min。每次进样分析开始前,均依次用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH,水及缓冲液冲洗3 min,以后每次进样依次用水、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH溶液、水及缓冲液冲洗1 min,进样前在运行电压下平衡5 min。

分析过程采用胶束电动毛细管色谱(MEKC)电泳模式,优化的条件为,压力进样: $0.5 \text{ Psi} \times 10 \text{ s}$,分离电压30 kV,柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,DAD检测波长为202 nm,带宽8 nm,参比波长400 nm,带宽20 nm。运行缓冲液由 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂- $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS-甲醇(4:6:2,体积比)构成。

2.3 方法学考察

2.3.1 仪器适应性实验

取S2号样品的供试品溶液,连续进样5次,计算峰面积大于总峰面积5%的色谱峰(P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8, P9)的相对保留时间和相对峰面积的RSD值,结果显示,RSD分别小于1.0%和2.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性实验

取S2号样品供试品溶液,分别在0,1,2,4,8,12 h时进样测定,计算上述8个色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值,结果显示,RSD分别小于3.0%和5.0%,表明样品溶液在12h内稳定性良好。

2.3.3 精密度实验

以S2号样品为供试品,按“2.1.2”项下方法处理,制备6份供试品溶液,进样测定,计算上述8个色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值,结果显示,RSD分别小于1.0%和4.0%,表明该试验方法重复性良好。

2.4 样品的分离效果

采用优化后的HPCE色谱条件,测定对照品和供试品溶液,通过23-乙酰泽泻醇B对照品溶液与供试品溶液图谱的比较,发现色谱峰分离度与峰形较好,能测定其保留时间、峰面积及峰高并能进行定性分析。

2.5 指纹图谱的建立

按“1.2”项下方法制备10批泽泻提取物供试品溶液,在“2.2”项下色谱条件下依次进样,测得10批泽泻提取物的HPCE色谱图。经比较分析10批样品所有的峰数、峰值(积分峰)和峰位(相对保留时间)等参数和色谱图后,从中选定11个共有峰作为构成泽泻提取物指纹图谱稳定的特征峰,见图1,其中8号峰为23-乙酰泽泻醇B,11个共有峰的峰面积总和占总峰面积的95%以上。10批泽泻提取物指纹图谱的叠加图见图2。

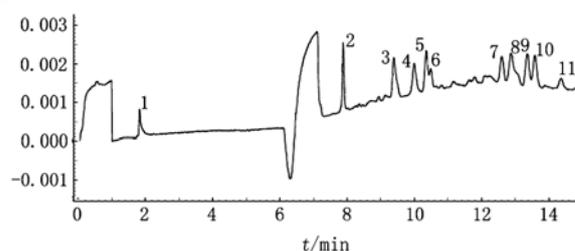


图1 泽泻提取物指纹图谱特征峰

Fig 1 Characteristic absorption peak of fingerprint spectrum of *Rhizoma Alismatis* extract by HPCE

2.6 结果

2.6.1 参照峰的选择

经比较所有测定和记录的样品色图谱,选取其中的11个共有峰作为特征峰,从样品色图谱中选择一个出峰时间较居中、在各样品中均稳定的

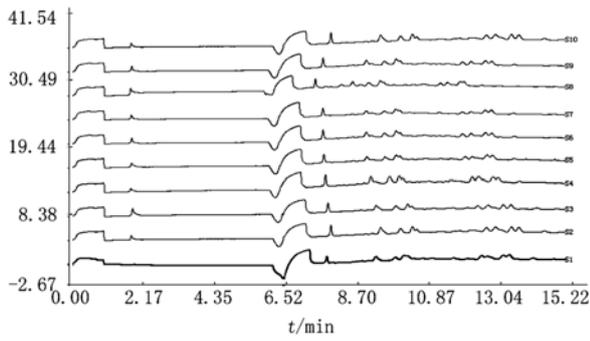


图 2 10 批泽泻提取物指纹图谱的叠加图

Fig 2 Layout chart chromatogram of 10 batches *Rhizoma Alismatis* extract by HPCE

表 1 10 批泽泻提取物 HPCE 指纹图谱共有峰的相对保留时间

Tab 1 Relative retention time of fingerprint spectrum of 10 batches *Rhizoma Alismatis* extract by HPCE

峰号	样 品 号										均值	RSD%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
P1	0.24	0.23	0.24	0.23	0.24	0.24	0.24	0.23	0.25	0.24	0.24	2.66
P2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
P3	1.19	1.19	1.19	1.18	1.17	1.17	1.17	1.09	1.15	1.15	1.17	2.60
P4	1.27	1.27	1.26	1.25	1.24	1.24	1.24	1.25	1.22	1.22	1.25	1.43
P5	1.30	1.31	1.31	1.29	1.29	1.29	1.29	1.29	1.26	1.27	1.29	1.21
P6	1.31	1.33	1.33	1.31	1.30	1.30	1.30	1.30	1.27	1.28	1.30	1.45
P7	1.60	1.60	1.58	1.58	1.56	1.55	1.55	1.53	1.51	1.51	1.56	2.14
P8	1.63	1.63	1.62	1.60	1.59	1.59	1.59	1.55	1.54	1.54	1.59	2.18
P9	1.69	1.69	1.68	1.66	1.64	1.64	1.64	1.61	1.60	1.59	1.64	2.21
P10	1.72	1.72	1.71	1.68	1.67	1.67	1.67	1.67	1.68	1.61	1.68	1.92
P11	1.80	1.82	1.81	1.76	1.75	1.76	1.76	1.72	1.76	1.68	1.76	2.37

表 2 10 批泽泻提取物 HPCE 指纹图谱共有峰的相对峰面积

Tab 2 Relative peak area of fingerprint spectrum of 10 batches *Rhizoma Alismatis* extract by HPCE

峰号	样 品 号										均值	RSD%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
P1	0.63	0.52	1.19	0.54	0.84	0.67	0.70	0.62	0.87	1.06	0.76	29.18
P2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
P3	1.21	1.24	1.21	1.2	0.61	0.84	0.66	1.14	0.74	0.64	0.95	28.75
P4	0.80	0.93	0.85	1.22	0.72	0.74	0.68	0.83	0.84	0.72	0.83	18.69
P5	1.09	1.00	0.93	1.07	0.72	0.90	0.85	1.10	0.90	0.87	0.94	12.90
P6	0.68	0.41	0.42	0.55	0.51	0.49	0.44	0.51	0.49	0.46	0.50	15.74
P7	1.05	0.74	0.53	0.79	0.45	0.62	0.43	0.64	0.62	0.39	0.63	31.69
P8	0.55	0.46	0.93	0.53	0.33	0.51	0.35	0.56	0.51	0.58	0.53	30.87
P9	1.34	1.00	0.96	1.07	0.90	0.67	0.90	0.99	0.84	0.67	0.93	20.87
P10	0.38	1.00	0.99	0.99	0.93	0.75	1.00	0.98	0.85	0.70	0.86	23.35
P11	0.52	0.35	0.35	0.22	0.27	0.23	0.26	0.35	0.23	0.17	0.30	34.13

2.6.3 相似度评价

将测试数据导入国家药典委员会“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件,经校正,将谱图自动匹配,然后生成对照图谱(平均数),进行谱峰差异性评价和整体相似性评价。通过中药指

纹图谱相似度计算软件得出泽泻提取物HPCE指纹谱共有图谱;与共有图谱比较,10批泽泻提取物的相似度分析结果见表3。结果表明,10批泽泻相似度均在0.9以上,说明福建地道药材泽泻提取物品质基本一致。

表3 10批泽泻提取物 HPCE 指纹图谱相似性分析结果

Tab 3 The similarity of the HPCE fingerprint of 10 batches *Rhizoma Alismatis* extract

样品号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.947	0.976	0.974	0.978	0.957	0.979	0.965	0.952	0.980	0.975

3 讨论

为易于辨认和分析,泽泻提取物 HPCE 指纹图谱可分为三个区:保留时间 1.8~8.0 min(I区),出现 1 号和 2 号两个特征峰,最强峰为 2 号,保留时间 9.0~11.8 min(II区),出现 3~6 号四个特征峰,最强峰为 3 号;保留时间 12~14 min(III区),出现 7~11 号五个特征峰,最强峰为 9 号。

指纹图谱中 2、3、9 号三个强峰的峰面积约占总峰面积的 30%,和其他峰相比,表观丰度相差较大,这是蔓荆子药材 HPCE 指纹图谱的一个主要特点。总体看来,三个区段中表观丰度最强的是第 II 区,其次是第 I 区、第 III 区。表观丰度最强的第 II 区和色谱峰较集中排列、丰度相对较低的第 I 区是辨认泽泻提取物 HPCE 指纹图谱的另一主要特点。

实验曾采用其它运行缓冲液,如:0.1 mol·L⁻¹ 硼酸-0.1 mol·L⁻¹ KOH(4:2 或 5:1),单独采用 0.1 mol·L⁻¹ 硼砂溶液,0.1 mol·L⁻¹ 硼砂溶液-0.1 mol·L⁻¹ KOH 等,但因分离效果不太理想,未采用。由于泽泻醇类化合物属紫外末端吸收,响应值很低,为保证其有较大的响应值,将检测波长设为 202 nm。

在文献报道的有关泽泻指纹图谱研究采用的方法中,高效液相色谱法(HPLC)是公认的检测指纹图谱的主导方法,具有仪器普及率高,适用范围广,重复性好等优点,但分析时常需要消耗大量的高纯度的甲醇等有机溶剂,研究成本和污染较

大。而气相色谱法(GC)主要针对的是挥发性成分的研究,电感耦合等离子体质谱技术(ICP-MS)主要用于元素分析,不能体现药材中的具体的化学成分^[2-6]。本试验采用的高效毛细管电泳技术,具有高分离效率、高速度、低消耗、无污染等优点,正成为检测中药指纹图谱又一重要技术,是一种值得十分重视的绿色分析方法。

致谢:能顺利完成本实验,与建瓯市吉阳镇农业技术推广站站站长葛培盛老师为我们提供泽泻 GAP 基地原药材,原南京中医药大学朱国元博士为我们提供了泽泻醇 B 对照品密不可分,在此对两位老师表示最诚挚的谢意!

REFERENCES

- [1] Ch. P (2005) Vol I(中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005: 184.
- [2] GONG L P, WANG S Y, ZHANG K. Development of Chromatographic Fingerprint of *Rhizoma Alismatis* Orientalitis by HPLC-ELSD[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2007, 18(6): 461-464.
- [3] LIU H C, YANG W Y, CHEN X F. Establishment of chromatographic fingerprint and quality assessment on Sichuan native medicinal plant *Alisma plantago-aquatica*[J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(18): 1844-1847.
- [4] ZHANG M N, WANG S Y. GC Fingerprint of *Rhizoma Alismatis*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38(9): 1406-1408.
- [5] JIANG Y L, HAN C, QIU Z C, et al. Dynamic study of zexie by HPLC fingerprinting technique[J]. *Chin J Anal Lab* (分析试验室), 2006, 25(3): 70-74.
- [6] CHEN F R, H Y, QIU Z C, et al. Determination of elements'content of *Rhizome Alismatics* in Fujian and its classification discrimination[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16(2): 124-128.