

山西道地药材远志的毛细管电泳指纹图谱研究

王洁, 张一鸣, 郝增燕, 张红芬, 陈安家^{*}(山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要: 目的 建立山西道地药材远志的毛细管电泳指纹图谱(CEFP), 获得对照图谱, 并与不同产地远志药材指纹图谱相比较, 以控制远志质量。方法 未涂层毛细管柱(75 $\mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$, 有效长度 50 cm); 缓冲液: 25% 甲醇的 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液; 分离电压: 18 kV; 检测波长: 210 nm; 温度: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样条件: 0.5 psi, 5 s。使用指纹图谱相似度评价软件进行数据处理, 比较分析远志 HPCE 指纹图谱的相似度。结果 建立了山西道地远志药材的 HPCE 指纹图谱共有模式, 并比较了不同产地远志药材 HPCE 指纹图谱的相似度。结论 所建立的 CEFP 具有较好的重复性, 为远志药材质量控制提供了新方法。

关键词: 毛细管电泳法; 远志; 指纹图谱

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)02-0133-04

Fingerprint Chromatogram of Polygalae Radix from Shanxi Province with HPCE

WANG Jie, ZHANG Yiming, HAO Zengyan, ZHANG Hongfen, CHEN Anjia^{*} (Pharmacy College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the high performance capillary electrophoresis (HPCE) fingerprint chromatogram of genuine Polygalae Radix from Shanxi and get the control chromatogram. **METHODS** The separation was carried out in an uncoated fused silica capillary (75 $\mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$, effective length 50 cm). The running voltage was 18 kV. The buffer was 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ containing 25% methanol, and the wavelength was 210 nm. Data and chromatogram were dealt with "Computer Aided Similarity Evaluation" software in order to analyse the similarity of fingerprint chromatogram of Polygalae Radix from different districts. **RESULTS** The control fingerprint of HPCE of Polygalae Radix was established, and the similarity of fingerprint chromatogram of Polygalae Radix from different districts were compared. **CONCLUSION** This method is proved to be simple, rapid and accurate, and can be used as a new method for the quality control of Polygalae Radix.

KEY WORDS: capillary electrophoresis; Polygalae Radix; fingerprint chromatogram

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 和卵叶远志 *Polygala sibirica* L. 的根, 是一种常用中药, 始载于《神农本草经》, 被列为上品, 有益智安神、祛痰消肿等功效^[1], 主要成分为皂苷类、口山酮、寡糖酯类。文献[2-4]采用 HPLC 测定远志中远志酸、远志皂苷元和远志总皂苷的

含量, 并以此控制远志药材的质量。中国药典 2010 年版一部通过测定远志药材中细叶远志皂苷、口山酮类及蔗糖类成分的含量对远志药材的质量进行控制^[5]。虽然这些方法能在一定程度上控制远志药材的质量, 但是对于远志这样的有效成分类型多、组分复杂的中药材, 仅测定某类成分的含量,

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目(2008011077-1)

作者简介: 王洁, 女, 硕士生 Tel: 13803413253 E-mail: beibeiaabcd_love@126.com ^{*}通信作者: 陈安家, 男, 博士, 教授 Tel: 15835108120 E-mail: chenanjia888@163.com

难以客观、有效地评价或控制药材的质量。而指纹图谱技术作为一种多组分复杂样品的有效质量控制方法,能够反映出待测样品的整体性、特征性,目前已被广泛用于中草药及其各种制剂的质量控制^[1]。

中药的色谱指纹图谱应用最多的是 HPLC 指纹图谱,但中药提取物常损害色谱柱,消耗大量的有毒有机溶媒,导致 HPLC 指纹图谱法分析成本高且污染环境;而毛细管电泳法因其低消耗、无污染、柱效高、样品处理简单而日益受到重视^[6-7]。本试验以毛细管区带电泳法对山西道地药材远志的醇提取液进行毛细管电泳指纹图谱(CEFP)的初步研究,并获得对照图谱,与不同产地远志药材指纹图谱作了比较,方法简便、快捷,重复性较好,为远志药材质量的有效评价提供了新方法。

1 仪器及试剂

1.1 仪器

BECKMAN P/ACE MDQ 型高效毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司);熔融石英毛细管(美国 Beckman 公司);KQ-400KDB 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

硼酸、氢氧化钠、无水乙醇、甲醇、乙腈等均为分析纯;水为去离子水。远志药材由我院中药教研室高建平教授鉴定为远志 *Polygala tenuifolia* Willd., 药材采集时间均为 2008 年 12 月。其来源见表 1(1~10 为山西道地药材,11~17 为不同产地药材)。

表 1 远志样品及来源

Tab 1 Origins of Polygalae Radix samples

样品号	样品来源	样品号	样品来源
1	山西临汾	10	山西太原
2	山西平陆	11	河南安阳
3	山西万荣	12	甘肃兰州
4	山西襄汾	13	河北承德(制远志)
5	山西绛县	14	陕西西安
6	山西闻喜(1)	15	陕西咸阳
7	山西东镇(1)	16	河北承德(蜜远志)
8	山西闻喜(2)	17	山西闻喜(炒远志)
9	山西东镇(2)		

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取药材粉末(过三号筛)1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 70%甲醇 25 mL,称重,超声提取 0.5 h,称重,补足减失重量,静置,过滤。取续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 电泳条件 毛细管柱:未涂层毛细管柱(75 μm×57 cm,有效长度 50 cm);缓冲液:25%甲醇的 20 mmol·L⁻¹硼砂溶液;分离电压:18 kV;检测波长:210 nm;温度:25 ℃;进样条件:0.5 psi, 5 s。每天分析之前,用 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液冲洗毛细管 10 min,纯净水冲洗 15 min,运行缓冲液冲洗 10 min。进样前分别用 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠、纯净水和缓冲液各冲洗 3 min。每 5 次进样后更换缓冲液。所有溶液进毛细管柱前都需用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,并对其作超声脱气处理。

2.2.2 内参比峰的选取 由于缺少对照品,且该方法得到的图谱峰较多,难以插入适宜的内标物,因此,采用对称性较好的 16 号峰作为内参比峰。

2.2.3 稳定性试验 按“2.2.1”项下条件将 2 号远志药材的供试液于 2 d 内间断进样 5 次。以 16 号峰为内参比峰,各指纹峰相对迁移时间的 RSD 均小于 3.0%,相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%,表明样品在 48 h 内稳定。

2.2.4 仪器精密度试验 按“2.2.1”项下条件将 2 号远志药材的供试液连续进样 5 次,记录电泳图。各指纹峰相对迁移时间的相对标准偏差(RSD)小于 2.6%,相对峰面积的 RSD 为 2.0%~4.3%,表明仪器精密度符合要求。

2.2.5 重复性试验 按“2.1”项下方法制备 4 号远志药材的供试液 5 份,依次进样分析,记录电泳图。各指纹峰相对迁移时间的 RSD 均<5.0%;相对峰面积的 RSD 为 2.0%~6.0%,表明本方法的重复性满足指纹图谱的要求。

2.2.6 山西道地药材远志 HPCE 指纹图谱的建立 取山西产远志药材(1~10 号样品),按“2.1”项下方法制备供试品溶液,分别进样,记录指纹图谱,得到道地远志药材 26 个共有峰,共有峰面积占总峰面积的比值均大于 90%,见图 1。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版软件”生成道地远志药材共有模式的对照指纹图谱(R)。各指纹图谱及生成的对照图谱见图 2,并计算其相似度,结果见表 2。

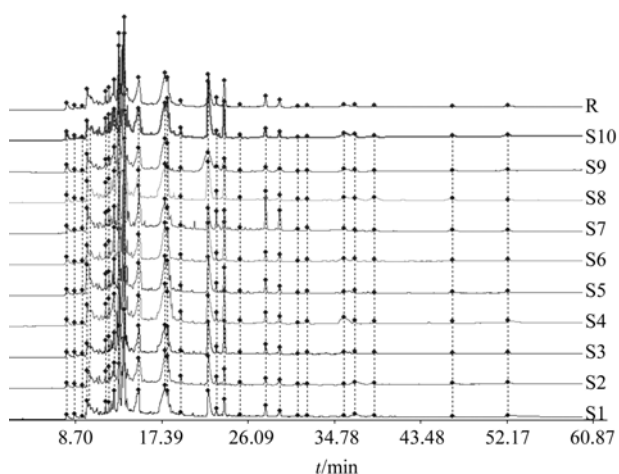


图1 道地远志药材指纹图谱及共有峰标识

Fig 1 Fingerprint of genuine *Polygalae Radix* markings of common peaks

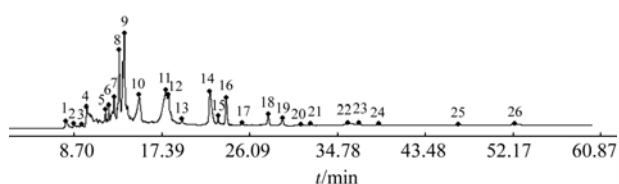


图2 10批道地药材指纹图谱及生成的对照图谱(R)

Fig 2 Fingerprints of ten batches of genuine *Polygalae Radix* and common pattern(R)

表2 远志药材指纹图谱与对照图谱的相似度结果

Tab 2 Similarities of fingerprints of *Radix Polygalae* samples compared with control fingerprint

样品号	相似度	样品号	相似度
1	0.952	10	0.950
2	0.974	11	0.843
3	0.960	12	0.921
4	0.943	13	0.975
5	0.986	14	0.967
6	0.979	15	0.968
7	0.988	16	0.980
8	0.990	17	0.968
9	0.975		

2.2.7 不同产地远志药材 HPCE 指纹图谱的建立

取不同来源的远志药材,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,分别进样,得到7批不同来源远志药材的指纹图谱,并计算其与所建立的对照指纹图谱比较的相似度,结果见表2。

2.2.8 结果分析 从上述结果可以看出,所建立的远志药材指纹图谱的分离度较好。10批山西道地药材,有26个共有峰,相似度均在0.94以上,说明山西产远志药材质量稳定;7批不同产地的远

志药材除河南安阳以外的其他产地的远志药材指纹图谱的相似度均较高,且与山西产远志无明显差异,说明远志药材所含化学成分随产地变化较小;河南安阳产远志因所含化学成分的量较低而导致相似度较低;制远志、蜜远志、炒远志和生远志药材指纹图谱的相似度均在0.90以上,说明不同产地远志药材的不同炮制品之间相似度高。

3 讨论

3.1 样品预处理方法的选择

取远志,以相同电泳条件下的电泳峰数目及峰分离度为考察指标,对远志的提取方式、提取溶液、提取时间、提取次数、提取溶剂的体积分数及提取溶剂的体积进行实验分析。实验结果表明:1g远志用25mL体积分数为70%的甲醇超声30min,效果最佳。

3.2 电泳条件的选择

3.2.1 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器对样品进行了全波长扫描,结果在210nm处各电泳峰均有较好的紫外吸收,峰信息最为丰富。因此,选择该波长作为检测波长。

3.2.2 缓冲液的种类和浓度的选择 通过考察磷酸盐、醋酸盐、硼砂和硼酸缓冲液系统,实验发现采用磷酸盐为缓冲液时,峰分离良好,但电泳图谱信息量较少;采用醋酸盐为缓冲液时,峰分离较差;采用硼砂为缓冲液时,电泳图谱信息量最为丰富,峰形对称,且当浓度达到 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各峰之间分离度较好,分离效率高,运行电流适宜,保留时间适当。浓度低于 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,保留时间在15min之前出现的峰分离效果较差;浓度高于 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着硼砂浓度的增高,电流增大,焦耳热严重,保留时间延长。

3.2.3 缓冲液 pH 值的选择 选用硼砂缓冲体系,缓冲液的条件考查主要在pH值8~10弱碱性范围内进行;随着pH值的增加,各电泳峰之间分离度增大,迁移时间也随之增长。结果表明,当pH为8.8时,各电泳峰之间分离良好且迁移时间适宜。

3.2.4 有机溶剂种类及含量对分离的影响 在毛细管电泳中,有机溶剂作为改性剂,可以改善分离。本试验分别考察了甲醇含量为5%~30%和乙腈含量为5%~30%对分离的影响。结果表明,缓冲液中加入甲醇后,各电泳峰的分离效率明显优于加入乙腈。随着甲醇含量的增加,各峰之间分离度增加,但是迁移时间增长,且焦耳热增加使得基

线噪音变大。故最终确定的运行缓冲液为含有 25% 甲醇的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液($\text{pH}=8.8$)。

3.2.5 运行电压的选择 提高分离电压可以缩短分析时间, 本试验考察了 10~30 kV 电压时各电泳峰的分离情况。电压为 18 kV 时分离时间短, 分离效率高且峰形尖锐, 因此选择 18 kV 为分离电压。

3.2.6 分离柱温的选择 柱温对电解质溶液的黏度、谱带扩展、离子淌度等有直接的影响。柱温试验发现: 在 15~35 $^{\circ}\text{C}$ 不同柱温区间内, 分离时间变化不大, 但对各电泳峰之间的分离度有较大影响。柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 各峰之间分离度较好, 故选择 25 $^{\circ}\text{C}$ 作为实验柱温。

4 结论

远志药材主要分布在山西、陕西、河北等地, 以山西产量最大。为了更好地控制远志道地药材的质量及实现山西远志药材的标准化种植, 有必要对山西产远志药材的质量进行控制; 本研究建立了山西道地远志药材的 HPCE 指纹图谱共有模式(参考峰和其他指标成分的确认待课题组后续

工作完成), 比较了不同产地远志药材 HPCE 指纹图谱的相似度, 对远志药材的质量控制具有指导意义。

REFERENCES

- [1] JIANG Y, ZHANG N, CUI Z. Fingerprint of *Polygala tenuifolia* by high performance liquid chromatography [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2006, 41(2): 179-183.
- [2] YANG G H, SUN X F. Studies on quantitative determination of senegenin in Radix Polygalae by RP-HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2001, 21(4): 261-263.
- [3] XU R C, LIU P L, ZHANG X D, et al. Determination of polygalic acid in compound Haishe capsule by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2008, 17(13): 23-26.
- [4] LIANG G L, LIN S Y, LIU D. Quantitative determination of total saponin in Polygalae by spectrophotometry [J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2008, 8(1): 104-105.
- [5] Ch.P Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 146.
- [6] LIU W, GUO X H. Determination of rosmarinic acid in *Spica prunellae* by HPCE [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(8): 632-634.
- [7] LIN W J, XU R Q, ZHANG Y M. Study on fingerprint spectrum of Rhizoma Alismatis extract by HPCE [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(6): 495-498.

收稿日期: 2011-04-30