

不同产地泽泻 HPLC 指纹图谱建立及模式识别

金立阳, 汪英俊, 叶淑青, 李存玉, 彭国平*, 郑云枫*
(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 目的 建立不同产地泽泻 HPLC 指纹图谱, 并对其进行模式识别。方法 泽泻乙腈提取物的分析采用 Hanbon Heder a ODS-2 C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相水-乙腈, 梯度洗脱; 柱温 35 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm。对结果进行化学模式识别 (聚类分析、主成分分析和正交最小二乘法判别分析)。结果 19 批四川产地样品指纹图谱中有 17 个共有峰, 11 批广西产地样品指纹图谱中 12 个共有峰, 相似度均大于 0.94。正交最小二乘法判别分析结合 HPLC-MS/MS 及对照品比对, 筛选出泽泻醇 B、泽泻醇 A、11-去氧泽泻醇 C、23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 O、24-乙酰泽泻醇 A6 种主要差异性成分。结论 该方法稳定可靠, 可将四川、广西产地泽泻进行明显区分, 从而用于该药材的质量控制与评价。

关键词: 泽泻; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 正交最小二乘法判别分析; HPLC-MS/MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)01-0139-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.030

Establishment of HPLC fingerprints of *Alisma orientale* from different growing areas and chemical pattern recognition

JIN Li-yang, WANG Ying-jun, YE Shu-qing, LI Cun-yu, PENG Guo-ping*, ZHENG Yun-feng*
(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

KEY WORDS: *Alisma orientale* (Sam.) Juzep.; fingerprints; cluster analysis; principal component analysis; OPLS-DA; HPLC-MS/MS

泽泻是泽泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎^[1], 其传统主产地为四川、福建与江西。然而根据近几年文献报道与实地考察发现, 四川产量最大, 广西次之, 福建与江西由于市场因素影响已逐渐退出主产区^[2]。目前, 已有泽泻指纹图谱的相关报道^[3-7], 但针对四川、广西产地泽泻指纹图谱与差异性成分的研究较少。

本研究收集了 19 批四川产地泽泻、11 批广西产地泽泻, 通过指纹图谱结合模式识别 (聚类分析、主成分分析和正交最小二乘法判别分析) 进行综合分析^[8-11], 将这 2 个产地药材进行区分, 并探讨它们之间成分的差异, 以期为其质量控制与评

价、制剂生产、临床应用提供依据。

1 材料

Waters e2695 型高效液相色谱仪 (配置 2998PDA 二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司); Triple TOF™ 5600 型质谱仪 (美国 AB Sciex 公司); KH-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); AL210 型电子分析天平 (万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); HP-02 型多功能粉碎机 (永康市帅通电器厂)。

对照品泽泻醇 A (批号 JBZ-1648)、24-乙酰泽泻醇 A (批号 JBZ-1665)、泽泻醇 B (批号 JBZ-1649)、23-乙酰泽泻醇 B (批号 JBZ-1419) 质量分

收稿日期: 2018-12-21

基金项目: 国家自然科学基金 (81503258, 81603307); 江苏省高校自然科学基金 (17KJB360010); 中药标准化项目 (ZYBZH-C-JS-34)

作者简介: 金立阳 (1996—), 男, 硕士生, 研究方向为中药化学与分析。Tel: 13260761529, E-mail: jinliyong23@126.com

* 通信作者: 彭国平 (1963—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药成分分离精制及新药开发。Tel: (025) 86798186, E-mail: guopingpeng@126.com

郑云枫 (1979—), 男, 副教授, 研究方向为中药活性成分与质量评价。Tel: (025) 86798186, E-mail: zyunfeng88@126.com

数均大于98.0%，均购于南京金益柏生物技术有限公司。乙腈（色谱纯，美国Tedia公司）；甲酸（色谱纯，德国Merck公司）；冰醋酸为分析纯。

30批泽泻分别收购于四川和广西，具体见表1，经南京中医药大学药学院严辉副教授鉴定为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎。

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	四川夹江县	180401SC	S16	四川彭山县	180416SC
S2	四川夹江县	180402SC	S17	四川彭山县	180417SC
S3	四川夹江县	180403SC	S18	四川彭山县	180418SC
S4	四川夹江县	180404SC	S19	四川东坡区	180419SC
S5	四川夹江县	180405SC	S20	广西贵港市	180401GX
S6	四川夹江县	180406SC	S21	广西贵港市	180402GX
S7	四川五通桥区	180407SC	S22	广西贵港市	180403GX
S8	四川五通桥区	180408SC	S23	广西贵港市	180404GX
S9	四川五通桥区	180409SC	S24	广西博白县	180405GX
S10	四川五通桥区	180410SC	S25	广西博白县	180406GX
S11	四川五通桥区	180411SC	S26	广西博白县	180407GX
S12	四川五通桥区	180412SC	S27	广西博白县	180408GX
S13	四川彭山县	180413SC	S28	广西	180409GX
S14	四川彭山县	180414SC	S29	广西	180410GX
S15	四川彭山县	180415SC	S30	广西	180411GX

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取泽泻醇A、24-乙酰泽泻醇A、泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇B对照品适量，加乙腈溶解，即得。

2.2 供试品溶液制备 称取泽泻粉末（过5号筛）2.0 g，置于具塞锥形瓶中，加入10 mL乙腈，称定质量，超声提取（功率250 W、频率40 kHz）30 min，放冷，乙腈补足减失的质量，摇匀，过0.22 μm微孔滤膜。精密吸取1 mL续滤液，加入2 μL冰醋酸，摇匀，即得。

2.3 色谱条件 Hanbon Hedera ODS-2 C₁₈柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为水（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~15 min，60%~45% A；15~32 min，45%~5% A；32~50 min，5%~3% A；50~55 min，3% A）；体积流量1.0 mL/min；柱温35℃；检测波长210 nm；进样量10 μL。

2.4 质谱条件 电喷雾离子源（ESI）；正离子模式检测；扫描范围 *m/z* 50~2 000；喷雾电压5 500 V；解簇电压100 V；碰撞电压40、20 V；离子源温度600℃；雾化器压力413.7 kPa；辅助加热器压力413.7 kPa；气帘气压力275.8 kPa。

3 方法学考察

3.1 精密度试验 取泽泻1份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下连续进样6次。以泽泻醇B为对照峰，测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积RSD均小于2.08%，表

明仪器精密度良好。

3.2 重复性试验 取同一泽泻6份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下进样，以泽泻醇B为对照峰，测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积RSD均小于2.93%，表明该方法重复性良好。

3.3 稳定性试验 取泽泻1份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下于0、2、4、8、12、24 h进样，以泽泻醇B为对照峰，测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积RSD均小于2.53%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

4 不同产地泽泻指纹图谱建立

4.1 相似度分析 30批泽泻按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下进样，记录55 min色谱图。将30批图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件（2012版）”，计算各批泽泻与对照图谱的相似度。结果，四川产地泽泻相似度为0.937~0.968，广西产地泽泻相似度为0.240~0.364，表明两地药材成分差异性较大，而同一产地差异较小。因此，不能建立同一指纹图谱，而应各自进行分析。

4.2 指纹图谱建立 分别将19批四川产地泽泻（S1~S19）、11批广西产地泽泻（S20~S30）图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件（2012版）”进行分析，结果见图1。S1~S19

的相似度分别为 0.995、0.995、0.975、0.976、0.960、0.987、0.978、0.963、0.980、0.994、0.995、0.977、0.997、0.967、0.994、0.973、0.948、0.976、0.998、0.990，两地均在 0.94 以上，表明同一产地泽泻成分接近，稳定性较好。0.990、0.991、0.992、0.987、0.997、0.996、0.993、0.996、0.992，而 S20~S30 分别为 0.982、

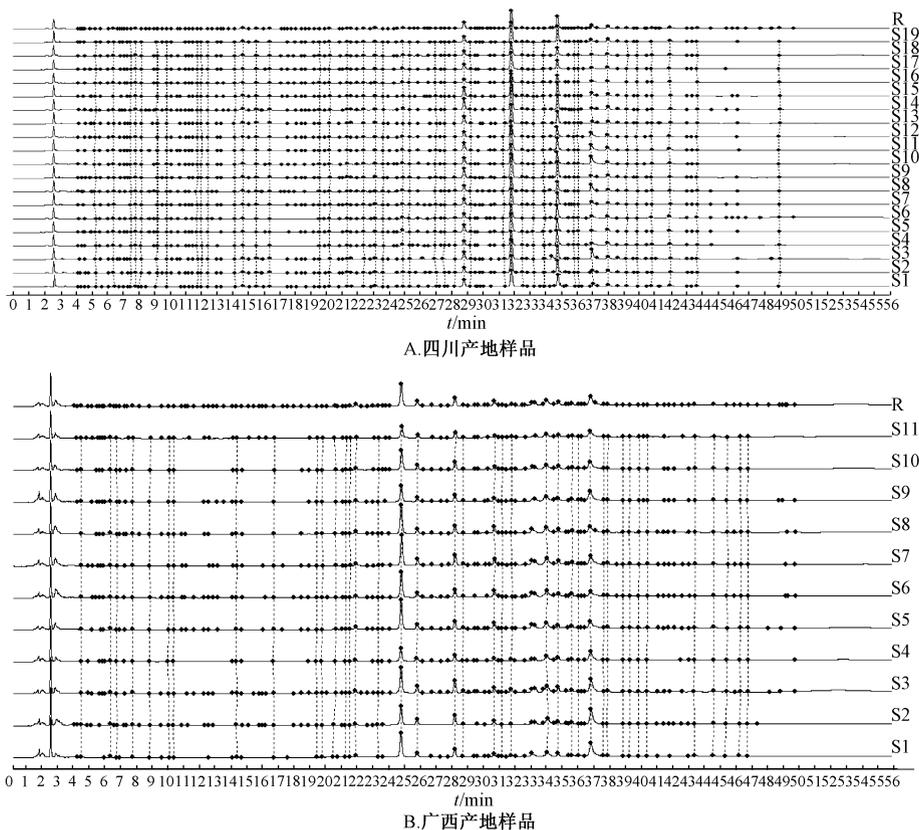
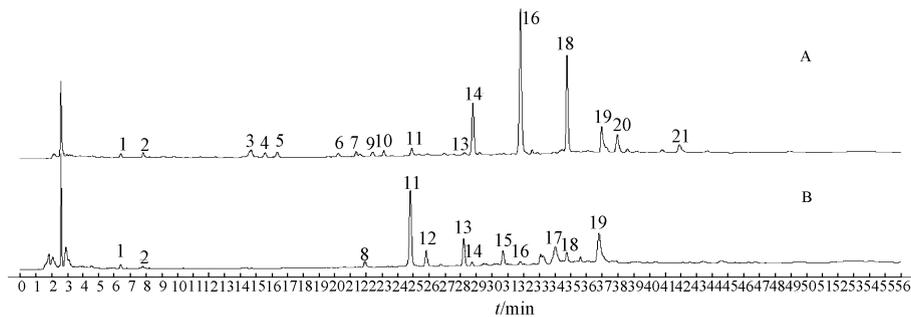


图 1 不同产地样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of samples from different growing areas

4.3 共有峰标定与分析 根据指纹图谱分析结果，分别从 19 批四川产地泽泻中标定了 17 个共有峰，11 批广西产地泽泻中标定了 12 个，按保留时间进行排序，共有 21 个色谱峰，见图 2。由此可知，峰 1、2、11、13~14、16、18~19 为两地共有，峰

3~7、9~10、20~21 为四川独有，而峰 8、12、15、17 为广西独有；四川峰 14、16、18 较高，而广西峰 11 较高。根据对照图谱可以直观看出，四川、广西产地泽泻成分差异明显。



注：A、B 分别为四川、广西产地样品。

11. 泽泻醇 A 13. 24-乙酰泽泻醇 A 16. 泽泻醇 B 18. 23-乙酰泽泻醇 B
11. alisol A 13. 24-acetate alisol A 16. alisol B 18. 23-acetate alisol B

图 2 不同产地样品对照图谱

Fig. 2 Reference chromatograms of samples from different growing areas

5 化学模式识别

5.1 聚类分析 将不同产地、批次样品指纹图谱标定的21个色谱峰峰面积导入SPSS 24.0软件(若在该保留时间下无对应色谱峰,则将峰面积定为0),峰面积数据进行Z得分标准化后以平方 Euclidean 距

离为度量标准,采用组间联接法,对标准化的数据进行系统聚类,结果见图3。根据聚类分析结果,在度量距离为10时,30批泽泻可聚为2类,其中S1~S19聚合为一类,S20~S30聚合为一类,不同批次样品按产地聚合,与相似度分析结果一致。

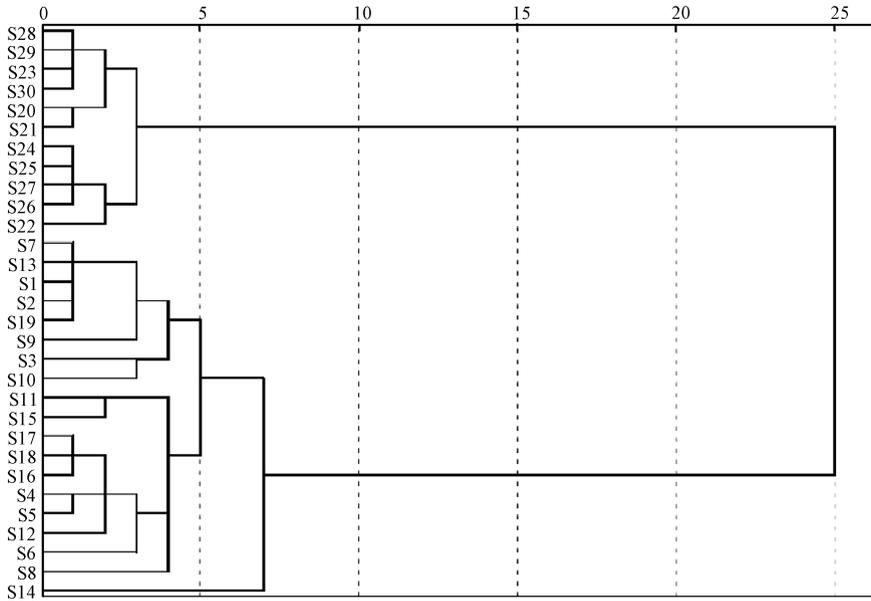


图3 30批样品聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram of thirty batches of samples

5.2 主成分分析 将不同产地、批次样品指纹图谱标定的21个色谱峰峰面积导入SIMCA14.1软件(若在该保留时间下无对应色谱峰,则将峰面积定为0),采用无监督模式识别-主成分分析,用前2个主成分进行区分。建立模型的 R^2Y (累计解释

参数)为0.863, Q^2 (预测能力参数)为0.751,表明其区分与预测能力良好,可进行产地区分。主成分分析得分图见图4,以中轴为界限,左边为广西产地泽泻,右边为四川产地泽泻。

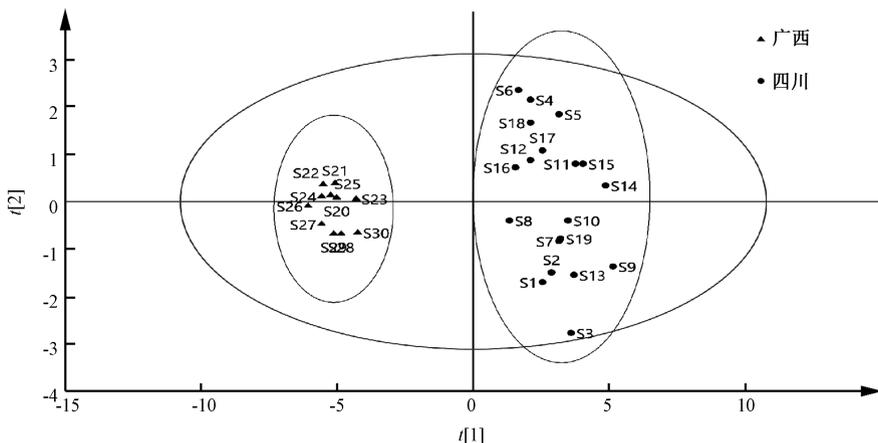


图4 30批样品主成分分析图

Fig. 4 Principal component analysis plot for thirty batches of samples

5.3 正交最小二乘法判别分析 相似度分析、聚类分析、主成分分析都可以发现2个产地泽泻差异

性较大,为了进一步探究它们之间成分的差异性,使用正交最小二乘法判别分析,生成变量重要投

影, 见图5, 得出各标定峰对于区分两地泽泻的贡献程度。以VIP大于1作为标准, 筛选出了6个对区分2个产地泽泻贡献较大的变量, 按影响大小排

列依次为峰16、峰11、峰19、峰18、峰14、峰13, 两地共有峰中都包括这6种成分。

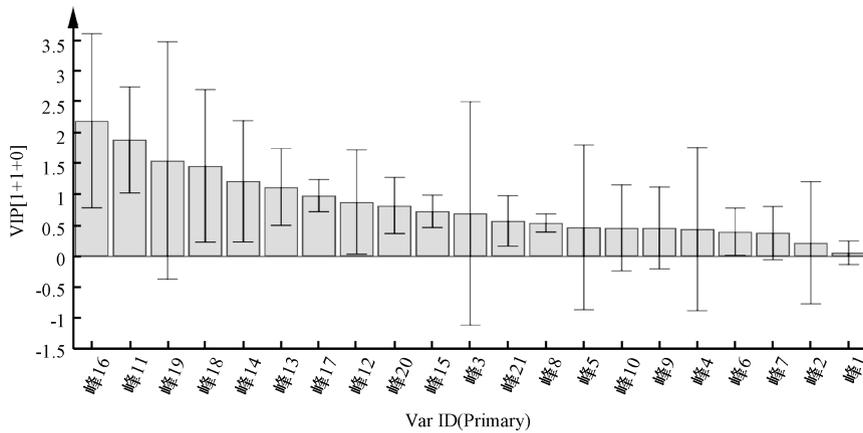


图5 变量重要性投影图

Fig. 5 VIP plot of OPLS-DA

以上结果表明, 四川、广西产地泽泻中这6种成分区别较大, 可能是导致其相似度较差的主要原因, 可据此对2个产地样品进行鉴别。

5.4 共有峰定性分析 为了确认四川、广西产地泽泻之间的差异性成分, 采用HPLC-MS/MS结合

对照品比对, 对上述标定的21个色谱峰进行鉴定, 在“2.3”“2.4”项条件下进样(为了提高检出灵敏度, 流动相中的水换为0.1%甲酸^[12]), 结果见表2。

表2 样品成分二级质谱鉴定结果

Tab. 2 MS/MS identification results of constituents in samples

峰号	t_R /min	测定值 m/z	碎片离子 m/z	分子式	化合物	参考文献
1	6.385	545.341 1[M+H] ⁺	527,485,467,431	C ₃₂ H ₄₈ O ₇	23-乙酰泽泻醇 M	[14]
2	7.866	505.351 9[M+H] ⁺	487,469,451,415,397	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	16-氧代泽泻醇 A	[15]
3	14.502	471.348 7[M+H] ⁺	453,435,381,339	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	16,23-氧化泽泻醇 B	[15]
4	15.243	487.342 1[M+H] ⁺	469,451,415,397,353	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	泽泻醇 C	[15]
5	15.852	471.343 3[M+H] ⁺	453,435,399,381,339	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	泽泻醇 H	[14]
6	20.132	487.343 8[M+H] ⁺	469,451,433,397	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	16-氧代 11-脱水泽泻醇 A	[15]
7	20.713	489.359 2[M+H] ⁺	471,453,399,381	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	16-氧代 11-去氧泽泻醇 A	[15]
8	21.893	489.356 9[M+H] ⁺	471,453,399,381	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	泽泻醇 F	[15]
9	22.499	529.353 1[M+H] ⁺	511,469,451,433,415	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	23-乙酰泽泻醇 C	[15]
10	23.279	469.330 3[M+H] ⁺	451,397	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	泽泻醇 L	[15]
11	24.893	473.363 5[M+H-H ₂ O] ⁺	455,437,383,339	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	泽泻醇 A*	[14]
12	25.76	515.373 6[M+H-H ₂ O] ⁺	497,455,437,383,365	C ₃₂ H ₅₂ O ₆	23-乙酰泽泻醇 A	[14]
13	28.116	515.372 8[M+H-H ₂ O] ⁺	497,455,437,383,365	C ₃₂ H ₅₂ O ₆	24-乙酰泽泻醇 A*	[14]
14	28.715	513.357 1[M+H] ⁺	495,453,435,381,339	C ₃₂ H ₄₈ O ₅	泽泻醇 O	[13]
15	30.544	473.361 5[M+H] ⁺	455,437,419,383	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	泽泻醇 G	[15]
16	31.519	473.363 0[M+H] ⁺	455,437,383,365	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	泽泻醇 B*	[15]
17	33.755	455.352 9[M+H] ⁺	437,383,341,339	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	泽泻醇 I	[13]
18	34.274	515.374 6[M+H] ⁺	497,479,455,437,419	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	23-乙酰泽泻醇 B*	[15]
19	36.773	471.348 1[M+H] ⁺	453,435,383	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	11-去氧泽泻醇 C	[13]
20	37.275	457.364 4[M+H] ⁺	439,385,367	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	11-去氧泽泻醇 B	[15]
21	41.236	499.379 6[M+H] ⁺	481,439,421,385	C ₃₂ H ₅₀ O ₄	11-去氧 23-乙酰泽泻醇 B	[15]

注: *表示与对照品比较。

除11~13号峰外, 各成分均存在准分子离子[M+H]⁺。以11号峰为例, 正离子模式下扫描显示 m/z 473 [M+H-H₂O]⁺, 455 [M+H-2H₂O]⁺,

437 [M+H-3H₂O]⁺, 383 [M+H-H₂O-C₄H₁₀O₂]⁺, 339 [M+H-H₂O-C₆H₁₄O₃]⁺。依据文献[14]中泽泻醇 A 裂解数据结合相应对照品, 鉴定11号峰为

泽泻醇 A。其余成分按该方法,依照相关文献数据^[13-15]及对照品,结合一级、二级离子碎片信息进行鉴定。

6 讨论

本实验用甲醇、80%乙腈、90%乙腈、乙腈进行超声提取,结果发现乙腈提取时较甲醇基线更稳定,较80%、90%乙腈出峰多,峰形好,此外2015年版《中国药典》中泽泻也采用该溶剂提取^[1]。因此,本实验选择乙腈。

泽泻作为常用的传统中药,其产地在不断变迁,由内陆向沿海地区扩张^[16]。自从清代以来,其道地产区一直是福建,但目前当地种植面积与市场占有严重下降^[2],故对比四川、广西这2个主要产区的泽泻更具有实际意义。

结果显示,四川、广西产地泽泻成分差异较大,通过化学模式识别结合 HPLC-MS/MS,筛选并鉴定出6种主要差异性成分,按影响大小排列依次为泽泻醇 B、泽泻醇 A、11-去氧泽泻醇 C、23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 O、24-乙酰泽泻醇 A。今后,可进一步以这6种成分为指标,对两地泽泻进行区分,如针对其中差异性最大的泽泻醇 B 进行含量测定;制定两地泽泻醇 B 含量限度标准以判别药材产地。

四川、广西产地泽泻成分的差异性可能是由种质差异与生长环境差异造成的,四川种质来源于当地,并进行了杂交留种实验;广西种质来源于福建,后为当地留种,并且未经过择优选育^[2];由于地理位置不同,导致两地水质、土壤、日照、温度等方面存在差别。有研究针对泽泻根际土壤与块茎中无机元素进行相关性分析,发现块茎中部分元素积累受土壤影响明显^[17],表明不同土壤背景也可能是导致泽泻成分变化的原因之一。

现代研究表明,泽泻中24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、泽泻醇 A 都具有降血脂活性,但泽泻醇 B 却不能抑制血脂升高^[18],表明四川、广西产地泽泻成分的明显差异可能会导致其药理作用区别较大。本研究筛选出的6种主要差异性成分需要作进一步药理分析,结合与药效之间的关系探究可能导致的药效差别。在当前成分与药效之间关系还不明确的情况下,制剂生产与临床应用时应注意泽泻来源,并使用固定产地的药材以保障质量稳定、疗效确切。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 蔡杏粟, 杨成梓, 温秀萍, 等. 泽泻的资源调查及外观性状评价[J]. 中国现代中药, 2016, 18(2): 193-197.
- [3] 许 树, 杨松松. 泽泻指纹图谱的初步研究[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(12): 727-728.
- [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): 1844-1847.
- [5] 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): 1712-1715.
- [6] 陈 莹, 丘建芳, 黄小强, 等. 建泽泻盐炙工艺优化及其 HPLC 指纹图谱的建立[J]. 中国药房, 2017, 28(16): 2244-2248.
- [7] 张丽娜, 张 兵, 薛志峰, 等. 泽泻 HPLC-UV 指纹图谱研究[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(3): 285-288.
- [8] 郭 威, 孙 蓉, 王 亮, 等. 基于指纹图谱和 OPLS-DA 的越南和国产土茯苓差异性化合物探索[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 62-67.
- [9] 黄文平, 温芝琪, 王萌萌, 等. 不同产地山腊梅叶 HPLC 指纹图谱[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1795-1798.
- [10] 常金花, 刘天琪, 李 申, 等. 元胡止痛片 HPLC 指纹图谱建立及3种成分测定[J]. 中成药, 2018, 40(9): 2011-2016.
- [11] 杨晓珍, 谢 苗, 王 燕, 等. 紫地榆 HPLC 指纹图谱建立及模式识别[J]. 中成药, 2018, 40(2): 383-387.
- [12] 赵新峰, 孙毓庆. 高效液相色谱-电喷雾-质谱法分析泽泻中的活性成分[J]. 中成药, 2007, 29(12): 1805-1807.
- [13] Liu X, Li S L, Zhou Y, et al. Characterization of protostane triterpenoids in *Alisma orientalis* by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(11): 1514-1522.
- [14] 邓 岳, 刘阿娜, 王小明, 等. HPLC-TOF-MS 分析泽泻提取物中三萜类化合物[J]. 化学分析计量, 2015, 24(6): 11-14.
- [15] Zhao W L, Huang X Q, Li X Y, et al. Qualitative and quantitative analysis of major, triterpenoids in *Alismatis Rhizoma* by high performance liquid chromatography/ diode-array detector/ quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Molecules*, 2015, 20(8): 13958-13981.
- [16] 李丽霞, 王书林, 王 砚, 等. 泽泻品种的本草考证[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 433-434.
- [17] 谷 巍, 申修源, 周娟娟, 等. 不同产地泽泻及其根际土壤中无机元素分布特征和相关性研究[J]. 中药材, 2012, 35(12): 1893-1897.
- [18] 彭 贤, 黄 舒, 郇皆秀, 等. 泽泻属植物化学成分与药理活性[J]. 国外医药(植物药分册), 2000, 15(6): 245-247.