

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.11.004

不同地区藏药达乌里秦艽 MEKC 指纹图谱研究^①

李成思^{1,2,3}, 卢永昌¹, 王志波¹,
张军文¹, 白雪¹, 宋仁君¹

1. 青海民族大学药学院, 西宁 810007; 2. 青海省青藏高原植物化学研究重点实验室, 西宁 810007;
3. 青海省药物分析重点实验室, 西宁 810007

摘要: 在最佳的毛细管电泳条件下建立达乌里秦艽指纹图谱。实验选择胶束毛细管电泳法, 测得的指纹图谱具有 11 个共有峰。通过共有峰的相对保留时间和峰面积, 可以衡量药材的质量及其真伪。实验方法的稳定性、精密度、重现性良好, 说明实验方法准确可靠, 可以为达乌里秦艽质量控制研究提供方法和思路。

关键词: 达乌里秦艽; 胶束毛细管电泳; 指纹图谱; 相似度

中图分类号: Q969.426.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)11-0025-05

龙胆科植物达乌里秦艽(*Gentiana dahurica* Fisch)是青藏高原特有的多年生草本, 常用于藏药方剂中, 在《藏药方剂宝库》中出现上百次, 如在培根瘀紫症方剂的代表方剂《九味秦艽散》中作君药, 功效主治培根阻喉、中毒下泻、呕吐、黄水病、中毒病;《十三味甘青乌头散》中作为君药, 功效主治清热解毒、镇静。治疗天花痘的代表方剂有《六味秦艽汤散》, 用于赤巴引起的口渴、口苦、发热、失眠, 恰牙虫引起的身痒, 对热性赤巴病有裨益^[1]。为保证原料药的质量, 通过建立药材指纹图谱, 辨别原料药的真伪, 同时对应用 MEKC 指纹图谱控制药材质量的方法起到推广效果。运用《中药色谱指纹图谱相似度评价软件》, 将测得的 10 个 MEKC 图谱导入其中, 生成 10 个不同地区的藏药达乌里秦艽 MEKC 叠加图^[2-3]。同时, 应用 SPSS 13.0 统计软件对测得的达乌里秦艽胶束毛细管电泳的数量化特征进行系统聚类分析, 可以有效地鉴别不同产地的达乌里秦艽药材^[4]。

1 实验材料

1.1 仪器

Agilent 7100 毛细管电泳系统, 梅特勒—托利多 AL204 型电子天平。

1.2 药材

达乌里秦艽, 于 2017 年 8—9 月份采自青海, 经中国科学院生物研究所卢学峰鉴定为龙胆科植物达乌里秦艽(*Gentiana dahurica* Fisch)。药材信息见表 1。

① 收稿日期: 2018-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760783); 青海省重点实验室发展专项(2017-ZJ-Y19)。

作者简介: 李成思(1994—), 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析研究。

通信作者: 卢永昌, 教授。

表 1 药材信息

| 编号 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|
| 产地 | 同仁县 | 贵南县 | 互助县 | 门源县 | 甘南州 | 泽库县 | 海南县 藏医院 | 贵德县 | 天峻县 | 湟中县 |

1.3 试剂

异荛草苷(批号: MUST-1307250)、乙腈(色谱纯)、硼砂、十二烷基磺酸钠均为分析纯试剂、自制三重蒸馏水。

2 方法

2.1 对照品溶液及样品溶液的制备

异荛草苷对照品溶液: 用 80% 甲醇配制, 质量浓度为 1.002 mg/mL。样品溶液制备方法: 精密称取达乌里秦艽样品 0.50 g, 加 10 mL 的 80% 甲醇浸提 12 h, 后超声 1 h, 过滤后取少量甲醇洗涤滤器, 将滤液完全转移至 25 mL 的容量瓶中, 定容。使用时将溶液蒸干, 加缓冲液溶解至 5 mL 即可。

2.2 实验条件

缓冲溶液: I: 分别称取 1.91 g 硼砂, 1.63 g 十二烷基磺酸钠于烧杯中, 加适量蒸馏水溶解, 完全转移至 100 mL 容量瓶中, 定溶得浓度为 50 mmol/L 硼砂—60 mmol/L 十二烷基磺酸钠的混合溶液。II: 乙腈。将 I 和 II 按 5:1 的比例混合后, 调 pH 值至 9.44。电泳参数为 Voltage: 18 kV; Cassette Temperature: 20 °C; Apply Pressure: 5 kPa×5 s; Stoptime: 60 min; 毛细管规格: 56 cm×50 μm, 检测波长: 254 nm^[5]。

2.3 参照物的选择

采用峰高增加法检测到试样中含异荛草苷, 其出峰时间为 28.323 min, 在色谱图的中间处, 宜选为参照峰。

2.4 方法学考察^[6-7]

2.4.1 稳定性实验

按 2.1 的方法制备 1 份 S1 号达乌里秦艽样品, 在最佳色谱条件下选择 7 个时间点, 分 3 d 进行检测, 第 1 天 8:00 开始, 每隔 2 h 检测 1 次, 共 5 次, 第 2 天 8:00 检测 1 次, 第 3 天 8:00 检测 1 次。计算 7 个时间点的色谱图共有峰相对保留时间(R_T)和相对峰面积(R_A)的 RSD 值, 如表 2 所示。该方法的稳定性良好。

2.4.2 精密度实验

按 2.1 的方法制备 1 份 S1 号达乌里秦艽样品, 在最佳色谱条件下连续 5 次进样测得色谱图, 计算共有峰的相对保留时间(R_T)和相对峰面积(R_A)的 RSD 值, 如表 2 所示。该方法的精密度良好。

2.4.3 重现性实验

按 2.1 的方法取 5 份 S1 号达乌里秦艽样品, 在最佳色谱条件下检测其色谱图, 计算各共有峰的相对保留时间(R_T)及相对峰面积(R_A)的 RSD 值, 如表 2 所示。该方法的重现性良好。

表 2 方法学考察结果

%

| 稳定性实验结果 | | | | | | | | | | | |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| R_T 的 RSD 值 | 4.45 | 2.44 | 5.00 | 5.50 | 2.93 | 0.00 | 2.88 | 3.02 | 4.51 | 2.25 | 2.46 |
| R_A 的 RSD 值 | 4.14 | 2.78 | 3.65 | 2.69 | 2.83 | 0.00 | 5.29 | 4.91 | 4.07 | 2.29 | 6.11 |
| 精密度实验结果 | | | | | | | | | | | |
| R_T 的 RSD 值 | 3.10 | 3.26 | 5.38 | 4.04 | 5.08 | 0.00 | 3.59 | 2.47 | 3.22 | 1.96 | 2.61 |
| R_A 的 RSD 值 | 3.20 | 5.42 | 3.63 | 3.70 | 3.78 | 0.00 | 4.60 | 2.90 | 3.32 | 5.38 | 4.66 |
| 重现性实验结果 | | | | | | | | | | | |
| R_T 的 RSD 值 | 4.04 | 6.17 | 6.78 | 4.15 | 3.54 | 0.00 | 3.07 | 2.66 | 2.82 | 3.32 | 5.91 |
| R_A 的 RSD 值 | 4.63 | 5.46 | 5.85 | 5.34 | 3.07 | 0.00 | 5.88 | 3.95 | 5.28 | 4.95 | 4.10 |

2.5 实验结果

2.5.1 参照物

根据峰高增加法鉴定达乌里秦苳色谱图中含有异荛草苳的色谱峰, 其色谱峰在图谱中分离度较好, 出峰时间适中, 可作为参照峰. 异荛草苳对照品色谱图如图 1 所示.

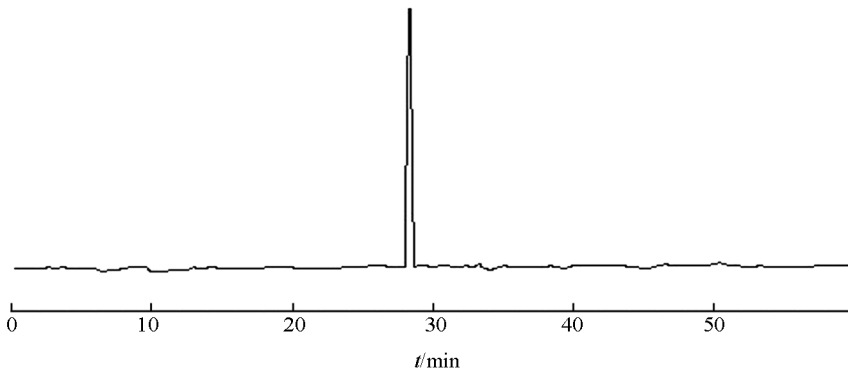


图 1 异荛草苳对照品

2.5.2 MEKC 指纹图谱

按优化的电泳条件进行测试, 测得达乌里秦苳 10 个地区供试品的 MEKC 色谱图, 如图 2 所示. 应用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统版软件》^[8-9], 将 10 个地区的达乌里秦苳色谱图导入其中, 生成指纹图谱叠加图, 如图 3 所示.

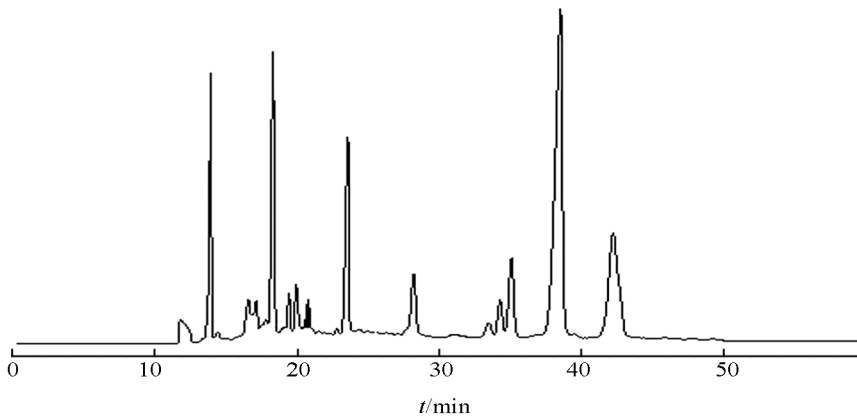


图 2 达乌里秦苳色谱图

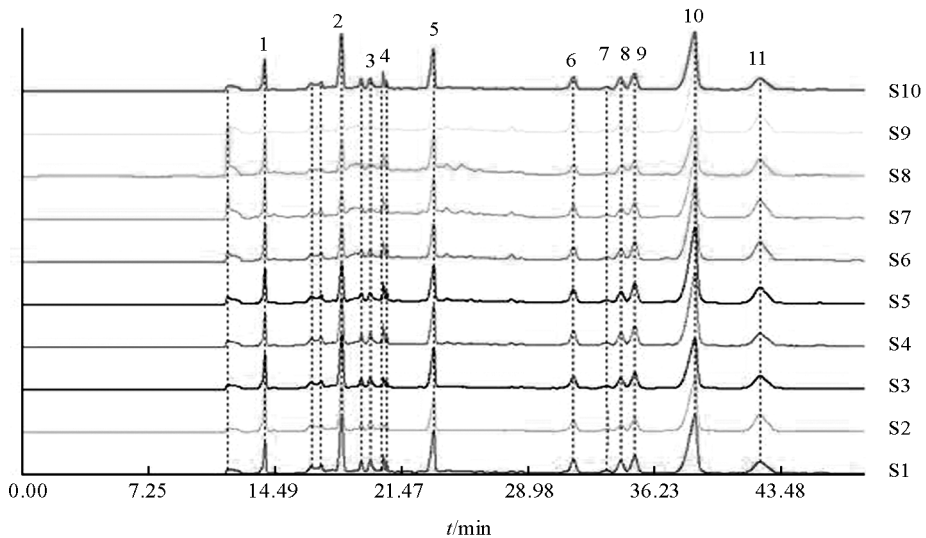


图 3 达乌里秦苳指纹图谱叠加图

2.6 指纹图谱相似度分析

2.6.1 夹角余弦法

根据夹角余弦法计算达乌里秦艽指纹图谱的相似度^[10-11], 计算结果见表 3.

表 3 10 个地区达乌里秦艽指纹图谱的相似度

| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1 | 1 | 0.998 | 0.994 | 0.995 | 0.996 | 0.998 | 0.997 | 0.995 | 0.993 | 0.996 |
| S2 | 0.998 | 1 | 0.995 | 0.993 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 0.995 | 0.993 | 0.996 |
| S3 | 0.994 | 0.995 | 1 | 0.987 | 0.998 | 0.995 | 0.997 | 0.998 | 0.997 | 0.998 |
| S4 | 0.995 | 0.993 | 0.987 | 1 | 0.988 | 0.991 | 0.991 | 0.986 | 0.982 | 0.991 |
| S5 | 0.996 | 0.996 | 0.998 | 0.988 | 1 | 0.997 | 0.997 | 0.998 | 0.998 | 0.999 |
| S6 | 0.998 | 0.997 | 0.995 | 0.991 | 0.997 | 1 | 0.997 | 0.996 | 0.995 | 0.997 |
| S7 | 0.997 | 0.998 | 0.997 | 0.991 | 0.997 | 0.997 | 1 | 0.998 | 0.995 | 0.996 |
| S8 | 0.995 | 0.995 | 0.998 | 0.986 | 0.998 | 0.996 | 0.998 | 1 | 0.997 | 0.997 |
| S9 | 0.993 | 0.993 | 0.997 | 0.982 | 0.998 | 0.995 | 0.995 | 0.997 | 1 | 0.998 |
| S10 | 0.996 | 0.996 | 0.998 | 0.991 | 0.999 | 0.997 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 1 |

2.6.2 系统聚类分析

采用系统聚类分析法测定达乌里秦艽指纹图谱的相似度^[12], 结果见图 4. 聚类通过青海省地理方位分组, 从图 4 中得知 S1, S2, S6, S7 聚为一类, 这 4 种药材来源地属于青海省南部. 东经分别为 $102^\circ, 100.75^\circ, 101.5^\circ, 102^\circ$, 北纬分别为 $35.54^\circ, 35.57^\circ, 35.03^\circ, 35.54^\circ$, 其纬度相似, 均在北纬 35° 附近.

S3, S5, S8, S9, S10 聚为另一类, 东经分别为 $101.95^\circ, 102.92^\circ, 101.47^\circ, 99.03^\circ, 101.57^\circ$, 北纬分别为 $36.84^\circ, 34.98^\circ, 36.02^\circ, 37.28^\circ, 36.49^\circ$, 其经度有差异, 纬度均大于北纬 36° (除 S5 外), 相比于第一类, 纬度增大了. S5 为北纬 34.98° , 其药材来源于甘肃省甘南藏族自治州. S4 单独为一类.

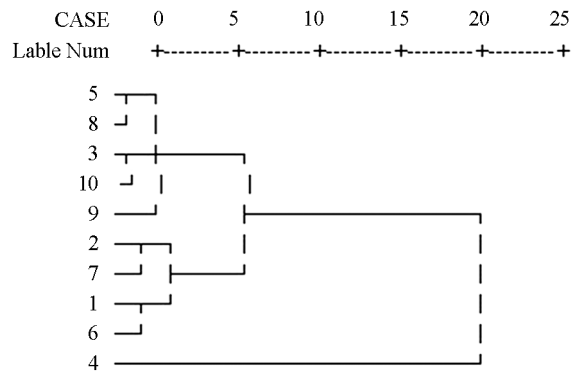


图 4 系统聚类图

3 结 语

缓冲液种类的选择是实验的关键. 为了达乌里秦艽中各个特征峰达到较好的分离度, 本实验中采用了十二烷基磺酸钠(SDS), SDS 容易起泡沫, 因此采用有机溶剂消除, 本实验选择了乙腈, 当乙腈加入缓冲液的体积超过 $1/5$ 时, 缓冲液变浑浊, 毛细管柱无法正常工作. 缓冲液的 pH 值也是实验成功与否的关键, 它直接影响峰形. 毛细管电泳的电压大小与出峰时间呈正比, 可根据情况适当调节.

实验采用夹角余弦法、系统聚类分析法对 10 个地区达乌里秦艽指纹图谱相似度进行了分析, 2 种分析方法都显示出不同地区的达乌里秦艽存在差异, 其中夹角余弦法计算结果可体现出更高的灵敏度, 系统聚类分析方法却更加直观. 结合这 2 种方法计算的结果体现出它们的相似度较高, 反映了达乌里秦艽药材的同源性, 可为提高青海省达乌里秦艽药材质量提供准确的技术依据.

参考文献:

- [1] 毛继祖, 吉守祥. 藏药方剂宝库 [M]. 兰州: 甘肃民族出版社, 2014.
- [2] 许 靖, 王成芳, 杜树山, 等. 金钱白花蛇商品药材的高效毛细管电泳指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2014, 36(3): 563-566.
- [3] 李丽蓉, 金 晨, 廖 辉, 等. 不同产地维药古丽娜 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2017, 40(3): 630-633.

- [4] 张 慧, 杨孟妮, 刘 娟, 等. 基于多种分析模式对藏茵陈水部位的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 114-118.
- [5] 白 雪, 曾擎屹, 马家麟, 等. 胶束毛细管电泳测定龙胆科植物中 5 种活性成分的含量 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(6): 2367-2370.
- [6] 惠 阳, 仲佳明, 武晓雪, 等. 高良姜黄酮类成分的毛细管电泳特征图谱分析 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 69-72.
- [7] 李成思, 张军文, 王志波, 等. 藏药白花龙胆胶束毛细管电泳指纹图谱的研究 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2018, 43(3): 65-70.
- [8] 于桂芳, 闫显光, 殷洪梅, 等. 益心舒片的 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 69-74.
- [9] 柯雪红, 罗 艳, 李东晓, 等. 芩葛颗粒 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 668-672.
- [10] 詹雪艳, 史新元, 段天璇, 等. 色谱指纹图谱组合相似度的算法 [J]. 色谱, 2010, 28(11): 1071-1076.
- [11] 许丹萍. 中药色谱指纹图谱相似度的计算 [J]. 数学学习与研究, 2012(13): 119.
- [12] 朱广磊, 睢 宁, 张春椿, 等. 不同产地浙贝母药材 HPLC-ELSD 指纹图谱的研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(5): 352-361.

Study of MEKC Fingerprint of the Tibetan Medicine *Gentiana dahurica* Fisch from Different Areas

LI Cheng-si^{1,2,3}, LU Yong-chang¹, WANG Zhi-bo¹,
ZHANG Jun-wen¹, BAI Xue¹, SONG Ren-jun¹

1. College of Pharmacy, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, China;

2. Key Laboratory of Plant Resources Chemical Research of Qinghai-Tibet Plateau in Qinghai Province, Xining 810007, China;

3. Key Laboratory of Pharmaceutical Analysis in Qinghai Province, Xining 810007, China

Abstract: An MEKC (micellar electrokinetic chromatographic) fingerprint of *Gentiana dahurica* Fisch was established under optimal capillary electrophoresis conditions. The fingerprint had 11 common peaks. The relative retention time and peak area of the common peaks were used to measure the quality and authenticity of medicinal materials. This experimental method was shown to have good stability, precision and reproducibility and, therefore, is accurate and reliable and is recommended for quality control of *G. dahurica* Fisch.

Key words: *Gentiana dahurica* Fisch; micellar capillary electrophoresis; fingerprint; similarity

责任编辑 夏 娟