

远志 HPLC 指纹图谱及 rbcL 序列分子鉴定研究

郑玉霄^{1,2}, 杨 晨^{1,2}, 张 彬^{1,2}, 李鹏辉², 龚年春², 李 超^{3*}, 李跃辉^{1,2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013

3. 湖南省药品评审与不良反应监测中心, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 建立 14 批不同产地远志药材 HPLC 指纹图谱并利用化学计量学方法对其进行质量评价。采用 DNA 分子鉴定技术对远志药材进行物种鉴定, 为远志药材质量控制提供依据。方法 选用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 0.5 μm), 流动相为乙腈-0.05% 磷酸溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 316 nm, 进样量 10 μL, 运用软件“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版) 对 14 批远志药材进行相似度评价, 确认共有峰, 对测定结果进行聚类分析和主成分分析, 并结合正交偏最小二乘-判别分析对样品进行模式识别。提取 14 批远志以及白薇、瓜子金样品的 DNA 进行序列分析和物种鉴定, 并从 NCBI 数据库下载混淆品的序列, 借助 MEGA-X 计算遗传距离并构建系统发育树。结果 建立了 14 批远志药材的 HPLC 指纹图谱, 标定了 20 个共有峰, 相似度均大于 0.918, 化学计量学分析将 14 批远志药材分为 3 类。经 DNA 分子鉴定, 14 批远志药材均为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia*, 遗传距离和 NJ 树分析可将远志与混淆品区分开。结论 所建立的 HPLC 指纹图谱稳定可靠, 可为远志的质量评价提供参考。rbcL 序列能区分远志及其混淆品, 可用于远志药材的鉴定。

关键词: 远志; HPLC 指纹图谱; DNA 分子鉴定; rbcL 序列; 西伯利亚远志糖 A5; 远志吡啶 III; 3,6'-二芥子酰基蔗糖
中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)02-0588-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.024

HPLC fingerprint and molecular identification of rbcL sequence of *Polygala tenuifolia*

ZHENG Yuxiao^{1,2}, YANG Chen^{1,2}, ZHANG Bin^{1,2}, LI Penghui², GONG Nianchun², LI Chao³, LI Yuehui^{1,2}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410013, China

3. Hunan Provincial Center for Drug Evaluation and Adverse Drug Reaction Monitoring, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints of 14 batches of *Polygala tenuifolia* from different habitats, evaluate their quality by chemometric methods, and identify the species of *P. tenuifolia* by DNA molecular identification technology, so as to prove a basis for the quality control of *P. tenuifolia*. **Methods** The analysis was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈ chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 0.5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution for gradient elution, with flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C, detection wavelength of 316 nm, injection volume of 10 μL. Similarity evaluation was performed by Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 edition) to confirm the common peaks. The clustering analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) method were carried out. The DNA of 14 batches of *P. tenuifolia*, *Cynanchum atratum* and *P. japonica* was extracted for sequence analysis and species identification, and the sequences of adulterants were downloaded from NCBI database. The genetic distance was calculated by MEGA-X and the phylogenetic tree was constructed. **Results** The HPLC fingerprints of 14 batches of *P. tenuifolia* were established, 20 common peaks were calibrated, their similarities were all greater than 0.918 and the 14 batches of *P. tenuifolia* were divided into three

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 湖南省自然科学基金药联合作项目 (2021JJ80045)

作者简介: 郑玉霄, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药及保健食品研究。E-mail: 1853347427@qq.com

*通信作者: 李跃辉, 女, 硕士生导师, 研究员, 主要从事中药新药与大健康产品的研发。E-mail: 410256518@qq.com

李 超, 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事中药质量评价与管理工作。E-mail: 44654448@qq.com

groups by chemometric analysis. The 14 batches of *P. tenuifolia* were identified by DNA molecular identification, and genetic distance and NJ tree analysis could distinguish *P. tenuifolia* from adulterants. **Conclusion** The HPLC fingerprint established in this paper is stable and reliable, which can provide reference for the quality evaluation of *P. tenuifolia*. The *rbcL* sequence can distinguish *P. tenuifolia* and its adulterants, and can be used for the identification of *P. tenuifolia*.

Key words: *Polygala tenuifolia* Willd.; HPLC fingerprint; DNA molecular identification; *rbcL* sequence; sibiricose A5; polygalaxanthone III; 3,6'-disinapoyl sucrose

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd.或卵叶远志 *P. sibirica* L.的干燥根，其药用历史悠久，始载于《神农本草经》，列为上品，视为养命之要药，具有安神益智、祛痰消肿等功效，主要用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸、神志恍惚等^[1]。现代研究表明，远志中含皂苷、呋酮、寡糖酯等化学成分，具有改善认知障碍、增强学习记忆、抗衰老等药理作用^[2-3]，临床应用广泛。

远志是我国常用大宗药材，但近年来随着临床需求量的增加，其野生资源大量减少。目前，我国的远志主要分布在山西、陕西、河北和山东等地，以山西和陕西为主要产地^[4]。但由于生产周期长、产量低、规模小，市场上近缘种、习用品、掺伪现象较多。白薇、瓜子金、三叶香草等经常被用于充当远志药材，严重影响远志药材质量和用药安全^[5]。目前对远志的鉴别以传统的性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别等为主，但传统鉴别对鉴定者理论基础和实践经验要求较高，并且受准确性、检测效率、药材形态等因素限制，影响药材鉴定准确性。近年来，DNA 分子鉴定、高效液相色谱等技术被逐渐应用到中药的质量控制^[6]。本研究拟通过 HPLC 指纹图谱对来自 3 个产地的 14 批远志药材进行指纹图谱研究，并通过 DNA 分子鉴定技术对 14 批远志药材及其近缘种白薇、瓜子金等进行 *rbcL* 序列的鉴别研究，通过化学成分表征和分子生物学信息相结合，为远志药材的质量控制及质量评价提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

14 批远志药材从陕西、山西采集，保存于湖南省中医药研究院中药创新药物研究所，经刘浩副研究员鉴定 14 批药材基原植物为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd.。14 批远志药材产地信息见表 1。市售白薇（编号 202101，产地为山东）、瓜子金（编号 202201，产地为江西）经刘浩副研究员鉴定其基原植物分别为萝藦科植物白薇 *Cynanchum atratum* Bge.和远志科植物瓜子金 *P. japonica* Hoult.。远志对照药材（批号 120989-201107）购自

表 1 14 批远志药材来源信息

Table 1 Information of 14 batches of *P. tenuifolia*

编号	产地	编号	产地
202001	陕西省渭南市合阳县	202008	山西省晋中市平遥县
202002	陕西省渭南市合阳县	202009	山西省晋中市平遥县
202003	陕西省渭南市合阳县	202010	山西省长治市沁源县
202004	陕西省渭南市合阳县	202011	山西省长治市沁源县
202005	山西省晋中市平遥县	202012	山西省长治市沁源县
202006	山西省晋中市平遥县	202013	山西省长治市沁源县
202007	山西省晋中市平遥县	202014	山西省长治市沁源县

中国食品药品检定研究院。远志呋酮 III（批号 100298-201203，中国食品药品检定研究院）、3,6'-二芥子酰基蔗糖（批号 100298-201203，中国食品药品检定研究院）、西伯利亚远志糖 A5（批号 107702-201801，宝鸡市金台区盛世科技仪经营部），所有对照品质量分数均大于 98%。

1.2 仪器

高效液相色谱仪（Agilent 1260 Infinity II，安捷伦），XPE-105 型十万分之一电子天平（梅特勒-托利多仪器有限公司），Quintix224-1CN 型万分之一电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司），GY-FS-06 型粉碎机（江西赣云食品机械有限公司），Multifuge×1R 型冷冻离心机（赛默飞世尔科技有限公司），Eppendorf AG 22331 Hamburg 型聚合酶链式反应仪（德国艾本德股份公司），Universal Hood II 型凝胶成像仪（武汉佰真生物科技有限公司），JY-SPCT 型电泳槽（北京君意东方电泳设备有限公司）。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱

2.1.1 色谱条件 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，0.5 μm，SN：USCL041482），柱温 30℃；检测波长 316 nm；进样量 10 μL；以乙腈为流动相 A，以 0.05%磷酸溶液为流动相 B；按表 2 进行梯度洗脱，预运行 10 min，体积流量 1.0 mL/min。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution procedure of mobile phase		
t/min	乙腈 (A) /%	0.05%磷酸溶液 (B) /%
0~10	10~12	90~88
10~25	12~15	88~85
25~37	15~19	85~81
37~55	19~25	81~75
55~75	25~30	75~70
75~80	30~37	70~63
80~91	37~42	63~58
91~105	42~47	58~53

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取 14 批远志药材样品粉末(过四号筛)各 1.0 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇(10%氢氧化钠溶液配制)10 mL, 称定质量, 超声(300 W、40 kHz) 30 min, 取出放冷, 再称定质量, 用 70%甲醇(10%氢氧化钠溶液配制)补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。精密称取远志对照药材粉末(过四号筛) 1.0 g, 同法制得远志对照药材溶液。

2.1.3 对照品溶液制备 取对照品西伯利亚远志糖 A5、远志呋酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖适量, 加甲醇溶解, 制成各含西伯利亚远志糖 A5、远志呋酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖约 0.2 mg/mL 的混合溶液, 作为混合对照品溶液。

2.1.4 精密度试验 取编号为 202004 的远志药材样品, 采用“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。标定 20 个特征峰, 以 5 号峰 3,6'-二芥子酰基蔗糖(S)为参照物峰, 计算其他特征峰与参照物峰的相对保留时间与相对峰面积。结果 20 个共有峰的相对保留时间的 RSD 不超过 0.53%, 相对峰面积的 RSD 不超过 1.67%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取编号为 202004 的远志药材样品, 采用“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。标定 20 个特征峰, 以 5 号峰为 3,6'-二芥子酰基蔗糖(S)为参照物峰, 计算其他特征峰与参照物峰的相对保留时间与相对峰面积。结果 20 个共有峰的相对保留时间的 RSD 不超过 0.53%, 相对峰面积的 RSD 不超过 1.45%, 表明本方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取编号为 202004 的远志药

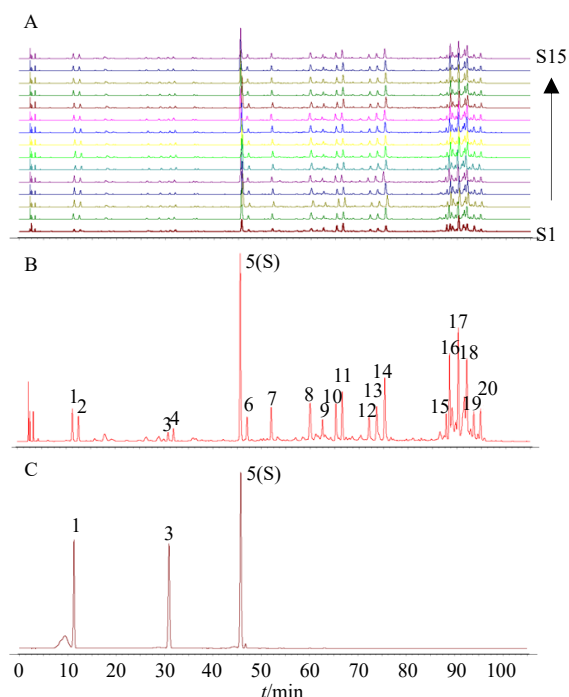
材样品, 采用“2.1.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件, 分别于 0、2、6、9、22、26、33 h 进样, 记录色谱图。标定 20 个特征峰, 以 5 号峰为 3,6'-二芥子酰基蔗糖(S)为参照物峰, 计算其他特征峰与参照物峰的相对保留时间与相对峰面积。结果表明, 20 个共有峰相对保留时间 RSD 不超过 0.66%, 相对峰面积 RSD 不超过 1.68%, 证明供试品溶液在 33 h 内稳定性好。

2.1.7 指纹图谱的建立及相似度分析 精密称取 14 批远志药材样品粉末(过四号筛)各 1.0 g, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。通过与混合对照品溶液比对, 指认了 3 个成分, 分别为西伯利亚远志糖 A5(1 号峰)、远志呋酮 III(3 号峰)、3,6'-二芥子酰基蔗糖(5 号峰)。将测定获得的 14 批远志药材 HPLC 图谱导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”, 进行多点校正(20 个 Marker 峰)并自动匹配, 以中位数法生成对照指纹图谱(R), 时间窗宽度为 0.1, 选择 S1 为参照图谱, 以 5 号峰(3,6'-二芥子酰基蔗糖)为参照峰(S), 标定了 20 个特征峰。色谱图见图 1。

计算其他特征峰与参照物峰的相对保留时间与相对峰面积, 计算得到 20 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 1.05%以内, 相对峰面积的 RSD 在 18.97%以内, 说明不同产地远志药材内含物有一定差异。计算各样品指纹图谱与对照药材及对照指纹图谱(R)的相似度。结果如表 3 所示, 以对照药材计算相似度, 14 批远志药材相似度为 0.918~0.945, RSD 为 0.989 8%; 以对照指纹图谱计算相似度为 0.997~0.999, RSD 为 0.064 7%。

2.1.8 聚类分析 将 14 批远志样品 20 个共有峰的峰面积数据导入 SPSS 25.0 软件进行分析, 选择组间连接和平方欧式距离的方法, 作聚类分析树状图。由图 2 可知, 当欧式距离为 15 时, 14 批远志按产地分为 3 类, 可见不同产地远志化学成分的含量存在一定的差异。

2.1.9 主成分分析(principal component analysis, PCA) 将 14 批远志指纹图谱的 20 个共有峰的峰面积导入 SIMCA 17 软件, 建立 PCA 模型, 得到模型解释率参数 $R^2_X=0.850$, 预测能力参数 $Q^2=0.529$, 表明提取的主成分可解释 85.0%的原始变量, 模型的预测能力为 52.9%。不同产地远志的 PCA 得分图见图 3, 可见 14 批远志样品基本分为 3 类, 与



S1-远志对照药材, S2~S15-依次为远志药材 202001—202014, 1-西伯利亚远志糖 A5, 3-远志呋酮 III, 5-3,6'-二芥子酰基蔗糖。S1-reference medicinal materials of *P. tenuifolia*, S2—S15-*P. tenuifolia* 202001—202014, 1-sibiricose A5, 3-polygalaxanthone III, 5-3,6'-disinapoylsucrose.

图 1 不同产地远志药材 (A)、对照指纹图谱 (B) 和混合对照品图谱 (C)

Fig. 1 *P. tenuifolia* from different producing areas (A), reference fingerprint (B) and chromatogram of mixed reference (C)

表 3 远志药材相似度评价结果

Table 3 Similarity evaluation results of *P. tenuifolia*

编号	相似度	
	对照药材	对照指纹图谱
202001	0.925	0.999
202002	0.925	0.999
202003	0.922	0.998
202004	0.928	0.999
202005	0.941	0.999
202006	0.938	0.999
202007	0.938	0.998
202008	0.945	0.999
202009	0.939	0.999
202010	0.918	0.997
202011	0.920	0.998
202012	0.923	0.998
202013	0.920	0.998
202014	0.923	0.998
RSD/%	0.989 8	0.064 7

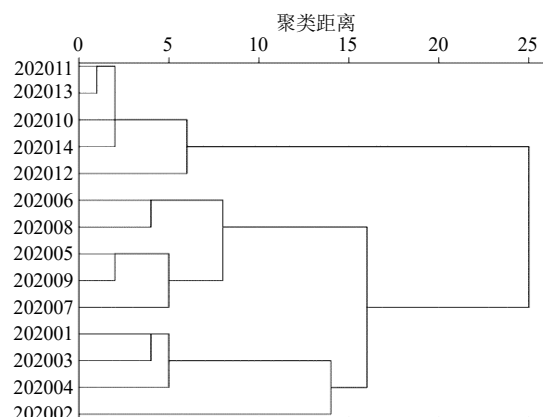


图 2 14 批远志 HPLC 指纹图谱聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of 14 batches of *P. tenuifolia*

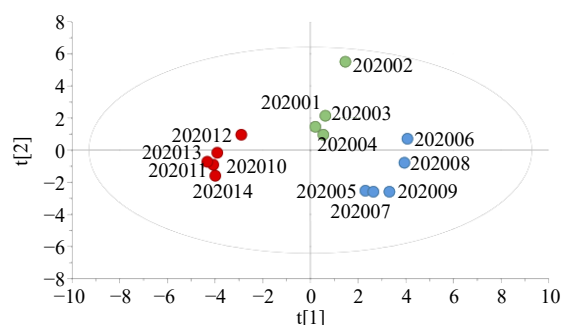


图 3 不同产地远志 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score diagram of *P. tenuifolia* from different producing areas

聚类分析结果相互佐证, 进一步说明不同产地远志药材化学成分的含量存在一定的差异。

2.1.10 正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 为进一步寻找导致不同产地远志药材间差异的标志物, 采用 OPLS-DA 模型对 14 批远志药材样品进行分析。将 14 批远志指纹图谱的 20 个共有峰的峰面积导入 SIMCA 17 软件, 建立 OPLS-DA 模型, 模型解释率参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.846 和 0.953, 模型预测能力参数 Q^2 为 0.881, 表明模型对变量 X 的可解释能力为 84.6%, 对变量 Y 的可解释能力为 95.3%, 模型的预测能力为 88.1%, 说明该模型稳定、可靠。OPLS-DA 模型结果见图 4, 该结果与聚类分析、PCA 结果一致, 进一步验证了分析结果的可靠性。

采用统计推断方法分析该模型^[7], 对模型进行 200 次置换检验进行验证, 结果如图 5 所示, 检验参数 $R^2 = (0, 0.324)$ 、 $Q^2 = (0, -0.605)$, 所有位于左边的 R^2 和 Q^2 值均低于最右边的值, 且 Q^2 点的

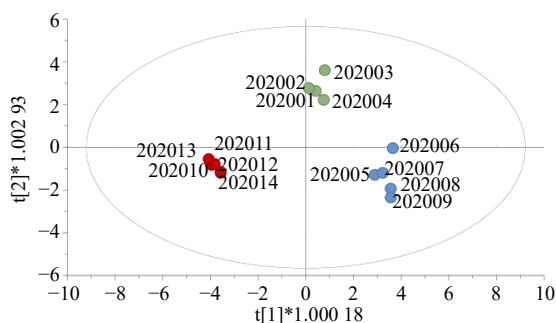


图 4 不同产地远志 OPLS-DA 得分图

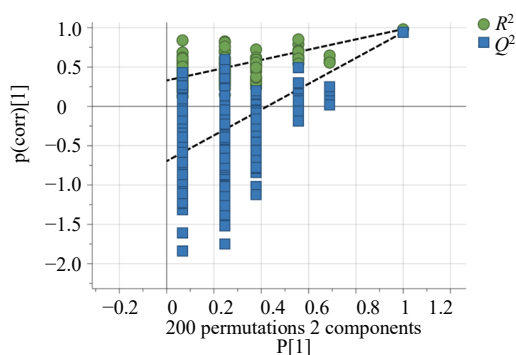
Fig. 4 OPLS-DA score diagram of *P. tenuifolia* from different producing areas

图 5 OPLS-DA 模型置换检验图

Fig. 5 OPLS-DA model replacement test diagram

回归线与垂直轴（左侧）相交于 0 以下，表明所建立的模型未出现过拟合现象，可用于 14 批远志药材的判别分析。变量投影重要性（variable importance in projection, VIP）值是筛选差异化化合物的重要指标，VIP 值越高，说明其对组间差异的影响越大^[8]。提取 20 个共有峰 VIP 值，以 VIP>1 为标准^[9-10]，筛选出 10 个主要峰，见图 6，按 VIP 值大小排序分别为 1（西伯利亚远志糖 A5）、15、5（3,6'-二芥子酰基蔗糖）、14、4、19、18、3（远志吡啶 III）、17、13 号峰。由此可见，这 10 个峰对应的化学成分可能是导致 3 个不同产地远志药材产生差异的主要原因。

2.2 rbcL 序列分子鉴定

2.2.1 样品 DNA 提取 药材用 75%乙醇擦拭药材表面，自然晾干，刮去外皮，液氮速冻研磨使成粉末，照高效植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作，提取样品基因组 DNA。

2.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系 25 μ L：2 $\times$ Prime STAR Max Premix 12.5 μ L，引物：rbcLa_F：5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'；

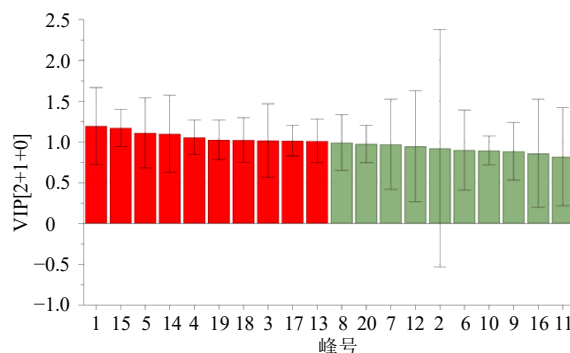


图 6 不同产地远志 OPLS-DA 的 VIP 值图

Fig. 6 VIP value diagram of *P. Tenuifolia* from different producing areas

rbcLa_R：5'-GTAAATCAAGTCCACCRG-3' 各 0.75 μ L，DNA 模板 1 μ L，灭菌水补足至 25 μ L。扩增程序：95 $^{\circ}$ C、4 min；94 $^{\circ}$ C、30 s，55 $^{\circ}$ C、1 min，72 $^{\circ}$ C、1 min，35 个循环；72 $^{\circ}$ C、10 min。制备 1%琼脂糖凝胶，电泳检测 PCR 产物 2 μ L 结果见图 7，可见各样品扩增条带单一明亮，表明各样品均扩增成功。

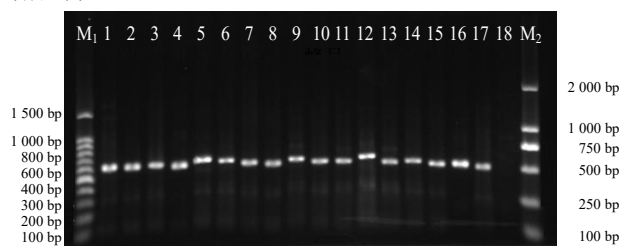
M₁-Marker, M₂-Marker, 1-远志对照药材，2~15-14 批远志药材样品，16-白薇样品，17-瓜子金样品，18-阴性对照。M₁-Marker, M₂-Marker, 1-reference medicinal materials of *P. tenuifolia*, 2—15-14 batches of *P. tenuifolia*, 16-*Cynanchum atratum*, 17-*P. japonica*, 18-blank.

图 7 rbcL 序列 PCR 产物电泳图

Fig. 7 Electrophoretogram of PCR products of rbcL sequence

2.2.3 rbcL 测序分析 rbcL 序列测序由长沙擎科生物科技公司测序完成。测序结果通过 Seqman 软件进行序列拼接和人工校正，去除拼接后的序列两端的低质量区。将所得序列通过美国国家生物技术信息中心（NCBI，<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）进行 Blast 对比鉴别，取相似性最高的比对结果。比对结果显示，14 批远志（编号 202001~202014）的 rbcL 序列一致，与 NCBI 数据库中物种 *Polygala tenuifolia* Willd（登录号：OK217278.1、NC_050829.1）的相似性均达到 100%。白薇（编号 202101）与物种 *Cynanchum atratum* Bge.（登录号：GQ436511.1）的相似性达 100%。瓜子金（编号

202201) 与物种 *Polygala japonica* Houtt. (登录号: MN206278.1) 的相似性达 100%。

另从 GenBank 数据库下载了远志混淆品的 rbcL 序列共 7 条, 样品信息见表 4, 采用 MEGA-X 软件计算遗传距离, 并构建系统发育树。遗传距离结果

见表 5, 远志种内的遗传距离均为 0.000, 远志与混淆品的遗传距离为 0.006 4~0.741 7。采用 NJ 法构建了系统发育树, 结果见图 8, 远志属共聚为一个大致, 其中 14 批远志样品与 NCBI 数据库中远志已有序列聚为一支, 混淆品各自分支或相互聚为一支。

表 4 样品信息
Table 4 Sample information

样品	拉丁名	来源	登录号
远志 (202001~202014)	<i>Polygala tenuifolia</i> Willd.	陕西、山西	—
白薇	<i>Cynanchum atratum</i> Bge.	山东	—
瓜子金	<i>P. japonica</i> Houtt.	江西	—
远志	<i>P. tenuifolia</i> Willd.	NCBI 数据	NC_050829.1
瓜子金	<i>P. japonica</i> Houtt.	NCBI 数据	MT384910.1
小扁豆	<i>P. tatarinowii</i> Regel.	NCBI 数据	MN192648.1
西南远志	<i>P. crotalarioides</i> Buch.-Ham. ex DC.	NCBI 数据	NC_060367.1
白薇	<i>Cynanchum atratum</i> Bge.	NCBI 数据	GQ436511.1
三叶香草	<i>Lysimachia insignis</i> Hemsl.	NCBI 数据	JF942413.1
山麦冬	<i>Liriope spicata</i> (Thunb.) Lour.	NCBI 数据	AB113258.1
麦冬	<i>Ophiopogon japonicus</i> (L. f.) Ker-Gawl.	NCBI 数据	AB125346.1

表 5 遗传距离分析
Table 5 Genetic distance analysis

样品	遗传距离
远志种内	0.000 0
远志与瓜子金种间	0.006 4~0.006 6
远志与小扁豆种间	0.051 0
远志与西南远志种间	0.019 1
远志与白薇种间	0.197 5
远志与三叶香草种间	0.165 6
远志与山麦冬种间	0.741 7
远志与麦冬种间	0.235 7

3 讨论

3.1 提取工艺的优化

本研究对回流提取与超声提取 2 种方式进行了考察, 结果发现回流提取与超声提取所得的远志药材图谱无差异, 考虑到操作的方便性, 选择超声提取作为处理方式。对提取溶剂甲醇、水、70%甲醇 (10%氢氧化钠溶液配制) 进行考察, 发现 70%甲醇 (10%氢氧化钠溶液配制) 样与水样的检测图谱中整体峰形较好、分离效果较好, 峰数多, 但水样在制备时难滤过, 滤液较浑浊, 因此选择 70%甲醇 (10%氢氧化钠溶液配制) 作为提取溶剂。对提取溶剂 70%甲醇 (10%氢氧化钠溶液配制) 不同用量 10、20、30 mL 进行考察, 发现溶剂用量对远志药材 HPLC 图谱的峰数、分离效果无明显影响, 考虑到溶剂用

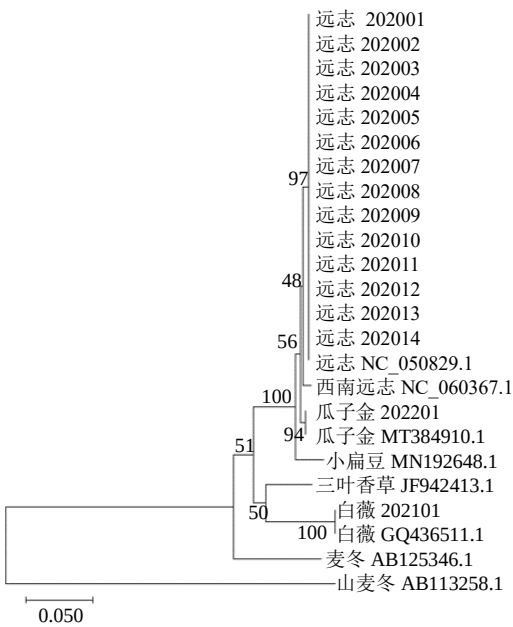


图 8 基于 rbcL 序列构建的 NJ 树

Fig. 8 NJ tree based on rbcL sequences

量高时, 响应值较低, 不利于峰信号采集, 故选择 10 mL 作为溶剂用量。对提取时间进行考察, 发现提取时间 20、30、40、50 min 对远志药材 HPLC 图谱的峰数、分离效果无明显影响, 为保证样品提取完全, 选择 30 min 作为提取时间。

3.2 色谱条件的优化

本研究对不同流动相 (乙腈-水、乙腈-0.05%磷

酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液)进行了考察,发现当流动相为乙腈-水时后四分之一时间段内的色谱峰基线不平稳,色谱峰分离效果差。乙腈-0.05%磷酸和乙腈-0.1%磷酸 2 种流动相体系的色谱峰相似,故选择乙腈-0.05%磷酸作为流动相。对检测波长(210、254、316、350 nm)进行了考察,结果发现检测波长为 254 nm 和 350 nm 时,后三分之一时间段没有色谱峰。210 nm 和 316 nm 波长下的色谱图相似,但 210 nm 为紫外末端吸收,背景基线高,流动相在该波长下吸收也很明显;316 nm 波长下色谱峰的分离效果更好,故选择 316 nm 作为检测波长。

3.3 指纹图谱及化学计量学结果分析

为进一步对不同产地远志药材进行质量评价,本研究在最佳色谱条件下对 14 批不同产地远志药材进行指纹图谱分析,14 批远志样品以对照药材图谱和对照指纹图谱计算相似度分别为 0.918~0.945 和 0.997~0.999, RSD 分别为 0.989 8% 和 0.064 7%,可以看出,以生成的对照指纹图谱计算相似度结果更好,说明 14 批远志药材相似度高,但是与对照药材存在一定差异。指纹图谱标定了 20 个共有峰,指出了 3 个共有峰化学成分。聚类分析结果为当欧氏距离为 15 时可将 14 批远志药材按产地聚为 3 类,此结果与 PCA、OPLS-DA 的结果一致,同时通过 OPLS-DA 的 VIP 筛选法得到 VIP 大于 1 的 10 个峰,推测这 10 个峰对应的化学成分可能是导致 3 个不同产地远志样品产生质量差异的潜在成分,可对不同产地远志药材的质量控制中指标成分的选择提供参考。运用化学模式对远志药材质量进行综合分析,方法简便、准确、重复性好,可为远志药材全面质量评价提供更完善的方法。

3.4 rbcL 序列分子鉴定结果分析

在植物药 4 种 DNA 条形码通用引物序列中, ITS2 序列与 psbA-trnH 序列用于远志的 DNA 分子鉴定已有报道^[5, 11],目前尚未见文献对远志 matK 序列和 rbcL 序列分子鉴定相关研究。本研究对远志样品 matK 序列和 rbcL 序列进行了 PCR 扩增,两种序列 PCR 扩增条带明亮,但后续测序结果发现远志样品 matK 序列的测序结果多为双峰,会影响分析结果的准确性,因此最终选择 rbcL 序列进行后续的研究。本研究成功扩增并测定了 14 批远志药材 rbcL 序列,经与 NCBI 数据库比对,远志各批次样品的 rbcL 序列与公共数据库中远志科植物远志的基因

组序列相似性均达到 100%,验证了 14 批远志基原均为远志科植物远志。通过遗传距离分析,发现 14 批远志药材种内遗传距离均为 0,说明 14 批远志药材均为同一物种。结合遗传距离和 NJ 树分析,发现 rbcL 序列能将远志及其混淆品明显区分开来。因此, rbcL 序列可以对远志及其混淆品白薇、瓜子金、西南远志等进行有效鉴定,为该药材的区分鉴定提供了新的技术手段,丰富了 NCBI 远志序列库。

DNA 分子鉴定是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段来进行物种鉴定的分子诊断新技术,具有快速、便捷、通用、对技术人员要求低等优点,是对传统鉴定方法的有效补充,近年来该技术被广泛应用于中药材及其基原植物的鉴定^[12-14]。HPLC 指纹图谱是基于对物质群整体作用的认识,借助于色谱技术获得的中药化学成分的色谱图,是实现鉴别产品真实性、评价质量一致性和产品稳定性的可靠手段^[15-16]。2 种鉴别方法分别从分子水平和化学成分水平鉴别,一个侧重微观层面,另一个侧重宏观层面,能更全面地评价药材质量。本研究所建立的指纹图谱方法专属性强, rbcL 序列分子鉴定方法准确度高,稳定性好,为有效控制远志药材的质量和远志药材的区分鉴定提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 263.
- [2] 姚辛敏, 周晓洁, 周妍妍, 等. 远志化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50(2): 103-107.
- [3] 曾雷, 王彩云, 王颂, 等. 远志属植物化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 林业与环境科学, 2021, 37(4): 160-175.
- [4] 洪占梅, 熊晓莉, 肖俊萍, 等. 基于高效液相色谱法测定不同产地、不同抽芯程度远志药材中 4 种成分的含量 [J]. 中南药学, 2023, 21(2): 503-507.
- [5] 马孝熙, 任伟超, 孙伟, 等. 远志药材及其混伪品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(8): 1719-1724.
- [6] 周勤梅, 朱欢, 耿昭, 等. 中药材及饮片质量控制和评价的关键技术评析 [J]. 环球中医药, 2023, 16(3): 379-386.
- [7] 孙冬梅, 罗思妮, 魏梅, 等. 不同基原大黄指纹图谱、多成分定量结合多元统计分析的质量评价研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 83-90.
- [8] 郑振兴, 胡瀚文, 曾利, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 174-180.

- [9] 王强, 苏若, 王翰华. 醒脾养儿颗粒 HPLC 指纹图谱研究与化学模式识别 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(6): 1083-1090.
- [10] 林丽, 李欢欢, 谢辉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的旋覆花药材质量评价研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1751-1758.
- [11] 樊杰, 白妍, 束明月. 远志属 7 种药用植物 ITS1 和 ITS2 序列分析 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 562-565.
- [12] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 6-7.
- [13] 时瑞梓, 田星, 赵禹, 等. 基于叶绿体 DNA 条形码的披麻草药材及其混伪品的分子鉴定 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(1): 31-37.
- [14] 张明英, 李依民, 程文萍, 等. 基于通用 DNA 条形码序列的黄精属药用植物分子鉴定 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 235-244.
- [15] 赵紫薇, 赵程成, 徐鑫梅, 等. 藏药圆柏 HPLC 指纹图谱的建立及不同品种模式识别研究 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 663-669.
- [16] 文敏, 周欣, 赵超, 等. 苗药滚山珠 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(10): 1668-1674.

[责任编辑 时圣明]