

# 金橘药材的UPLC指纹图谱建立、聚类分析及主成分分析<sup>△</sup>

黄华花<sup>1\*</sup>,王明军<sup>1</sup>,黄鸣清<sup>2</sup>,吕诗诗<sup>1</sup>,王圣江<sup>1</sup>(1.厦门医学院药学系/福建省中医药重点研究室/福建省中药精加工与健康产品开发重点研究室,福建厦门 361023;2.福建中医药大学药学院,福州 350122)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1661-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.15

**摘要** 目的:建立金橘药材的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并进行聚类分析和主成分分析。方法:采用UPLC法,色谱柱为Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,检测波长为330 nm,进样量为2 μL。以金柑苷峰为参照,绘制8批药材样品的UPLC指纹图谱;采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行相似度评价,确定共有峰;采用SPSS 24.0软件对8批药材样品进行聚类分析和主成分分析。结果:8批药材样品的UPLC指纹图谱有24个共有峰,相似度均大于0.97。聚类分析结果显示,8批药材样品可聚为两类,S1~S4、S6~S8聚为一类,S5聚为一类。经主成分分析,3个主成分因子的累计方差贡献率为81.366%。结论:所建UPLC指纹图谱及聚类分析和主成分分析结果可为金橘药材的质量控制提供参考。

**关键词** 金橘;超高效液相色谱法;指纹图谱;相似度评价;聚类分析;主成分分析

## Establishment of UPLC Fingerprint, Cluster Analysis and Principal Component Analysis of *Fortunella margarita*

HUANG Huahua<sup>1</sup>, WANG Mingjun<sup>1</sup>, HUANG Mingqing<sup>2</sup>, LYU Shishi<sup>1</sup>, WANG Shengjiang<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, Xiamen Medical College/Fujian Provincial Key Lab of Traditional Chinese Medicine/Fujian Provincial Key Lab of Traditional Chinese Medicine Finish Processing and Health Product Development, Fujian Xiamen 361023, China; 2. College of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish UPLC fingerprint of *Fortunella margarita*, and to conduct its cluster analysis and principal component analysis. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The detection wavelength was set at 330 nm, and sample size was 2 μL. Using fortunellin as reference, UPLC fingerprints of 8 batches of *F. margarita* were determined. The similarity of 8 batches of samples was evaluated by *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2012 edition) to confirm common peak. Cluster analysis and principal component analysis were performed by using SPSS 24.0 software. RESULTS: There were 24 common peaks in UPLC fingerprints of 8 batches of sample, the similarity of which was higher than 0.97. Cluster analysis showed that 8 batches of samples were clustered into 2 categories. S1, S2, S3, S4, S6, S7 and S8 were clustered into one category; S5 was clustered into the other category. By principal component analysis, the accumulative contribution rate of three main components was 81.366%. CONCLUSIONS: Established UPLC fingerprint, the results of cluster analysis and principal component analysis can provide reference for quality control of *F. margarita*.

**KEYWORDS** *Fortunella margarita*; UPLC; Fingerprint; Similarity evaluation; Cluster analysis; Principal component analysis

金橘,别名金桔、山橘、金枣、金柑、金弹等,是芸香科植物金橘[*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle]的果实,原产于我国,其中福建尤溪、广西融安、广西阳朔、江西遂川、湖南浏阳和浙江宁波是金橘的六大产区<sup>[1]</sup>。金橘药食同源,是一种营养价值较高的水果,同时也具有较高的药用价值<sup>[2]</sup>。《中华本草》记载,金橘性温,味辛、

甘,具有理气解郁、消食化痰、醒酒之功效,主治胸闷郁结、脘腹痞胀、食滞纳呆、咳嗽痰多、伤酒口渴<sup>[3]</sup>。现代研究表明,金橘具有抑菌、抗氧化、调节免疫等作用<sup>[4-5]</sup>;除可直接食用或泡水饮用外,市面上还有咸金枣、金枣丹、金桔咀嚼片等相关制剂<sup>[6-7]</sup>。目前,金橘药用方面的研究主要集中在成分分离和药理活性方面<sup>[8-10]</sup>,未见质量控制方面的报道及相关质量标准。金橘药材中许多成分的对照品在市场上购买不到,目前仅有金柑苷对照品和野漆树苷对照品,但仅对一两个成分进行含量测定并不能有效控制金橘药材的整体质量。为此,本研究收集了

<sup>△</sup>基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373940);福建省中青年教育科研项目(No.JT180659);福建省中医药重点研究室建设项目(No.ZD201405-01)

\*讲师,硕士。研究方向:中药质量控制。电话:0592-5953096。E-mail:huahua033@163.com

我国主要产地的金橘药材样品,建立了其超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并结合聚类分析和主成分分析进行综合质量评价,旨在为有效控制其质量提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Acquity 型 UPLC 仪,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器、Empower<sup>®</sup> 3 色谱工作站(美国 Waters 公司);BS224S 型电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

金柑苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:Q14M10Q73839,纯度:>98%);乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);甲醇、磷酸等其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 药材

金橘(编号:S1~S8)经厦门医学院药学院鲍红娟副教授鉴定为金橘[*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle]的果实。药材样品来源见表1。

表1 药材样品来源

Tab 1 Sample source of *F. margarita*

编号	采集地点	采集时间	品种
S1	福建龙岩漳平	2018年11月	栽培
S2	福建龙岩长汀	2018年11月	栽培
S3	福建三明八字桥	2018年12月	栽培
S4	福建三明管前	2018年12月	栽培
S5	广西桂林阳朔	2018年10月	栽培
S6	广西柳州融安	2018年10月	栽培
S7	江西吉安遂川	2018年11月	栽培
S8	江西宜春万载	2018年11月	栽培

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~20 min, 5% A→40% A; 20~25 min, 5% A); 流速: 0.3 mL/min; 检测波长: 330 nm; 进样量: 2 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取金柑苷对照品适量,精密称定,加75%甲醇溶解,制成质量浓度为24.6 μg/mL的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品适量,粉碎,过40目筛,取0.5 g,精密称定,置于具塞三角瓶中,加75%甲醇25 mL,称定质量,超声(功率:900 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,再次称定质量,用75%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S4)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以金柑苷峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相

对保留时间和相对峰面积。结果,24个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.10%(n=6),相对峰面积的RSD均小于1.92%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S4)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、10、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以金柑苷峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,24个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.28%(n=7),相对峰面积的RSD均小于2.84%(n=7),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取药材样品(编号:S4)0.5 g,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以金柑苷峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,24个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.15%(n=6),相对峰面积的RSD均小于2.90%(n=6),表明本方法重复性良好。

### 2.4 UPLC 指纹图谱的生成与相似度、共有峰相关分析

2.4.1 UPLC 指纹图谱的生成 取8批药材样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对8批药材样品指纹图谱进行分析,得UPLC 指纹图谱,详见图1、图2。

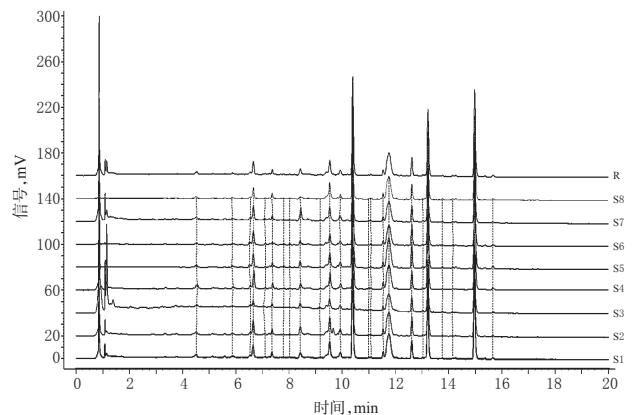


图1 8批药材样品的UPLC 叠加指纹图谱

Fig 1 UPLC superimposed fingerprint of 8 batches of samples

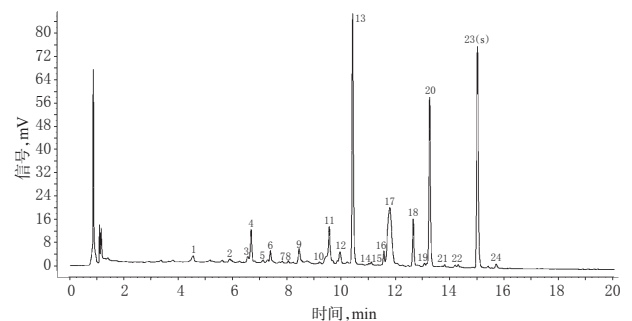


图2 药材样品的UPLC 对照指纹图谱

Fig 2 UPLC control fingerprint of samples

2.4.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评

价系统》(2012版),以药材样品的UPLC对照指纹图谱为对照,进行整体相似度评价。结果显示,8批药材样品的相似度均大于0.97,提示药材样品的化学成分一致性较好,详见表2。

表2 8批药材样品相似度评价结果

**Tab 2 Similarity evaluation of 8 batches of samples**

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
S1	1.000	0.998	0.994	0.999	0.987	0.994	0.993	0.999
S2	0.998	1.000	0.992	0.997	0.987	0.993	0.992	0.997
S3	0.994	0.992	1.000	0.994	0.984	0.989	0.992	0.992
S4	0.999	0.997	0.994	1.000	0.990	0.995	0.991	0.998
S5	0.987	0.987	0.984	0.990	1.000	0.996	0.971	0.989
S6	0.994	0.993	0.989	0.995	0.996	1.000	0.982	0.994
S7	0.993	0.992	0.992	0.991	0.971	0.982	1.000	0.987
S8	0.999	0.997	0.992	0.998	0.989	0.994	0.987	1.000

2.4.3 共有峰的指认及相关分析 8批药材样品共有24个共有峰,通过与对照品溶液的UPLC图(见图3)比对,指认23号峰为金柑苷峰。因该峰分离度良好、峰面积大且稳定,故以其保留时间和峰面积为参照,计算其他峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表3、表4。

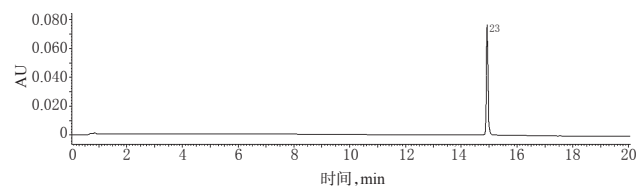


图3 对照品的UPLC图

Fig 3 UPLC chromatogram of substance control

表3 8批药材样品UPLC图谱共有峰的相对保留时间

**Tab 3 Relative retention time of common peaks in UPLC chromatograms for 8 batches of samples**

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	RSD, %
1	0.302	0.301	0.303	0.304	0.301	0.302	0.302	0.302	0.30
2	0.391	0.391	0.391	0.394	0.391	0.392	0.391	0.390	0.26
3	0.437	0.437	0.437	0.436	0.435	0.435	0.437	0.437	0.21
4	0.444	0.444	0.444	0.446	0.444	0.445	0.445	0.445	0.10
5	0.474	0.474	0.470	0.475	0.474	0.475	0.474	0.474	0.31
6	0.492	0.492	0.492	0.493	0.492	0.492	0.492	0.492	0.07
7	0.520	0.520	0.521	0.521	0.520	0.521	0.520	0.520	0.08
8	0.535	0.535	0.536	0.536	0.535	0.536	0.536	0.536	0.03
9	0.563	0.562	0.562	0.563	0.562	0.562	0.564	0.562	0.12
10	0.612	0.612	0.612	0.613	0.612	0.612	0.612	0.612	0.05
11	0.636	0.636	0.636	0.637	0.636	0.636	0.636	0.636	0.04
12	0.663	0.663	0.663	0.664	0.663	0.662	0.662	0.663	0.09
13	0.694	0.694	0.694	0.694	0.694	0.694	0.694	0.694	0.04
14	0.734	0.734	0.734	0.734	0.733	0.733	0.733	0.733	0.03
15	0.740	0.739	0.739	0.740	0.739	0.739	0.739	0.739	0.05
16	0.771	0.770	0.770	0.770	0.770	0.770	0.770	0.770	0.03
17	0.785	0.785	0.785	0.785	0.785	0.785	0.785	0.785	0.03
18	0.843	0.843	0.843	0.842	0.842	0.842	0.842	0.842	0.02
19	0.870	0.870	0.870	0.870	0.870	0.870	0.870	0.869	0.04
20	0.883	0.883	0.883	0.882	0.883	0.883	0.883	0.883	0.02
21	0.919	0.919	0.919	0.919	0.919	0.919	0.919	0.919	0.01
22	0.945	0.945	0.945	0.945	0.945	0.945	0.945	0.945	0.03
23(对照)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
24	1.046	1.046	1.046	1.046	1.046	1.046	1.046	1.046	0.02

表4 8批药材样品UPLC图谱共有峰的相对峰面积

**Tab 4 Relative peak area of common peaks in UPLC chromatograms for 8 batches of samples**

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	RSD, %
1	0.047	0.044	0.041	0.063	0.022	0.029	0.044	0.033	30.89
2	0.027	0.022	0.025	0.026	0.012	0.022	0.027	0.009	33.00
3	0.033	0.031	0.022	0.041	0.027	0.043	0.037	0.023	24.42
4	0.146	0.163	0.085	0.188	0.121	0.200	0.191	0.136	25.84
5	0.012	0.008	0.013	0.014	0.003	0.018	0.019	0.008	44.54
6	0.054	0.060	0.046	0.048	0.031	0.032	0.059	0.060	24.07
7	0.006	0.005	0.005	0.005	0.011	0.012	0.006	0.004	43.17
8	0.009	0.009	0.009	0.006	0.008	0.012	0.008	0.008	18.54
9	0.087	0.122	0.087	0.070	0.048	0.052	0.204	0.019	65.89
10	0.010	0.006	0.024	0.007	0.006	0.005	0.009	0.007	66.36
11	0.273	0.305	0.185	0.240	0.153	0.200	0.241	0.296	22.91
12	0.077	0.092	0.090	0.065	0.053	0.067	0.115	0.059	26.65
13	0.980	1.024	0.886	0.967	1.217	1.182	0.830	1.034	13.07
14	0.009	0.009	0.006	0.007	0.002	0.004	0.009	0.006	38.32
15	0.011	0.014	0.013	0.010	0.010	0.012	0.016	0.011	15.30
16	0.061	0.068	0.062	0.064	0.042	0.052	0.053	0.062	14.27
17	0.712	0.713	0.681	0.652	0.635	0.728	0.723	0.722	5.11
18	0.178	0.193	0.216	0.170	0.183	0.271	0.209	0.170	17.06
19	0.014	0.014	0.019	0.016	0.010	0.014	0.018	0.009	25.60
20	0.780	0.756	0.678	0.736	0.716	0.817	0.759	0.800	6.01
21	0.008	0.008	0.009	0.008	0.009	0.009	0.007	0.008	9.75
22	0.011	0.010	0.012	0.010	0.010	0.009	0.009	0.011	8.53
23(对照)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
24	0.022	0.019	0.027	0.023	0.026	0.023	0.020	0.022	12.22

2.5 聚类分析

以各共有峰的峰面积除以称样量的数值作为原始数据,采用SPSS 24.0软件,以组间联接法结合平方欧氏距离对8批药材样品进行聚类分析,详见图4。由图4可知,8批药材样品可聚为两类,S1~S4、S6~S8聚为一类,S5聚为一类。

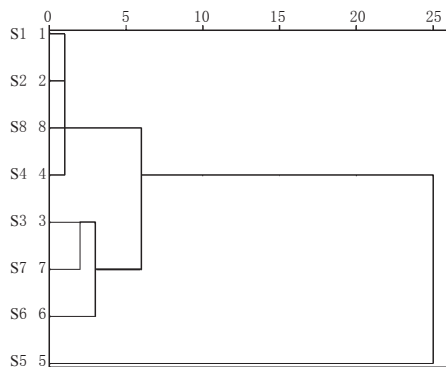


图4 8批药材样品聚类分析树状图

Fig 4 Dendrogram of cluster analysis of 8 batches of samples

2.6 主成分分析

对8批药材样品的24个共有峰的绝对峰面积进行标准化处理后,采用SPSS 24.0软件进行主成分分析,其特征值和方差贡献率结果见表5。由表5可知,共得到3个主成分因子,特征值分别为10.736、6.067、2.725,方差贡献率分别为44.732%、25.280%、11.353%,累计方差贡献率为81.366%。这提示,主成分因子1、2、3可作为

金橘药材的评价指标,适用于主成分分析。故取主成分因子1、2、3为指标对8批药材样品进行评价,详见表6、图5。结果显示,8批药材样品中S1~S4、S6~S8样品质量较为相近,与S5质量差异较大。

表5 3个主成分因子的特征值和方差贡献率

Tab 5 Eigen value and variance contribution rate of 3 main component factors

主成分因子	特征值	方差贡献率, %	累计方差贡献率, %
1	10.736	44.732	44.732
2	6.067	25.280	70.013
3	2.725	11.353	81.366

表6 8批药材的主成分因子得分

Tab 6 Scores of principal component factors of 8 batches of samples

编号	主成分因子1	主成分因子2	主成分因子3
S1	0.172	0.591	-0.301
S2	0.496	0.985	-0.647
S3	-1.396	-0.605	-0.277
S4	0.546	1.198	0.558
S5	1.859	-1.267	0.282
S6	-0.606	-1.092	1.393
S7	-0.736	0.825	0.834
S8	-0.335	-0.636	-1.840

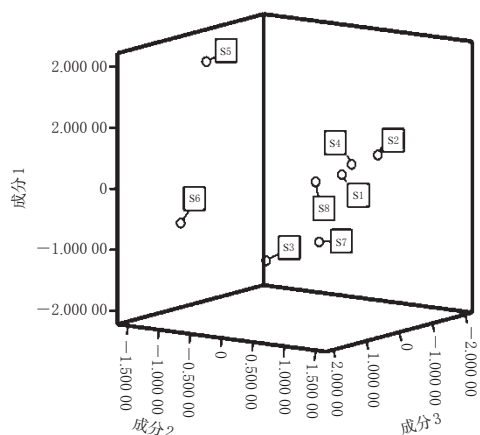


图5 8批药材样品主成分因子得分散点图

Fig 5 Scattering plot of principal component factors of 8 batches of samples

### 3 讨论

现代研究表明,金橘具有抗炎镇痛、镇咳祛痰、免疫调节、预防结石、解酒保肝等作用<sup>[11-14]</sup>,其主要有效成分为黄酮类成分<sup>[12,15]</sup>。也有研究发现,金橘中所含的黄酮类成分包括金柑苷、柚皮素、根皮苷、野漆树苷、4'-甲氧基-牡荆素-2''-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷、4'-甲氧基-异牡荆素-2''-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷、芦丁等<sup>[16-18]</sup>。笔者参考上述文献,发现金柑苷为金橘的特征性成分之一,因此选择金柑苷作为参照峰建立金橘药材的UPLC指纹图谱。

本试验比较了乙腈-水、甲醇-水的流动相体系,发现两种体系中各组分分离度均较好,但采用乙腈-水流动相体系时出峰较快,因此初步选出乙腈-水为流动相体系。但试验过程中发现,检测一段时间后,色谱峰出现

了拖尾现象,而再加入0.1%磷酸可使峰形改善且稳定,故最终确定乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相。笔者又比较了267、330 nm波长下样品的色谱行为,发现在330 nm波长下基线较平稳,色谱峰较多,各峰的峰高合适,故选择330 nm为检测波长。

采用50%、75%、100%甲醇分别对样品进行提取时,发现得到的色谱峰及各峰面积差异不大,但50%甲醇提取时的样品溶液滤过困难,又考虑到环保因素,最终选择75%甲醇为提取溶剂。同时,笔者又考察了不同提取时间(15、30、45 min)对提取效果的影响,结果发现,提取30 min时的提取效果较提取15 min好,提取45 min时与提取30 min无显著差异,故选择提取时间为30 min。

相似度评价结果显示,8批药材样品的相似度均大于0.97,表明药材样品的化学成分一致性较好;8批样品24个共有峰的相对保留时间的RSD范围为0~0.31%,相对峰面积的RSD范围为0~66.36%,表明不同产地间药材样品虽具有相同的化学成分,但含量存在差异。聚类分析、主成分分析结果均显示,8批药材样品可聚为两类,S1~S4、S6~S8聚为一类,S5聚为一类,表明8批药材样品中S1~S4、S6~S8样品质量较为相近,与S5质量差异较大。该结果与相似度评价结果一致,其原因可能与药材的产地、采集时间、植株生长年份不同有关。

综上所述,本研究所建UPLC指纹图谱及聚类分析和主成分分析结果可为金橘药材的质量控制提供参考。

### 参考文献

- [1] 郑洁, 江东, 张耀海, 等. 我国主要金柑品种果皮中挥发性成分比较[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 145-150.
- [2] 李丽, 盛金凤, 孙健, 等. 金桔的营养价值及综合利用现状与前景[J]. 食品工业, 2015, 36(9): 220-224.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第四卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 936.
- [4] 项娟娟. 金桔胶囊抗炎镇痛、镇咳祛痰和免疫增强的药理学作用[J]. 中国药房, 2014, 25(11): 1003-1005.
- [5] 黎继烈, 崔培梧, 吴耀辉, 等. 金橘黄酮对小鼠抗氧化作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1031-1032.
- [6] 郑正男, 丁利君, 郑希, 等. 梅子风味金枣丹的加工工艺技术研究[J]. 食品工业, 2016, 37(1): 160-163.
- [7] 零东宁, 何雪梅, 孙健, 等. 金桔咀嚼片加工工艺的研究[J]. 轻工科技, 2015(8): 12-13.
- [8] 孟猛. 金柑柠檬苦素类化合物的提取纯化、结构鉴定及生物活性研究[D]. 福州: 福建农业大学, 2013.
- [9] 陈萍, 娄东华, 王建刚. 金橘挥发性成分的SPME-GC/MS分析[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(12): 140-142.
- [10] 刘顺珍, 刘红星, 张丽霞, 等. 金橘叶和金橘果皮挥发油成分的分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 36(26): 15968-15972.
- [11] 白婕. 金橘化学成分及抗氧化作用初步研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2007.
- [12] 黎继烈, 王卫, 刘忠敏, 等. 金橘黄酮对小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1599-1600.

# 基于ISSR技术对藏药“蒂达”3种基源植物的亲缘关系分析<sup>Δ</sup>

李水仙<sup>1\*</sup>, 夏从龙<sup>1</sup>, 陈丽元<sup>2#</sup> (1. 大理大学基础医学院病理教研室, 云南大理 671000; 2. 昆明医科大学第一附属医院药剂科, 昆明 650032)

中图分类号 R282; Q37 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1665-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.16

**摘要** 目的: 对藏药“蒂达”的3种基源植物紫红獐牙菜、青叶胆和椭圆叶花锚进行亲缘关系研究。方法: 利用简单重复序列区间(ISSR)分子标记技术对紫红獐牙菜9个样品(样品ZT-1~ZT-5采自大理苍山感通寺, 样品ZC-1~ZC-4采自大理宾川县)、青叶胆2个样品(QYD-1~QYD-2)和椭圆叶花锚2个样品(HM-1~HM-2)进行聚合酶链式反应(PCR)扩增。采用青叶胆的DNA基因组为模板DNA进行引物筛选, 对筛选得到的8条引物进行PCR反应; 对PCR扩增产物进行人工读带, 建立原始数据矩阵, 并计算多态性条带比率; 同时, 采用NTSYS 2.1软件计算遗传相似系数, 并选择UPGMA法绘制聚类图。结果: 通过8条ISSR引物共反应获得113条清晰可辨的PCR扩增产物条带, 多态性位点百分率为100%。紫红獐牙菜、青叶胆和椭圆叶花锚3个品种共13个样品的遗传相似系数在0.301~0.500之间; 紫红獐牙菜9个样品的种内遗传相似系数在0.752~0.929之间。聚类分析结果显示, 当距离线为0.410时, 可将13个样本分为3个类群, 即青叶胆、椭圆叶花锚、紫红獐牙菜; 当距离线为0.780时, 可将紫红獐牙菜的9个样品分为2个亚类, 一个亚类只有苍山感通寺采集的样品ZT-1, 另一个亚类含有其余8个样品。结论: 利用ISSR分子标记技术能从分子水平对紫红獐牙菜、青叶胆和椭圆叶花锚进行鉴别。紫红獐牙菜与青叶胆、椭圆叶花锚存在一定的亲缘关系, 但亲缘关系相对较远、遗传差异较大; 大理地区两个不同地点产紫红獐牙菜的遗传差异较小、亲缘关系较近, 但表现出丰富的遗传多样性。

**关键词** ISSR分子标记技术; 紫红獐牙菜; 青叶胆; 椭圆叶花锚; 鉴定; 亲缘关系; 遗传多样性

## Analysis of the Phylogenetic Relationships of 3 Basic Plants of Tibetan Medicine “Dida” Based on ISSR Technology

LI Shuixian<sup>1</sup>, XIA Conglong<sup>1</sup>, CHEN Liyuan<sup>2</sup> (1. Pathology Teaching and Research Section, College of Basic Medicine, Dali University, Yunnan Dali 671000, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the phylogenetic relationships of 3 basic plants of Tibetan medicine “Dida”, such as *Swertia puricea*, *Wertia mileensis*, *Halenia elliptica*. METHODS: ISSR technology was used for PCR amplification of 9 samples of *S. puricea* (ZT-1 to ZT-5 from Gantongsi in Dali Cangshan, ZC-1 to ZC-4 from Binchuan county of Dali), 2 samples of *W. mileensis* (QYD-1 to QYD-2) and 2 samples of *H. elliptica* (HM-1 to HM-2). Using DNA genome of *S. puricea* as template, 8 primers were screened and used for PCR reaction. The PCR amplification products were read by hand, the original data matrix was established, and the polymorphic band ratio was calculated. At the same time, genetic similarity coefficient was calculated by using NTSYS 2.1 software, and UPGMA method was used to draw cluster diagram. RESULTS: A total of 113 clear and identifiable amplification product bands were obtained by 8 ISSR primers. The rate of polymorphic site was 100%. The genetic similarity coefficients for totally 13 samples of *S. puricea*, *W. mileensis* and *H. elliptica* ranged 0.301-0.500. Intraspecific genetic similarity coefficients for 9 samples of *S. puricea* ranged from 0.752 to 0.929. The cluster analysis showed, when the range line was 0.410, 13 samples could be divided into three groups, i.e. *S. puricea*, *W. mileensis*, *H. elliptica*; when the range line was 0.780, 9

[13] 余志运, 石洪波, 张雪军, 等. 金桔液预防草酸钙肾结石的实验与临床研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2005, 20(9): 543-545.

[14] 陈则夷. 金柑解酒保肝组方功效研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81260677); 云南省教育厅科学研究基金重点项目(No.2012Z118)

\* 助教, 硕士。研究方向: 药用植物的种质资源评价及其药理作用机制。E-mail: lsx5289@163.com

# 通信作者: 药师, 硕士。研究方向: 药用植物的种质资源评价。E-mail: 1070162150@qq.com

[15] 唐巧玉, 周毅峰, 朱玉昌, 等. 金橘皮中黄酮类物质的提取及其体外抗氧化活性研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(6): 258-261.

[16] 田圣梅. 蕨菜和金橘果实化学成分的研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2011.

[17] 葛永斌. 金橘化学成分研究[J]. 中药材, 2014, 37(3): 435-438.

[18] 王治元, 李宁, 王开金, 等. 金橘果皮的化学成分[J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(1): 92-94.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-04-23)

(编辑: 陈宏)