

# 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)

samples of *S. purpurea* could be divided into 2 subgroups, one of which was only sample ZT-1 collected from Gantongsi in Cangshan, and the other contained the remaining 8 samples. CONCLUSIONS: ISSR technology can be used to identify *S. puricea*, *S. glabra* and *H. elliptica* at the molecular level. *S. puricea* has some genetic relationship with *S. glabra* and *H. elliptica*, but the genetic relationship is relatively distant and the genetic difference is large. *S. puricea* from two different locations in Dali area has little genetic difference and close relationship, but it shows abundant genetic diversity.

**KEYWORDS** ISSR; *Swertia puricea*; *Swertia mileensis*; *Halenia elliptica*; Identification; Phylogenetic relationship; Genetic diversity

简单重复序列区间(Inter-simple sequence repeat, ISSR)是由加拿大蒙特利尔大学 Zietkeiwicz E 等<sup>[1]</sup>在聚合酶链式反应(PCR)基础上提出的分子标记技术,其基本原理是以锚定的微卫星 DNA 为引物,在简单重复序列(SSR)的 3' 端或 5' 端加上 1~4 个随机核苷酸,锚定引物可在 PCR 反应中引起特定位点退火,导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间 DNA 片段进行 PCR 扩增。ISSR 分析具有操作方便、精确、快速、高效且 DNA 用量少等优点<sup>[2]</sup>,目前已广泛应用于植物品种鉴定、基因定位、遗传多样性分析等研究中<sup>[3-5]</sup>。

“蒂达”是藏药中治疗肝胆疾病最具有代表性的常用药物之一,具有悠久的用药历史,它是指“味苦,能治疗肝胆疾病”的一类功效相近的药物的总称<sup>[6-7]</sup>。《晶珠本草》中有记载:“蒂达可清热,治胆病、血病,有清肝利胆、退诸热的作用”<sup>[8]</sup>。藏药“蒂达”品种繁多、基源复杂,涉及到龙胆科獐牙菜属、花锚属、扁蕾属、肋柱花属、喉毛花属及虎耳草科虎耳草属、唇形科等多种植物<sup>[6,9-10]</sup>。龙胆科植物为“蒂达”常用药用植物之一,其中龙胆科植物青叶胆(*Swertia mileensis* T. N. Ho. et L. Shih)、椭圆叶花锚(*Halenia elliptica* D. Don)为其主要药用基源植物,但由于资源需求量较大、过度开采,目前已濒临灭绝<sup>[11-13]</sup>。藏医常用同科植物紫红獐牙菜(*Swertia puricea* Hemsl)进行替代使用。目前对青叶胆、椭圆叶花锚和紫红獐牙菜的成分及药理作用研究较多<sup>[14-18]</sup>,而从分子水平对三者进行亲缘性分析的研究尚未见报道。因此,本课题组利用 ISSR 分子标记技术对藏药“蒂达”3 种基源植物(青叶胆、椭圆叶花锚、紫红獐牙菜)的亲缘关系进行评价并进行遗传学多样性分析,为紫红獐牙菜作为“蒂达”基源的替代使用提供可靠依据,也为青叶胆及其近缘种药用植物的遗传改良、选种育种、亲本选配、种质保护和核心种质构建等提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Applied Biosystem 2720 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);GBOX HR 型化学发光凝胶成像系统(英国 Syngene 公司);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);UV-1102 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

溴代十六烷基三甲胺(CTAB,美国 Amresco 公司,

批号:0833);2×Taq PCR Master Mix 试剂[包含 0.1 U Taq DNA 聚合酶、0.5 mmol/L d NTP、20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3)、100 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>];TE 洗脱缓冲液(北京天根生化科技有限公司,批号分别为 KT201、RK121-03);DNA Marker、琼脂糖[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为 B500347、A610013];其余试剂均为国产分析纯,水为双蒸水(dd H<sub>2</sub>O)。

### 1.3 药材

所有药材样本均采自云南省不同地区(药材样品来源见表 1)。所采植物由大理学院药学与化学学院夏从龙教授鉴定分别为龙胆科獐牙菜属紫红獐牙菜(*S. puricea* Hemsl)、龙胆科獐牙菜属青叶胆(*S. mileensis* T. N. Ho. et L. Shih)、龙胆科花锚属椭圆叶花锚(*H. elliptica* D. Don)的原植物。各植物取新鲜叶片,用变色硅胶迅速干燥,于 4 °C 冰箱保存。

表 1 药材样品来源

Tab 1 Origins of samples

代码	名称	拉丁名	采集地点
ZT-1	紫红獐牙菜	<i>S. puricea</i> Hemsl	大理苍山感通寺
ZT-2	紫红獐牙菜	<i>S. puricea</i> Hemsl	大理苍山感通寺
ZT-3	紫红獐牙菜	<i>S. puricea</i> Hemsl	大理苍山感通寺
ZT-4	紫红獐牙菜	<i>S. puricea</i> Hemsl	大理苍山感通寺
ZT-5	紫红獐牙菜	<i>S. puricea</i> Hemsl	大理苍山感通寺
ZC-1	紫红獐牙菜	<i>S. puricea</i> Hemsl	大理宾川县
ZC-2	紫红獐牙菜	<i>S. puricea</i> Hemsl	大理宾川县
ZC-3	紫红獐牙菜	<i>S. puricea</i> Hemsl	大理宾川县
ZC-4	紫红獐牙菜	<i>S. puricea</i> Hemsl	大理宾川县
QYD-1	青叶胆	<i>S. mileensis</i> T. N. Ho. et L. Shih	红河弥勒县
QYD-2	青叶胆	<i>S. mileensis</i> T. N. Ho. et L. Shih	红河弥勒县
HM-1	椭圆叶花锚	<i>H. elliptica</i> D. Don	大理宾川县
HM-2	椭圆叶花锚	<i>H. elliptica</i> D. Don	大理宾川县

### 1.4 引物

ISSR 引物根据不列颠哥伦比亚大学(University of British Columbia)公布的序列设计<sup>[19]</sup>,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

## 2 方法

### 2.1 样品 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法<sup>[20]</sup>提取 3 种植物样品中的全基因组 DNA;采用琼脂糖凝胶电泳法结合紫外分光光度法检测 DNA 的质量浓度后,用 TE 洗脱缓冲液稀释至 50 ng/μL,备用。

### 2.2 引物筛选

根据预实验结果,采用青叶胆药材的 DNA 基因组

为模板DNA进行引物的筛选,从生工生物工程(上海)股份有限公司合成的100条引物中筛选出8条能扩增出多态性条带、背景清晰、反应稳定的引物,用于后续的本ISSR分析。8条引物序列详见表2。

表2 8条引物及其扩增结果

Tab 2 8 primers and their amplification results

引物代码	5'-3'序列	退火温度,℃	扩增条带数	多态性条带数	多态性比,%
UBC-807	AGAGAGAGAGAGAGT	52.2	15	15	100
UBC-817	CACACACACACACAA	52.2	12	12	100
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGYTYT	53.9	13	13	100
UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGYC	56.2	12	12	100
UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAYT	53.9	13	13	100
UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAYC	56.2	20	20	100
UBC-855	ACACACACACACACYT	53.9	16	16	100
UBC-857	ACACACACACACACYG	56.2	12	12	100
总数			113	113	100
平均数			14.1	14.1	100

### 2.3 PCR反应

采用PCR仪进行ISSR-PCR扩增。体系组成(总体积为25 μL):2×Taq Master Mix 12.5 μL,引物1 μL,DNA模板3 μL,加dd H<sub>2</sub>O至25 μL。扩增程序:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,约52~56℃(不同引物按照表2中退火温度进行微调)退火45 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸5 min。PCR产物以DNA Marker为内参,经1.5%琼脂糖凝胶电泳1.5 h,采用凝胶成像系统照相并记录结果。

### 2.4 数据处理

根据迁移率对8条引物反应所得PCR扩增产物的凝胶电泳图进行人工读带,选取稳定清晰的条带进行统计分析。每个条带(即DNA片段)均记为1个分子标记,代表1个引物的结合位点。根据分子标记的有无(“有”赋值为1,包括强带和重复性好的弱带;“无”赋值为0)统计所有的二元数据,从而得到原始数据矩阵,并计算多态性条带比率。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。

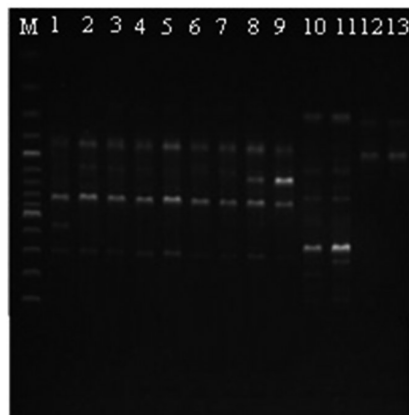
## 3 结果

### 3.1 3种植物的扩增产物多态性

根据8条筛选出来的引物,共扩增出113条条带,全部条带均具有多态性,多态性位点百分率为100%;平均每个引物可扩增的多态性条带为14.1条,详见表2。这8条引物对紫红獐牙菜、青叶胆及椭圆叶花锚DNA反应获得的PCR扩增产物电泳图多样性较为明显,所得条带差异较为明显,能够用于独立区分上述3种植物。以UBC-834为例,其反应所得的PCR扩增产物电泳图见图1。

### 3.2 3种植物的遗传相似系数分析结果

遗传相似系数分析结果显示,9个紫红獐牙菜样品(ZT-1~ZT-5,ZC-1~ZC-4)之间的相似系数在0.752~0.929范围内,平均为0.849。其中,样品ZT-1与ZC-2的遗传相似系数最小(0.752),表明这两个样品的亲缘关系较其他紫红獐牙菜样品更远、遗传差异性更大;而样品



注:1~5.样品 ZT-1~ZT-5;6~9.样品 ZC-1~ZC-4;10~11.样品 QYD-1~QYD-2;12~13.样品 HM-1~HM-2;M.Marker

Note:1-5. samples ZT-1 to ZT-5;6-9. ZC-1 to ZC-4; 10-11. samples QYD-1 to QYD-2; 12-13. sample HM-1 to HM-2; M. Marker

图1 引物 UBC-834对藏药“蒂达”3种基源植物 DNA 的PCR扩增产物电泳图

Fig 1 PCR amplification electrophoresis of primer UBC-834 to DNA of 3 basic plants of Tibetan medicine “Dida”

ZT-4与ZT-2的遗传相似系数最大(0.929),表明这两个样品的亲缘关系较其他紫红獐牙菜样品更近、遗传差异性更小。从紫红獐牙菜的种内遗传相似系数可以看出,其存在较明显的遗传多样性和种内遗传相似性。紫红獐牙菜、青叶胆与椭圆叶花锚3个品种共13个样品之间的相似系数在0.301~0.500之间,平均为0.430。青叶胆与紫红獐牙菜样品之间的相似系数在0.301~0.496之间,平均为0.390;其中,样品QYD-1与ZT-1之间的遗传相似系数最小(0.301),样品QYD-2与ZT-3之间遗传相似系数最大(0.496),表明这两个品种之间的亲缘关系较远、遗传差异性较大,存在较明显的遗传多样性。椭圆叶花锚与紫红獐牙菜样品之间的相似系数在0.425~0.500之间,平均为0.470;其中,样品HM-1与ZC-4之间的遗传相似系数最小(0.425),样品HM-2与ZC-2之间遗传相似系数最大(0.500),表明椭圆叶花锚与紫红獐牙菜的亲缘关系较青叶胆更近。总体而言,青叶胆、椭圆叶花锚和紫红獐牙菜3个品种间存在较大的遗传多样性。13个样品之间的遗传相似系数见表3。

### 3.3 3种植物的聚类分析结果

聚类分析结果显示,在距离线约0.410处,13个样品聚为3个类群,第一类为紫红獐牙菜,第二类为椭圆叶花锚,第三类为青叶胆;在距离线约0.780处,紫红獐牙菜的9个样品分为A、B2个亚类,A亚类为大理苍山感通寺采集的样品ZT-1,B亚类含有其余8个样品。3种植物样品的聚类图见图2。

## 4 讨论

目前常见的分子标记技术有限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性DNA标记(RAPD)、扩增片

表3 13个样品之间的遗传相似系数

Tab 3 Genetic similarity coefficients of 13 samples

样品代码	ZT-1	ZT-2	ZT-3	ZT-4	ZT-5	ZC-1	ZC-2	ZC-3	ZC-4	QYD-1	QYD-2	HM-1	HM-2
ZT-1	1.000												
ZT-2	0.823	1.000											
ZT-3	0.814	0.920	1.000										
ZT-4	0.788	0.929	0.920	1.000									
ZT-5	0.796	0.850	0.876	0.903	1.000								
ZC-1	0.770	0.841	0.814	0.858	0.850	1.000							
ZC-2	0.752	0.841	0.832	0.912	0.903	0.876	1.000						
ZC-3	0.788	0.788	0.814	0.841	0.850	0.876	0.876	1.000					
ZC-4	0.779	0.814	0.858	0.885	0.912	0.850	0.885	0.885	1.000				
QYD-1	0.301	0.354	0.390	0.336	0.327	0.319	0.372	0.354	0.327	1.000			
QYD-2	0.381	0.451	0.496	0.451	0.425	0.416	0.467	0.434	0.425	0.885	1.000		
HM-1	0.451	0.451	0.460	0.469	0.478	0.451	0.487	0.469	0.425	0.442	0.487	1.000	
HM-2	0.496	0.478	0.475	0.478	0.487	0.478	0.500	0.478	0.451	0.451	0.496	0.885	1.000

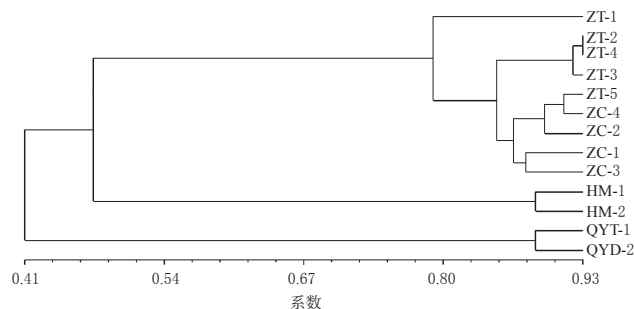


图2 藏药“蒂达”3种药用植物的聚类图

Fig 2 Cluster graph of 3 medicinal plants of Tibetan medicine “Dida”

段长度多态性(ALFP)和ISSR等,均可用于亲缘关系、基因表达差异的分析及分子标记辅助育种等。ISSR技术采用的是通用引物,可降低试验中引物开发的成本,具有多态性高、遗传稳定性好、技术操作简便等优点,因此已广泛应用于植物遗传多样性研究<sup>[2-5,21]</sup>。本研究利用8条引物对13个植物样品进行PCR扩增,共得到113个DNA条带产物,且全部为多态性DNA条带,多态性位点百分率为100%,表现出很高的多态性。这种多态性将为紫红獐牙菜、青叶胆和椭圆叶花锚种质资源的保存、鉴定、适应性评价以及生态型研究奠定可靠、稳定的基因信息基础。

从遗传相似性系数和聚类分析结果来看,来自大理地区不同居群的9个紫红獐牙菜样品遗传相似系数在0.752~0.929之间,在聚类分析中单独聚为一支,表明该地区紫红獐牙菜遗传差异较小、亲缘关系较近。同时,分析数据还表明紫红獐牙菜种群内部可见丰富的遗传多样性,这可能是由于生境条件的改变使物种在长期适应环境的过程中发生了不同物种性状间的交叉。从遗传学的角度来看,这种遗传多样性意味着比较高的适应能力,蕴涵着较大的进化潜能以及比较丰富的育种和遗传改良能力,这为其今后的栽培育种提供了依据。而紫红獐牙菜、青叶胆和椭圆叶花锚这三个品种之间的相似系数仅为0.301~0.500,且聚类分析结果显示三者各聚为一支,表明不同品种间存在较大的遗传差异。

青叶胆与椭圆叶花锚均为龙胆科植物,以往作为藏

药“蒂达”主要药用基源之一,但近年来两者自然资源已面临枯竭,因此藏医常用其同科植物紫红獐牙菜进行替代,用于治疗相关疾病。本研究采用ISSR技术从分子水平上对三者的亲缘关系进行分析后认为,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,在替代藏药“蒂达”基源植物使用时,建议充分考虑不同品种植物药效的差异性,不能盲目替代使用。此外,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。由于该植物生长地域较广,本研究只考察了大理地区收集的部分样品,下一步拟收集其在全国各地的植物样品进行遗传多样性分析,对其替代青叶胆和椭圆叶花锚的可能性进行全面考察。

### 参考文献

- [1] ZIETIKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (ISSR) anchored and polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomica*, 1994, 20(2): 176-183.
- [2] SHEN J, DING X, LIU D, et al. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(3): 420-422.
- [3] 范彦, 李芳, 张新全, 等. 扁穗牛鞭草种质遗传多样性的ISSR分析[J]. *草业学报*, 2007, 16(4): 76-81.
- [4] 刘建乐, 白昌军, 严琳玲, 等. 割手密种质资源遗传多样性的ISSR分析[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(1): 68-73.
- [5] 沈颖, 徐程, 万小凤. ISSR-PCR在石斛种间鉴别中的应用[J]. *中草药*, 2005, 36(3): 423-427.
- [6] 钟国跃, 王昌华, 周华蓉, 等. 藏药材的生药学特点及品种整理研究策略[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2008, 10(2): 28-32.
- [7] 钟国跃, 古锐, 周华蓉, 等. 藏药“蒂达”的名称与品种考证[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(23): 3139-3144.
- [8] 蒂玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 毛继祖, 罗尚达, 王振华, 等, 编译. 上海: 上海科学技术出版社, 1988: 79-81.
- [9] 红布拉·道尔吉·蒙药正典[M]. 罗布桑, 徐嫦, 嘎玛曲培, 等, 译. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2006: 2008-2013.
- [10] JONSHIL P, DHAWAN V. *Swertia chirayita*: an overview[J]. *Curr Sci*, 2005, 89(4): 635-640.
- [11] 古锐, 钟国跃, 张艺, 等. 藏药椭圆叶花锚的研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 24(4): 397-400.
- [12] 李隆云, 占堆, 卫莹芳, 等. 濒危藏药资源的保护志[J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(8): 561-565.
- [13] 黄衡宇, 王美蓉, 王元忠, 等. 区域性特有濒危药用植物青叶胆的传粉生物学研究[J]. *中药材*, 2016, 39(12): 2675-2679.
- [14] 张秀桥, 田峦鸾, 侯俊杰, 等. 紫红獐牙菜高效液相色谱指纹图谱的研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2006, 26(8): 922-924.
- [15] 纪兰菊, 保怡, 陈桂琛, 等. 15种獐牙菜属植物中主要药用成分的高效液相色谱测定[J]. *西北植物学报*, 2004, 24(7): 1298-1302.

# 红外光谱三级鉴别法联合高效液相色谱-质谱法研究不同采收期黄芩药材的质量<sup>Δ</sup>

赵胜男\*,刘素丽,徐杨璐,李守拙<sup>#</sup>(承德医学院中药研究所/河北省中药研究与开发重点实验室,河北承德067000)

中图分类号 R282;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1669-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.17

**摘要** 目的:研究不同生长期春秋两季采收黄芩药材中有效成分种类及含量的差异,为确定黄芩的最佳采收期提供技术支持。方法:对赤峰产黄芩不同采收期药材样品(一年、二年、三年生长期,在各年份的春季和秋季分别采挖),应用红外光谱三级鉴别技术(IR-TL)分析其整体成分构成变化,以高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)分析药材中6种黄酮类成分(千层纸素A、白杨素、黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷)含量的变化。结果:IR-TL分析结果显示,不同生长期黄芩所含黄酮类、苷类、糖类、酯类等成分均有所不同,其中二年生黄芩中的苷类物质含量最高、药材质量更稳定;6种黄酮类成分含量测定结果显示,不同采收期对上述指标成分含量有较大影响,其中二年生春季采收样品的整体含量高于同年份秋季采收样品。结论:本研究可为黄芩药材质量的控制提供可靠的分析方法;二年生长期春季采收可能为黄芩的最佳采收时间。

**关键词** 黄芩;红外光谱三级鉴别;高效液相色谱-质谱联用法;采收期;鉴定;含量测定;质量控制

## Study on the Quality of *Scutellaria baicalensis* with Different Harvesting Periods by IR-TL and HPLC-MS

ZHAO Shengnan, LIU Suli, XU Yanglu, LI Shouzhuo (TCM Institute of Chengde Medical College, Chengde Medical College/Hebei Key Lab of Research and Development for TCM, Hebei Chengde 067000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study effective component kinds and content difference of *Scutellaria baicalensis* with different harvesting periods collected in spring and autumn, and to determine the optimal harvesting time. METHODS: IR-IL was used to analyze the constitutions change of the components in *S. baicalensis* collected in different harvesting periods (annual, biennial and triennial, in spring and autumn, respectively). HPLC-MS method was used to analyze the contents change of 6 flavonoids (quoxylin A, chrysin, wogonin, wogonoside, baicalin, baicalein). RESULTS: Results of IR-TL analysis showed that *S. baicalensis* contained different components such as flavonoids, glycosides, saccharides, esters in different growth stages, among which the contents of glycosides in biennial *S. baicalensis* were the highest with more stable quality. The results of content determination of 6 flavonoids showed that different harvesting periods had a great influence on the contents of the above indicators. The overall content of biennial samples collected in spring was higher than that of autumn samples collected in the same year. CONCLUSIONS: This study provides a reliable analytical method for the quality control of *S. baicalensis*; spring harvest in two-year growth period may be the best harvesting time for *S. baicalensis*.

**KEYWORDS** *Scutellaria baicalensis*; IR-TL; HPLC-MS; Harvesting period; Identification; Content determination; Quality control

[16] 申晓娟,段书涛,俞培. RP-HPLC法测定椭圆叶花锚和花锚中异龙胆黄素的含量[J].天然产物研究与开发,2008,20(1):107-109.

[17] 彭芳,刘晓波,方春生,等.紫红獐牙菜对实验性肝损伤的保护作用[J].中国新药与临床药理,2002,13(6):376-378.

[18] 张经明,鲍文莲,高海平,等.花锚及其口山酮苷抗肝损伤

<sup>Δ</sup>基金项目:河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(No.冀中医药[2015]11号-2015156);河北省高校重点学科建设项目(No.冀教高[2013]4号)

\* 讲师,硕士。研究方向:中药分析。电话:0314-2291186。E-mail:dadashengnan@126.com

<sup>#</sup> 通信作者:教授。研究方向:药物分析。电话:0314-2291186。E-mail:1192620149@qq.com

和毒性的研究[J].中草药,1984,15(10):34-36.

[19] 朱田田,张裴斯,晋玲,等.当归简单重复序列区间-聚合酶链反应体系的建立及优化与品种(系)间遗传关系研究[J].中国药房,2014,25(35):3265-3269.

[20] DOYLE JJ. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[M]/HEWITT GM, JOHNSTON AWB, YOUNG JPW. Molecular techniques in taxonomy. Berlin: Springer-Verlag, 1991:283-293.

[21] 田辉,蒋嫦月,朱华,等.广西产鸡血藤遗传多样性的RAPD与ISSR标记方法的比较研究[J].中国药房,2015,26(31):4348-4350.

(收稿日期:2018-10-17 修回日期:2019-04-26)

(编辑:段思怡)