

· 巴西草药研究专题 ·

基于 DNA 条形码—高效液相色谱联用的 巴西草药 *SENE*(番泻叶)的品种鉴定

李妍芃 顾选 马恺悦 吴浩忠 赵百孝 刘春生 马长华 韩丽

【摘要】 目的 对巴西草药番泻叶 *SENE* 进行品种鉴别,进而研究其中番泻苷 A 和番泻苷 B 的含量并与中国番泻叶番泻苷 A、B 的比较,为其品种整理、临床使用及资源开发提供参考。**方法** 利用 DNA 条形码—产地—形态分析联用技术鉴定巴西草药番泻叶 *SENE* 的基原,高效液相色谱技术测定番泻苷 A 和番泻苷 B 的含量。**结果** 品种鉴定结果为番泻叶,其中番泻苷 A 和番泻苷 B 两者的平均总含量为巴西番泻叶(1.56%)>中国番泻叶(1.52%)>2010 年版《中华人民共和国药典》(一部)的含量要求(1.10%)。**结论** 巴西草药番泻叶来源于番泻叶 *Senna alexandrina* Mill.,其番泻苷 A 和番泻苷 B 的含量与中国番泻叶差异不显著,且能达到药典要求。

【关键词】 巴西草药; 番泻叶; DNA 条形码; 高效液相色谱; 番泻苷

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.007

Research of Brazilian herb *SENE* based on DNA barcoding-HPLC combined method evaluation LI Yan-peng, GU Xuan, MA Kai-yue, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine. Beijing 100102, China

Corresponding author: ZHAO Bai-xiao, E-mail: baixiao100@gmail.com

【Abstract】 Objective To identify the species of Brazilian herb *SENE* and study on the content of sennoside A and sennoside B, then to compare the results with Chinese *Sennae folium*, and provide reference for varieties systematics, clinical use and resource exploitation. **Methods** The source of varieties of Brazilian herb *SENE* was identified by a technique combined DNA barcoding, geographical origin and morphological features, and the content of sennoside A and sennoside B was analyzed by HPLC. **Results** DNA barcoding identification indicated that *SENE* was *Senna alexandrina*, and its average total content of sennoside A and sennoside B (1.56%) was higher than its Chinese counterpart (1.52%) and also higher than what is required in *Chinese Pharmacopoeia* (1.10%). **Conclusion** Brazilian herb *SENE* derives from *Senna alexandrina* Mill., and its sennoside A and sennoside B content have no significant difference with its Chinese counterpart which meets pharmacopoeia requirement.

【Key words】 Brazilian herb; *SENE*; DNA barcoding; HPLC; Sennoside

在巴西植物资源宝藏中有许多植物可用于医疗保健,防治各种疾病^[1]。但是,由于使用特殊语

言及符号收载,品种混乱,遗传和环境因素可能导致的各方面差异以及缺少权威法典等都对这些药用植物的品种鉴定造成一定的困难。巴西草药番泻叶是巴西应用最广的导泻药之一,临床用于热结积滞、便秘腹痛、水肿胀满等症已有千余年的历史^[2],但是至今尚确定不了其来源及有效成分,因此对其进行品种整理与质量研究十分必要。

确定药材的基原是药材品种整理的重要内容,通过产地调研、标本采集和植物分类鉴定是药材品种鉴定的传统方法,具有准确、可靠的优点,但同时存在耗时、费力等缺点,而且对于缺少背景信息的

基金项目: 国家国际科技合作专项(2011DFA31370)

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院[李妍芃(硕士研究生)、马恺悦(硕士研究生)、吴浩忠、刘春生、马长华], 针灸推拿学院(赵百孝), 中医养生学研究所(韩丽); 北京华邈中药工程技术开发中心(顾选)

作者简介: 李妍芃(1990-),女,2013 级在读硕士研究生。研究方向: 分子生药学和药用植物学研究。E-mail: guiyuan1@163.com

通讯作者: 赵百孝(1963-),博士,教授,博士生导师。研究方向: 针灸推拿与中医药。E-mail: baixiao100@gmail.com

植物鉴定具有一定的困难。DNA 条形码鉴定是一种较为先进的物种鉴定方法,能够在准确的基础上,达到省时的目的。其中内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS) 序列的进化速率适中且具有较高的物种分辨率^[3],因此被广泛应用于中药材的物种鉴定^[4-6]和种质资源鉴定^[7]。本课题组建立的 DNA 条形码—产地—形态联用的品种鉴定方法,以 DNA 条形码分子鉴定为核心,采用产地分析进一步筛选结果,形态和显微验证物种及确定入药部位。与单一的条形码分析鉴定比较,其准确度提高了 30%,可以弥补传统鉴定方法和单一鉴定方法的不足,相互补充,实现准确、快速地品种鉴定和整理研究。

药材的品质是关乎安全和有效的核心问题, DNA 条形码分子鉴定虽能较为准确快速地鉴别品种,但难以进行质量好坏地判断。利用高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC)对药用植物次生代谢物即有效成分有无及含量进行定性和定量研究,既进一步验证了品种鉴定结果的准确性,同时又对药材的质量优劣作出初步评价,能够实现品种整理后根据科属信息,结合中国相关品种进行质量分析,基本满足了现阶段对未知巴西草药品种和质量的同步研究。

本研究通过 DNA 条形码—产地—形态联用方法对巴西草药番泻叶的品种进行鉴定, HPLC 测定其指标成分的含量,为巴西草药的品种整理、合理应用和开发、丰富药用植物资源及促进中医药的全球化发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

巴西草药番泻叶(巴西名 *SENE*) 3 份,每份约 200 g, 2012 年 4 月购自巴西隆城药材集散地,样品的凭证标本保存于北京中医药大学标本室。中国番泻叶药材购于北京同仁堂,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为番泻叶。

1.2 试剂

番泻苷 A(中国食品药品检定研究院,批号 110824-201207);番泻苷 B(中国药品生物制品检定所,批号 110825-201207);冰醋酸、醋酸铵(分析纯,康源化工科技有限公司);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司),娃哈哈纯净水。

1.3 仪器

美国 Waters 公司高效液相色谱仪(Waters 1525 型泵, Waters 2996 PDA 紫外检测器); Sartorius BSA124S 分析天平, AE-240 分析天平, FW177 型中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); KQ-400KDB 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.4 品种整理

巴西草药番泻叶品种鉴定采用 DNA 条形码—产地—形态联用鉴定方法^[8],即首先利用 DNA 条形码相似度分析进行鉴定,根据其产地分析 DNA 条形码鉴定结果,再根据形态特征进一步验证结果,三种方法联用获得鉴定结果。

1.5 含量测定

1.5.1 供试品溶液制备 样品均经过中药材粉碎机粉碎并过 80 目筛,药材粉末至干燥器中备用。取各干燥样品粉末约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密移取 50% 甲醇 30 mL,准确称量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 分钟,放冷至室温后称量,用 50% 甲醇补足其减失重量,布氏漏斗抽滤,精密量取续滤液 10 mL 于 25 mL 量瓶中,50% 甲醇定容摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

1.5.2 对照品溶液制备 称取经真空干燥 12 小时的番泻苷 A($\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{O}_{20}$) 对照品与番泻苷 B($\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{O}_{20}$) 对照品适量,精密称定,置 10 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇溶液溶解,并定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,得番泻苷 A 0.0540 mg/mL 和番泻苷 B 0.1050 mg/mL 对照品溶液。

1.5.3 色谱条件 色谱柱: Sunfire C_{18} 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 美国 Waters 公司); 流动相: 甲醇-1 mol/L 醋酸—醋酸铵缓冲液(pH 5.0)(1 \rightarrow 10 分钟) 30:70; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL ; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 280 nm 和 340 nm。

1.5.4 专属性 采用 1.5.1 项下溶液制备方法制备对照品及各样品供试溶液,分别精密吸取对照品及各样品供试溶液 20 μL ,按 1.5.2 项下色谱条件测定条件进样分析,以考察待测成分相互间是否有干扰、杂质成分是否对待测成分有干扰,各色谱图见图 1 至图 3。测定方法专属性好,待测成分与其它成分分离度大于 1.5,且其他成分对待测成分测定无干扰。

1.5.5 线性 精密吸取 1.5.1 项下对照品溶液 1 μL 、5 μL 、10 μL 、20 μL 、30 μL 、40 μL ,按 1.5.2 项

下色谱条件进行测定,记录峰面积,进行回归分析。番泻苷 A 线性方程为: $y=44492x-25037$, $R^2=0.9999$,表明番泻苷 A 在质量范围 0.054 μg -2.16 μg 间与峰面积有良好的线性关系。番泻苷 B 回归方程与系数为: $y=89038x-59020$, $R^2=0.9999$,表明番泻苷 B 在质量范围 0.105 μg -4.2 μg 间与峰面积有良好的线性关系,见图 4 至图 5。

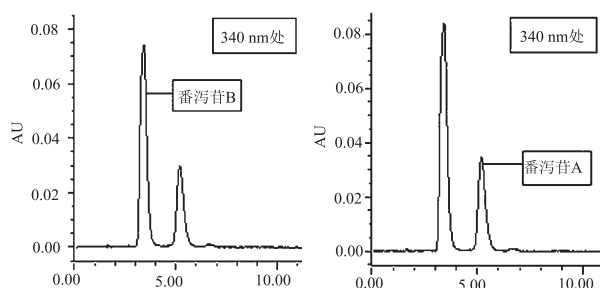


图 1 番泻苷 B 与番泻苷 A 对照品的 HPLC 图谱

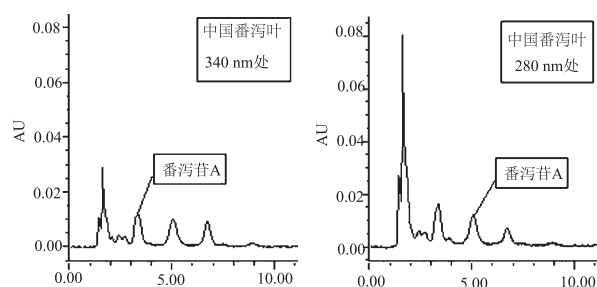


图 2 中国番泻叶番泻苷 B 与番泻苷 A 的 HPLC 图谱

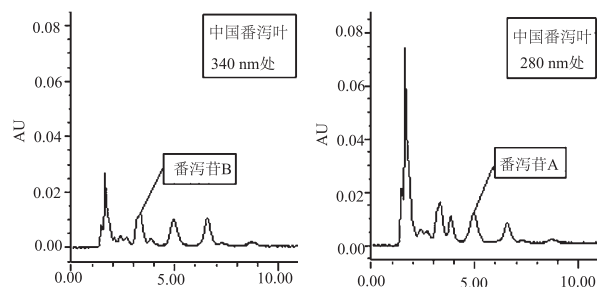


图 3 巴西番泻叶番泻苷 B 与番泻苷 A 的 HPLC 图谱

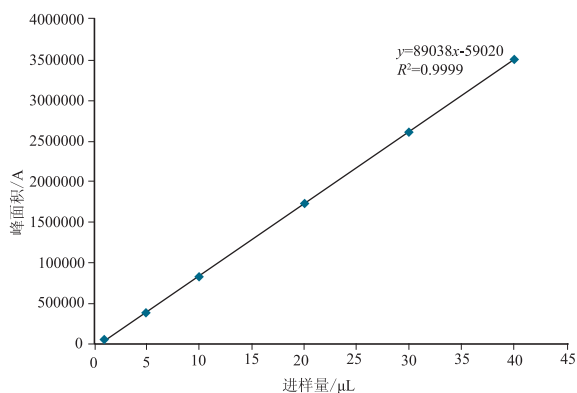


图 4 番泻苷 A 标准曲线

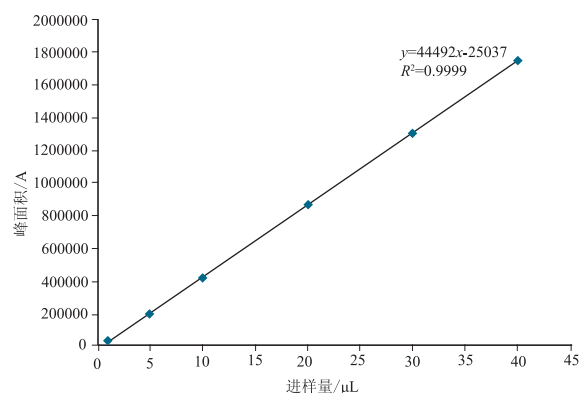


图 5 番泻苷 B 标准曲线

1.5.6 精密度 精密称定中国番泻叶 0.2 g,按 1.5.1 项下样品制备方法制备中国番泻叶供试品溶液,精密吸取该供试品溶液 20 μL ,连续进样 6 次,结果番泻苷 A 峰面积的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 1.63%,番泻苷 B 峰面积的 RSD 为 1.22%,结果表明仪器的精密度良好。

1.5.7 稳定性 精密称定中国番泻叶 0.2 g,按“1.5.1”项下样品制备方法制备样品溶液一份,分别于室温放置 0 小时、1 小时、3 小时、5 小时、7 小时,进样分析,记录番泻苷 A 与 B 峰面积,计算 RSD 值。番泻苷 A 和番泻苷 B 的 RSD 分别为 1.26% 和 1.04%,结果表明实验所采用的方法制得的供试品溶液在 7 小时内稳定。

1.5.8 重现性 取中国番泻叶 0.2g/份 5 份,精密称定,按 1.5.1 项下制备供试品溶液,进样分析,记录峰面积,计算平均值与 RSD。番泻苷 A 与番泻苷 B 的重现性 RSD 分别为 0.79% 和 1.15%,结果表明该条件重现性良好。

1.5.9 回收率 取中国番泻叶 0.1g/份 9 份,精密称定,分别按药材含量的 80%、100%、120% 精密加入番泻苷 A、B 对照品各 3 份,按照 1.5.1 项下方法制备供试溶液,制得加样回收供试品溶液,计算番泻苷 A、B 的加样回收率与 RSD,结果见表 1、表 2。番泻苷 A 的加样回收率为 99.17%,RSD=1.76%,番泻苷 B 的加样回收率为 99.87%,RSD=1.47%,结果表明该条件加样回收率良好。

2 结果与分析

2.1 品种整理

2.1.1 基于 DNA 条形码的品种鉴别 PCR 产物经电泳验证,在 750 bp 左右出现单一、清晰且明亮的条带。3 份样品的测序峰图良好,测序结果一致,截

表 1 中国番泻叶番泻苷 A 回收率考察

编号	样品含量(mg)	番泻苷 A 加入量(mg)	测得含量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.7418	0.45	1.1916	100.02	99.17	1.76
2	0.7369	0.45	1.2118	97.94		
3	0.7355	0.45	1.1966	99.07		
4	0.7345	0.76	1.4654	101.98		
5	0.7426	0.76	1.5475	97.10		
6	0.7267	0.76	1.5010	99.05		
7	0.7358	1.06	1.8287	98.20		
8	0.7374	1.06	1.8430	97.53		
9	0.7415	1.06	1.7718	101.68		

表 2 中国番泻叶番泻苷 B 回收率考察

编号	样品含量(mg)	番泻苷 B 加入量(mg)	测得含量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.8573	0.47	1.3267	100.04	99.87	1.47
2	0.8516	0.47	1.3481	98.04		
3	0.8500	0.47	1.3408	98.45		
4	0.8489	0.79	1.6357	100.19		
5	0.8582	0.79	1.6686	98.77		
6	0.8399	0.79	1.6497	98.80		
7	0.8505	1.10	1.9025	102.52		
8	0.8523	1.10	1.9339	100.95		
9	0.8569	1.10	1.9368	101.04		

取 ITS 片段后选择一条序列用于后续分析。截取 ITS 片段后,经 NCBI(美国国立生物技术信息中心)数据库检索,样品与豆科决明属 *Senna* L. 植物相似度最高,相似度范围为 85% ~ 99%,与其他属相似度均低于 87%。因此,该样品来自豆科决明属 *Senna* L. 植物。根据分子鉴定指标(相同物种相似度达到 97% 以上),仅有 *Senna alexandrina* (KF815491.1, 99%) 符合要求,因此巴西草药番泻叶的基原可能为番泻叶 *Senna alexandrina* Mill.。

2.1.2 基于产地分析的鉴定 《巴西植物志》记载豆科决明属约 60 种植物,根据 DNA 条形码鉴定结果,最佳鉴定结果 *Senna alexandrina* 在巴西分布,并且在巴西以叶子入药,因此,根据产地分析巴西草药番泻叶的基原为番泻叶。

2.1.3 基于形态分析的鉴定 本品呈披针形或长卵形,长约 1.5 ~ 5 cm,宽约 0.3 ~ 1.2 cm;略卷曲,全缘,叶端短尖或微凸,叶基歪形不对称。上表面黄绿色,下表面灰绿色,上表面较下表面平滑,上表面脉络清晰,下表面叶脉稍隆起,两面均有不明显细短毛茸。少数叶面上散有细小灰棕色斑点。质地较薄脆,微呈革质状。气微而特异,味微苦,稍有

黏性,用开水浸泡为茶色,压之变为灰棕色。

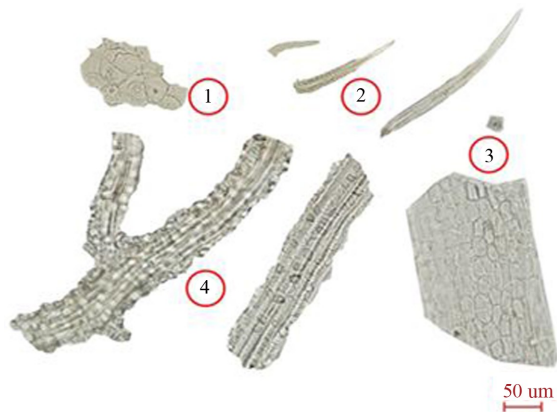


图 6 巴西草药番泻叶性状图

粉末黄绿色或淡绿色。晶鞘纤维多,草酸钙方晶直径 12 ~ 15 μm 。非腺毛单细胞长 100 ~ 350 μm ,直径 12 ~ 25 μm ,壁厚,有疣状突起,基部稍弯曲。草酸钙簇晶存在于叶肉薄壁细胞中,直径 9 ~ 30 μm 。上下表皮细胞表面观呈多角形,垂周壁平直,上下表皮均有气孔,主为平轴式,副卫细胞大多为 2 个。形态分析表明,本品的形态特征与决明属植物相同,入药部位为小叶。

形态分析结果表明,本品与番泻叶的形态及显

微特征相符合。



1. 气孔及表皮细胞 2. 非腺毛 3. 簇晶 4. 晶鞘纤维

图 7 巴西草药番泻叶显微图

2.2 含量测定

分别取巴西番泻叶和中国番泻叶 0.2g/份,精密称定,按 1.5.1 项下制备供试品溶液,进样分析,记录峰面积,计算各待测成分含量与 RSD,结果见表 3、表 4。巴西番泻叶中番泻苷 A、B 平均含量分别为 0.7953% 和 0.7799%;中国番泻叶中番泻苷 A、B 平均含量分别为 0.7032% 和 0.8127%。

表 3 中国番泻叶番泻苷 A 和番泻苷 B 含量测定

样品	番泻苷 A 含量(%)	番泻苷 B 含量(%)
1	0.70±0.006	0.81±0.009
2	0.72±0.005	0.80±0.007
3	0.69±0.006	0.82±0.007
平均	0.70	0.81

表 4 巴西番泻叶番泻苷 A 和番泻苷 B 含量测定

样品	番泻苷 A 含量(%)	番泻苷 B 含量(%)
1	0.79±0.008	0.77±0.015
2	0.78±0.009	0.79±0.011
3	0.78±0.007	0.76±0.013
平均	0.78	0.77

3 讨论

临床上的导泻剂中约有一半含有番泻叶,它不仅可以用药,在保健品中也被广泛利用,现代药理实验证明番泻叶已超出了通便消胀的范围,尤其是对某些急症的治疗,其临床应用前景广阔。因此,

进一步研究番泻叶的资源具有重要的意义。

巴西植物志记载豆科决明属约 60 种植物, *Senna alexandrina* 在巴西分布,并且在巴西以叶子入药,进一步确证了 DNA 条形码的鉴定结果。DNA 条形码—产地—形态分析联合化学进行双指标评价的方法在条形码确定物种的前提下选择其指标性成分或有效成分进行含量测定,基本能够同时实现准确快速的定性和定量,满足目前大多数药材的品种鉴定和品质评价要求,可以作为一种鉴别药材品质的新方法。

巴西番泻叶与中国番泻叶中番泻苷 A 和 B 的含量差异不明显,2010 年版《中华人民共和国药典》(一部)规定番泻叶中番泻苷 A 与番泻苷 B 含量总和不得少于 1.1%^[9],巴西番泻叶与中国番泻叶均符合要求,有待进一步扩大样本量进行化学成分及遗传多样性等研究。本研究为巴西草药的品种整理和临床应用提供了参考依据,同时也为下一步巴西番泻叶的资源开发及质量研究奠定了一定基础。

参 考 文 献

[1] 李雷鹏. 巴西主要药用植物资源及利用[J]. 东北林业大学学报,2002,30(2):103-104.

[2] 米丽,李敬超,张夏华,等. 番泻叶的化学成分和药理作用研究进展[J]. 西南军医,2009,11(4):727-728.

[3] 王建波,张文驹,陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 植物分类学报,1999,37(4):407.

[4] 程小丽,廖彩丽,刘春生,等. 基于 NCBI 核酸数据库的紫荆皮混淆品种华中五味子的 DNA 鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(17):2534.

[5] 杨耀华,赵志礼,嘎务,等. 基于 ITS 序列的藏药“川布”的分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(21):3773.

[6] 冯彬彬,郑司浩,李亚康,等. 中药材威灵仙及其伪品 DNA 条形码鉴别研究[J]. 药学报,2014,49(2):260.

[7] Ma XC, Xie CX, Guan M, et al. High levels of genetic diversity within one population of *Rheum tanguticum* on the Qinghai-Tibet Plateau have implications for germplasm conservation [J]. *Pharmaceutical Crops*,2014,(5):1.

[8] 顾选,张晓芹,宋晓娜,等. 基于 DNA 条形码—产地—形态联用的药材鉴定新方法研究——以黑果枸杞 1 种伪品为例[J]. 中国中药杂志,2014,39(24):4759-4762.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:326.

(收稿日期: 2015-08-18)

(本文编辑: 蒲晓田)