

表 3 10 批马钱子药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks for fingerprints of ten batches of *Semen Strychni*

批号	相对峰面积											
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12
y302-1	0.043	0.329	0.016	0.036	0.000	1.000	0.518	0.014	0.020	0.012	0.055	0.000
y302-2	0.058	0.317	0.000	0.000	0.024	1.000	0.567	0.000	0.000	0.027	0.120	0.026
y302-3	0.092	0.347	0.035	0.047	0.030	1.000	0.429	0.023	0.000	0.012	0.030	0.026
y302-4	0.067	0.397	0.011	0.023	0.035	1.000	0.559	0.010	0.022	0.000	0.105	0.034
y302-5	0.046	0.333	0.000	0.033	0.036	1.000	0.399	0.015	0.000	0.013	0.082	0.035
y302-6	0.045	0.361	0.019	0.038	0.046	1.000	0.496	0.016	0.024	0.000	0.062	0.026
y302-7	0.044	0.377	0.027	0.052	0.058	1.000	0.580	0.032	0.022	0.026	0.079	0.042
y302-8	0.050	0.381	0.015	0.039	0.055	1.000	0.617	0.000	0.027	0.010	0.085	0.029
y302-9	0.044	0.377	0.000	0.037	0.055	1.000	0.538	0.000	0.000	0.000	0.093	0.000
y302-10	0.043	0.379	0.016	0.026	0.027	1.000	0.486	0.000	0.020	0.024	0.071	0.024

表 4 10 批马钱子药材指纹图谱与参照图谱的相似度

Table 4 Similarities of fingerprints of ten batches of *Semen Strychni*

样品	相似度	
	相关系数	夹角余弦
1	0.998	0.999
2	0.997	0.998
3	0.992	0.994
4	0.999	0.999
5	0.991	0.993
6	0.998	0.999
7	0.999	0.999
8	0.998	0.999
9	0.999	0.999
10	0.998	0.999

马钱子药材指纹图谱的检测结果,确定了 12 个共有峰。评价了 10 批药材的相似度,均达 0.9 以上,可见药材来源质量均一、稳定。该指纹图谱方法的建立,为马钱子药材和相关制剂的全面质量控制研究提供了参考。

References:

[1] Yuan L M, Zi M, Versatile P A, et al. Two-phase solvent system for alkaloid separation by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 927: 91-96.
 [2] Ying S L, Meng J Y, et al. Clinic application of *Semen Strychni* [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med* (天津中医学报), 2003, 3 (22): 51.
 [3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
 [4] Ren D Q. The significance and effect of quality control technology of Chinese medicinal [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24 (4): 235.
 [5] World Health Organization. *Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines* [S]. Munich: WHO, Geneva, 1991.
 [6] Cai B C, Pan Y, Yin W, et al. The application of fingerprint in TCM study [J]. *World Sci Technol* (世界科学技术), 2000, 2 (5): 9-14.

道,马钱子药材为剧毒药材,控制其质量尤为重要。本实验通过比较不同的样品制备方法,考察流动相、色谱柱、波长等色谱条件,建立了马钱子药材 HPLC 指纹图谱,通过方法学考察,表明该方法精密度、稳定性、重现性均符合指纹图谱技术要求。通过 10 批

不同品种郁金的 SRAP 研究

李 敏¹, 王 琦², 付福友³

(1. 成都中医药大学 中药鉴定与药用植物教研室, 四川 成都 610075; 2. 广东省江门市药品检验所, 广东 江门 529000; 3. 西南农业大学生命科学院, 重庆 400716)

摘要:目的 用 SRAP 技术探讨郁金类药材原植物分类,并为郁金类药材的种质资源提供一定的依据。方法 对来源于姜科姜黄属的郁金类药材的 9 个样品进行了 SRAP 研究。结果 从上、下游各 10 个引物形成的 100 个引物组合中筛选出扩增产物条带信号强、重现性好、特征性好的 27 个引物组合,扩增,得到 847 条条带,其中多态性条带 397 条,平均每个引物组合产生 14.7 条多态性条带。结论 SRAP 技术可以很好地分析郁金原植物的种间关系。结合形态学资料,将 6 个郁金品种分为了 2 个组,一组花序从叶鞘抽出,包括黄丝郁金和黄白丝郁金,黄白丝郁金

收稿日期:2005-10-28

基金项目:四川省科技厅“郁金 GAP 研究”项目

作者简介:李 敏(1963—),女,四川省成都市人,成都中医药大学药学院中药鉴定与药用植物教研室,副教授、硕士生导师。研究方向为中药材品种质量和中药材 GAP 研究。Tel: 13320988022 Fax: (028) 87782078 E-mail: limin96@yahoo.com.cn

应为黄丝郁金即姜黄的栽培变种 *Curcuma longa* L. cv. *chuanyujin*; 一组花序从根茎抽出, 包括绿丝郁金、白丝郁金、桂郁金和温郁金, 其中白丝郁金可能为绿丝郁金即蓬莪术的栽培变种 *C. phaeocaulis* Val. cv. *baisi*。

关键词: 郁金; 分类; SRAP

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2006)08-1255-04

SRAP Study on different varieties of *Radix Curcumae*

LI Min¹, WANG Qi², FU Fu-you³

(1. Department of Herb Identification and Medicinal Plant, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Guangdong Province Jiangmen Institute for Drug Control, Jiangmen 529000, China; 3. Institute of Agriculture and Life Science, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Key words: *Radix Curcumae*; classifying; SRAP

郁金为常用中药材之一, 为姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling、姜黄 *C. longa* L.、广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 或蓬莪术 *C. phaeocaulis* Val. 的干燥块根^[1]。商品上分别称为温郁金、黄丝郁金、桂郁金和绿丝郁金。市场上郁金品种复杂, 仅四川就有黄白丝郁金(川郁金)和白丝郁金入药。笔者在双流郁金 GAP 基地建设过程中, 发现由于郁金品种的混乱, 传统粗放的种植模式导致郁金品种退化、病毒化严重、产量低, 质量不稳定; 再加上药材种植的种苗市场混乱, 郁金药材优质种苗难寻, 导致郁金药材的品种混乱, 品质、产量下降。而且姜黄属植物的亲缘关系、系统分类和中药鉴定一直存在很大的争议。有专家认为川郁金为姜黄的栽培变种^[2]; 有的专家认为温郁金和川郁金关系密切^[3]; 也有专家认为川郁金可定为一个单独的种^[4]。因此对郁金的种质资源进行研究非常必要。SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 技术为 Li 等^[5]发展的一种新标记, 该标记具有简便、稳定、产率高、便于克隆目标片段的特点, 已被应用于图谱构建^[5]、比较基因组学^[6]和遗传多样性^[7]分析中, 如水稻、油菜和大蒜等植物的分析研究中。本实验首次应用 SRAP 技术对郁金类药材进行了分析研究, 拟为郁金类中药的分类学研究、种质资源和遗传多样性以及 GAP 研究提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 供试材料为新鲜叶片, 样品均系笔者于 2000—2001 年分别从各道地药材产地引种至四川省双流县金桥镇舟渡村郁金 GAP 生产种源基地栽培而得, 见表 1。

1.2 主要仪器和试剂: 梯度 PCR 仪: Biometra Tgradient; 垂直电泳仪: Sequin—Gen GT; 低温离心机: Hettich—Universal 32R; 低温离心机: Eppendorf 5804R。Taq DNA 聚合酶: 上海生工生物

工程技术服务有限公司; SD₀₀₂ NDA Marker; 参照片段 19 325、600、500、400、300、200、100, 北京鼎国生物技术有限责任公司; 引物: 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 样品来源及编号

Table 1 Sample resources and their numbers

编号	样品	植物学名	产地来源
1	黄白丝郁金 1 号	<i>Curcuma longa</i> . cv. <i>chuanyujin</i>	四川新津
2	黄白丝郁金 2 号		四川双流县
3	绿丝郁金	<i>C. phaeocaulis</i> Val.	四川双流县
4	黄丝郁金 1 号	<i>C. longa</i> L.	四川双流县
5	温郁金	<i>C. wenyujin</i> Y. H. Chen et C. Ling	浙江瑞安县
6	桂郁金	<i>C. kwangsiensis</i> S. G. Lee et C. F. Liang	广西灵山县
7	黄丝郁金 2 号		四川犍为上鼓
8	黄丝郁金 3 号		四川犍为铁炉
9	白丝郁金	<i>C. phaeocaulis</i> Val. cv. <i>baisi</i>	四川双流县

1.3 DNA 提取: 采用 CTAB 法, 略有改动。提取出的 DNA 用 TE 200 μL 溶解, 存于 -20 °C 冰箱备用。

1.4 引物设计: 根据 Li 等^[5]发表的引物, 设计了 10 个上游引物 (ME₁~ME₁₀) 和 10 个下游引物 (EM₁~EM₁₀), 见表 2^[5,8]。

表 2 实验中应用的 SRAP 引物序列

Table 2 Primer sequences used for SRAP analysis

编号	上游引物 ME5'-3'	下游引物 ME5'-3'
1	TGA GTC CAA ACC GGA TA	GAC TGC GTA CGA ATT CAA
2	TGA GTC CAA ACC GGA GC	GAC TGC GTA CGA ATT CTG
3	TGA GTC CAA ACC GGA AT	GAC TGC GTA CGA ATT CGA
4	TGA GTC CAA ACC GGA CC	GAC TGC GTA CGA ATT CCA
5	TGA GTC CAA ACC GGA AG	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
6	TGA GTC CAA ACC GGT TG	GAC TGC GTA CGA ATT AAC
7	TGA GTC CAA ACC GGT GT	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
8	TGA GTC CTT TCC GGT AA	GAC TGC GTA CGA ATT TGA
9	TGA GTC CTT TCC GGT CC	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
10	TGA GTC CTT TCC GGT GC	GAC TGC GTA CGA ATT GCA

1.5 PCR 反应: 反应体系 20 μL: DNA 2 μL (30 ng/μL), 10×PCR buffer 2 μL, MgCl₂ 2 μL (25 mmol/L), dNTP 2 μL (2 mmol/L), 上游引物 2 μL, 下游引物 2 μL, Taq 酶 0.2 μL (5 U), H₂O 补足总体积 20 μL。

PCR 扩增程序:94 ℃变性 5 min;开始 5 个循环 94 ℃变性 1 min,35 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 1 min;然后 35 个循环 94 ℃变性 1 min,50 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 1 min;72 ℃延伸 5 min。

扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳(6%,7 mol/L 尿素)分离,电泳缓冲液为 0.5×TBE。电泳时,先用 120 W 电流电泳预热 30 min,上样后 70~90 W 电流电泳 2 h 左右,当二甲苯青 FF 跑过 2/3 胶板时中止电泳,银染。

2 结果与分析

2.1 用 1 号和 3 号样品对 100 个引物组合进行筛选,选取扩增产物条带信号强、重现性好、特征性好的 27 个引物组合。27 个引物组合分别是:ME-1/EM-1、ME-1/EM-2、ME-1/EM-3、ME-3/EM-1、ME-3/EM-2、ME-3/EM-3、ME-3/EM-4、ME-3/EM-5、ME-3/EM-6、ME-3/EM-7、ME-3/EM-8、ME-3/EM-9、ME-4/EM-3、ME-4/EM-9、ME-4/EM-10、ME-5/EM-1、ME-5/EM-2、ME-5/EM-3、ME-5/EM-4、ME-5/EM-5、ME-5/EM-6、ME-5/EM-7、ME-6/EM-2、ME-6/EM-3、ME-6/EM-4、ME-6/EM-5、ME-6/EM-7。用 27 个引物组合对 9 个郁金材料进行扩增,电泳后,共得到 847 条条带,其中多态性条带 397 条,每个引物组合的总条带数从 20~64 条不等,多态性条带数从 7~25 条不等。平均每个引物组合产生 14.7 条多态性条带,见图 1。

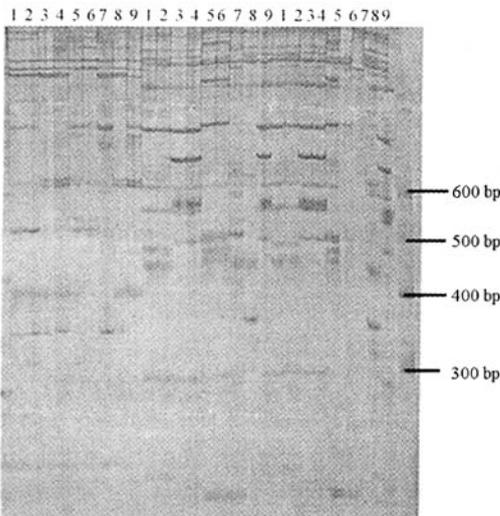


图 1 引物 ME-5/EM-4、ME-5/EM-5、ME-5/EM-6 在 9 个样品上的扩增图

Fig. 1 Amplified results of primer ME-5/EM-4, ME-5/EM-5, ME-5/EM-6 for nine samples

2.2 采用 Baroni-Urbani 聚类系数,WPGMA 聚类方法,在 DPS 统计分析软件上运用 0-1 聚类分析方法,获得了距离矩阵和聚类分析图。见表 3,图 2。

表 3 Baroni-Urbani 和 Buser 相异系数距离矩阵
Table 3 Baroni-Urbani and Buser dissimilar coefficient of distance matrix

	1	2	3	4	5	6	7	8								
2	0.263	16														
3	0.443	65	0.438	23												
4	0.468	85	0.421	55	0.173	12										
5	0.529	46	0.570	48	0.494	74	0.478	83								
6	0.510	53	0.532	95	0.563	05	0.482	15	0.202							
7	0.507	97	0.464	20	0.562	71	0.480	37	0.541	36	0.435	51				
8	0.527	38	0.509	42	0.494	94	0.433	05	0.496	26	0.478	96	0.454	37		
9	0.489	69	0.532	95	0.367	98	0.328	55	0.478	83	0.526	10	0.480	37	0.478	96

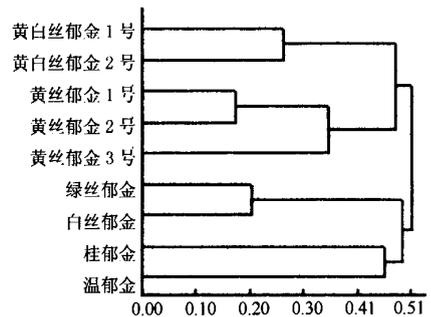


图 2 9 个郁金材料的 SRAP 聚类分析图
Fig. 2 Dendrogram from SRAP results of nine Radix Curcumae

2.3 分子生物学研究结合原植物形态可见,当取分类阈值 $\lambda_1=0.51$ 时,供试的 6 个品种郁金可分为 2 个大组,一组为黄丝郁金和黄白丝郁金(简称 I 组),另一组为绿丝郁金、白丝郁金、桂郁金和温郁金(简称 II 组)。从原植物形态来看,这两组的主要区别在于花序的出生部位。I 组花序从叶鞘内抽出,II 组花序直接从根茎抽出(仅白丝未见花)。在经典植物分类文献上,花序出生的部位非常重要,常常作为分类的重要依据。其次在主根茎和侧根茎横切面的颜色上两组也有区别,I 组主根茎和侧根茎颜色均为橙红色和橙色,II 组的颜色为墨绿色或黄绿色。

2.4 黄白丝郁金和黄丝郁金:黄丝郁金和黄白丝郁金主要分布于四川双流、崇州、犍为等地,黄白丝郁金常与黄丝郁金混生,其块根在当地常被当作黄丝郁金入药。黄白丝郁金植株比较高,根茎比较发达,根入土较深;黄丝郁金的植株比较矮小,根茎发达,根入土较浅。但两者花序均从叶鞘内抽出,叶片两面均无毛,主根茎和侧根茎横切面的颜色相近,为橙红色和橙色。故两者具有非常近的亲缘关系,笔者认为黄白丝郁金(川郁金)应为姜黄 *C. longa* L. 即

黄丝郁金的栽培变种 *C. longa* L. cv. *chuanyujin*。

2.5 白丝郁金与绿丝郁金:从 SRAP 研究结果可见白丝郁金和绿丝郁金有很近的亲缘关系,在分类阈值为 0.22 时,两个品种可以相互聚合。在生长环境上白丝郁金常与绿丝郁金混生在一起。认为白丝郁金可能为蓬莪术 *C. phaeocaulis* 即绿丝郁金的栽培变种,暂定为白丝郁金 *C. phaeocaulis* Val. cv. *baisi*。

3 讨论

SRAP 技术是一种新型标记,现主要用在水稻、油菜和大蒜等植物研究中。本文首次将该技术应用到中药研究领域中来,研究中通过引物的筛选、反应程序的优化,得到了较好的扩增效果,每个引物组合平均产生 14.7 条多态性条带,最多可达 25 条。研究证明,SRAP 技术可用于郁金分子生物学的研究,本研究从 DNA 分子水平上为郁金类药材原植物的分类、遗传多样性和种质资源以及 GAP 研究提供了参考依据,并且为中药研究领域提供了一个新的分析方法。

References:

- [1] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Xiao X H, Liu F Q, Shi C H, et al. RAPD Polymorphism and authentication of medicinal plants from Turmeric (*Curcuma L.*) in China [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (3): 209-213.
- [3] Chen Y H, Bai S M, Chen K L, et al. RAPD Study of *Curcuma wenyujin* and *C. sichuanensis* [J]. *J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24 (3): 131-133.
- [4] Zhang H, Xie C K. A new species of *Curcuma* of Sichuan [J]. *J West China Univ Med Sci* (华西医科大学学报), 1990, 21 (2): 179.
- [5] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new markers system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genetic*, 2001, 103: 455-461.
- [6] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theor Appl Genetic*, 2003, 107: 168-180.
- [7] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucubita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genetic*, 2003, 107: 271-282.
- [8] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2003, 48 (15): 1676-1679.

HPLC 法研究雄、雌虎杖不同部位化学成分的变化

张须学¹, 李海霞², 刘延泽³

(1. 南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 450004; 2. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450052; 3. 河南中医学院, 河南 郑州 450008)

虎杖在我国广泛分布,在美国东北部也有大量分布。临床可用于痹痛,黄疸,经闭,烫伤,跌打损伤,疮毒,咳嗽、痰多等症。现代药理研究表明虎杖中的蒽醌类大黄素、大黄酸、大黄素甲醚有抗炎、抑菌、抗病毒、抗肿瘤等作用^[1];萘类白藜芦醇、白藜芦醇苷有抑制胃酸分泌、保肝、抗血栓、降血脂、预防动脉硬化、对多种癌症发生阶段的抑制^[2]、强心扩血管、镇咳平喘^[3]、改善微循环、提高烧伤动物存活率和存活时间等作用^[4];黄酮醇苷类槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷有利尿作用^[5];缩合鞣质有抗肝脂质过氧化^[6]、降血糖^[7]等作用。虎杖为雌雄异株植物,在生产、采集及使用中从未涉及到其性别问题。尽管雌雄异株现象在植物中也常见到,但其化学成分及药理作用有何异同引起了我们的兴趣。虽然对虎杖的化学成分已有大量报道,但对其性别和

部位间的差异目前未见文献报道;并且中药是整体化学成分发挥作用,现有文献虽有大黄素、白藜芦醇、白藜芦醇苷量的测定方法,但未见用 HPLC 一次分析其尽可能多的化学成分的方法;而且《雷公炮制论》记载“虎杖,采得后,细研,却用虎杖叶裹一夜,出煞干用”,说明虎杖叶对其根及根茎的炮制有一定作用,提示有必要研究虎杖不同部位化学成分的同异。鉴于在我国及美国东北部地区具有十分丰富的资源及巨大的开发潜力,因此,本试验用 HPLC 法对我国及美国雌雄虎杖的不同部位进行化学成分变化分析,为评价雌雄虎杖的品质及其合理化的采收、加工、炮制、用药提供依据,并为进一步研究虎杖的药理药效作用提供参考。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: Waters 1525 HPLC 泵,