

蒙药蜀葵花 HPLC 指纹图谱及 rbcL 序列分子鉴定研究

陈玉花, 撒切尔, 肖田梅, 白梅荣*, 白迎春, 包桂花*

内蒙古民族大学, 内蒙古 通辽 028007

摘要: 目的 建立蜀葵花 HPLC 指纹图谱及 rbcL 序列 DNA 条形码 (barcoding) 分子鉴定方法。方法 色谱柱为 Welch Column C₁₈ (300 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相、梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 365 nm, 进样量 10 μL; 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 版 A 版)”进行相似度评价; 同时以 rbcL 为引物, 对 11 份蜀葵花进行 PCR 扩增并测定序列, 运用 DNDMAN 和 MEGA7.0 及 CodonCode Aligner17.0 软件进行分析。结果 建立了 11 份蜀葵花的 HPLC 指纹图谱, 得到 21 个共有峰, 相似度均大于 0.88, 并标定了金丝桃苷 (7 号峰)、槲皮素 (15 号峰)、芹菜素 (19 号峰)、山柰素 (20 号峰) 4 个成分; rbcL 序列扩增和测序成功率 100%, 测序到的长度 500 bp, GC 含量为 44.10%~44.40%, 种内遗传距离 0~0.004 0, 平均遗传距离 0.001 4, 变异位点数 10 个, 相似度为 99.00%。结论 建立的 HPLC 指纹图谱方法稳定可靠、rbcL 序列 DNA barcoding 分子鉴定方法重复性好, 可用于蜀葵花的质量控制。

关键词: 蒙药; 蜀葵花; rbcL 序列; HPLC 法; 指纹图谱; 金丝桃苷; 槲皮素; 芹菜素; 山柰素

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5607-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.026

Fingerprint and molecular identification of rbcL sequence of Mongolian medicine *Althaeae Roseae Flos* by HPLC

CHEN Yu-hua, SA Qie-er, XIAO Tian-mei, BAI Mei-rong, BAI Ying-chun, BAO Gui-hua

Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028007, China

Abstract: Objective To establish the fingerprint of *Althaeae Roseae Flos* by HPLC and the molecular identification method of DNA barcode of rbcL sequence. **Methods** The fingerprint establishment of *Althaeae Roseae Flos* was performed on Welch Column C₁₈ (300 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile - 0.1% formic acid solution as mobile phase for gradient elution, with flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 35 °C, detection wavelength of 365 nm, injection volume of 10 μL. DNA barcode molecular identification method was used for PCR amplification and determination of rbcL sequence. **Results** The fingerprints of 11 samples were established, 21 common peaks were obtained, their similarities were calculated, and four components (hyperoside, quercetin, apigenin and kaempferide) were determined. The total length of rbcL sequence of 11 samples was measured, and the G + C content was 44.10%—44.40% and genetic distance (K2P) was 0.001 4. There were 10 ectopic points and the similarity was 99.00%. **Conclusion** The two methods are stable and reliable, which can provide basis for the identification and quality control of *A. rosea*.

Key words: Mongolian medicine; *Althaea rosea* (Linn.) Cavan.; rbcL sequence; HPLC; fingerprint; hyperoside; quercetin; apigenin; kaempferide

蜀葵花为常用蒙药, 为锦葵科蜀葵 *Althaea rosea* (Linn.) Cavan. 的干燥花, 别名额日·占巴, 哈鲁莫德格、炮扎木、哈鲁其其格^[1]。始载于《四部甘露》, “主治尿闭, 肾热…等症”^[2]。继后《认药白晶鉴》记: “叶绿色, 具长柄, 花白色或暗紫色^[3]”。《无误蒙药鉴》载: “生于庭园, 茎长, 叶大, 花朱红色、白色、红棕色^[4]”。《认药学》^[5]、《中华本草·蒙

药卷》^[6]、《中华医学百科全书·蒙医学》^[7]等蒙医药著作中见有关于蜀葵花的记载。本品系味咸、甘, 性寒, 具有利尿、消肿、清肾热和膀胱热、固精、调经等功效。主要用于水肿肾热, 膀胱热, 遗精, 月经不调等症^[8]。临床疗效好, 故沿用至今。其主要化学成分有黄酮苷类和黄酮类化合物, 即蜀葵苷、异甘草苷、虎耳草苷、芦丁、山柰素、洋芹素、

收稿日期: 2020-04-06

基金项目: 蒙医药标准化国际科技合作项目 (MDKBZH2018013); 2017 内蒙古自治区科技计划项目 (NMKJZX1701); 内蒙古自然科学基金项目 (2018MS08124)

作者简介: 陈玉花 (1971—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事蒙药化学成分及质量标准研究。Tel: 15004951775 E-mail: nmdcyh@163.com

*通信作者 白梅荣, 女, 教授, 博士生导师, 从事蒙药药理与毒理研究。Tel: 15804758404 E-mail: baimeirong@126.com

包桂花, 女, 教授, 硕士生导师, 从事蒙药鉴定与品种资源研究。Tel: 13948359978 E-mail: bghtlg_123@163.com

香橙素、柚皮素、木犀草素、芹菜素、槲皮素等, 酚酸类成分有咖啡酸、阿魏酸等文献报道^[9-11]。1987 年被载入《内蒙古药材标准》^[12], 并仅对药材的来源及性状方面进行了规定, 除此之外, 该药材的研究尚处于空白。因此, 在前期研究基础上, 本研究对 11 个产地蜀葵花进行 HPLC 指纹图谱和 rbcL 序列 DNA barcoding 分子鉴定, 建立该药材的 HPLC 指纹图谱和 rbcL 序列 DNA barcoding 分子鉴定方法, 为蜀葵花提升标准以及质量评价提供依据。

1 仪器与材料

LC-20AT 输液泵高效液相色谱仪 (SPD-M20A 检测器、CBM-20A 工作站、CTO-22A 柱温箱、日本岛津公司); Multigene Gradient PCR 仪 (Labent International L Ine 公司)、JY200C 型电泳仪 (北京君意东方电泳公司)、JY-SPC 型电泳槽 (北京君意东方电泳公司)、QUANTUM 凝胶成像系统 (北京五洲科技公司)、SIGMA3K15 高速冷冻离心机 (北京五洲科技公司)、明澈-D 超纯水机 (美国默克公司); 离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒, Taq Master Mix (Dye), rbcL 通用引物, Trans5k DNA Marker, 琼脂糖, EB, 金丝桃苷 (批号 111521-201809)、槲皮素 (批号 111541-201605)、芹菜素 (批号 111901-201603)、山柰素 (批号 111520-200504) 均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数大于 98%; 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。11 份蜀葵花均 2018 年 7~8 月采集, 经内蒙古民族大学包桂花教授鉴定为 *A. rosea* (Linn.) Cavan. 的干燥花, 样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件

表 1 蜀葵花药材信息

Table 1 Information of *Althaeae Roseae Flos*

编号	采集地	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m	生境
S1	辽宁大连	121°56'	40°50'	29	栽培
S2	辽宁阜新	121°40'	42°01'	146	栽培
S3	天津市南开区	117°10'	39°10'	6	栽培
S4	内蒙古通辽	122°24'	42°15'	177	栽培
S5	内蒙古赤峰	118°88'	43°52'	587	栽培
S6	陕西太白	107°01'	33°04'	510	栽培
S7	湖北神农架	110°48'	31°40'	1 001	栽培
S8	内蒙古霍林河	119°66'	45°53'	821	栽培
S9	内蒙古兴安盟	122°08'	46°06'	271	栽培
S10	内蒙古海拉尔	119°74'	49°22'	609	栽培
S11	内蒙古锡林浩特	116°08'	43°93'	995	栽培

4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸水 (B), 梯度洗脱, 0~30 min, 10%~12% A; 30~60 min, 12%~16% A; 60~80 min, 16%~20% A; 80~100 min, 20%~25% A; 100~110 min, 25%~30% A; 110~120 min, 30%~58% A; 120~130 min, 58%~97% A; 130~135 min, 97%~96% A; 135~140 min, 96%~10% A; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 365 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL^[13-14]。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取金丝桃苷、槲皮素、芹菜素、山柰素对照品适量, 依次加甲醇分别制成 8.5、6.2、7.0、4.0 μg/mL 的对照品溶液^[13,15]。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取蜀葵花粉约 0.5 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 回流 30 min, 放冷, 加甲醇补足减失的质量, 过滤, 取续滤液, 即得供试品溶液^[16-17]。

2.1.4 专属性考察 取“2.1.2”和“2.1.3”项下混合对照品溶液和供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (图 1、2)。其各已知成分分离度良好 ($R > 1.5$), 理论板数按金丝桃苷峰计算大于 3 000, 结果表明该方法专属性良好。

2.1.5 精密度试验 按照“2.1.3”项下的方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.1.1”项下色谱条件连续

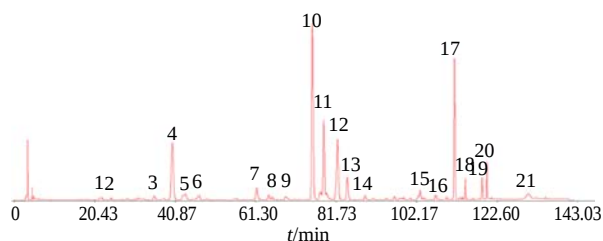
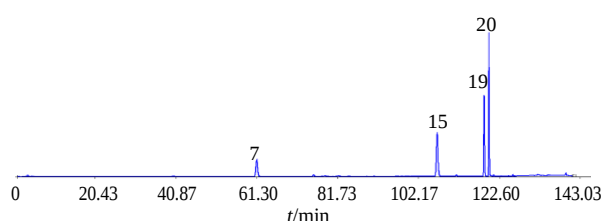


图 1 蜀葵花 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of *Althaeae Roseae Flos*



7-金丝桃苷 15-槲皮素 19-芹菜素 20-山柰素
7-hyperoside 15-quercetin 19-apigenin 20-kaempferide

图 2 混合对照品 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed reference substance

进样 6 次, 20 号峰为参照峰, 结果显示指纹图谱中 21 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 0.48%、1.72%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密称取蜀葵花粉末约 0.5 g, 按照“2.1.3”项下的方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、12、24 h 注入液相色谱仪, 结果 21 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 0.32%、1.25%, 表明供试品溶液在常温 (25 ℃) 下 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 6 份, 在“2.1.1”项下色谱条件注入液相色谱仪, 结果 21 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 0.26%、2.01%, 表明该方法的重复性良好。

2.1.8 HPLC 指纹图谱的建立 将 11 份蜀葵花粉末, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液并测定, 记录色谱图, 应用《中药指纹图谱相似

度评价系统》(2012 版·A 版) 进行分析, 结果见表 2 和图 3。

2.1.9 特征峰的标定 在蜀葵花 HPLC 指纹图谱研究中, 建立了不同产地 11 份蜀葵花的 HPLC 色谱图, 确定了 21 个共有峰, 以山柰素 (20 号峰) 为参照峰, 结果相似度均大于 0.88, 表明不同地区蜀葵花化学成分基本一致, 但共有峰相对峰面积有一定的差异, 故在实际应用中, 应该固定药材来源; 同时通过与对照品色谱图进行比对, 指认了金丝桃苷 (7 号峰)、槲皮素 (15 号峰)、芹菜素 (19 号峰)、山柰素 (20 号峰) 4 个成分。

2.2 rbcL 序列 DNA barcoding 分子鉴定

2.2.1 引物设计 依据参考文献方法^[18-19]选择引物并进行 rbcL 序列扩增, rbcLa_F: 5'-ATGTC-ACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'; rbcLa_R: 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3', 委托华大基因公司进行合成。

2.2.2 总 DNA 提取^[20] 对 11 份蜀葵花采用植物基

表 2 蜀葵花药材相似度分析结果

Table 2 Similarity analysis results of *Althaeae Roseae Flos*

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	对照图谱
S1	1.000	0.978	0.927	0.928	0.931	0.995	0.976	0.974	0.986	0.984	0.905	0.962
S2	0.978	1.000	0.927	0.929	0.929	0.983	0.937	0.950	0.976	0.987	0.970	0.961
S3	0.927	0.927	1.000	0.938	0.939	0.976	0.976	0.992	0.986	0.954	0.924	0.959
S4	0.928	0.929	0.938	1.000	0.941	0.930	0.978	0.987	0.978	0.996	0.927	0.957
S5	0.931	0.929	0.939	0.941	1.000	0.950	0.986	0.997	0.968	0.994	0.920	0.957
S6	0.995	0.983	0.976	0.930	0.950	1.000	0.941	0.967	0.941	0.956	0.958	0.963
S7	0.974	0.950	0.992	0.987	0.997	0.967	0.981	1.000	0.991	0.980	0.988	0.977
S8	0.974	0.950	0.992	0.978	0.968	0.941	0.965	0.991	1.000	0.992	0.967	0.974
S9	0.986	0.976	0.986	0.978	0.968	0.941	0.965	0.991	1.000	0.992	0.880	0.942
S10	0.984	0.987	0.954	0.996	0.994	0.956	0.976	0.980	0.992	1.000	0.936	0.977
S11	0.905	0.970	0.924	0.927	0.920	0.958	0.988	0.967	0.880	0.936	1.000	0.943
对照图谱	0.962	0.961	0.959	0.957	0.957	0.963	0.977	0.974	0.977	0.943	0.943	1.000

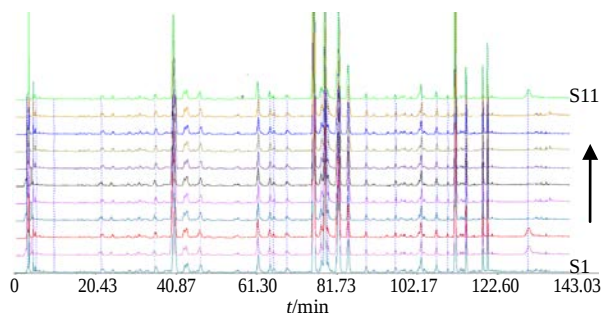


图 3 蜀葵花 HPLC 指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of *Althaeae Roseae Flos*

因组 DNA 试剂盒进行提取。称取材料适量研磨转置 1.5 mL 离心管中, 加入 800 μL 缓冲液 GP1, 在水浴加热 30 min, 取上清液加入苯酚-三氯甲烷 (1:1) 抽提, 取上清液加入 400 μL 三氯甲烷, 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 400 μL 异丙醇, 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃掉离心液, 应用 400 μL 75%乙醇清洗并沉淀, 该步骤重复 2 次, 吸干液体, 沉淀干燥 30 min, 用 60 μL 水溶解沉淀, 即得总 DNA 备用。

2.2.3 DNA 鉴定 取总 DNA 4 μL, rbcLa_F 和

rbcLa_R 引物各 2 μL , ddH₂O 17 μL , 2 $\times$ Es Taq Master Mix (Dye) 25 μL , 混匀后 50 μL 放入 PCR 仪进行扩增, 其条件为 93 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 进行 35 次循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min) 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。制备 1.5% 琼脂糖凝胶, 电泳检测 PCR 产物 5 μL 结果见图 4^[21]。

2.2.4 rbcL 测序分析 rbcL 序列测序由华大基因公司测序完成。所测得序列用 DNDMAN 和 MEGA7.0 及 CodonCode Aligner17.0 等软件进行

分析, 结果见表 3 和图 5~7。在 rbcL 序列 DNA barcoding 分子鉴定研究中, 应用 DNDMAN 和 MEGA 7.0 及 CodonCode Aligner17.0 软件进行分析, 成功扩增并测定了 11 份蜀葵花 rbcL 序列, 得到序列长度 500 bp, GC 含量为 44.10%~44.40%, 种内遗传距离为 0~0.004 0, 平均遗传距离为 0.001 4, 变异位点数 10 个, 相似度为 99.00%。结果表明, 不同产地蜀葵花 rbcL 序列基本相似, 但有一定的变异性。

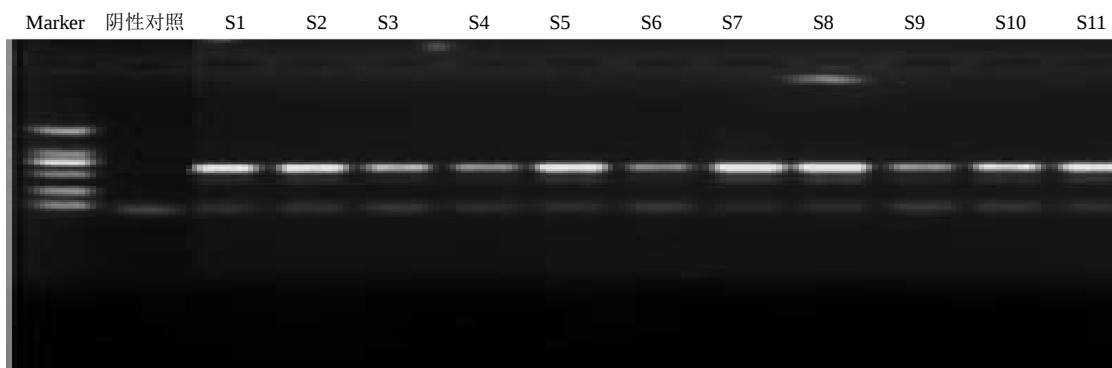


图 4 rbcL 序列 PCR 产物电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of rbcL PCR products

表 3 蜀葵花 rbcL 序列的遗传距离 (K2P)

Table 3 Genetic distance (K2P) of rbcL sequence in *Althaeae Roseae Flos*

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
S1	0.000 0										
S2	0.000 0										
S3	0.002 0	0.002 0									
S4	0.002 0	0.002 0	0.000 0								
S5	0.002 0	0.002 0	0.000 0	0.000 0							
S6	0.004 0	0.004 0	0.002 0	0.002 0	0.002 0						
S7	0.002 0	0.002 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.002 0					
S8	0.002 0	0.002 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.002 0	0.000 0				
S9	0.002 0	0.002 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.002 0	0.000 0	0.000 0			
S10	0.002 0	0.002 0	0.004 0	0.004 0	0.004 0	0.006 0	0.004 0	0.004 0	0.004 0		
S11	0.002 0	0.002 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.002 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0

65 TGTTAAAGAGTATAAATTGACTTATTATACTCCTGAATATGAAGTCAAAGATACTGATATCTTGG
 130 CAGCCTTCCGAGTAACCTCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCGGGGGCCGCGGTAGCTGCT
 195 GAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAA
 260 AGGGCGATGCTACCACATTGAGCCCCTTGCTGGAGAAGAACAATATATATGTTATGTAGCTT
 325 ACCCCTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTA
 390 TTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTAGAGGATCTGCGAATCCCTATTGCTTATGTTAA
 455 AACTTTCCAAGGCCACCTCATGGTATCCAGGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGCC
 500 CCCTATTAGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTA

图 5 rbcL 序列 DNA barcoding 碱基

Fig. 5 DNA barcoding base of rbcL sequence

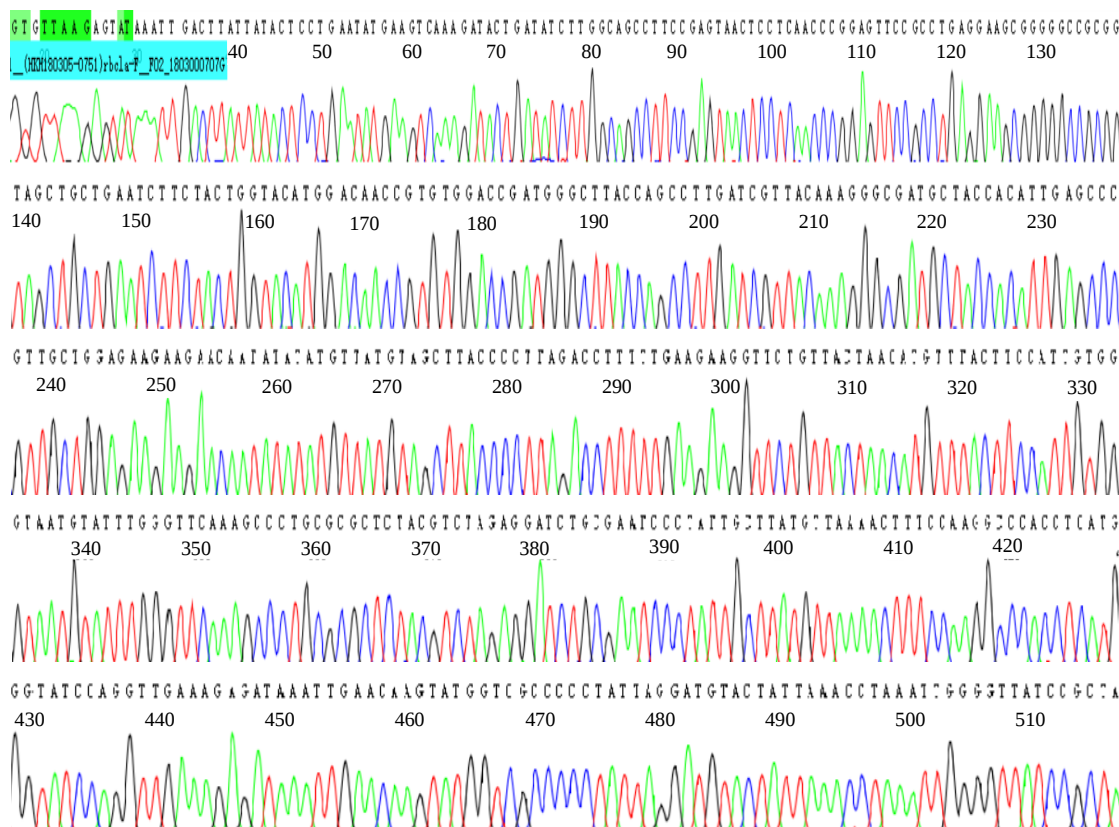


图 6 rbcL 序列 DNA barcoding 峰图

Fig. 6 DNA barcoding peak of rbcL sequence

S10	CCT	TGA	TCG	TTA	CAA	AGG	GCG	ATG	CTA	CCA	CAT	TGA	GCC	CGT	TGC	TGG	AGA	AGA	AGA	ACA
S9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S10	ATA	TAT	ATG	TTA	TGT	AGC	TTA	CCC	CTT	AGA	CCT	TTT	TGA	AGA	AGG	TTC	TGT	AAC	TAA	CAT
S9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S10	GGT	TGA	AAG	AGA	TAA	ATT	GAA	CAA	GTA	TGG	TCG	CCC	CCT	ATT	AGG	ATG	TAC	TAT	TAA	ACC
S9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
S1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

图 7 rbcL 序列 DNA barcoding 碱基变异位点图

Fig. 7 Variation site of DNA barcoding base in rbcL sequence

4 讨论

考察了超声提取和加热回流提取 2 种提取方法, 结果发现加热回流提取率较超声提取高, 故选用加热回流提取方法; 同时在提取方法相同的情况下比较了 50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、70% 乙醇和乙醇等不同提取溶剂, 结果甲醇的提取率最高, 考虑有效成分和药效间的相关性, 选择甲醇为提取溶剂; 在上述条件相同的情况下, 选择 30、60、90 min 加热回流提取条件下提取, 结果表明, 不同时间段的提取率相当, 故选择加热回流时间为 30 min。

本实验考察了甲醇-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-水溶液、甲醇-水溶液作为流动相, 结果显示, 乙腈-0.1% 磷酸水溶液共有色谱峰多, 并且分离效果好于其他流动相, 故选用乙腈-0.1% 磷酸作为流动相; 检测波长在 200~400 nm 进行光谱扫描。结果显示, 在 365 nm 附近处色谱峰的峰高最高, 所以选择 365 nm 为蜀葵花 HPLC 指纹图谱的检测波长; 除此之外柱温 25、30、35、40 °C 时对该药材进行了考察, 结果柱温 35 °C 时各色谱峰基本基线分离, 并且峰形最佳, 结果选择柱温 35 °C。根据文献记载蜀葵花化学成分中还含有异甘草苷、芦丁、咖啡酸、阿魏酸等, 但经对照品比对, 11 份蜀葵花中未检测到上述几个成分, 有待进一步深入研究。

在 rbcL 测序引物的筛选中, rbcLa_F 和 rbcLa_R 引物的 PCR 扩增产物检测中, 扩增条带明亮, 并且扩增成功率 100%, 故选用该引物为蜀葵花 rbcL 序列 DNA barcoding 分子鉴定的首选引物; 在总 DNA 提取中, 如果不加苯酚-三氯甲烷 (1:1), rbcL 序列 PCR 扩增产物检测时条带有杂质, 所以在试验中加等体积 (各 350 μ L) 的苯酚-三氯甲烷 (1:1), 结果条带清亮、测序成功率 100%; 在 PCR 仪扩增时, 预变性 93 °C、5 min 和 95 °C、4 min 进行比较时, 93 °C 预变性 5 min 的扩增条带清晰, 所以未选通用条件预变性 95 °C、4 min。

目前尚未见文献对蜀葵花 HPLC 指纹图谱和 rbcL 序列分子鉴定相关研究, 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, 所以该项研究为其有效控制蜀葵花的质量提供依据。

参考文献

- [1] 奥·乌力吉, 布和巴特尔. 传统蒙药与方剂 [M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2013.
- [2] 伊喜巴拉珠尔. 四部甘露 (蒙古文版) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1998.
- [3] 伊喜巴拉珠尔. 认药白晶鉴 (蒙古文版) [M]. 赤峰: 内蒙古科技出版社, 2015.
- [4] 占布拉道尔吉. 无误蒙药鉴 (蒙古文版) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1988.
- [5] 罗布桑泉布勒. 认药学 (蒙古文版) [M]. 北京: 民族出版社, 1998.
- [6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-蒙药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004.
- [7] 白清云. 蒙医学《上下册》 [M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1986.
- [8] 罗布桑. 蒙药学 蒙文版 [M]. 北京: 民族出版社, 1989.
- [9] 冯育林. 蜀葵花化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1622-1624.
- [10] 杨鹏元, 韩凤兰. 药用植物蜀葵研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(28): 17241-17243.
- [11] 孟和毕力格, 红 艳, 包金花, 等. 蒙药材蜀葵花的研究概况 [J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(4): 48-50.
- [12] 内蒙古蒙药材标准 [S]. 1987.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [14] 高必兴, 苟 琰, 齐景梁, 等. 多基原兔耳草 HPLC 指纹图谱对比研究 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 4019-4024.
- [15] 李 永, 葛兆宏, 李勇军, 等. HPLC 法测定黄蜀葵花中金丝桃苷及槲皮素含量 [J]. 扬州大学学报, 2015, 36(1): 107-109.
- [16] 武晶芳. 民族药材黄蜀葵子质量标准研究 [D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2019.
- [17] 林 婧. 黄蜀葵茎叶质量标准及指纹图谱研究 [D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2018.
- [18] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [19] 黄璐琦, 刘昌孝. 分子生药学 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [20] 孙思雅, 陈 云, 王琪瑞, 等. 基于 ITS2 和 rbcL 条形码的金钱草及其地方习用品与混伪品分子鉴定技术研究 [J]. 中药材, 2020, 43(6): 1338-1344.
- [21] 屈 燕, 赵琬玥, 区 智, 等. 绿绒蒿属藏药植物 ndhF 和 rbcL 序列片段特征分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2018, 38(6): 84-89.