

坚龙胆主要次生代谢产物及分子差异的研究

韩多¹, 赵志莲², 刘卫红¹, 李海峰^{1*}

(1. 大理大学 药学与化学学院, 云南 大理 671000;

2. 云南省大理农林职业技术学院, 云南 大理 671003)

[摘要] 目的:通过含量测定与 DNA 条形码分析,探讨坚龙胆主要次生代谢产物及分子的差异。方法:采用 HPLC 测定不同居群坚龙胆根及根茎、茎、叶、花中主要次生代谢产物龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷及苦龙胆酯苷含量,建立其指纹图谱共有模式,用单因素方差分析对主要次生代谢产物间的差异进行评价;并采用 DNA 条形码技术对不同居群坚龙胆样品进行 ITS2 测序。结果:不同居群坚龙胆根及根茎、茎、叶、花中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷及苦龙胆酯苷含量具有极显著差异($P < 0.01$);同时 ITS2 序列结果显示不同居群坚龙胆分子差异较小。结论:不同居群坚龙胆主要次生代谢产物有一定差异,但分子间差异较小,亲缘关系较近。

[关键词] 坚龙胆; 高效液相色谱; 次生代谢产物; ITS2 序列; DNA 条形码

[中图分类号] R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0035-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180035

Research on Differences Between Main Secondary Metabolites and Molecules of *Gentiana rigescens*

HAN Duo¹, ZHAO Zhi-lian², LIU Wei-hong¹, LI Hai-feng^{1*}

(1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China;

2. Dali Vocational and Technical College of Agriculture and Forestry, Dali 671003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the differences between main secondary metabolites and molecules of *Gentiana rigescens* from different populations by the method of content determination and DNA barcoding analysis. **Method:** An HPLC method was applied to determine the contents of gentiopicroside, swertiamarin, sweroside and amarogentin in *G. rigescens* roots and rhizomes, stems, leaves, and flowers, and the HPLC fingerprint was established, the main secondary metabolites were evaluated by one-way ANOVA, and the DNA barcoding technique was used to test ITS2 sequences of *G. rigescens*. **Result:** There were significant differences in the contents of gentiopicroside, swertiamarin, sweroside and amarogentin ($P < 0.01$) in different parts. The results of ITS2 sequences showed that there was no significant difference in the molecule of *G. rigescens* from different populations. **Conclusion:** There were differences in main secondary metabolites of *G. rigescens* from different populations, but there was little difference of with less differences among molecules and a close genetic relationship.

[Key words] *Gentiana rigescens*; HPLC; secondary metabolites; ITS2 sequence; DNA barcoding

坚龙胆为龙胆科多年生宿根草本植物^[1],被 2015 年版《中国药典》一部收载,药用历史悠久,以

干燥根及根茎入药,大理州白族民间长期以坚龙胆全草入药。裂环烯醚萜类物质是龙胆科植物的主要

[收稿日期] 20160328(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102806)

[第一作者] 韩多,在读硕士,从事药用植物次生代谢、品质评价及质量控制研究,Tel: 18887212025,E-mail: handuo787079523@126.com

[通讯作者] *李海峰,教授,硕士生导师,从事药用植物生物技术及品质评价研究,Tel: 0872-2251475,E-mail: lihfh888@sina.com

活性成分,其功效与龙胆苦苷(gentiopicroside),獐芽菜苦苷(swertiamarin),獐芽菜苷(sweroside),苦龙胆酯苷(amarogentin)等成分密切相关^[2],其中龙胆苦苷含量为 2015 年版《中国药典》一部规定的质量控制的标准^[3]。现代研究发现坚龙胆除清热泻火、保肝、利胆、健脾、抗炎、杀菌等传统功效^[4-5]外,还具有抗过敏、抗惊厥、降血压、利尿、抑制甲状腺功能亢进、升血糖、兴奋中枢神经系统等作用^[6-8]。

DNA 条形码是利用基因组中一段通用的标准短序列进行物种鉴定的分子诊断技术^[9],该技术具有快速、准确、费用低等优点,可实现对未知物种的鉴定^[10-11]。ITS 存在于大多数真核细胞中,由 ITS1, 5.8 S 和 ITS2 组成,具有长度保守性和核苷酸高度变异性等特点^[12],常用于不同分类阶元的系统进化研究,尤其是属水平或属以下水平的研究^[13],被推荐为植物条形码研究的候选序列,特别是 ITS2 序列^[14]。但用 ITS2 序列对龙胆属药用植物亲缘关系分析的研究很少。因此,笔者收集了云南省大理州坚龙胆药材主要原料来源地 5 个县的坚龙胆样品,拟采用 HPLC 测定坚龙胆根及根茎、茎、叶、花中的主要次生代谢产物龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷及苦龙胆酯苷含量,建立其指纹图谱共有模式,用单因素方差分析对其主要次生代谢产物进行差异评价,初步探讨坚龙胆不同部位中主要次生代谢产物的差异,并采用 DNA 条形码方法对坚龙胆的分子差异进行分析,进一步对不同居群坚龙胆的生物遗传和亲缘关系进行比较研究,为选育优质坚龙胆提供理论基础。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(G1315A/B 型 DAD 检测器,美国 Agilent 公司),FY135 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),AE240 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),SK5200H 型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司),MM400 型植物组织研磨仪(德国 Retsh 公司),1-14K 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),DYY-8C 型电泳仪, JY04S-3C 型紫外凝胶成像分析仪(北京六一仪器厂),Rotor-Gene[®] Q 型实时荧光定量 PCR 仪(德国 Qiagen GmbH),微量移液器(10,200,1 000 μL ,德国 Tripette Brand 公司)。

龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷、苦龙胆酯苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 ZJ0701BA13, M29J4S1, PN1125SA13, Z06J6S2,纯度均 $\geq 98\%$),植物基因组提取试剂盒(天根生化科技

有限公司),Type-it[®] HRMTM PCR Kit(凯杰生物技术有限公司,批号 206544),DL2000 DNA marker (Takara, USA),ITS2 引物(上海生工生物技术服务公司,正向引物 ITS 5F 为 5'-GGAAGTAAAAGT CGTAACAAGG-3',反向引物 ITS 4R 为 5'-TCCTC CGCTTATTGATATGC-3'),甲醇为色谱纯,水为超纯水,PVP-40,EDTA,Tris-HCl,NaCl,三氯甲烷,异戊醇等均为分析纯。

2014 年 10 月在坚龙胆药材主要原料来源地云南省大理州选择野生资源分布较丰富的南涧、永平、大理、漾濞、洱源 5 个县采集开花期坚龙胆(花期相同)样品,经大理大学李海峰教授鉴定为龙胆科坚龙胆 *Gentiana rigescens* 的干燥根及根茎、茎、叶、花,采集的植株样品经 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱干燥至恒重。

2 方法与结果

2.1 坚龙胆根及根茎、茎、叶、花中主要次生代谢产物含量测定

2.1.1 色谱条件

Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水梯度洗脱(0 ~ 15 min, 15% ~ 35% B; 15 ~ 60 min, 35% ~ 80% B),龙胆苦苷检测波长 274 nm,獐芽菜苦苷、獐芽菜苷和苦龙胆酯苷检测波长 243 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,进样量 10 μL 。

2.1.2 对照品溶液的配制

分别精密称取龙胆苦苷 1.92 mg,獐芽菜苦苷 1.01 mg,獐芽菜苷 0.50 mg,苦龙胆酯苷 0.49 mg,分别置于 1, 2, 10, 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别取 0.4, 0.1, 0.16, 0.16 mL 置于 1 mL 量瓶中,并用甲醇稀释至刻度。配成龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷、苦龙胆酯苷的质量浓度分别为 0.768 0, 0.050 50, 0.008 160, 0.007 840 g \cdot L⁻¹的对照品溶液。4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

2.1.3 供试品溶液的配制

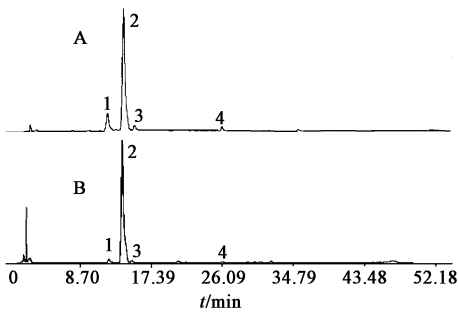
提取制备方法参照文献[15]。取坚龙胆样品粉碎,过 100 目筛,精密称取药材粉末 0.1 g 于 10 mL 量瓶中,加入甲醇 2 mL,于 53 kHz, 40 $^{\circ}\text{C}$ 超声处理 20 min,过滤,滤渣用甲醇 2 mL 按此步骤重复处理 1 次,合并 2 次提取滤液置于 5 mL 量瓶中,冷却至室温,加甲醇溶液至刻度,混匀,定容,即得供试品溶液。

2.1.4 系统适应性试验

在 2.1.1 色谱条件下,分别取对照品溶液和供试品溶液进样测定,记录色谱图,见图 1。

2.1.5 线性关系考察

将龙胆苦苷对照品依次配成 1.536, 1.152, 0.768 0, 0.384 0, 0.307 2, 0.153 6



1. 獐芽菜苦苷; 2. 龙胆苦苷; 3. 獐芽菜苷; 4. 苦龙胆酯苷。A. 对照品; B. 样品

图 1 坚龙胆样品 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Gentiana rigescens* samples

$g \cdot L^{-1}$, 将獐芽菜苦苷对照品依次配成 0.101 0, 0.075 75, 0.050 50, 0.025 25, 0.010 10, 0.005 050 $g \cdot L^{-1}$, 将獐芽菜苷对照品依次配成 0.008 160, 0.004 080, 0.001 632, 0.000 816 0, 0.000 408 0, 0.000 163 2 $g \cdot L^{-1}$, 将苦龙胆酯苷对照品依次配成 0.007 840, 0.003 920, 0.001 568, 0.000 784 0, 0.000 392 0, 0.000 156 8 $g \cdot L^{-1}$, 在 2.1.1 色谱条件下, 每次进样 10 μL , 测定龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷、苦龙胆酯苷对照品峰面积, 再分别以对照品进样量 (μg) 对峰面积进行线性回归, 绘制标准曲线, 得到回归方程分别为 $Y = 800.04X + 40.197 (r = 1.000 0)$, $Y = 1 700.8X - 55.042 (r = 0.999 7)$, $Y = 3 080.5X - 0.093 4 (r = 0.999 6)$, $Y = 1 854.8X - 1.497 2 (r = 1.000 0)$, 其分别在 1.536 ~ 15.36, 0.050 50 ~ 1.010, 0.001 632 ~ 0.081 60, 0.001 568 ~ 0.078 40 μg 呈良好的线性关系。

2.1.6 精密度试验 取 2.1.2 对照品溶液重复进样 6 次, 记录峰面积, 各对照品成分测定峰面积结果的 RSD 0.4% ~ 1.3%, 表明精密度良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取坚龙胆根及根茎 6 份, 按 2.1.3 项下方法制备坚龙胆不同部位供试品溶液, 各进样 10 μL 分析, 记录峰面积, 各主要成分测定峰面积结果的 RSD 1.6% ~ 2.3%, 表明方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 取供试品溶液, 在室温条件下分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样 10 μL 分析, 记录峰面积, 各成分测定结果的 RSD 0.4% ~ 2.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的坚龙胆样品 9 份, 各 0.1 g, 置于量瓶中, 按 80%, 100%, 120% 体积浓度分别精密加入对照品溶液, 每一浓度取 3 份, 各进样 10 μL 分析, 记录峰面积, 平

均回收率 98.88% ~ 100.7%, RSD 0.9% ~ 1.8%。

2.1.10 坚龙胆根及根茎、茎、叶、花中主要次生代谢产物含量测定 按 2.1.3 项下方法制备坚龙胆不同部位供试溶液, 分别进样测定龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷及苦龙胆酯苷, 所得数据用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析, 见表 1。结果显示: 根及根茎中, 洱源滇龙胆中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷含量极显著高于其他居群 ($P < 0.01$), 漾濞滇龙胆中獐芽菜苷含量极显著高于其他居群 ($P < 0.01$), 大理滇龙胆中苦龙胆酯苷含量极显著高于其他居群 ($P < 0.01$); 茎中: 洱源滇龙胆中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷含量极显著高于其他居群 ($P < 0.01$), 不同居群滇龙胆茎中均未检测出獐芽菜苷和苦龙胆酯苷; 叶中, 洱源、漾濞滇龙胆中龙胆苦苷含量极显著高于其他居群 ($P < 0.01$), 洱源滇龙胆中獐芽菜苦苷含量极显著高于其他居群 ($P < 0.01$), 漾濞中苦龙胆酯苷含量极显著 ($P < 0.01$) 高于其他居群, 不同居群滇龙胆叶中均未检测到獐芽菜苷; 花中, 洱源滇龙胆中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷含量明显高于其他居群 ($P < 0.01$), 漾濞滇龙胆中苦龙胆酯苷含量明显高于其他居群 ($P < 0.01$)。除了南涧滇龙胆茎, 不同居群滇龙胆根及根茎、茎、叶、花中龙胆苦苷含量都超过 2015 年版《中国药典》一部规定的 1.5% 限量。

2.2 坚龙胆根及根茎、茎、叶、花指纹图谱的建立及相似度评价 本实验在做坚龙胆 HPLC 指纹图谱时, 采用 2.1.1 色谱条件下测定的坚龙胆图谱, 综合考虑出峰数目, 选用出峰数目最多的 243 nm 作为检测波长, 将不同居群坚龙胆图谱的 AIA 格式原始数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版), 以 S1 为参照图谱, 时间窗宽度为 0.1 min, 对照图谱的生成方法为中位数法, 对多个色谱峰进行多点校正, 自动匹配, 建立坚龙胆龙胆 HPLC 指纹图谱及对照色谱图, 比较其相似度, 相似度分析结果见表 1, 指纹图谱结果见图 2。结果显示: 不同居群滇龙胆根及根茎相似度均在 0.991 以上, 茎相似度均在 0.963 以上, 叶相似度均在 0.990 以上, 花相似度均在 0.991 以上, 说明不同居群坚龙胆各部位次生代谢产物相似性较好; 不同居群滇龙胆根及根茎 HPLC 指纹图谱共有峰有 18 个, 茎的 HPLC 指纹图谱共有峰有 5 个, 叶的 HPLC 指纹图谱共有峰有 10 个, 花的 HPLC 指纹图谱共有峰有 14 个, 经过与对照品保留时间相比较, 确认了 3 号峰为龙胆苦苷, 2 号峰为獐芽菜苦苷, 19 号峰为獐

表 1 坚龙胆根及根茎、茎、叶、花中主要次生代谢产物质量分数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Comparison of contents of main secondary metabolites in roots, stems, leaves, flowers of *Gentiana rigescens* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

部位	样品	质量分数/%				相似度
		龙胆苦苷	獐芽菜苦苷	獐芽菜苷	苦龙胆酯苷	
根及根茎	S1	6.561 0 ± 0.036 7 ^{Ed}	0.094 7 ± 0.003 2 ^{Cc}	0.002 9 ± 0.000 2 ^{Ch}	-	0.991
	S2	8.009 1 ± 0.094 9 ^{Bb}	0.127 9 ± 0.001 8 ^{ABab}	-	-	0.997
	S3	7.862 7 ± 0.020 6 ^{Cb}	0.115 5 ± 0.004 3 ^{Bb}	0.011 1 ± 0.000 6 ^{Ch}	0.006 0 ± 0.000 1 ^{Aa}	0.993
	S4	7.486 1 ± 0.036 6 ^{Dc}	0.120 7 ± 0.004 3 ^{Bb}	0.041 2 ± 0.000 1 ^{Aa}	-	0.992
	S5	8.669 6 ± 0.078 4 ^{Aa}	0.140 6 ± 0.007 9 ^{Aa}	0.026 8 ± 0.008 4 ^{Ba}	0.003 5 ± 0.000 2 ^{Bb}	0.997
茎	S1	1.256 3 ± 0.014 6 ^{Dd}	0.040 53 ± 0.002 4 ^{Bb}	-	-	0.963
	S2	2.166 5 ± 0.036 6 ^{Cc}	0.016 1 ± 0.000 5 ^{Cc}	-	-	0.990
	S3	3.306 9 ± 0.025 0 ^{Bb}	0.062 0 ± 0.005 0 ^{Aa}	-	-	0.998
	S4	3.181 1 ± 0.150 5 ^{Bb}	0.046 5 ± 0.002 9 ^{Bb}	-	-	0.998
	S5	4.898 4 ± 0.019 4 ^{Aa}	0.070 9 ± 0.004 6 ^{Aa}	-	-	0.998
叶	S1	2.463 5 ± 0.012 4 ^{Dd}	0.094 1 ± 0.001 7 ^{Dc}	-	-	0.990
	S2	4.534 2 ± 0.010 3 ^{Bb}	0.098 8 ± 0.001 8 ^{CDbc}	-	-	0.999
	S3	3.683 8 ± 0.046 7 ^{Cc}	0.110 2 ± 0.003 8 ^{BCb}	-	0.017 4 ± 0.000 8 ^{Bb}	0.995
	S4	7.547 0 ± 0.108 8 ^{Aa}	0.112 5 ± 0.006 4 ^{Bb}	-	0.028 4 ± 0.004 0 ^{Aa}	0.991
	S5	7.669 9 ± 0.030 9 ^{Aa}	0.238 7 ± 0.004 9 ^{Aa}	-	-	0.993
花	S1	2.171 9 ± 0.015 5 ^{Ee}	0.064 3 ± 0.003 4 ^{Ded}	0.015 5 ± 0.001 2 ^{Cd}	0.009 0 ± 0.000 6 ^{Ced}	0.992
	S2	6.353 2 ± 0.091 9 ^{Cc}	0.056 6 ± 0.004 5 ^{Dd}	0.033 1 ± 0.001 7 ^{Bb}	0.010 3 ± 0.001 8 ^{Cbc}	0.998
	S3	5.614 7 ± 0.049 2 ^{Dd}	0.076 2 ± 0.003 4 ^{Cc}	0.031 4 ± 0.001 2 ^{Bb}	0.004 4 ± 0.000 6 ^{Dd}	0.991
	S4	6.766 9 ± 0.061 0 ^{Bb}	0.099 3 ± 0.003 5 ^{Bb}	0.008 2 ± 0.005 4 ^{Cd}	0.020 4 ± 0.000 3 ^{Aa}	0.998
	S5	9.141 8 ± 0.187 5 ^{Aa}	0.141 7 ± 0.003 1 ^{Aa}	0.049 9 ± 0.001 7 ^{Aa}	0.014 7 ± 0.001 8 ^{Bb}	0.996

注:不同 A,B,C,D,E 表示差异极显著 ($P < 0.01$);不同 a,b,c,d,e 表示差异显著 ($P < 0.05$)。S1. 南涧滇龙胆;S2. 永平滇龙胆;S3. 大理滇龙胆;S4. 漾濞滇龙胆;S5. 洱源滇龙胆。

芽菜苷,20 号峰为苦龙胆酯苷对应的峰。

2.3 坚龙胆 DNA 条形码的测定

2.3.1 样品总 DNA 的提取和 PCR 扩增、测序

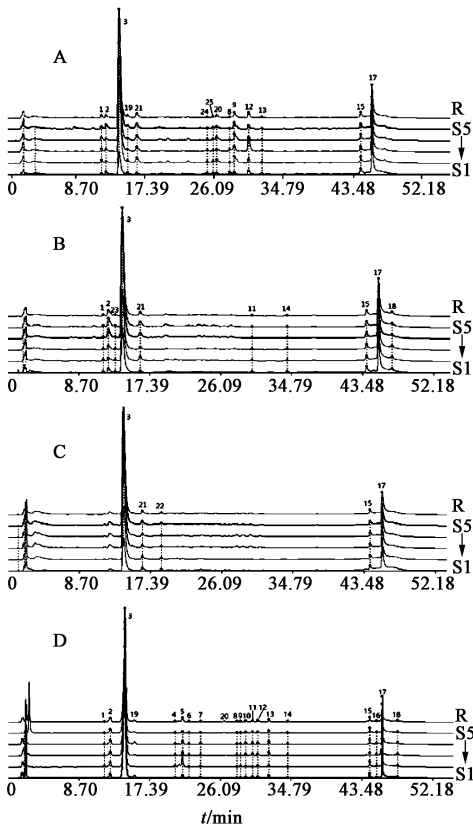
植物叶片采用硅胶进行干燥,取样 30 mg,用植物组织研磨仪把样品打成细粉,采用天根植物基因组提取试剂盒提取所有样品总 DNA。通过分光光度计检测 DNA 质量。分别以不同来源的坚龙胆样品 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 25 μL ,包括:2 \times PCR Mix 12.5 μL ,正反向引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1 μL ,模板 DNA 1 μL 。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,再进行 30 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min),最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 扩增产物经纯化后使用 ABI 3730 XL 测序仪(Applied Biosystems Co.,USA)进行双向测序。

2.3.2 序列分析 使用 CodonCode Aligner V 5.1.5 (CodonCode Co.,USA)软件对测序峰图进行校对和序列拼接,去除低质量序列及引物区,应用相似性搜索法进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)序列比对分析,采用 MEGA 6.05 (Molecular evolutionary genetics analysis)计算 K2P (Kimura 2-parameter)遗传距离。结果显示:BLAST 序列比对分析结果均为 99%;坚龙胆样本的 ITS2 序列的长度为 284 bp,GC 含量为 57.0% ~ 61.0%,平均 GC

含量为 60.2%;坚龙胆种内 5 个样本间的 K2P 遗传距离较小为 0.000 ~ 0.013,种内平均 K2P 距离为 0.008。序列比对中,仅在 26 bp (S5-洱源滇龙胆)和 35 bp (S3-大理滇龙胆)处有变异,其余位点均相同,因此不同居群坚龙胆的系统聚类树没有分支,是归为一类的。

3 讨论

坚龙胆主要次生代谢产物含量分析结果显示,除南涧居群坚龙胆茎中龙胆苦苷含量未达到 2015 年版《中国药典》一部 1.5% 的标准外,其余不同居群坚龙胆根及根茎、茎、叶、花中龙胆苦苷含量均达到标准;不同居群坚龙胆根及根茎、花中龙胆苦苷含量较高,茎最低,说明坚龙胆主要次生代谢产物龙胆苦苷在坚龙胆植物的绿色器官叶绿体中合成,并进行储藏和分配,从叶经茎向下运输,最后主要在根及根茎中积累和储存,同时也向花中运输,在花中积累;獐芽菜苦苷根及根茎、叶中含量相对较高,说明獐芽菜苦苷可能在叶中合成和积累,主要向根及根茎运输,少量向花中运输;茎、叶中均未检测到獐芽菜苷,只有在根及根茎和花中检测到,所以獐芽菜苷可能只在根及根茎和花中合成和积累;苦龙胆酯苷茎中未检测到,叶和花中含量较高,说明其可能主要在叶中合成向花中运输,少量向根及根茎运输。



2. 獐芽菜苦苷;3. 龙胆苦苷;19. 獐芽菜苷;20. 苦龙胆酯苷;A,B,C,D. 为根及根茎、茎、叶、花

图 2 坚龙胆根及根茎、茎、叶、花中 HPLC 指纹谱共有模式
Fig. 2 Mutual pattern of HPLC fingerprints of roots, stems, leaves, and flowers of *Gentiana rigescens*

不同居群坚龙胆 HPLC 指纹图谱共有模式及相似度结果显示,不同居群坚龙胆各相同部位次生代谢产物种类差异较小,但不同部位次生代谢产物的种类有较大差异;不同居群坚龙胆中次生代谢产物的差异,主要原因可能是不同居群坚龙胆的遗传背景、生态因子不同以及叶中合成积累的能力^[16]不同而导致的。而 ITS2 序列分析结果显示,不同居群坚龙胆间变异位点极少,在 284 bp 长度的序列中,仅有 2 个位点不完全相同,其余位点均完全相同,且其种内 K2P 遗传距离较小,说明其生物遗传相似,亲缘关系较近。因此,不同居群坚龙胆中次生代谢产物的差异,不是因其遗传背景导致的,很大可能是由于它们生长的土壤、温度、水分、光照等生态因子及积累合成能力的不同而引起的。

2015 年版《中国药典》一部规定坚龙胆根及根茎为药用部位,且以龙胆苦苷含量作为质量控制的标准^[3],而大理州白族民间长期以坚龙胆全草入药,这可能是由于坚龙胆不同部位主要次生代谢产物存在差异而药效不一的原因,江蔚新等^[17]实验结

果也表明,在利尿作用方面,龙胆地下部分明显优于地上部分;在抗炎方面,龙胆地上部分明显优于地下部分;在抗菌方面,龙胆的地上部分和地下部分相差不大。但是,关于坚龙胆地上部分是否能真正与根及根茎同等入药,还需要进一步做药理学、药动学、药代学、毒理学等研究。

[参考文献]

[1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志. 第 11 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 556.
 [2] 李远菊, 沈涛, 张霁, 等. 不同种植模式对滇龙胆草总裂环醚萜苷含量的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(3): 111-113.
 [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 96.
 [4] 杨书彬, 王承. 龙胆化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医学报, 2005, 33(6): 54-56.
 [5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 73.
 [6] 赵杰, 余林中, 方芳, 等. 麻黄-甘草药对的抗炎作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 163-166.
 [7] 高麟第, 门玉华, 杨振凤. 治疗甲状腺机能亢进的中药-龙胆[J]. 中草药, 1997, 28(9): 571-572.
 [8] 刘涛, 才谦, 付玉芹, 等. 中药龙胆的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(1): 85-86.
 [9] 熊波, 赵志礼, 倪梁红, 等. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用、局限性与展望[J]. 中药材, 2015, 38(10): 2202-2206.
 [10] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
 [11] 陈士林, 郭宝林, 张贵君, 等. 中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 13(8): 1043-1055.
 [12] 姜黎, 孙琴, 张春, 等. 基于 ITS 全序列分析的重楼常见混伪品鉴定研究[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(20): 2439-2444.
 [13] Álvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference[J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 29(3): 417-434.
 [14] Stoeckle M. Taxonomy, DNA, and the barcode of life [J]. Bio Science, 2003, 53(9): 796-797.
 [15] 张琳, 罗智渊, 冯丽丽, 等. 滇龙胆不同居群间品质评价及质量等同性的研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(5): 412-418.
 [16] 徐任生, 叶阳, 赵维民. 天然产物化学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2004: 184.
 [17] 江蔚新, 安胜利, 郭立萍, 等. 龙胆地上、地下部分药理作用的比较分析[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2003, 19(1): 14-16.

[责任编辑 邹晓翠]