

# 不同生长形态的爵床植株鉴别及其化学成分含量比较

姚云峰<sup>1</sup>, 熊羿屹<sup>1</sup>, 熊唯琛<sup>1</sup>, 甘娇娥<sup>1</sup>, 刘博<sup>1,2</sup>, 吴和珍<sup>1,2,3</sup>, 杨艳芳<sup>1,2,3\*</sup>

- (1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065;
2. 中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 武汉 430061;
3. 老年病中药新产品湖北省协同创新中心, 武汉 430065)

**[摘要]** 目的: 鉴别垂直生长(V类)和横向生长(L类)两类爵床并比较其地上部分及不同器官中化学成分含量的差异。方法: 使用试剂盒提取两类爵床叶中的DNA, 经聚合酶链式反应(PCR)扩增和双向测序得内部转录间隔区2(ITS2)序列, *psbA-trnH* 序列; 采用HPLC, 测定两类爵床地上部分及花穗、叶和茎中爵床脂定B和金不换甲醚的含量; 通过独立样本 $T$ 检验和配对样本 $T$ 检验, 比较两类爵床地上部分及其不同器官中的爵床脂定B和金不换甲醚的含量差异。结果: 将2个序列经过剪切后比对, V类和L类爵床的DNA序列完全一致; 独立样本 $T$ 检验结果表明, 爵床脂定B的含量在两类爵床的地上部分中不存在显著差异, 而金不换甲醚的含量为V类爵床显著高于L类( $P < 0.05$ ); 配对样本 $T$ 检验结果表明, 爵床脂定B和金不换甲醚的含量在同类爵床的花穗、叶和茎中均存在显著性差异( $P < 0.05$ ), 花穗和叶中的含量远大于茎; 且金不换甲醚在V类爵床的花穗和叶中的含量要高于L类。结论: DNA条形码技术鉴别序列一致, 表明两类不同生长形态的爵床为同种植物; 不同生长形态的爵床植株中金不换甲醚的含量存在差异, V类爵床含量更高; 同时, 爵床茎中有效成分的含量极少, 故在爵床的花穗和叶多的花、果期采收为佳。

**[关键词]** 爵床; 垂直生长类; 横向生长类; DNA条形码; 爵床脂定B; 金不换甲醚

**[中图分类号]** R284.1; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)21-0140-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191411

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190408.1102.003.html>

**[网络出版时间]** 2019-04-09 17:07

## Plant Identification of Different Growth Forms of *Justicia procumbens* and Comparison of Their Chemical Components Content

YAO Yun-feng<sup>1</sup>, XIONG Yi-yi<sup>1</sup>, XIONG Wei-chen<sup>1</sup>, GAN Jiao-e<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1,2</sup>,  
WU He-zhen<sup>1,2,3</sup>, YANG Yan-fang<sup>1,2,3\*</sup>

- (1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) of Resources and Chemistry

Hubei Province, Wuhan 430061, China;

3. Collaborative Innovation Center of TCM of New Products for Geriatrics Hubei Province, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify two different growth types vertical growth (V-class) and lateral growth (L-class) of *Justicia procumbens*, and compare the contents of chemical compounds between upper part and different organs. **Method:** DNA was extracted from the leaves of two growth forms of *J. procumbens*. Internal transcriptional spacer 2 (ITS2) and *psbA-trnH* sequences were obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification and bidirectional sequencing. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the contents of justicidin B (JB) and chinensinaphthol methyl ether (CME) from the above-ground parts

**[收稿日期]** 20181001(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31570343)

**[第一作者]** 姚云峰, 在读硕士, 从事中药资源与开发研究, E-mail: 963445765@qq.com

**[通信作者]** \* 杨艳芳, 副研究员, 从事中药物质基础研究及新产品开发研究, E-mail: yyf0204@hbtc.edu.cn

of V-class and L-class *J. procumbens* and their inflorescence, leaves, and stems. Independent sample *T*-test and Paired-sample *T*-test were used to compare the contents of JB and CME from two different growth forms of *J. procumbens* and their different organs. **Result:** The DNA sequences after shearing were shown to be identical between the V-class and L-class samples. Independent sample *T*-test showed no difference on the content of JB between the above-ground parts of V-class and L-class samples, but the content of CME was higher in V-class *J. procumbens* than L-class ( $P < 0.05$ ). Paired-sample *T*-test showed that the content of JB and CME were different in the inflorescence, leaves, and stems of *J. procumbens* ( $P < 0.05$ ), and the contents in inflorescence and leaves were much higher than those in stems. At the same time, we found the content of CME in inflorescence and leaves of V-class *J. procumbens* was higher than that in L-class. **Conclusion:** DNA barcoding and comparison of JB and CME content indicated that the two different growth forms of *J. procumbens* belong to the same species. The contents of CME were different in *J. procumbens* between different growth forms, and was higher in V-class. Meanwhile, due to the little content of JB and CME in stems, the best picking time of *J. procumbens* is the flowering and fruiting period with more inflorescence and leaves.

[**Key words**] *Justicia procumbens*; vertical growth; lateral growth; DNA barcoding; justicidin B; chinensinaphthol methyl ether

爵床始载于《神农本草经》，曾收载于 1977 年版《中国药典》(一部)。味苦、咸、辛，性寒，归肺、肝、膀胱经。具有清热解毒、利湿消积、活血止痛的功效，临床用于治疗感冒发热、咳嗽、咽喉肿痛、疟疾、黄疸、浮肿、小便淋浊、疝积、筋肌疼痛、痈疮疔肿、跌打损伤和湿疹<sup>[1-2]</sup>。爵床主要含有木脂素、生物碱、黄酮、三萜等类型的化学成分<sup>[3]</sup>。现代药理学研究表明，爵床具有抗肿瘤、抗慢性肾炎、抗血小板聚集以及抑菌等作用<sup>[4-7]</sup>。

本课题组在野外采收爵床时注意到，生长在同片区域的爵床植株存在形态上的差异，一类全草瘦高，茎长、分枝少，呈垂直生长(标记为 V)；另一类全草矮胖成簇状，根部分枝较多，呈横向生长(标记为 L)。不同生长形态的两类爵床是否为同一种植物，其有效成分含量是否存在差异，有关学者对爵床的化学成分及药理作用进行了较为深入的研究<sup>[8-9]</sup>，但对于此类问题至今未见文献报道，因此，本课题组对此开展了进一步研究。

爵床中抗肿瘤、抗血小板凝集的主要活性成分为木脂素及其苷类<sup>[3,10-12]</sup>，爵床脂定 B 和金不换甲醚为含量较高的木脂素类活性成分<sup>[13-16]</sup>，本文采用高效液相色谱法，选取爵床脂定 B (JB) 和金不换甲醚 (CME) 为指标成分进行含量测定<sup>[17]</sup>；分别采用独立样本 *T* 检验、配对样本 *T* 检验比较两类不同生长形态的爵床地上部分及其花穗、叶、茎中爵床脂定 B 和金不换甲醚的含量差异。同时，采用 DNA 条形码鉴定技术，使用试剂盒柱式法提取爵床叶中总 DNA，聚合酶链式反应 (PCR) 扩增其内转录间隔区

2 (ITS2) 序列和 *psbA-trnH* 序列，双向测序，所得序列经拼接去除低质量序列及引物区，然后比较两类爵床序列的差异，从而判断两类爵床是否为同种植物<sup>[18-21]</sup>。

## 1 材料

JXFSTPRP-24 型全自动样品快速研磨仪 (上海净信)，2720 型热循环 PCR 仪 (赛默飞世尔科技公司)，DK-34 型台式 Mini 高速离心机 (Labogene 有限公司)，1260 型高效液相色谱仪 (包括四元泵，DAD 检测器，ChemStation 化学工作站，美国 Agilent 公司)，Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)，BP211D 型 1/10 万电子分析天平 (德国赛多利斯股份有限公司)，AL204 型 1/1 万电子分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]，SK7200HP 型超声波清洗器 (53 kHz, 300 W, 上海科导超声仪器有限公司)。

植物基因组 DNA 小量纯化试剂盒 (Takara Bio 生物技术有限公司，批号 AK1201)，PCR Mix (北京艾德莱生物科技有限公司，批号 272128AX)，琼脂糖 (Biofroxx，批号 EZ2811F322)，DM2000 DNA Marker (康为世纪生物科技有限公司，批号 01003/30214)，Gold View I 型核酸染色剂 (北京索莱宝科技有限公司，批号 20160602)，乙腈 (色谱纯，美国 Tedia 公司)，甲醇 (分析纯，国药集团)，超纯水。

爵床脂定 B，金不换甲醚对照品 (实验室自制，经过 UV，<sup>1</sup>H-NMR，<sup>1</sup>C-NMR 鉴定，通过 HPLC 峰面积归一化法，确定其纯度均 > 98%)；实验用爵床药材，采集于湖北省武汉市九峰山、青龙山、黄家湖等

地区,经湖北中医药大学药学院生药学教研室吴和珍教授鉴定为爵床科植物爵床 *Justicia procumbens* 的干燥全草。见表 1。

表 1 爵床样品信息

Table 1 Sample information of *Justicia procumbens*

No.	采集地	采集时间
1	湖北省武汉市洪山区九峰山	2017-10-05
2	湖北省武汉市洪山区九峰山	2017-10-05
3	湖北省武汉市洪山区九峰山	2017-10-06
4	湖北省武汉市洪山区九峰山	2017-10-06
5	湖北省武汉市武昌区昙华林	2017-10-10
6	湖北省武汉市洪山区黄家湖	2017-10-12
7	湖北省武汉市江夏区豹山村	2017-10-21
8	湖北省武汉市江夏区青龙山	2017-10-21
9	湖北省武汉市江夏区青龙山	2017-10-21
10	湖北省武汉市蔡甸区凤凰山	2017-10-22

## 2 方法与结果

**2.1 样品的处理** 将采集到的号爵床样品(1~10),根据生长形态,将其分为 V 类(V1~V10)和 L 类(L1~L10),其中纵横比(垂直高度/水平宽度) > 3 的归为 V 类,纵横比 < 1.5 的归为 L 类,介于两者之间形态特征不明显的爵床药材存放于干燥处保存

表 2 PCR 扩增引物序列及反应条件

Table 2 Primer sequences and reaction conditions of PCR amplification

片段	引物名	引物序列(5'→3')	反应条件		
ITS2	ITS2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	94 °C, 5 min 94 °C, 30 s } 循环 40 次 56 °C, 30 s } 72 °C, 45 s } 72 °C, 10 min		
	ITS3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT			
	<i>psbA-trnH</i>	fwd		GTTATGCATGAACGTAATGCTC	94 °C, 4 min 94 °C, 30 s } 循环 35 次 55 °C, 1 min } 72 °C, 1 min } 72 °C, 10 min
		rev		CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	

### 2.3 HPLC 测定爵床脂定 B, 金不换甲醚的含量

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密称取爵床脂定 B 2.61 mg, 金不换甲醚 2.69 mg, 分别置 20 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得 2 种对照品储备液, 爵床脂定 B 储备液质量浓度 130.5 mg·L<sup>-1</sup>, 金不换甲醚储备液质量浓度为 134.5 mg·L<sup>-1</sup>。精密移取 2 种对照品储备液各 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度线, 摇匀, 即得混合对照品溶液, 其中爵床脂定 B 质量浓度为 13.0 mg·L<sup>-1</sup>, 金不换甲醚的

备用。将分类后的爵床每份取适量, 粉碎后过 60 目筛, 得两类爵床地上部分的样品粉末, 置于干燥器中保存; 分类后的 V 类和 L 类爵床样品, 每份取适量, 并按花穗、叶子和茎, 分为 3 个部分, 粉碎, 过 60 目筛, 得 60 份不同器官的样品粉末, 置于干燥器中保存, 备用。

**2.2 DNA 条形码鉴定实验** 使用 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit 来提取 V 类和 L 类爵床的 DNA。取样品叶粉末约 50 mg, 经球磨机研碎成微粉, 加入裂解液使药材裂解, 释放 DNA; 裂解液经 KAC 沉淀, 离心取上清, 将吸附柱安置于收集管, 上清液移至吸附柱中, 离心后弃收集管中的滤液, 使 DNA 与膜结合, 并用清洗液离心清洗吸附柱, 重复清洗 2 次使 DNA 纯化, 待清洗液自然挥干后用灭菌水将 DNA 从膜上洗脱, 得到总提取 DNA。

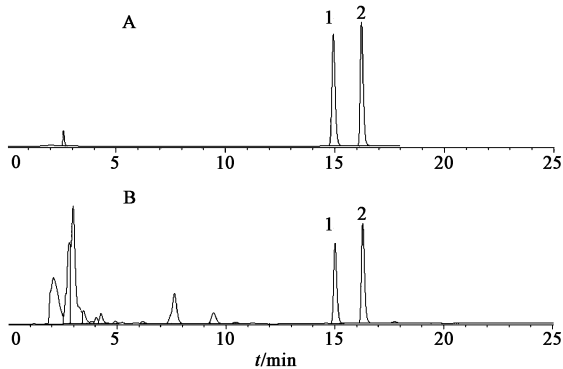
采用合适的引物进行 PCR 扩增, 使用琼脂糖凝胶电泳法检测扩增情况。电泳后, PCR 产物在相应的 DNA 条形码序列长度位置出现一条目的条带。PCR 产物经生工生物武汉测序部双向测序, 得到 ITS2 序列和 *psbA-trnH* 序列, 所得序列经校对剪切, 去引物区, 后使用 MEGA 6.0 分析序列, 将获得的序列在 GenBank 数据库进行相似性比对。见表 2。

质量浓度为 13.5 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 取爵床样品粉末约 0.1 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇, 超声提取 30 min, 冷却至室温, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤后即得供试品溶液。

**2.3.3 色谱条件** EclipseXDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水梯度洗脱 (0~8 min, 45% 乙腈; 8~12 min, 45%~65% 乙腈; 12~20 min, 65% 乙腈); 流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>; 检

测波长 256 nm;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。在上述色谱条件下,爵床脂定 B,金不换甲醚的保留时间分别为 15.0,16.2 min,达到基线分离,理论板数按爵床脂定 B 峰计算不低于 5 000。见图 1。



A. 混合对照品;B. 供试品;1. 爵床脂定 B;2. 金不换甲醚

图 1 爵床样品和对照品的 HPLC

Fig.1 HPLC of standard and test solution *Justicia procumbens*

**2.3.4 线性关系考察** 精密移取 2.3.1 项下的 2 种对照品储备液各 10 mL,置 20 mL 量瓶中,摇匀得 7 号溶液;精密移取 7 号溶液 1.0,2.0,3.0,5.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度线,摇匀即得 3~6 号溶液;精密移取 7 号溶液 0.5,1.0 mL 置 20 mL 量瓶中,并加甲醇至刻度线,摇匀即得 1,2 号溶液。1~7 号溶液中爵床脂定 B 的质量浓度分别为 1.63,3.26,6.53,13.05,19.58,32.63,65.25 mg·L<sup>-1</sup>,金不换甲醚的质量浓度分别为 1.68,3.36,6.73,13.45,20.18,33.63,67.25 mg·L<sup>-1</sup>。精密吸取上述系列对照品溶液各 10 μL,按 2.3.3 项下条件进样,测定峰面积。以质量浓度(X)对峰面积(Y)进行回归分析,得爵床脂定 B 回归方程  $Y = 112.15X + 8.7945$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围 1.63~65.25 mg·L<sup>-1</sup>;金不换甲醚回归方程  $Y = 102.16X + 8.7516$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围 1.68~67.25 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.5 精密度考察** 精密吸取 2.3.1 项下的混合对照品溶液 10 μL,按 2.3.3 项下色谱条件连续进样 6 次,考察各峰相对峰面积的 RSD。爵床脂定 B 相对峰面积的 RSD 0.4%,金不换甲醚的 RSD 0.4%,表明仪器精密度良好。

**2.3.6 稳定性考察** 按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,于配好后的 0,1,2,4,6,8 h,分别精密吸取 10 μL 供试品溶液,按 2.3.3 项下色谱条件进样,计算峰面积的 RSD,爵床脂定 B 相对峰面积的 RSD 2.6%,金不换甲醚的 RSD 2.9%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

**2.3.7 重复性考察** 称取同批爵床药材粉末 6 份,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL 按 2.3.3 项下色谱条件进样,计算药材粉末含量,并计算含量的 RSD。结果爵床脂定 B 的质量分数为 1.421~1.440 mg·g<sup>-1</sup>,平均质量分数为 1.430 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 1.3%,金不换甲醚的质量分数为 0.588~0.602 mg·g<sup>-1</sup>,平均质量分数为 0.600 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 0.7%,表明本方法重复性良好。

**2.3.8 加样回收率试验** 精密称量爵床脂定 B 7.25 mg,金不换甲醚 3.00 mg,分别置于 50 mL 的量瓶中,加入甲醇至刻度线,摇匀,得到质量浓度为 145.0 mg·L<sup>-1</sup> 的爵床脂定 B 溶液和质量浓度为 60.0 mg·L<sup>-1</sup> 金不换甲醚溶液。取已知含量的爵床 6 份(爵床脂定 B 质量分数为 1.430 mg·g<sup>-1</sup>,金不换甲醚质量分数为 0.600 mg·g<sup>-1</sup>),每份 0.1 g,精密称定。分别加入上述两种溶液各 1 mL,然后按 2.3.2 项下方法制成 6 份供试品溶液。按 2.3.3 项下色谱条件进样检测,得爵床脂定 B 加样回收率为 98.70%,RSD 2.7%,金不换甲醚加样回收率为 100.09%,RSD 1.4%,表明该方法准确可靠。见表 3。

**2.3.9 爵床地上部分含量测定** 将 2.1 项中的 V1~V10 和 L1~L10 爵床地上部分的样品粉末,按 2.3.2 项下方法分别制备供试品溶液,按 2.3.3 项下项色谱条件进样,计算样品中爵床脂定 B 和金不换甲醚的含量。

**2.3.10 爵床不同器官的成分含量测定** 将 2.1 项中的 60 份不同器官粉末样品,按 2.3.2 项下方法制备成供试品溶液,并按 2.3.3 项下色谱条件进样,计算样品中爵床脂定 B 和金不换甲醚的含量。

## 2.4 结果分析

**2.4.1 DNA 条形码鉴定不同形态的爵床** 将 V 类和 L 类的爵床样本经 DNA 提取,PCR 扩增,电泳,测序,拼接,得到 ITS2 序列和 *psbA-trnH* 序列。将所得的序列分别进行对比,两类爵床的序列完全一致;并且经 GenBank 数据库中 BLAST 鉴定比对,结果均为爵床,相似度 99%。证明两类爵床为同种植物。见图 2,3。

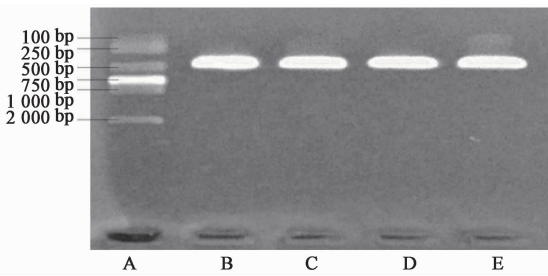
**2.4.2 含量测定结果** 按外标法计算爵床各样品的含量,结果见表 4。

**2.4.3 爵床的异常样品数据检测** 利用 SPSS 的箱式图和格鲁布斯法的双尾检验对爵床地上部分含量测定的数据进行分析,检测爵床样品中是否存在离群样品。箱式图是描述数据分布的统计图,若统计

表 3 爵床中爵床脂定 B 和金不换甲醚的加样回收率

Table 3 Recovery experiment of JB and CME in *Justicia procumbens*

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
爵床脂定 B	0.100 7	0.144 0	0.145 0	0.293 3	102.93	98.70	2.7
	0.099 7	0.142 6	0.145 0	0.284 5	97.90		
	0.100 0	0.143 0	0.145 0	0.281 6	95.62		
	0.100 2	0.143 3	0.145 0	0.286 4	98.67		
	0.099 9	0.142 9	0.145 0	0.288 3	100.28		
	0.100 0	0.143 0	0.145 0	0.283 3	96.78		
金不换甲醚	0.100 7	0.060 4	0.060 0	0.120 9	100.88	100.09	1.4
	0.099 7	0.059 8	0.060 0	0.118 3	97.53		
	0.100 0	0.060 0	0.060 0	0.120 2	100.39		
	0.100 2	0.060 1	0.060 0	0.121 2	101.72		
	0.099 9	0.059 9	0.060 0	0.119 9	99.90		
	0.100 0	0.060 0	0.060 0	0.120 1	100.12		



A. DM2000 Marker; B, C. V 类; D, E. L 类

图 2 ITS2 序列琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of ITS2 sequence

的数值大于四分位数间距的 1.5 倍,则被判断为离群值,若大于四分位数间距的 3 倍,则被判断为极端值。由箱式图可得, V 类爵床样品中,样品 V4 金不换甲醚含量值为极端值,样品 V9 爵床脂定 B 和样品 L10 金不换甲醚的含量值为离群值,证明样品 V4, V9, L10 可能存在异常。见图 4。

格鲁布斯 (Grubbs) 检验法是通过计算统计数据中的平均值和标准偏差  $S$ , 然后再按公式计算统计值  $G$ , 通过查表比对, 若  $G > G_{\alpha, n}$  表示该数值异常, 应进行处理。

$$G = \frac{|X_n - \bar{X}|}{S}$$

经查表得  $G_{0.95, 10} = 2.29$ , 计算得样品 V4 金不换甲醚含量值的  $G = 2.66$ , 且样品 L10 金不换甲醚含量值的  $G = 2.47$ , 均  $> G_{0.95, 10}$  证明这两组样品的数据异常。

综合以上 2 种检验方法, 考虑到野生爵床可能



图 3 剪切后的 ITS2 序列 GenBank 比对

Fig. 3 GenBank comparison Results of ITS2 sequence

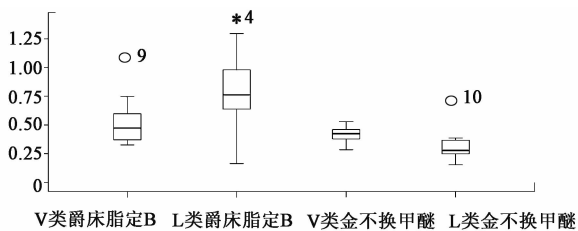
因一些不稳定因素, 而使得自身体内代谢异常, 导致木脂素含量异于正常值, 从而影响实验, 故考虑将样品 V4 和 L10 剔除, 并计算爵床中花穗、叶、茎中的含量和地上部分含量的均值, 结果见表 5。

**2.4.4 不同生长形态的爵床地上部分含量差异性比较** 将测得的 V 类和 L 类爵床地上部分的爵床脂定 B 和金不换甲醚含量数据进行独立样本  $T$  检验。对于爵床脂定 B 的含量, 计算方差方程的齐性检验  $F = 0.819 (P = 0.379, P > 0.05)$ , 故方差齐, 均值方程  $T$  检验得  $t = 1.252 (P = 0.229, P > 0.05)$ , 故两类爵床中爵床脂定 B 的含量无统计学意义上的差异, 其中 V 类爵床的爵床脂定 B 均值为  $0.525 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , L 类爵床的爵床脂定 B 均值为  $0.698 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 对于金不换甲醚的含量, 计算方差方程的齐性检验  $F = 0.000 (P = 0.998, P > 0.05)$ , 故方差齐, 均值方程  $T$  检验得  $t = -3.875 (P = 0.001, P < 0.05)$ , 故两类爵床金不换甲醚的含量有统计学意义上的差异, 其中 V 类爵床的金不换甲醚均值为  $0.409 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , L 类爵床的金不换甲醚均值为

表 4 爵床中爵床脂定 B 和金不换甲醚的质量分数

Table 4 Content of JB and CME in *Justicia procumbens* mg·g<sup>-1</sup>

No.	爵床脂定 B				金不换甲醚			
	花穗	叶	茎	地上部分	花穗	叶	茎	地上部分
V1	1.295	1.122	0.025	0.420	1.004	1.358	0.024	0.417
V2	1.222	0.576	0.010	0.373	1.301	0.865	0.009	0.455
V3	1.269	0.639	0.011	0.326	1.033	0.820	0.009	0.325
V4	2.326	1.315	0.024	0.596	3.675	2.261	0.034	0.979
V5	1.087	0.909	0.018	0.327	1.605	1.120	0.016	0.430
V6	3.323	1.892	0.065	0.370	3.991	2.516	0.071	0.460
V7	2.187	1.246	0.015	0.598	1.260	0.994	0.006	0.400
V8	2.082	1.394	0.017	0.746	0.679	0.708	0.009	0.284
V9	2.367	2.249	0.037	1.042	1.029	0.601	0.018	0.379
V10	1.129	0.996	0.017	0.524	0.974	1.251	0.015	0.529
L1	1.266	1.106	0.037	0.642	0.660	0.706	0.019	0.367
L2	1.452	1.370	0.030	0.681	0.258	0.533	0.009	0.191
L3	2.386	1.531	0.015	0.979	0.642	0.565	0.006	0.307
L4	0.260	0.216	0.008	0.164	0.428	0.527	0.010	0.275
L5	3.275	2.904	0.129	1.191	0.485	0.884	0.043	0.252
L6	0.412	0.457	0.011	0.217	0.506	0.651	0.009	0.279
L7	1.350	1.100	0.026	0.638	0.208	0.334	0.006	0.154
L8	1.972	1.569	0.049	0.928	0.310	0.558	0.012	0.249
L9	1.415	1.364	0.040	0.845	0.572	0.859	0.021	0.386
L10	2.482	2.341	0.063	1.296	1.224	1.278	0.023	0.664



○. 离群值; \*. 极端值

图 4 爵床地上部分含量测定数据的箱式

Fig. 4 Boxplots of content determination data of *Justicia procumbens*

0.273 mg·g<sup>-1</sup>, V 类爵床中金不换甲醚的含量高于 L 类。

**2.4.5 爵床不同器官的含量差异性比较** 将爵床不同器官样品的含量数据,进行配对样本 *T* 检验,比较花穗、叶和茎中的含量差异。对于 V 类爵床,爵床脂定 B 和金不换甲醚在爵床的花穗、叶和茎中均存在含量差异 ( $P < 0.05$ ),且花穗中的含量大于叶,叶中的含量大于茎,结果见表 6。对于 L 类爵

表 5 爵床中花穗、叶、茎中的含量和地上部分质量分数

Table 5 Average content of inflorescence, leaves, stems and above-ground parts in *Justicia procumbens* mg·g<sup>-1</sup>

部位	V 类		L 类	
	爵床脂定 B	金不换甲醚	爵床脂定 B	金不换甲醚
花穗	1.773	1.431	1.532	0.452
叶	1.225	1.137	1.291	0.624
茎	0.024	0.020	0.038	0.015
地上部分	0.525	0.409	0.698	0.273

床,爵床脂定 B 和金不换甲醚在爵床的花穗、叶和茎部位也均存在含量差异 ( $P < 0.05$ ),花穗中爵床脂定 B 的含量大于叶,叶中的含量大于茎,但对于金不换甲醚,叶中的含量高于花穗,花穗中的含量高于茎。结果见表 7。

表 6 配对样本 *T* 检验比较 V 类爵床不同器官中爵床脂定 B 和金不换甲醚的含量差异

Table 6 Differences in JB and CME content in different organs of V-class *Justicia procumbens* by paired sample *T*-test

成分	配对	<i>t</i>	<i>P</i>
爵床脂定 B	花穗-叶	3.675	0.006
	叶-茎	6.670	0
	花穗-茎	6.982	0
金不换甲醚	花穗-叶	0.900	0.001
	叶-茎	0.923	0
	花穗-茎	0.926	0

表 7 配对样本 *T* 检验比较 L 类爵床不同器官中爵床脂定 B 和金不换甲醚的含量差异

Table 7 Differences in JB and CME content in the different organs of L-class *Justicia procumbens* by paired sample *T*-test

成分	配对	<i>t</i>	<i>P</i>
爵床脂定 B	花穗-叶	2.623	0.030
	叶-茎	5.138	0.001
	花穗-茎	4.957	0.001
金不换甲醚	花穗-叶	-3.569	0.007
	叶-茎	11.158	0
	花穗-茎	8.131	0

**2.4.6 不同生长形态的爵床不同器官的含量差异性比较** 将 V 类爵床的花穗、叶、茎中爵床脂定 B 和金不换甲醚的含量,与 L 类爵床的花穗、叶、茎分别进行比较,通过独立样本 *T* 检验判断他们之间是否存在差异。两类爵床的花穗、叶和茎中爵床脂定

B 的含量没有统计学意义上的差异,但是对于金不换甲醚, V 类爵床花穗中的含量高于 L 类 ( $t = -2.913, P = 0.010, P < 0.05$ ), V 类爵床叶中也高于 L 类 ( $t = -2.569, P = 0.021, P < 0.05$ )。结果见表 8。

表 8 独立样本 T 检验比较两类爵床的花穗、叶和茎的含量差异  
Table 8 Differences in JB and CME content in different organs of *Justicia procumbens* between different growth forms by independent sample T-test

部位	成分	分类 (假设方差)	方差齐性 检验		均值方程的 T 检验	
			F	P	t	P
花	爵床脂定 B	相等	0.027	0.872	-0.600	0.557
		不相等			-0.600	0.557
叶	爵床脂定 B	相等	0.178	0.679	0.210	0.836
		不相等			0.210	0.837
茎	爵床脂定 B	相等	1.134	0.303	1.067	0.302
		不相等			1.067	0.308
花	金不换甲醚	相等	3.480	0.081	-2.913	0.010
		不相等			-2.913	0.018
叶	金不换甲醚	相等	3.126	0.096	-2.569	0.021
		不相等			-2.569	0.029
茎	金不换甲醚	相等	0.481	0.498	-0.602	0.555
		不相等			-0.602	0.557

### 3 讨论

本文采用 RP-HPLC 测定不同生长形态的爵床及其花穗、叶、茎中主要活性成分爵床脂定 B 和金不换甲醚的含量。通过统计学分析,发现两类不同生长形态的爵床植株中爵床脂定 B 的含量无差异,而金不换甲醚的含量存在差异,其中 V 类爵床地上部分的金不换甲醚含量高于 L 类爵床,同时爵床脂定 B 和金不换甲醚在爵床不同器官中的含量也存在差异,花穗和叶中的含量远高于茎,且茎中含量极其微小。另外, V 类爵床的花穗和叶中金不换甲醚的含量高于 L 类。经过 DNA 条形码技术鉴定,两类爵床的 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列完全相同,证明为同种植物。

自然界中野生爵床存在生长形态差异较大的 V 类和 L 类两类植株,以上研究结果表明,产生这种形态差异的原因极有可能是生长环境中光照、水、土壤等的差异造成的。不同生长形态爵床的有效成分的含量存在差异,其中茎细长、分枝少、植株高而花、

叶多的 V 类爵床中爵床脂定 B 和金不换甲醚的含量更高,故 V 类爵床可能有更好的临床疗效。另外,爵床的花穗和叶的含量远高于茎,提示在评价爵床药材质量时,以花穗、叶多的质量为优。爵床为一年生草本植物,7 月前植株嫩小,花穗稀少,而 11 月中旬后,天气转寒,花穗和叶已大量凋零,故推测爵床的最佳采收期为其花、果期的 8 至 11 月。

### [参考文献]

- [1] 岳延涛,张继,欧阳臻,等.爵床的鉴别研究[J].中药材,2010,33(5):712-714.
- [2] 许晶晶,李齐激,杨艳,等.不同产地爵床药材 HPLC 成分差异性研究[J].中药材,2017,40(8):1888-1891.
- [3] 王丹,尉捷,许欣然,等.天然双四氢呋喃类木脂素化合物的化学研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(8):226-234.
- [4] LIU B, YANG Y, LIU H, et al. Screening for cytotoxic chemical constituents from *Justicia procumbens* by HPLC-DAD-ESI-MS and NMR [J]. Chem Cent J, 2018, 12(1):1-15.
- [5] 刘文坤,陈思强,邵明国,等.爵床属植物的化学成分和药理活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2012,24(4):539-549.
- [6] LUO J, QIN J, FU Y, et al. 6'-Hydroxy justicidin B triggers a critical imbalance in Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondrion-dependent cell death in human leukemia K562 cells [J]. Front Pharmacol, 2018, 6(9):601.
- [7] 张晓,唐力英,吴宏伟,等.穿心莲现代研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(18):222-234.
- [8] 付英杰,李悦,甘娇娥,等.爵床抑制肾炎细胞增殖的物质基础及作用机理[J].中成药,2018,40(4):783-787.
- [9] 李玄,贺晓丽,童元峰,等.6'-羟基爵床素 A 对 HepG2 细胞内质网应激及胞内 Ca<sup>2+</sup> 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):212-215.
- [10] LUO J, HU Y, QIN J, et al. Ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and pharmacokinetic analysis of justicidin B and 6'-hydroxy justicidin C in rats [J]. J Sep Sci, 2017, 40(3):604-611.
- [11] QIU F, ZHOU S, FU S, et al. LC-ESI-MS/MS analysis and pharmacokinetics of 6'-hydroxy justicidin A, a potential antitumor active component isolated from *Justicia procumbens*, in rats [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 70(11):539-543.
- [12] ZHOU P, LUO Q, DING L, et al. Preparative isolation and purification of lignans from *Justicia procumbens*

- using high-speed counter-current chromatography in stepwise elution mode [J]. *Molecules*, 2015, 20 (4): 7048-7058.
- [13] JIANG J, DONG H, WANG T, et al. A strategy for preparative separation of 10 lignans from *Justicia procumbens* L. by high-speed counter-current chromatography[J]. *Molecules*, 2017, 22 (12): 2024.
- [14] LIU G, WU J, SI J, et al. Complete assignments of <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data for three new aryl naphthalene lignan from *Justicia procumbens* [J]. *Magn Reson Chem*, 2008, 46(3): 283-286.
- [15] JIN H, YANG S, DONG J X. New lignan glycosides from *Justicia procumbens*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19 (1): 1-8.
- [16] 甘娇娥, 杨艳芳, 洪宗超, 等. 爵床药材质量标准研究 [J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(23): 30-33.
- [17] 杨艳芳, 陈清杰, 李婷婷, 等. RP-HPLC 法同时测定爵床药材中 6'-羟基-爵床定 B、新爵床脂定 B 和 TaiwanE 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33 (1): 120-123.
- [18] LI X, YANG Y, Henry R J, et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2015, 90(1): 157-166.
- [19] 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.
- [20] 方强强, 王燕, 彭春, 等. 中药 DNA 条形码分子鉴定技术的应用与展望 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (22): 197-205.
- [21] 许亮, 刘春生, 杨燕云, 等. DNA 条形码技术鉴定一种植物样品的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20 (7): 127-129.

[责任编辑 顾雪竹]