

柴胡属药用植物的分子鉴定及市售柴胡药材的质量调查

袁伯川¹, 李文东², 马永生¹, 周 珊¹, 朱林峰¹, 林瑞超^{3*}, 刘 颖^{1*}

(1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100102; 2. 北京市药品检验所, 北京 102206;
3. 北京中医药大学中药品质评价研究中心, 北京 100102)

摘要: 柴胡是最常用的大宗中药材之一, 在我国有着两千多年的药用历史。但是目前柴胡药材品种混乱, 有 25 种、8 变种、3 变型的柴胡属药用植物在不同地区和中药材市场作为柴胡使用, 通过传统方法鉴别极为困难。为快速准确地对柴胡属为数众多的药用植物进行鉴定, 本文从全国 9 省份 14 居群采集了 168 株柴胡属药用植物, 扩增获得了长度为 600~606 bp 的 ITS 序列; 通过 DNAMAN 比对分析找到 86 个变异位点, 并确定了 19 种 ITS 单倍型 (TH1~TH19); 利用 MEGA 5.0 进行 K2P (Kimura 2-parameter) 遗传距离分析, 发现种间遗传距离显著大于种内遗传距离; 利用邻接 (neighbor joining, NJ) 法构建系统发育树, 显示各物种聚类关系清晰, 因此建立了基于 ITS 序列的柴胡属药用植物分子鉴定方法。利用该方法对来自全国 5 个主要中药材市场的 52 份柴胡药材进行了分子鉴定, 并进一步利用 HPLC 法测定各药材中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c 及柴胡皂苷 d 的含量, 应用 ANOVA 和 LSD T 检验进行统计学分析, 从而对市售柴胡药材的质量进行评价。本文不仅对柴胡属药用植物的快速准确鉴定具有重要意义, 而且对于掌握市场上柴胡药材的流通现状及质量评价具有指导意义。

关键词: 柴胡; ITS; 分子鉴定; 柴胡皂苷; 质量评价

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0162-10

The molecular identification of *Bupleurum* medicinal species and the quality investigation of *Bupleuri Radix*

YUAN Bo-chuan¹, LI Wen-dong², MA Yong-sheng¹, ZHOU Shan¹, ZHU Lin-feng¹,
LIN Rui-chao^{3*}, LIU Ying^{1*}

(1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China; 3. Traditional Chinese Medicine
Quality Evaluation Research Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: *Bupleuri Radix* is one of the most frequently used herbal medicines in China with a 2000-year medicinal history. However, the use of *Bupleuri Radix* is very confused. Twenty-five species and eight varieties of *Bupleurum* have been used as *Bupleuri Radix* in different regions of China. It is very difficult to identify these *Bupleurum* species using traditional morphological method. In order to establish a fast and effective method to identify these *Bupleurum* species, we collected 168 *Bupleurum* medicinal plants from 14 populations of 9 provinces, and amplified their ITS sequences. 168 ITS sequences with a full length of 600–606 bp were obtained. DNAMAN analyzing results showed that 86 variable sites were present in these sequences and 19 haplotypes (TH1-TH19) were determined. After calculating K2P distance and analyzing an NJ tree, we established a molecular identification method based on ITS sequence. Using this method,

收稿日期: 2016-06-03; 修回日期: 2016-06-26.

基金项目: 国家科技重大专项 (2014zx09304307001).

*通讯作者 Tel: 86-10-84738646, E-mail: liuyliwd@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0539

52 samples of *Bupleuri Radix* were identified successfully. Furthermore, we tested saikosaponin a, c, d contents in these *Bupleuri Radix* by HPLC and analyzed the results by ANOVA and LSD T test to evaluate the quality of *Bupleuri Radix*. This method is significant for effective identification of *Bupleurum* medicinal plants, and quality control of *Bupleuri Radix* in the market.

Key words: *Bupleurum*; ITS; molecular identification; saikosaponins; quality evaluation

中药柴胡 (*Bupleuri Radix*) 始载于《神农本草经》, 在中国有着两千多年的药用历史, 是最常用的大宗药材之一^[1]。它在方剂配伍中常作为“君药”出现, 用于治疗感冒发热、寒热往来、疟疾、肝郁气滞、胸肋胀痛、脱肛、子宫脱垂以及月经不调^[2]。随着中药现代化的发展, 柴胡中分离得到了诸如柴胡皂苷^[3]、挥发油^[4]、柴胡多糖^[5]等多种活性成分, 它们发挥了抗炎^[6]、抗肿瘤^[7]、神经调节^[8]、免疫调节^[9]等多种药理活性, 这使得柴胡在现代药物开发中占据了重要的地位。因此其市场需求逐年旺盛, 年需求量已达上千吨^[10]。

柴胡属包含约 150 种植物, 我国分布有 42 种、17 变种、7 变型^[11]。2015 版《中国药典》规定, 中药柴胡为伞形科柴胡属植物柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 或狭叶柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.) 的干燥根^[2], 其中柴胡俗称“北柴胡”。但由于地理分布以及地方用药习惯等因素的影响, 柴胡属中有 25 种、8 变种、3 变型在不同地区和市场中作为柴胡使用^[12]。事实上, 一些《中国药典》规定基原以外的柴胡种类, 在地方标准中被当做正品柴胡, 如黑柴胡 (*Bupleurum smithii* Wolff) 和银州柴胡 (*Bupleurum yinchowense* Shan et Y. Li) 在《甘肃省中药材标准》^[13]、锥叶柴胡 (*Bupleurum bicaule* Helm) 在《内蒙古中药材标准》^[14]中均被列为地方用柴胡。然而, 不同种柴胡的主要成分及药理活性不尽相同, 如银州柴胡的总皂苷具有很好的神经调节作用^[8], 柴胡相比于狭叶柴胡具有更好的解热作用^[15]。因此, 各种柴胡的混用滥用会导致柴胡质量的不可控制以及相应的用药安全问题, 对不同种柴胡属药用植物的鉴定就显得尤为重要。此外, 在各中药材市场中, 将柴胡药材通过传统方法进行鉴别的难度很大, 因此建立一种快速准确的新鉴定方法迫在眉睫。

目前, DNA 条形码鉴定技术在中药鉴定领域取得了良好的效果^[16-18]。其中 18S~26S 核 rRNA 基因的内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 因变异速度较快、变异位点丰富、长度较为稳定、便于测序分析等优点^[19,20], 在解决植物界科、亚科、族属组内的系统发育和分类问题方面发挥了重要作用^[21],

已成为系统与进化植物学研究中的重要分子标记。因此, 综合比较了不同 DNA 条形码在柴胡属药用植物鉴定中的鉴定效率^[22-25], 拟采用 ITS 序列作为鉴定柴胡属药用植物的 DNA 条形码。

本文采集了来自辽宁、河北、内蒙、北京、山西、宁夏、甘肃、青海、西藏 9 个省区共 14 个居群的柴胡属药用植物 168 株, 建立了柴胡属药用植物 ITS 鉴定方法。利用此方法对 52 份来自全国 5 个主要中药材市场的柴胡药材进行分子鉴定, 从而对 ITS 鉴定方法的准确性进行验证, 同时对市售柴胡药材的流通情况进行考察。由于柴胡皂苷是柴胡中最为重要的活性物质^[26,27], 是柴胡质量评价的指标性成分^[28,29], 因此本文进一步对 52 份柴胡药材中柴胡皂苷 a (saikosaponin a, Ssa)、柴胡皂苷 c (saikosaponin c, Ssc) 以及柴胡皂苷 d (saikosaponin d, Ssd) 进行了含量分析, 以期为市售柴胡药材的质量评价提供依据。本文的结果对于常见柴胡属药用植物的有效鉴定具有重要价值, 且对于掌握市售柴胡药材的流通现状以及质量评价具有指导意义。

材料与amp;方法

柴胡属药用植物材料 从全国 9 个省份的 14 个居群采集了 168 株柴胡属药用植物, 由北京中医药大学刘春生教授对其进行形态鉴定, 各样品详细信息见表 1。

柴胡药材材料 52 份柴胡药材样品收集自全国 5 个中药材市场, 包括: 四川成都荷花池药材市场 10 份 (CD1~CD10)、河北安国药材市场 11 份 (AG1~AG11)、广东广州药材市场 10 份 (GZ1~GZ10)、安徽亳州药材市场 11 份 (BZ1~BZ11)、河南禹州药材市场 10 份 (YZ1~YZ10)。

实验仪器 移液枪 (eppendorf); 1-13000 型离心机 (SIGMA); TProfessional 热循环分析仪 (Biometra); DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); BG-gds AUTO510 型凝胶成像系统; Agilent 1100 液相色谱仪; Phenomenex gemini 5 μm C₁₈ (110A 4.6 mm \times 250 mm) 色谱柱。

实验试剂 广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂

Table 1 *Bupleurum* medicinal plants for establishment of ITS identification method

Population	Location	Longitude and latitude	Altitude/m	Wild/Cultivated	Species	Quantity	Code
1	Longde, Ningxia	N35°44'57"E106°06'22"	2 000	Cultivated	<i>B. yinchowense</i>	12	NX1–NX12
2	Lvliang, Shanxi	N37°30'3"E110°51'54"	1 400	Cultivated	<i>B. yinchowense</i>	7	SX1–SX7
3	Yuncheng, Shanxi	N35°31'37"E111°30'51"	800	Cultivated	<i>B. chinense</i>	16	YC1–YC16
4	Dingxi, Gansu	N34°48'13"E104°24'36"	2 300	Cultivated	<i>B. yinchowense</i>	15	GS1–GS15
5	Huining, Gansu	N35°45'52"E105°25'51"	2 200	Wild	<i>B. yinchowense</i>	10	HN1–HN10
6	Zhengning, Gansu	N35°20'56"E108°18'51"	1 400	Cultivated	<i>B. chinense</i>	15	QY1–QY15
7	Yanqing, Beijing	N40°30'9"E115°48'45"	800	Wild	<i>B. chinense</i>	10	B1–B10
8	Zhangjiakou, Hebei	N40°49'8"E114°50'38"	1 100	Wild	<i>B. chinense</i>	8	ZJK1–ZJK8
9	Yanqing, Beijing	N40°30'57"E115°46'37"	1 400	Wild	<i>B. scorzonrifolium</i>	15	XY1–XY15
10	Chicheng, Hebei	N40°33'39"E115°48'15"	2 200	Wild	<i>B. smithii</i>	15	H1–H15
11	Hailar, Inner Mongolia	N49°21'33"E119°31'1"	770	Wild	<i>B. bicaule</i>	15	HL1–HL15
12	Fushun, Liaoning	N41°59'22"E125°08'22"	800	Cultivated	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	10	FS1–FS10
13	Linzhi, Tibet	N29°28'14"E94°52'16"	3 500	Wild	<i>Bupleurum marginatum</i> Wall. ex DC. var. <i>stenophyllum</i>	10	LZ1–LZ10
14	Xining, Qinghai	N36°44'18"E101°02'5"	2 800	Cultivated	<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	10	XN1–XN10

盒、2×Taq PCR Master Mix 酶、琼脂糖、Golden View 染色剂、BM2000+DNA Marker 购于北京博迈德科技发展有限公司；对照品柴胡皂苷 a (纯度: 98%, 批号: 141128)、柴胡皂苷 d (纯度: 99.07%, 批号: 141220) 购于成都普菲德生物技术有限公司, 对照品柴胡皂苷 c (纯度: 98.59%, 批号: MUST-15102802) 购于成都曼思特生物技术有限公司; 甲醇 (分析纯, Merck); 乙腈 (色谱纯, Merck); 浓氨水 (分析纯, 北京化工厂)。

ITS 序列扩增 取柴胡属植物材料干燥叶片置于研钵中, 在液氮氛围下迅速研磨成粉末, 取该粉末 20 mg 于 1.5 mL 离心管中, 用广谱植物基因组 DNA 提取试剂盒逐步提取 DNA。扩增 ITS 序列引物为 P1: 5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTC-3', P4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。30 μL PCR 反应体系: 2×Taq PCR Master Mix 15.0 μL, 上下游引物各 1.0 μL (5 μmol·L⁻¹), DNA 模板 3.0 μL, ddH₂O 10.0 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min (35 循环); 72 °C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 扩增产物送上海生工生物工程有限公司测序, 采用 CodonCode Aligner V5.12 (CodonCode Co., USA) 进行序列拼接及校对。

柴胡属药用植物分子鉴定方法的建立 对扩增获得的 ITS 序列进行基于 GenBank 的相似性搜索, 以确定是否为目标序列。将全部 ITS 序列导入 DNAMAN 6.0 (LynnonBiosoft Co., LTD, USA) 中进行比对分析, 统计 ITS 序列各类单倍型信息, 并在 GenBank 中注册。利用 MEGA 5.0 (molecular evolutionary genetics analysis) 进行种内及种间变异及

K2P (Kimura 2-parameter) 遗传距离分析^[30]。基于邻接 (neighbor joining, NJ) 法构建系统发育树, 使用 Bootstrap 重复 1 000 次检验各分支的支持率。基于以上分析, 确定物种与单倍型的对应关系, 并验证分子鉴定方法的准确性。

市售柴胡药材的分子鉴定 提取 52 份柴胡药材的总 DNA 并扩增其 ITS 序列, 利用已建立的 ITS 分子鉴定方法对其进行物种鉴定。

HPLC 法分析市售柴胡药材中 SSa、SSc、SSd 的含量 采用文献报道的 HPLC 方法测定柴胡药材中 SSa、SSc 及 SSd 的含量^[31]。对照品储备液的制备方法为: 精密称取 SSc 8.30 mg 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解并稀释至刻度; 精密称取 SSa 11.58 mg、SSd 12.31 mg 到同一 10 mL 量瓶中, 加 SSc 溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液, 分别进样 1、2、5、10、20、30 μL 作为线性溶液。供试品溶液的制备方法为: 精密称定柴胡药材粉末 (过四号筛) 0.50 g, 置具塞锥形瓶中, 加入含 5% 浓氨水试液的甲醇溶液 25 mL, 密塞, 30 °C 水温超声处理 (功率 200 W, 频率 40 kHz) 30 min, 抽滤, 用甲醇 20 mL 分 2 次洗涤容器及药渣, 洗液与滤液合并, 旋转蒸发回收溶剂至干。残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 取续滤液, 即得。色谱条件: 色谱柱为 Phenomenex gemini 5 μm C₁₈ (110A 4.6 mm×250 mm); 流动相为乙腈-水溶液, 梯度洗脱条件: 0~5 min 20% 乙腈, 5~10 min 20%~30% 乙腈, 10~22 min 30% 乙腈, 22~46 min 30%~45% 乙腈, 46~60 min 45%~48% 乙腈, 60~61 min 48%~20% 乙腈, 61~70 min 20% 乙腈; 流速

Continued

Variable sites/bp	Haplotypes																			
	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5	TH6	TH7	TH8	TH9	TH10	TH11	TH12	TH13	TH14	TH15	TH16	TH17	TH18	TH19	
209–210	TG	*	*	*	*	*	*	*	*	*	AA	AA	AA	AA	AA	AA	*	*	*	
212	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*
217	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*
351	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*
381	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	T	T	T	T	T	*	*	T	*
398	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*
407–408	AA	*	*	*	*	*	GA	GA	GA	GA	*	*	*	*	*	*	*	*	GT	*
411	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*
416–417	CG	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	TG	CA
422	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*
440	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	T	T/G	*	T	*	*	*
459	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*
480–482	AGT	*	*	*	TGT	A/TGT	AGC	AGC	AGC	AGC	*	*	*	*	*	*	*	*	••T	*
484	A	*	*	*	*	*	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
496	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*
516–517	GT	*	*	*	*	*	GG	GG	GG	GG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	GG	GG	GG	GG
519–520	GT	*	*	*	*	*	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AC	AT
524–525	GC	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	TA	*
538	A	*	*	*	*	*	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
545	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*
549	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*
555–556	TA	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	••	*
559–562	CTGT	*	GTGT	*	*	*	*	*	*	*	CTAT	CTGT	CTA/GT	CTA/GT	CTA/GT	*	*	*	ACGC	CCGT
567	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*
569–571	AAT	*	*	*	*	*	CTG	CTG	CTG	CTG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG
592	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*
595	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*
604	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	

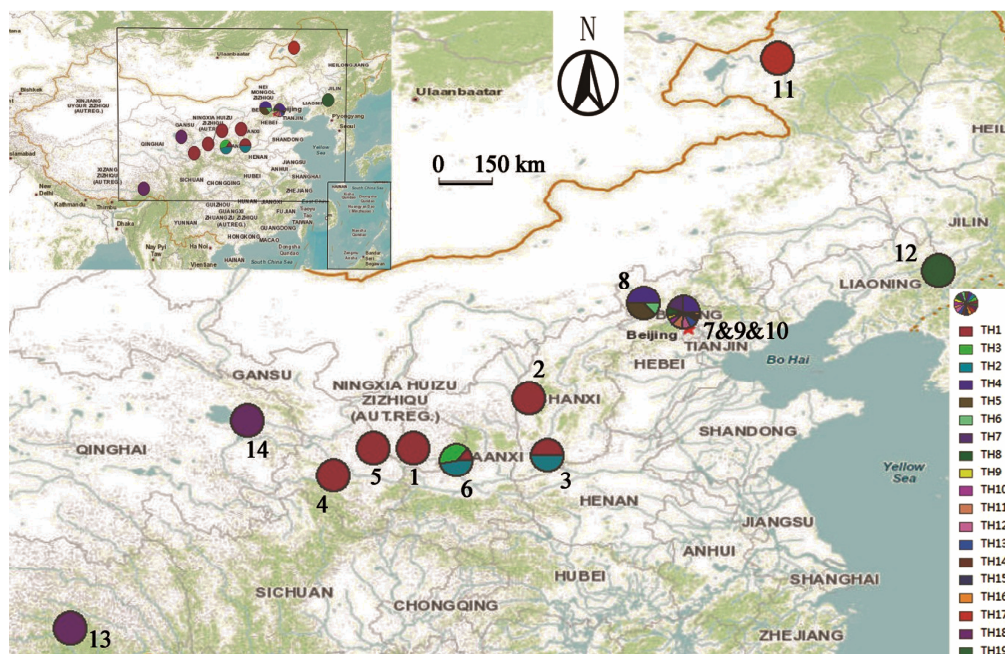


Figure 1 The distribution of 19 haplotypes. 1–14 represent different populations and pie charts show proportion of different haplotypes

19种单倍型的遗传距离范围是0~0.1045; 北柴胡种内遗传距离范围是0~0.0051; 狭叶柴胡种内遗传距离为0; 黑柴胡种内遗传距离范围是0~0.0017; 银州柴胡、锥叶柴胡、窄竹叶柴胡、三岛柴胡种内遗传距离为0; 银州柴胡与北柴胡TH2种间遗传距离最小, 是0.0068; 银州柴胡与锥叶柴胡种间遗传距离最大, 是0.1045。种内种间遗传距离的分布情况如图2所示, 可明显看出种间遗传距离显著大于种内遗传距离, 并且二者趋势线的峰图有着明显的分离, 故以ITS序列鉴定常见柴胡属药用植物有着较高的效率。

1.3 基于ITS序列的聚类分析 将168条扩增得到的ITS序列以及GenBank中已注册的银州柴胡序列HM114234、北柴胡序列JF718839、HM114232、狭

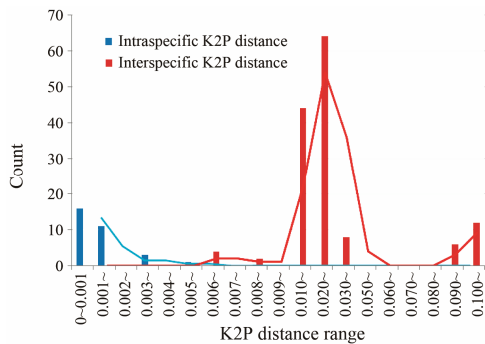


Figure 2 The distribution of K2P distance

叶柴胡序列JF718838、黑柴胡序列JF738140、锥叶柴胡序列HQ824723、窄竹叶柴胡序列HQ687952和三岛柴胡序列KP281271导入MEGA 5.0软件, 以阿米芹族毒芹 *Cicutavivosa* L. (AY524767) 为外类群构建NJ树(图3), 结果显示ITS序列可将7种柴胡属药用植物明确区分。其中窄竹叶柴胡最先与其他柴胡分开, 其亲缘关系较其他种柴胡最远; 随后北柴胡与银州柴胡聚为一大类, 黑柴胡、三岛柴胡、锥叶柴胡、狭叶柴胡聚为一大类; 在进一步的分支中, 各自独立聚为一支。GenBank中的序列亦各自聚到所属柴胡种的分支中。

1.4 柴胡分子鉴定方法确定 基于全部柴胡属药用植物材料的ITS序列单倍型信息及物种信息, 建立了柴胡“物种-单倍型”信息表(表3), 常见柴胡属药用植物的ITS序列可通过DNAMAN与此信息表中的序列进行比对, 从而确定柴胡的物种。

2 市售柴胡药材的物种鉴定及质量调查

2.1 市售柴胡药材的物种鉴定 按照已建立的柴胡分子鉴定方法, 对52份柴胡药材进行鉴定, 结果显示该方法能够成功鉴定全部的柴胡药材, 并且未出现新的单倍型, 从而进一步验证了本方法的可靠性, 各柴胡药材单倍型及物种信息列于表4。共鉴定出5种柴胡, 其中北柴胡18份、银州柴胡23份、窄竹叶

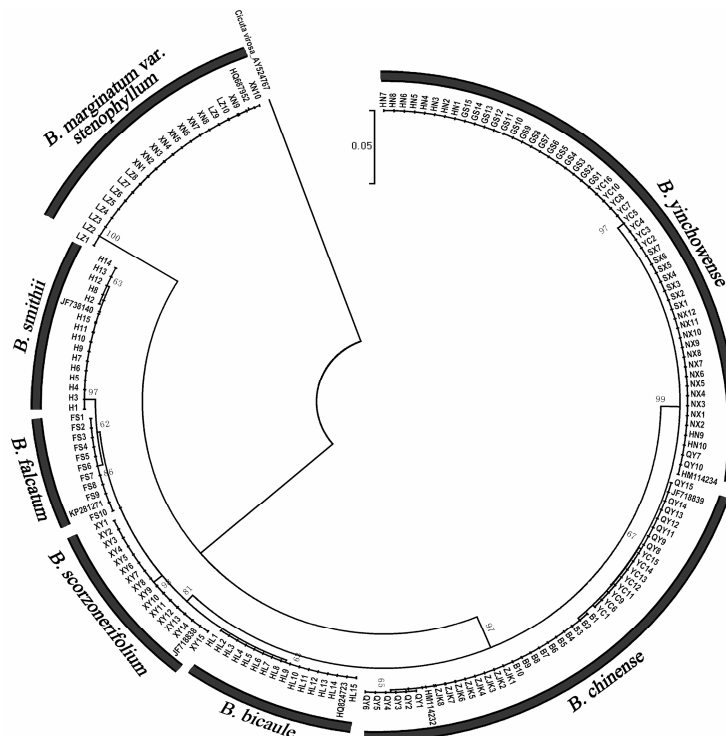


Figure 3 NJ tree based on ITS sequences from 168 *Bupleurum* medicinal plants and 9 registered ITS sequences in GenBank. Bootstrap repeated 1 000 times and branch values lower than 50% were hidden

Table 3 “Species-Haplotypes” information of *Bupleurum* medicinal species

Species	Haplotype	GenBank accession No.
<i>B. yinchowense</i>	TH1	KT984177
<i>B. chinense</i>	TH2	KT984178
	TH3	KT984179
	TH4	KT984180
	TH5	KT984181
	TH6	KT984182
	TH7	KT984183
<i>B. scorzoniferifolium</i>	TH8	KT984184
	TH9	KT984185
	TH10	KT984186
	TH11	KT984187
<i>B. smithii</i>	TH12	KT984188
	TH13	KT984189
	TH14	KT984190
	TH15	KT984191
	TH16	KT984192
<i>B. bicaule</i>	TH17	KT984193
<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	TH18	GU570601
<i>B. falcatum</i>	TH19	EU001336

柴胡 5 份、锥叶柴胡 5 份、三岛柴胡 1 份。

2.2 市售柴胡药材中 3 种柴胡皂苷含量分析 HPLC 色谱图如图 4 所示, SSa、SSc、SSd 的保留时间分别为 42.486、33.272、54.022 min; SSa 的标准曲线为: $Y=285\ 923X-4.625\ 1$ ($R^2=0.999\ 9$); SSc 的标准曲线为: $Y=248\ 107.788\ 7X+57.072$ ($R^2=0.991\ 2$); SSd 的标准曲线为: $Y=327\ 324.540\ 3X+19.947$ ($R^2=0.999\ 9$); 各柴胡药材中 3 种柴胡皂苷的百分含量列于表 4。

2.3 市售柴胡药材中柴胡皂苷含量的统计分析 以 3 种皂苷含量相加作为柴胡总皂苷含量, ANOVA 和

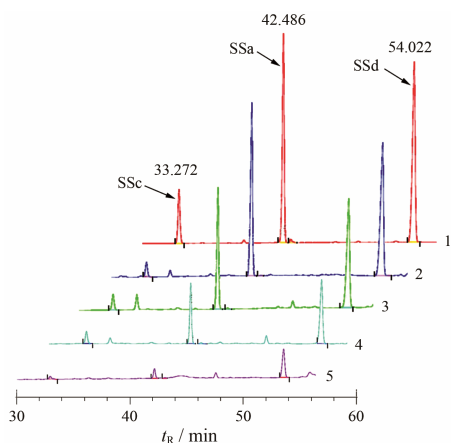


Figure 4 HPLC chromatograms of reference substance and samples. 1: HPLC chromatogram of reference substance; 2–5: HPLC chromatograms of *B. marginatum* var. *stenophyllum*, *B. yinchowense*, *B. chinense*, and *B. bicaule*, respectively

LSD T 检验分析结果如表 5、6 所示。4 种柴胡 (三岛柴胡只有 1 份样品, 无统计意义, 故排除) 的总皂苷含量存在显著差异 ($F=38.04$, $P<0.000\ 1$)。根据 LSD T 检验结果, 4 种柴胡的皂苷含量从高到低依次为窄竹叶柴胡、银州柴胡、北柴胡和锥叶柴胡。

为了进一步探讨 SSa、SSc、SSd 含量之间的相关性, 对其进行了 Spearman 相关系数检验。SSa 与 SSc: $0.5 < r_s = 0.671\ 5 < 0.7$ ($P < 0.000\ 1$), 两者呈现弱相关性; SSa 与 SSd: $0.5 < r_s = 0.834\ 4 < 0.7$ ($P < 0.000\ 1$), 两者呈现较强相关性; SSc 与 SSd: $0.5 < r_s = 0.671\ 2 < 0.7$ ($P < 0.000\ 1$), 两者呈现弱相关性。

讨论

中药柴胡由于其药用物种的多样性和形态的相似性, 使得柴胡药材鉴别十分困难。本课题组在前期预实验中, 对市售柴胡药材样品进行了形态及显微鉴定分析, 结果均不理想, 难以实现柴胡药材的有效鉴定。ITS 序列在植物的鉴定中有着较高的效率^[32], 本文采集各地药用柴胡植物材料, 扩增其 ITS 序列, 通过序列分析确定了 19 种 ITS 单倍型, 并最终发现 ITS 序列能实现常见的 7 种柴胡属药用植物的高效鉴定。其中银州柴胡、窄竹叶柴胡、锥叶柴胡、三岛柴胡各只有 1 种单倍型, 北柴胡有 5 种单倍型, 狭叶柴胡有 4 种单倍型, 黑柴胡有 6 种单倍型。此外, 发现栽培品的柴胡样品, 其种内 ITS 序列一致性良好, 如: 三岛柴胡的 TH19 和北柴胡的 TH2、TH3 都只出现在栽培品中, 因此提示这 3 种单倍型可作为北柴胡和三岛柴胡栽培品的分子标记。这其中的三岛柴胡原产于日本, 在中国均为栽培品^[33]。

本文建立的 ITS 鉴定方法在市售柴胡药材的鉴定中有着很高的效率, 可实现全部柴胡药材的准确鉴定, 进一步证明了该方法的可靠性。此外, 发现各柴胡药材的 ITS 序列所属单倍型多为各柴胡栽培品所属单倍型, 这也进一步说明市售柴胡药材以栽培柴胡为主。

《中国药典》中明确规定中药柴胡的检测指标为 SSa 及 SSd, 两者总含量应 $\geq 0.30\%$ 。因此, 根据这一标准, 市售柴胡样品的合格率为 100%。通过测定 52 份柴胡药材中 3 种皂苷的含量, 发现皂苷含量从高到低的顺序为窄竹叶柴胡、银州柴胡、北柴胡、锥叶柴胡, 其中锥叶柴胡的皂苷含量最低。但在收集这些柴胡药材的过程中, 发现锥叶柴胡在市场上被称为“海拉尔柴胡”, 其价格最为昂贵, 每公斤售价约为 150 元。因此, 从皂苷含量的角度考虑, 仅以价格为导

Table 4 Molecular identification results and saikosaponins contents of 52 *Bupleuri Radix* samples

Medicinal materials market	Code	Haplotype	Identification result	SSa/%	SSc/%	SSd/%	Total/%
Chengdu, Sichuan	CD1	TH18	<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	2.20	0.10	2.26	4.55
	CD2	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.90	0.21	0.98	2.09
	CD3	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.42	0.07	0.41	0.89
	CD4	TH3	<i>B. chinense</i>	0.64	0.15	0.83	1.62
	CD5	TH2	<i>B. chinense</i>	0.33	0.00	0.01	0.34
	CD6	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.44	0.07	0.54	1.05
	CD7	TH3	<i>B. chinense</i>	0.95	0.11	0.73	1.79
	CD8	TH18	<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	2.31	0.20	2.30	4.81
	CD9	TH18	<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	2.22	0.22	2.31	4.75
	CD10	TH18	<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	2.09	0.18	2.04	4.31
Anguo, Hebei	AG1	TH2	<i>B. chinense</i>	0.52	0.11	0.58	1.21
	AG2	TH17	<i>B. bicaule</i>	0.28	0.00	0.93	1.21
	AG3	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.91	0.10	0.99	2.00
	AG4	TH2	<i>B. chinense</i>	1.06	0.13	1.11	2.30
	AG5	TH2	<i>B. chinense</i>	0.52	0.14	0.70	1.35
	AG6	TH1	<i>B. yinchowense</i>	1.39	0.20	1.58	3.18
	AG7	TH3	<i>B. chinense</i>	1.06	0.14	1.17	2.37
	AG8	TH17	<i>B. bicaule</i>	0.31	0.07	1.12	1.51
	AG9	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.92	0.24	1.03	2.19
	AG10	TH1	<i>B. yinchowense</i>	1.15	0.31	1.71	3.17
	AG11	TH1	<i>B. yinchowense</i>	1.41	0.41	2.04	3.86
Guangzhou, Guangdong	GZ1	TH2	<i>B. chinense</i>	0.92	0.11	0.98	2.02
	GZ2	TH19	<i>B. falcatum</i>	0.16	0.03	0.19	0.38
	GZ3	TH2	<i>B. chinense</i>	0.86	0.12	0.66	1.64
	GZ4	TH3	<i>B. chinense</i>	0.39	0.18	0.55	1.11
	GZ5	TH17	<i>B. bicaule</i>	0.36	0.08	1.11	1.55
	GZ6	TH2	<i>B. chinense</i>	0.55	0.23	0.71	1.49
	GZ7	TH3	<i>B. chinense</i>	0.44	0.16	0.54	1.14
	GZ8	TH1	<i>B. yinchowense</i>	1.17	0.21	1.36	2.74
	GZ9	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.68	0.12	0.67	1.48
	GZ10	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.53	0.08	0.56	1.17
Bozhou, Anhui	BZ1	TH2	<i>B. chinense</i>	0.48	0.14	0.56	1.19
	BZ2	TH3	<i>B. chinense</i>	0.35	0.05	0.43	0.84
	BZ3	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.49	0.07	0.53	1.08
	BZ4	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.79	0.13	0.78	1.70
	BZ5	TH17	<i>B. bicaule</i>	0.11	0.02	0.34	0.47
	BZ6	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.69	0.14	0.81	1.65
	BZ7	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.67	0.13	0.75	1.56
	BZ8	TH1	<i>B. yinchowense</i>	1.01	0.19	1.12	2.32
	BZ9	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.88	0.21	0.95	2.03
	BZ10	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.70	0.22	0.99	1.91
	BZ11	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.72	0.13	0.72	1.57
Yuzhou, Henan	YZ1	TH3	<i>B. chinense</i>	0.38	0.02	0.44	0.83
	YZ2	TH3	<i>B. chinense</i>	0.43	0.08	0.60	1.10
	YZ3	TH3	<i>B. chinense</i>	0.57	0.14	0.84	1.55
	YZ4	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.67	0.13	0.80	1.60
	YZ5	TH18	<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	2.07	0.21	2.13	4.41
	YZ6	TH2	<i>B. chinense</i>	0.64	0.10	0.64	1.37
	YZ7	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.41	0.06	0.43	0.89
	YZ8	TH17	<i>B. bicaule</i>	0.13	0.00	0.64	0.77
	YZ9	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.97	0.16	1.19	2.31
	YZ10	TH1	<i>B. yinchowense</i>	0.75	0.14	0.89	1.78

Table 5 The ANOVA results. d.f.: Degrees of freedom; SSD: Sum of squares

Source of variation	d.f.	SSD	Mean square	F value	P value
Model	3	45.35	15.12	38.04	< 0.000 1
Error	48	19.08	0.40		
Corrected total	51	64.43			

Table 6 LSD T test results. Means with the same letter are not significantly different

T groups	Mean	Number of samples	Species
A	4.57	5	<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>
B	1.92	23	<i>B. yinchowense</i>
C	1.40	18	<i>B. chinense</i>
C	0.96	5	<i>B. bicaule</i>

向的质量评判标准是不科学的。此外,从3种柴胡皂苷含量的相关性来看,SSa和SSd是密切相关的,而SSc则与它们呈现一种弱相关性,因此推测SSa和SSd的生物合成途径更为接近,这也可以为研究柴胡皂苷的生物合成途径提供一些参考。

References

- [1] Sen L. Shennong's Herbal (神农本草经) [M]. Shanghai: Shanghai Technology and Health Press, 1959: 35.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part 1 (中华人民共和国药典一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 263.
- [3] Tao YW, Xu JS, Wei JH, et al. Expression analysis of glycosyltransferase BcUGT1 from *Bupleurum chinense* DC. and its expression in *E. coli* and the target protein purification [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 1345–1352.
- [4] Ashour ML, El-Readi M, Youns M, et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil obtained from *Bupleurum arginatum* (Apiaceae) [J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61: 1079–1087.
- [5] Xie JY, Di HY, Li H, et al. *Bupleurum chinense* DC polysaccharides attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Phytomedicine, 2012, 19: 130–137.
- [6] Zhu J, Luo C, Wang P, et al. Saikosaponin a mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF- κ B pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. Exp Ther Med, 2013, 5: 1345–1350.
- [7] Wong VK, Li T, Law BY, et al. Saikosaponin d, a novel SERCA inhibitor, induces autophagic cell death in apoptosis-defective cells [J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e720.
- [8] Li ZY, Guo Z, Liu YM, et al. Neuroprotective effects of total saikosaponins of *Bupleurum yinchowense* on corticosterone-induced apoptosis in PC12 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148: 794–803.
- [9] Ying ZL, Li XJ, Dang H, et al. Saikosaponin d affects the differentiation, maturation and function of monocyte-derived dendritic cells [J]. Exp Ther Med, 2014, 7: 1354–1358.
- [10] Li X, Wang Y, Du G, et al. The 10th National Symposium on Natural Medicinal Material Resources Proceedings and Abstracts (全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会论文集) [C]. Lanzhou: Lanzhou Chinese Pharmaceutical Association Press, 2012: 159–164.
- [11] Pan SL. *Bupleurum* Species: Scientific Evaluation and Clinical Applications [M]. London: London Taylor & Francis Group, 2006: 7–22.
- [12] Yang ZY, Chao Z, Huo KK, et al. ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China [J]. Phytomedicine, 2007, 14: 416–423.
- [13] Food and Drug Administration of Gansu Province. Chinese Medicinal Materials Standard of Gansu province (甘肃省中药材标准) [S]. Lanzhou: Gansu Culture Press, 2008: 388.
- [14] The Inner Mongolia Autonomous Region Health Department. Chinese Medicinal Materials Standard of Inner Mongolia Autonomous Region (内蒙古中药材标准) [S]. Hohhot: Inner Mongolia Medical Press, 1988: 279.
- [15] Yan J, Wei YF, Gu R. Study on composition of essential oil in above-ground and root of *Bupleurum malconense* and root of *B. chinense* by AMDIS and retention index [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 1048–1053.
- [16] Chen S, Song J, Yao H, et al. Strategy and key technique of identification of Chinese herbal medicine using DNA barcoding [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物杂志), 2009, 7: 322–327.
- [17] Feng S, Zheng SH, Li YK, et al. Identification of Radix et Rhizoma Clematidis and its adulterants using DNA barcoding [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 260–266.
- [18] Chen N, Lai X. "Global System" for species identification: DNA barcode [J]. World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科技:中药现代化), 2010, 12: 331–336.
- [19] Coutinho JP, Carvalho A, Lima-Brito J. Taxonomic and ecological discrimination of *Fagaceae* species based on internal transcribed spacer polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism [J]. AoB Plants, 2014, 7 (pii): plu79.
- [20] Coleman AW. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure [J]. Trends Genet, 2015, 31: 157–163.
- [21] Alvarez I, Wendel JF. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference [J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 29: 417–434.
- [22] Wu Y, Liu CS, Liu YF, et al. ITS sequence identification of

- Radix Bupleuri [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30: 732–734.
- [23] Xie H, Huo KK, Chao Z, et al. Identification of crude drugs from Chinese medicinal plants of the genus *Bupleurum* using ribosomal DNA ITS sequences [J]. *Planta Med*, 2009, 75: 89–93.
- [24] Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, et al. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12794–12797.
- [25] Chao Z, Zeng W, Liao J, et al. DNA barcoding Chinese medicinal *Bupleurum* [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 1767–1773.
- [26] Wang X, Wang Q, Burczynski FJ, et al. Saikosaponina of *Bupleurum chinense* (Chaihu) elevates bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) during hepatic stellate cell activation [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20: 1330–1335.
- [27] Liu RY, Li JP. Saikosaponin d inhibits proliferation of human undifferentiated thyroid carcinoma cells through induction of apoptosis and cell cycle arrest [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18: 2435–2443.
- [28] Huang W, Sun R. The chemistry, pharmacology and toxicology review of saikosaponins [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2010, 26: 71–74.
- [29] Xu L, Tian J, Song R, et al. LC-MS/MS determination and comparison of saikosaponin a, b₂, c, d in crude and processed Radix Bupleuri by vinegar [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2012, 43: 334–340.
- [30] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 2731–2739.
- [31] Min YH, Wang JH, Fan MX, et al. Study on the variation of saikosaponins and the quality control of the decoction pieces of Radix Bupleuri [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2014, 34: 836–843.
- [32] Han J, Song J, Yao H, et al. Comparison of DNA barcoders in identifying medicinal materials [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 1056–1061.
- [33] Ke SY, Shi LL, Ma YZ, et al. Evaluation of the genetic diversity of *Bupleurum* using amplified fragment length polymorphism analysis [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14: 2590–2599.