

## 基于叶绿体基因 *matK* 及 UPLC 对市售大黄的种质资源 鉴定和质量分析

满金辉<sup>1#</sup>, 石 玥<sup>1#</sup>, 张靖晗<sup>1</sup>, 张志飞<sup>1</sup>, 尹光耀<sup>1</sup>, 王 馨<sup>1</sup>,  
刘凤波<sup>1,3</sup>, 张 媛<sup>1,3</sup>, 王晓晖<sup>1,2\*</sup>, 魏胜利<sup>1,3\*</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院中药现代研究中心, 北京 100029;  
3. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102)

**摘要:** 大黄是多基原大宗常用药材, 不同基原大黄其药理活性存在一定差异。本研究基于叶绿体基因 *matK* 序列对市售大黄饮片的种质资源进行鉴定, 通过 UPLC 对其总蒽醌和游离蒽醌含量进行测定, 以期确定市售大黄的主要种质及质量。本研究从 27 省 40 市收集 89 份市售大黄样品并提取 DNA, 通过 PCR 扩增 *matK* 基因, 扩增的 *matK* 基因序列的分析结果表明, 收集的市售大黄样品都是同一基原, 即掌叶大黄, 共鉴定了其 8 个基因型: Rp1、Rp2、Rp3、Rp4、Rp5、Rp6、Rp10 和 Rp12, 其中来自甘肃、四川和云南省的 Rp4 和 Rp6 是主要流通基因型, 分别占总样品量 40.45% 和 37.08%。系统发育树结果表明, 8 个基因型主要分成 2 大支, 其中主要基因型 Rp4 和 Rp6 聚在同一支, 遗传距离分析结果表明 8 个基因型遗传距离在 0.001~0.010 之间。利用 UPLC 检测市场样品中的总蒽醌和游离蒽醌含量结果表明, 93.26% 样品符合药典标准。样品之间总蒽醌含量和游离蒽醌的含量差异显著, 其中游离蒽醌相差 1.01%; 总蒽醌含量相差 3.79%, 说明市售大黄样品质量存在参差不齐的现象, 但是不同采集省份之间市售大黄总蒽醌和游离蒽醌含量没有显著性差异, 各基因型之间的大黄样品中总蒽醌和游离蒽醌含量没有显著性差异。本文对大黄市场样品的种质资源、产地来源和药材质量进行研究, 有利于指导大黄市场样品流通及临床科学合理用药, 为其他中药材市场样品种质及质量鉴定提供参考。

**关键词:** 大黄; *matK* 基因; 分子鉴定; 质量评价

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0514-11

## Molecular identification and quality analysis of Rhei Rhizoma based on chloroplast *matK* gene and UPLC

MAN Jin-hui<sup>1#</sup>, SHI Yue<sup>1#</sup>, ZHANG Jing-han<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-fei<sup>1</sup>, YIN Guang-yao<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>,  
LIU Feng-bo<sup>1,3</sup>, ZHANG Yuan<sup>1,3</sup>, WANG Xiao-hui<sup>1,2\*</sup>, WEI Sheng-li<sup>1,3\*</sup>

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Engineering Research Center of Good Agricultural Practice for Chinese Crude Drugs of Ministry of Education, Beijing 100102, China)

**Abstract:** Rhei Rhizoma is commonly used as a traditional Chinese medicine with multiple botanical origins. Different botanical sources may have different pharmacological activities. The germplasm resources of commercial

收稿日期: 2021-08-24; 修回日期: 2021-09-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3207020660); 北京市科学技术委员会基金资助项目 (Z201100005420005).

<sup>#</sup>并列第一作者.

\*通讯作者 Tel: 13683336930, E-mail: wsl7491@126.com;

Tel: 15201166873, E-mail: wangxhui2014@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1225

Rhei Rhizoma were determined based on the chloroplast gene *matK*, and the anthraquinone and free anthraquinone content was determined by UPLC to analyze quality of commercial Rhei Rhizoma. Eighty-nine commercial Rhei Rhizoma samples were collected from 40 cities in 27 provinces. DNA was extracted and the *matK* gene was amplified by PCR. Results indicated that the collected samples were from the same botanical origin, *Rheum palmatum*, and 8 genotypes were identified, including Rp1, Rp2, Rp3, Rp4, Rp5, Rp6, Rp10 and Rp12. Rp4 and Rp6, cultivated in Gansu, Sichuan and Yunnan provinces were the main circulating genotypes, representing 40.45% and 37.08% of the total samples, respectively. Phylogenetic tree analysis showed that the eight genotypes were mainly divided into two branches, of which the main genotypes Rp4 and Rp6 were in one branch. Genetic distance analysis indicated that the genetic separation of the eight genotypes was between 0.001 and 0.010. UPLC analysis indicated that 93.26% of the samples met the Pharmacopoeia standards. There were significant differences in the content of total anthraquinone and free anthraquinone among the samples, in which the difference in free anthraquinone was 1.01% and the difference in total anthraquinone content was 3.79%, indicating that the quality of commercial Rhei Rhizoma samples varies considerably. There was no significant difference in the content of total anthraquinone and free anthraquinone in commercial Rhei Rhizoma among different collection provinces and genotypes. This study will help guide the circulation of Rhei Rhizoma in the market and provides valuable insights for molecular identification and quality analysis of other traditional Chinese medicines.

**Key words:** Rhei Rhizoma; *matK* gene; molecular identification; quality evaluation

大黄 (*Rhei Rhizoma*) 是常用大宗药材之一<sup>[1]</sup>, 具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀痛经、利湿退黄的功效<sup>[2]</sup>, 临床上常用于治疗慢性肝炎<sup>[3]</sup>、肝纤维化<sup>[4]</sup>、便秘<sup>[5]</sup>、慢性肾衰<sup>[6]</sup>、黄疸<sup>[7]</sup>、上消化道出血等多种疾病<sup>[8]</sup>。大黄是一种典型的多基原、多炮制、多功效药材<sup>[9]</sup>, 其正品来源为蓼科植物掌叶大黄 (*Rheum palmatum* L.)、唐古特大黄 (*Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf.) 或药用大黄 (*Rheum officinale* Baill) 的根及根茎<sup>[2]</sup>。已有研究表明, 不同基原大黄化学成分含量存在一定差别, 其中蒽醌类及其衍生物差别较大<sup>[10,11]</sup>, 并且 3 种基原大黄其药理活性也存在不同差异<sup>[12]</sup>, 其中大黄蒽醌类化合物是发挥泻下攻积作用的主要成分<sup>[13,14]</sup>, 鞣质类成分为清热泻火的药效物质基础<sup>[15,16]</sup>, 为确保大黄更为精确的对症用药, 有必要针对不同功效用途, 选取不同基原大黄入药, 因此, 鉴别大黄市场样品基原及种质具有重要的意义。

近年来, 基于 DNA 序列标记的中药材分子鉴定技术在中药鉴定领域被广泛应用, 与中药材性状鉴定、药材理化鉴定等方法相比, DNA 序列标记技术重复性好并且准确度高<sup>[17,18]</sup>。叶绿体基因通过母系遗传给后代, 结构简单、分子量小、序列保守, 因此广泛用于中药材种质资源鉴定<sup>[19,20]</sup>及系统进化分析<sup>[21-23]</sup>。叶绿体基因 *matK* 具有分子质量小、序列和结构保守性强、进化速率快等特点, 常被应用于中药材分子鉴定<sup>[24]</sup>及亲缘性研究<sup>[25]</sup>。如 *matK* 基因作为石斛属系统进化关系及亲缘关系分析具有更高的遗传多样<sup>[24]</sup>。课题组前期研究结果表明 *matK* 基因能够鉴别大黄的真伪<sup>[9]</sup>, 及不同产地野生型和栽培型大黄的种质, 因此可以利用 *matK*

基因实现对市场销售的大黄进行种质资源鉴别, 并推断其产地来源。

大黄临床应用范围广, 组方中包含有大黄的中成药有 868 种, 如防风通圣丸、牛黄上清丸等, 均配有大黄药材, 大黄的质量直接关系到中药处方和制剂的临床疗效。大黄的质量与大黄的有效成分息息相关, 《中华人民共和国药典》(2020 版) 中明确规定大黄药材中总蒽醌含量应不低于 2.0%, 游离蒽醌含量应不低于 0.2%。因此, 检测市场销售大黄的总蒽醌和游离蒽醌的含量有利于确定大黄药材的质量, 确保大黄临床疗效。本研究从 27 省 40 市收集 89 份大黄市场样品, 通过检测 *matK* 基因型确定市售样品的基原、种质, 判断其产地, 通过 UPLC 检测市售大黄样品的总蒽醌和游离蒽醌含量, 确定大黄质量, 为后续指导大黄市场样品流通及大黄临床用药奠定基础, 同时也对其他多基原、多种质的中药材的市场样品检测及科学合理临床用药具有重要指导意义。

## 材料与amp;方法

**材料** 本研究样本于 2020 年 11 月至 2021 年 5 月从全国 27 省 40 市收集 89 份市售大黄饮片, 将其粉碎, 过 6 号筛, 样品信息见表 1。植物基因组提取试剂盒 (Vazyme, 中国), 产物纯化试剂盒 (Vazyme, 中国), Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa), 琼脂糖 (Biowest Agrose, 西班牙), 核酸 Marker 和核酸染料购自北京拜尔迪生物科技有限公司, 芦荟大黄素对照品 (T28D6F8264)、大黄酸对照品 (F27J7S18516)、大黄素对照品 (T17A10F95418)、大黄酚对照品 (T23A8F42188)、大黄素甲醚对照品 (T18O10F100404) (上海源叶生物科技

有限公司), *matK* 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

**仪器** 冷冻高速离心机 (TGL-16, 湘仪离心机仪器有限公司), 粉碎机 (BJ-150, 拜杰多功能粉碎机), 电热恒温水浴锅 (HH-S4A, 北京科伟永兴仪器有限公司), 涡旋器 (GL-88B, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 超高效液相 (岛津 SPD-M40), 色谱柱 (Waters, 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 超声波清洗机 (GW1030, 深圳市冠博科技实业有限公司), 电子天平 (PL602E, METTLER TOLEDO), 凝胶成像仪 (WD-9413B, 北京六一生物科技有限公司), 电泳仪 (JY300E, 北京君意东方电泳设备有限公司), 超微量分光光度计 (NanoDrop, Thermo Fisher), PCR 仪 (T100, Bio-Rad)。

**DNA 提取与检测** 按照植物 DNA 提取试剂盒 (Vazyme, 中国) 实验操作步骤进行 DNA 提取, 利用 NanoDrop 检测 DNA 浓度, 同时利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性和质量。

**PCR 扩增与测序** 本研究根据大黄 *matK* 片段设计特异性引物 *matK*-F: ATGGAGGAATTCCAAGGATATT TAG, *matK*-R: ATAATTATGACTGGCCAAATCATAA,

并对 89 份样品进行 PCR 扩增。扩增体系为 DNA 1 μL、10×Taq buffer 5 μL、dNTP Mix (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 4 μL、rTaq (2.5 U·μL<sup>-1</sup>) 1 μL、0.1% BSA 1 μL、10 μmol primer 各 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 补足至终体积 50 μL。扩增程序: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 50 s, 72 °C 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸反应 10 min, 4 °C 保存。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 目的片段回收和纯化按照胶回收试剂盒说明书进行。回收产物送北京六合华大基因科技有限公司测序。

**对照品溶液制备** 分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品, 依次为 1.88、1.66、1.25、3.55 和 0.95 mg, 加纯甲醇溶液超声使之充分溶解, 分别定容至 10 mL 量瓶中, 备用; 将上述溶液作为对照品贮备溶液, 置于 4 °C 冰箱中备用。

**供试品溶液制备** 市售大黄饮片游离蒽醌和总蒽醌提取参考<sup>[26,27]</sup>等方法。取市售大黄粉末 1.0 g, 精密称定, 置具 50 mL 塞锥形瓶中, 加入 45 mL 甲醇, 称定质量。超声处理 30 min, 放至室温, 加甲醇补足质量, 摇匀, 过滤, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 作为游离蒽醌供试品溶液。取市售大黄粉末 0.1 g, 精密称定,

**Table 1** Sample list

No.	Province	No.	Province	No.	Province
1	Baishan, Jilin	31	Chengdu, Sichuan	61	Liuan, Anhui
2	Baoji, Shaanxi	32	Chengdu, Sichuan	62	Nantong, Jiangsu
3	Bayannaocer, Neimenggu	33	Chengdu, Sichuan	63	Qingdao, Shandong
4	Beijing	34	Chengdu, Sichuan	64	Qingyang, Gansu
5	Beijing	35	Chengdu, Sichuan	65	Sanming, Fujian
6	Beijing	36	Chengdu, Sichuan	66	Sanming, Fujian
7	Beijing	37	Chifeng, Neimenggu	67	Shenyang, Liaoning
8	Beijing	38	Chongqing	68	Shenyang, Liaoning
9	Beijing	39	Chuxiong, Yunnan	69	Shenyang, Liaoning
10	Beijing	40	Dalian, Liaoning	70	Shijiazhuang, Hebei
11	Beijing	41	Ganzhou, Jiangxi	71	Shijiazhuang, Hebei
12	Beijing	42	Guangzhou, Guangdong	72	Tangshan, Hebei
13	Beijing	43	Guiyang, Guizhou	73	Tianjin
14	Beijing	44	Guiyang, Guizhou	74	Tianjin
15	Beijing	45	Guiyang, Guizhou	75	Xining, Qinghai
16	Bozhou, Anhui	46	Guiyang, Guizhou	76	Xinxiang, Henan
17	Bozhou, Anhui	47	Guiyang, Guizhou	77	Xinxiang, Henan
18	Bozhou, Anhui	48	Guiyang, Guizhou	78	Xinxiang, Henan
19	Bozhou, Anhui	49	Guiyang, Guizhou	79	Yichun, Jiangxi
20	Bozhou, Anhui	50	Haerbin, Heilongjiang	80	Yichun, Jiangxi
21	Bozhou, Anhui	51	Haerbin, Heilongjiang	81	Yinchuan, Ningxia
22	Bozhou, Anhui	52	Haerbin, Heilongjiang	82	Yulin, Guangxi
23	Bozhou, Anhui	53	Haerbin, Heilongjiang	83	Yulin, Shaanxi
24	Bozhou, Anhui	54	Haikou, Hainan	84	Yuncheng, Shanxi
25	Changchun, Jilin	55	Huichun, Jilin	85	Yuncheng, Shanxi
26	Changchun, Jilin	56	Jieyang, Guangdong	86	Zhengzhou, Henan
27	Changchun, Jilin	57	Kashi, Xinjiang	87	Zhengzhou, Henan
28	Changge, Henan	58	Kashi, Xinjiang	88	Zibo, Shandong
29	Changsha, Hunan	59	Kunming, Yunnan	89	Zibo, Shandong
30	Chengdu, Sichuan	60	Kunming, Yunnan		

置 100 mL 量瓶中, 加入约 99 mL 甲醇, 超声提取 0.5 h, 放至室温, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过。取续滤液 15 mL 置圆底烧瓶中, 加盐酸 0.8 mL, 80 °C 水浴加热回流 30 min, 放至室温, 加 10% NaOH 溶液 3 mL 调节 pH 值为 3~4, 摇匀, 转移至 25 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度线, 摇匀, 过滤, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 作为总蒽醌供试品溶液。

**色谱条件** 采用 UPLC 进行含量测定, 总蒽醌 UPLC 条件: 岛津 SPD-M40 (日本), 色谱柱为 Waters Acquity UPLC® BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸水 (B) 梯度洗脱。洗脱条件为 0 min 97% B, 1.5 min 97% B, 3 min 96% B, 5 min 95% B, 8 min 90% B, 14 min 85% B, 18 min 75% B, 20 min 64% B, 25 min 40% B, 40 min 40% B; 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 254 nm; 柱温 40 °C。游离蒽醌 UPLC 条件: 岛津 SPD-M40 (日本), 色谱柱为 Waters Acquity UPLC® BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸水 (B) 梯度洗脱。洗脱条件为 0 min 64% B, 3 min 45% B, 5 min 41% B, 6 min 40% B, 10 min 40% B; 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 254 nm; 柱温 40 °C。

**序列分析及数据处理** 采用 ContingExpress 校对拼接, 去除低质量序列及引物区。用 DNAMAN 软件将测序得到的 *matK* 序列与文献中大黄序列进行碱基分析, 获得市场大黄饮片基因型信息, 并根据基因型判断

市场大黄饮片基原。以本研究收集的大黄饮片为材料, 采用 MEGA X 软件中的 K2P (kimura2-parameter) 模型计算不同种间和种内的遗传距离, 生成距离矩阵以及构建基因型 NJ 树。采取 SPSS 19.0 统计软件中的单因素分析比较采集地与总蒽醌和游离蒽醌的相关性以及单倍型与总蒽醌和游离蒽醌的相关性。

## 结果与分析

### 1 市售大黄样品的收集

本实验收集 27 个省 40 个市 89 份市场销售大黄, 样品信息见表 1, 其中北京市 12 份样品, 安徽省 10 份样品, 四川省和贵州省各 7 份样品, 河南省 6 份样品, 吉林省 5 份样品, 辽宁省和黑龙江省各 4 份样品, 云南省、江西省、河北省和山东省各 3 份样品, 内蒙古自治区、新疆维吾尔自治区、陕西省、广东省、天津市、福建省和山西省各 2 份样品, 重庆市、湖南省、海南省、江苏省、甘肃省、青海省、宁夏回族自治区和广西壮族自治区各 1 份样品。

### 2 市售大黄 DNA 条形码 *matK* 基因的扩增

成功提取 89 份市售大黄样品 DNA, DNA 浓度是 33.2~107.0 ng·μL<sup>-1</sup>, 具体结果如图 1 所示; 以提取的 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *matK* 基因, 89 份样品中都扩增到了 1 500 bp 的片段, 具体结果如图 2 所示。PCR 产物经纯化后进行双向测序, 测序结果经拼接后, 通过与 NCBI 中大黄 *matK* 序列 (AB115669) 进行比对, 确定

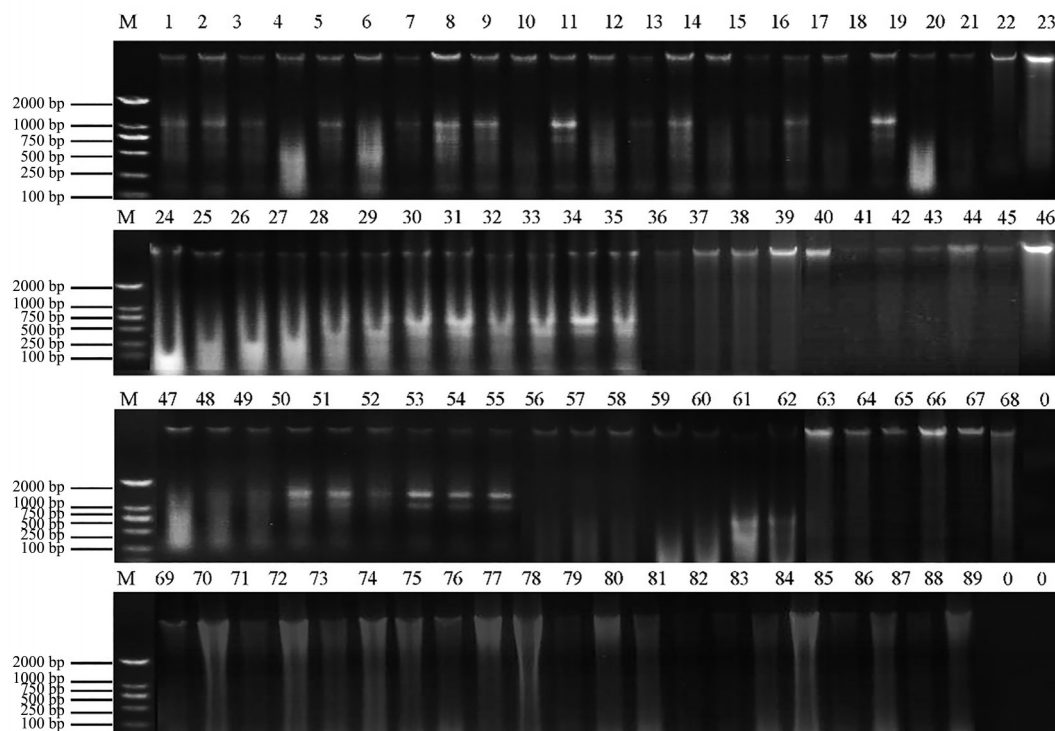


Figure 1 Genomic DNA of the commercial Rheum samples (M: DL2000)

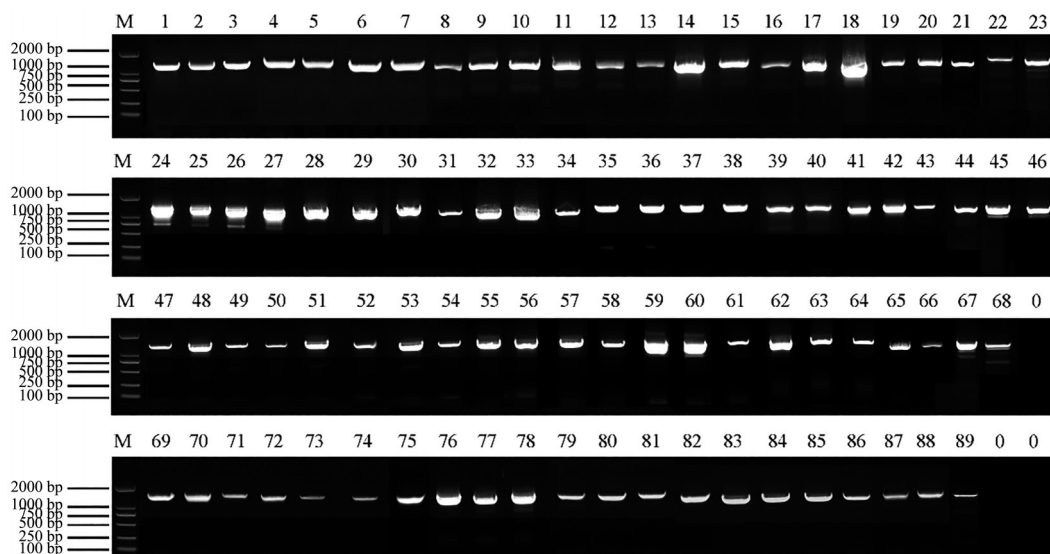


Figure 2 PCR amplification results of *matK* sequence of the commercial Rheum samples (M: DL2000)

其为大黄 *matK* 基因序列。

### 3 市售大黄 DNA 条形码比对结果

本课题组前期研究结果表明, 目前检测的中国地区的大黄正品及伪品共 41 个单倍型, 3 个基原的大黄共 29 个单倍型 (基因型), 其中药用大黄 5 个、掌叶大黄 16 个、唐古特大黄 8 个。本研究 89 份市场样品均为正品大黄, 而且均是掌叶大黄的单倍型, 共 8 个基因型, 分别为 Rp1、Rp2、Rp3、Rp4、Rp5、Rp6、Rp10 和 Rp12, 基因型序列变异位点见表 2, 其中基因型 Rp4 数量最多, 占总样本量 40.45%, 共 36 份, 其次是 Rp6, 共有 33 份, 占总样本量 37.08%; 基因型数量由高至低排列如下: Rp4 > Rp6 > Rp5 > Rp3 > Rp10 > Rp2 > Rp1 = Rp12 (图 3)。市售大黄中 Rp4 基因型分布在 18 个省, 占全国

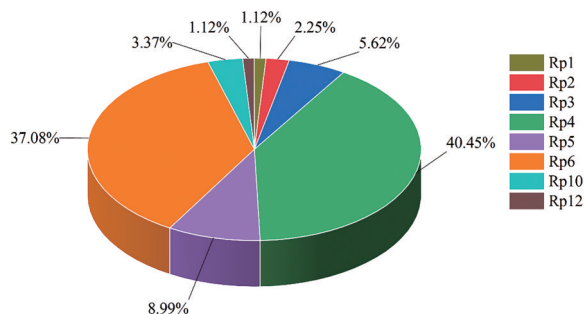


Figure 3 Proportion of each haplotype in the total

省级行政区的 52.94%, 包括北京市、广东省、云南省、河南省、吉林省、福建省、内蒙古自治区、贵州省、湖南省、山西省、广西壮族自治区、黑龙江省、辽宁省、新疆维吾尔自治区、安徽省、江西省、江苏省和山东省; 以前

Table 2 Comparison of the *matK* gene sequence among 89 commercial specimens of Rheum species. \*Base in this site is the same as that in the first row. (-) denotes alignment gaps

Species	Sample No.	Variable site/bp															Genotype type					
		1	3	4	5	6	6	7	7	7	7	7	8	8	8	8		0	1	1	1	1
<i>Rheum palmatum</i>	59	G	C	T	G	A	C	C	C	A	T	C	A	C	G	C	T	C	C	G	Rp1	
	20,36	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	Rp2	
	15,34,43,48,81	*	*	A	*	*	*	A	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	Rp3	
	1,3,4,5,6,7,9,10,13,16,17,25,26,29,37,39,40,42,47,49,52,57,61,62,65,66,68,76,77,78,80,82,84,85,87,89	*	*	A	A	C	*	A	*	*	G	*	C	*	*	*	*	*	*	T	A	Rp4
	8,22,30,56,64,75,83,86	*	*	A	*	C	*	A	*	*	G	*	C	*	*	*	*	*	*	*	Rp5	
	2,11,12,14,19,21,23,24,27,28,31,33,35,41,44,45,46,50,51,53,54,55,58,60,67,69,70,71,72,73,74,79,88	A	*	A	*	C	*	A	*	*	G	*	C	*	*	*	C	*	*	*	Rp6	
	18,32,63	*	*	A	*	C	*	A	*	*	G	*	C	A	*	T	*	*	*	*	Rp10	
	38	*	*	A	*	*	*	A	*	*	G	*	C	A	*	T	*	*	*	*	Rp12	

的研究结果表明 Rp4 基因型来自甘肃省、云南省和宁夏回族自治区, 其中云南省和甘肃省为栽培大黄, 宁夏回族自治区为野生大黄; 说明来自甘肃、云南的栽培大黄和来自宁夏的野生大黄可能销售到全国 18 个省份。Rp6 基因型分布 16 个省份, 占全国省级行政区的 47.06%, 包括北京市、辽宁省、四川省、安徽省、云南省、吉林省、黑龙江省、天津市、新疆维吾尔自治区、河北省、河南省、贵州省、海南省、陕西省、山东省和江西省, 课题组前期研究结果表明 Rp6 基因型来自四川省的栽培大黄; 说明四川的栽培大黄销售到全国 16 个省份。以上结果表明, 市售大黄饮片的基因型比较集中, 来源地也相对集中。

#### 4 市售大黄饮片基因型系统进化及遗传距离分析

采用 MEGA X 将市售大黄 8 个 *matK* 基因型序列构建进化树。从进化树可以看出 8 个基因型共分成两个大支, 其中 Rp10 和 Rp12 聚为一大支, 支持率为 76%; Rp1、Rp2、Rp3、Rp4、Rp5 和 Rp6 聚为另一大支 (图 4)。对获得的 8 个基因型进行种内遗传距离分析, 8 个基因型平均遗传距离为 0.004, 遗传距离在 0.001~0.010 之间, 最大遗传距离为 0.010, 发生在 Rp10 和 Rp1 之间, 最小遗传距离为 0.001, 发生在 Rp2 和 Rp3 之间 (表 3)。此外, 研究发现市售大黄饮片主要流通的 Rp4 和 Rp6 基因型聚在一小支上, 支持率为 56%, 其遗传距离为 0.003, 表明 2 个基因型亲缘关系较近。

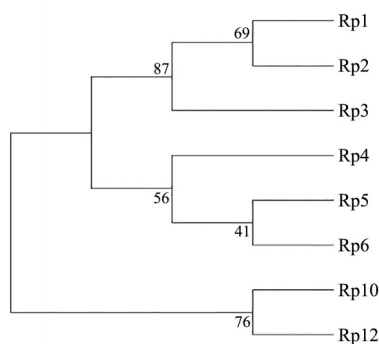


Figure 4 Phylogenetic tree constructed using NJ method based on 8 chloroplast *matK* gene sequences

Table 3 The intraspecific genetic distances between 8 chloroplast *matK* gene sequences

<i>R. palmatum</i>	Intraspecific genetic distance							Intraspecific genetic distance (mean)
	1	2	3	4	5	6	7	
Rp1								
Rp2	0.002							
Rp3	0.002	0.001						
Rp4	0.006	0.004	0.003					
Rp5	0.004	0.002	0.002	0.002				
Rp6	0.006	0.004	0.003	0.003	0.002			
Rp10	0.010	0.008	0.007	0.007	0.006	0.007		
Rp12	0.005	0.003	0.002	0.004	0.002	0.004	0.005	

#### 5 市售大黄饮片采集地含量及基因型含量分析

采用 UPLC 对大黄中游离蒽醌和总蒽醌成分 (芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚) 进行线性关系考察 (图 5、6, 表 4、5), 结果表明游离蒽醌和总蒽醌成分相关系数  $R^2$  符合分析要求。采用该方法对 89 份市售大黄饮片进行游离蒽醌和总蒽醌含量测定, 结果表明 89 份样品中 83 份市售大黄饮片总蒽醌和游离蒽醌含量符合药典标准, 合格率为 93.26%, 其中辽宁省、内蒙古自治区、黑龙江省、广西壮族自治区和陕西省大黄饮片存在总蒽醌含量不合格情况, 北京市、

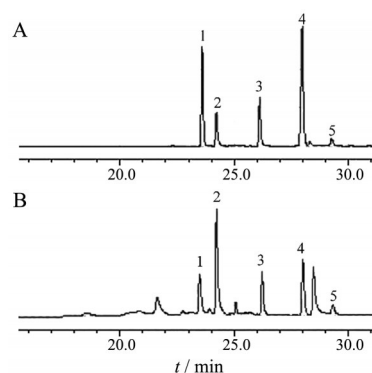


Figure 5 Free anthraquinone UPLC of mixed reference substances (A) and sample (B). 1: Aloe-emodin; 2: Rhein; 3: Emodin; 4: Chrysophanol; 5: Physcion

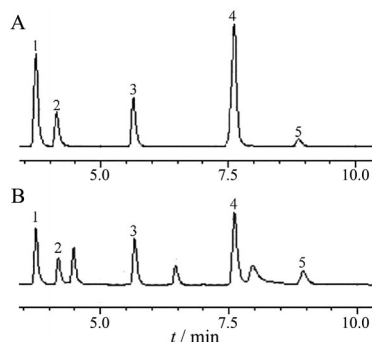


Figure 6 Total anthraquinone UPLC of mixed reference substances (A) and sample (B). 1: Aloe-emodin; 2: Rhein; 3: Emodin; 4: Chrysophanol; 5: Physcion

**Table 4** Regression equations of free anthraquinone

Compd.	Regression equation	$R^2$
Aloe-emodin	$y = 15\ 659\ 262.663\ 1x + 101\ 684.884\ 2$	0.999 7
Rhein	$y = 7\ 020\ 849.301\ 7x - 2\ 872.391\ 2$	0.999 9
Emodin	$y = 12\ 387\ 879.266\ 9x + 32\ 007.372\ 8$	0.999 9
Chrysophanol	$y = 13\ 257\ 038.455\ 2x + 52\ 023.627\ 8$	1.000 0
Physcion	$y = 3\ 652\ 156.894\ 8x + 97\ 584.840\ 1$	0.999 1

**Table 5** Regression equations of total anthraquinone

Compd.	Regression equation	$R^2$
Aloe-emodin	$y = 15\ 503\ 230.514\ 6x - 15\ 467.663\ 4$	1.000 0
Rhein	$y = 6\ 986\ 119.268\ 3x + 6\ 708.475\ 8$	0.999 3
Emodin	$y = 12\ 659\ 622.823\ 2x - 19\ 162.199\ 9$	1.000 0
Chrysophanol	$y = 13\ 912\ 884.710\ 9x - 68\ 986.647\ 7$	0.999 9
Physcion	$y = 3\ 499\ 359.079\ 7x + 69\ 196.113\ 3$	0.998 9

**Table 6** The total anthraquinone content and free anthraquinone content of commercial specimens

Sample No.	Province	Code No.	Total anthraquinone content/%	Free anthraquinone content/%
1	Baishan, Jilin	RP4	2.25%	0.59%
2	Baoji, Shaanxi	RP6	3.22%	0.45%
3	Bayannaoer, Neimenggu	RP4	3.49%	0.55%
4	Beijing	RP4	4.54%	1.10%
5	Beijing	RP4	3.26%	0.75%
6	Beijing	RP4	3.83%	0.72%
7	Beijing	RP4	3.61%	0.67%
8	Beijing	RP5	2.93%	0.55%
9	Beijing	RP4	2.15%	0.48%
10	Beijing	RP4	3.86%	0.47%
11	Beijing	RP6	3.58%	0.47%
12	Beijing	RP6	3.56%	0.38%
13	Beijing	RP4	2.96%	0.36%
14	Beijing	RP6	3.21%	0.26%
15	Beijing	RP3	3.89%	0.09%
16	Bozhou, Anhui	RP4	2.81%	0.63%
17	Bozhou, Anhui	RP4	2.53%	0.47%
18	Bozhou, Anhui	RP10	2.43%	0.35%
19	Bozhou, Anhui	RP6	5.03%	0.31%
20	Bozhou, Anhui	RP2	3.64%	0.27%
21	Bozhou, Anhui	RP6	2.82%	0.26%
22	Bozhou, Anhui	RP5	2.43%	0.21%
23	Bozhou, Anhui	RP6	3.22%	0.18%
24	Bozhou, Anhui	RP6	2.85%	0.13%
25	Changchun, Jilin	RP4	3.90%	0.65%
26	Changchun, Jilin	RP4	3.02%	0.64%
27	Changchun, Jilin	RP6	2.85%	0.29%
28	Changege, Henan	RP6	2.70%	0.38%
29	Changsha, Hunan	RP4	2.49%	0.41%
30	Chengdu, Sichuan	RP5	2.22%	0.73%
31	Chengdu, Sichuan	RP6	3.42%	0.57%
32	Chengdu, Sichuan	RP10	2.59%	0.54%
33	Chengdu, Sichuan	RP6	3.39%	0.40%
34	Chengdu, Sichuan	RP3	3.18%	0.30%
35	Chengdu, Sichuan	RP6	2.55%	0.21%
36	Chengdu, Sichuan	RP2	2.86%	0.20%
37	Chifeng, Neimenggu	RP4	1.45%	0.28%
38	Chongqing	RP12	3.31%	0.21%
39	Chuxiong, Yunnan	RP4	3.43%	0.10%
40	Dalian, Liaoning	RP4	2.61%	0.59%
41	Ganzhou, Jiangxi	RP6	3.60%	0.48%

云南省、安徽省、宁夏回族自治区和辽宁省大黄饮片存在游离蒽醌含量不合格情况(表6)。市售大黄中总蒽醌的含量为1.27%~5.06%，总蒽醌含量最高的省份是海南省，平均值为4.59%，含量最低的省份是广西壮族自治区，平均值为1.98%；市售大黄样品的游离蒽醌含量为1.10%~0.09%。游离蒽醌含量最高的省份为甘肃省，平均值为0.81%，含量最低的省份为宁夏回族自治区，平均值为0.19% (图7)，这些结果表明市售大黄样品总蒽醌和游离蒽醌含量参差不齐。实验采用SPSS 19.0对采集省份的市售大黄游离蒽醌和总蒽醌含量进行相关性分析，发现各采集省份之间的市售大黄游离蒽醌和总蒽醌含量无显著性差别。对市售大黄8个基

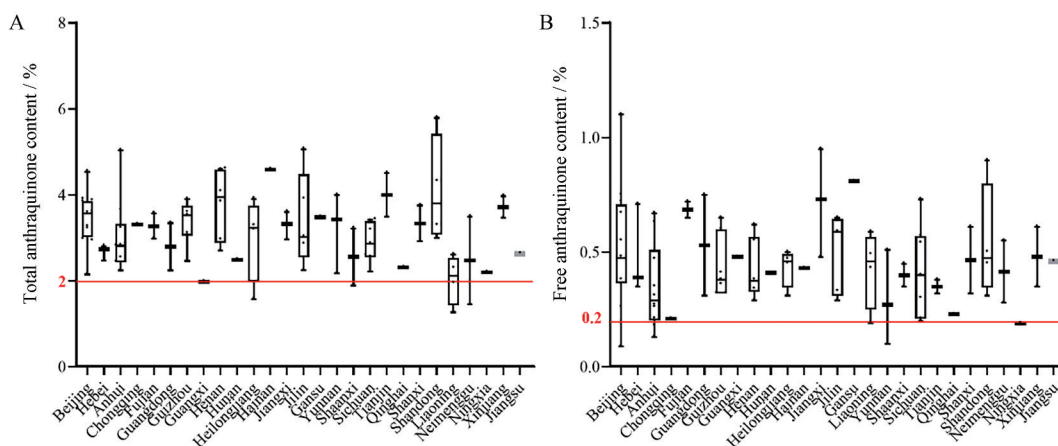
Continued

Sample No.	Province	Code No.	Total anthraquinone content/%	Free anthraquinone content/%
42	Guangzhou, Guangdong	RP4	2.24%	0.75%
43	Guiyang, Guizhou	RP3	3.52%	0.65%
44	Guiyang, Guizhou	RP6	2.46%	0.60%
45	Guiyang, Guizhou	RP6	3.10%	0.41%
46	Guiyang, Guizhou	RP6	3.75%	0.38%
47	Guiyang, Guizhou	RP4	3.05%	0.36%
48	Guiyang, Guizhou	RP3	3.90%	0.32%
49	Guiyang, Guizhou	RP4	3.59%	0.32%
50	Haerbin, Heilongjiang	RP6	3.28%	0.50%
51	Haerbin, Heilongjiang	RP6	3.91%	0.47%
52	Haerbin, Heilongjiang	RP4	1.57%	0.45%
53	Haerbin, Heilongjiang	RP6	3.18%	0.31%
54	Haikou, Hainan	RP6	4.59%	0.43%
55	Huichun, Jilin	RP6	5.06%	0.33%
56	Jieyang, Guangdong	RP5	3.34%	0.31%
57	Kashi, Xinjiang	RP4	3.46%	0.61%
58	Kashi, Xinjiang	RP6	3.97%	0.35%
59	Kunming, Yunnan	RP1	3.99%	0.51%
60	Kunming, Yunnan	RP6	2.17%	0.27%
61	Liuan, Anhui	RP4	2.24%	0.67%
62	Nantong, Jiangsu	RP4	2.63%	0.46%
63	Qingdao, Shandong	RP10	3.29%	0.50%
64	Qingyang, Gansu	RP5	3.48%	0.81%
65	Sanming, Fujian	RP4	2.98%	0.72%
66	Sanming, Fujian	RP4	3.57%	0.65%
67	Shenyang, Liaoning	RP6	1.94%	0.49%
68	Shenyang, Liaoning	RP4	2.29%	0.43%
69	Shenyang, Liaoning	RP6	1.27%	0.19%
70	Shijiazhuang, Hebei	RP6	2.73%	0.39%
71	Shijiazhuang, Hebei	RP6	2.81%	0.35%
72	Tangshan, Hebei	RP6	2.47%	0.71%
73	Tianjin	RP6	3.49%	0.38%
74	Tianjin	RP6	4.50%	0.32%
75	Xining, Qinghai	RP5	2.31%	0.23%
76	Xinxiang, Henan	RP4	4.60%	0.62%
77	Xinxiang, Henan	RP4	3.83%	0.55%
78	Xinxiang, Henan	RP4	4.07%	0.29%
79	Yichun, Jiangxi	RP6	3.32%	0.95%
80	Yichun, Jiangxi	RP4	2.97%	0.73%
81	Yinchuan, Ningxia	RP3	2.20%	0.19%
82	Yulin, Guangxi	RP4	1.98%	0.48%
83	Yulin, Shaanxi	RP5	1.89%	0.35%
84	Yuncheng, Shanxi	RP4	2.92%	0.61%
85	Yuncheng, Shanxi	RP4	3.75%	0.32%
86	Zhengzhou, Henan	RP5	2.95%	0.37%
87	Zhengzhou, Henan	RP4	4.58%	0.34%
88	Zibo, Shandong	RP6	4.31%	0.45%
89	Zibo, Shandong	RP4	3.00%	0.31%

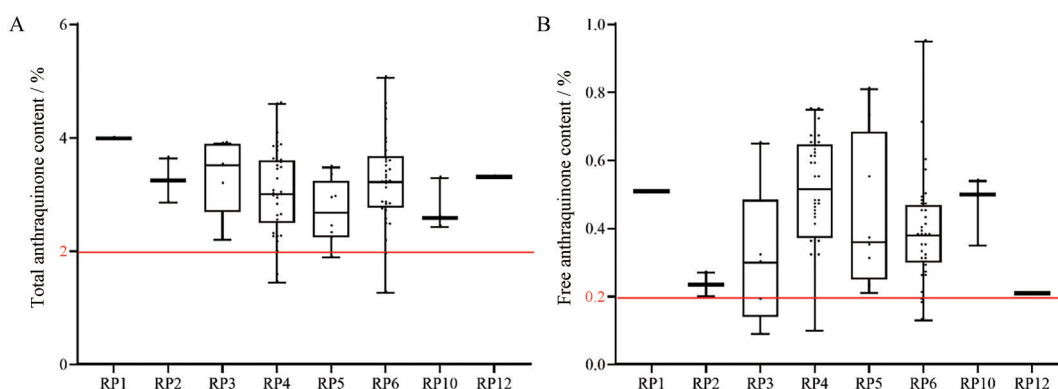
因型的总蒽醌含量和游离蒽醌含量进行相关性分析, 总蒽醌含量最高的基因型为Rp1, 含量最低的基因型为Rp10; 游离蒽醌含量最高的基因型为Rp4, 含量最低的基因型为Rp12 (图8); 采用SPSS 19.0对各基因型大黄中总蒽醌和游离蒽醌含量进行相关性分析, 结果表明各基因型间大黄总蒽醌和游离蒽醌含量无显著性差别。

## 讨论

2020版《中华人民共和国药典》规定正品来源是掌叶大黄、唐古特大黄和药用大黄, 因此大黄是多基原药材<sup>[2]</sup>, 有文献表明不同基原药材的药理活性不同<sup>[12,16]</sup>, 对市场上大黄的种质资源鉴定对指导临床上合理用药尤为重要。传统的药材鉴定方法无法实现对药材基原及种质的鉴别<sup>[9]</sup>。近年来, 基于DNA序列标



**Figure 7** Content determination of the 89 commercial Rheum samples. A: Total anthraquinone content; B: Free anthraquinone content. Red line: Standards of Pharmacopoeia of the People's Republic of China



**Figure 8** Content determination of the 8 haplotype (A: Total anthraquinone content; B: Free anthraquinone content). Red line: Standards of Pharmacopoeia of the People's Republic of China

记的中药材分子鉴定技术在中药鉴定领域得到了广泛的应用<sup>[9]</sup>。其中叶绿体基因 *matK*、*trnH/trnL* 等基因和核基因 ITS<sup>[18]</sup> 序列常用于中药材分子鉴定, 目前的研究表明 *matK* 在大黄正品及伪品鉴别、基原鉴定、种质资源鉴别过程中起到重要的作用<sup>[28,29]</sup>。但是由于大黄是多炮制的药材, 炮制后的大黄 DNA 样品不易提取, PCR 片段不易扩增等原因, 对大黄市场样品的种质资源的鉴定目前还未见报道。本研究首次从全国 27 省 40 市收集 89 份药材提取的 DNA 样品中扩增到 *matK* 基因的全长并进行序列分析, 令人惊奇的是, 89 份来自不同省市的大黄市售样品都是同一基原, 为掌叶大黄, 共发现掌叶大黄的 8 个单倍型, 其中 *Rp4* 和 *Rp6* 基因型数量为 36 份和 33 份, 占样品总体 40.45% 和 37.08%; 以前的研究表明 *Rp4* 基因型主要来源于云南省、甘肃省和宁夏回族自治区, 其中云南和甘肃省的大黄是栽培大黄, 宁夏回族自治区为野生大黄, *Rp6* 基因型主要是四川省的栽培大黄<sup>[9]</sup>, 进化树和遗传距离分析结果表明 *RP4* 和 *RP6* 的基因型亲缘关系比较接

近, 遗传距离较小; 这些实验结果表明市售大黄饮片的基原较单一, 基因型集中, 大部分可能是人工栽培的掌叶大黄。

中药质量与中药处方和制剂的临床疗效和安全息息相关, 中药的质量主要是由中药的活性成分决定的<sup>[30]</sup>。如现代药理学研究表明大黄结合蒽醌具有致泻作用<sup>[13]</sup>, 游离蒽醌具有抑菌抗炎等功效<sup>[15]</sup>。《中华人民共和国药典》(2020 版) 明确规定大黄中总蒽醌的含量应不低于 2.0%, 游离蒽醌的含量应不低于 0.2%; 王红娟等<sup>[31]</sup>利用紫外-可见分光光度测定不同产地大黄中游离蒽醌结合蒽醌含量, 发现不同产地大黄中结合蒽醌成分含量范围为 7.38%~6.15%; 游离蒽醌成分含量为 0.563%~0.668%; 已有文献报道掌叶大黄和唐古特大黄质量较好, 药用大黄质量较差, 产地不同, 大黄的质量差异也比较大<sup>[32]</sup>, 但是目前对市售大黄的质量研究比较少。本研究利用 UPLC 对市售样品的总蒽醌和游离蒽醌进行测定, 结果表明有 83 份样品中总蒽醌和游离蒽醌含量符合药典规定; 但是样品间总蒽醌含量

和游离蒽醌的含量差异显著, 样品中游离蒽醌最高含量是 1.10%, 最低含量是 0.09%, 相差 1.01%; 总蒽醌含量最高为 5.06%, 最低为 1.27%, 相差 3.79%; 同时对不同采集省份的市售大黄样品的总蒽醌和游离蒽醌含量进行分析, 结果表明相同采集省份的大黄的总蒽醌和游离蒽醌的含量差异比较大, 导致地区之间没有显著性差异。对不同基因型的大黄市售样品的总蒽醌和游离蒽醌含量进行分析, 结果表明相同基因型的样品之间差异比较大, 如 RP4 和 RP6 收集的样品中, 总蒽醌最高含量是 5.06%, 最低含量是 1.27%; 游离蒽醌最高含量是 1.10%, 最低含量是 0.10%; 总蒽醌和游离蒽醌含量差异最大的基因型均是 Rp4, 但是基因型之间的市售大黄的总蒽醌和游离蒽醌含量没有显著性差异。这些结果表明大部分市场销售的大黄质量符合《中华人民共和国药典》的要求, 但是样品质量参差不齐, 采集地区和基因型与大黄的质量关联性不强。本研究为后续指导大黄的市场流通和科学合理的临床用药具有重要意义。

**作者贡献:** 满金辉负责 *matK* 基因的扩增、序列分析和数分析; 石玥负责市场大黄样品中总蒽醌和游离蒽醌含量检测、数据分析和论文初步撰写; 张靖晗、张志飞、尹光耀负责市场大黄样品打粉、DNA 提取; 王馨、刘凤波和张媛负责全国各地样品的收集; 王晓晖和魏胜利负责设计论文的实验思路, 指导学生实验, 论文撰写及修改。

**利益冲突:** 无相关利益冲突。

## References

- [1] Li RJ, Xin TY, Song LK, et al. Research progress in original species identification in industry chain of Rhei Radix et Rhizoma [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 1060-1066.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [3] Lee JC, Tseng CK, Wu SF, et al. San-Huang-Xie-Xin-Tang extract suppresses hepatitis C virus replication and virus-induced cyclooxygenase-2 expression [J]. J Viral Hepatitis, 2011, 18: 315-324.
- [4] Pan TL, Wang PW, Huang CH, et al. Herbal formula, Scutellariae radix and Rhei rhizoma attenuate dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in a rat model [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11734.
- [5] Shi YB, Li JC, Ren Y, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of emodin loaded nanoemulsion in rats [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2015, 30: 242-249.
- [6] Takizawa Y, Nishimura H, Morota T, et al. Pharmacokinetics of TJ-8117 (Onpi-to), a drug for renal failure (I): plasma concentration, distribution and excretion of [<sup>3</sup>H]-(-)-epicatechin 3-O-gallate in rats and dogs [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokin, 2004, 29: 91-101.
- [7] Lin YC, Lu J, Lim LC, et al. Berberine-induced haemolysis revisited: safety of *Rhizoma coptidis* and *Cortex phellodendri* in chronic haematological diseases [J]. Phytother Res, 2012, 26: 682-686.
- [8] Tu C, He Q, Zhou YY, et al. Metabolomic study on the hepatotoxic or hepatoprotective effects of rhubarb to normal or hepatic fibrosis rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1139-1147.
- [9] Zhang XQ, Liu CS, Yan XL, et al. Sequence analysis and identification of a chloroplast *matK* gene in Rhei Rhizoma from different botanical origins [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 1722-1728.
- [10] Tan P, Zhang HZ, Zhang Q, et al. Simultaneous determination of 10 anthraquinone derivatives in Rhei Radix et Rhizoma based on UPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 928-934.
- [11] Zhang C, Li L, Xiao YQ, et al. HPLC simultaneous determination of two anthraquinone-O-glucosides in different botanical origins of rhubarb [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2010, 30: 53-55.
- [12] Liu J, Liu CS, Wei SL. The review of medicinal constituents and pharmacological activities of Rhei Radix et rhizoma [C]//China Association of Traditional Chinese Medicine Tenth Identification of Chinese Academic Proceedings (中华中医药学会第十届中药鉴定学术会议论文集). Xi'an: China Association of Chinese Medicine, 2010: 374.
- [13] Fu YD, Zhang J, Liu Y, et al. Analysis on bidirectional regulation of purging and astringency about raw and steamed products of Rhei Radix et Rhizoma and their active components [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2019, 25: 127-132.
- [14] Takayama K, Tsutsumi H, Ishizu T, et al. The influence of rhein 8-O-β-D-glucopyranoside on the purgative action of sennoside a from rhubarb in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35: 2204-2208.
- [15] Chen YY, Tang YP, Chen JQ, et al. Research progress and utilization strategy on resource chemistry of Rhei Radix et Rhizoma [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 5170-5178.
- [16] Wang LX, Liu T, Hui LQ, et al. Study on antipyretic effect of rhubarb on rats and its antipyretic ingredients [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 1128-1134.
- [17] Xin TY, Hui Y, Luo K, et al. Stability and accuracy of the identification of Notopterygii Rhizoma et Radix using the ITS/ITS2 barcodes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1098-1105.
- [18] Luo K, Ma P, Yao H, et al. Identification of gentiana Macrophyllae Radix using the ITS2 barcodes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1710-1717.
- [19] Yang JP, Zhu ZL, Fan YJ, et al. Comparative plastomic analysis of three *Bulbophyllum* medicinal plants and its significance in species identification [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55:

- 2736-2745.
- [20] Wu X, Jiang M, Chen HM, et al. Comparative analysis of three complete chloroplast genomes of *Inula* genus with phylogenetic analysis of 49 plants from Carduoideae [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 288-295.
- [21] Wu LW, Cui YX, Nie LP, et al. The characteristics of complete chloroplast genome sequence and phylogenetic analysis of *Dendrobium moniliforme* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1056-1066.
- [22] Zhang MY, Wang XF, Gao J, et al. Complete chloroplast genome of *Paeonia mairei* H. Lév.: characterization and phylogeny [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 168-176.
- [23] Zhang MY, Zhang YQ, Li YM, et al. Complete plastid genomes of *Bupleurum chinense* DC. and *B. boissieuianum* H. Wolff, with comparative and phylogenetic analyses of medicinal *Bupleurum* species [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 618-629.
- [24] Liu J, He T, Chun Z. Analysis and authentication of chloroplast *matK* gene sequences of *Herba Dendrobii* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 1051-1055.
- [25] Liu YP, Cao H, Han GR, et al. *matK* and its nucleotide sequencing of crude drug chuanxiong and phylogenetic relationship between their species from China and Japan [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 63-68.
- [26] Yan YG, Yin LM, Wang HY, et al. HPLC method for simultaneous determination of nine components from leaves of *Rheum officinale* by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 2360-2364.
- [27] Bian L, Dou ZH, Wang DD, et al. Improvement of determination method of total anthraquinone in *Rhei Radix et Rhizoma* in Pharmacopoeia of the People's Republic of China [J]. Int J Tradit Chin Med (国际中医中药杂志), 2021, 43: 156-160.
- [28] Yang DY, Fushimi H, Cai SQ, et al. Molecular analysis of *Rheum* species used as *Rhei Rhizoma* based on the chloroplast *matK* gene sequence and its application for identification [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27: 375-383.
- [29] Yang DY, Fushimi H, Cai SQ, et al. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and amplification refractory mutation system (ARMS) analyses of medicinally used *Rheum* species and their application for identification of *Rhei Rhizoma* [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27: 661-669.
- [30] Liu Y, Nie Q, Chen J. Suggestions to strengthen quality management of herbal decoction pieces—based on production chain of herbal decoction piece [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 3319-3322.
- [31] Wang HJ, Wang F, Lv XX, et al. Determination of free anthraquinone and bound anthraquinone in *Rhubarb* from different producing areas [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol (中国中医药科技), 2021, 28: 213-224.
- [32] Komatsu K, Nagayama Y, Tanaka K, et al. Comparative study of chemical constituents of *Rhubarb* from different origins [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54: 1491-1499.