

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.028

聚合酶链式反应法筛选龙胆栽培品最佳采收期*

吴艳蓉¹, 贾凌云^{2△}

(1. 辽宁省沈阳市肛肠医院药剂科, 辽宁 沈阳 110002; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 本溪 117004)

摘要:目的 应用聚合酶链式反应(PCR)法筛选龙胆栽培品,并依据龙胆苦苷含量确定其最佳采收期。方法 应用PCR法建立龙胆栽培品的种质标准,采用高效液相色谱(HPLC)法测定筛选出的龙胆栽培品中龙胆苦苷含量,并对不同采收季节和生长年限的龙胆栽培品中龙胆苦苷含量进行测定。结果 龙胆栽培品最佳采收季节为春秋两季,最佳生长年限为3年。结论 PCR法建立的种质标准可用于筛选龙胆栽培品;其主要有效成分龙胆苦苷含量高,可作为确定龙胆栽培品最佳采收期的合理依据。

关键词:龙胆栽培品;聚合酶链式反应法;最佳采收期;高效液相色谱法

中图分类号:R932;R282.4

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)09-0092-04

The Best Harvesting Time for Cultivated *Gentiana Scabra* Screened by PCR

WU Yanrong¹, JIA Lingyun²

(1. Department of Pharmacy, Shenyang Coloproctology Hospital, Shenyang, Liaoning, China 110002; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi, Liaoning, China 117004)

Abstract: Objective To apply the polymerase chain reaction(PCR)method to screen cultivated *Gentiana scabra* and study the best harvest time according to the content of gentiopicroside. **Methods** The germplasm standard of cultivated *Gentiana scabra* was established by PCR, and a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the study of gentiopicroside content in the selected was also established. The content of gentiopicroside in cultivated *Gentiana scabra* with different harvesting seasons and growing years was determined. **Results** Cultivated *Gentiana scabra* could be harvested in spring and autumn, and the best growing years were three years. **Conclusion** The germplasm standard established by PCR can be used to screen the cultivated *Gentiana scabra*. The high content of gentiopicroside should be taken as the reasonable basis to determine the best harvest time of cultivated *Gentiana scabra*.

Key words: cultivated *Gentiana scabra*; polymerase chain reaction method; the best harvest time; high-performance liquid chromatography

*基金项目:辽宁省中药资源普查项目[2018016]。

第一作者:吴艳蓉,女,硕士研究生,副主任中药师,研究方向为中药资源、中药质量控制、中药制剂质量控制与临床应用,(电子信箱)moxiang801009@126.com。

△通信作者:贾凌云,女,博士研究生,副教授,研究方向为中药质量评价及中药资源开发,(电子信箱)jialingyun2003@126.com。

导小鼠睡眠时间为指标考察酸枣仁复方提取工艺,结合工业生产的可行性,设计了不同醇体积分数、溶剂用量及提取时间对提取工艺的参数进行优化,确定其最佳提取工艺为水提取。这与传统提取方式一致(以水为溶剂),对生产设备及车间的安全要求相对较低,具有安全、无毒、生产成本低优点,若后续通过树脂分离纯化活性部位,可直接提取液上样,不需回收溶剂,树脂使用寿命长。为更好地控制复方质量,不同提取工艺对复方有效成分含量及其比例的影响仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 程晓卫,张须学. 酸枣仁功用古今谈[J]. 中医药管理杂志, 2006,14(11):66-68.
- [2] 张敏,高晓红,孙晓萌,等. 茯苓的药理作用及研究进展[J]. 北华大学学报,2008,9(1):63-68.
- [3] 林海成,祝洪艳,何忠梅,等. 正交试验优选酸枣仁总皂苷提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):42-45.
- [4] 王敏,沈冰冰,罗娟,等. 中药复方物质基础的研究现状[J]. 中国医药导报,2015,12(10):31-33.
- [5] 柯仲成,侯雪峰,邱辉辉,等. 基于组分结构理论等现代中药制剂发展思路探讨[J]. 中药材,2017,40(4):999-1002.
- [6] 邱婧然,王志祥,周黎明,等. 均匀设计优选白芷香豆素微波提取工艺[J]. 中医学报,2015,30(1):86-87.
- [7] 阎力君,洪涛,王福玲,等. 黄芪多糖水提工艺的优化及其体外抗肿瘤活性[J]. 中成药,2017,39(10):2045-2049.
- [8] 冯青云,周昌妮,陈书慧,等. 超临界CO₂萃取干姜的工艺优化[J]. 中国药房,2016,27(25):3552-3554.
- [9] 史万忠,徐德生,沈培芝,等. 补肾益精方水提物和醇提物化学指标及药效的比较研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(7):462-465.
- [10] 戴娅怡,袁拯忠,倪小芬. 酸枣仁汤化裁治疗失眠的中医证候分布特点及组方规律的文献分析[J]. 中华中医药学刊, 2010,28(10):2095-2097.
- [11] 朱晓钗,刘晓,汪小莉,等. 基于“生熟地增”论探讨酸枣仁炮制方法历史沿革及其镇静催眠作用物质基础[J]. 中药材, 2017,40(8):1991-1995.
- [12] 刘晟,吉红玉,王青,等. 酸枣仁的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药,2019,39(8):1004-1007.
- [13] 崔思娇,贾英,罗洁,等. 酸枣仁镇静催眠活性部位的筛选[J]. 中国药房,2013,24(23):2128-2129.
- [14] 李玉娟,王瑞,陈旻,等. 不同提取工艺酸枣仁汤的药效学研究[J]. 中药材,24(12):884-885.
- [15] 孙立梅,张雷. 酸枣仁水提取物的镇静催眠试验研究[J]. 吉林农业科技学院学报,2012,21(2):1-3.

(收稿日期:2019-10-10)

采收期是指中药材的采收时间,中药材的采收期对其有效成分含量、制剂质量、临床疗效等均有直接影响^[1]。龙胆始载于《神农本草经》,被列为中品。陶弘景曰:“……根状似牛膝,味甚苦,故以胆为名。”中药龙胆为龙胆科植物条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag.、龙胆 *Gentiana scabra* Bge.、三花龙胆 *Gentiana triflora* Pall. 或坚龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. 的干燥根和根茎^[2]。本研究中应用以聚合酶链式反应(PCR)为基础的分子标记技术,建立了辽宁省道地药材龙胆 *Gentiana scabra* Bge. 栽培品的种质标准,并确定了筛选的龙胆栽培品最佳采收期。现报道如下。

1 龙胆栽培品种质标准的建立

1.1 仪器与试剂

仪器:PTC100™ 型 PCR 仪(Programmable Thermal Controller MJ Research Inc USA);DYY-Ⅲ23A 型电泳槽,ECP3000 型三恒多用电泳仪(北京六一仪器厂);TGL-16G 型台式高速离心机(上海医用分析仪器总厂);UV755B 型紫外可见分光光度计(上海分析仪器总厂)。

试剂:十二烷基硫酸钠(SDS)提取缓冲液[100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA, pH 8.0), 50 mmol/L 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-HCl, pH 8.0), 0.5% SDS, 0.8% β-Me, dNTPs, 缓冲液(buffer)], Taq DNA 聚合酶, 随机扩增多态性 DNA (RAPD)随机引物, 溴化乙啶(EB), 均购自上海生物工程有限公司;DNA Maker 购自天根生化科技(北京)有限公司;蒸馏水为无菌重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。龙胆栽培品(共 5 批,产地均为辽宁省清原县);坚龙胆对照药材(批号为 120988-200403),龙胆对照药材(批号为 121530-201602),龙胆苦苷对照品(批号为 110770-201716),均购自中国食品药品检定研究院。

1.2 方法学考察

供试品提取溶剂的制备:分别采用 SDS 法、CTAB 法、高盐低 pH 法提取龙胆药材,将提取的总 DNA 溶液稀释后,用紫外可见分光光度计于 260 nm 及 280 nm 波长处测定吸光度(A)。结果 SDS 法最佳,详见表 1。

表 1 SDS 法提取紫外检测结果

药材	A ₂₆₀	A ₂₈₀	纯度
龙胆(栽培品)	0.025	0.016	1.56
龙胆(对照品)	0.033	0.021	1.57
坚龙胆(对照品)	0.042	0.027	1.56

模板、引物、酶用量对 RAPD 扩增的影响:结果见表 2。可见,确定 RAPD 扩增最佳条件为模板含量 28~30 ng,引物量 20 ng,酶用量 1.5~2.0 U,94℃ 预变性 3 min,94℃ 10 s,36℃ 35 s,72℃ 70 s,43 个循环,72℃ 保温 5 min^[3]。

表 2 模板、引物、酶用量考察结果

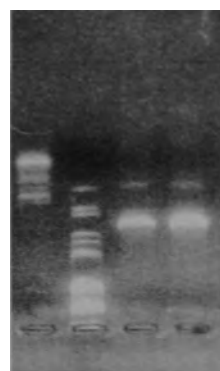
序号	模板含量(ng)	引物量(ng)	酶量(U)	结果
1	161~57.5	40~20	1.5~2.5	有 DNA 条带,条带间不清晰
2	30	20	1.5~2.0	有 DNA 条带,条带清晰
3	15	20	1.5~2.0	无 DNA

1.3 溶液制备

取 0.2 g 供试药材,置研钵,用液氮冷却,研成细粉,置 2 mL Eppendorf 管中,加入 400 μL SDS 提取缓冲液,56℃ 温浴 30 min,加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V/V)抽提,混匀,以 10 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,置另 1 支 2 mL Eppendorf 管中,用上述抽提液重复抽提,直至蛋白沉淀完全为止,吸取上清液,与 2 倍体积无水乙醇混匀^[3],于 -20℃ 放置 20 min,离心,得沉淀。用 70% 乙醇洗涤 2 次,干燥,溶于无菌重蒸馏水中,得供试品溶液。分别取坚龙胆及龙胆对照药材各 0.2 g,依法分别制成对照药材溶液。

1.4 DNA 扩增与检测结果

分别以供试品溶液及对照品溶液为模板,引物为 50 种 RAPD 随机引物,进行 RAPD 反应,反应总体积为 25 μL,置 PTC-100 型 PCR 仪上扩增。反应成分:buffer (Mg²⁺), 400 μm dNTPs, 2 U Taq 酶, 20 ng 引物, 30 ng 模板;反应程序:94℃ 预变性 3 min, 94℃ 10 s, 36℃ 35 s, 72℃ 70 s, 43 个循环, 72℃ 保温 5 min。反应结束后,通过 1.4% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,在紫外透射反射条件下观察结果、照相,并将扩增产物长度与 DNA Marker 进行比较^[3]。结果在与对照药材龙胆相应位置出现相同的条带,与对照药材坚龙胆有显著差异,可作为龙胆(栽培品)的种质标准。龙胆 DNA 指纹图谱见图 1。



1. 坚龙胆对照药材 2. DNA Marker 3. 龙胆栽培品
4. 龙胆对照药材

图 1 龙胆 DNA 指纹图谱

2 龙胆栽培品最佳采收期的确定

2.1 仪器与试剂

仪器:LC-10AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Diamosil C₁₈ 柱(迪马公司);DL-360 型超声波清洗器

(浙江省象山县石浦海天电子仪器厂, 功率为 180 W, 频率为 30 ~ 40 kHz)。

试药: 甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司化工分公司); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。生长年限为 2 ~ 5 年的龙胆栽培品。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Diamosil C₁₈ 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(24:76, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。理论板数按龙胆苦苷峰计不低于 3 000, 与相邻峰的分度大于 1.5, 系统适用性良好。

2.3 溶液制备

对照品溶液: 取龙胆苦苷对照品 2 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成质量浓度为 0.2 g/L 的溶液, 即得^[2]。

供试品溶液: 取龙胆粉末 0.5 g(过 4 号筛), 精密称定, 精密量取甲醇 20 mL, 置同一具塞锥形瓶中并称重, 加热回流 15 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足损失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液备用, 精密量取续滤液 2 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得^[2]。

2.4 方法学考察

线性关系考察: 取龙胆苦苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制得质量浓度为 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 g/L 的对照品溶液, 分别精密吸取 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积。以龙胆苦苷质量浓度(X)为横坐标、相应峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 600\,722\,882.258\,1X + 3\,401\,944.5$, $r^2 = 0.999\,6$ ($n = 5$)。结果表明, 龙胆苦苷质量浓度在 0.05 ~ 0.80 g/L 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取同一对照品溶液, 重复进样 6 次, 每次 10 μL, 记录龙胆苦苷峰面积。结果的 RSD 为 1.52%($n = 6$), 表明仪器精密度符合要求。

重复性试验: 取 6 份样品各 0.5 g, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 进样测定龙胆苦苷的含量。结果的 RSD 为 1.61%($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 时进样测定, 记录龙胆苦苷峰面积。结果的 RSD 为 1.96%($n = 6$), 表明供试品溶液在制备后 12 h 内稳定。

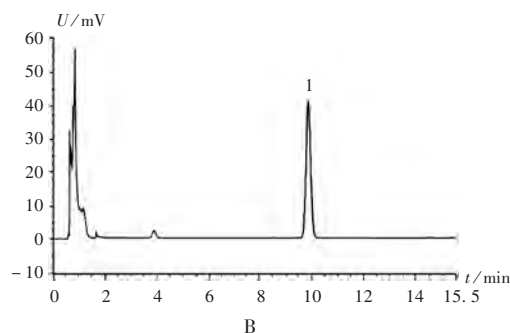
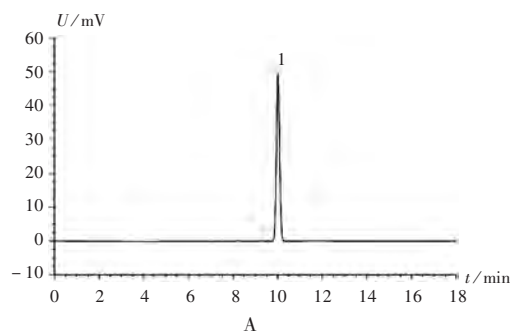
加样回收试验: 取已知含量的样品 0.5 g, 精密称定, 共 3 份, 按高、中、低分别加入龙胆苦苷对照品, 依法制备供试品溶液, 依法测定并计算回收率。结果见表 3。

2.5 样品含量测定

取经筛选的龙胆栽培品, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 色谱图见图 2。5 批

表 3 龙胆苦苷加样回收试验结果($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
21.35	10.50	31.75	99.05	100.74	1.53
21.35	10.50	31.72	98.76		
21.35	10.50	31.69	98.48		
21.90	21.50	43.89	102.28		
21.90	21.50	43.82	101.95		
21.90	21.50	43.85	102.09		
22.25	32.20	54.87	101.30		
22.25	32.20	54.85	101.24		
22.25	32.20	54.92	101.46		



1. 龙胆苦苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 2 高效液相色谱图

样品的含量分别为 4.29%, 4.53%, 4.48%, 4.27%, 3.93%。

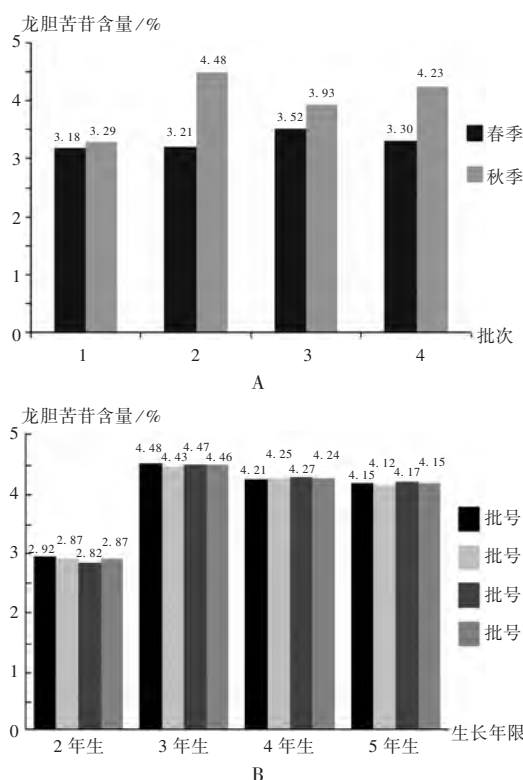
2.6 最佳采收期确定

4 个批次不同采收季节和 4 个批次不同生长年限的龙胆栽培品中龙胆苦苷的含量变化见图 3。

3 讨论

中医取龙胆苦寒之性, 泻肝胆实火, 除下焦湿热^[4]。东北的关龙胆以产量最大、质量最好成为药材市场的主流而畅销全国, 并有出口^[5-6]。中药龙胆中最主要的有效成分为龙胆苦苷等环烯醚萜苷类化合物^[7-8], 具有抗病毒、抗肿瘤、保肝利胆等生物活性^[6]。故本研究中以龙胆苦苷为指标成分, 对应用 PCR 法进行筛选的辽宁省道地药材龙胆 *Gentiana scabra* Bge. 栽培品进行最佳采收期研究。

关于龙胆苦苷的 HPLC 含量测定方法, 以甲醇-磷酸



A. 4批不同采收季节龙胆栽培品 B. 4批不同生长年限龙胆栽培品

图3 不同采收季节和生长年限龙胆栽培品中龙胆苦苷含量

水溶液系统为流动相进行梯度洗脱,270 nm 为检测波长^[9];以乙腈-磷酸水溶液系统为流动相,240 nm 为检测波长^[10-11];文献^[12-16]和2015年版《中国药典(一部)》中均以甲醇-水系统为流动相,270~275 nm 为检测波长测定龙胆苦苷。本研究中参考以上文献,对龙胆苦苷测定方法进行筛选,最终确定甲醇-水(24:76, V/V)为流动相,以270 nm 为检测波长。

由龙胆苦苷的含量测定结果可见,秋季采收的龙胆栽培品中龙胆苦苷含量高于春季采收的龙胆栽培品,但二者含量均高于2015年版《中国药典(一部)》龙胆药材项下规定的龙胆苦苷含量^[21],故春秋两季均可采收。生长年限为2~5年的龙胆栽培品中,以3年生龙胆苦苷含量最高,故确定龙胆栽培品的最佳生长期为3年。

近年来,我国野生中药材资源呈明显下降趋势,特别是道地药材的野生资源日益匮乏,拯救和保护濒危中药材资源刻不容缓,没有科学指导的移栽品更是降低了临床疗效^[11,17]。优良的种质资源是道地药材品质形成的内因,对优良种质资源进行筛选和深入研究,有助于对道地药材优良品种的推广和发展。RAPD是目前用于作物种质资源鉴定的一种分子标记技术^[18]。PCR法是DNA分子水平PCR,被称为检测基因多态性的常规技术,代表中药品种变异类型的遗传标记。

故本研究中采用PCR法测定龙胆种质标准。应用PCR法筛选龙胆栽培品简单易行,结果可靠,可据此探索建立道地中药材种子的PCR法筛选标准,以筛选优良的中药材种质资源,推广道地中药材的规范化种植。这对于挽救中药资源的流失和枯竭,促进中药资源的保护和发展,提高中药质量标准制订水平均有重要意义。

参考文献:

- [1] 杨金华,陈文财,孟杰. 桂林产银杏叶最佳采收期的研究[J]. 中草药,2015,46(13):1985-1988.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:96.
- [3] 周美环,马秀君,刘艳杰,等. RAPD技术在中药狼毒鉴别中的应用[J]. 辽宁中医学院学报,2003,5(2):156-157.
- [4] 杨书彬,王承. 龙胆化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药学报,2005,33(6):54-56.
- [5] 徐国钧. 药材学[M]. 北京:人民卫生出版社,1963:489.
- [6] 张堇诤,尹海波,张建遼,等. 中药龙胆的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(13):163-169.
- [7] 李翟,姜大成,翁丽丽,等. 一测多评法同时测定龙胆不同部位中3个环烯醚萜苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2019,39(6):1069-1076.
- [8] 冯波,朱鹤云,关皎,等. HPLC同时测定龙胆中4种活性成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):82-85.
- [9] 刘海燕. 反相高效液相色谱法测定炎热清片中龙胆苦苷含量[J]. 中国药业,2016,25(15):71-73.
- [10] 雷慧博,吴立宏,王铮涛,等. 龙胆中龙胆苦苷和落干酸含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药,2016,7(10):2397-2399.
- [11] 曹悦,左代英,刘敬武,等. GAP生产基地龙胆中龙胆的质量控制评价[J]. 中草药,2010,41(5):821-825.
- [12] 程玉鹏,马爱萍,陈琦,等. 微波法提取龙胆中龙胆苦苷工艺研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(3):38-40.
- [13] 许秋霞,李小芳,舒予,等. 干燥方法对龙胆炮制品中龙胆苦苷含量的影响[J]. 中国药房,2013,24(7):622-624.
- [14] 段宇,王冬梅,潘英妮,等. GAP基地龙胆中多糖和龙胆苦苷积累动态与土壤因子的关系[J]. 沈阳药科大学学报,2014,31(12):998-1002.
- [15] 范娜,张诗龙,宋杨,等. HPLC法测定芹龙颗粒中龙胆苦苷的含量[J]. 解放军药科学,2016,32(6):531-532.
- [16] 许仲,叶胜体,张安. 高效液相色谱法测定龙胆泻肝汤颗粒中龙胆苦苷含量[J]. 中国药业,2012,21(8):54-55.
- [17] 王程成,赵慧,严颖,等. 道地药材品质形成机制的组学研究思路[J]. 中国中药杂志,2018,43(11):2407-2412.
- [18] 黄璐琦,吕冬梅,杨滨,等. 药用植物种质资源研究的发展——核心种质的构建[J]. 中国中药杂志,2005,30(20):1565-1568.

(收稿日期:2019-10-21)