

基于 ITS2 序列和 HPLC 指纹图谱鉴别琴叶榕及其近缘种

张声源^{1,2}, 庄远杯^{1,2}, 杨秋娜¹, 魏爱红¹, 张超¹, 杨亚利^{1*}

¹嘉应学院 广东省山区特色农业资源保护与精准利用重点实验室, 梅州 514015;

²嘉应学院医学院客家药用生物资源研究所, 梅州 514031

摘要: 基于 ITS2 序列和 HPLC 指纹图谱建立琴叶榕及其近缘种的鉴别方法, 为琴叶榕质量控制提供参考。采用 MEGA6.0 软件分析 ITS2 序列, 计算 K2P 遗传距离, 构建 NJ 树, ITS2 database 在线分析二级结构。采用 HPLC 建立指纹图谱并测定补骨脂素和佛手柑内酯含量。琴叶榕 ITS2 序列长度 210 bp, 平均 GC 含量 62.37%; 近缘种的 ITS2 序列长度范围为 218 ~ 232 bp, GC 含量范围为 60.25% ~ 64.03%; 琴叶榕种内 K2P 平均遗传距离小于琴叶榕与近缘种种间的平均 K2P 遗传距离; NJ 树可将琴叶榕及其近缘种区分, 且 ITS2 二级结构的臂数目、臂长度、臂上茎环数目、臂与臂的夹角均有明显差异。不同产地琴叶榕的 HPLC 指纹图谱相似度为 0.902 ~ 0.981, 确定 10 个共有峰, 8 号峰为补骨脂素, 9 号峰为佛手柑内酯, 含量分别为 1.01 ~ 4.80, 0.96 ~ 4.88 mg/g; 近缘种与琴叶榕对照图谱的相似度均小于 0.807, 全缘琴叶榕、条叶榕、粗叶榕的补骨脂素含量分别为 0.38 ~ 0.63, 1.08 ~ 1.32, 2.45 ~ 14.73 mg/g, 条叶榕、粗叶榕的佛手柑内酯含量分别为 0.25 ~ 0.34, 0.13 ~ 0.74 mg/g, 全缘琴叶榕未检出佛手柑内酯。结果表明 ITS2 序列和 HPLC 指纹图谱可用于鉴定琴叶榕与近缘种, 建立的 HPLC 指纹图谱简便, 专属性强, 重现性良好, 为琴叶榕的质量评价提供了参考。

关键词: 琴叶榕; ITS2 序列; HPLC 指纹图谱; 近缘种

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)4-0640-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.4.011

Identification of *Ficus pandurata* Hance and its related species based on ITS2 sequences and HPLC fingerprint

ZHANG Sheng-yuan^{1,2}, ZHUANG Yuan-bei^{1,2},
YANG Qiu-na¹, WEI Ai-hong¹, ZHANG Chao¹, YANG Ya-li^{1*}

¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Conservation and Precision Utilization of Characteristic Agricultural Resources in Mountainous Areas, Meizhou 514015, China; ²Institute of Hakka Medicinal Bio-resources, Medical College, Jiaying University, Meizhou 514031, China

Abstract: ITS2 sequences and high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint method were established to provide reference for the quality control of *F. pandurata*. MEGA6.0 was used to analyse ITS2 sequences, calculate K2P genetic distances, construct neighbor joining (NJ) phylogenetic tree. Secondary structure was analyzed by online ITS2 database. HPLC was used to establish the fingerprint and determine the content of psoralen and bergapten. The length of ITS2 sequence from *F. pandurata* is 210 BP and the average GC content is 62.37%. The length of ITS2 sequence of the related species ranged from 218 to 232 BP, and the content of GC ranged from 60.25% to 64.03%. The average genetic distance of K2P from *F. pandurata* was less than the interspecific genetic distance between *F. pandurata* and its related species. NJ tree showed that ITS2 could distinguish *F. pandurata* and its related species, and there were significant differences in the number of arms, arm length, number of stem rings on arms and the angle between arms in ITS2 secondary structure. The similarity of HPLC fingerprints from *F. pandurata* in different habitats ranged from 0.902-0.981 and the data showed 10 common peaks. Peak 8 was identified as psoralen, peak 9 was bergapten, and the content of psoralen was 1.01-4.80 mg/g, bergapten was

收稿日期: 2022-08-09 接受日期: 2023-03-08

基金项目: 广东省中药药局项目(20212243); 梅州市社会发展科技计划(2020B151); 2022年广东省基地嘉应学院客家研究院大客家平台研究团队(22KYKT03); 广东省大学生创新创业项目(S202010582082)

* 通信作者 Tel: 86-01382598256; E-mail: yyali198622@163.com

0.96-4.88 mg/g. The similarity of the common pattern between the related species and *F. pandurata* was less than 0.807. The content of psoralen in *F. pandurata* var. *holophylla*, *F. pandurata* var. *angustifolia*, and *F. hirta* was 0.38-0.63, 1.08-1.32, 2.45-14.73 mg/g, respectively. The content of bergapten in *F. pandurata* var. *angustifolia* was 0.25-0.34, and *F. hirta* was 0.13-0.74 mg/g. The content of bergapten was not detected in *F. pandurata* var. *holophylla*. The results showed that ITS2 sequences and HPLC fingerprint can be used for identification of *F. pandurata* and its related species. The established HPLC fingerprint analysis method is simple, specificity and reproducibility, which provides a reference for the quality evaluation of *F. pandurata*.

Key words: *Ficus pandurata* Hance; ITS2 sequences; high-performance liquid chromatography fingerprint; related species

琴叶榕为桑科榕属植物 *Ficus pandurata* Hance, 又称为牛奶树、牛奶子, 主要分布于广东、广西、江西、海南、福建、湖南、湖北、江西、安徽、浙江等地^[1,2]。据《中药大辞典》《福建药物志》《江西民间草药验方》记载, 琴叶榕以根、叶部位入药, 性平、味甘微凉、无毒, 具清热、健脾开胃、益气生津、祛湿化滞等功效, 用于祛风、去湿、解毒、疗疔、通乳等^[3-5], 如《江西民间草药验方》记载琴叶榕根、马兰适量, 清水煎汤内服可治疗黄疸; 琴叶榕根、梵天花根、木防己、五加根、艾梗适量, 以等体积的白酒与清水的混合液煎汤可用于治腰脊疼痛。在广东地区, 琴叶榕食用和药用历史悠久, 群众基础深厚, 已成为地方特色药膳以及食疗药材原料的重要组成部分^[6]。现代研究表明, 琴叶榕富含三萜类、黄酮类、香豆素类、酚酸类等活性成分^[7], 其中佛手柑内酯具有抗肿瘤、调节血糖、改善失眠、防治骨质疏松、抗衰老、抗炎抗过敏等多种药理活性^[8]; 补骨脂素具有抗骨质疏松、神经保护、抗肿瘤、雌激素样、抗炎等药理作用^[9]; 两者均具有抗骨质疏松的作用, 含量丰富、易得, 为琴叶榕代表性活性成分。

目前市售琴叶榕药材混淆品主要有全缘琴叶榕 (*F. pandurata* var. *holophylla*)、条叶榕 (*F. pandurata* var. *angustifolia*) 和粗叶榕 (*F. hirta*) 3 种^[10]。全缘琴叶榕和条叶榕为琴叶榕的变种, 三者叶形过渡; 此外, 琴叶榕和粗叶榕两者均以根入药, 均具有牛奶香味, 市场常以商品名牛奶树根出售, 导致药材的质量参差不齐。目前对于琴叶榕的现代研究多集中于生药学研究、化学成分及药理活性等方面^[11-13], 对琴叶榕质量标准的研究未见报道。DNA 条形码鉴定是利用一段标准的、相对较短的 DNA 序列进行物种鉴别的一种分子生物学鉴别方法。该方法在促进中药新资源的开发与利用、缓解中药鉴定人才的缺乏状况、中药市场流通管理、弥补形态学难以攻克的隐种问题等多个方面具有重要意义^[14]。HPLC 指纹图谱是基于对物质群整体作用的认识, 借助于色谱技

术获得的中药化学成分的色谱图, 是实现鉴别产品真实性、评价质量一致性和产品稳定性的可靠手段^[15]。本实验采用 ITS2 序列对琴叶榕及其近缘种进行分子鉴别, 建立 HPLC 指纹图谱, 测定补骨脂素和佛手柑内酯含量差异, 对不同产地琴叶榕及其近缘种进行鉴别, 为琴叶榕药材的质量控制及评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Alliance 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); BS110s 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); Q-Gard A2 超纯水仪(德国 Millipore 公司); PHSJ-3F pH 计(上海精科仪器有限公司); NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 材料

引物由广州华大生物科技有限公司合成; Plant Genomic DNA Kit(批号: CW0553); 补骨脂素(批号: H1528027, 质量分数为 98.0%)、佛手柑内酯(批号: H1616005, 质量分数为 98.0%) 对照品均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲醇为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。实验用不同产地琴叶榕及其三种近缘种经嘉应学院医学院客家药用生物资源研究所聂华副教授鉴定为桑科榕属 (*Ficus*) 琴叶榕 (*F. pandurata*) 的根(编号 Q-1 ~ Q-10), 桑科榕属全缘琴叶榕 (*F. Pandurta* var. *holopjulla*) 的根(编号 QY-1 ~ QY-3)、桑科榕属条叶榕 (*F. pandurata* var. *angustifolia*) 的根(编号 TY-1 ~ TY-3)、桑科榕属粗叶榕 (*F. hirta*) 的根(编号 CY-1 ~ CY-3), 详细信息见表 1。将采摘的新鲜样品用蒸馏水洗净后切段, 置于 55 °C 恒温鼓风干燥箱中, 烘干至恒重, 粉碎, 过 80 目筛, 备用。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号 No.	种类 Type	采集地点 Collection location	编号 No.	种类 Type	采集地点 Collection location
Q-1	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	广东蕉岭	QY-1	全缘琴叶榕 <i>F. pandurata</i> var. <i>holopjulla</i>	广东揭阳
Q-2	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	广东梅县	QY-2	全缘琴叶榕 <i>F. pandurata</i> var. <i>holopjulla</i>	广东梅县
Q-3	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	广东兴宁	QY-3	全缘琴叶榕 <i>F. pandurata</i> var. <i>holopjulla</i>	广东蕉岭
Q-4	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	广东大埔	TY-1	条叶榕 <i>F. pandurata</i> var. <i>angustifolia</i>	广东揭阳
Q-5	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	广东丰顺	TY-2	条叶榕 <i>F. pandurata</i> var. <i>angustifolia</i>	广东梅县
Q-6	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	广东揭阳	TY-3	条叶榕 <i>F. pandurata</i> var. <i>angustifolia</i>	广东蕉岭
Q-7	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	广东汕尾	CY-1	粗叶榕 <i>F. hirta</i>	广东揭阳
Q-8	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	广东江门	CY-2	粗叶榕 <i>F. hirta</i>	广东梅县
Q-9	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	江西赣州	CY-3	粗叶榕 <i>F. hirta</i>	广东蕉岭
Q-10	琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	广东河源	-	-	-

1.3 方法

1.3.1 ITS2 条形码鉴别

取 ITS2 条形码鉴别所用药材外表皮,切成小块,置于 2 mL 离心管中,以 50 Hz 的频率研磨成细粉,称取约 60 mg 粉末,采用 Plant Genomic DNA Kit 试剂盒提取总 DNA。选用正向引物为 5'-AT-GCCGATACTTGGTGTGAAT-3',反向引物为 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'进行扩增^[16],体系为 2 × PCR Master Mix 25 μL、10 μmol/L 的正反向引物各 1 μL、DNA 取 70 ng、ddH₂O 补足至 50 μL。扩增程序:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 次循环,72 °C 延伸 10 min;产物送至广州华大生物科技有限公司进行正向测序。The ITS2 Database 分析,去除两端序列,获得 ITS2 序列,并预测 ITS2 序列的二级结构;用 MEGA (Version 6.0) 软件分析序列长度,统计 GC 含量,选择邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树,并以 Kimura 2-parameter model 做 1 000 次可信度分析^[17]。

1.3.2 HPLC 指纹图谱鉴别

1.3.2.1 供试品溶液制备

不同产地的琴叶榕及其近缘种药材于恒温鼓风

干燥箱中 55 °C 干燥,粉碎,过 80 目筛。取粉末 1 g,精密称定,加 95% 乙醇 30 mL,超声提取 (45 °C, 200 W, 40 kHz, 30 min),过滤,挥干滤液,残渣用少量甲醇溶解,置 10 mL 量瓶中用甲醇定容,过 0.45 μm 微孔滤膜,备用^[15]。

1.3.2.2 对照品溶液制备

取补骨脂素、佛手柑内酯对照品适量,加甲醇溶解,分别制成浓度为 100 μg/mL 的对照品储备溶液。分别精密量取各对照品储备液适量,甲醇定容,制成浓度依次为 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 μg/mL 的混合对照品溶液^[18]。

1.3.2.3 色谱条件

色谱柱: XBridge Peptide BEH C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 甲醇 (A) - pH8 磷酸缓冲溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 50 min, 10% → 60% A; 50 ~ 55 min, 60% → 10% A; 55 ~ 60 min, 10% A); 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 330 nm, 柱温: 30 °C, 进样量: 10 μL。

1.3.2.4 方法学考察

精密度试验: 取 Q-10 供试品溶液,连续进样测定 6 次,以 7 号色谱峰为参照峰 (S),计算各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD。重复性试验:

精密称取 6 份 Q-10 供试品,以 7 号色谱峰为参照峰(S),计算各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD。稳定性试验:取 Q-10 供试品溶液,于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,以 7 号色谱峰为参照峰(S),计算各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD。加样回收率试验:精密称取 6 份 Q-10 供试品,分别精密加入与样品中含量相当的补骨脂素和佛手柑内酯对照品,测定峰面积,计算平均回收率和 RSD。

1.3.2.5 指纹图谱的建立

按“1.3.2.1”项下方法制备样品溶液,“1.3.2.3”项测定,将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,以 Q-10 样品色谱图为参照图谱,进行多点校正与 Mark 峰匹配,生成琴叶榕叠加图谱及对照图谱,标定共有峰,并进行相似度评价,经与对照品保留时间及紫外吸收光谱比对指认色谱峰。

1.3.2.6 含量测定

按“1.3.2.1”项制备供试品溶液,“1.3.2.2”项制备补骨脂和佛手柑内酯对照品溶液,“1.3.2.3”项色谱条件下检测,得质量浓度 X 与峰面积 Y 的线性方程,采用外标法计算补骨脂和佛手柑内酯的含量。

2 结果与分析

2.1 ITS2 条形码鉴别

2.1.1 ITS2 序列分析

序列分析显示(见表 2),琴叶榕的 ITS2 序列长度为 210 bp,GC(G 为鸟嘌呤,C 为胞嘧啶)含量 62.37%;近缘种的 ITS2 序列长度均较琴叶榕长,范围为 218~232 bp,GC 含量范围为 60.25%~64.03%。琴叶榕及其近缘种的序列长度相差较明显,可作为鉴别指标之一。

表 2 琴叶榕及其近缘种的 ITS2 序列特征

Table 2 ITS2 sequence characteristics of *F. pandurata* and its related species

品种 Variety	ITS2 序列长度 ITS2 sequence length (bp)	GC 含量 GC content (%)
琴叶榕 <i>F. pandurata</i>	210	62.37
全缘琴叶榕 <i>F. pandurata</i> var. <i>holopjulla</i>	232	60.25
条叶榕 <i>F. pandurata</i> var. <i>angustifolia</i>	223	64.03
粗叶榕 <i>F. hirta</i>	218	61.78

2.1.2 K2P 遗传距离分析

遗传距离分析显示(见表 3),琴叶榕种内 K2P 平均遗传距离为 0.004 17,均小于琴叶榕与近缘种种间的平均 K2P 遗传距离。其中琴叶榕种内的最大遗传距离(0.004 36)小于琴叶榕与粗叶榕之间的最小遗传距离(0.004 43);但琴叶榕种内的最大遗

传距离(0.004 36)大于琴叶榕与全缘琴叶榕、琴叶榕与条叶榕种间的最小遗传距离,表明 K2P 遗传距离可以有效的鉴别琴叶榕与粗叶榕,用于鉴别琴叶榕与全缘琴叶榕及条叶榕具有一定的局限性,需要结合其他鉴别方法。

表 3 琴叶榕及其近缘种 ITS2 序列的 K2P 遗传距离

Table 3 K2P genetic distance of ITS2 sequence of *F. pandurata* and its related species

项目 Item	最小 K2P 距离 Minimum K2P distance	最大 K2P 距离 Maximum K2P distance	平均 K2P 距离 Average K2P distance
琴叶榕种内 <i>F. pandurata</i> within species	0.001 83	0.004 36	0.004 17
全缘琴叶榕种内 <i>F. pandurata</i> var. <i>holopjulla</i> within species	0.003 05	0.004 88	0.004 27
条叶榕种内 <i>F. pandurata</i> var. <i>angustifolia</i> within species	0.006 10	0.006 10	0.006 10
粗叶榕种内 <i>F. hirta</i> within species	0.004 88	0.006 72	0.005 69
琴叶榕与全缘琴叶榕种间 Interspecific between <i>F. pandurata</i> and <i>F. pandurata</i> var. <i>holopjulla</i>	0.001 83	0.006 70	0.004 81

续表 3 (Continued Tab. 3)

项目 Item	最小 K2P 距离 Minimum K2P distance	最大 K2P 距离 Maximum K2P distance	平均 K2P 距离 Average K2P distance
琴叶榕与条叶榕种间 Interspecific between <i>F. pandurata</i> and <i>F. pandurata</i> var. <i>angustifolia</i>	0.002 44	0.008 54	0.006 03
琴叶榕与粗叶榕种间 Interspecific between <i>F. pandurata</i> and <i>F. hirta</i>	0.004 43	0.007 33	0.006 42

2.1.3 NJ 树聚类分析

NJ 树聚类分析显示(见图 1),条叶榕单独聚为一支,粗叶榕和全缘琴叶榕形成姐妹分支,琴叶榕共

聚为一个大支,表明 NJ 树能将琴叶榕及其近缘种明显区分开。

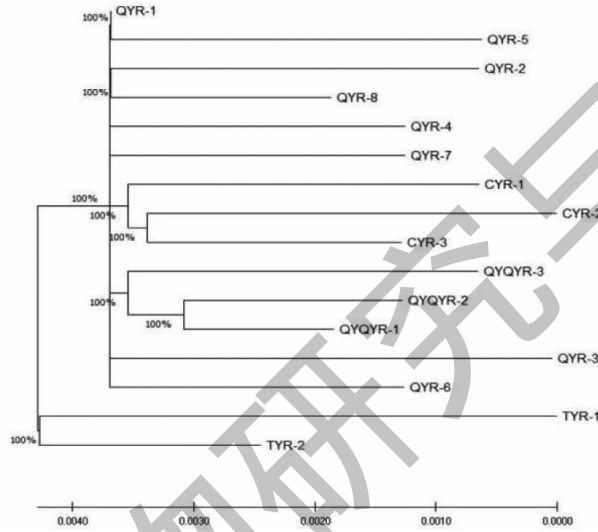


图 1 基于 ITS2 序列构建的琴叶榕及其近缘种的 NJ 树

Fig. 1 NJ tree based on ITS2 sequences among *F. pandurata* and its related species

2.1.4 ITS2 序列二级结构分析

采用 The ITS2 Database 的 Predict 功能对样品的 ITS2 序列进行二级结构的预测(见图 2),结果显示琴叶榕及其近缘种的 ITS2 序列二级结构均具有一个多分支环中心,四周延长出 4~5 个臂,标记为 I、II、III、IV、V 臂。其中全缘琴叶榕含有 5 个臂,且其 V 臂顶端形成一个大的未闭合的环,琴叶榕、条

叶榕、粗叶榕均含 4 个臂,可将全缘琴叶榕与其余品种区分。条叶榕 I、II、III 臂之间的夹角较小,明显区别于其余品种。相较于琴叶榕和条叶榕的 II 臂,全缘琴叶榕与粗叶榕的 II 臂较长,且臂上的茎环数均为 3 个;琴叶榕 IV 臂上的茎环数为 7 个,其余为 5 或 6 个,故在 IV 臂茎环数目可将琴叶榕与其余品种区分。

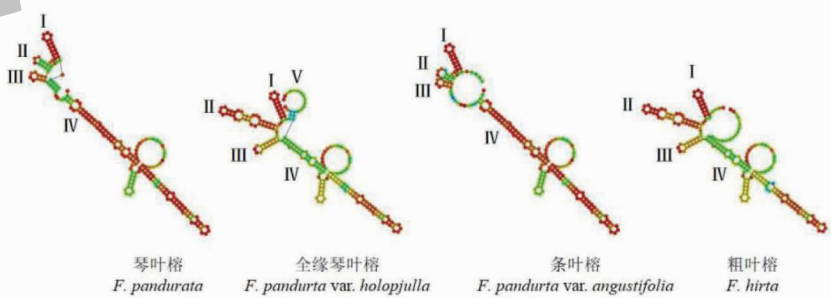


图 2 琴叶榕及其近缘种 ITS2 序列二级结构

Fig. 2 Secondary structures of ITS2 in *F. pandurata* and its related species

综上,琴叶榕及其近缘种 ITS2 序列二级结构的臂数目、臂长度、臂上茎环数目、臂与臂的夹角均有明显差异,可作为区分琴叶榕及其近缘种指标。

2.2 HPLC 指纹图谱鉴别

2.2.1 方法学考察

按“1.3.2.4”方法,结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.36%, 相对峰面积的 RSD < 1.29%, 表明仪器精密度良好;各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.18%, 相对峰面积的 RSD < 2.26%, 表明方法重复性良好;各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.30%, 相对峰面积的 RSD < 1.95%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。加样回收率试验:补骨脂素平均回收率为 99.08%, RSD 值为 2.68%;佛手柑内酯平均回收率为 101.12%, RSD 值为 2.35%。

2.2.2 指纹图谱的建立

按“1.2.2.1”项下方法制备样品溶液,按“1.2.2.3”项下方法测定,将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,以 Q-10 样品色谱图作为参照图谱,进行多点校正与 Mark 峰匹配,生成琴叶榕叠加图谱(见图 3)及对照图谱(见图 4)。共确定 10 个共有峰,并指认其中 2 个成分,8 号峰为补骨脂素、9 号峰为佛手柑内酯。将近缘种的

HPLC 特征图谱与琴叶榕对照图谱进行比对,发现琴叶榕与近缘种图谱的在特征峰数目、相对保留时间、峰面积均有一定差异(见图 5),其中琴叶榕色谱峰数目最为丰富,且在 8~10、24~26、44~46 min 三个保留时间段呈现出三组成对出现的特征色谱峰(2 号峰和 3 号峰构成一对、5 号峰和 6 号峰构成一对、9 号峰和 10 号峰构成一对);全缘琴叶榕的特征峰数目仅有两个、未见佛手柑内酯特征峰;条叶榕特征峰数介于琴叶榕和粗叶榕之间,未见成对呈现的特征色谱峰;由此可知,琴叶榕及其近缘种在特征色谱峰具有明显差异,建立的 HPLC 特征图谱可用于鉴别琴叶榕及其近缘种。

2.2.3 相似度评价

将琴叶榕及其近缘种药材指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,10 批琴叶榕样品与对照图谱的相似度 0.902~0.981 之间;与琴叶榕 HPLC 指纹谱共有模式比较,全缘琴叶榕相似度在 0.698~0.721,条叶榕为 0.785~0.807,粗叶榕相似度为 0.762~0.779,相似度均低于 0.807,表明琴叶榕与近缘种的相似度较低,可将琴叶榕与近缘种区别开。

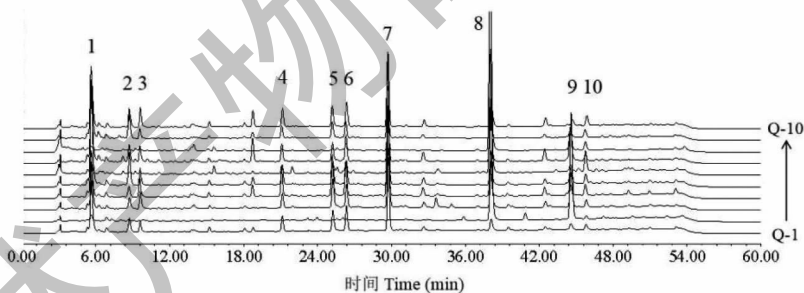


图 3 10 批琴叶榕样品 HPLC 叠加图谱

Fig. 3 Superposition plot of HPLC fingerprint of 10 batches of *F. pandurata*

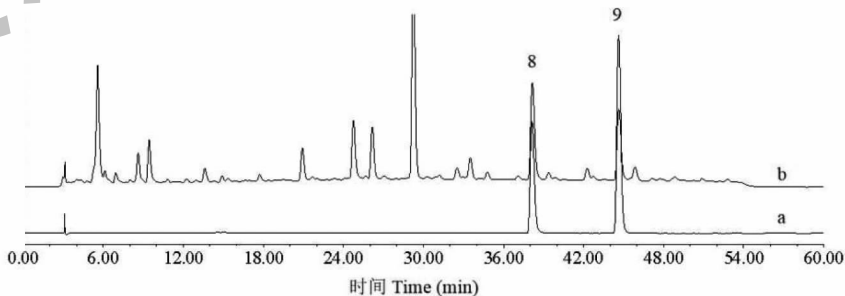


图 4 混合对照品和琴叶榕对照图谱对比图

Fig. 4 Contrast map of mixed reference substance and *F. pandurata*

注:8-补骨脂素;9-佛手柑内酯;a-混合对照品;b-琴叶榕。Note:8-Psoralein;9-Bergapten;a-Mixed reference;b-*F. pandurata*.

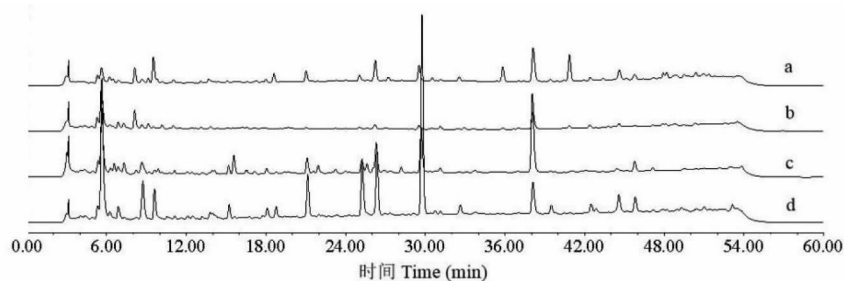


图5 琴叶榕及其近缘种的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC fingerprint of *F. pandurata* and its related species注: a-条叶榕; b-全缘琴叶榕; c-粗叶榕; d-琴叶榕。Note: a-*F. pandurata* var. *angustifolia*; b-*F. pandurata* var. *holopjulla*; c-*F. hirta*; d-*F. pandurata*.

2.2.4 含量测定

按“1.2.2.1”项制备供试品溶液,“1.2.2.2”项制备补骨脂和佛手柑内酯对照品溶液,“1.2.2.3”项色谱条件下检测,得质量浓度 X 与峰面积 Y 的线性方程(见表4)。补骨脂素 $Y = 17\,599X - 160.9$,

$R^2 = 0.999\,5$,表明在 $2.00 \sim 32.00 \mu\text{g/mL}$ 范围内补骨脂素浓度与峰面积线性关系良好;佛手柑内酯 $Y = 10\,963X - 372.7$, $R^2 = 0.999\,9$,表明在 $2.00 \sim 32.00 \mu\text{g/mL}$ 范围内补骨脂素浓度与峰面积线性关系良好。

表4 线性回归方程及相关系数

Table 4 Linear regression equation and correlation coefficient

成分 Ingredient	线性方程 Equation of linear regression	R^2	线性范围 Linearity range ($\mu\text{g/mL}$)
补骨脂素 Psoralen	$Y = 17\,599X - 160.9$	0.999 5	2.00 ~ 32.00
佛手柑内酯 Bergapten	$Y = 10\,963X - 372.7$	0.999 9	2.00 ~ 32.00

不同产地琴叶榕及其近缘种的补骨脂素、佛手柑内酯含量测定结果见表5,10批不同产地的琴叶榕药材补骨脂素含量为 $1.01 \sim 4.80 \text{ mg/g}$;佛手柑内酯含量为 $0.96 \sim 4.88 \text{ mg/g}$ 。全缘琴叶榕的补骨脂素含量为 $0.38 \sim 0.63 \text{ mg/g}$,低于琴叶榕中的补骨脂素含量;实验条件下未检测出佛手柑内酯;由此可知,补骨脂素及佛手柑内酯含量可将琴叶榕与全

缘琴叶榕区别开。条叶榕的补骨脂素含量为 $1.08 \sim 1.32 \text{ mg/g}$;佛手柑内酯含量为 $0.25 \sim 0.34 \text{ mg/g}$,低于琴叶榕,表明佛手柑内酯含量可将琴叶榕与条叶榕区别开。粗叶榕的补骨脂素含量为 $2.45 \sim 14.73 \text{ mg/g}$;佛手柑内酯含量为 $0.13 \sim 0.74 \text{ mg/g}$,低于琴叶榕,表明佛手柑内酯含量可将琴叶榕与粗叶榕区别开。

表5 琴叶榕与近缘种中补骨脂素与佛手柑内酯的含量($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Contents of psoralen and bergapten in *F. pandurata* and its related species($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品 Sample	含量 Content(mg/g)		样品 Sample	含量 Content(mg/g)	
	补骨脂素 Psoralen	佛手柑内酯 Bergapten		补骨脂素 Psoralen	佛手柑内酯 Bergapten
Q-1	1.17 ± 0.01	1.03 ± 0.05	QY-1	0.55 ± 0.01	-
Q-2	4.78 ± 0.03	4.88 ± 0.63	QY-2	0.63 ± 0.03	-
Q-3	4.02 ± 0.1	4.81 ± 0.2	QY-3	0.38 ± 0.04	-
Q-4	1.21 ± 0.01	1.02 ± 0.03	TY-1	1.08 ± 0.07	0.31 ± 0.02
Q-5	1.09 ± 0.04	1.11 ± 0.09	TY-2	1.32 ± 0.11	0.34 ± 0.03
Q-6	4.80 ± 0.3	4.82 ± 0.5	TY-3	1.16 ± 0.14	0.25 ± 0.01

续表 5 (Continued Tab. 5)

样品 Sample	含量 Content (mg/g)		样品 Sample	含量 Content (mg/g)	
	补骨脂素 Psoralen	佛手柑内酯 Bergapten		补骨脂素 Psoralen	佛手柑内酯 Bergapten
Q-7	2.94 ± 0.04	2.44 ± 0.3	CY-1	14.73 ± 0.71	0.74 ± 0.03
Q-8	2.20 ± 0.1	1.65 ± 0.41	CY-2	11.54 ± 0.52	0.36 ± 0.05
Q-9	1.01 ± 0.04	0.96 ± 0.02	CY-3	2.45 ± 0.31	0.13 ± 0.01
Q-10	1.15 ± 0.1	1.01 ± 0.05			

注:“-”表示未检出。

Note:“-” indicates not detected.

3 讨论与结论

试验对琴叶榕及其近缘种进行 ITS2 序列、K2P 遗传距离、NJ 树聚类分析及二级结构进行了分析, NJ 树聚类分析及二级结构均可很好区分琴叶榕及其近缘种,但 K2P 种内及种间的遗传距离对于鉴别琴叶榕及其近缘种具有一定局限性,需要结合 NJ 树聚类分析及二级结构进行鉴别。

试验考察了不同提取溶剂、不同检测波长、不同柱温、不同流动相体系、不同色谱柱等色谱条件,结果显示采用 95% 乙醇提取, XBridge Peptide BEH C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱, 检测波长 330 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min, 流动相为甲醇-pH8 磷酸缓冲溶液时, 各色谱峰的峰形、分离程度较好。建立了琴叶榕及其近缘种的 HPLC 指纹图谱, 填补了琴叶榕 HPLC 特征图谱研究的空白, 琴叶榕与近缘种的指纹图谱在特征峰数目、相对保留时间差异显著, 可直观将琴叶榕与近缘种区别开, 能应用于琴叶榕的质量评价。不同产地琴叶榕共有色谱峰 10 个, 多数在全缘榕与条叶榕中未检测出。近缘种与琴叶榕的相似度低于 0.807; 补骨脂及佛手柑内酯含量在琴叶榕及近缘种中相差较大, 全缘琴叶榕和条叶榕的含量明显低于琴叶榕, 表明琴叶榕与近缘种质量存在差异, 对将补骨脂素及佛手柑内酯含量作为琴叶榕质量控制指标具有重要实践指导价值。因此, 从指纹图谱、相似度、含量测定均可客观、准确地判别琴叶榕药材的真伪, 可以有效用于琴叶榕药材的质量控制和真伪鉴定。

综上, 建立了琴叶榕及其近缘种的 DNA 条形码和 HPLC 指纹图谱, 方法简便易行、稳定可靠、重复性好, 可用于琴叶榕及其近缘种的指纹图谱研究及真伪鉴别, 同时为进一步提高琴叶榕的质量提供了科学依据。

参考文献

1 Editorial Committee of Flora of China. Flora of China(中国

植物志) [M]. Beijing: Science Press, 2004: 153-156.

- Peng WW, Ouyang XJ, Dai WB, et al. Pharmacognosy of *Ficus pandurata* Hance [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2018, 41: 2542-2545.
- Gong HM. Jiangxi folk herbal prescription [M]. Nanchang: Jiangxi People's Publishing House, 1963: 130.
- Jiangsu New Medical College. Chinese Dictionary of Herbal Medicine (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Sci Technol Press, 1986: 3187-3 188.
- Fujian medical research institute. Fujian pharmacology (福建药物志) [M]. Fuzhou: Fujian People's Publishing House, 1979: 38-43.
- Wu WK, Chen FH, Yan QR, et al. Study on folk medicine used by Hakka in Meizhou [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 3984-3987.
- Lu YC, Peng WW. Species study of *Ficus pandurata* Hance and research advances [J]. Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2018, 14: 84-87.
- Yang K, Gao R, Ma YZ, et al. Research progress on mechanism of pharmacological effects and hepatotoxicity of psoralen [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 289-298.
- Xie SH, Feng ML. Advances in pharmacological action of bergamot lactone [J]. J Hainan Med Univ (海南医学院学报), 2022, 28: 1 917-1 920.
- Chen CZ, Wang WJ, Duan YJ, et al. Identification of *Ficus Hirtae* Radix and its related species [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2017, 40: 797-802.
- Dai WB, Chen C, Feng HT, et al. Protection of *Ficus pandurata* Hance against acute alcohol-induced liver damage in mice via suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 275: 114140.
- Lv HQ, Hu CF, Xie ZJ, et al. Purification, characterization and anti-tumor activity of a pectic-type polysaccharide isolated from *Ficus pandurata* H [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 153: 201-206.
- Chen C, Hu XJ, Song LY, et al. Research advance of *Ficus pandurata* Hance [J]. Food Drug (食品与药品), 2020, 22: 148-153.

(下转第 676 页)