

雷公藤属植物叶片中萜类成分的差异性

郭思远¹ 马宝伟¹ 吴晓毅¹ 李佳¹ 高伟¹ 黄璐琦²

(1 首都医科大学中医药学院中医络病研究北京市重点实验室,北京,100069; 2 中国中医科学院中药资源中心地道药材国家重点实验室培育基地,北京,100700)

摘要 目的:测定雷公藤属植物叶片中5种萜类成分的含量并比较差异,研究3个物种间的化学亲缘关系。方法:采用HPLC法测定28批雷公藤属植物叶片中雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚新内酯、雷酚内酯和雷公藤红素5个成分的含量,并进行方差分析和聚类分析。结果:雷公藤属植物叶片中,雷公藤甲素、雷酚内酯和雷公藤红素的含量差异有统计学意义($P < 0.05$);雷公藤内酯酮和雷酚新内酯含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。运用系统聚类将28批雷公藤属植物聚为4类:第I类为东北雷公藤和昆明山海棠;第II类为雷公藤;第III类为雷公藤;第IV类为雷公藤和昆明山海棠。结论:雷公藤属植物叶片中部分萜类成分含量差异明显。东北雷公藤与雷公藤化学亲缘关系较远;昆明山海棠混在2者之间,与2者无明显区分。

关键词 雷公藤属;萜类成分;含量测定;化学分类

Study on Differences of Terpenoid Compositions in Plant Leaves of *Tripterygium* Genus

Guo Siyuan¹, Ma Baowei¹, Wu Xiaoyi¹, Li Jia¹, Gao Wei¹, Huang Luqi²

(1 Key Laboratory of Collateral Diseases, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2 State Key Laboratory of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To study the relative relationship among the three species of *Tripterygium* genus by measuring the contents of 5 terpenoid compositions in plant leaves of *Tripterygium* genus and comparing the differences. **Methods:** HPLC was used to measure the 5 composition contents including Triptolide, Triptonide, Neotriptophenolide, Triptophenolide and Tripterine in 28 batches of plant leaves of *Tripterygium* genus. ANOVA and cluster analysis were also performed to verify the results. **Results:** There were significant differences among the contents of Triptolide, Triptophenolide and Tripterine in the plant leaves of *Tripterygium* genus ($P < 0.05$); There was no significant difference between Triptonide and Neotriptophenolide. Hierarchical clustering was used to divide the 28 batches of plants of *Tripterygium* genus into 4 kinds: I: *Tripterygium regelii* Sprague et Takeda and *Tripterygium hypoglaucum*; II: *Tripterygium*; III: *Tripterygium*; IV: *Tripterygium* and *Tripterygium hypoglaucum*. **Conclusion:** The differences of some contents of terpenoid compositions in plant leaves of *Tripterygium* genus were significant. The relative relationship of *Tripterygium regelii* Sprague et Takeda and *Tripterygium* was distant; *Tripterygium hypoglaucum* was between the two, which had no significant difference.

Key Words *Tripterygium* genus; Terpenoid composition; Content determination; Chemotaxonomy

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.02.002

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)、东北雷公藤(*Tripterygium regelii* Sprague et Takeda)和昆明山海棠(*Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch.) 3者均属于卫矛科雷公藤属植物。雷公藤为传统中药,又名黄藤、黄腊藤、断肠草等^[1]。药理研究显示,其有较好的抑制免疫、抗炎、抗动脉粥样硬化和抗肿瘤等作用^[2],临床上主要用于肾病综合征、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等疾病的治疗^[3]。目前,雷公藤和昆明山海棠可作为药用植物,而东北雷公藤尚无用药历史^[4]。

文献报道^[4-5]显示,综合形态特征、生物特性和地理分布分析,认为雷公藤和昆明山海棠应划分为

同一物种的2个类型,将分布于浙江和福建等海拔300~500 m以上的物种划分为雷公藤种内的一个新变形,即中间型雷公藤^[5]。有文献通过RAPD分子标记方法研究3者遗传关系和遗传多样性,结果显示东北雷公藤明显与其他种有显著地遗传差异可作为一个独立物种,而雷公藤与昆明山海棠之间存在大量的中间类型,中间类型连接了这2个种,建议将2个种合并。

现代研究发现,雷公藤中含有二萜类、三萜类、生物碱类、倍半萜类等活性成分^[6-7]。本实验以雷公藤的萜类活性成分:雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚新内酯、雷酚内酯和雷公藤红素为指标,对不同产

基金项目:“十三五”时期北京市属高校高水平教师队伍建设支持计划(CIT&TCD20170324);市教委科技+社科计划重点项目(KZ201710025022);国家自然科学基金面上项目(81773830)

作者简介:郭思远(1994.11—),男,硕士研究生在读,研究方向:分子生药,E-mail:854013547@qq.com

通信作者:李佳(1974.05—),女,博士研究生,副教授,研究方向:中药鉴定方法学和质量研究,E-mail:yueliang2683@sina.com;高伟

(1979.05—),男,博士研究生,教授,研究方向:中药资源与分子生药学,E-mail:weigao@ccmu.edu.cn

地的雷公藤叶片、东北雷公藤叶片和昆明山海棠叶片进行含量测定,并参照药用植物化学分类研究方法^[8]对样品进行系统聚类分析,为进一步研究3者萜类含量差异和物种分类提供化学角度支撑。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(Agilent 1200,安捷伦科技有限公司),冷冻干燥机(Alpha 1-2LDplus,德国格马有限责任公司),混合球磨仪(MM400,德国RETSCH公司),循环水式多用真空泵(SHB-III,郑州长城科工贸有限公司),数显恒温水浴锅(SB-1100,上海爱朗仪器有限公司),低速台式离心机(SIGMA 1-14,德国Sigma实验室离心机股份有限公司)。

1.2 试剂 雷公藤甲素(成都曼思特生物科技有限公司生产,生产批号 MUST-14092510),雷公藤内酯酮(成都曼思特生物科技有限公司生产,生产批号 MUST-14111115),雷酚新内酯(药渡经纬信息科技有限公司生产,生产批号 YD0000883-170220),雷酚内酯(上海源叶生物科技有限公司生产,生产批号 Y25A3S1),雷公藤红素(成都普思生物科技有限公司生产,生产批号 R0130198);上述对照品 HPLC 纯度 $\geq 98\%$ 。乙腈(色谱纯, Fisher Chemical),甲醇(分析纯,北京化工厂生产),磷酸(色谱纯,北京现代东方精细化学品有限公司生产),DMSO(纯度 $> 99.5\%$, SIGMA-ALORICH 中国公司生产),娃哈哈纯净水(纯化水,娃哈哈宏振饮料有限公司生产)。

1.3 分析样品 本实验所用雷公藤属植物叶片由本课题组野外采集,其基原植物经鉴定为雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)、东北雷公藤(*Tripterygium regelii* Sprague et Takeda)、昆明山海棠(*Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch.)。3者取其叶,在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,再于冷冻干燥机中冷冻干燥24 h,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:DIKMA Diamonsil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B),洗脱梯度(0~12 min,38% A;12~25 min,38%~60% A;25~30 min,60%~65% A;30~35 min,65% A;35~48 min,65%~85% A;48~52 min,85% A;52~54 min,85%~83% A,54~65 min,83% A);流速:0.8 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:220 nm。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取雷公藤甲素对照品2.38 mg、雷公藤内酯酮对照品1.44 mg、雷酚新内酯1.53 mg、雷酚内酯1.67 mg,于2 mL容量瓶中,用50% DMSO 甲醇溶液溶解,定容至刻度,摇匀

即得,含雷公藤甲素对照品190 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、雷公藤内酯酮对照品720 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、雷酚新内酯对照品765 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、雷酚内酯对照品835 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、雷公藤红素对照品930 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。进样10 μL 。对照品色谱图见图1。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取昆明山海棠、雷公藤、东北雷公藤干燥叶片适量。取昆明山海棠、雷公藤样品于2 mL离心管中,混合球磨仪粉碎2 min,加入10倍量体积(w/v)80%甲醇水溶液,超声提取2 h,摇匀,离心10 min(14 000 r/min),上清液离心5 min(14 000 r/min),上清液微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得;取东北雷公藤样品研成粉末于15 mL离心管中,加入10倍量体积(w/v)80%甲醇水溶液,超声提取2 h,抽滤,浓缩,用80%甲醇水溶液定容至2 mL,离心10 min(14 000 r/min),上清液离心5 min(14 000 r/min),上清液微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得。进样15 μL 。

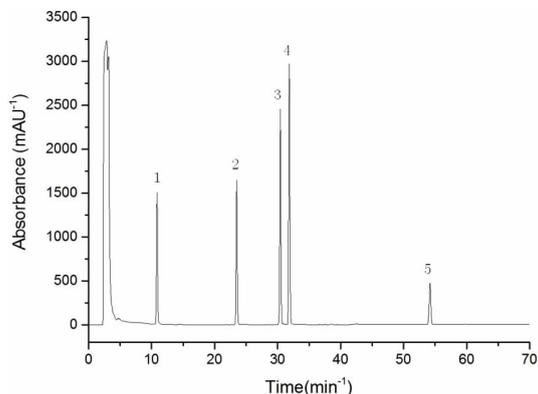


图1 对照品色谱图

注:1:雷公藤甲素;2:雷公藤内酯酮;3:雷酚新内酯;4:雷酚内酯;5:雷公藤红素

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品储备液适量,分别用50% DMSO 甲醇溶液溶解逐渐稀释配制成5个不同浓度的混合对照品溶液,用“2.1项”下色谱条件进行分析。以峰面积为纵坐标,对照品溶液浓度为横坐标,进行回归,回归方程及线性关系。见表1。

表1 回归方程及线性关系

化合物	回归方程	线性范围/ μg	R^2
雷公藤甲素	$y = 0.0657x + 0.2502$	0.238 μg ~ 119.0 μg	1
雷公藤内酯酮	$y = 0.0362x + 0.0240$	0.144 μg ~ 72.0 μg	1
雷酚新内酯	$y = 0.0266x + 0.0504$	0.153 μg ~ 76.5 μg	1
雷酚内酯	$y = 0.0216x + 0.0929$	0.167 μg ~ 83.5 μg	1
雷公藤红素	$y = 0.1148x + 0.7013$	0.186 μg ~ 93.0 μg	0.9998

2.5 样品测定结果 按2.3项下的制备方法制备供试溶液,按2.1项下的色谱条件进样,测定峰面积,计算含量。见表2。

表2 不同产地多成分含量测定

品名	产地	雷公藤甲素 (mg/g)	雷公藤内酯酮 (mg/g)	雷酚新内酯 (mg/g)	雷酚内酯 (mg/g)	雷公藤红素 (mg/g)
昆明山海棠 1	云南省北市区	0.117 2	0.000 0	0.023 0	0.013 2	0.010 0
昆明山海棠 2	云南省北市区	0.033 9	0.002 6	0.005 5	0.002 5	0.011 5
昆明山海棠 3	云南省北市区	0.030 8	0.003 1	0.010 6	0.005 1	0.011 2
昆明山海棠 4	云南省北市区	0.030 8	0.001 4	0.005 6	0.002 6	0.010 5
昆明山海棠 5	云南省北市区	0.029 0	0.001 2	0.002 6	0.002 7	0.006 6
雷公藤 81	福建省三明	0.199 9	0.025 2	0.025 9	0.018 9	0.011 7
雷公藤 77	福建省三明	0.070 5	0.019 2	0.015 6	0.003 8	0.011 3
雷公藤 76	福建省三明	0.064 3	0.062 2	0.020 9	0.002 2	0.014 0
雷公藤 72	福建省三明	0.147 9	0.040 3	0.018 9	0.011 6	0.013 7
雷公藤 68a	福建省三明	0.205 4	0.021 4	0.019 9	0.018 3	0.014 2
雷公藤 80	福建省三明	0.230 8	0.005 5	0.002 4	0.001 6	0.020 2
雷公藤 79	福建省三明	0.222 0	0.005 6	0.002 4	0.002 3	0.039 6
雷公藤 75	福建省三明	0.062 5	0.008 5	0.002 7	0.002 7	0.029 1
雷公藤 78	福建省三明	0.189 8	0.002 8	0.016 5	0.018 1	0.033 1
雷公藤 74	福建省三明	0.068 4	0.023 9	0.005 2	0.004 7	0.022 7
雷公藤 70a	福建省三明	0.168 2	0.039 3	0.009 4	0.011 4	0.033 9
雷公藤 69	福建省三明	0.123 3	0.041 7	0.013 3	0.008 3	0.046 7
东北雷公藤安图 1	吉林省安图	0.001 6	0.071 6	0.003 4	0.025 4	0.011 3
东北雷公藤安图 2	吉林省安图	0.001 5	0.075 3	0.005 1	0.025 9	0.018 6
东北雷公藤安图 3	吉林省安图	0.003 9	0.090 4	0.013 2	0.030 9	0.022 6
东北雷公藤安图 4	吉林省安图	0.001 2	0.087 7	0.004 2	0.034 7	0.014 1
东北雷公藤 1	吉林省通化	0.002 5	0.020 7	0.020 8	0.022 9	0.047 9
东北雷公藤 2	吉林省通化	0.000 9	0.021 3	0.014 7	0.011 0	0.029 4
东北雷公藤 3	吉林省通化	0.000 0	0.014 6	0.014 5	0.028 9	0.011 9
东北雷公藤 4	吉林省通化	0.001 4	0.018 3	0.006 5	0.073 4	0.009 7
东北雷公藤 5	吉林省通化	0.001 0	0.004 6	0.001 6	0.008 4	0.008 9
东北雷公藤 6	吉林省通化	0.001 1	0.008 2	0.012 3	0.008 6	0.006 0
东北雷公藤 7	吉林省通化	0.000 6	0.014 8	0.007 0	0.011 3	0.007 4

2.6 统计学方法 采用 SPSS 统计学软件对雷公藤属 3 个物种化学成分含量数据进行统计学分析,结果显示,不同物种间雷公藤甲素、雷酚内酯和雷公藤红素含量,差异有统计学意义($P < 0.05$);不同物种间雷公藤内酯酮和雷酚新内酯含量,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

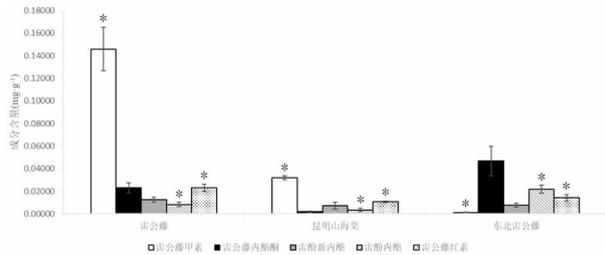


图2 雷公藤属植物含量测定统计分析图

注:雷公藤属 3 个物种化学成分含量比较, * $P < 0.05$

2.7 聚类分析 以雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚新内酯、雷酚内酯和雷公藤红素五种化学指标作为聚类指标,以各产区样品各指标作为聚类数据,采用系统聚类法对不同样品进行聚类分析。见图 3。

由图 3 可见,样品可被聚为四类,雷公藤 74、雷

公藤 75、雷公藤 76、雷公藤 77 被聚为一类,雷公藤 68a、雷公藤 78、雷公藤 79、雷公藤 80 和雷公藤 81 被聚为一类,昆明山海棠 1、雷公藤 69、雷公藤 70a、雷公藤 72 被聚为一类;东北雷公藤和昆明山海棠 2、3、4、5 被聚为另一类。可见,东北雷公藤样品可明显与雷公藤样品区分,2 者萜类成分整体含量有较大差异;而昆明山海棠样品混在 2 者之间不能区分。此外,雷公藤样品不能聚为一类,说明不同雷公藤样品之间萜类成分含量有差异,样品质量的稳定性不如东北雷公藤。雷公藤 74、75、76、77 与东北雷公藤样品可聚为一大类,这可能与其所处海拔与采收时间有关,使其萜类含量与东北雷公藤接近。

3 讨论

3.1 提取方法及色谱条件的选择 本实验在选择提取方法时,参考了不同文献^[9-12],比较了浸提法、加热回流法、煎煮法和超声提取法,综合提取时间,提取效率考虑,最终选择了超声提取法。

在确定色谱条件时,参考了不同的文献^[13-16],比较了 0.05% 磷酸水溶液、0.05% 乙酸水溶液、与

0.05% 磷酸水溶液相同 pH 值的乙酸水溶液作为流动相时的分离效果,比较了流速为 1 mL/min 和 0.8 mL/min 时的分离效果,实验结果显示,以 0.05% 磷酸水溶液为水相,流速为 0.8 mL/min 时,分离效果较好且基线相对平坦。

3.2 统计分析雷公藤属植物的差异 雷公藤属 3 个物种的萜类含量测定结果显示,雷公藤与昆明山海棠中的雷公藤甲素和雷公藤内酯酮含量,差异有统计学意义($P < 0.05$),而雷酚新内酯、雷酚内酯和雷公藤红素含量,差异无统计学意义($P > 0.05$)。雷公藤与东北雷公藤中的雷公藤甲素、雷酚内酯和雷公藤红素含量,差异有统计学意义($P < 0.05$),而雷公藤内酯酮和雷酚新内酯含量,差异无统计学意义($P > 0.05$)。东北雷公藤与昆明山海棠中的雷公藤甲素和雷酚内酯含量,差异有统计学意义($P < 0.05$),而雷公藤内酯酮、雷酚新内酯和雷公藤红素含量,差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 者比较,雷公藤、东北雷公藤和昆明山海棠中的雷公藤甲素、雷酚内酯和雷公藤红素含量,差异有统计学意义($P < 0.05$),而雷公藤内酯酮和雷酚新内酯含量,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其中,雷公藤中雷公藤甲素、雷酚新内酯和雷公藤红素的含量在 3 者中最高;东北雷公藤中雷公藤内酯酮和雷酚内酯的含量在 3 者中最高,而雷公藤甲素的含量在 3 者中最低;昆明山海棠中雷公藤内酯酮、雷酚新内酯、雷酚内酯和雷公藤红素的含量在 3 者中均最低。

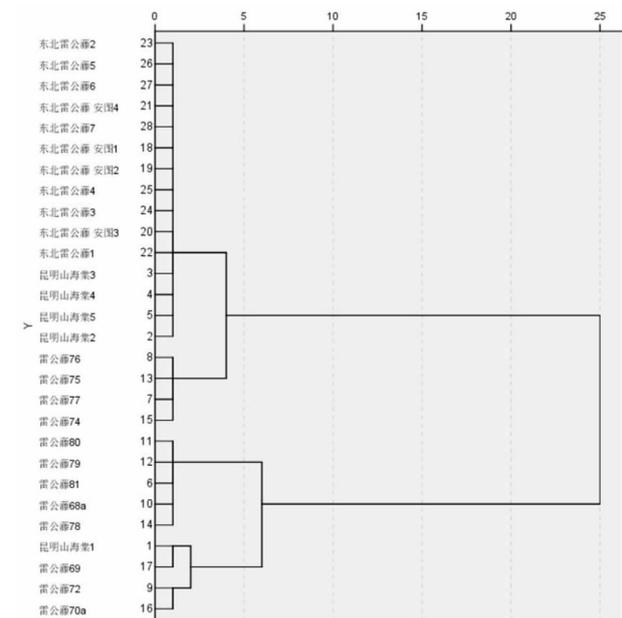


图3 系统聚类分析图

3.3 雷公藤属植物分类学争议 雷公藤属植物在分类学上一直存在争议。在《中国植物志》中,雷公

藤属植物分为了雷公藤、东北雷公藤和昆明山海棠 3 个种。然而在随后出版的《中国植物志》中,雷公藤属植物的 3 个种均被命名为雷公藤。据文献报道^[5],从遗传分类角度分析,雷公藤与昆明山海棠之间存在大量的中间类型,使种间界限模糊,而东北雷公藤可作为一个独立的物种。有定量分析表明^[13],雷公藤和昆明山海棠中 19 种化合物的含量存在显著性差异。但是,对不同种群和个体的雷公藤属植物进行雷公藤甲素含量测定,发现东北雷公藤中雷公藤甲素含量很低,而雷公藤和昆明山海棠中雷公藤甲素含量,差异无统计学意义($P > 0.05$)^[17]。此外,还有文献指出^[4],东北雷公藤和昆明山海棠中 11 个化学成分的含量,差异有统计学意义($P < 0.0001$)。本实验参照药用植物化学分类研究方法,基于萜类成分对样品进行系统聚类分析,通过系统聚类分析发现东北雷公藤与雷公藤可明显区分,2 者化学亲缘关系较远,而昆明山海棠混在 2 者之间,与 2 者无明显区分。

参考文献

[1] 杨芳. 雷公藤的研究进展[J]. 第一军医大学分校学报, 2003, 26 (2): 159-160.

[2] 张倩, 彭广操, 朱明军. 雷公藤的药理作用及毒性研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(15): 1753-1754.

[3] 刘雪梅, 刘志宏, 张晶, 等. 雷公藤临床应用及不良反应的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(2): 110-113.

[4] 陈一龙, 刘翔, 翟显友, 等. 雷公藤属植物物种间的化学成分差异性研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 319-326.

[5] 刘万水, 郭宝林, 陈玉婷, 等. 雷公藤属 3 种植物遗传关系与遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1615-1620.

[6] 刘玉凤, 潘丽, 南丽红, 等. 雷公藤药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(9): 37-39.

[7] 谢晨景, 周萍, 李祥, 等. 昆明山海棠化学成分及药理作用和临床应用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(13): 1996-2010.

[8] 刘建群, 刘健. 基于萜素聚类分析的凤尾蕨属药用植物化学分类研究[J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(5): 4-9.

[9] 徐晓勇, 马凤森, 方剑乔, 等. 响应面法优选雷公藤超声提取工艺[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1030-1034.

[10] 巴文强, 王利胜, 王珂, 等. 正交试验优选雷公藤提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 16-19.

[11] 田振, 刘志宏, 宋洪涛. 雷公藤有效部位提取纯化工艺研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(2): 408-412.

[12] 刘超, 郝庆秀, 金艳, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 比较雷公藤与昆明山海棠叶片的代谢产物差异[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1710-1717.

[13] Guo L, Duan L, Liu K, et al. Chemical comparison of *Tripterygium wilfordii* and *Tripterygium hypoglaucom* based on quantitative analysis and chemometrics methods[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 95(3): 220-228.

现正伪品序列存在显著差异,系统发育树分析亦呈单系^[14-15],故可从根据 COI 序列差异位点设计特异性引物进行鉴别。

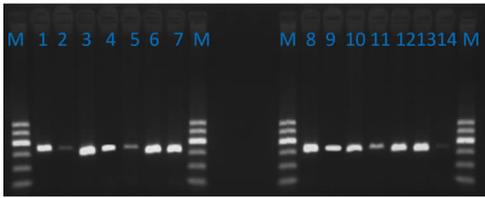


图2 使用 PCR 鉴别不同批次羚羊角和羚羊角塞

注:M;DL 500 Marker(条带大小自下而上依次为 100、150、200、300、400、500 bp);1~7:羚羊角;8~14:羚羊角塞



图3 使用 PCR 鉴别羚羊角塞常见伪品结果

注:M;DL 500 Marker(条带大小自下而上依次为 100、150、200、300、400、500 bp);1:普氏原羚;2~6:山羊角;7~11:鹅喉羚;12~14:藏原羚;15~18:藏羚羊;19~20:蒙原羚;21:水牛角

进行 PCR 分子鉴别的第一步是 DNA 提取,不同的方法其 DNA 提取效果可能会有区别,同时因羚羊角塞为骨制品, DNA 提取较为困难。为保证鉴别结果的准确性,本研究试验了不同的 DNA 提取方法(Promega DNA 提取试剂盒,柱式骨骼 DNA 提取试剂盒, SDS 法和 CTAB 法),发现各方法均能获得良好的提取效果,光吸收比值 $A_{260}/A_{280} > 1.5$, 浓度均 $> 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$,且均可满足 PCR 扩增的基本要求。本研究选择最为简便的 Promega DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。方法学考察是获得稳定、准确 DNA 分子鉴别方法的必要步骤^[16]。我们对影响 PCR 扩增的核心因素,如退火温度、PCR 循环次数、DNA 浓度、DNA 聚合酶用量及不同品牌的 PCR 仪和 DNA 聚合酶进行了考察,发现所建立的特异性 PCR 鉴别方法具有很强的稳定性。见表 3。为考察羚羊角塞特异性 PCR 鉴别方法的特异性和适用性,本研究收集了不同药材市场的 31 批羚羊角塞类正品和市场常见的 21 批羚羊角塞混伪品进行验证,结果仅正品能扩增获得约 300 bp 大小的条带,混伪品无条带,表明所建立的特异性 PCR 鉴别方法能专属

性鉴别待检样品是否为正品基原,对羚羊角塞药材的使用和流通的安全性与规范性起到保障作用。

参考文献

- [1] Milner-Gulland EJ, Kholodova MV, Bekenov A, et al. Dramatic declines in saiga antelope populations [J]. *Oryx*, 2001, 35(4): 340-345.
- [2] Milner-Gulland EJ, Bukreeva OM, Coulson T, et al. Conservation: Reproductive collapse in saiga antelope harems [J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 135.
- [3] 徐必达, 张华林. 羚羊角及其代用品的研究进展 [J]. *中药材*, 2003, 26(12): 910-914.
- [4] Yan D, Luo JY, Han YM, et al. Forensic DNA barcoding and bio-response studies of animal horn products used in traditional medicine [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(2): e55854.
- [5] 黄璐琦, 袁媛, 蒋超, 等. 动物药材分子鉴别现状与策略 [J]. *中国现代中药*, 2017, 19(1): 1-10.
- [6] 黄璐琦, 袁媛, 袁庆军, 等. 中药分子鉴定发展中的若干问题探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(19): 3663-3667.
- [7] 李敏, 黄龙妹, 赵欣, 等. 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(12): 1754-1757.
- [8] 李桂林, 宋雅迪, 吕振晖, 等. 基于 ITS 序列位点特异性 PCR 的酸枣仁及其混伪品的鉴别 [J]. *中国现代中药*, 2016, 18(12): 1566-1570.
- [9] 蒋超, 罗宇琴, 袁媛, 等. 多重位点特异性 PCR 鉴别人参, 三七, 西洋参掺杂 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(7): 1319-1323.
- [10] 丁铃, 赵丹, 周涛, 等. 杜仲药材特异性 PCR 的鉴定方法研究 [J]. *中药材*, 2015, 38(4): 730-734.
- [11] 蒋超, 赵群, 金艳, 等. 快速 PCR 技术鉴别中药材蛤蚧的方法研究 [J]. *中国现代中药*, 2017, 19(1): 21-25.
- [12] 张晓璐, 白素英, 徐艳春. 赛加羚羊的分子生物学鉴别 [J]. *东北林业大学学报*, 2006, 34(3): 106-108.
- [13] Cao M, Wang J, Yao L, et al. Authentication of animal signatures in traditional Chinese medicine of Lingyang Qingfei Wan using routine molecular diagnostic assays [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(4): 2485-2491.
- [14] Tong Y, Jiang C, Yuan Y, et al. Molecular identification of antelope horn by melting curve analysis [J]. *Mitochondrial DNA A*, 2016, 27(6): 3945-3951.
- [15] Chen J, Jiang Z, Li C, et al. Identification of ungulates used in a traditional Chinese medicine with DNA barcoding technology [J]. *Ecol Evol*, 2015, 5(9): 1818-1825.
- [16] 陈康, 蒋超, 金艳, 等. 人参属中药材高分辨率熔解曲线鉴定及其方法学考察 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(1): 64-73.

(2017-12-05 收稿 责任编辑: 张文婷)

(上接第 251 页)

- [14] Su P, Cheng Q, Wang X, et al. Characterization of eight terpenoids from tissue cultures of the Chinese herbal plant, *Tripterygium wilfordii*, by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Biomedical Chromatography*, 2014, 28(9): 1183-1192.
- [15] 吴春敏. 雷公藤化学成分与多组分含量测定研究 [D]. 上海: 第

二军医大学药学院药物分析学教研室, 2010.

- [16] 马鑫斌, 巴文强, 王珂, 等. 雷公藤药材中雷公藤甲素及总二萜内酯的含量测定 [J]. *中国中医药*, 2014, 12(6): 153-155.
- [17] 黄文华, 郭宝林, 斯金平, 等. 雷公藤属 3 种植物不同群体和个体中雷公藤甲素的研究 [J]. *中草药*, 2005, 36(7): 1065.

(2017-12-05 收稿 责任编辑: 张文婷)