

博落回本草考证及其鉴定研究

章伟, 潘泽玥, 章蕾, 董姝洁, 仇凤梅, 黄真^{*}(浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 开展博落回及其相似品种的中药鉴定研究。方法 通过查阅历代本草书籍和近现代文献资料, 对博落回进行系统梳理与考证; 采用传统中药鉴定、显微鉴定、理化鉴定以及分子鉴定等鉴别方法对博落回及其相似品种进行鉴定。结果 得到博落回本草考证资料; 博落回与小果博落回以及其他相似品种的性状、显微、理化、分子特征均有一定区别; 分子鉴定结果显示, 博落回 rbcL 序列长度在 600~603 bp, 平均 GC 碱基含量在 43.95%~44.28%; 博落回与其他相似品种间的变异位点存在较大差异, 其中与小果博落回的变异位点最少; 博落回与其相似品种的种间遗传距离均大于其最大种内遗传距离; 基于 rbcL 构建的 NJ 树可对博落回与其他相似品种进行有效区分; 博落回与其相似品种在 rbcL 二级结构上存在显著差异。结论 构建了博落回与小果博落回以及其他相似品种的中药鉴定方法, 为博落回的品种鉴定及后续中药资源开发提供实验基础。

关键词: 博落回; 相似品种; 本草考证; 传统中药鉴定; rbcL 分子标记

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)06-0750-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230732

引用本文: 章伟, 潘泽玥, 章蕾, 等. 博落回本草考证及其鉴定研究[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(6): 750-759.

Study on Herbal Textual Research and Identification of *Macleaya Cordata*

ZHANG Wei, PAN Zeyue, ZHANG Lei, DONG Shujie, Qiu Fengmei, HUANG Zhen^{*}(School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study on the identification of traditional Chinese medicine of *Macleaya cordata*(*M. cordata*) and its similar varieties. **METHODS** By consulting the ancient herbal books and modern literature, this paper systematically combs and studies the *M. cordata*. The morphological identification, microscopic identification, physicochemical identification, molecular identification were used to identify *M. cordata* and its similar varieties. **RESULTS** Obtained *M. cordata* herbal textual research data. There were some differences between *M. cordata* and *Macleaya microcarpa*(*M. microcarpa*) and other similar varieties in traits, microscopic, physicochemical and molecular characteristics. Molecular identification results showed that the length of the rbcL gene of *M. cordata* were 600 bp to 603 bp, with the average GC content ranging from 43.95% to 44.28%. There were significant differences in the variation sites between *M. cordata* and other similar varieties, and the variation sites with *M. microcarpa* were the least. The interspecific genetic distance between *M. cordata* and its similar varieties was greater than its maximum intraspecific genetic distance. NJ analysis results of rbcL could effectively distinguish *M. cordata* from other similar varieties accurately and quickly. There were significant differences in the secondary structure of rbcL between *M. cordata* and its similar varieties. **CONCLUSION** The traditional Chinese medicine identification methods of *M. cordata*, *M. microcarpa* and other similar varieties are constructed, which provides experimental basis for the variety identification of *M. cordata* and the subsequent development of traditional Chinese medicine resources.

KEYWORDS: *Macleaya cordata*; similar varieties; herbal authentication; identification of traditional Chinese medicine; rbcL barcoding analysis

博落回 (*Macleaya cordata*) 是罂粟科博落回属多年生草本植物, 主要生长于山坡及草丛中, 在中国长江中下游广泛分布, 药用部位为其带根全草, 其味微辛、苦, 性寒, 有大毒, 具有行气消肿、清热解毒和杀虫功效^[1], 主治恶疮, 顽癣, 湿疹, 蛇虫咬伤, 跌打肿痛, 风湿痹痛等。外用适

量, 捣敷; 或煎水黑洗; 或研末调敷。秋、冬季采收, 根与茎叶分开, 晒干, 干燥处保存^[2]。研究表明, 博落回主要活性成分为异喹啉类生物碱, 具有抗炎、抑菌、抗肿瘤等药理作用^[3-4]。博落回属为罂粟科下的一个独立属^[5], 同属植物小果博落回 (*Macleaya microcarpa*) 与博落回植物学形态相

基金项目: 全国中药资源普查 (国中医药办科技函 [2018]132 号); 国家级大学生创新创业项目 (202110344001X); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目 (2022R410C061)

作者简介: 章伟, 男, 硕士生 E-mail: 452623149@qq.com

通信作者: 黄真, 女, 硕士, 教授 E-mail: huangzhen@zcmu.edu.cn

似,功效相近,干燥后难以区分,其常作为博落回的替代品入药,但其有效成分及毒性物质含量均有一定差异,如血根碱和白屈菜红碱等^[6],为博落回的临床应用带来了一定的安全隐患。因此快速准确鉴别博落回与其相似品种是其用药的关键点。除传统中药鉴定技术外,DNA条形码技术是一种利用基因组中一段标准的、相对较短的DNA片段进行物种鉴定的新方法,是药用植物传统鉴别的有效补充^[7]。在过去几十年间,核基因组条形码ITS2和叶绿体基因组条形码rbcL、matK、trnH-psbA作为通用型标准DNA条形码应用于大多数植物的鉴定中^[8]。其中rbcL序列作为鉴定陆生植物的通用条形码之一,相较于ITS2具有更高的种属特异性,且叶绿体在中药材的采收炮制过程中更加稳定,易于扩增,更适宜于中药材的分子鉴定研究。

为加快博落回的开发应用,本研究对其基原、名称、产地、形态考证研究,梳理博落回整个历史演变发展脉络,考证开发中所涉及的关键信息,通过传统中药鉴定研究博落回及小果博落回的性状、显微、理化差异,利用rbcL片段序列结合DNA二级结构的辅助手段对博落回与小果博落回及其他4种相似品种中药比较分析,为博落回的快速准确鉴定提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 药材

博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.采自浙江杭州,小果博落回 *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde采自湖北黄冈,由浙江中医药大学汪红教授鉴定。

1.2 仪器与试剂

EOS 60D 佳能单反相机(佳能公司); Nikon Eclipse 正置生物显微镜(日本尼康公司); KD-BM 生物组织包埋机(浙江金华市科迪仪器设备有限公司); KD-BL 包埋机冷冻台(金华科迪仪器设备有限公司); HM430 石蜡切片机(美国 Thermo); YT-6C 生物组织摊烤片机(亚光医用电子技术有限公司); DYY-8C 电泳仪(北京六一生物科技有限公司); ABI ProflexPCR 仪(上海土森视觉科技有限公司); DZKW-4 电子恒温水浴锅(北京中兴科技有限公司); SCANSPEED 1730R 离心机[基因生物技术国际贸易(上海)有限公司,离心半径11 cm]; GL323-ISCN 多功能精密电子天平(梅特勒-多利多

公司); ChemiDocTMMP 凝胶成像系统(苏州莫纳生物科技有限公司)。

2% CTAB 抽提缓冲溶液(批号: ALS00066)、10 PCR buffer(批号: SL2606)均购自杭州正伯生物科技有限公司; TE 缓冲液(南通飞宇生物科技有限公司,批号: FY42053); 50×TAE 溶液(杭州高晟生物科技有限公司,批号: BL533A-1); 4S Red Plus 核酸染料(北京中冉旭升科技发展有限公司,批号: A606695); 2000 DNA Marker(北京沿程科技有限公司,批号: DM02040); 10×Loading Buffer(杭州鲲鹏基因科技有限公司,批号: LB803); dNTP Mix[宝如亿(北京)生物技术有限公司,批号: 1708874]; rTaq 酶(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号: R832384); 琼脂糖(杭州囊萤科技有限公司,批号: AC901); 无水乙醇(批号: MR114568)、β-巯基乙醇(批号: M301573)、异戊醇(批号: MR113441)、甲醇(批号: M116119)均购自杭州邦易化工有限公司; 稀甘油(上海创赛科技有限公司,批号: PM01674); 水合氯醛(温州普诺生物科技有限公司,批号: C104202); 氯仿(批号: 3811)、浓硫酸(批号: 11391)均购自华东医药股份有限公司器材化剂分公司; 甲醛(批号: C11969.K2)、冰醋酸(批号: A38)均购自国药集团化学试剂有限公司; FAA 固定液由 10% 甲醛 5 mL、冰醋酸 5 mL、70% 乙醇 90 mL 配制而成。

1.3 方法

1.3.1 博落回本草考证 通过考证分析博落回历代本草著作及查阅现代文献,梳理博落回药材的基原、名称、产地、形态,厘清博落回历史脉络。

1.3.2 性状鉴定 采用中药鉴定基本方法如眼观、手摸及尺量观察,结合相关文献资料^[5]对植物形态特征进行描述。药材从形状、大小、颜色、质地、断面、气味等性状特征进行描述。

1.3.3 显微鉴定 石蜡永久制片:按文献^[9-10]并结合预试验结果改进,制成石蜡片观察。

叶表面水装片制备:取新鲜博落回叶片,浸润后撕取叶片表面,制成水装片观察。

粉末透化制片:用水合氯醛试液、稀甘油试液制成博落回粉末的切片并观察。

1.3.4 理化鉴定 取博落回、小果博落回药材粗粉各 10 g,分别置于圆底烧瓶中,加入 75% 乙醇

100 mL, 于水浴加热回流 1 h, 放冷, 过滤。将醇提液分为若干份, 分别对鞣质、皂苷、有机酸、黄酮、甾醇及三萜类、生物碱、香豆素及内酯等成分进行检查, 观察并记录实验结果。

1.3.5 分子鉴定 DNA 提取: 称取 7 份不同株的新鲜博落回叶片, 每份 100 mg, 采用改良的 CTAB 法提取植物叶绿体基因组, 利用凝胶电泳检测 DNA 质量, 将质量合格的 DNA 置于-120℃保存备用。

PCR 扩增及测序 rbcL 扩增引物由上海桑尼公司合成, 引物序列 (5'-3') 如下 rbcL-F: ATG-TCACCACAAACAGAGACTAAAGC; rbcL-R: GT-AAAATCAAGTCCACCRCG (R=A/G)。PCR 反应扩增体系 50 μL, 其中, Mix Taq 酶 25 μL, 超纯水 12 μL, 正向引物 5 μL, 反向引物 5 μL, 模板 DNA 3 μL。扩增程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 0.8% 凝胶电泳检测, 可获得单一明亮条带, 后将 PCR 扩增产物送至上海桑尼公司进行双向测序。

数据处理: 通过 Blast 对测序结果的准确性和方向性进行确认, 并利用 Bioedit 对反向序列进行人工校正, 除去上下游引物, 利用 Bankit 将序列信息提交至 Genbank 数据库。通过 Bioedit 和 MEGA 对序列的碱基组成、变异位点进行分析, 并基于 K2P 模型计算博落回序列及其相似品种的种内种间遗传距离, 构建 NJ 系统发育树分析物种间的亲缘关系。

rbcL 二级结构预测 利用 VectorBuilder 平台对博落回及其同属物种小果博落回的二级结构进行预测并解析。

2 结果

2.1 博落回本草考证

2.1.1 基原考证 博落回首载于唐代陈藏器所编著的《本草拾遗》, 曰: “博落回, 有大毒。主恶疮, 癰根, 瘤赘, 息肉, 白癫风, 蛊毒, 精魅溪毒, 已上疮痿者和百丈青、鸡桑灰等为末, 傅痿疮蛊毒精魅, 当有别法”^[1], 表明唐代时博落回便已作药用, 因其有大毒, 故多见于外敷, 主治恶疮, 癰根等外科疾病。在唐代《酉阳杂俎》中记载: “落回一曰博落回, 有大毒, 生江淮山谷中。茎叶如麻。茎中空, 吹作声如勃遛回, 因

名之”^[12], 博落回因茎中空, 吹其茎杆能发出独特声音如勃遛, 曾被用作乐器, 故又名勃遛回。明代《本草纲目》^[13]、北宋《经史证类备急本草》^[14]及尚志钧校订的《大观经史证类备急本草》^[15]皆引自《本草拾遗》之言。其中《本草纲目》^[14]因博落回茎叶如蓖麻, 将博落回附录于“蓖麻”条下, 本草记载与现今所用博落回基本一致。清朝吴其濬《植物名实图考长编》描述了博落回花期、形态等, 记载道: “今江西广饶间极多, 生河滨荒阜, 非山草也……四五月有花生梢间, 长四五分, 色白, 不开放, 微似南天烛”^[16]。以上各书所述植物与今罂粟科植物博落回大致相仿, 开展博落回的溯源研究, 从本草古籍中挖掘更多中药资源, 为进一步安全、有效、合理开发博落回资源提供理论依据, 对中医药文化的守正创新具有重大意义。

2.1.2 名称考证 博落回在唐代《本草拾遗》中记载道: “生江南山谷, 茎叶如蓖麻, 茎中空, 吹作声, 如博落回”^[11], 《酉阳杂俎》中记载: “落回一曰博落回, 有大毒, 生江淮山谷中。茎叶如麻。茎中空, 吹作声如勃遛回, 因名之”^[12], 清代《植物名实图考长篇》中对其名称也有记载, “今江西广饶间极多, 生河滨荒阜, 非山草也……案牍中时有之, 亦呼为勃勒回……湖南长沙亦多, 土名号简草, 知其有声, 不知其有毒, 是以无服之者”^[16]。结合文献资料搜集, 在唐代以后不同地区 (民间) 对于博落回有许多俗称, 见表 1。

表 1 博落回分布地区及俗称^[5]

Tab. 1 *Macleaya cordata*'s distribution areas and common names^[5]

地区	俗称
广西 ^[17]	三钱三、翻牛白、狮子爪、滚地龙
广东 ^[18]	通心竹、泡通珠、救命王
浙江	喇叭竹、空洞草、猢猻竹、角罗吹、山梧桐
湖南	号筒杆、泡通珠、边天蒿、通天大黄
江西 ^[19]	大叶莲、土霸王、号桐树
福建 ^[20]	洗五角、海骨子、地布罗、号海樵、菠萝筒
湖北	黄杨杆
江苏 ^[2]	落回、山梧桐、博勒回
贵州、安徽、河南	黄薄荷吹火筒、蛇罗麻、哈哈筒野麻杆

2.1.3 形态考证 《本草拾遗》中描述博落回“茎叶如蓖麻, 茎中空, 吹作声, 如博落回, 折之有黄汁”^[11]。可以推测其形态: 直立草本, 茎

绿色且光滑，中空，上部多分枝；叶片单叶互生，阔卵形；全体带有白粉，折断后有黄汁流出。《全国中草药汇编》中记载：“多年生草本，高 1~2 m，全体带有白粉，折断后有黄汁流出。茎圆柱形，中空，绿色。单叶互生，阔卵形，上面绿色，光滑，下面白色，具密细毛；蒴果下垂，倒卵状长椭圆形，扁平，红色。花果期 6~11 月”^[1]。《中国植物志》中记载：“直立草本，基部木质化，具乳黄色浆汁。茎高 1~4 m，绿色，光滑，多白粉，中空。叶片宽卵形或近圆形，表面绿色，无毛，背面多白粉；蒴果狭倒卵形或倒披针形，先端圆或钝，无毛。种子 4~6 枚，卵珠形”^[5]。

2.1.4 产地考证 历代本草著作关于博落回产地的记载均较简单。《本草拾遗》^[11]言博落回“生江南山谷”，《酉阳杂俎》^[12]称其“生江淮山谷中”，这些记载说明博落回喜温暖湿润环境，在唐代时的江苏地区就有分布。随着朝代的变迁，博落回的产地越来越广泛。《植物名实图考长篇》云：“今江西广饶间极多，生河滨荒阜，非山草也……湖南长沙亦多，土名号筒草，知其有声，不知其有毒，是以无服之者”^[16]，在清代时江西广东一带分布极多，湖南长沙也有较多分布。《中国高等植物图鉴》中记载：“其主要分布在甘肃、陕西、湖北北部、河南和江苏北部”^[21]。《中华本草》中记载：“博落回生于海拔 2 000 m 以下的低山河边、沟岸、路旁等处，分布于江苏、安徽、浙江、江西等地”^[22]。《中国植物志》记载：“博落回在我国长江以南、南岭以北的大部分省区均有分布，南至广东，西至贵州，西北达甘肃南部”^[5]。《全国中草药汇编》中记载：“生于山坡、路边及沟边，分布长江流域中、下游各省”^[1]。随着时间的推移，博落回产地相较于古代更加广泛，可能原因一是其具有较强的生态适应能力，二是其对生境要求发生改变。

2.2 性状鉴定

2.2.1 博落回与小果博落回原植物鉴定 博落回为多年生直立草本植物，全株具乳黄色浆汁。茎中空绿色，光滑，多白粉。单叶互生，叶宽卵形或近圆形，裂片有不规则波齿状，叶上表面绿色、无毛，背面多白粉、被细绒毛。大型圆锥花序，蒴果狭倒卵形或倒披针形，种子 4~8 枚，见图 1A~C。

小果博落回为多年生直立草本植物，基部木质化，具乳黄色浆汁，多白粉。茎中空绿色，呈圆柱形，上部多分枝。叶宽卵形或近圆形，先端急尖、钝或圆形，基部心形，表面绿色，无毛，背面多白粉，被绒毛。大型圆锥花序多花，蒴果近圆形，种子卵珠形，见图 1E~G。

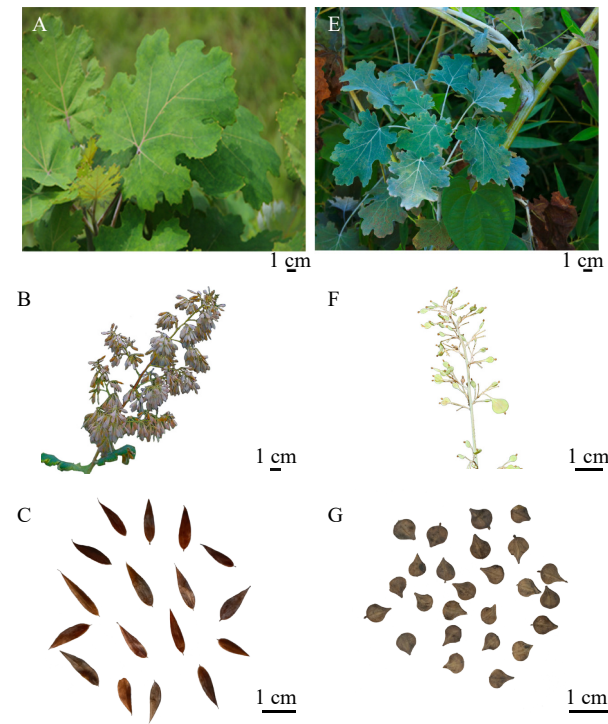


图 1 博落回和小果博落回形态

A-博落回；B-博落回蒴果；C-博落回种子；E-小果博落回；F-小果博落回蒴果；G-小果博落回种子。

Fig. 1 Morphological of *Macleaya cordata* and *Macleaya microcarpa*

A-*Macleaya cordata*; B-*Macleaya cordata* capsule; C-*Macleaya cordata* seeds; E-*Macleaya microcarpa*; F-*Macleaya microcarpa* capsule; G-*Macleaya microcarpa* seeds.

2.2.2 博落回与小果博落回药材性状鉴定 博落回药材根及根茎圆柱形或长椭圆形，表面暗棕色。茎圆柱形中空，表面灰棕色或黄棕色，质脆易折断，断面纤维性，有的髓表面呈黄色。单叶互生，多皱缩破碎。花序圆锥状，多皱缩扭曲。蒴果狭倒卵形或倒披针形，扁平，种子 4~6 枚，见图 2A。

小果博落回药材根及根茎圆柱形，呈黄褐色。茎中空，表面黄褐色。单叶互生，多皱缩、破碎，完整者有浅裂，裂片有不规则波状齿；叶上表面呈黄褐色，叶下表面呈灰褐色，具白色柔毛。花瓣卵圆形，蒴果近圆形，种子卵珠形，基着，直立，见图 2B。

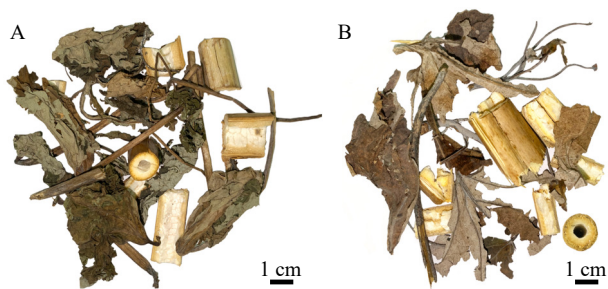


图2 博落回和小果博落回药材

A-博落回; B-小果博落回。

Fig. 2 Medicinal material of *Macleaya cordata* and *Macleaya microcarpa*

A-*Macleaya cordata*; B-*Macleaya microcarpa*.

2.2.3 其他相似品种植物特征 小果博落回作为博落回同属植物，在植物形态上易与博落回混淆，是博落回相似品种之一。除此之外，还存在不少与博落回在植物形态上相似的同科异属植物。以下对4种博落回相似品种植物作性状鉴定研究。

白屈菜为罂粟科白屈菜属植物 (*Chelidonium majus* L.)，多年生直立草本植物，主根粗壮，侧根较多。茎呈聚伞状，呈绿色，多分枝，多具白色柔毛。基生叶少，叶倒卵状长圆形或宽倒卵形，羽状全裂，倒卵状长圆形，具不规则的深裂或浅裂，裂片边缘圆齿状，叶表面绿色，无毛，背面具白粉，疏被短柔毛。伞形花序多花，蒴果狭圆柱形，种子卵形，暗褐色。

荷青花为罂粟科荷青花属植物 [*Hylomecon Japonicum* (Thunb.) Prantl]，多年生草本植物，根茎斜生，茎直立，不分枝，具条纹，无毛。基生叶少数，叶片羽状全裂，裂片2~3对，宽披针状菱形、倒卵状菱形或近椭圆形，先端渐尖，基部楔形，边缘具不规则的圆齿状锯齿或重锯齿，表面深绿色，背面淡绿色，两面无毛；花芽卵圆形，花瓣倒卵圆形或近圆形；蒴果，无毛。种子卵形。

西欧绿绒蒿为罂粟科绿绒蒿属植物 [*Meconopsis cambrica* (L.) Vig.]，为1年生或多年生草本植物，主根肥厚明显，茎分枝。叶全部基生成莲座状或生于茎上；叶片全缘、具锯齿、羽状浅裂或羽状全裂；花单生或总状，蒴果近球形或卵形，种子多数，卵形或肾形^[23]。

罂粟为罂粟壳罂粟属植物 (*Papaver somniferum* L.)，为1年生草本植物，主根近圆锥状，垂直。茎直立，不分枝。叶片卵形或长卵形，先端

渐尖至钝，基部心形；花单生，花瓣近圆形或近扇形；蒴果球形或长圆状椭圆形。种子黑色或深灰色，表面呈蜂窝状^[5]。

2.3 博落回显微鉴定

2.3.1 根和茎横切面石蜡切片 根横切面由表皮、皮层、韧皮部、形成层、木质部组成。其中皮层宽广约占横切面的1/3，薄壁细胞中含极少量细小草酸钙簇晶；木质部较发达，导管向四周大致呈辐射状排列，细胞壁木化加厚，射线由9~15列薄壁细胞组成。茎横切面由表皮、皮层、韧皮部、形成层、木质部、无限外韧型维管束、髓组成。维管束无限外韧型，约8个环列，内外可见乳管群；髓部宽广，细胞呈不规则多边形，排列疏松，老茎髓部细胞较大，见图3。其中根部皮层、射线、导管群，茎中无限外韧型维管束、乳管群可作为根、茎主要鉴别依据。

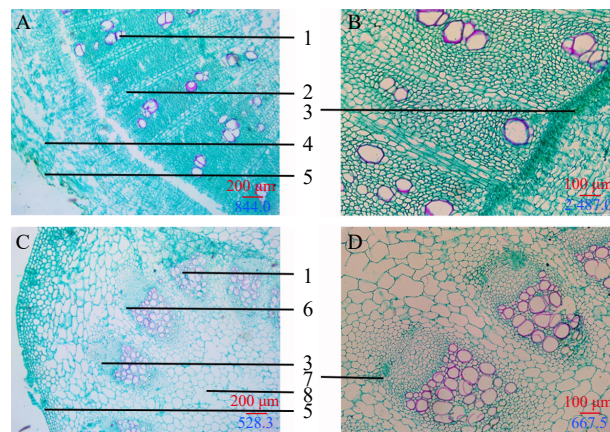


图3 博落回根、茎横切面显微图

A-博落回根横切面整体图(200×); B-根横切面后含物(400×); C-博落回茎横切面整体图(200×); D-茎横切面后含物(400×); 1-导管; 2-射线; 3-形成层; 4-皮层; 5-表皮; 6-韧皮部; 7-乳管群; 8-髓。

Fig. 3 Microscopic identification of *Macleaya cordata* root and stem

A-overall cross section of *Macleaya cordata* root(200×); B-post-inclusions in root transverse section(400×); C-overall cross section of *Macleaya cordata* stem(200×); D-post-inclusions in stem transverse section(400×); 1-catheter; 2-ray; 3-cambium; 4-cortex; 5-epidermis; 6-phloem; 7-milk duct group; 8-pith.

2.3.2 叶下表皮制片观察 叶下表皮细胞垂周壁波状弯曲，略增厚，气孔不定式。气孔器周围副卫细胞数目不定，大小基本相同，副卫细胞5~7个，见图4。

2.3.3 粉末制片的显微特征

2.3.3.1 博落回粉末显微特征 博落回粉末呈黄绿色。气孔众多；导管以梯纹导管、螺纹导管为主，多散在；木纤维细胞壁微木化；薄壁细胞中

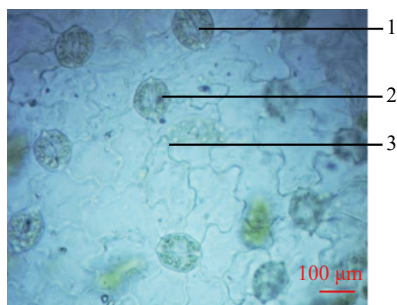


图4 叶表面观(100×)

1-气孔; 2-保卫细胞; 3-副卫细胞。

Fig. 4 Leaf epidermis view(100×)

1-stomatal; 2-guard cell; 3-secondary guard cell.

含棕色团块状物质; 腺毛及非腺毛较多, 散在于叶组织中; 淀粉粒较少; 草酸钙簇晶少见或单个散在, 见图5。

2.3.3.2 小果博落回粉末显微特征 小果博落回粉末呈黄棕色, 纤维和薄壁细胞中含糊粉粒, 薄壁细胞中含少量草酸钙簇晶, 棱角宽钝。导管有梯纹导管、网纹导管和具缘纹导管。有黄棕色团块, 木栓细胞呈长方形。有淀粉粒, 单粒类圆形, 脐点点状或一字形。气孔为不定式; 有非腺毛, 见图6。

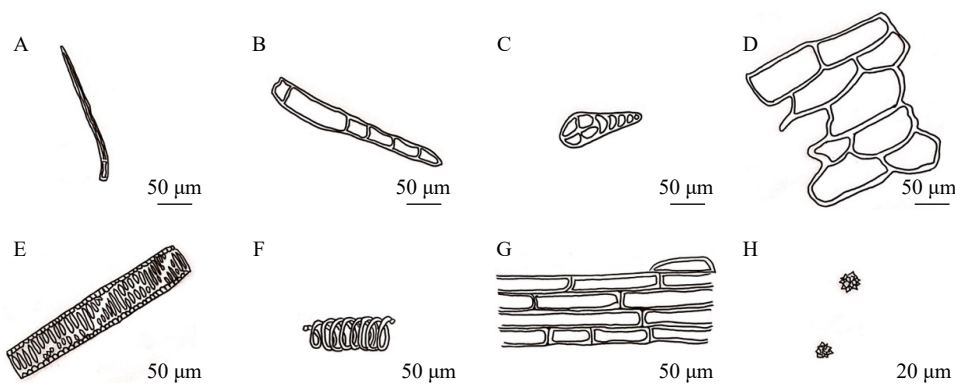


图5 博落回粉末图(A~G: 200×; H: 400×)

A~B-非腺毛; C-腺毛; D-薄壁细胞; E-梯纹导管; F-螺纹导管; G-木纤维细胞; H-草酸钙簇晶。

Fig. 5 Powder diagram of *Macleaya cordata* (A~G: 200×; H: 400×)

A~B-non glandular hair; C-glandular hair; D-parenchymal cell; E-ladder pattern duct; F-thread duct; G-wood fiber cell; H-calcium oxalate crystal.

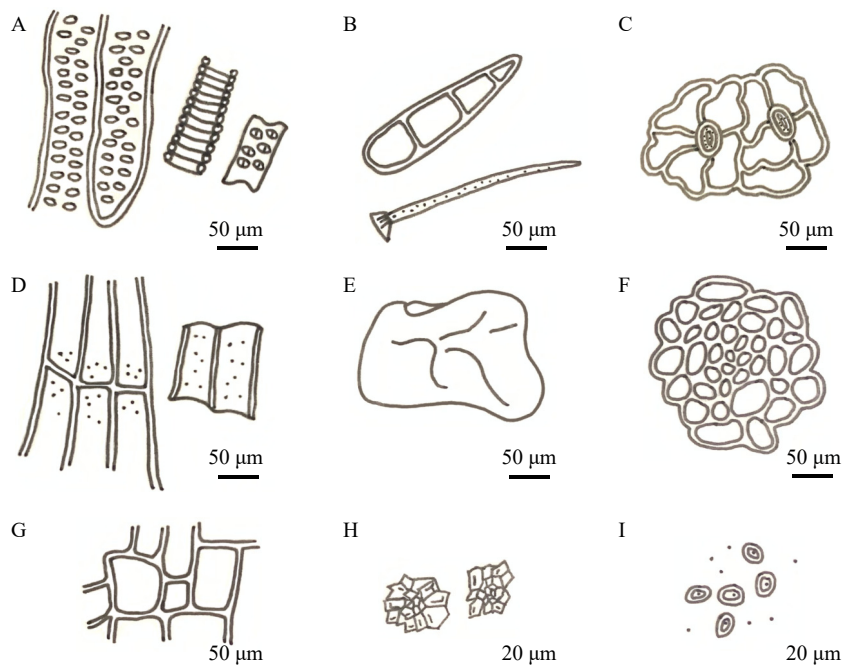


图6 小果博落回粉末图(A~G: 200×; H~I: 400×)

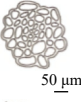
A-导管; B-非腺毛; C-气孔; D-纤维; E-棕色团块; F-薄壁细胞; G-木栓细胞; H-草酸钙簇晶; I-淀粉粒。

Fig. 6 Powder diagram of *Macleaya microcarpa* (A~G: 200×; H~I: 400×)

A-vessel; B-non glandular hair; C-stoma; D-fiber; E-brown mass; F-parenchyma cell; G-phellem cell; H-cluster crystal of calcium oxalate; I-starch grain.

为清晰博落回与小果博落回粉末特征，以下
为博落回与小果博落回粉末显微特征对照表2。

表2 博落回与小果博落回粉末特征对照
Tab. 2 Comparison of powder characteristics between
Macleaya cordata and *Macleaya microcarpa*

名称	博落回	小果博落回
非腺毛		
腺毛		
薄壁细胞		
导管		
草酸钙簇晶		
木纤维细胞		
气孔		
木栓细胞		
淀粉粒		
棕色团块		

2.4 理化鉴定结果

博落回药材中含有鞣质、有机酸、皂苷、黄酮、甾醇、三萜类、生物碱、香豆素、内酯等化学成分。博落回醇提液 pH 值 6~7，显酸性，表明有有机酸成分；醇提液加碘-碘化钾显红棕色验证含生物碱类成分；Liebermann-Burchard 醋酸-浓硫酸反应显由黄色变红色说明有甾醇、三萜类物质；其他鞣质、黄酮、香豆素、内酯定性检查均为正反应。小果博落回药材中均含有鞣质、有机酸、皂苷、黄酮、甾醇、三萜类、生物碱、香豆素、内酯等化学成分，见表3。

2.5 分子鉴定

2.5.1 rbcL 序列分析 从 Genbank 数据库下载博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.、小果博落回 *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde、白屈菜 *Chelidonium majus* L.、荷青花 *Hylomecon Japonicum* (Thunb.) Prantl、西欧绿绒蒿 *Meconopsis cambrica* L.、罂粟 *Papaver somniferum* L. 的 rbcL 序列。植物样品信息见表4。

表3 博落回和小果博落回理化鉴定结果
Tab. 3 Physicochemical identification results of *Macleaya cordata* and *Macleaya microcarpa*

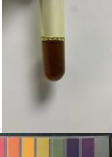
检查项目	反应名称及试液	博落回	小果博落回
鞣质	三氯化铁		
皂苷	泡沫试验		
有机酸	pH试纸试验		
黄酮	盐酸-镁粉试验		
甾醇、三萜类	醋酸-浓硫酸试验		
生物碱	碘化铋钾		
香豆素、内酯	荧光检测		

表4 样品信息
Tab. 4 Source of materials used in present study

编号	名称	拉丁名	单倍型	样品来源	Genbank 登录号
MC-01	博落回	<i>Macleaya cordata</i>	A1	浙江杭州	MZ062443
MC-02	博落回	<i>Macleaya cordata</i>	A2	浙江杭州	MZ062444
MC-03	博落回	<i>Macleaya cordata</i>	A3	浙江杭州	MZ062445
MC-04	博落回	<i>Macleaya cordata</i>	A4	浙江杭州	MZ062446
MC-05	博落回	<i>Macleaya cordata</i>	A5	浙江杭州	MZ062447
MC-06	博落回	<i>Macleaya cordata</i>	A6	浙江杭州	MZ062448
MC-07	博落回	<i>Macleaya cordata</i>	A7	浙江杭州	MT178411
MM-01	小果博落回	<i>Macleaya microcarpa</i>	B1	湖北黄冈	MH658205
CM-01	白屈菜	<i>Chelidonium majus</i>	C1	湖北黄冈	MH713902
CM-02	白屈菜	<i>Chelidonium majus</i>	C2	湖北黄冈	MH657992
CM-03	白屈菜	<i>Chelidonium majus</i>	C3	湖北黄冈	HQ590028
HJ-01	荷青花	<i>Hylomecon japonica</i>	D1	Genbank	MH658011
MC'-01	西欧绿绒蒿	<i>Meconopsis cambrica</i>	E1	Genbank	JN892936
PS-01	罂粟	<i>Papaver somniferum</i>	F1	Genbank	MG248990

对浙江杭州地区的 7 个博落回 *rbcL* 序列进行了扩增和测序, 结果表明博落回样品 *rbcL* 序列长度在 600~603 bp, GC 碱基含量范围为 43.95%~44.28%, 种内有 6 个变异位点, 存在 6 种单倍型, 明确了本地区博落回的种质资源的遗传多样性。小果博落回的 *rbcL* 序列长度为 562 bp, 与博落回的同源性为 98.67%, 见表 5。

表 5 博落回及其相似品种 *rbcL* 序列分析信息
Tab. 5 Sequence analysis information of *rbcL* of *Macleaya cordata* and its similar varieties

样品名	序列长度/bp	GC 含量/%	种内变异位点	种间变异位点
博落回	600~603	43.95~44.28	6	/
小果博落回	562	43.59	/	11
白屈菜	569~606	43.59~43.73	/	16
荷青花	565	43.36	/	17
西欧绿绒蒿	541	43.81	/	24
罂粟	552	42.93	/	27

其他同科植物的 *rbcL* 序列长度在 541~606 bp, GC 含量变化范围为 42.93%~43.81%, 变异位点变化范围为 11~27 个。由此可见, 在 GC 含量方面博落回与其相似品种的差异不大; 在变异位点方面, 博落回与同属植物小果博落回序列间变异位点最少, 与其他同科植物的变异位点存在较大差异, 可证实博落回与小果博落回在遗传信息方面的差异最小。

2.5.2 遗传距离分析 本研究通过 MEGA7 软件, 基于 Kimura 2-Parameter (K2P) 模型对博落回及其相似品种的遗传距离进行分析, 基于 *rbcL* 条形码序列遗传结果分析显示, 博落回的种内遗传距离变化范围为 0~0.003, 平均种间遗传距离为 0.001, 与小果博落回的种间遗传距离为 0.006, 与白屈菜、荷青花、西欧绿绒蒿、罂粟种间遗传距离分别为 0.015, 0.033, 0.017, 0.030。表明博落回的种内平均遗传距离均小于博落回与其他相似品种的种间平均遗传距离, 存在显著性差异, 且博落回与其他相似品种的种间遗传距离均大于博落回的最大种内遗传距离, 条形码不存在重叠部分, 说明 *rbcL* 可用于鉴别博落回及其相似品种, 且小果博落回的与博落回的遗传距离最小。

2.5.3 NJ 系统发育树分析 为进一步验证实验结果, 本研究基于 K2P 模型, 构建了 7 个博落回样品和 7 个博落回相似品种样品的 *rbcL* 序列的 NJ 系统发育树。7 个博落回样品可形成一个分

支, 与其他相似品种可明显区分, 后又与小果博落回形成一个大的分支, 提示二者之间的亲缘关系相近, 见图 7。结果表明, 利用 *rbcL* 基因片段可鉴定博落回及其相似品种, 丰富博落回分子鉴定条形码数据库, 为博落回鉴定提供多重参考。

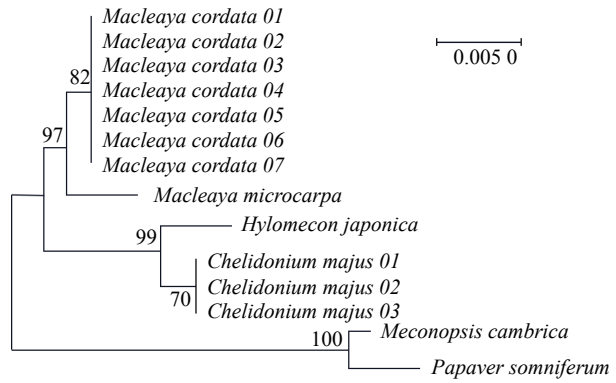


图 7 基于 *rbcL* 序列构建的博落回及其相似品种的 NJ 树
Fig. 7 NJ tree of *Macleaya cordata* and its similar varieties constructed based on *rbcL* sequence

2.5.4 *rbcL* 二级结构分析 Vector Builder 网站预测结果显示, 博落回与白屈菜、荷青花、西欧绿绒蒿、罂粟的二级结构之间区别明显, 其中白屈菜和罂粟的四个螺旋区分布较其他物种无法清晰地区分。博落回和小果博落回的二级结构相似, 均由 1 个中心环 (主环) 及 4 个螺旋区 (helix) 组成, 每个螺旋区又具有数量不一、大小有别的茎环 (loop) 结构。其中 II 区结构相对保守, 表现为博落回比小果博落回多 3 个茎环, 而 I、III、IV 区差异相对 II 区较大, 如博落回 I 区茎分支数较小果博落回少, 且小果博落回 II、III 区有部分连接, 不如博落回区分清晰。因此, 依据 *rbcL* 片段序列的二级结构, 可以直观地将博落回及其相似品种区分, 见图 8。

3 讨论

博落回始载于《本草拾遗》。通过大量中药古籍和文献的搜索和整理, 本研究初步明确了博落回基原、名称、分布、形态等内容。博落回主治恶疮、癰根、白癰风、蛊毒等症, 随着中医药发展, 博落回制成各种剂型应用于临床。本草考证可知, 博落回自历代以来植物资源分布较为广泛, 从唐代的江苏地区到清代的江西广东等地, 到现在在中国大部分省份均有分布, 博落回具有较大的资源开发价值。

本研究还进行系统的中药鉴定研究包括对部

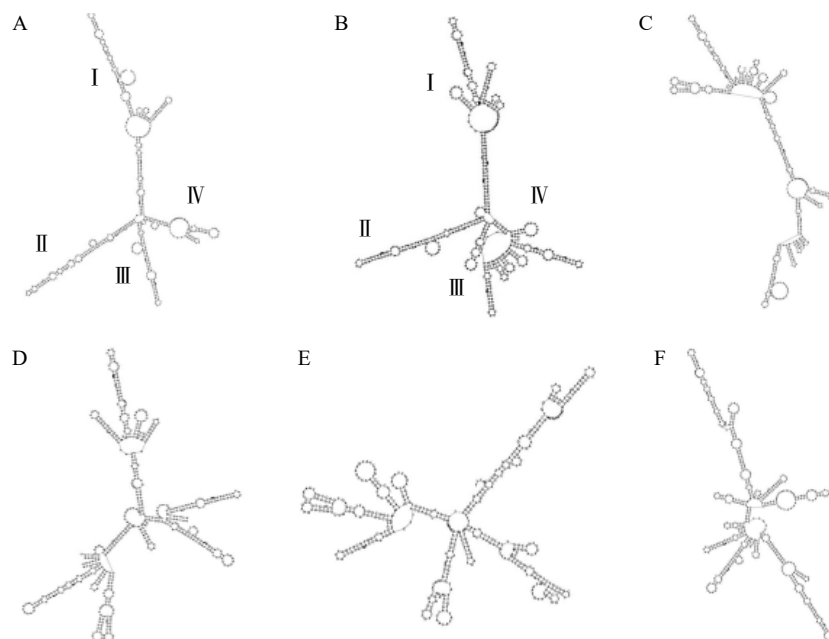


图8 博落回及其相似品种的 rbcL 序列二级结构比较

A-博落回; B-小果博落回; C-白屈菜; D-荷青花; E-西欧绿绒蒿; F-罂粟。

Fig. 8 Comparison of the secondary structure of rbcL sequence of *Macleaya cordata* and its similar varieties

A-*Macleaya cordata*; B-*Macleaya macrocarpa*; C-*Chelidonium majus*; D-*Hylomecon japonica*; E-*Meconopsis cambrica*; F-*Papaver somniferum*.

分相似品种的鉴定,在原植物形态鉴定、药材性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定基础上补充了根和茎的显微图像信息及药材粉末特征图,增加了叶表面气孔观察和理化鉴定内容,同时构建了基于 rbcL 序列的 NJ 系统发育树并结合其 rbcL 二级结构进行分析。其中中药材显微鉴别具有快速、鉴别准确率高的特点,在中药材性状相似不易区分时可根据组织、细胞或内含物等特征进行药材鉴别^[24]。博落回和同属小果博落回在根部皮层组织、射线细胞、粉末腺毛有无等方面存在差异^[25],因此药材资源利用时可以结合两者显微区别具体分析。

博落回因其具有良好的抗菌消炎、散瘀止痛之功,在民间广泛应用。其中主要活性成分为生物碱类化合物,其中以血根碱、白屈菜红碱、别隐品碱、原阿片碱含量最高^[4],本研究的理化鉴别也进一步验证了博落回中含有生物碱类物质。博落回中血根碱、白屈菜红碱具有抗炎、抑菌、抗肿瘤、防治肝纤维化等药理作用,目前以博落回为君药的愈肝灵胶囊已用于治疗多种类型肝炎、肝腹水硬化疾病^[26]。但血根碱存在含量低、难分离、难合成的问题^[27],有必要从博落回活性成分方面进一步分析探究。此外,博落回在消肿散瘀等方面功效显著,在治疗骨伤科疾病方面具有广

阔的临床应用和开发前景。

随着分子生物技术的飞速发展,DNA 条形码以通用性、稳定性和可重复性等优点,在药用植物及其相似品种以及混伪品鉴别方面的优势愈加明显^[28]。目前 rbcL 和 ITS2 序列成功应用于多种植物的鉴别^[29],许贞等^[30]研究表明,rbcL 引物序列对天南星药材及其混伪品鉴别效率高,结果准确,可用于市售天南星及其混伪品鉴别。课题组前期研究也发现 ITS2 和 rbcL 均可用于鉴别金钱草及其混伪品,但对于不同产地物种的区分仍存在一定局限^[31]。

在一级结构分析中,博落回与小果博落回同源性为 98.67%,序列间变异位点最少,遗传距离最小,在遗传信息方面差异最小,但在二级结构预测的结果中可以得出两者的二级结构差异明显,从而更直观准确地将其进行区分。利用 rbcL 片段序列结合 DNA 二级结构的辅助手段^[32-33]对博落回及其相似品种比较分析,旨在为博落回的分子鉴定提供理论依据,进一步丰富其 DNA 条形码数据库。

本研究运用传统中药鉴定方法结合 rbcL 基因的 DNA 分子鉴定技术,对博落回及其相似品种进行了较为系统的鉴定研究,较好鉴别博落回与其相似品种差异,为博落回的物种鉴定和质量评价

提供技术保障,也为博落回药材质量标准建立和开发利用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 836-837.
- [2] 陈仁寿, 刘训红. 江苏中药志(第三卷)[M]. 南京: 江苏凤凰科学技术出版社, 2020: 278-280.
- [3] CHEN W, ZHANG R, LEI S M, et al. Advances in chemical constituents and bioactivities of *Macleaya cordata*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(3): 243-250.
- [4] XU J X, LIU M T, ZHANG M D, et al. Research progress on pharmacological study of bioactive components in *Macleaya cordata*[J]. Feed Ind(饲料工业), 2021, 42(14): 59-64.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第32卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [6] LIN L, LIU Y C, HUANG J L, et al. Medicinal plants of the genus *Macleaya* (*Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*): A review of their phytochemistry, pharmacology, and toxicology[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(1): 19-48.
- [7] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [8] KRESS W J. Plant DNA barcodes: Applications today and in the future[J]. *Jnl Sytematics Evolution*, 2017, 55(4): 291-307.
- [9] ZHANG B H. Focus on paraffin section of plants[J]. J Educ Inst Jilin Prov(吉林省教育学院学报: 下旬), 2013, 29(4): 153-154.
- [10] YANG H B, LI X X, LUO L J. An improved clearing and de-waxing method for plant paraffin sectioning[J]. Chin Bull Bot(植物学报), 2009, 44(2): 230-235.
- [11] (唐)陈藏器. 本草拾遗[M]. 尚志钧, 辑释. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2004: 87.
- [12] (唐)段成式. 酉阳杂俎[M]. 方南生, 点校. 北京: 中华书局, 1981: 183.
- [13] (明)李时珍. 本草纲目[M]. 胡乃长, 胡双元, 辑校. 太原: 山西科学技术出版社, 2014: 528.
- [14] (宋)唐慎微. 证类本草[M]. 张存惠, 辑校. 北京: 人民卫生出版社, 1957: 215.
- [15] (宋)唐慎微. 大观本草[M]. 尚志钧, 辑校. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2002: 291.
- [16] (清)吴其浚. 植物名实图考长编[M]. 北京: 中华书局, 1963: 214.
- [17] 广西壮族自治区革命委员会卫生局. 广西本草选编[M]. 南宁: 广西人民出版社, 1974: 172.
- [18] 广东中药志编辑委员会. 广东中药志(第二卷)[M]. 广州: 广东科技出版社, 1996: 215-217.
- [19] 江西省卫生局革命委员会. 江西草药[M]. 南昌: 江西省新华书店, 1970: 110.
- [20] 福建省医药研究所. 福建药物志[M]. 福州: 福建人民出版社, 1979: 145-146.
- [21] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 275.
- [22] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第四册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 210-212.
- [23] YUAN C C, WU D H, YUAN Q M. Differences between *Meconopsis cambrica* and its allies based on the evidence of ITS sequence analysis[J]. J Zhanjiang Norm Coll(湛江师范学院学报), 2007, 28(3): 82-86.
- [24] WANG Y Q, LIU J F, YU J H, et al. Research status, problems and countermeasures of identification of multi-base traditional Chinese medicine collected in China pharmacopoeia (2020 edition)[J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2021, 36(2): 214-222.
- [25] QI L, LIU Y F, NIU X F. Study on the pharmacognosy of *Macleaya microcarpa*(maxim.) fedde [J]. [J]. Northwest Pharm J(西北药理学杂志), 2012, 27(2): 111-112, 127.
- [26] JU J, WANG S G. Preparation and quality control of yuganling capsule[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(6): 510-512.
- [27] ZHU L F, WANG X L, QU S H. Research progress on pharmacological effects of sanguinarine[J]. Guangdong Chem Ind(广东化工), 2020, 47(22): 69-70.
- [28] FANG J, LYU Q D, CHEN Z D, et al. Identification of commercially available rubi fructus based on DNA barcoding technology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(4): 437-442.
- [29] ZHANG Z L, SONG M F, LI H T, et al. ITS2 and rbcL sequence analysis on plants of *Marsdenia* R. Br. and its related species[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44(16): 2300-2303.
- [30] XU Z, LIU C S, HU X S, et al. Molecular identification of Rhizoma Arisaematis and its common adulterants based on chloroplast rbcL sequence amplification[J]. Glob Tradit Chin Med(环球中医药), 2020, 13(4): 576-582.
- [31] SUN S Y, CHEN Y, WANG Q R, et al. Molecular identification of *Lysimachia christinae* and its substitute and adulterants based on the ITS2 and rbcL barcodes[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43(6): 1336-1342.
- [32] ZHANG D C, GONG L, HUANG Z H. Molecular identification of *Pulsatilla chinensis*(Bunge) Regel and adulterants using different DNA barcodes[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2020, 35(2): 896-899.
- [33] HAN F P, XIE C Y, LAN Z, et al. Phylogenetic analysis of Compositae medicinal plants based on ITS2 barcode and ITS2 secondary structure[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2020, 22(10): 3760-3767.

收稿日期: 2023-03-20
(本文责编: 陈怡心)