

人工栽培与野生蕨麻中蕨麻苷含量测定及指纹图谱分析

许根华^{1,2}, 孙小茗², 蔡光明^{2*}, 颜红¹, 李军乔³, 汪境成³, 贾洪霞³, 欧阳婷¹

¹湖南中医药大学药学院, 长沙 410000; ²解放军 302 医院全军中医药研究所, 北京 100039;

³青海民族大学化学与生命科学学院蕨麻研究中心, 西宁 810007

摘要:对野生和人工栽培蕨麻中主要成分蕨麻苷的含量测定并比较其 HPLC 指纹图谱, 分析它们之间的差异。样品采用 70% 乙醇回流提取, 并采用 D101 大孔吸附树脂纯化富集其成分, 用甲醇配制成一定浓度供试品溶液进样, Kromasil 100-5-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇: 水(60: 40); 柱温: 室温; 检测波长: 208 nm; 流速: 1.0 mL/min。指纹图谱采用乙腈和水进行线性梯度洗脱, 柱温: 30 °C, 其它条件与前同。蕨麻苷峰面积与其进样量在 0.5 ~ 5 μg 范围内呈良好的线性关系, 回归方程为(A = 381.41C - 11.749, R = 0.9994, n = 6), 平均回收率为 97.7% (n = 6, RSD = 2.8%)。人工栽培蕨麻中蕨麻苷的含量接近或超过野生蕨麻的水平。指纹图谱比对, 相似度达 84.5%。作为药材入药, 人工栽培蕨麻初步替代野生蕨麻是可行的。

关键词:野生蕨麻; 人工栽培蕨麻; HPLC; 蕨麻苷; 指纹图谱

中图分类号: Q946.91 + 9; R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.015

Determination of Anserinoside and Fingerprint Analysis between Wild and Cultivated *Potentilla anserina*

XU Gen-hua^{1,2}, SUN Xiao-ming², CAI Guang-ming^{2*}, YAN Hong¹,

LI Jun-qiao³, WANG Jing-cheng³, JIA Hong-xia³, OU Yang-ting¹

¹School of Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine 410000, China; ²China Military

Institute of Chinese Medica, 302 Military Hospital 100039, China;

³Department of Chemistry and Life Science, Qinghai University For Nationalities

Abstract: To analyze the difference of the content of anserinoside and fingerprints between the wild and the artificial cultivated *Potentilla anserina* No. 1. Samples were extracted with 70% ethanol and purified with D101 macroporous adsorption resin to enrich its composition. The extract solutions were evaporated to dry and the residue was dissolved with methanol. The chromatographic system consisted of an Kromasil 100-5-C₁₈ and mobile phase of methanol: water (60: 40) with the detector set at 208 nm in room temperature. The flow rate of 1.0 mL/min. Acetonitrile in water was used as mobile phase for gradient linear eluting to get the fingerprint, other conditions is the same as the first time. The peak area of anserinoside and its filling quantity within 0.5 ~ 5 μg had good linear relationship. The regression equation is (A = 381.41C - 11.75, R = 0.9994, n = 6), the average recovery was 97.7% (n = 6, RSD = 3.0%). The content of anserinoside in the artificial cultivated *Potentilla anserina* No 1 have reached or exceeded those in the wild one. Fingerprint matching, similarity degree has reached to 84.5%. It is preliminarily feasible for the artificial cultivated *potentilla anserina* No 1 used as herbal medicine to replace the wild one.

Key words: wild *Potentilla anserina*; cultivated *Potentilla anserina*; HPLC; anserinoside; fingerprints

藏药蕨麻为蔷薇科委陵菜属植物鹅绒委陵菜(*Potentilla anserina* L.)的根茎部位, 经分析研究, 其主要活性成分为总皂苷类物质。蕨麻(俗名人参

果)是分布于我国甘肃、青海、西藏等西部地区一种重要的具有多种经济价值的野生药食同源(植物)资源^[1,2]。解放军 302 医院中医药研究所蕨麻研究课题组蔡光明等在国家自然科学基金与北京市重大创新研究基金等支持下, 经过多年的努力, 针对蕨麻总皂苷类活性成分具有较显著的抗慢性肝炎作用的研究取得了一系列研究成果与重要进展^[3-7]。但伴

随长期以来蕨麻作为当地的经济资源被市场过度开发,从而刺激其价格的不断攀升,少数人为了获取有限的经济利益而疯狂采挖野生蕨麻,导致蕨麻资源面临毁灭性破坏以及自然生态环境的破坏。为了可持续发展,为了有限的资源不会枯竭,我们必须坚持经济发展与利益的获得不以牺牲环境为代价^[8],应将保护有限的野生资源和生态放在首位,故人工培育新品种是替代和保护野生资源的重要途径。自“十一五”以来,青海民族大学蕨麻研究中心李军乔等在国家自然科学基金与省级科研基金的支持下经过近十年的研究,成功的培育了蕨麻新品种---蕨麻1号,经过在青海不同地区试种达到预期目标^[9-12]。目前,人工培育蕨麻新品种已经通过省级技术鉴定,达到扩大种植的标准。本实验以蕨麻总皂苷中主要成分蕨麻苷为测定指标,采用高效液相色谱法测定了人工栽培蕨麻——蕨麻1号和野生蕨麻中蕨麻苷含量,并进行二者指纹图谱的比对考察,以此作为评价人工培育蕨麻1号能否替代野生蕨麻的重要科学依据。

1 仪器与材料

仪器:安捷伦 1200 高效液相色谱仪(美国);Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);试剂:甲醇(色谱纯,美国 Fisher)、乙腈(色谱纯美国 Fisher)、娃哈哈纯净水;D-101 大孔吸附树脂(精品级,天津海光有机化工材料有限公司提供);蕨麻苷对照品,纯度 >98%,由解放军第 302 医院中医药研究所自行制备,批号 20120608;试验用蕨麻样本:野生蕨麻药材系采自青海西宁皇源县境内,经兰州医学院药学系鉴定为 *Potentilla anserina* L. Var. *anserina*;人工栽培蕨麻 1 号样本:由青海省民族大学蕨麻研究中心提供。

2 实验方法

2.1 色谱条件^[13,14]

色谱柱:Kromasil100-5-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇:水(60:40);柱温:室温,检测波长 208 nm,流速为 1.0 mL/min。进样量体积 5 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取蕨麻苷对照品 5.00 mg,置 10 mL 容量瓶中,甲醇定容,摇匀备用,置于 4 °C 冰箱备用。

2.3 供试品溶液的制备

称取野生蕨麻和人工培育蕨麻 1 号粗粉 30.0

g,置于圆底烧瓶中,加 70% 乙醇 300 mL,浸润过夜,水浴加热回流提取 1.0 h,分别提取 2 次,合并滤液,回收乙醇,蒸干,再加适量 30% 乙醇溶解,通过 D101 大孔树脂柱(上样液体积:树脂体积 = 4:3),分别以水洗至无色澄清,再以 30% 乙醇洗脱至无色澄清(Molisch 鉴定成阴性),最后以 70% 乙醇洗脱至无色(终点判断方法 Liebermann-Burchard 反应为阴性),收集 70% 乙醇洗脱液减压回收溶剂,冷冻干燥,得蕨麻总皂苷提取物,称重备用。精密称取野生蕨麻和人工栽培蕨麻总皂苷提取物各 20.00 mg,置于 10 mL 容量瓶定容,得野生蕨麻和人工栽培蕨麻总皂苷供试品液,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

分别精密量取由蕨麻苷对照品储备,采用进样不同体积的对照品液(1、2、4、5、8、10 μL)每一体积进样 2 次,每次进样 5 μL,得其线性方程为 $A = 381.41C - 11.749$, $R = 0.9994$, $n = 6$ 。

2.4.2 精密度试验

取同一供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,连续测定 6 次,RSD 为 0.3%。

2.4.3 稳定性试验

供试品溶液及蕨麻苷对照品溶液,密封室温放置,于 0、1、2、4、8、16、24 h 进样 5 μL 测定峰面积,供试品 RSD 为 0.07%,对照品 RSD 为 0.99%。

2.4.4 重复性试验

同一批人工培育蕨麻 1 号分别精密称取 6 份,按照 2.3 供试品的方法制备。进样检测,检测其重复性,RSD 为 0.14%。

2.4.5 加样回收试验

按 2.3 项下方法,精密称取同一批野生蕨麻精提取物 6 份各 10 mg,分别加入蕨麻苷对照品储备液 1 mL。在 2.1 的条件下进样测定,回收率数据见表 1。

2.5 供试品的测定

按照 2.1 色谱条件下,将 2.3 已制备好的野生蕨麻和人工培育蕨麻 1 号供试品,进样 3 次,进样体积 5 μL,测得数据见表 2。

2.6 指纹图谱的建立^[15]

2.6.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil100-5-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),水(A)-乙腈(B)为流动相,采用线性梯度洗

表1 加样回收率试验

Table 1 Sample recovery

编号 No.	样品 Sample weight (mg)	样品中蕨麻苷的量 Amount of anserinoside (mg)	加入对照品量 Added amount (mg)	测定量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
1	10.07	2.41	0.50	2.92	102		
2	10.01	2.40		2.87	94		
3	10.23	2.46		2.96	100	97.7	3.0
4	10.17	2.44		2.93	98		
5	10.16	2.44		2.92	96		
6	10.11	2.43		2.91	96		

表2 供试品的测定

Table 2 Content determination results

样品 Sample	峰面积 Peak area (A)	平均 Mean	药材中蕨麻苷的含量 Content (%)		
野生蕨麻 Wild <i>P. anserine</i>	911.38	909.48	910.50	910.45	0.24
人工栽培蕨麻 Cultivated <i>P. anserine</i>	1289.80	1291.46	1290.11	1290.50	0.34

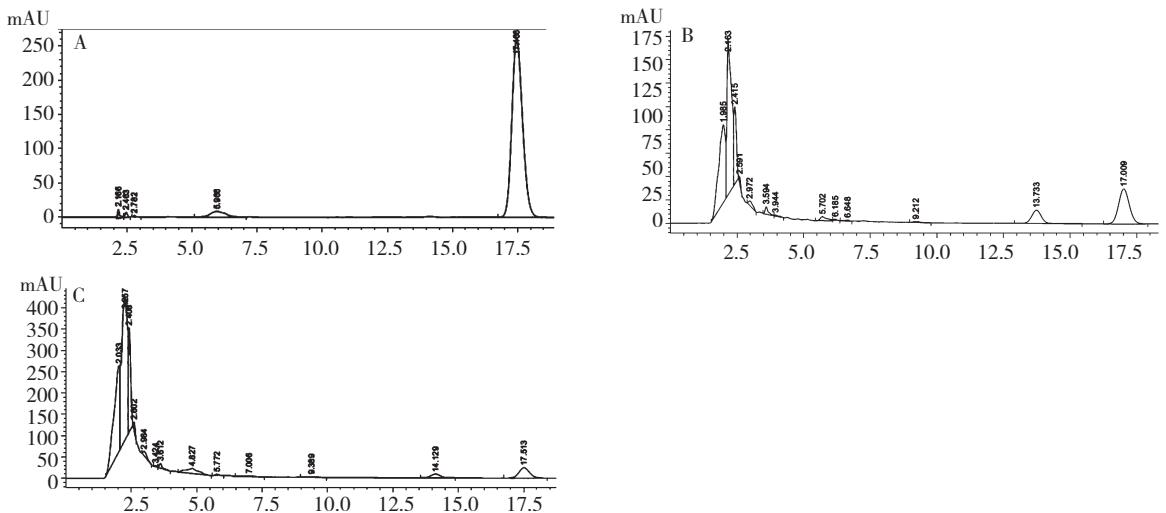


图1 蕨麻苷对照品(A)、人工培育蕨麻1号纯化物(B)及野生蕨麻(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of anserinoside standard (A), cultivated *P. anserine* (B) and wild *P. anserine* (C)

脱:0 ~ 30 min, 20% ~ 40% B; 30 ~ 40 min, 40% ~ 55% B; 40 ~ 60 min, 55% ~ 80% B; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 208 nm。

2.6.2 方法与记录

将蕨麻苷对照品和野生蕨麻以及人工培育蕨麻1号供试品各3批,每次5 μ L。记录40 min的色谱图谱。

2.6.3 指纹图谱相似性评价

利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版),将野生蕨麻和人工培育蕨麻1号所得数据整理,经过数据导入,峰点校正和数据匹配,以中位数法建立对照指纹图谱。结果显示二者指纹图谱显示度在84.5%,见图3。

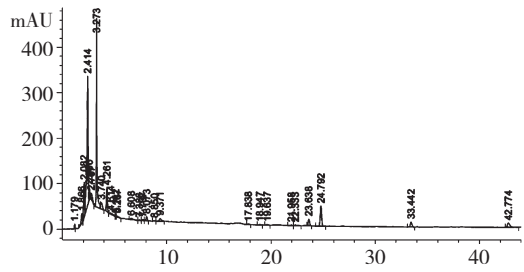
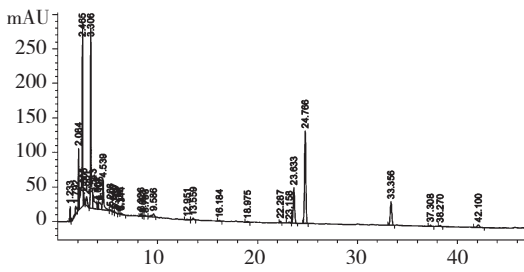


图2 人工培育蕨麻1号纯化物(A)及野生蕨麻纯化物(B)的指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of purified extracts of cultivated *P. anserine* (A) and wild *P. anserine* (B)

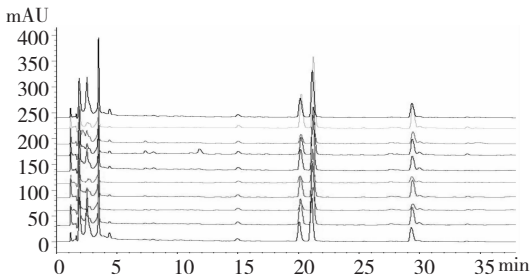


图3 相似度评价指纹图谱

Fig. 3 Similarity analysis of fingerprints

然有一定的帮助。由于本文报道仅仅是通过对野生蕨麻和人工培育蕨麻1号进行单一(主要的)化学成分--蕨麻苷的含量测定与分析的比对。故对野生与人工栽培蕨麻药材质量的整体评价仍有待继续完成,其中包括生药学、药理学方法的系统评价。

感谢:青海省民族大学化学与生命科学学院、蕨麻研究中心李军乔教授及其课题组对本文完成给予了大力支持!

参考文献

- 1 Qinghai province health department. The Qinghai Province Pharmaceutical Standards (青海省药品标准). 1992.
- 2 Chen HQ(陈惠清), Zhang RX(张瑞贤), Huang LQ(黄璐琦), et al. Tibetan medicine literature investigation of fern hemp. *China J chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 05: 55-56.
- 3 Cai GM(蔡光明), Zhao YL(赵燕玲), Yuan HL(袁海龙), et al. Separation of *Potentilla anserine* (total saponin) and anti -DHBV-DNA action in duck. *Central South Pharm* (中南药学), 2003, 1(1): 17-21.
- 4 Zhao YL(赵燕玲), Cai GM(蔡光明), Hu L(胡琳), et al. Protective effects of Fuganneng (FGN) on experimental hepatic injury in mice. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36: 448-450.
- 5 Hong X(洪霞), Cai GM(蔡光明), Xiao XH(肖小河). Triterpenoids from roots of *Potentilla anserina*. *Chin Trad Patent Med* (中草药), 2006, 37(2): 165-168.
- 6 Zhao YL(赵艳玲), Cai GM(蔡光明), Zhang XQ(张新全), et al. Experimental research on antiviral effect of Fuganneng(FGN). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(5): 305-308.
- 7 Ye H(叶华), Liu SQ(刘树林), Zhao YS(翟永松), et al. Talk about ethnic minority areas the sustainable development of national pharmaceutical industry. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 16: 3176-3179.

3 讨论

3.1 色谱条件选择

本实验选择在不同柱温条件下进样,由于蕨麻苷化学性质稳定,故温度的变化对峰形无影响,同时柱温由 20 °C 到 35 °C,只是蕨麻苷吸收峰峰保留时间由 17.5 min 变为 15.7 min,峰面积不变,而杂质峰的吸收强度随温度的变化而发生改变,同时基线不稳。根据热力学定律,温度越高,分子运动越剧烈,从而导致蕨麻苷的出峰时间越快,当然柱温升高对色谱柱也易造成损害,所以一般选择室温条件较为适合,通常设定为 20 °C。但是指纹图谱的柱温用 20 °C,却无法得到满意的分离图谱,但温度升高到 30 °C时,峰形还是分离度都得到了较大改善。

3.2 研究的结论与推测

本文试验通过对野生蕨麻和人工栽培蕨麻中主要化学成分蕨麻苷含量的测定与相关指纹图谱分析相结合的方法,结合定量和定性的数据分析,说明在合适地理环境下,由人工培育蕨麻替代野生蕨麻是可行的,如地理条件选择适宜,人工栽培蕨麻的活性成分含量完全可以达到或者超过野生蕨麻的含量。

3.3 研究的意义与不足

蕨麻人工栽培的成功意味着人类对自然界探索取得了一定的进步,为人们更好的认识自然保护自