

16个产地地乌药材的系统鉴定及质量评价

胡鑫¹, 王旭¹, 刘曼¹, 裴红², 朱志国³, 黄必胜¹, 刘义飞¹, 宋成武^{1*}, 胡志刚^{1,3*}

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2. 广州康和药业有限公司, 广州 511440;
3. 湖北金贵中药饮片有限公司, 武汉 430051)

[摘要] 目的:构建地乌药材基原物种系统鉴定体系,并对全国16个产地的地乌药材进行综合品质评价,为地乌药材产地选择及临床用药安全奠定基础。方法:使用传统鉴别方法结合DNA条形码核糖体DNA第二内部转录间隔区(ITS2)序列分子鉴定技术快速鉴别地乌药材真伪,并基于HPLC-UV对地乌药材中5个有效成分进行含量测定,采用Welch Ultimate XB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.01%三氟乙酸溶液(30:70),检测波长210 nm,柱温30 °C,流速1.0 mL·min⁻¹。结果:传统鉴别及DNA条形码快速鉴别技术均能准确鉴别地乌药材真伪。BLAST比对分析发现,16个产地地乌药材均与林荫银莲花 *Anemone flaccida* 具有最大相似度;基于多指标成分含量测定表明湖北恩施板桥镇的地乌药材中5个三萜皂苷类成分含量之和最高(10.59%),其次为贵州毕节赫章(6.28%)和湖北长阳都镇湾(5.64%)。结论:DNA条形码技术可作为地乌药材传统鉴定技术的有效补充,该鉴别体系可保障地乌药材基原准确及临床用药安全。HPLC多指标成分综合评价及聚类分析结果表明在本研究所涉及的产地中,湖北恩施、长阳、五峰,贵州毕节和重庆金佛山的地乌药材质量较优,可作为地乌药材的重要产地。

[关键词] 地乌; 传统鉴定; DNA条形码; 核糖体DNA第二内部转录间隔区(ITS2); 高效液相色谱法(HPLC); 质量评价; 产地选择

[中图分类号] R22;R931;R28;Q523;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0132-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201947

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200616.1305.003.html>

[网络出版日期] 2020-6-16 19:57

Systematic Identification and Quality Evaluation of *Anemone flaccida* Rhizoma from 16 Different Places of Origin

HU Xin¹, WANG Xu¹, LIU Man¹, PEI Hong², ZHU Zhi-guo³, HUANG Bi-sheng¹,
LIU Yi-fei¹, SONG Cheng-wu^{1*}, HU Zhi-gang^{1,3*}

(1. *Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;*
2. *GKH Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 511440, China;*
3. *Hubei Jingui Chinese Medicine Pieces Co. Ltd., Wuhan 430051, China*)

[Abstract] **Objective:** To construct a systematic identification system of *Anemone flaccida* Rhizoma, and to evaluate the comprehensive quality of *Anemone flaccida* Rhizoma from 16 regions in China, so as to lay a foundation for its origin selection and clinical medication safety. **Method:** The authenticity of *Anemone flaccida* Rhizoma was quickly identified by traditional identification method and DNA barcode molecular identification technology, and HPLC-UV was used to determine the contents of 5 active ingredients in *Anemone flaccida* Rhizoma. All high pressure chromatographic separations were performed with a Welch

[收稿日期] 20200116(022)

[基金项目] 武汉市“黄鹤英才计划”入选人才项目;湖北省中央引导地方科技发展专项(2019ZYD063)

[第一作者] 胡鑫,在读硕士,从事中药资源及其品质研究,E-mail:xinhu0624@163.com

[通信作者] *胡志刚,副教授,博士,从事中药资源及其品质研究,Tel:027-68890106,E-mail:zgghu0608@163.com;

*宋成武,副教授,博士,从事中药复方物质基础及作用机制研究,E-mail:chengwusong_2016@hbtc.edu.cn

Ultimate XB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile-0.01% trifluoroacetic acid aqueous solution (30:70) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 210 nm and the column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** The authenticity of *Anemone Flaccidae* Rhizoma could be precisely and rapidly identified by ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequence and traditional identification methods. BLAST comparative analysis found that medicinal materials from 16 areas were all *Anemone flaccida*. Based on the contents of multi-index components, it was shown that the total content of 5 triterpenoid saponins in *Anemone Flaccidae* Rhizoma from Banqiao, Enshi, Hubei was the highest (10.59%), followed by Hezhang, Bijie, Guizhou (6.28%) and Duzhenwan, Changyang, Hubei (5.64%). **Conclusion:** DNA barcoding can be used as an effective supplement to the traditional identification technology, it can ensure the authenticity of *Anemone Flaccidae* Rhizoma and the safety of clinical use. The comprehensive evaluation of multi-index components of HPLC and cluster analysis show that the quality of medicinal materials in Enshi, Changyang, Wufeng of Hubei, Bijie of Guizhou and Jinfoshan of Chongqing is superior, which can be considered as important origin of *Anemone Flaccidae* Rhizoma.

[Key words] *Anemone Flaccidae* Rhizoma; traditional authentication; DNA barcoding; ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 (ITS2); high performance liquid chromatography (HPLC); quality evaluation; origin selection

地乌为毛茛科植物林荫银莲花的干燥根茎^[1-2], 其性温, 味辛、微苦, 《贵州民间药物》记载地乌具有消肿止痛、祛风湿、强筋骨等功效, 湖北民间常将其用于治疗风湿性和类风湿性关节炎以及跌打损伤。药理研究表明地乌皂苷具有镇痛、抗炎、抗组织胺、抗癌及免疫调节等药理活性^[3-8], 其活性成分主要为齐墩果烷型三萜皂苷。据文献统计, 从地乌中分离并完成结构鉴定的三萜皂苷类成分共25种^[9-13]。目前, 以地乌为原料的中药五类新药——地乌风湿安胶囊已完成Ⅲ期临床试验研究, 具有良好的开发及应用前景。

药用植物的主要药效成分通常是次生代谢产物^[14], 中药材次生代谢产物除受遗传因素调控外, 地理环境、气候条件等生态因子亦会对其产生重要影响^[15-16], 即环境会导致同种异地药材质量的不同。我国地乌野生资源分布广泛, 受地域影响, 各产地地乌药材质量存在一定差异, 地乌药材基原的准确鉴别及优质药材产地选择对于其合理开发及临床应用至关重要, 2018年版《湖北省中药材质量标准》^[17]记载的地乌药材鉴定方法(性状、显微、理化)虽准确稳定, 但比较耗时耗力。目前有关地乌的研究多集中于活性成分的提取、分离、结构鉴定及药理活性等方面, 其分子鉴定研究尚未见报道, 多产地地乌药材的综合质量评价体系亦尚未构建。

随着中药材DNA条形码分子鉴定方法研究的深入与普及^[18-19], 越来越多的实例证明, 其与传统鉴定方法相比, 具有不依赖外观性状的完整度、快速、

准确的特点, 适用于药材基原的真伪鉴别^[20]。此外, 基于HPLC的多种活性成分的含量测定有利于把控各产地药材整体质量。基于此, 本研究立足于《中国植物志》记载的地乌产地进行野生资源收集, 采用传统鉴别技术确定其基原真伪, 并首次使用DNA条形码分子鉴定技术构建其基原快速鉴别方法, 以多种药效活性成分含量作为地乌药材质量控制依据, 评价各产地地乌药材整体质量, 以期为优质地乌药材的产地选择及质量控制奠定基础。

1 材料

LC-20AD型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司, 包括SPD-20A型检测器, CTO-20A型柱温箱), UV-1800(PC)型紫外分光光度计[翱艺仪器(上海)有限公司], MS105/A型1/10万电子分析天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司], JXFSTPRP-24型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司), 1580R型低温冷冻离心机(美国Gene公司), Tgradient型梯度聚合酶链式反应(PCR)仪(德国Biometra公司), Bio-Print CX4型凝胶图像分析系统(法国Vilber Lourmat公司), DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司), SYZ-V型超纯水机(武汉渗源仪器设备有限公司)。

anhuienoside E, glycoside St-14a, hemsgiganoside B, flaccidoside II, hederasaponin B对照品均由广州康和药业有限公司自制并提供, 经HPLC-UV峰面积归一化法测得其纯度均>98%; 聚乙烯吡咯烷酮40(PVP-40)和十六烷基三甲基溴化

铵(CTAB)(合肥 Biosharp 公司,批号分别为 68077115, 68076161),乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)和琼脂糖(德国 BioFroxx 公司,批号分别为 EZ345B227, EZ4567B129),GoldView I 型核酸染料(上海索莱宝生物科技有限公司,批号 20180809), β -巯基乙醇(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号 97L01011200), $2\times Es$ Taq MasterMix(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 01032/60417),水为自制超纯水,其余试剂均为分析纯。

2019年3月28日至2019年5月7日,本课题组成员赴湖北、湖南、河南、安徽、四川、重庆、贵州及陕西8个省市16个地区采集地乌基原植物样品,每个样点采集3个批次(编号01~03),样品采集信息见图1。所有采集样品经中国科学院武汉植物园赵子恩研究员鉴定为毛茛科植物鹅掌草(林荫银莲花)*Anemone flaccida*的干燥根茎,凭证标本保存于湖北中医药大学中药标本馆。所有样品洗净,置于50℃烘箱干燥10d,各批次部分样品用于总DNA提取,剩余样品粉碎后过二号筛用于含量测定。



图中字母代表相应产地样品编码(图2,5,6同)

图1 地乌样品信息及性状特征

Fig. 1 Sample information of *Anemone flaccida* Rhizoma and their characteristics

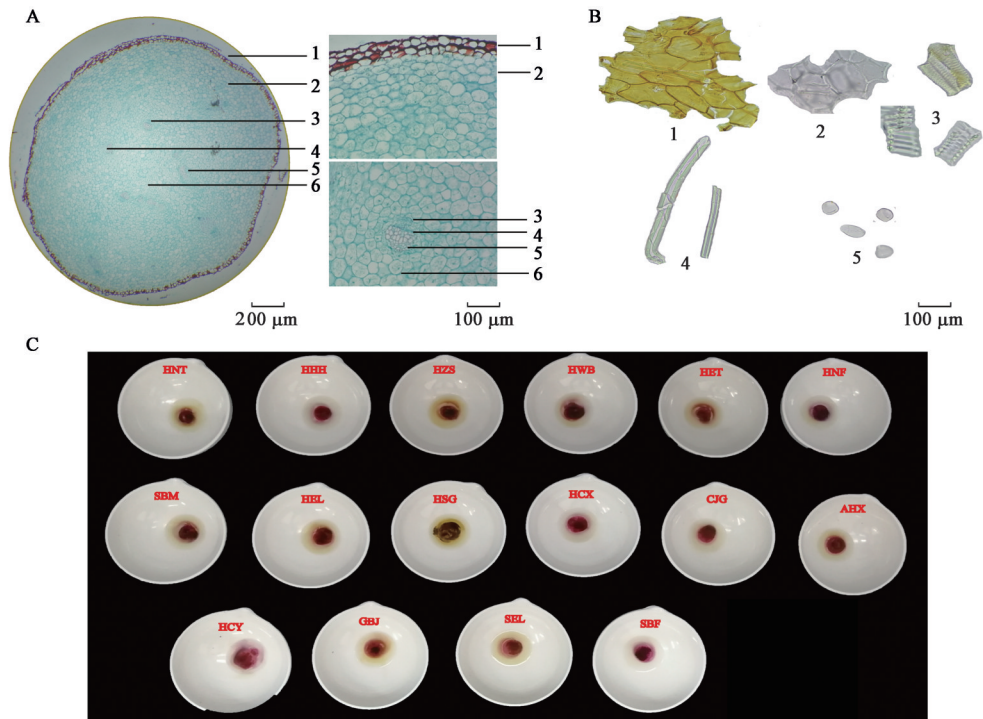
2 方法和结果

2.1 地乌药材传统鉴定

2.1.1 性状鉴别 对采集样品外观、表面、质地、断面、气味等特征进行观察后发现,各产地的地乌样品均呈略弯曲的扁圆柱形,表面棕黑色或淡黑色,具细皱纹和多数半环状突起的鳞叶痕,节上着生棕褐色鳞毛,见图1;质地坚脆,易折断;断面平坦,有粉性,且略呈灰白色,边缘呈褐色,角质状;气无,味微苦。结果均与2018年版《湖北省中药材质量标准》^[17]中地乌药材性状鉴别特征一致。

2.1.2 显微鉴别 所有药材样品采用常规的石蜡切片法制片,使用番红-固绿混合染色后,用加拿大

树脂封片,在光学显微镜下观察地乌药材横切面,见图2(A)。结果表明其根茎的表皮细胞扁平,外壁厚且木化;皮层薄壁细胞类圆形,为20余列;维管束外韧型,成环分布;髓部大,细胞类圆形。采用粉末制片法制备药材水合氯醛-稀甘油透化装片,在光学显微镜下观察地乌药材粉末,见图2(B)。结果可观察到棕色或黄色的表皮细胞;薄壁细胞常呈破碎状,且细胞壁较厚,呈不均匀的连珠状;非腺毛均为单细胞,其表面可见螺旋状裂隙;导管为梯纹、网纹及螺纹导管;淀粉粒多种。上述结果均与2018年版《湖北省中药材质量标准》^[17]中地乌药材显微鉴别特征一致。



A. 药材横切面显微结构(1.表皮;2.皮层;3.韧皮部;4.束内形成层;5.导管;6.髓部);B.药材粉末显微鉴定(1.表皮细胞;2.薄壁细胞;3.导管;4.非腺毛;5.淀粉粒);C.药材 Liebermann-Burchard 反应

图2 地乌药材的传统鉴别

Fig. 2 Traditional identification of *Anemonis Flaccidae* Rhizoma

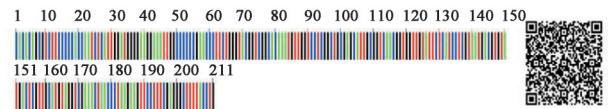
2.1.3 理化鉴别 采用 Liebermann-Burchard 反应法判断药材是否含有三萜皂苷类成分。结果发现各产地的地乌样品经 Liebermann-Burchard 反应后均呈现不同程度的紫红色,见图2(C),与2018年版《湖北省中药材质量标准》^[17]中地乌药材理化鉴别特征一致。

2.2 基于 ITS2 的地乌药材分子鉴定

2.2.1 地乌药材基因组总 DNA 提取 用 75% 乙醇擦拭实验样品表面,去除其表面杂质及微生物,稍晾干后,分别取实验材料 30~70 mg,放入 2.0 mL 的无菌离心管中,研磨 2 min(频率 60 次/min),使用改良的 CTAB 法^[21]提取植物总 DNA。

2.2.2 PCR 扩增、测序及数据处理 采用 ITS2 通用引物对地乌药材样品基因组总 DNA 进行 PCR 扩增^[19]。25 μL 的 PCR 反应体系: 2×Es Taq MasterMix 12.5 μL,引物对 ITS2 (ITS2-2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'; ITS2-3R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3') 各 1 μL,模板 DNA 2 μL,灭菌超纯水 8.5 μL。设置未加模板 DNA(以灭菌超纯水代替)的 PCR 反应为阴性对照。ITS2 序列扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35~40 个循环;

72 °C 延伸 10 min。应用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,所有样品 PCR 产物经电泳后均在 500 bp 处显示单一明亮条带,PCR 扩增成功率 100%。PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序成功率 100%,经 CondonCode Aligner V4.2.4 软件去除两端 5.8S 和 28S 区段^[22],获得 ITS2 间隔区序列。经 MEGA 7.0 软件^[23]序列比对分析后,所有样品 ITS2 序列长度均为 211 bp,GC(G 表示鸟嘌呤,C 表示胞嘧啶)质量分数均为 52.6%,共存在 1 个变异位点,为 66 位点 G-C 变异[陕西宝鸡眉县(SBM)],其主导单倍型序列特征见图 3。



绿色表示腺嘌呤(A);红色表示胸腺嘧啶(T);蓝色表示胞嘧啶(C);黑色表示鸟嘌呤(G)

图3 地乌 ITS2 序列主导单倍型序列

Fig. 3 Dominant haplotype of ITS2 sequence of *Anemonis Flaccidae* Rhizoma

2.2.3 局部序列比对基本检索工具(BLAST)比对 将 2.2.2 项下所获 ITS2 间隔区序列导入美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库,运用 BLAST 进行

相似性比对。结果显示所有实验样品最大相似度对应的物种均为毛茛科植物林荫银莲花 *A. flaccida* (GeneBank 号为 KJ819809), 且相似度均 >99.5%。基于 ITS2 序列比对分析的结果与植物分类专家鉴定结论一致, 表明 16 个产地采集的地乌药材样品基原准确, 且该方法可用于地乌药材的快速鉴别。

2.3 地乌药材中 5 种三萜皂苷类成分的含量测定

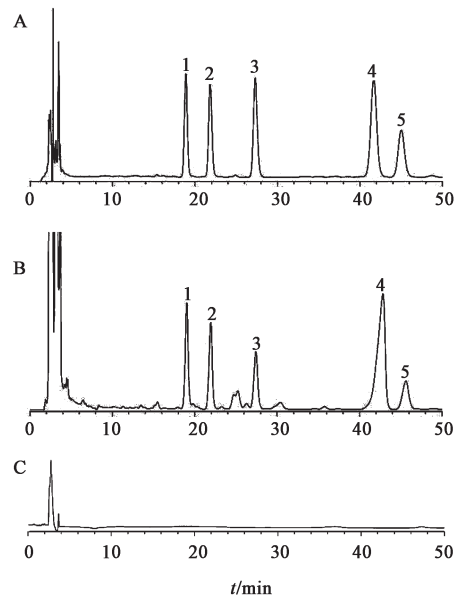
2.3.1 供试品溶液的制备 精密称取地乌粉末 0.25 g, 置于具塞锥形瓶中, 使用移液管精密加入 75% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 室温静置 30 min, 超声处理 (300 W, 40 kHz) 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 75% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 封口胶密封备用。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取 anhuienoside E, glycoside St-14a, hemsgiganoside B, flaccidoside II, hederasaponin B 对照品 5.01, 5.03, 5.02, 10.02, 5.02 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 用 30% 乙腈溶解并定容, 得混合对照品溶液, 封口胶密封, 于 4 °C 保存备用。

2.3.3 色谱条件 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 210 nm, 进样量 20 μL, 流动相乙腈-0.01% 三氟乙酸溶液 (30:70)^[24]。在该色谱条件下, 色谱图中目标色谱峰出峰时间适当、分离度良好, 且阴性无干扰 (以 75% 甲醇作为阴性对照), 见图 4。

2.3.4 线性范围考察 精密吸取 2.3.2 项下混合对照品溶液适量, 加 30% 乙腈稀释 2 倍并且连续稀释 5 次, 得系列混合对照品溶液, 按 2.3.3 项下色谱条件测定。以对照品质量浓度为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 进行线性回归, 得 anhuienoside E, glycoside St-14a, hemsgiganoside B, flaccidoside II 及 hederasaponin B 回归方程分别为 $Y=3.662 \times 10^7 X - 57\ 300$ ($R^2=0.999\ 3$), $Y=3.718 \times 10^6 X + 10\ 198$ ($R^2=0.999\ 8$), $Y=4.698 \times 10^6 X + 48\ 358$ ($R^2=0.999\ 3$), $Y=2.059 \times 10^6 X + 8\ 096$ ($R^2=0.999\ 9$) 以及 $Y=3.509 \times 10^6 X + 19\ 881$ ($R^2=0.999\ 4$), 各成分线性范围分别为 0.625~20.04, 0.629~20.12, 0.627~20.08, 1.252~40.08, 0.627~20.08 μg。

2.3.5 精密度考察 精密称取 HCX01 样品适量, 按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算 anhuienoside E, glycoside St-14a, hemsgiganoside B, flaccidoside II, hederasaponin B 峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.7%,



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品 (75% 甲醇); 1. anhuienoside E; 2. glycoside St-14a; 3. hemsgiganoside B; 4. flaccidoside II; 5. hederasaponin B

图 4 地乌药材的 HPLC

Fig. 4 HPLC chromatograms of *Anemonis Flaccidae* Rhizoma samples

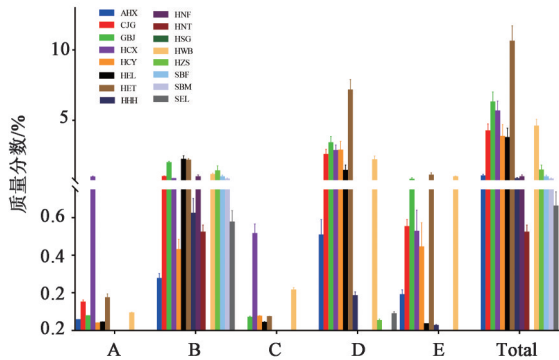
1.1%, 0.5%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性考察 精密称取 HCX01 样品 6 份, 按 2.3.1 项下方法平行制备供试品溶液, 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 计算 anhuienoside E, glycoside St-14a, hemsgiganoside B, flaccidoside II, hederasaponin B 平均质量分数分别为 0.86%, 0.77%, 0.46%, 2.83%, 0.64%; RSD 分别为 1.0%, 0.6%, 0.9%, 0.8%, 1.1%, 表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性考察 精密称取 HCX01 样品适量, 按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 h 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 计算 anhuienoside E, glycoside St-14a, hemsgiganoside B, flaccidoside II, hederasaponin B 峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.1%, 0.9%, 0.7%, 1.3%, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率考察 取已知各指标成分含量的 HCX01 样品 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 按 1:1 比例精密加入各对照品, 按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 计算 anhuienoside E, glycoside St-14a, hemsgiganoside B, flaccidoside II, hederasaponin B 的平均回收率依次为 98.76%, 96.94%, 102.31%, 99.17%, 101.58%; RSD 分别为 1.6%, 0.9%, 1.4%, 0.8%, 1.3%, 表明该方法回收率良好。

2.3.9 样品测定 将16个产地48份地乌样品,分别按照2.3.1项下方法制备供试品溶液,按2.3.3项下色谱条件测定,计算5个指标成分的含量。利用SPSS 20对各产地地乌药材中 anhuienoside E, glycoside St-14a, hemsgiganoside B, flaccidoside II, hederasaponin B 的质量分数进行单因素方差分析(One-way ANOVA),结果见图5。



A. anhuienoside E; B. glycoside St-14a; C. hemsgiganoside B; D. flaccidoside II; E. hederasaponin B; Total. 总量

图5 16个产地地乌样品中三萜皂苷类成分的质量分数($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 5 Contents of 5 triterpenoid saponins in *Anemonis Flaccidae* Rhizoma from 16 places of region ($\bar{x} \pm s, n=3$)

依据5个三萜皂苷类成分含量之和可将16个产地地乌样品分为5类。其中,HET样品中5个成分质量分数总和最高(10.59%),且与GBJ和HCX样品之间存在显著差异($P<0.01$);HWB,CJG,HCY及HEL样品中5个成分质量分数总和较高,且这4个产地样品间无显著性差异;HHH,HNF,HNT,SBF,SBM,SEL样品中5个成分质量分数总和均<1%,均略低于AHX和HZS样品,但差异不显著;而HSG样品中5个成分均未检测到,可能是因为该样品生长年限较短,次生代谢产物积累少而造成的。这5个三萜皂苷类成分含量单独分析结果表明,HCX样品中皂苷 anhuienoside E, hemsgiganoside B 含量显著高于其他产地($P<0.01$),有8个产地均未检测到这2种皂苷成分;GBJ,HEL及HET样品中 glycoside St-14a 含量显著高于其他产地($P<0.05, P<0.01$);HET样品中皂苷 flaccidoside II 含量显著高于其余各产地样品($P<0.01$);HET及HWB样品中 hederasaponin B 含量显著高于其他产地($P<0.05, P<0.01$)。2018年版《湖北省中药材质量标准》中明确规定地乌质量控制的指标成分为地乌皂苷 W3 (flaccidoside II)。基于以上含量测定结果分析表明,无论是以5个三萜皂苷类成分含量之和亦或是单独以 flaccidoside II 含量作为地乌药材质量控制

的依据,湖北恩施、长阳、五峰,贵州毕节以及重庆金佛山生长的地乌药材质量均较优。

2.4 地乌药材的聚类分析 基于5个三萜皂苷类成分含量,使用Helm 1.0.0软件对各产地的地乌样品进行聚类分析,见图6。结果发现16个产地的地乌样品被分为两大支,其中湖北地乌样品(除HSG)与重庆、安徽和贵州的地乌样品,由于各成分含量比例趋势较为一致,单独聚为一大支,而湖南、河南、陕西及四川地乌样品地乌皂苷积累量明显较低,单独聚为另一大支。该结果从化学成分层面表明,相比其他几个地区,湖北(除HSG)与重庆、安徽、贵州的地乌较其他几个产地具有更大相似性。

3 讨论

所有地乌样品性状鉴定参照《中国植物志》,显微鉴定和理化鉴定参照2018年版《湖北省中药材质量标准》,传统鉴定结果表明所有样品均与文献记载的林荫银莲花 *A. flaccida* 的干燥根茎一致。自2010年陈士林研究员提出DNA条形码中草药鉴定体系以来,该方法的准确性及稳定性已在数十个科属的药用植物中得到验证。本研究在确保地乌药材基原准确的前提下,首次基于DNA条形码技术构建了地乌药材分子快速鉴别体系,重点考察了地乌药材总DNA提取时样品取样量、中间精密度以及PCR循环次数。最终确定采用改良的CTAB法提取地乌药材总DNA,在取样量30~70 mg,35~40个PCR循环以及不同的PCR仪下通过琼脂糖凝胶电泳均能获得单一明亮的条带,且测序成功率100%。基于ITS2序列的分子鉴定结果表明该方法可实现对地乌药材基原的快速准确鉴别,可作为地乌药材传统鉴定的有效补充。本研究首次通过构建地乌药材传统鉴定与DNA条形码分子鉴定体系对其基原进行协同分析,双重鉴定确保了地乌药材基原鉴定结果的准确性与可靠性,该系统鉴定体系的构建将有利于保障地乌药材在生产过程中的投料准确,为其临床安全用药奠定基础。

研究表明 anhuienoside E, glycoside St-14a, hemsgiganoside B, hederasaponin B 和 flaccidoside II 等均具有显著药理活性^[5-6,11,25],是地乌药材治疗风湿类疾病的药效物质,2018年版《湖北省中药材质量标准》中明确将 flaccidoside II 作为含量测定指标成分,杨伟群等^[24]基于16批地乌药材构建了HPLC-UV特征图谱,并选择上述5种成分作为其特征峰。基于此,本研究选择以上5个指标成分作为其质量评价依据,所获HPLC色谱图分离度好、出峰

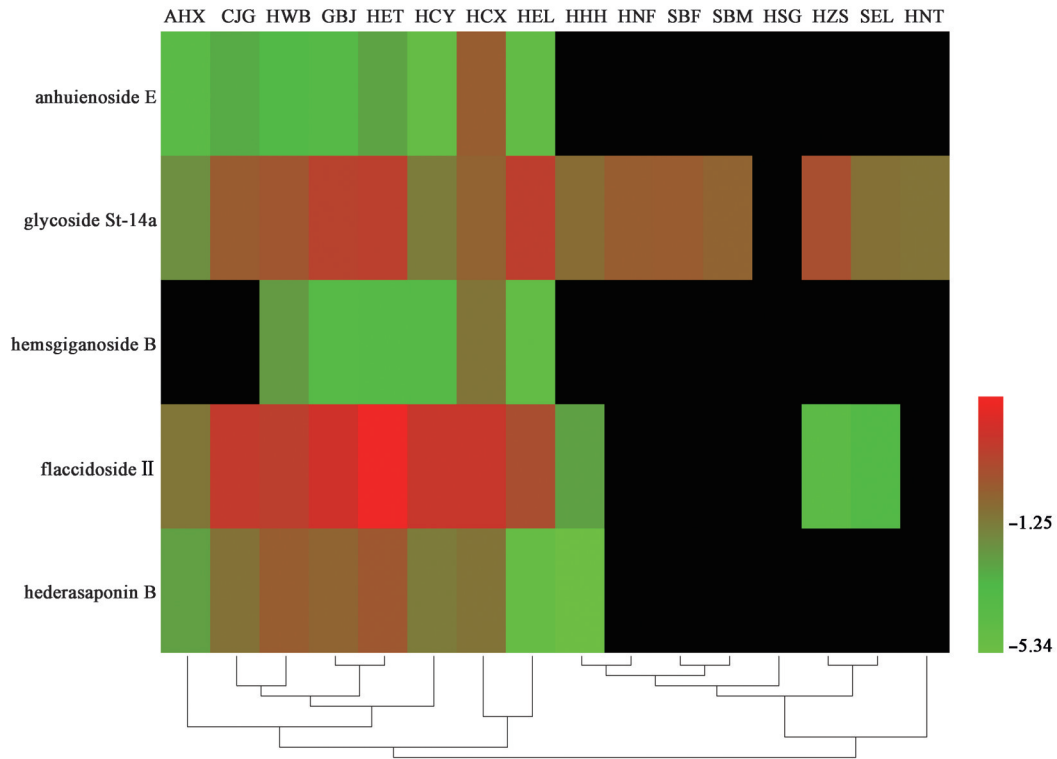


图6 16个产地地乌样品的聚类分析

Fig. 6 Cluster analysis of *Anemone Flaccidae Rhizoma* from 16 places of region

时间合适,以 flaccidoside II 为参考峰,其余4个成分的相对保留时间与杨伟群等^[24]报道的一致,表明该方法准确、稳定。本研究中5个三萜皂苷类成分含量测定结果的差异性分析表明湖北恩施、长阳、五峰,贵州毕节以及重庆金佛山生长的地乌药材质量较优,这一结果同样在聚类分析中得以证实。由于条件限制,所采集样品仅考虑到了产地、生态环境等对地乌有效成分的影响,并未考察地乌生长年限。此外,地乌药材大范围采集工作需耗费大量人力物力及时间,且采集难度大,无法保证采集时间完全一致。本研究尽可能在较短的时间内完成样品的收集,所得结果仅代表本批次的样品,不可延伸涵盖地乌药材整个生长周期内的整体质量。基于此,在下一步的工作将重点考察生长年限与地乌皂苷含量的相关性以及地乌药材在整个生长周期内的有效成分动态变化规律。

目前,地乌药材来源主要以野生资源为主,后期随着地乌风湿安胶囊的上市以及相关保健产品的开发,传统的野生地乌将难以满足日益增长的需求量。为保护地乌野生资源,兼顾地乌药材资源的合理开发与应用,发展其人工栽培迫在眉睫。基于化学层面的聚类分析,本研究结果表明湖北、重庆、安徽和贵州的地乌药材在化学组成上存在相似性,

可考虑以湖北地乌种质资源为主,贵州、重庆和安徽地乌种质资源为辅,开展地乌优良品种选育,为其人工栽培提供选育材料及理论基础。

【参考文献】

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997:802.
- [2] 公保吉. 地乌风湿安胶囊用于类风湿性关节炎Ⅲ期临床研究[J]. 内蒙古中医药,2017,36(11):18-19.
- [3] 尹登平,吴在德. 胆总管十二指肠肠端侧瓣膜成形吻合术[J]. 宜昌医学专科学校学报,1990,18(2):144-146.
- [4] 江俊,邴飞虹,蒋冠斌. 地乌总甙抗炎及抗过敏作用的实验研究[J]. 中药药理与临床,1996,12(5):20-21.
- [5] LIU Q, XIAO X H, HU L B, et al. Anhuienoside C ameliorates collagen-induced arthritis through inhibition of MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. Front Pharmacol,2017,8:299.
- [6] LIU Q, ZHU X Z, FENG R B, et al. Crude triterpenoid saponins from *Anemone flaccida* (Di Wu) exert anti-arthritis effects on type II collagen-induced arthritis in rats[J]. Chin Med,2015,10:20.
- [7] 江俊. 地乌总苷对佐剂性关节炎大鼠特异性免疫功能影响的实验研究[J]. 中药材,2002,25(3):

- 194-195.
- [8] 张兰天. 地乌和蛇莓的化学成分研究[D]. 天津:天津大学,2007.
- [9] HUANG X J, TANG J Q, LI M M, et al. Triterpenoid saponins from the rhizomes of *Anemone flaccida* and their inhibitory activities on LPS-induced NO production in macrophage RAW264.7 cells [J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(9):910-921.
- [10] 张兰天,高石喜久,张彦文,等. 地乌中三萜皂苷类成分[J]. 中国中药杂志,2008,33(14):1696-1699.
- [11] 韩林涛,黄芳. 鹅掌草根茎三萜皂苷类成分研究[J]. 中药材,2009,32(7):1059-1062.
- [12] ZHAO L, CHEN W M, FANG Q C. Triterpenoid saponins from *Anemone flaccida* [J]. Planta Med, 1990, 56(1):92-93.
- [13] HUANG X, CHENG S H, DU Y G, et al. Synthesis of oleanolic acid saponins mimicking components of Chinese folk medicine Di Wu [J]. Carbohydr Res, 2009, 344(10):1153-1158.
- [14] 黄璐琦,郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成[J]. 中国中药杂志,2007,32(4):277-280.
- [15] OBRADOVIC M, KRAJSEK S S, DERMASTIA M, et al. A new method for the authentication of plant samples by analyzing fingerprint chromatograms [J]. Phytochem Anal, 2007, 18(2):123-132.
- [16] SARROU E, MARTENS S, CHATZOPOULOU P. Metabolite profiling and antioxidative activity of Sage (*Salvia fruticosa* Mill.) under the influence of genotype and harvesting period [J]. Ind Crop Prod, 2016, 94:240-250.
- [17] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药材质量标准 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2018:78-80.
- [18] 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.
- [19] CHEN S L, SONG J Y, YAO H, et al. Strategy and Key Technique of Identification of Chinese Herbal Medicine Using DNA Barcoding [J]. Chin J Nat Med, 2009, 7(5):322-327.
- [20] 方强强,王燕,彭春,等. 中药DNA条形码分子鉴定技术的应用与展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2018, 24(22):197-205.
- [21] 罗焜,马培,姚辉,等. 中药DNA条形码鉴定中的DNA提取方法研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2012,14(2):1433-1439.
- [22] KELLER A, SCHLEICHER T, SCHULTZ J, et al. 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. Gene, 2009, 430(1/2):50-57.
- [23] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12):2725-2729.
- [24] 杨伟群,范春林,裴红,等. 地乌药材HPLC-UV特征图谱[J]. 暨南大学学报:自然科学与医学版,2016, 37(4):277-284.
- [25] HAN L T, FANG Y, CAO Y, et al. Triterpenoid saponin flaccidoside II from *Anemone flaccida* triggers apoptosis of NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors via the MAPK-HO-1 pathway [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9:1969-1979.

[责任编辑 刘德文]