

doi:10.11937/bfyy.20170157

HPLC 法测定牡丹江地区 栽培芍药根中芍药苷的含量

李凤玉, 藏小丹, 曹 阳

(黑龙江农业经济职业学院, 黑龙江 牡丹江 157041)

摘 要:以牡丹江栽培实生苗观赏芍药的根为试材,采用 HPLC 法,研究了不同生理年龄栽培实生苗芍药根和同龄生不同径级的实生苗芍药根对其次生代谢产物芍药苷含量的影响。结果表明:牡丹江栽培实生苗芍药根中前 7 年芍药苷的含量随着年限的增长而增高,栽培 7 年生芍药实生苗的芍药苷含量最高,栽培 7 年后芍药苷的含量并没有随着栽培年份的增长而增高;同龄的芍药根芍药苷含量随着根茎变细芍药苷含量逐渐增多。

关键词:芍药;芍药苷;高效液相色谱法;含量

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)20-0149-05

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)属芍药科(Paeoniaceae)芍药属(*Paeonia*)多年生草本植物。在我国的栽培历史悠久,品种资源丰富,同时兼具观赏与药用两大用途。次生代谢产物芍药苷(paeoniflorin)是芍药根部的主要活性成分,芍药苷具有多种药理作用,如作为离子通道、保护神经、抗伤害性疼痛、保肝、降血糖、抑制肿瘤、免疫调节等作用,是芍药作为药材发挥其药理作用的主要成分,其含量大小常被作为评价芍药药材质量的优劣,以其含量多者为优^[1]。

现以种子繁殖不同生理年龄实生苗芍药根,以及同龄生不同径级的实生苗芍药根为试验材料,对其根的次生代谢产物芍药苷的含量进行测定,以期对牡丹江栽培芍药的药用开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

该试验在黑龙江省牡丹江市黑龙江农业经济职业学院芍药园进行,该芍药园位于黑龙江省牡

丹江市西安区温春镇,温春镇属中温带大陆性季风气候,四季分明,年平均气温 6.1℃,年活动积温 2 500~2 700℃,年均降水量 579.7 mm,年日照时数 2 339.8 h,年平均相对湿度 64%,土壤类型为暗棕壤。

1.2 试验材料

2016 年 10 月在黑龙江省牡丹江市黑龙江农业经济职业学院芍药园随机采挖 2 年生芍药实生苗根 50 株,3、5、10 年生的各 5 株,7 年生 15 株,鲜根去泥沙洗净去芽头装网袋,挂于通风阴凉处,自然风干。取 2 年生的 50 株,取 3、5、7、10 年生的各 5 株切成 0.5 cm 的片,用四分法取样 100 g,用分析研磨机(IKAM20)全部粉碎,过 100 目筛,装于样品瓶中;取 7 年生的样本 10 株,从粗到细至须根分成 6 个级别(表 3),每个级别取 100 g 粉碎,过 100 目筛,装于样品瓶中;处理好的样本放置冰箱保鲜室中备用。

芍药苷(每支标准品 20 mg)、乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、乙醇(色谱纯)、磷酸(分析纯)^[2]。

高效液相色谱仪(Agilent1260,配紫外检测器,自动进样仪),电子精密天平(CAV264,精度 0.000 1 g),台式数控超声波清洗器(KQ-250DE),分析研磨机(IKAM20),外分光光度计(GARY-100),全自动水分灰分分析仪(Prep ASH229,测

第一作者简介:李凤玉(1963-),女,硕士,教授,研究方向为食品分析与检测。E-mail:lfynjxy@126.com.

收稿日期:2017-06-22

水分计算干质量)。

1.3 试验方法

1.3.1 标准品溶液制备

精密称定芍药苷标准品 20 mg 于 50 mL 的棕色容量瓶中,用 50% 甲醇溶解并定容,配制成 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芍药苷标准溶液。

1.3.2 供试样品液的制备

称取芍药根粉 0.1 g(精确至 0.000 1 g,3 次重复),置于 25 mL 容量瓶中,加 50% 乙醇 20 mL,浸泡 2 h,超声处理 30 min,超声温度为 26 ℃。取出冷却,加 50% 乙醇稀释至刻度,摇匀,取上清液过有机膜,装于 2 mL 的进样瓶中,得芍药样品供试溶液。

1.3.3 检测波长的确定

取适量芍药苷标准品溶液,用甲醇稀释配制成 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,用紫外分光光度计(GARY-100)进行全波长图谱扫描。从图 1 可以看出,芍药苷在 203 nm 处 Abs 值为 3.897,222 nm 处 Abs 值为 3.974,因 222 nm 处峰值比 203 nm 处大,且接近于线值的峰误差大,故选择 222 nm 为检测波长。

1.3.4 色谱条件

Agilent SB-C18 色谱柱 (4.6 mm×150 mm,

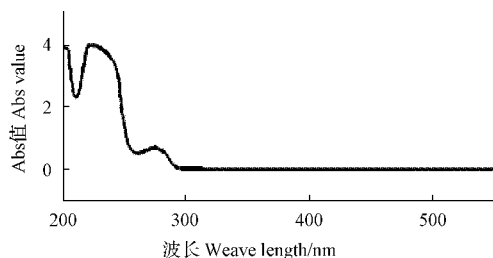
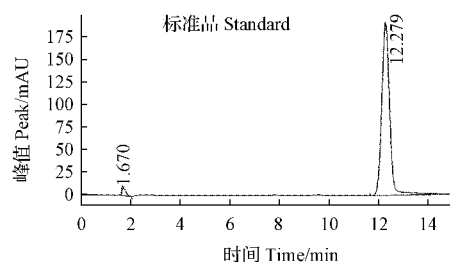


图 1 芍药苷紫外全波长扫描结果

Fig. 1 Result of UV full wavelength scanning of paeoniflorin



5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸溶液 (12 : 88),检测波长 222 nm,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 30 ℃。

1.3.5 标准曲线的绘制

将配制好的芍药苷标准溶液,过有机滤膜,装于 2 mL 的进样瓶中,放于高效液相色谱的自动进样器上,设置进样量分别为 1、2、4、6、8、10 μL ,记录峰面积,以芍药苷质量浓度($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归^[3],结果表明,芍药苷进样量在 0.4~4.0 μg 与峰面积成良好的线性,得回归方程为 $y=1\,248.1x+17.47$ ($r=0.999\,99, n=6$)。

1.3.6 精密度试验

在 1.3.4 色谱条件下,用 1.3.1 中 2 mL 进样瓶中的芍药苷标准溶液,设置标准品溶液进样量 10 μL ,重复进样 5 次测得芍药苷峰面积^[4]。结果芍药苷峰面积 RSD 为 0.03%,结果表明此仪器条件下测定芍药苷含量的精密度很好。

1.3.7 样品溶液稳定性试验

取一供试样品溶液(2 年生)放于自动进样器上,设置进样时间分别为 1、3、6、12、24、48 h,记录峰面积,结果表明,芍药苷 48 h 内稳定性良好,芍药苷峰面积 RSD 为 0.46%。表明此仪器条件下测定芍药苷含量的稳定性很好。

1.3.8 芍药苷含量测定

设置标准对照品溶液和供试样品溶液各 10 μL ,按上述(1.3.4)色谱条件测定得标准对照品溶液和供试品溶液的色谱(图 2)。将装于 2 mL 进样瓶中的芍药样品供试溶液,放置于 HPLC 的自动进样器上,色谱条件同 1.3.4,设置序列,设置进样量 10 μL ,得峰面积值,将其代入线性回归方程计算出芍药苷的浓度^[5]。

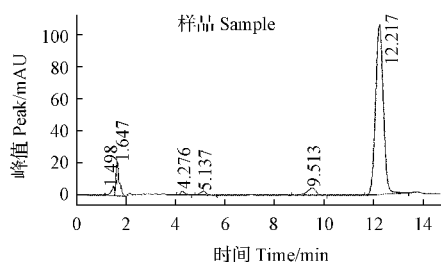


图 2 标准对照品与供试样品芍药苷 HPLC 色谱

Fig. 2 Picture of paeoniflorin HPLC of Chromatograms sample and reference products

1.4 数据分析

采用 DPS 7.05 软件对试验数据进行分析。

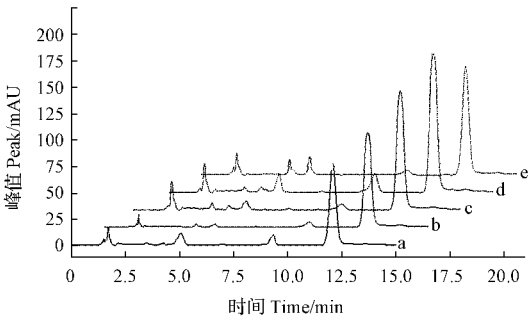
2 结果与分析

2.1 不同生理年龄芍药根中芍药苷含量的测定

由图 3、表 1、2 可知,不同生理年龄芍药根内芍药苷含量均有显著性差异,表现为 7 年生>5 年生>3 年生>10 年生>2 年生。7 年生芍药苷含量达 5.870 0%,而 2 年生含量 4.596 7%。芍药苷含量整体趋势呈低-高-低的走势,2~7 年生逐渐升高,7 年生含量最高,而后 10 年生含量降低。

2.2 同龄芍药不同根径中芍药苷含量的测定

由图 4、表 1、2 可知,不同粗细芍药根中芍药



注:a,2年生;b,3年生;c,5年生;d,7年生;e,10年生。
Note:a, 2-year-old; b, 3-year-old; c, 5-year-old; d, 7-year-old; e, 10-year-old.

图 3 不同生理年龄芍药根中芍药苷 HPLC 色谱

Fig. 3 Picture of HPLC of chromatogram of paeoniflorin in different physiological age peony root

表 1 不同生理年龄芍药根中芍药苷的含量

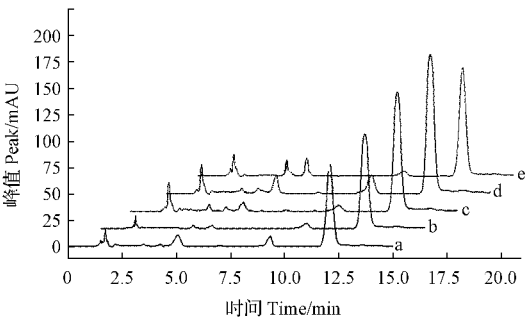
Table 1 Content of paeoniflorin in peony root of different physiological age

芍药根	2 年生	3 年生	5 年生	7 年生	10 年生
Peony root	2-year-old	3-year-old	5-year-old	7-year-old	10-year-old
含量 Content/%	4.596 7±0.005 8eE	5.086 7±0.015 3cC	5.446 7±0.025 2bB	5.870 0±0.010 0aA	4.926 7±0.015 3dD

表 2 不同生理年龄芍药根中芍药苷含量方差分析

Table 2 Variance analysis of content of paeoniflorin in peony root of different physiological age

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F value	P value
处理间 Different treatments	2.880 7	4	0.720 2	2 919.66	0.000 1
处理内 Different processing	0.002 5	10	0.000 2		
总变异 Total variation	2.883 2	14			



注:a,根茎 3.7~3.9 cm;b,根茎 2.2~2.3 cm;c,根茎 1.6~1.7 cm;d,根茎 1.0~1.1 cm;e,根茎 0.6~0.7 cm;f,根须。

Note:a, Rhizome 3.7—3.9 cm; b, Rhizome 2.2—2.3 cm; c, Rhizome 1.6—1.7 cm; d, Rhizome 1.0—1.1 cm; e, Rhizome 0.6—0.7 cm; f, Root hair.

图 4 同龄芍药不同根中芍药苷 HPLC 色谱

Fig. 4 Picture of HPLC of chromatogram of paeoniflorin in the same age of peony and different roots

表 3 同龄芍药不同根径中芍药苷的含量

Table 3 Content of paeoniflorin in the same age of peony and different roots

芍药根 Peony root/cm	须 Peony must	0.6~0.7	1.0~1.1	1.6~1.7	2.2~2.3	3.7~3.9
含量 Content/%	8.836 7±0.015 3aA	8.046 7±0.005 8bB	6.446 7±0.025 2cC	5.333 3±0.015 3dD	4.346 7±0.015 3eE	3.810 0±0.010 0fF

表 4 同龄芍药不同根径中芍药苷含量方差分析

Table 4 Variance analysis of content of paeoniflorin in the same age of peony and different roots

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of square	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
处理间 Different treatments	60.891 1	5	12.178 2	49 819.845	0.000 1
处理内 Different processing	0.002 9	12	0.000 2		
总变异 Total variation	60.894 0	17			

苷含量差异显著,随着根直径的增加芍药苷含量反而减少。芍药根须芍药苷含量达 8.836 7%,根径 0.6~0.7 cm 芍药苷含量 8.046 7%,根径 1.0~1.1 cm 芍药苷含量 6.446 7%,根径 1.6~1.7 cm 芍药苷含量 5.333 3%,根径 2.2~2.3 cm 芍药苷含量 4.346 7%,根径 3.7~3.9 cm 芍药苷含量 3.810 0%,即芍药根中芍药苷含量与其粗细呈负相关。芍药根越细,其芍药苷含量越多,这可能与芍药根越细,外层皮越多有关。与金林等^[6]研究结果中、外层皮中芍药苷含量高于内层一致。

3 结论与讨论

不同生理年龄实生苗芍药根中芍药苷含量 7 年生>5 年生>3 年生>10 年生>2 年生,前 7 年芍药苷的含量随着年份的增长而增长,并且差异显著,10 年生实生苗芍药根中芍药苷含量小于 7 年生、5 年生、3 年生芍药苷的含量,栽培 7 年后芍药苷的含量并没有随着年份的增长而增长。从栽培学和芍药根的综合成分角度分析,芍药根除芍药苷之外还有总糖、脂肪、纤维素等多种成分,随着栽培年限的增长,芍药根中其它成分含量也呈现着不同的变化趋势。但是,芍药作为药用植物的核心成分是芍药苷。其采收年限应以芍药苷含量最高的生长年限为最佳采收期,试验分析表明,在牡丹江地区人工栽培实生苗药用芍药最佳采收时期为 7 年生,其药用效果和商品价值均为最佳。对于相同生理年龄的芍药根其芍药苷的含量随着

根的直径的变化而变化,根茎越细其芍药苷的相对含量越高。相对于主根,芍药的须根中芍药苷的含量最高,药用价值和商品价值更佳,因此,在进行芍药根收获时,注意将全部主根和须根全部采收。

该试验用 GARY-100 紫外分光光度计对芍药苷样品进行全波长图谱扫描,芍药苷在 222 nm 处有最大吸收值,故选择波长 222 nm 测定芍药苷。芍药品种甚多,不同种与品种间的主要活性成分可能存在差异^[7];对芍药根径的界定只是一个范围,有待进一步完善,是否芍药根的表皮中芍药苷的含量高于内茎,也有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 康晓飞,郭先锋,许世磊,等.三个观赏芍药品种芍药苷含量的动态变化研究[J].北方园艺,2011(5):85-87.
- [2] 周星辰,李鹏,顾沛雯,TLC 和 HPLC 法同时测定苦豆子总碱中槐定碱和苦参碱的体系优化[J].北方园艺,2014(18):41-43.
- [3] 冯源.HPLC 测定黄牡丹不同部位中芍药苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012(9):139-142.
- [4] 金英善,陈曼丽,陶俊.芍药化学成分和药理作用研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2013(4):745-750.
- [5] 许源,刘培,严辉,等.白芍初加工过程中单萜苷类及多羟基化合物的变化分析[J].中药材,2014(5):775-780.
- [6] 金林,赵万顺,郭巧生,等.芍药根化学成分分布及加工工艺研究[J].中国中药杂志,2015,40(10):1953-1959.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2005 版)[M].北京:化学工业出版社,2006.

doi:10.11937/bfyy.20170195

刺五加转录因子基因的挖掘

龙月红, 宋 菊, 国红玉, 尤鹏升, 邢朝斌

(华北理工大学 生命科学学院, 河北 唐山 063000)

摘 要:以刺五加嫩叶为试材,采用二代测序方法 Illumina HiSeq 4000 进行转录组测序和生物信息学方法,找出其转录因子,并随机挑选 4 个不同家族的转录因子,针对 6 个生长时期和 3 个器官的样本,使用实时荧光定量 PCR 确认转录因子的正确性。结果表明:刺五加转录组共计 8.34 Gb,拼接得到 77 087 条 Unigenes,有 485 个转录因子,分类于 36 个家族。通过 qRT-PCR 分析,Unigene 49771、Unigene 22314、Unigene 13139 和 Unigene 18837 在不同生长发育时期和器官中表达差异极显著($P < 0.01$)。

关键词:刺五加;转录组;转录因子;皂苷

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)20-0153-04

转录因子(transcription factor, TFs)即反式作用因子,是一种重要的调控蛋白,能与真核生物

基因启动子区域的顺式作用元件发生特异性结合^[1]。其包含有 3 个典型的结构域:核定位信号区、转录激活或抑制区和 DNA 结合区^[2]。目前已经发现的转录因子有 84 个家族,根据 DNA 结合域的不同,可将转录因子分为 MYB、bHLH、bZIP、Zinc-finger、MADS-box 等不同家族^[3]。其中 MYB 家族是植物中最大的转录因子家族,与植物的生长发育、生理代谢、细胞形态等生理过程有关^[4]。MADS-box 则是植物界研究最为广泛的转录因子家族,其最主要的作用是参与调控花的形成^[5]。

第一作者简介:龙月红(1974-),女,本科,实验师,研究方向为分子生药学。E-mail:lyhheuu@126.com.

责任作者:邢朝斌(1975-),男,硕士,教授,研究方向为分子生药学及药用植物细胞工程。E-mail:xzbheuu@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31570683);河北省教育厅资助科研资助项目(QN2014102);华北理工大学培育基金资助项目(SP201508)。

收稿日期:2017-04-05

Determination of Paeoniflorin of Cultivated Peony Root in Mudanjiang by HPLC

LI Yufeng, ZANG Xiaodan, CAO Yang

(Heilongjiang Agriculture Economics Vocational College, Mudanjiang, Heilongjiang 157041)

Abstract: Using the method of HPLC, seedling root of herbaceous peony seedlings were used as test materials in Mudanjiang city, the effect of the different physiological age of seedling cultivation of peony root and different size of peony seedling root on the secondary metabolites of paeoniflorin were studied. The results showed that in Mudanjiang cultivated seedlings of peony root in 7 years before the content of paeoniflorin was increased with the number of years of cultivation. It had the highest content of paeoniflorin in 7-year-old peony seedlings. After 7 years of cultivation the content of paeoniflorin was not increased with the growth of the year. The content of paeoniflorin in the same age was gradually increased with the increase of the content of paeoniflorin.

Keywords: Chinese herbaceous peony; paeoniflorin; HPLC; content