

基于茎痕判定的不同生长年限重楼药材中皂苷含量分析

李燕敏^{1,2}, 丁立帅^{2,3}, 王晶晶^{2,3}, 刘晓谦², 陈两绵², 高慧敏^{2*}, 王智民^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;

3. 河南中医药大学 药学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:明确基于茎痕判定的不同生长年限重楼药材中甾体皂苷含量。方法:基于茎痕数目判定重楼药材的生长年限;采用 HPLC 测定不同样品中重楼皂苷 VII,重楼皂苷 VI,重楼皂苷 V,重楼皂苷 II 和重楼皂苷 I 的含量。结果:不同批次重楼药材被区分为生长年限 3~7 年,3~8 年和 3~9 年的样品。所有检测样品均符合 2015 年版《中国药典》重楼药材项下重楼皂苷 VII,VI,II 和 I 的总量不低于 0.6% 的要求;在检测的 5 个指标成分中,以偏诺皂苷类重楼皂苷 VII 为主。不同年限样品甾体皂苷的含量总体上呈现随年限增长而增加的趋势。结论:茎痕可以作为典型外观特征纳入重楼药材传统质量评价体系。

[关键词] 七叶一枝花;根茎;茎痕;生长年限;甾体皂苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0042-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120042

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160426.1037.030.html>

[网络出版时间] 2016-04-26 10:37

Determination of Steroidal Saponins in *Paridis Rhizoma* with Different Ages Based on Numbers of Mark of Dropped Stem Bottom

LI Yan-min^{1,2}, DING Li-shuai^{2,3}, WANG Jing-jing^{2,3},

LIU Xiao-qian², CHEN Liang-mian², GAO Hui-min^{2*}, WANG Zhi-min^{2*}

(1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China;*

2. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicine, Beijing 100700, China;*

3. *Pharmacy College, Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)*

[Abstract] **Objective:** To understand the contents of steroidal saponins in *Paridis Rhizoma* with different growth ages based on numbers of mark of dropped stem bottom. **Method:** The growing ages of *Paridis Rhizoma* was identified with the numbers of mark of dropped stem bottom. The contents of polyphyllin VII, polyphyllin VI, polyphyllin V, polyphyllin II and polyphyllin I were determined by HPLC. **Result:** The different batches of samples were divided into the various samples with 3-7, 3-8 and 3-9 years based on the numbers of mark of dropped stem bottom. All tested samples are fulfilled with the require of content limit described in the current *Chinese Pharmacopoeia*, that the total amounts of polyphyllin VII, polyphyllin VI, polyphyllin II and polyphyllin I are not less than 0.6%. Among the five marker constituents, polyphyllin VII has the highest amount. The contents of steroidal saponins in the samples have a gradually increasing trend, with the growth years increasing. **Conclusion:**

[收稿日期] 20160121(001)

[基金项目] 2015 年中医药行业科研专项(201507002)

[第一作者] 李燕敏,在读硕士,Tel/Fax: 010-84014128,E-mail: 719739090@qq.com

[通讯作者] *高慧敏,研究员,从事中药化学与质量评价研究,Tel/Fax: 010-84014128,E-mail: hmgao@icmm.ac.cn;

*王智民,研究员,从事中药化学与质量评价研究,Tel/Fax: 010-84014128,E-mail: zhmw123@263.net

The mark of dropped stem bottom could be considered as a typical character for the traditional quality evaluation system of *Paridis Rhizoma*.

[Key words] *Paris polyphylla* var. *chinensis*; rhizoma; mark of dropped stem bottom; growth ages; steroidal saponins

重楼来源于百合科植物云南重楼或七叶一枝花的干燥根茎,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效,用于疔疮痈肿、咽喉肿痛、蛇虫咬伤、跌扑伤痛、惊风抽搐^[1]。重楼药用历史悠久,目前是云南白药、宫血宁、热毒清等多种著名中成药的主要原料之一。随着中药工业和大健康产业的快速发展,对重楼资源的市场需求大幅增长,巨大的供应缺口导致野生资源遭遇掠夺式采挖,许多未达入药年限的重楼资源被仓促采挖,商品重楼药材品质下降。再者,重楼的人工规模化种植业尚处于初级阶段^[2-3],栽培种源多来自野生混杂群体,种苗的混乱不堪加剧了商品药材质量的参差不齐。在影响重楼药材质量的诸多因素中(品种、产地、采收年限和时节等),对于以地下根茎入药的多年生重楼来讲,生长年限是判断药材质量的重要传统指标之一。已有研究证实随生长年限的增加,滇重楼地下根茎中甾体皂苷的含量呈现总体升高的趋势^[4-6]。鉴于目前重楼药材仍旧主要来源于野生资源,商品重楼的采收年限是不统一的。因此,如何快速、简易地判别重楼药材的采收年限,并将其纳入商品重楼分级标准的评价体系之中,显得至关重要。

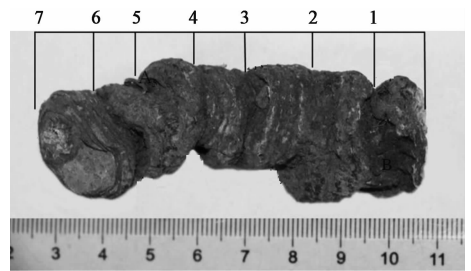
中药材生长年限的鉴别方法有很多种^[7-12],如 DNA 分子技术,蛋白质标记技术,光谱和色谱技术^[7-8]以及最近兴起的电子鼻^[9]和基于植物生物学特性的“生长轮”^[10-12],但这些方法各有优缺点,需要对药材进行提取,样品前处理过程复杂,或者仪器尚未普及。药材外观性状中的典型特征(比如芦头上的芦碗)作为年限传统鉴别方法一直被用于人参药材的鉴定,具有简单、直观和实际可操作的特点^[7,13]。茎痕在重楼药材外观性状中是一个显著特征,每年植物地上茎枯萎脱落后,在地下根茎上形成的疤痕,一般一年形成一个茎痕。依据茎痕数目的多少,可判断出药材的生长年限。本研究采用 HPLC 方法测定基于茎痕判定的不同生长年限重楼药材中甾体皂苷的含量,从化学评价指标上探讨外观性状特征茎痕判别重楼药材真实生长年限,进而将其纳入重楼传统质量评价体系。

1 仪器与试剂

2695-2996 型高效液相色谱仪(Waters),

BSA2245-CW 型分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),乙腈和甲醇色谱纯,娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其他试剂为分析醇。

3 批次野生重楼根茎于 2014 年 11 月分别来自福建省龙岩市长汀县草药市场,经福建中医药大学药学院范世明高级实验师鉴定为百合科七叶一枝花 *Paris polyphylla* var. *chinensis* 的干燥根茎。见图 1。重楼皂苷 I, II, IV 和 VII 对照品购买于中国食品药品检定研究院(批号 111590-2011103, 111592-200402, 111593-201303, 111591-200402)。重楼皂苷 V(批号 LOT#201311, 纯度 98%)购买于上海盛中医药化工有限公司。



1~7. 1~7 年生生长年限茎痕

图 1 7 年生的重楼根茎

Fig. 1 Rhizoma of *Paridis Rhizoma* growing for seven years

2 方法与结果

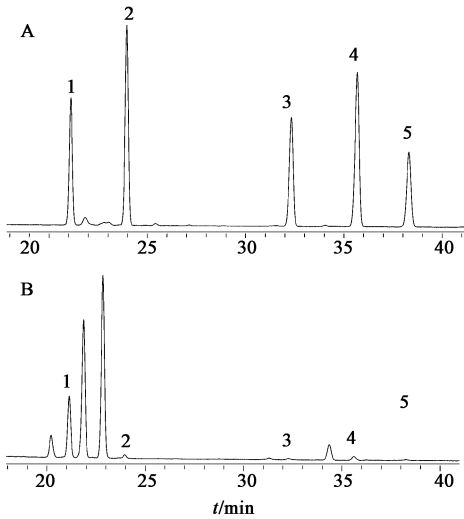
2.1 基于茎痕的重楼药材生长年限判定 为了排除产地和基源品种对结果的影响,本研究选择同一产地(福建长汀)和同一基源(七叶一枝花)的根茎开展研究。根据根茎上茎痕数目的多少,将不同批次的重楼药材进一步区分为不同生长年限的样品。

2.2 不同样品中重楼皂苷 I, II, V, VI 和 VII 的含量测定 含量测定方法参考 2015 年版《中国药典》一部重楼药材含量测定项下的方法^[1]。

2.2.1 对照品溶液的制备 取重楼皂苷 VII, VI, II, I, V 适量,精密称定,用甲醇溶解并定容,制成质量浓度为 2.042, 2.328, 2.102, 2.790, 1.162 g·L⁻¹ 的对照品溶液。精密量取上述各对照品溶液适量,混合、定容,制成质量浓度为 0.204, 0.233, 0.210, 0.279, 0.116 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液(1);将部分混合对照品(1)稀释 10 倍,得混和对照品溶液(2)。

2.2.2 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm ×

250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)和水(B)梯度洗脱(0~40 min, 30%~60% A, 40~50 min, 60%~30% A), 检测波长 203 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 柱温 30 ℃。上述色谱条件下, 混合对照品和典型样品的 HPLC 见图 2。



A. 混合对照品溶液; B. 供试品溶液; 1. 重楼皂苷 VII; 2. 重楼皂苷 VI; 3. 重楼皂苷 II; 4. 重楼皂苷 I; 5. 重楼皂苷 V

图 2 混合对照品和典型重楼样品的 HPLC

Fig. 2 HPLC profiles of mixed reference substances and sample solution of Paridis Rhizoma

2.2.3 供试品溶液的制备 取各样品粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取混和对照品溶液(2)5, 10 μL, 混合对照品溶液(1)2, 5, 10, 12, 15, 18, 20 μL, 进样分析, 记录待测成分的峰面积, 以峰面积 Y 对进样量 X 进行线性回归, 得到待测成分的线性方程和范围, 见表 1。

表 1 5 种待测成分的线性方程和范围

Table 1 Regression equation and linear ranges of five analyzed constituents

成分	线性方程	R ²	范围/μg
重楼皂苷 VII	Y = 256 431X - 915	0.999 5	0.102 ~ 4.08
重楼皂苷 VI	Y = 363 609X - 552	0.999 5	0.116 ~ 4.65
重楼皂苷 II	Y = 266 328X - 1 598	0.999 6	0.105 ~ 4.20
重楼皂苷 I	Y = 301 779X - 9 673	0.999 4	0.140 ~ 5.58
重楼皂苷 V	Y = 364 513X - 1 754	0.999 7	0.058 1 ~ 2.32

2.2.5 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录待测成分的峰面积, 结果显示重楼皂苷 VII, VI, II, I 和 V 峰面积的 RSD 分别为 0.8%,

0.7%, 1.5%, 0.6%, 0.9%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在制样后 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h 进样测定, 结果重楼皂苷 VII, VI, II, I, V 峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 1.1%, 1.0%, 1.0%, 1.7%, 表明处理后的样品溶液至少在 72 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一供试品约 0.5 g, 共 6 份, 按供试品溶液制备方法处理, 分别进样 10 μL, 记录色谱峰面积, 计算含量, 结果显示重楼皂苷 VII, VI, II, I, V 的质量分数分别为 0.248%, 0.606%, 0.126%, 0.801%, 0.169%, RSD 分别为 1.6%, 3.0%, 2.4%, 2.7%, 0.9%。

2.2.8 加样回收率 称取已知含量的样品约 0.1 g, 精密称定, 分别精密加入重楼皂苷 VII, VI, II, I, V 对照品(约相当于各样品含量的 80%, 100%, 120%), 按供试品溶液处理方法制备样品, 测定各待测成分的含量, 计算加样回收率。结果见表 2。

表 2 重楼样品中 5 种待测成分的加样回收率

Table 2 Recovery of five analyzed constituents in samples of Paridis Rhizoma

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
重楼皂苷 VII	0.099 8	0.248	0.245	0.499	102.4	101.1	2.2
	0.100 2	0.248	0.245	0.487	97.55		
	0.100 2	0.248	0.245	0.505	104.9		
	0.100 2	0.248	0.204	0.453	100.5		
	0.100 2	0.248	0.204	0.456	102.0		
	0.100 2	0.248	0.204	0.450	99.01		
	0.100 1	0.248	0.285	0.542	103.2		
	0.100 2	0.248	0.285	0.534	100.4		
	0.100 0	0.248	0.285	0.533	100.1		
	0.100 2	0.248	0.285	0.533	100.1		
重楼皂苷 VI	0.099 8	0.605	0.605	1.24	105.0	101.0	3.4
	0.100 2	0.607	0.605	1.20	98.02		
	0.100 2	0.607	0.605	1.23	103.0		
	0.100 2	0.607	0.512	1.09	94.34		
	0.100 2	0.607	0.512	1.14	104.1		
	0.100 2	0.607	0.512	1.13	102.1		
	0.100 1	0.607	0.745	1.37	102.4		
	0.100 2	0.607	0.745	1.36	101.1		
重楼皂苷 II	0.099 8	0.606	0.745	1.34	98.52		
	0.100 0	0.606	0.745	1.34	98.52		
	0.099 8	0.126	0.126	0.248	96.83	97.69	1.6
	0.100 2	0.126	0.126	0.248	96.83		
	0.100 2	0.126	0.126	0.251	99.21		
0.100 2	0.126	0.106	0.231	99.06			

续表 2

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
	0.100 2	0.126	0.106	0.231	99.06		
	0.100 2	0.126	0.106	0.231	99.06		
	0.100 1	0.126	0.147	0.265	94.56		
	0.100 2	0.126	0.147	0.270	97.96		
	0.100 0	0.126	0.147	0.268	96.60		
重楼皂苷 I	0.099 8	0.799	0.781	1.58	100.0	100.5	3.2
	0.100 2	0.803	0.781	1.60	102.0		
	0.100 2	0.803	0.781	1.59	100.8		
	0.100 2	0.803	0.614	1.39	95.60		
	0.100 2	0.803	0.614	1.43	102.1		
	0.100 2	0.803	0.614	1.39	95.60		
	0.100 1	0.802	0.948	1.75	100.1		
	0.100 2	0.803	0.948	1.80	105.2		
	0.100 0	0.801	0.948	1.78	103.3		
重楼皂苷 V	0.099 8	0.169	0.162	0.337	103.7	104.9	1.2
	0.100 2	0.169	0.162	0.340	105.6		
	0.100 2	0.169	0.162	0.342	106.8		
	0.100 2	0.169	0.139	0.316	105.8		
	0.100 2	0.169	0.139	0.314	104.3		
	0.100 2	0.169	0.139	0.316	105.8		
	0.100 1	0.169	0.186	0.361	103.2		
	0.100 2	0.169	0.186	0.362	103.8		
	0.100 0	0.169	0.186	0.365	105.4		

2.2.9 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 计算含量。不同批次样品中 5 种皂苷的含量见表 3。

3 讨论

3.1 实验样品 福建省重楼资源丰富, 其根茎在止血活性更强的偏诺皂苷类成分上具有一定的地域优势。与云、贵、川地区重楼种源的多样性相比, 该省重楼种源相对单一, 整体化学特征相对稳定。本研究选择来源于同一产地福建长汀的野生重楼药材进行生长年限的区分, 一定程度上保证了实验样品的地域和基源品种的一致性。从表 3 可知, 依据茎痕数目的多少, 3 批重楼药材被区分为不同年限的样品(3~7 年, 3~8 年和 3~9 年), 这也间接地说明重楼药材在采收时是不同生长年限植物的混合品, 并且采挖时没有考虑资源的可持续利用。已有文献表明, 滇重楼种子苗 3 年生之前的根茎中重楼皂苷 VII, VI, II, I 的总量不符合《中国药典》要求(总量

不低于 0.6%)^[6], 笔者对云南白药中药材优质种源繁育有限责任公司提供的 1 年生, 2 年生和 3 年生的滇重楼实生苗根茎的皂苷含量分析也证实了这一点。从第 4 年开始, 其根茎中皂苷含量可达标, 且产量进入快速增长期。本研究观察到实验样品的根茎个体均是 3 年生以上, 所有批次含量测定结果均符合药典标准要求, 在 4 个法定检测的重楼皂苷指标成分中, 主要以偏诺皂苷中的重楼皂苷 VII 为主。

3.2 茎痕表征的生长年限与甾体皂苷含量的关系 对于基源植物为多年生的中药材, 其活性成分的含量随生长年限的增加而增加。本研究表明重楼药材中甾体皂苷的含量总体上也呈现随年限增长而曲折性增加的趋势, 3~6 年含量增加, 7 年以后增加缓慢或略有下降, 与滇重楼种子、生苗采集的样品研究结果^[6]类似, 但也与部分文献报道“4 个重楼皂苷总量从第 6 年后下降”存在一定偏差^[5]。究其原因可能是分析样本的来源存在差异, 该文献样品尽管采自滇重楼栽培基地不同栽培年限的植株, 未考虑栽培种苗是来自野生种质资源的混合品还是由块茎繁殖。这也进一步说明了将茎痕表征的药材真实生长年限纳入重楼质量评价体系的意义所在, 测定结果从现代化学评价指标重楼皂苷的含量上佐证了以茎痕数目判别重楼药材生长年限具有一定的科学合理性。重楼药材质量因种、地、时不同^[3], 商品重楼质量参差不齐, 对其进行分级标准的建立, 可以实现产品的优质优价^[14]。目前关于重楼药材等级标准的研究仅涉及根茎鲜重、干重、根茎粗和长^[15], 若将茎痕这一典型外观特征纳入评价体系, 从外观性状上对药材质量进行直观判断, 对于完善重楼药材传统质量评价方法和建立等级标准具有重要价值。

根据中药材经典书籍和《中国植物志》对重楼属植物的描述, 其典型特征为茎单生, 直立, 顶生一轮花(叶状萼片)。基于本研究, 野生重楼药材采用茎痕快速判定其生长年限, 进而初步评价药材质量是可行的。对于栽培重楼而言, 由于栽培基质或肥料中营养物质丰富, 随着生长年限的增加, 地上茎可能出现双杆或多头现象, 但不会影响基于茎痕对生长年限判定的结果, 原因在于除了茎痕, 不同年度根茎的生长量呈现出结节状, 可以辅助判别双杆或多头现象产生的茎痕是同一年度还是不同年度遗留的痕迹。再者, 从植物栽培学的角度考虑, 植株地上部分生长旺盛, 必然会影响次生代谢产物在根茎部分的积累, 因此, 在栽培过程中顶芽形成时, 会采用

表 3 不同批次重楼根茎样品中 5 种皂苷的质量分数 (n = 3)

批次	年限	重楼皂苷 VII	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 II	重楼皂苷 I	重楼皂苷 V	VII + VI + II + I	VII + VI + II + I + V	%	
1	3 年	0.607	0.022	Nd	Nd	Nd	0.630	0.630		
	4 年	0.652	0.017	0.021	0.040	Nd	0.730	0.730		
	5 年	0.525	0.173	Nd	0.025	0.058	0.723	0.780		
	6 年	0.756	0.027	0.026	0.038	0.045	0.846	0.890		
	7 年	0.867	Nd	0.049	0.018	Nd	0.934	0.934		
	2	3 年	1.860	0.162	Nd	0.031	0.015	2.050	2.070	
		4 年	1.810	0.155	Nd	0.017	Nd	1.980	1.980	
5 年		1.880	0.338	Nd	0.026	0.040	2.240	2.280		
6 年		1.490	0.191	Nd	0.018	Nd	1.700	1.700		
7 年		2.460	0.113	0.032	0.018	0.259	2.620	2.880		
8 年		1.560	0.103	Nd	Nd	0.013	1.660	1.670		
3		3 年	0.946	0.076	Nd	Nd	Nd	1.020	1.020	
	4 年	1.240	0.182	Nd	Nd	Nd	1.420	1.420		
	5 年	1.270	0.182	Nd	Nd	Nd	1.430	1.430		
	6 年	0.645	0.106	Nd	Nd	Nd	0.751	0.751		
	7 年	1.000	0.044	Nd	Nd	Nd	1.040	1.040		
	8 年	0.879	0.119	Nd	Nd	Nd	0.998	0.998		
	9 年	2.030	Nd	Nd	Nd	Nd	2.030	2.030		

注: Nd 未检出。

“去除多余芽头,只保留 1 个”的干预措施,确保第二年仍旧长出 1 支地上茎,遗留 1 个明显的茎痕。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015: 260.

[2] 李恒,李嵘,王跃虎. 我国重楼种植业发展之路[J]. 云南林业,2015(3): 28-31.

[3] 李恒,苏豹,张兆云,等. 中国重楼资源现状评价及其种植业的发展对策[J]. 西部林业科学,2015,44(3):1-7,15.

[4] 夏从龙,赵杰,吕霜霜,等. 不同生长年限滇重楼 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国现代应用药学,2011,28(6):515.

[5] 张焯,吕霜霜,周浓,等. 不同生长年限滇重楼中 4 种重楼皂苷的含量比较[J]. 中国药房,2011,22(43): 4081-4083.

[6] 赵庭周,王卜琼,马青,等. 滇重楼采收期研究[J]. 中国野生植物资源,2014,33(5):61-63,66.

[7] 程春松. 基于端粒研究的人参年限鉴定及其数学模型的构建[D]. 合肥:安徽中医药大学,2013.

[8] 杨会云,刘飞,杨春艳,等. 红外光谱结合判别分析对滇重楼生长年限的鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):35-39.

[9] 杨庆珍,郑司浩,黄林芳,等. 基于电子鼻技术和化学成分分析对不同生长年限黄芩的研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2015,17(3):723-728.

[10] Liu Y B, Zhang Q B. Growth rings of roots in perennial forbs in Duolun Grassland, Inner Mongolia, China [J]. J Integrative Plant Biology,2007,49(2): 144-147.

[11] Zha L P, Cheng M E, Peng H S. Identification of ages and determination of paeoniflorin in roots of *Paeonia lactiflora* Pall from four producing areas based on growth rings[J]. Microsc Res Tech,2012,75(9): 1191-1196.

[12] 王军. 苦参药用部位发育解剖暨黄芩道地药材的年限鉴别及其次生代谢产物积累研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2013.

[13] 关艳玲,田成刚. 野山参生长年限的初步探讨[J]. 中国特种经济动植物,2013(1): 44-46.

[14] 杨光,曾燕,郭兰萍,等. 中药材商品规格等级标准研究现状及几个关键问题的商榷[J]. 中国中药杂志,2014,39(9):1733-1738.

[15] 杨丽英,杨斌,王馨,等. 滇重楼药材产品质量分级标准研究[J]. 西南农业学报,2012,25(5): 1860-1864.

[责任编辑 顾雪竹]