

· 资源与鉴定 ·

多茎滇重楼地上叶和茎中主要次生代谢产物的积累

王彩步, 韩多, 杨敏, 李海峰*

(大理大学 药学与化学学院, 药物研究所, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的:探讨不同居群多茎滇重楼叶和茎中主要次生代谢产物的积累规律。方法:采用 HPLC 测定不同居群多茎滇重楼叶和茎中主要活性成分重楼皂苷 I, II, VI, VII 的含量,流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~40 min, 30%~60% B; 40~50 min, 60%~30% B),检测波长 203 nm,运用单因素方差分析、聚类分析和 HPLC 图谱分析探讨其次生代谢产物的积累规律。结果:不同居群多茎滇重楼叶中重楼皂苷 II, VI, VII 含量及总含量具有显著差异;除个别居群外,不同居群多茎滇重楼茎中重楼皂苷 VII 含量差异较小。叶中主要检测到重楼皂苷 II 和 VII,茎中只检测到重楼皂苷 VII。多茎滇重楼和滇重楼比较的地上部分叶和茎 HPLC 图谱相似度均较低,6 个居群叶中重楼皂苷 I, II, VI, VII 总质量分数达到了 2015 年版《中国药典》规定的限量标准。结论:多茎滇重楼与滇重楼地上部分叶和茎存在一定差异,但多茎滇重楼叶中有效物质成分较高,该研究为多茎滇重楼地上部分叶和茎的开发利用提供了一定的参考依据。

[关键词] 滇重楼; 多茎滇重楼; 茎叶; 重楼皂苷; 相似度; 次生代谢产物

[中图分类号] R282.6; R284.1; R932; R282.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0034-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100034

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170307.1614.010.html>

[网络出版时间] 2017-03-07 16:14

Accumulation of Main Secondary Metabolites in Leaves and Stems of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* with Multi-stem

WANG Cai-bu, HAN Duo, YANG Min, LI Hai-feng*

(College of Pharmacy and Chemistry, Institute of Materia Medica,
Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the accumulation of main secondary metabolites in leaves and stems of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem. **Method:** The contents of polyphyllin I, II, VI and VII in the leaves and stems of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem were determined by HPLC. One-way ANOVA, cluster analysis and HPLC analysis were used to evaluate the accumulation of its secondary metabolites. **Result:** There were significant differences in the contents of polyphyllin II, VI, VII and their total content in the leaves of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem; in addition to individual populations, polyphyllin VII content had a certain difference in the stems of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem. Polyphyllin II and polyphyllin VII were mainly detected in the leaves, and only polyphyllin VII was detected in the stems. The similarity of HPLC were low both in the leaves and stems of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem and *P. polyphylla* var. *yunnanensis*. Six populations of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem had reached the standard of the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* in the total content of polyphyllin I, II, VI and VII.

[收稿日期] 20161212(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360616);云南省应用基础研究计划青年项目(2014FD046)

[第一作者] 王彩步,在读硕士,从事药用植物次生代谢、品质评价及质量控制研究, Tel:13628723410, E-mail:wangcaibu@sina.com

[通讯作者] *李海峰,硕士,教授,从事药用植物次生代谢、品质评价及质量控制研究, Tel:0872-2251475, E-mail:lihfhz888@sina.com

Conclusion: There are some differences in accumulation of main secondary metabolites in the leaves and stems between *P. polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem and *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, but the contents of active substances is higher in the former. This study provides a scientific basis for development and utilization of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem.

[**Key words**] *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem; stems and leaves; polyphyllin; similarity; secondary metabolites

滇重楼为百合科多年生草本植物^[1-2]。在主要原料来源地滇重楼存在 2 种形态,一种与《云南植物志》^[1]记录的滇重楼植物学形态一致,根状茎不分枝;另一种在《云南植物志》和《中国植物志》中均无记录,根状茎常分枝,少则几茎同出,多则几十或上百茎同出,产地俗称多茎滇重楼、多芽重楼。目前,对多茎滇重楼的形成原因,比较公认的观点——其是滇重楼在特殊生理、生态环境下生长发育而成。与滇重楼比较,多茎滇重楼根状茎粗壮、分枝数较多、植株高大、叶片数多、光合作用能力强、产量高,因此目前在大理白族自治州被广泛使用。

滇重楼在 2015 年版《中国药典》中以地下根茎入药,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊等功效^[2],但地下部分根茎生长速度比较缓慢,种植效益和经济效益低下,而地上部分叶和茎为一年生,相比地下部分根茎有较丰富的资源^[3]。李恒^[4]多年来从事滇重楼地上部分活性成分的提取及其他研究,发现其在药用价值方面可以部分替代该药材的根茎,且叶中皂苷类成分含量在全株不同组织器官中仅次于根茎^[5]。还有研究表明重楼地上部分叶和茎具有丰富的皂苷类成分,地上部分与地下部分具有一定的生物功能等效性^[6]。本实验采用高效液相色谱法(HPLC)对大理州不同居群多茎滇重楼地上部分叶和茎中重楼皂苷 I, II, VI, VII 进行含量测定,并与滇重楼地上部分叶和茎进行比较研究,为多茎滇重楼地上部分叶和茎资源的开发与利用提供一定依据。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司,含 G1315A/B 型 DAD 检测器),AE240 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),FY135 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),KL-UP-UV-20 型实验室专用超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司)。

重楼皂苷 I, II, VI, VII 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111590-200402, 111591-200301, 111592-200301, 111593-200402, 纯度均 ≥

98%),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。2015 年 9 月种子成熟期在云南省大理白族自治州不同产地采集多茎滇重楼和滇重楼样品,选择具有相同茎数(滇重楼为单个茎,多茎滇重楼为 10~12 个茎)的植株作为样品,均经大理大学药物研究所李海峰教授鉴定,分别为百合科植物多茎滇重楼和滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* 的植株,分别取植株地上部分叶和茎作供试样品,不同产地滇重楼样品(S10~S18)混合作为多茎滇重楼对照药材,样品信息见表 1,采集的样品自然干燥,置于 40℃ 恒温箱中干燥至恒重。

表 1 滇重楼的样品信息

Table 1 Informations of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* samples

No.	产地	经纬度
S1, S10	剑川羊琴	N26.49°, E100.47°
S2, S11	南涧乐秋	N24.99°, E100.33°
S3, S12	鹤庆西邑	N25.31°, E100.54°
S4, S13	云龙长新	N25.85°, E99.49°
S5, S14	云龙关平	N25.86°, E99.51°
S6, S15	漾濞平坡	N25.99°, E100.09°
S7, S16	大理湾桥	N25.79°, E100.12°
S8, S17	洱源邓川	N26.00°, E100.09°
S9, S18	巍山巍宝山	N26.90°, E99.97°

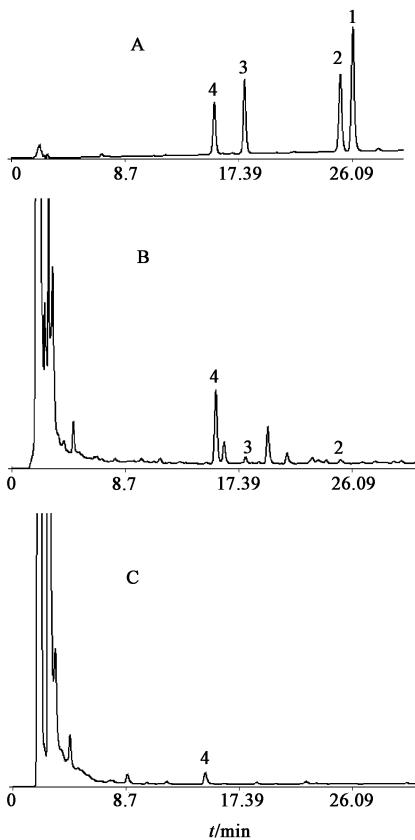
注: S1~S9 为多茎滇重楼, S10~S18 为滇重楼。

2 方法与结果

2.1 主要次生代谢产物的含量测定

2.1.1 色谱条件 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~40 min, 30%~60% B; 40~50 min, 60%~30% B), 检测波长 203 nm, 柱温 30℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。见图 1。

2.1.2 对照品及供试品溶液的制备^[7] 精密称取重楼皂苷 I, II, VI, VII 对照品适量, 分别置于不同的 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得对照品溶液。将样品粉碎, 过 100 目筛, 混匀, 精密称取供试品叶和茎粉末各 0.5 g, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入 75% 乙醇 4 mL, 于 60℃, 54 kHz 超声处理 1 h, 过滤, 滤液置于 10 mL 量瓶中; 向药材滤渣中加 75%



A. 对照品; B. 叶; C. 茎; 1. 重楼皂苷 VII; 2. 重楼皂苷 VI; 3. 重楼皂苷 II; 4. 重楼皂苷 I

图 1 多茎滇重楼不同部位样品的 HPLC
Fig. 1 HPLC chromatograms of leaves and stems of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem

乙醇 4 mL, 过夜, 相同参数超声处理 1 h, 过滤, 加 75% 乙醇定容, 得供试品溶液。

2.1.3 线性关系考察^[7] 精密量取 2.1.2 项下对照品溶液适量, 稀释后分别得到 6 个不同质量浓度重楼皂苷 I, II, VI, VII 混合对照品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程分别为 $Y = 367.29X + 4.833$ ($r = 0.9991$), $Y = 362.27X - 0.110$ ($r = 0.9999$), $Y = 368.9X + 2.646$ ($r = 0.9999$), $Y = 272.22X + 6.921$ ($r = 0.9992$), 线性范围依次为 0.064 ~ 2.550, 0.040 ~ 1.600, 0.066 ~ 2.650, 0.051 ~ 2.050 μg 。

2.1.4 精密性、重复性、稳定性和加样回收率试验^[7] 通过对重楼皂苷 I, II, VI, VII 含量测定方法进行考察, 结果精密性试验 (RSD 分别为 0.4%, 1.9%, 0.4%, 0.7%), 重复性试验 (RSD 分别为 1.0%, 1.7%, 1.2%, 1.9%), 稳定性试验 (RSD 分别为 1.8%, 1.9%, 0.8%, 2.0%) 和加样回收率试验 (RSD 分别为 1.2%, 1.8%, 2.2%, 2.1%) 均符合含量测定要求。

2.1.5 重楼皂苷 I, II, VI, VII 含量的比较 取不同居群多茎滇重楼叶和茎的样品, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液 ($n = 3$), 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算各成分质量分数, 试验数据利用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, 见表 2。结果表明不同居群多茎滇重楼叶中重楼皂苷 II, VI, VII 含量及总含量具有显著性差异。所有居群中均未检测到重楼皂苷 I; S9 居群多茎滇重楼叶中重楼皂苷 II 含量显著高于其他居群, S5 和 S8 居群多茎滇重楼叶中皂苷 II 含量无显著差异; 只有在 S2, S6 和 S9 居群多茎滇重楼叶中检测到重楼皂苷 VI, S2 和 S6 居群多茎滇重楼叶中皂苷 VI 含量无显著差异; S5 居群多茎滇重楼叶中重楼皂苷 VII 含量显著高于其他居群, S1 和 S2 居群多茎滇重楼叶中皂苷 VII 含量无显著差异; S3 和 S6 居群多茎滇重楼叶中重楼皂苷 VII 总含量无显著差异。除 S3, S6 和 S8 居群外, 其他居群多茎滇重楼叶中重楼皂苷 II, VI, VII 总含量均达到 2015 年版《中国药典》规定的限量标准 (0.6%)^[2]。所测样品茎中均未检测到重楼皂苷 I, II, VI; S5 居群多茎滇重楼茎中重楼皂苷 VII 含量显著高于其他居群, S1 和 S4 居群, S2 和 S6 居群及 S7 和 S8 居群多茎滇重楼茎中重楼皂苷 VII 含量无显著差异, S3, S9 居群多茎滇重楼茎中未检测到重楼皂苷 VII。

2.2 地上部分叶和茎 HPLC 图谱的相似度评价 参照文献[7-8] 对多茎滇重楼 HPLC 图谱的建立进行方法学考察, 包括精密度、重复性和稳定性试验, 结果显示相对峰面积、相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%, 达到了 HPLC 图谱建立的要求。将所得色谱图 AIA 格式原始数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版), 时间窗宽度设 0.1 min, 对照图谱的生成方法为中位数法, 选定的 HPLC 图谱峰进行多点校正, 自动匹配, 建立其 HPLC 图谱。分别设定 R' 和 R'' 为参照图谱, 见图 2。

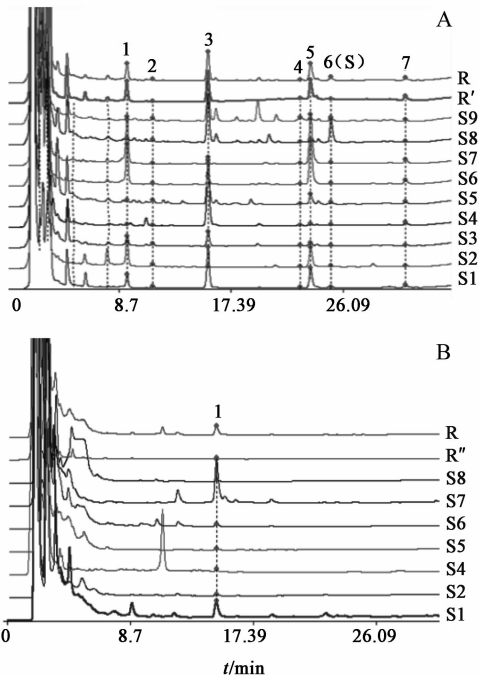
在叶的 HPLC 中, 经过与对照品保留时间比较, 确定 3 号峰为重楼皂苷 VII, 6 号峰为重楼皂苷 II。因为 6 号峰含量较高、与相邻色谱峰分离较好及相对稳定, 因此以 6 号峰 (重楼皂苷 II) 为参照峰 (S) 峰, 计算各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果不同居群多茎滇重楼与滇重楼叶中共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.4%, 说明在不同居群多茎滇重楼与滇重楼叶测定中, 所得各共有峰的保留时间比较一致, 所建立的方法较为精确及仪器运行稳定。不同居群多茎滇重楼与滇重楼叶共有峰相对峰面积的 RSD 较大, 说明不同居群多茎滇重楼叶与

表 2 多茎滇重楼叶和茎中重楼皂苷 I, II, VI, VII 质量分数的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Contents of polyphyllin I, II, VI and VII in leaves and stems of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem from different populations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

居群及部位	重楼皂苷 II	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 VII	总量	%
S1 叶	0.041 1 ± 0.001 2 ^{6,7}	-	1.647 6 ± 0.005 2 ³	1.688 7 ± 0.004 9 ⁴	
S2 叶	0.107 7 ± 0.002 1 ³	0.103 7 ± 0.001 3 ²	1.673 6 ± 0.023 8 ³	1.884 9 ± 0.020 5 ³	
S3 叶	0.174 8 ± 0.003 7 ²	-	0.076 8 ± 0.002 2 ⁷	0.251 7 ± 0.013 5 ⁷	
S4 叶	0.053 4 ± 0.001 5 ^{5,6}	-	1.091 5 ± 0.006 6 ⁴	1.144 9 ± 0.006 9 ⁵	
S5 叶	0.033 9 ± 0.001 0 ⁷	-	2.825 8 ± 0.002 8 ¹	2.859 7 ± 0.005 2 ¹	
S6 叶	0.066 3 ± 0.001 3 ^{4,5}	0.081 9 ± 0.002 3 ²	0.118 4 ± 0.003 2 ⁶	0.266 6 ± 0.004 7 ⁷	
S7 叶	0.076 5 ± 0.002 2 ⁴	-	0.578 6 ± 0.001 7 ⁵	0.655 1 ± 0.008 7 ⁶	
S8 叶	0.026 1 ± 0.000 7 ⁷	-	0.030 6 ± 0.000 9 ⁸	0.056 7 ± 0.003 9 ⁸	
S9 叶	0.799 1 ± 0.011 8 ¹	0.124 1 ± 0.001 5 ¹	1.831 8 ± 0.008 6 ²	2.705 5 ± 0.018 7 ²	
S1 茎	-	-	0.042 0 ± 0.001 2 ^{3,4}	0.042 0 ± 0.001 2 ^{3,4}	
S2 茎	-	-	0.034 6 ± 0.001 3 ⁴	0.034 6 ± 0.001 3 ⁴	
S3 茎	-	-	-	-	
S4 茎	-	-	0.022 8 ± 0.000 6 ^{3,4}	0.022 8 ± 0.000 6 ^{3,4}	
S5 茎	-	-	0.251 6 ± 0.001 3 ¹	0.251 6 ± 0.001 4 ¹	
S6 茎	-	-	0.029 5 ± 0.001 2 ⁴	0.029 5 ± 0.001 2 ⁴	
S7 茎	-	-	0.099 7 ± 0.002 4 ²	0.099 7 ± 0.002 2 ²	
S8 茎	-	-	0.096 3 ± 0.002 3 ²	0.096 3 ± 0.001 4 ²	
S9 茎	-	-	-	-	

注:重楼皂苷 I 均未检出。同列数据中不同小标数字者表示有显著差异 ($P < 0.05$), 相同小标数字者表示无显著差异 ($P > 0.05$)。



R'. S10 ~ S18 滇重楼混合样叶; R". S10 ~ S18 滇重楼混合样茎; S1 ~ S9. 不同居群多茎滇重楼; A. 叶; B. 茎; R. 对照图谱

图 2 多茎滇重楼与滇重楼地上叶和茎 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of leaves and stems of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem and *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

滇重楼叶中成分含量差异大。在茎的 HPLC 中, 其匹配的共有峰仅有 1 个, 经过与对照品保留时间比

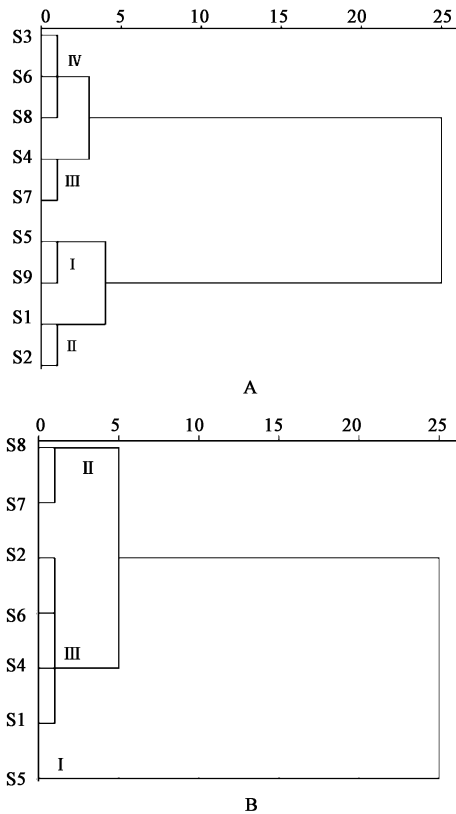
较, 确认匹配的共有峰为重楼皂苷 VII。不同居群多茎滇重楼 (S1 ~ S9) 叶与滇重楼混合样叶 R' 的相似度分别为 0.52, 0.81, 0.87, 0.53, 0.76, 0.94, 0.94, 0.90, 0.87; 茎与 R" 的相似度依次为 0.74, 0.85, 0.82, 0.93, 0.97, 0.98, 0.98, 0.99, 0.84, 不同居群叶和茎的相似度均较低, 跨度较大, 说明多茎滇重楼和滇重楼叶和茎中化学成分种类差异较大。

2.3 样品中重楼皂苷 I, II, VI, VII 总量的聚类分析

通过 SPSS 19.0 软件平方欧式距离计算样品间的相似系数, 利用 Ward 法对不同居群多茎滇重楼叶、茎中重楼皂苷 I, II, VI, VII 总量进行系统聚类分析, 树状聚类结果见图 3。根据多茎滇重楼叶中重楼皂苷 I, II, VI, VII 总量可将其分为 4 类, 第 I 类为 S5 和 S9 居群; 第 II 类为 S1 和 S2 居群; 第 III 类为 S4 和 S7 居群; 第 IV 类为 S3, S6 和 S8 居群。第 I 类多茎滇重楼叶中重楼皂苷 I, II, VI, VII 总量最高, 其次是第 II 类、第 III 类, 第 IV 类最低。根据多茎滇重楼茎中重楼皂苷 I, II, VI, VII 总量可将其分为 3 类, 第 I 类为 S5 居群; 第 II 类为 S8 和 S7 居群; 第 III 类为 S2, S6, S4 和 S1 居群。第 I 类多茎滇重楼茎中重楼皂苷 I, II, VI, VII 总量最高, 其次是第 II 类, 第 III 类最低。聚类分析与含量测定结果一致。

3 讨论

本实验对不同居群多茎滇重楼 (茎数 10 ~ 12



A. 叶; B. 茎

图 3 多茎滇重楼叶和茎中重楼皂苷 I, II, VI, VII 总量聚类树状分析
Fig. 3 Cluster tree analysis of total content of polyphyllin I, II, VI and VII in leaves and stems of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* with multi-stem

个)地上部分叶和茎主要次生代谢产物的积累进行评价,并与同产地的滇重楼(单个茎)进行比较,从含量测定分析结果可知,不同居群多茎滇重楼叶中重楼皂苷 II, VI, VII 质量分数及总含量差异较大;茎中只检测到重楼皂苷 VII,且差异较小。这可能是由于重楼皂苷类成分含量受产地和环境因素(光照、土壤、营养、微量元素等)影响较大,从而影响次生代谢途径,导致甾体皂苷类成分在多茎滇重楼叶和茎中积累的差异^[9],使其品质表现出一定的地域及生长环境依赖性^[10]。多茎滇重楼叶中主要存在重楼皂苷 II 和 VII,茎中主要存在重楼皂苷 VII,曾卫民等^[11]研究表明滇重楼地上部分与地下部分具有相似的化学成分,主要含有重楼皂苷 II 和 VII,表明多茎滇重楼与滇重楼地上部分叶和茎所含重楼皂苷类成分较一致。叶中所含重楼皂苷类成分多于茎中,表明重楼皂苷 I, II, VI, VII 主要在植物的叶绿体中合成并进行储藏和分配,经茎向下运输,主要在根茎和叶中积累和储存^[8],这与滇重楼储存分布较为类似。多茎滇重楼叶中

有 6 个居群重楼皂苷 I, II, VI, VII 总质量分数达到了 2015 年版《中国药典》的限量标准。

重楼属植物形态为茎单生,直立,顶生一轮花^[12],本实验中多茎滇重楼则为 10~12 个茎,意在探究相似茎数多茎滇重楼与滇重楼间次生代谢产物积累的比较,多茎滇重楼叶片数多,叶面积大,生长较滇重楼快,其地上部分叶和茎相比滇重楼地上部分叶和茎更具利用价值。目前多名研究者都着重致力于滇重楼地上部分叶和茎的开发与利用,鉴于笔者所在地区多将多茎滇重楼同等滇重楼入药,本实验着重对相似茎数多茎滇重楼地上部分叶和茎进行评价,结果表明该研究有一定的意义,多茎滇重楼地上部分叶和茎具有一定的开发价值。

[参考文献]

[1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志. 第 8 卷 [M]. 北京:科学出版社,1997:657-658.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:260.
[3] 许新恒,康梦瑶,匡坤燕,等. 滇重楼叶和茎总皂苷抗肝癌 HepG2 细胞活性 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(8):1865-1870.
[4] 李恒. 重楼属植物 [M]. 北京:科学出版社,1998:118.
[5] 邹亮,周浓,张海珠,等. HPLC 测定不同产地滇重楼中的 4 种重楼皂苷 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24(5): 521-523.
[6] 太光聪,方其仙,李行,等. 滇重楼栽培技术及有效成分积累研究综述 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(16): 8881-8883.
[7] 冯丽丽,张琳,李海峰,等. 滇重楼品质评价及其甾体皂苷类成分积累规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(13):41-45.
[8] 冯丽丽,张琳,李海峰,等. 滇重楼次生代谢产物甾体皂苷活性成分代谢规律的研究 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(8):664-670.
[9] 高微微,佟建明,郭顺星,等. 植物次生代谢产物的生态学功能研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(13):961-964.
[10] 李懿,何佳,赵庭周,等. HPLC 同时测定不同产地滇重楼中的 6 种重楼皂苷 [J]. 中成药, 2012, 34(1): 113-116.
[11] 曾卫民,赵廷周. ‘滇重楼’地上茎叶可利用性分析 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(18):266-270.
[12] 李燕敏,丁立师,王晶晶,等. 基于茎痕判定的不同生长年限重楼药材中皂苷含量分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(12):42-46.

[责任编辑 刘德文]