

七叶一枝花和滇重楼提取物的制备、表征及其体外溶血作用分析

丁立帅^{1,2}, 赵猛^{1,2}, 李燕敏², 陈两绵², 王祝举², 高慧敏^{2*}, 王智民^{2*}

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450008; 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)

[摘要] 目的:比较七叶一枝花和滇重楼提取物体外溶血作用强弱,探讨不同结构类型重楼皂苷的溶血作用特点。方法:采用75%乙醇对七叶一枝花和滇重楼根茎进行提取,采用大孔吸附树脂对各类物质进行富集,采用快速制备色谱技术对目标组分群进行定向制备,基于对照品对照和在线紫外吸收光谱对总提取物、部位和组分进行化学信息表征,采用分光光度法测定各样品的溶血率。结果:根据质量浓度-溶血率曲线计算七叶一枝花和滇重楼总提物的50%溶血浓度分别为34.97、46.52 mg·L⁻¹。在2.5~10 mg·L⁻¹时,七叶一枝花部位中仅有70%乙醇洗脱部位(PPC-D)显示了较强溶血作用,滇重楼部位中70%乙醇和95%乙醇洗脱部位(PPY-D和PPY-E)均显示溶血作用。5.0,10 mg·L⁻¹时PPC-D的溶血率分别为78.00%和95.68%,PPY-D(PPY-E)的溶血率分别为31.86%和63.29%(15.82%和55.25%)。在2.5~5.0 mg·L⁻¹时,七叶一枝花的组分呋甾皂苷和薯蓣皂苷未显示溶血作用,偏诺皂苷组分在质量浓度为2.5,5.0 mg·L⁻¹的溶血率分别为5.89%和90.33%;滇重楼的呋甾皂苷组分同样未显示溶血作用,偏诺皂苷(薯蓣皂苷)组分在质量浓度为2.5,5.0 mg·L⁻¹的溶血率分别为0.51%和57.75%(4.29%和49.39%)。结论:七叶一枝花和滇重楼均具有溶血作用,其中七叶一枝花强于滇重楼;七叶一枝花溶血成分群主要为偏诺皂苷类,滇重楼溶血成分群为偏诺皂苷和薯蓣皂苷;两者呋甾皂苷均无溶血作用;总提取物溶血作用强弱主要由其中所含偏诺皂苷和薯蓣皂苷类成分的绝对含量和相对比例来决定。

[关键词] 七叶一枝花;滇重楼;螺甾皂苷;呋甾皂苷;溶血作用;大孔树脂;有效部位

[中图分类号] R284;R283.6;R282.6;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0007-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210007

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170629.0922.028.html>

[网络出版时间] 2017-06-29 9:22

Preparation and Characterization of *Paris polyphylla* var. *chinensis* and *P. polyphylla* var. *yunnanensis* Extract and Analysis of Their Hemolysis *in Vitro*

DING Li-shuai^{1,2}, ZHAO Meng^{1,2}, LI Yan-min², CHEN Liang-mian²,
WANG Zhu-ju², GAO Hui-min^{2*}, WANG Zhi-min^{2*}

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

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

[Abstract] **Objective:** To compare *in vitro* hemolytic effect of *Paris polyphylla* var. *chinensis* (PPC) and *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (PPY) extract and to explore hemolytic property of various subtypes of steroidal

[收稿日期] 20170418(001)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201507002);国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-FJ-09);国际科技合作专项(2014DFG32700);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(GH2017-03-03)

[第一作者] 丁立帅,在读硕士,从事中药化学与质量评价研究,Tel:010-84014128,E-mail:990698360@qq.com

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

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

saponins from *Paridis Rhizoma*. **Method:** The rhizoma of PPC or PPY was extracted with 75% ethanol. The extract was subjected to chromatography on HPD100 macroporous resin to give fractions of PPC (Y) -A-E. The sub-fractions of PPC (Y) -D-F, PPC (Y) -D-P and PPC (Y) -D-D were obtained by flash chromatography. The chemical profiles of these extract, fractions and sub-fractions were analyzed by HPLC and the main chromatographic peaks were identified on the basis of the comparison of reference substances and on-line ultraviolet spectra. The hemolytic effect of these samples against the rabbit red blood cells were determined by UV-VIS. **Result:** The hemolytic curves of PPC and PPY were obtained by plotting the hemolytic effect against the corresponding concentrations and the concentrations up to 50% hemolytic rate were calculated as 34.97, 46.52 mg·L⁻¹, respectively. Among fractions of PPC-A-E, PPC-D displayed the potent hemolytic effect at concentrations from 2.5-10 mg·L⁻¹. For fractions of PPY-A-E, both PPY-D and PPY-E showed hemolytic effect at the same tested concentrations. The hemolytic rates of PPC-D at the concentration of 5.0, 10 mg·L⁻¹ were 78.00% and 95.68%, whereas PPY-D and PPY-E had the hemolytic rates of 31.86% and 63.29% as well as 15.82% and 55.25%. For the sub-fractions from PPC, furostanol saponins and dioscin saponins had no hemolytic effect, while pennogenin saponins took on the hemolytic rates of 5.89% and 90.33% at the concentration of 2.5, 5.0 mg·L⁻¹. For the sub-fractions from PPY, furostanol saponins display similar result as that of furostanol saponins from PPC, whereas pennogenin and dioscin saponins were observed at concentration of 2.5, 5.0 mg·L⁻¹ with the hemolytic rates of 0.51% and 57.75% as well as 4.29% and 49.39%, respectively. **Conclusion:** It is found that both PPC and PPY have hemolytic effects, and PPC is stronger than PPY. The hemolytic effect of PPC is related to its main constituents (pennogenin saponins) and that of PPY is due to the conjunction of pennogenin and dioscin saponins. The furostanol saponins from both plants have no hemolytic effect. The hemolytic level of PPC or PPY is determined according to the absolute and relative amounts of pennogenin and dioscin saponins in the extract.

[**Key words**] *Paris polyhoylla* var. *chinensis*; *P. polyhoylla* var. *yunnanensis*; spirostanol saponin; furostanol saponin; hemolysis; macroporous resin; effective fraction

重楼来源于七叶一枝花和云南重楼的干燥根茎,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效^[1],其化学成分主要包括甾体皂苷、蜕皮激素及其糖苷、黄酮类以及微量元素等,具有抗肿瘤、止血、镇痛、镇静、抗菌消炎等药理活性^[2-3]。课题组前期对全国范围内七叶一枝花和滇重楼的样品分析表明,两者在化学组成上差异显著,主要体现在甾体皂苷类成分,其中七叶一枝花以偏诺皂苷为主,滇重楼以薯蓣皂苷为主,两者共有成分为 F 环开环的呋甾类物质^[4]。已有研究表明重楼总皂苷具有止血作用^[5],偏诺皂苷较薯蓣皂苷在止血作用上具有明显优势^[6],薯蓣皂苷具有更好的抗肿瘤活性^[7]。为了系统比较七叶一枝花和滇重楼药理作用的差异,拟对其传统功效相关的镇痛抗炎作用,对血液系统相关的活血、凝血模型以及抗肿瘤作用进行综合评价,以支撑与药效相关的重楼质量评价体系的建立。本实验拟进行七叶一枝花和滇重楼不同提取物的制备、化学信息表征及体外溶血作用研究,探讨七叶一枝花和滇重楼提取物的溶血作用差异以及不同亚类

型甾体皂苷的溶血作用特点。

1 材料

Reveleris A 型全息快速制备色谱系统(美国 Grace 公司),LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),T6 型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),BSA224S-CW 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],Scout SE 型便携式天平(美国奥豪斯公司),HG-2518 型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

七叶一枝花根茎采自福建省南平市光泽县,滇重楼根茎采自四川省雅安市荣经县,经中国科学院昆明植物研究所李恒研究员鉴定,分别为七叶一枝花 *Paris polyphylla* var. *chinensis* 和云南重楼 *P. polyhoylla* var. *yunnanensis* (滇重楼),凭证样品存放于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,样品 50℃ 烘干后粉碎,过二号筛;重楼皂苷 I, II, VI, VII 及薯蓣皂苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111590-201103,

111591-200402, 111592-200402, 111593-201303, 111707-200501);重楼皂苷 V (上海盛中医药化工有限公司,批号 201311,纯度 $\geq 98\%$),纤细薯蓣皂苷 (上海源叶生物科技有限公司,批号 CF0227QC14,纯度 $\geq 98\%$);偏诺皂苷元 3-O- β -D-吡喃葡萄糖-(1-3)-[α -L-吡喃鼠李糖-(1-2)]-O- β -D-吡喃葡萄糖苷和重楼皂苷 H 由本课题组从七叶一枝花根茎中分离得到,山柰酚 3-O- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-吡喃半乳糖苷和异鼠李素 3-O- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-吡喃半乳糖苷由本课题组从七叶一枝花地上部分中分离得到,自制的对照品经核磁、质谱等数据鉴定结构,经 HPLC 面积归一化法分析,纯度均 $> 98\%$;反相硅胶 (40 ~ 75 μm ,富士硅化学公司),HPD100 型大孔吸附树脂 (沧州宝恩化工有限公司),氯化钠注射液 (山东齐都药业有限公司,批号 3B16063002),二甲基亚砜 (DMSO, Sigma-Aldrich 公司,批号 12A0219),水为娃哈哈纯净水,乙腈和甲

醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

清洁级雄性健康家兔,体重 2.5 kg,购自北京维通利华实验动物科技有限公司,合格证号 SCXK (京)2015-0001。实验中对动物的处理遵循相关动物使用伦理学原则。

2 方法与结果

2.1 总提物、部位和组分的制备及化学信息表征

2.1.1 总提物、部位和组分的制备 取干燥的七叶一枝花和滇重楼根茎粗粉,分别加 10,8 倍量 75% 乙醇提取 2 次,每次 1.5 h,过滤,合并滤液,取出部分提取液,减压浓缩,干燥,得七叶一枝花 (PPC) 和滇重楼 (PPY) 总提物并计算得率;剩余药液减压回收溶剂至无醇味后,过 HPD100 型大孔树脂柱,依次加 5 BV 的水,30% (或 20%) 乙醇,50% 乙醇,70% 乙醇,95% 乙醇洗脱,分别收集洗脱液,回收溶剂,得各洗脱部位 (PPC-A, B, C, D, E 及 PPY-A, B, C, D, E)。总提物及各部位的干膏得率见表 1。

表 1 七叶一枝花和滇重楼总提物和各部位的得率

Table 1 Yields of extract and fractions of *Paris polyphylla* var. *chinensis* (PPC) and *P. polyhoylla* var. *yunnanensis* (PPY) from chromatography on HPD100 macroporous resin

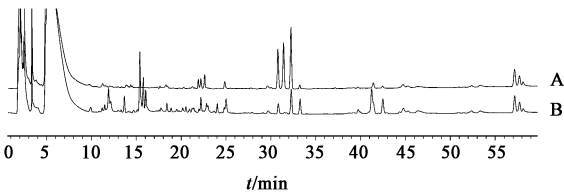
编号	提取物 (七叶一枝花)	提取率/%	编号	提取物 (滇重楼)	提取率/%
PPC	75% 乙醇总提物	26.41	PPY	75% 乙醇总提物	24.26
PPC-A	大孔吸附树脂水部位	5.24	PPY-A	大孔吸附树脂水部位	5.39
PPC-B	大孔吸附树脂 30% 乙醇部位	0.29	PPY-B	大孔吸附树脂 20% 乙醇部位	7.33
PPC-C	大孔吸附树脂 50% 乙醇部位	1.34	PPY-C	大孔吸附树脂 50% 乙醇部位	5.61
PPC-D	大孔吸附树脂 70% 乙醇部位	3.06	PPY-D	大孔吸附树脂 70% 乙醇部位	2.33
PPC-E	大孔吸附树脂 95% 乙醇部位	0.73	PPY-E	大孔吸附树脂 95% 乙醇部位	1.49

分别取一定量的 PPC-D 和 PPY-D,加甲醇溶解,分别得质量浓度约为 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PPC-D 和 PPY-D 供试品溶液 (供制备组分用),按一定色谱条件在快速制备色谱系统上进行分离,流动相水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 60 min, 30% ~ 60% B),检测波长 203 nm,流速 30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 50 mL,得呋甾皂苷、偏诺皂苷和薯蓣皂苷 3 类组分^[4],分别记为 PPC-D-F, PPC-D-P 和 PPC-D-D 及 PPY-D-F, PPY-D-P 和 PPY-D-D。

2.1.2 总提物 (PPC 和 PPY) 和部位 (PPC-A ~ E 和 PPY-A ~ E) 的定性分析 取一定量的各样品粉末,用适量甲醇溶解后进行 HPLC 分析。色谱条件为流动相乙腈 (A)-水 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 60 min, 20% ~ 80% A),流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 203 nm。见图 1,2。七叶一枝花总提物的主要色谱峰集中在 20 ~ 35 min,特别是 30 ~ 35 min 的 4 个主

要色谱峰分别为重楼皂苷 VII,偏诺皂苷元 3-O- β -D-吡喃葡萄糖-(1-3)-[α -L-吡喃鼠李糖-(1-2)]-O- β -D-吡喃葡萄糖苷,重楼皂苷 H 及重楼皂苷 VI;滇重楼总提物的 HPLC 显示在 10 ~ 26 min (呋甾组), 26 ~ 35 min (偏诺组) 和 35 ~ 45 min (薯蓣组) 3 个区域内主要色谱峰的比例基本相当,而薯蓣皂苷类群成分的相对质量分数较高。这和本课题组之前对全国范围内七叶一枝花和滇重楼的分析结果相似,即七叶一枝花以偏诺组皂苷为主,滇重楼以薯蓣皂苷为主,两者共有成分为呋甾皂苷类成分^[4]。进一步经过大孔吸附树脂富集之后的各部位 HPLC 分析结果表明水部位在相同色谱条件下未表现出明显的色谱峰;PPC-B 和 PPY-B 主要含黄酮类物质,特别是以山柰酚 3-O- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-吡喃半乳糖苷和异鼠李素 3-O- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-吡喃半乳糖苷 2 个成分为主,PPC-C 和 PPY-

C 主要以呋甾皂苷为主, PPC-D 和 PPY-D 以偏诺皂苷为主, PPC-E 和 PPY-E 以薯蓣皂苷为主。



A. 七叶一枝花; B. 滇重楼

图 1 七叶一枝花(福建)和滇重楼(四川)总提物的 HPLC

Fig. 1 HPLC of extract of PPC in Fujian province and PPY in Sichuan province

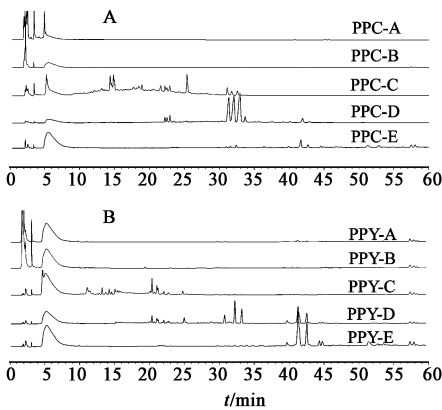


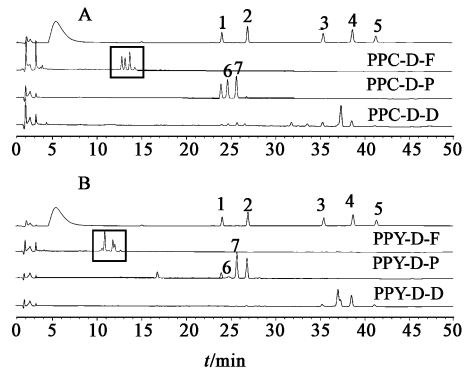
图 2 七叶一枝花(A)和滇重楼(B)部位的 HPLC

Fig. 2 HPLC of fractions of PPC (A) and PPY (B)

2.1.3 组分呋甾皂苷、偏诺皂苷和薯蓣皂苷的定性分析 取一定量的各样品粉末,用适量甲醇溶解后进行 HPLC 分析。色谱条件为流动相为乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~40 min, 30%~60% A; 40~50 min, 60%~30% A), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm。见图 3。七叶一枝花和滇重楼 70% 乙醇洗脱部位经制备的各呋甾组、偏诺组和薯蓣组大类成分相似,但各样品中色谱峰之间的比例关系不同,比如呋甾皂苷类, PPC 以苯甾类呋甾为主, PPY 以原薯蓣皂苷类呋甾为主;偏诺皂苷类, PPC 以重楼皂苷 VII, 偏诺皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖-(1-3)-[α-L-吡喃鼠李糖-(1-2)]-O-β-D-吡喃葡萄糖苷和重楼皂苷 H 为主, PPY 以重楼皂苷 H 和重楼皂苷 VI 为主;薯蓣皂苷类, PPC 以薯蓣皂苷和重楼皂苷 I 为主。这些组分样品中不同类别成分的比例关系及绝对含量不同,可能会导致组分的溶血作用强度不同。

2.2 总提物、部位和组分的体外溶血作用考察

2.2.1 受试药物的制备 称取 PPC 和 PPY 总提物粉末适量,加入一定量的 DMSO 轻轻震荡,待其完全溶解后分别加生理盐水稀释,配成 500 mg·L⁻¹ 储



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; 6. 偏诺皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖-(1-3)-[α-L-吡喃鼠李糖-(1-2)]-O-β-D-吡喃葡萄糖苷; 7. 重楼皂苷 H

图 3 七叶一枝花(A)和滇重楼(B)中呋甾皂苷、偏诺皂苷和薯蓣皂苷组分的 HPLC

Fig. 3 HPLC of furostanol, pennogenin and dioscin saponins from PPC (A) and PPY (B)

备液(含 2% DMSO), 备用。临用前用含 2% DMSO 的生理盐水分别稀释成质量浓度为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg·L⁻¹ 的样品液。称取各部位(PPC-A~E 和 PPY-A~E) 样品粉末适量,按总提物储备液的制备方法操作,配成 10 mg·L⁻¹ 的储备液(含 2% DMSO), 备用。临用前以含 2% DMSO 的生理盐水分别稀释成质量浓度为 5.0, 2.5 mg·L⁻¹ 的样品液。分别称取呋甾皂苷、偏诺皂苷、薯蓣皂苷各组分样品粉末适量,同法配成 10 mg·L⁻¹ 的储备液(含 2% DMSO), 备用。临用前分别以含 2% DMSO 的生理盐水稀释成质量浓度为 5.0, 2.5 mg·L⁻¹ 的样品液。

2.2.2 红细胞混悬液的制备^[8] 从家兔耳缘静脉取新鲜血液 20 mL,置于洁净烧杯中,用一端裹有脱脂棉的玻璃棒轻轻搅拌,以除去纤维蛋白原,制成脱纤血液。加入一定量生理盐水洗涤红细胞,稍后于 1 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃去上清液,重复洗涤、离心操作,直至离心后上清液呈无色。量取红细胞压积,用生理盐水配制成 1% 红细胞混悬液,4 °C 冰箱冷藏备用。

2.2.3 体外溶血率的测定^[8] 取 5 mL 洁净离心管,编号并按顺序加入各样品液、阴性对照液(含 2% DMSO 的生理盐水,阴性组)和阳性对照液(含 2% DMSO 的水,阳性组) 2 mL,样品组及对照组均加入等体积 1% 红细胞混悬液,每个样品浓度平行 3 份。各管盖紧后轻轻混匀,置 37 °C 水浴中温孵 3 h 后,1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液于比色皿中,利用紫外-可见分光光度计进行测定。以阴性组

为空白,对阳性组进行全波长扫描,以阳性组的最大吸光度 A 处(577 nm)为检测波长测定各样品 A,计算溶血率。

$$\text{溶血率} = A_{\text{样品}} / A_{\text{阳性组}} \times 100\%$$

2.3 总提物的溶血作用 分别测定了质量浓度 6.25 ~ 200 mg·L⁻¹ 内 PPC 和 PPY 与红细胞共孵育 3 h 后的溶血作用 (n = 3), 以质量浓度为横坐标, 溶血率为纵坐标, 运用 GraphPad Prism 6.0 软件拟合质量浓度-溶血率曲线, 见图 4。计算溶血率达 50% 时的质量浓度分别为 34.97, 46.52 mg·L⁻¹。结合 PPC 和 PPY 的提取率, 提示七叶一枝花的溶血作用强于滇重楼。根据溶血与否的判定标准——溶血率是否 > 5% [9], 七叶一枝花和滇重楼总提物质量浓度 < 12.5 mg·L⁻¹ 均未引起溶血, 当质量浓度为 25 mg·L⁻¹ 时溶血率分别为 12.16% 和 5.20%, 随着提取物质量浓度的增加, 溶血率不断增加, 直至达到 100%, 表现出明显的浓度依赖关系。

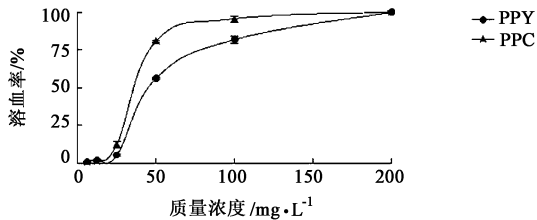


图 4 七叶一枝花 (PPC) 和滇重楼 (PPY) 总提物的质量浓度-溶血率曲线

Fig. 4 Concentration-hemolysis rate curves of PPC and PPY extract

2.4 部位的溶血作用 根据总提物的溶血率测定结果, 参考各部位的提取率, 对部位的溶血试验浓度进行预试验, 结果表明 PPC(Y)-A 和 B 在质量浓度达 150 mg·L⁻¹ 时未显示出溶血作用, PPC-C 在 50 mg·L⁻¹ 时溶血率达 66.59%, 而 PPY-C 在该质量浓度未显示溶血作用。因此, 为了更有效地比较 PPC 和 PPY 各部位的溶血作用强弱, 质量浓度设定为 2.5, 5.0, 10 mg·L⁻¹。各洗脱部位的溶血作用见表 2。

在设定的质量浓度范围内, 七叶一枝花仅 70% 乙醇洗脱部位 (PPC-D) 表现出溶血作用, 滇重楼 70% 和 95% 乙醇洗脱部位 (PPY-D 和 E) 均显示溶血作用, 这说明 PPC 和 PPY 的溶血作用主要与其中所含螺甾皂苷类成分有关 (指偏诺皂苷组和薯蓣皂苷组), 而 F 环开环的呋甾皂苷 (主要集中在 50% 乙醇洗脱部位) 未显示出溶血作用。PPC-E 和 PPY-E 溶血作用的差异可能主要与样品中薯蓣皂苷组成分的绝对含量有关, PPC-E 中薯蓣皂苷组的含量低, PPY-E 中薯蓣皂苷组的含量相对较高。PPC-D 和

表 2 七叶一枝花和滇重楼大孔吸附树脂各洗脱部位的溶血率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Hemolysis rates of fractions of PPC-A-E and PPY-A-E ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

来源	部位	2.5 mg·L ⁻¹	5.0 mg·L ⁻¹	10 mg·L ⁻¹
七叶一枝花	PPC-A	-	-	-
	PPC-B	1.38 ± 0.38	0.72 ± 0.55	0.45 ± 0.40
	PPC-C	0.57 ± 0.10	0.16 ± 0.14	0.12 ± 0.14
	PPC-D	2.41 ± 0.82	78.00 ± 11.03	95.68 ± 0.67
	PPC-E	0.84 ± 0.41	2.22 ± 0.85	0.36 ± 0.48
滇重楼	PPY-A	-	-	-
	PPY-B	0.39 ± 0.36	0	0.03 ± 0.05
	PPY-C	1.17 ± 0.86	0.31 ± 0.38	0.27 ± 0.09
	PPY-D	2.98 ± 0.18	31.86 ± 2.53	63.29 ± 5.54
	PPY-E	4.60 ± 0.55	15.82 ± 0.58	55.25 ± 1.34

注:“-”表示该质量浓度下未测定, 因为 PPC-A 和 PPY-A 在质量浓度 150 mg·L⁻¹ 尚未引起溶血。

PPY-D 的溶血作用呈现明显的浓度依赖关系。提示七叶一枝花和滇重楼溶血作用强度主要由 70% 和 95% 乙醇洗脱部位所含螺甾皂苷的含量决定, 其中又以偏诺皂苷组的作用较强。

2.5 组分的溶血作用 为了进一步明确不同亚类型皂苷 (呋甾、偏诺和薯蓣) 中各主要色谱峰对溶血作用的贡献, 对定向制备的目标组分 PPC(Y)-D-F, PPC(Y)-D-P 和 PPC(Y)-D-D 样品进行溶血率测定, 见表 3。结果发现从七叶一枝花中精制得到的偏诺皂苷组分的溶血作用极强。与之相比, 滇重楼中得到的偏诺皂苷组分 PPY-D-P 溶血作用相对较弱。七叶一枝花和滇重楼中的偏诺皂苷组分溶血作用差异较大, 可能与两者中主要色谱峰的比例不同有关, 也与各主要色谱峰在不同样品中的绝对含量有关。

3 讨论

重楼化学成分主要有甾体皂苷和黄酮类物质, 其中甾体皂苷根据结构特点又分呋甾皂苷、偏诺皂苷和薯蓣皂苷 [10]。本实验为了明确化学成分和重楼溶血作用的相关性, 采用大孔吸附树脂对各类物质分别进行了富集和制备, 采用快速制备色谱技术对目标组分进行了定向制备, 基于对照品对照和在线紫外吸收光谱, 对总提取物、部位和组分进行了化学信息表征, 为阐明七叶一枝花和滇重楼溶血作用的差异提供了物质基础信息。有文献报道重楼总皂苷和偏诺皂苷质量浓度达 50 mg·L⁻¹, 薯蓣皂苷质

表 3 七叶一枝花和滇重楼各组分分类群不同质量浓度时的溶血率
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Hemolysis rates of sub-fractions of PPC and PPY with different concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

来源	组分	2.5 mg·L ⁻¹	5.0 mg·L ⁻¹
七叶一枝花	PPC-D-F	0	0.45 ± 0.43
	PPC-D-P	5.89 ± 0.61	90.33 ± 4.65
	PPC-D-D	0.61 ± 0.65	0.64 ± 0.95
滇重楼	PPY-D-F	0.13 ± 0.22	0
	PPY-D-P	0.51 ± 0.81	57.75 ± 2.06
	PPY-D-D	4.29 ± 0.15	49.39 ± 0.34

量浓度达 75 mg·L⁻¹时才发生溶血^[11-12];而本研究结果表明七叶一枝花和滇重楼总提取物质量浓度达 25 mg·L⁻¹时即发生溶血,偏诺皂苷组和薯蓣皂苷组发生溶血的质量浓度更低。分析产生这种差异较大的原因可能为受试药的来源和其化学组成不同、与受试药在生理盐水中的溶解度有关。前者对溶血试验结果的影响容易理解,重楼根茎的来源(品种或产地)不同,总皂苷的提取率及其化学组成不同,进而造成溶血作用强度存在较大差异。因此,明确受试物的化学信息,对于保证实验结果的可重复性至关重要;后者对溶血试验结果的影响容易被忽视,体外溶血作用试验是依赖渗透压的改变造成红细胞溶血,要求在生理盐水体系中进行。在预试验中,考察了不同质量浓度受试药在生理盐水中的溶解度,水,30%乙醇和50%乙醇洗脱部位在质量浓度为150 mg·L⁻¹时溶解良好,而70%乙醇和95%乙醇洗脱部位只能在加入2% DMSO 助溶情况下,才能达到最大溶解质量浓度100 mg·L⁻¹。因此,受试药溶液制备时澄清、溶解完全才能保证试验浓度的准确性。

此外,本研究对溶血试验的测定条件进行了优化。在2015年版《中国药典》溶血作用体外试管法(肉眼观察法)的基础上,针对水浴保温时间和供试品溶液的稳定性进行了考察。分别考察了水浴保温30,60,90,120,150,180,210,240 min对PPC和PPY提取物溶血率的影响,结果表明水浴保温180 min红细胞溶解趋于平衡,与2015年版《中国药典》方法规定时间相符。采用分光光度法测定溶血率,供试品溶液的稳定性对测定结果也有重要影响。PPC和PPY样品溶液制备后分别在0,30,60,90,120,150,180,210,240,420 min测定A,结果显示制备后的样品溶液在7 h内稳定,其A的RSD均为0.7%。

本研究结果表明七叶一枝花总提物的溶血作用强于滇重楼,通过部位追踪,螺甾皂苷(偏诺皂苷和薯蓣皂苷)是重楼产生溶血作用的主要成分分类群,呋甾皂苷(F环开环)没有溶血作用,这与早期关于C-26位结合葡萄糖的呋喃甾醇类皂苷和双皂苷溶血作用较弱的结论相吻合^[13],充分说明皂苷元的种类决定皂苷是否具有溶血作用。从现有研究结果看,F环是否闭合是决定重楼提取物是否具有溶血作用的关键因素,但溶血作用的强弱由偏诺皂苷和薯蓣皂苷的结构特点决定,其溶血的作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 武珊珊,高文远,段宏泉,等. 重楼化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药,2004,35(3):344-347.

[3] 赵保胜,朱寅获,马勇,等. 中药重楼研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):267-270.

[4] 李燕敏. 重楼药材的品质评价[D]. 天津:天津中医药大学,2016.

[5] 付亚莉,赵振虎,善亚君,等. 重楼甾体总皂苷对血小板聚集的直接诱导作用及初步机制研究[J]. 军事医学科学院院刊,2007,31(5):416-419.

[6] 付亚莉. 中药甾体皂苷诱导血小板聚集的化学基础和分子机制研究[D]. 北京:军事医学科学院,2007.

[7] 颜璐璐,张艳军,高文远,等. 滇重楼皂苷对10种肿瘤细胞株的细胞毒谱及构效关系研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(16):2057-2060.

[8] 崔亚男,王东凯,邱志斌. 两种溶血性试验方法在复方参芍注射剂研究中的应用[J]. 西部药学,2006,3(4):227-228.

[9] 《中药、天然药物刺激性和溶血性研究的技术指导原则》课题研究组. 中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2005,[Z]GPT4-1.

[10] 汤海峰,赵越平,蒋永培. 重楼属植物的研究概况[J]. 中草药,1998,29(12):839-842.

[11] 杨黎江,沈放,王德斌,等. 抗重楼皂苷类化合物溶血作用的研究[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(4):629-632,651.

[12] 沈放,杨黎江,彭永芳,等. 重楼皂苷类化合物溶血作用研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(9):2280-2281.

[13] 庄司顺三,黄宝山,宋纯清. 皂苷的化学与生物活性[J]. 国外医学·药学分册,1982,3(4):204-211.

[责任编辑 刘德文]