

多基源重楼的质量等同性研究

杨德全¹, 杨勤¹, 周浓^{2,3*}

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; 2. 大理学院药学院, 云南 大理 671000;
3. 重庆三峡学院生命科学与工程学院, 重庆 404000)

[摘要] **目的:**对不同种属、不同产地重楼属植物中甾体皂苷(重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII)含量进行对比研究,为重楼属药材合理利用提供理论依据。**方法:**采用 HPLC-UV 法测定重楼属 4 种药材中重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII 的含量。Agela Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 相为乙腈, B 相为水,梯度洗脱(0 ~ 5 min, 34% ~ 44% A; 5 ~ 15 min, 44% ~ 49%; 15 ~ 18 min, 49% ~ 50.5%; 18 ~ 22 min, 50.5% ~ 51.8%; 22 ~ 25 min, 51.8% ~ 52.5%; 25 ~ 30 min, 52.5% ~ 53.5%),检测波长 203 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 20 μL。**结果:**不同种属、不同产地的重楼属植物中甾体皂苷含量和组成有显著性差异。**结论:**4 种重楼属植物具有化学等同性,花叶重楼、毛重楼可替代重楼使用。

[关键词] 重楼; 甾体皂苷; 高效液相色谱; 品质评价

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0091-04

[doi] 10.11653/syfy2014030091

Preliminary Study on Quality Equivalence of Rhizoma Paris from Various Species

YANG De-quan¹, YANG Qin¹, ZHOU Nong^{2,3*}

(1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China;

2. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China;

3. College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China)

[Abstract] **Objective:** In order to provide theoretical basis for proper utilization of the plants of paris genus in chinese Traditional medicine, the article compared content of paris- I, paris- II, paris- VI and paris- VII from various plants of different species and habits of paris genus. **Method:** HPLC-UV method was established. **Result:** The content and compounds of steroid saponin in plants of paris genus existed significant difference from various species. **Conclusion:** The four kinds of plants of paris genus owed the same chemistry quality. And *P. polyphylla* var. *pubescens* and *P. violacea* can be used as Rhizoma Paris in Chinese medication.

[Key words] Rhizoma Paris; steroid saponin; HPLC; quality evaluation

重楼是我国常用中药之一,《中国药典》(2010 年版)规定正规重楼为百合科植物的云南重楼 *Paris*

polyphylla Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hara 或七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎^[1],其中甾体皂苷类化合物具有较强的抗肿瘤、止血、镇痛、镇静、免疫调节等生物活性^[2-3],为重楼的活性成分和衡量药材质量的重要指标之一。作为重要的清热解毒药,目前国家药品标准中有 65 个品种使用了重楼,致使重楼药材的使用量逐年增加^[4-7]。目前其他种类的重楼属植物亦在民间使用^[8],因而研究不同药用重楼品种甾体皂苷成分的差异,对重楼资源的进一步开发

[收稿日期] 20130402(023)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260622);重庆市教委科学技术研究项目(KJ131109)

[第一作者] 杨德全,教授,从事中医药教学与科学研究, Tel: 13594875718, E-mail: ydq7086@126.com

[第一作者] *周浓,副教授,硕士生导师,从事药用植物栽培与质量控制, Tel: 023-58102522, E-mail: erhaizn@126.com

利用具有重要参考意义。

目前已有重楼属植物滇重楼、七叶一枝花中多种甾体皂苷的含量报道^[9-11],但 HPLC 对重楼属 4 种药材中甾体皂苷含量对比研究尚未见报道。为更科学、合理和有效地利用重楼属药材,本试验拟采用 HPLC 对不同部位、不同产地重楼属 4 种药用植物中重楼皂苷 I, II, VI, VII 的含量进行测定和比较,以此为依据研究重楼属药用植物化学成分的相似与不同之处,以期找到合适的重楼替代基源植物。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),SB25-120 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),DKS-28 型恒温水浴锅(嘉兴市中新医疗仪器有限公司),RE-2000A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),SHZ-DM 型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),AL104 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),FZ102 型

微型植物试样粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司);KL-UP-UV-20 型超纯水机(成都康宁实验专用纯水设备)。

重楼皂苷 I, II, VI 和 VII 对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 111590-200402, 111591-200402, 11592-200402, 111593-200402, 供含量测定用);云南重楼(滇重楼)对照药材(中国药品生物制品检定所,批号分别为 1157-200001);重楼药材(表 1)购于全国的药材市场或自采,经大理学院药学院生药教研室周浓副教授鉴定为云南重楼 *P. polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.、七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara、毛重楼 *P. polyphylla* Smith var. *pubescens* Hand. -Mazz.、花叶重楼 *P. violacea* Lévl. 的干燥根茎;水为三重蒸馏水;其他试剂均为分析纯。留样凭证存放于大理学院药学院生药学教研室。

表 1 不同产地不同品种重楼属植物中甾体皂苷的含量(n=3)

No.	样品名称	来源	质量分数/mg·g ⁻¹			
			重楼皂苷 VII	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 II	重楼皂苷 I
1	七叶一枝花	重庆市开县(自采)	0.281 6	0.088 0	0.301 4	3.523 8
2	滇重楼	云南省丽江地区(自采)	0.430 7	0.045 3	0.091 4	-
3	滇重楼	云南大理三月街药材市场(购买)	0.382 9	-	1.135 9	10.226 5
4	滇重楼	云南大理金贝药材市场(购买)	0.716 6	0.635 8	0.817 0	0.502 5
5	滇重楼	云南省云龙县(自采)	0.226 3	0.022 2	0.035 6	0.035 2
6	毛重楼	云南省丽江地区(自采)	0.413 2	0.049 3	-	0.220 0
7	花叶重楼	云南省丽江地区(自采)	0.245 0	0.137 4	0.286 4	0.207 7
8	滇重楼	中国药品生物制品检验所(对照药材)	0.231 7	0.110 1	0.258 9	0.238 5

注:“-”表示未检出。

2 方法与结果

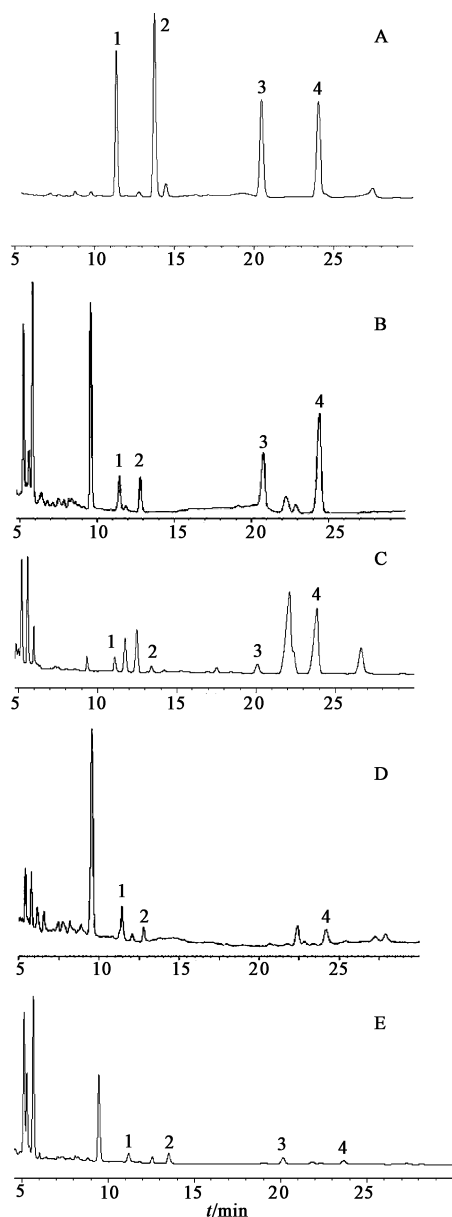
2.1 色谱条件 Agela Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 A 相为乙腈, B 相为水, 梯度洗脱(0~5 min, 34%~44% A; 5~15 min, 44%~49%; 15~18 min, 49%~50.5%; 18~22 min, 50.5%~51.8%; 22~25 min, 51.8%~52.5%; 25~30 min, 52.5%~53.5%), 检测波长 203 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 ℃, 进样量 20 μL。对照品和重楼样品分离的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 取重楼皂苷 VII 对照品、重楼皂苷 VI 对照品、重楼皂苷 II 对照品及重楼皂苷 I 对照品适量, 分别置于 5 mL 量瓶中, 精密称定, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即为各对照品贮备液: 重楼皂苷 VII 2.16 g·L⁻¹、重楼皂苷 VI 2.03 g·L⁻¹、重

楼皂苷 II 2.00 g·L⁻¹、重楼皂苷 I 2.15 g·L⁻¹。分别精密量取上述对照品储备液各 0.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得混合对照品溶液 I。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取重楼药材粉末(过三号筛)1.0 g, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 75% 乙醇 50 mL, 回流提取 2 次(2 h, 2 h), 趁热过滤, 合并提取液, 回收溶剂至干, 残渣以甲醇转移到 5 mL 量瓶中, 即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 I 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL 和重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 对照品贮备液各 2, 5, 10, 15, 20 μL, 注入液相色谱仪并测定各成分的色谱峰面积, 得对照品质量浓度 C(mg·L⁻¹) 与峰面积



A. 对照品; B. 滇重楼; C. 七叶一枝花; D. 毛重楼; E. 花叶重楼;

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 重楼对照品及样品的 HPLC

A 的线性方程。结果表明,重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II 和重楼皂苷 I 进样量分别在 $0.1080 \sim 43.20$, $0.1015 \sim 40.60$, $0.1000 \sim 40.00$, $0.1075 \sim 43.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积成良好的线性关系,回归方程分别为 $A = 370.19C + 8.9178$ ($r = 0.9999$), $A = 585.23C - 8.1425$ ($r = 0.9999$), $A = 430.83C + 6.5939$ ($r = 0.9996$), $A = 455.63C - 39.419$ ($r = 0.9996$)。

2.5 检测限和定量限 连续进 3 针空白溶剂,并记录色谱图,计算信噪比,取平均值。根据信噪比计算出检测限和定量限的图谱峰高。以信噪比(S/N)为

3:1 对检测限进行测定,进样 $10 \mu\text{L}$,按上述色谱条件测定,记录色谱图,重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 峰信号约为噪声的 3 倍,即最低检测限分别为 0.0242 , 0.0177 , 0.0321 , $0.0373 \mu\text{g}$ 。以信噪比为 10:1 对定量限进行测定,进样 $10 \mu\text{L}$,按上述色谱条件测定,记录色谱图,重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 峰信号约为噪声的 10 倍,即最低定量限分别为 0.0806 , 0.0590 , 0.1070 , $0.1243 \mu\text{g}$ 。

2.6 精密度试验 取混合对照品溶液 I 连续进样 6 次,测定峰面积,计算重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 的 RSD 分别为 0.74% , 0.82% , 1.17% , 2.29% ,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一采自重庆开县的重楼样品粉末(过三号筛)6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,测得重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 的 RSD 分别为 2.49% , 1.82% , 1.98% , 1.55% ,表明本方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一采自重庆开县的重楼供试品溶液,室温密闭放置,分别在制备后 $0, 4, 8, 12, 16, 20 \text{ h}$ 进样测定重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 峰面积, RSD 分别为 0.68% , 2.32% , 2.18% , 0.91% ,表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的采自重庆开县的重楼药材粉末约 0.50 g ,共 6 份,分别精密加入一定量的重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 对照品溶液,混合均匀,挥干溶剂,按 2.3 项下方法制备供试溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果见表 2。

2.10 样品含量测定 分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,平行 3 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积代入回归方程中分别计算重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量,结果见表 1。

3 讨论

分别采用不同溶剂(甲醇、95%乙醇、75%乙醇)、不同提取方法(超声、回流、索氏)、不同提取时间($1, 1.5, 2, 2.5 \text{ h}$)、不同提取次数($1, 2, 3$ 次)分别对重楼中甾体皂苷的含量进行测定^[8-13]。结果表明,以 75%乙醇为提取溶剂、加热回流提取 2 h 、提取 2 次所测得的甾体皂苷含量比较高和准确可靠。

由表 1 可以看出,重楼属药材(根茎)中均含有重楼皂苷 VII,而大理三月街药材市场购买的滇重楼

表2 4种成分加样回收率试验(n=6)

成分	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	0.140 9	0.151 2	0.289 4	98.21	97.58	1.08
	0.140 9	0.151 2	0.288 7	97.78		
	0.140 9	0.151 2	0.286 3	96.18		
	0.140 8	0.151 2	0.286 6	96.45		
	0.140 9	0.151 2	0.288 9	97.92		
	0.140 9	0.151 2	0.290 5	98.92		
重楼皂苷Ⅵ	0.044 0	0.040 6	0.083 0	96.04	97.25	0.97
	0.044 0	0.040 6	0.083 5	97.32		
	0.044 0	0.040 6	0.083 0	96.15		
	0.044 0	0.040 6	0.083 7	97.89		
	0.044 0	0.040 6	0.083 9	98.22		
	0.044 0	0.040 6	0.083 7	97.87		
重楼皂苷Ⅱ	0.150 8	0.160 0	0.307 1	97.68	96.54	1.18
	0.150 8	0.160 0	0.307 8	98.12		
	0.150 8	0.160 0	0.304 8	96.24		
	0.150 8	0.160 0	0.304 1	95.81		
	0.150 8	0.160 0	0.303 0	95.13		
	0.150 8	0.160 0	0.304 8	96.25		
重楼皂苷Ⅰ	1.763 0	1.720 0	3.417 2	96.18	97.91	1.40
	1.762 6	1.720 0	3.468 7	99.19		
	1.762 6	1.720 0	3.453 1	98.28		
	1.762 3	1.720 0	3.451 5	98.21		
	1.763 0	1.720 0	3.419 2	96.29		
	1.763 0	1.720 0	3.470 8	99.29		

未检测到重楼皂苷Ⅵ、毛重楼和花叶重楼未检测到重楼皂苷Ⅱ、毛重楼和丽江地区自采的滇重楼未检测到重楼皂苷Ⅰ,这说明不同种的重楼属药材在甾体皂苷种类上存在较大差异。重楼属药材(根茎)的甾体皂苷含量上也存在显著性差异。大理金贝药材市场购买的滇重楼重楼皂苷Ⅶ和重楼皂苷Ⅵ含量最高、大理三月街药材市场购买的滇重楼重楼皂苷Ⅱ和重楼皂苷Ⅰ含量最高;4种甾体皂苷总含量滇重楼最高(同为滇重楼,不同的产地其甾体皂苷含量、种类有较大的差异,其中云南大理三月街药材市场购买滇重楼中总皂苷含量最高,云南云龙县自采滇重楼总皂苷含量最低,相差近40倍)、七叶一枝花次之、花叶重楼和毛重楼最低,进一步验证中国药典收载云南重楼和七叶一支花的科学性。因此,甾

体皂苷的含量随产地及品种不同而有较大的差异。

同时,花叶重楼和毛重楼4种甾体皂苷总含量甚至超过部分滇重楼药材,说明了民间长年作为重楼药用的合理性,进一步提示其有可能作为重楼的替代药材资源。但重楼属药材中各类化学成分量及比例均有差别,部分地区的混用代用是否合理,有待进一步结合药理实验证实。

[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, 2010:243.

[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.

[3] 周浓, 张德全, 孙琴, 等. 真菌诱导子对滇重楼中次生代谢产物甾体皂苷的影响[J]. 药学学报, 2012, 47(9):1237.

[4] 张丽霞, 祁建军, 李海涛, 等. 西双版纳野生重楼资源的分布概况[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(13):1684.

[5] 周浓, 夏从龙, 姜北, 等. 滇重楼丛枝菌根的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14):1768.

[6] 赵保胜, 朱寅荻, 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.

[7] 周浓, 段宝忠, 夏从龙, 等. 滇重楼不同生长发育期化学成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):70.

[8] 付绍智, 李楠, 刘振, 等. HPLC法测定不同产地重楼属植物中7种甾体皂苷成分[J]. 中草药, 2012, 43(12):2435.

[9] 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.

[10] 梁玉勇, 刘振, 高文远. HPLC测定贵州不同产地的七叶一枝花中9种甾体皂苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15):2309.

[11] 尹鸿翔, 薛丹, 吴梅, 等. 川滇地区重楼商品药材质量评价[J]. 中药材, 2007, 30(7):771.

[12] 徐丽丽, 赵亮, 夏晖, 等. RP-HPLC法测定重楼中四种甾体皂苷的含量[J]. 药学实践杂志, 2009, 27(3):201.

[13] 黄贤校, 高文远, 谷克仁, 等. 毛重楼的化学成分研究[J]. 中草药, 2009, 40(9):1366.

[责任编辑 邹晓翠]