

重楼属 9 种植物根茎中甾体皂苷有效成分的差异

赵志莲^{1,2}, 刘立敏¹, 李海峰^{1*}

(1. 大理大学 药学与化学学院, 云南 大理 671000;
2. 云南省大理农林职业技术学院, 云南 大理 671003)

[摘要] **目的:** 探讨重楼属 9 种植物根茎中甾体皂苷有效成分和主成分的差异及相关性。**方法:** 采用液质联用(LC-MS)技术定性分析重楼属 9 种植物根茎中甾体皂苷有效成分和主成分的差异及相关性。**结果:** 滇重楼, 金线重楼, 毛重楼, 滇重楼(阔瓣), 南重楼, 五指莲, 黑籽重楼, 多叶重楼 8 种重楼属植物根茎中均能检测到 2015 年版《中国药典》(一部) 药材质量控制指标重楼皂苷 I, II, VI, VII, 同时还检测到重楼皂苷 V; 重楼皂苷 H, 薯蓣皂苷, 纤细薯蓣皂苷 3 种主要甾体皂苷有效成分差异较大。根据重楼属 9 种根植物根茎正离子模式下液质数据的主成分分析(PCA)模型可将 S1(滇重楼), S2(金线重楼), S3(毛重楼), S4[滇重楼(阔瓣)], S5(南重楼), S6(五指莲), S9(多叶重楼) 7 种重楼属植物聚为一类, S7(黑籽重楼), S8(长柱重楼)各自聚为一类, 距离滇重楼最远。**结论:** 滇重楼, 金线重楼, 毛重楼, 滇重楼(阔瓣), 南重楼, 五指莲, 多叶重楼根茎中甾体皂苷有效成分和主成分主要差异较小, 但能否替代滇重楼入药还值得进一步深入研究。

[关键词] 重楼属; 根茎; 液质联用技术; 甾体皂苷

[中图分类号] R22; R931; R28 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0176-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200416

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20191107.1019.001.html>

[网络出版时间] 2019-11-07 16:20

Differences in Active Ingredients of Steroid Saponins in Rhizomes of 9 Kinds of *Paris*

ZHAO Zhi-lian^{1,2}, LIU Li-min¹, LI Hai-feng^{1*}

(1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China;
2. Dali Vocational and Technical College of Agriculture and Forestry, Dali 671003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the differences and correlations of active ingredients and principal ingredients of steroid saponins in rhizomes of 9 kinds of *Paris*. **Method:** The differences and correlations of active ingredients and principal ingredients of steroid saponins in rhizomes of 9 kinds of *Paris*. were qualitatively analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Result:** Polyphyllin I, polyphyllin II, polyphyllin VI, and polyphyllin VII, the quality control indexes of medicinal materials in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition) were detected in rhizomes of 8 species, namely *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, *P. delavayi*, *P. mairei*, *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (kuoban), *P. vietnamensis*, *P. axialis*, *P. thibetica*, and *P. polyphylla* var. *polyphylla*, polyphyllin V was also detected in the study. There were significant differences in active ingredients of polyphyllin III (Dioscin), polyphyllin H and gracillin. Meanwhile, *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (S1), *P. delavayi* (S2), *P. mairei* (S3), *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (kuoban) (S4), *P. vietnamensis* (S5), *P. axialis* (S6) and *P. polyphylla* var. *polyphylla* (S9) could be classified into one category according to the principal component analysis (PCA) model of the LC-MS data under the positive ion mode of *Paris*. *P. thibetica*

[收稿日期] 20191024(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360616);大理农林职业技术学院 2016 年资助项目

[第一作者] 赵志莲, 硕士, 副教授, 从事药用植物生物技术及品质评价工作, E-mail: 2630881673@qq.com

[通信作者] * 李海峰, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事药用植物次生代谢、品质评价及质量控制, Tel: 0872-2251475, E-mail: lihfh888@sina.com

(S7) and *P. forrestii* (S8) were clustered as two separate categories, with a longest range from *P. polyphylla* var. *yunnanensis*. **Conclusion:** There are little differences in active ingredients and the principal ingredients of steroid saponins in rhizome of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, *P. delavayi*, *P. mairei*, *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, *P. vietnamensis*, *P. axialis* and *P. polyphylla* var. *polyphylla*. However, further research is required to determine whether these could substitute *P. polyphylla* var. *yunnanensis*. as an alternative medicine.

[Key words] *Paris*; rhizome; liquid chromatography-mass spectrometry; steroid saponins

重楼属 (*Paris*) 为百合科 (Linnaeus) 草本植物, 全世界有 24 种, 中国有 19 种, 主要分布于云南、四川、广西等地, 其中滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* 和七叶一枝花 *P. polyphylla* var. *chinensis* 被历版《中国药典》所收载, 以其干燥根茎入药^[1], 具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效, 可用于咽喉肿痛、跌打伤痛、毒蛇咬伤等病症的治疗^[2-3], 还是云南白药、季德蛇药、宫血宁胶囊等中成药的主要原料, 甾体皂苷类物质是其主要有效成分^[4-6], 其中重楼皂苷 I, II, VI, VII 总含量是 2015 年版《中国药典》(一部) 药材质量控制指标^[7]。

野生资源是重楼药材的主要原料来源, 经过长期大量的采挖致使滇重楼和七叶一枝花的资源日趋枯竭, 随着其药用范围的不断扩大, 野生种质资源遭到严重破坏, 野生资源的利用已经演变为严重的资源危机^[8]。因此, 在滇重楼和七叶一枝花主要原料来源地重楼属药用植物金线重楼 (*P. delavayi*), 毛重楼 (*P. mairei*), 南重楼 (*P. vietnamensis*), 黑籽重楼 (*P. thibetica*) 等品种作为其替代品销售及入药现

象极其普遍, 基源植物的改变势必影响到与重楼药材及其相关中成药的质量及品质。刘立敏等^[9]研究发现, 重楼属 9 种植物根茎中重楼皂苷 I, II, VI, VII 含量及其 UPLC 指纹图谱存在较大差异。因此, 本研究拟采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间高分辨质谱联用技术 (UPLC-ESI-Q-TOF-MS)^[10-12], 在 TOF-MS 电喷雾离子源下采用正离子模式, 对重楼属 9 种植物根茎中主要甾体皂苷有效成分进行快速有效分离, 收集正离子模式下的数据, 以对照品及文献数据为参考, 对重楼属 9 种植物根茎中甾体皂苷有效成分进行定性分析, 对 m/z 在 50 ~ 2 000 Da 的化学成分进行主成分 (PCA) 及主要差异峰分析, 为重楼属 9 种植物替代滇重楼和七叶一枝花入药以及其野生资源利用提供依据。

1 材料

2014 年 9 月种子成熟期, 在云南省重楼属植物分布区采集样品, 采集的样品经大理大学李海峰教授鉴定均为百合科重楼属 (*Paris*) 植株, 样品信息见表 1, 样品经自然干燥, 恒温箱 50 °C 干燥至恒重。

表 1 重楼属药用植物样品信息表

Table 1 Information of *Paris*

编号	拉丁学名	采集地	中文名称	经度和纬度	海拔/m
S1	<i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	南涧	滇重楼	N25°59.488'E100°05.475	1 634.76
S2	<i>P. delavayi</i>	保山	金线重楼	N25°56.432'E99°08.257	1 718.87
S3	<i>P. mairei</i>	凤仪	毛重楼	N25°59.488'E100°05.475	2 139.00
S4	<i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	凤仪	滇重楼(阔瓣)	N25°28.588'E100°30.364	2 029.00
S5	<i>P. vietnamensis</i>	南涧	南重楼	N25°59.488'E100°05.475	1 674.34
S6	<i>P. axialis</i>	龙陵	五指莲	N24°35.135'E98°49.175	1 848.78
S7	<i>P. thibetica</i>	龙陵	黑籽重楼	N24°34.297'E98°49.326	1 810.13
S8	<i>P. forrestii</i>	龙陵	长柱重楼	N25°59.488'E100°05.475	1 794.65
S9	<i>P. polyphylla</i> var. <i>polyphylla</i>	剑川	多叶重楼	N25°59.488'E100°05.475	2 247.00

重楼皂苷 I (批号为 111590-200402, 纯度 ≥ 98%), 重楼皂苷 II (批号为 111590-200402, 纯度 ≥ 98%), 重楼皂苷 VI (批号为 111591-200301, 纯度 ≥ 98%), 重楼皂苷 VII (批号为 111590-200402, 纯度 ≥

98%), 以上对照品均购自中国食品药品检定研究院。HPLC 分析用乙腈是色谱纯, 水是超纯水, 乙醇等均为分析纯。

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪 (美国戴安,

WPS-3000SL 型自动进样器, DGP-3600A 型双三元梯度泵, PDA-3000 型二极管阵列紫外检测器, TCC-3000 型柱温箱, Chromeleon 色谱工作站, Daltonics 公司 MS 质谱系统(德国 Bruker 公司), AE240 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), SK5200H 型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司), Millipore 纯水系统等。

2 方法与结果

2.1 重楼属 9 种植物根茎中主要有效成分的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 测定

2.1.1 色谱条件^[13-14] Dionex-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3 μm), 流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 12 min, 45% ~ 60% B; 12 ~ 25 min, 60% ~ 30% B; 25 ~ 28 min, 30% ~ 100% B; 28 ~ 30 min, 100% B; 30 ~ 35 min, 100% ~ 45% B; 35 ~ 40 min, 45% B), 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。

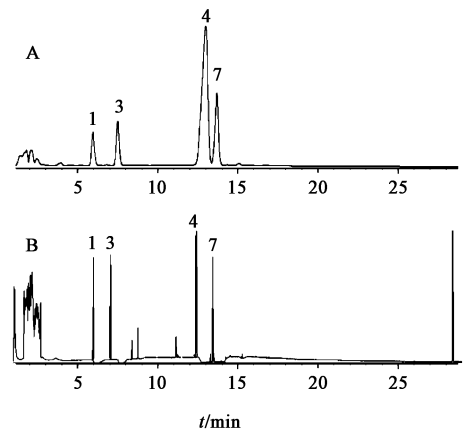
2.1.2 质谱条件^[13-14] 参照文献[13-14]笔者建立的方法, Bruker Q-TOF-MS 质谱系统, 采用电喷雾(ESI)离子源, 扫描模式正离子, 毛细管电压为 4 000 V, 终板抵消电压 500 V, 雾化器压力 253.8 kPa, 干燥气体为氮气, 气体流速为 8 L·min⁻¹, 干燥温度为 350 °C, 离子源温度为 220 °C, 扫描范围是 *m/z* 50 ~ 2 000 Da, 碰撞气体为氩气, 碰撞能量 8 eV, 六级杆射频频为 70 Vpp, 四级杆离子能量 8 eV, 用 Na[NaCOOH] 作校正液。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取重楼皂苷 I, 重楼皂苷 II, 重楼皂苷 VI, 重楼皂苷 VII 对照品, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 稀释, 定容, 混合均匀, 配制成重楼皂苷 I 0.127 5 g·L⁻¹, 重楼皂苷 II 0.080 1(g·L⁻¹), 重楼皂苷 VI 0.132 5, 重楼皂苷 VII 0.102 5 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备 分别取重楼属 9 种植物根茎粉碎, 过 100 目筛, 再精密称取重楼属 9 种植物根茎粉末 0.500 0 g 置于 50 mL 锥形瓶中, 用 75% 乙醇 4 mL, 40 kHz 40 °C 超声 20 min, 过滤。滤渣再用 75% 乙醇 2 mL 分别提取 2 次, 合并提取液, 置于 10 mL 量瓶, 用甲醇溶解, 稀释, 定容, 混合均匀, 为供试品溶液, 使用时供试品溶液用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤。

2.1.5 方法专属性 采用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 的方法测定重楼皂苷 I, 重楼皂苷 II, 重楼皂苷 VI, 重楼皂苷 VII 对照品, 分别在正离子、负离子两种 ESI 模式下进行质谱分析。结果显示, 在正离子模式时响

应较好, 负离子模式响应较小, 所以均收集正离子模式下的实验数据分析, 分别得到重楼皂苷 I, 重楼皂苷 II, 重楼皂苷 VI, 重楼皂苷 VII 色谱图(A)和总离子流图(B), 结果见图 1。



1. 重楼皂苷 VII; 3. 重楼皂苷 VI; 4. 重楼皂苷 II; 7. 重楼皂苷 I

图 1 重楼皂苷对照品 UPLC(A) 和总离子流(B)

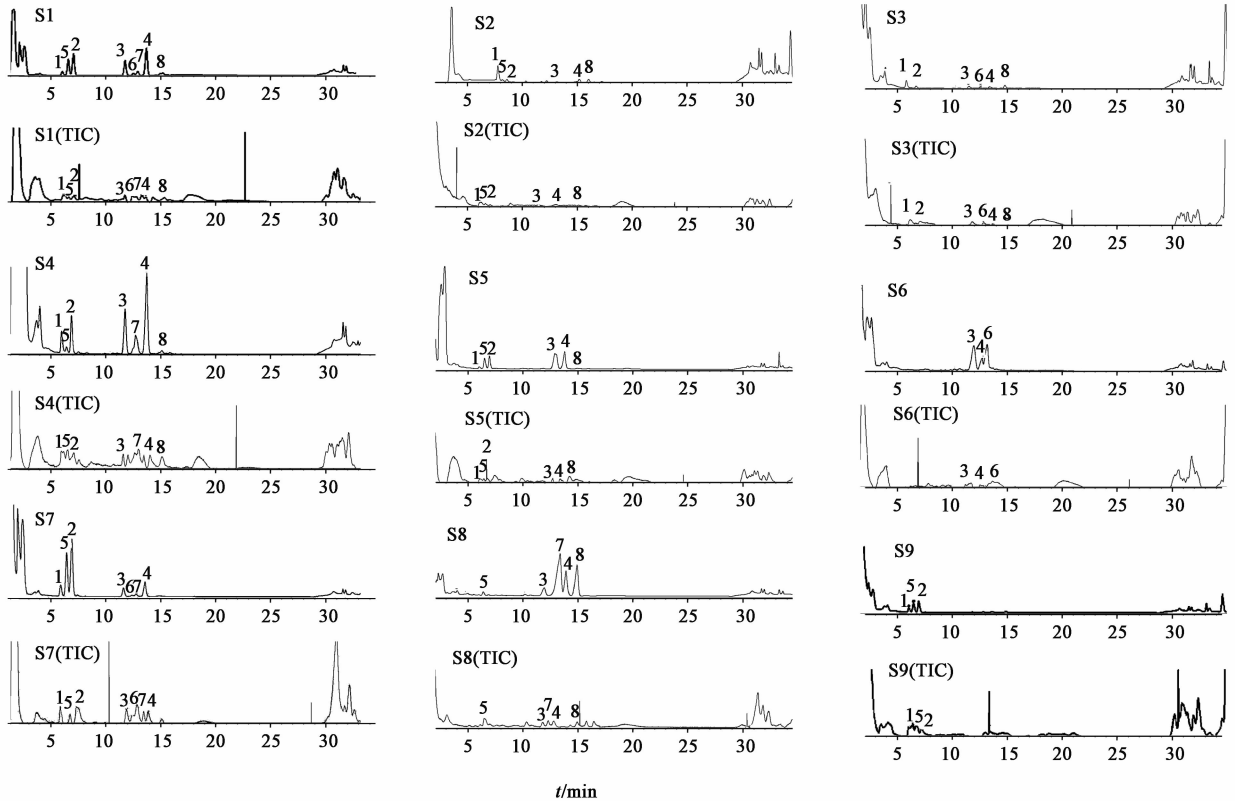
Fig. 1 Chromatograms of polyphyllin reference substance(A) and total ion flow(B)

2.2 重楼属 9 种植物根茎中主要有效成分分子式分析 参照文献[13-14]笔者建立的方法, 分别取 2.1.3 和 2.1.4 项下对照品溶液、供试品溶液, 在 2.1.1 和 2.1.2 项下色谱和质谱条件下进样, 每次进样量 10 μL, 分别测得对照品、供试品的质谱数据, 用 Bruker Daltonics 公司 Data Analysis 数据处理软件进行数据分析, 并与对照品质谱信息匹配, 鉴定重楼属植物根茎中主要有效成分。在正离子模式下, 用 Na[NaCOOH] (*m/z* 为 90.976 6) 进行 ESI 内部校正, 模式是 HPC, 搜索范围是 0.05, 强度是 1 000, microQ-TOF 外标法最大误差设置为 5 ppm。使用 Chemistry 对重楼属植物根茎中主要有效成分的分子式进行鉴定, 用 Smart Formula 计算质谱图各峰分子式, Smart Formula Manually 计算特定峰分子式, 选择质谱图对应的分子离子峰, 输出对应分子式。

2.3 主成分分析(PCA)模型的建立 将 2.2 项下测得的重楼属植物根茎质谱数据导入 Bruker Daltonics 公司 Profil Analysis 软件, 根据重楼属植物根茎质谱数据进行单因素分组建模, 建立其 PCA 分析模型, 分析重楼属植物根茎中主要化学成分的差异。时间范围为 100 ~ 2 400 s, 质量范围为 *m/z* 50 ~ 2 000, 时间容差为 2 min, 质量容差为 *m/z* 1.0, 用强度归一化, 无数据前处理、干扰峰扣除及背景扣除。

2.4 重楼属 9 种植物根茎中主要甾体皂苷有效成分 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 的测定 对金线重楼、毛重楼、南重楼、黑籽重楼、长柱重楼、五指莲、多叶重楼、滇重楼(阔瓣)和滇重楼进行 UPLC-ESI-Q-TOF-MS

测定,采用正离子 ESI 进行分析,结果显示,在重楼属植物根茎中各主要成分响应较好,收集正离子模式下的实验数据,得到重楼属植物根茎色谱图及总离子流图,结果见图 2。



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 H; 6. 薯蓣皂苷; 7. 纤细薯蓣皂苷; 8. 重楼皂苷 V

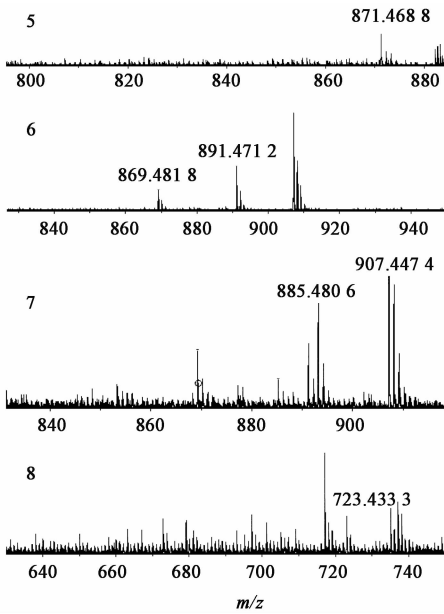
图 2 重楼属植物色谱与总离子流

Fig. 2 Chromatograms and total ion current of Paris

2.5 重楼属 9 种植物根茎中主要甾体皂苷有效成分分析 对所测得滇重楼根茎质谱数据进行分析,与对照品的质谱信息进行匹配,鉴定出滇重楼根茎中 1 号峰为重楼皂苷 VII, 2 号峰为重楼皂苷 VI, 3 号峰为重楼皂苷 II, 4 号峰为重楼皂苷 I。进一步对其他甾体皂苷有效成分进行分析, 5 号峰正离子模式可见 m/z 871.468 8 $[M + H]^+$, 893.442 9 $[M + Na]^+$, 推测为重楼皂苷 H ($C_{44}H_{70}O_{17}$, 3-O- α -L-rha(1 \rightarrow 2) [α -L-ara(1 \rightarrow 4)]- β -D-glc), 见图 3; 6 号峰正离子模式可见 m/z 869.481 8 $[M + H]^+$, 891.471 2 $[M + Na]^+$, 结合出峰时间与离子碎片可推测为薯蓣皂苷 ($C_{45}H_{72}O_{16}$, dioscin), 见图 3; 7 号峰, 正离子模式可见 m/z 907.447 4 $[M + Na]^+$, 885.480 647 $[M + H]^+$, 推测为纤细薯蓣皂苷 (gracillin, $C_{45}H_{72}O_{17}$, 3-O- β -D-glc(1 \rightarrow 3) [α -L-rha(1 \rightarrow 2)]- β -D-glc), 见图 3; 8 号峰正离子模式可见

m/z 723.433 3 $[M + H]^+$, 推测为重楼皂苷 V ($C_{39}H_{62}O_{12}$, 3-O- α -L-rha(1 \rightarrow 2)- β -D-glc), 见图 3。

依此类推,重楼属 9 种植物根茎中主要甾体皂苷有效成分检测结果见表 2, S1(滇重楼), S2(金线重楼), S3(毛重楼), S4[滇重楼(阔瓣)], S5(南重楼), S6(五指莲), S7(黑籽重楼), S9(多叶重楼)重楼属 8 种植物根茎中均能检测到 2015 年版《中国药典》(一部)药材质量控制指标重楼皂苷 I, II, VI, VII^[5], 同时还检测到重楼皂苷 V; S1(滇重楼), S7(黑籽重楼)根茎中还检测到重楼皂苷 H, 薯蓣皂苷, 纤细薯蓣皂苷; S2(金线重楼), S4[滇重楼(阔瓣)], S5(南重楼), S8(长柱重楼), S9(多叶重楼)5 种根茎中均能检测到重楼皂苷 H; S3(毛重楼), S8(长柱重楼), S9(多叶重楼)3 种根茎中均能检测到薯蓣皂苷; S4[滇重楼(阔瓣)], S8(长柱重楼), S9(多叶重楼)3 种根茎中均能检测到纤细薯蓣皂苷。



5. 重楼皂苷 H; 6. 薯蓣皂苷; 7. 纤细薯蓣皂苷; 8. 重楼皂苷 V

图 3 典型皂苷质谱

Fig. 3 Mass spectrogram of typical polyphyllins

因此,重楼属 9 种植物根茎中重楼皂苷 H,薯蓣皂苷,纤细薯蓣皂苷 3 种主要甾体皂苷有效成分差异较大。

表 2 重楼属 9 种植物根茎主要活性成分分析

Table 2 Analysis of main active ingredient in rhizomes of *Paris*

No.	重楼皂苷 I	重楼皂苷 II	重楼皂苷 V	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 VII	重楼皂苷 H	薯蓣皂苷	纤细薯蓣皂苷
S1	√	√	√	√	√	√	√	√
S2	√	√	√	√	√	√		
S3	√	√	√	√	√		√	
S4	√	√	√	√	√	√		√
S5	√	√	√	√	√	√		
S6	√	√	√	√	√		√	
S7	√	√	√	√	√	√	√	√
S8	√	√	√			√		√
S9	√	√	√	√	√		√	√

注:“√”表示检测到。

2.6 PCA 分析 对重楼属 9 种植物根茎中正离子模式下时间范围为 100 ~ 2 400 s 及质量范围 m/z 50 ~ 2 000 液质数据进行 PCA 建模分析,PCA 分析结果见图 4。分析结果显示,在 PC1 维度,重楼属 9 种植物根茎样品能够得到较好的分离,图中距离中心越远的点对差异贡献越大。S1 (滇重楼),S2 (金线重楼),S3 (毛重楼),S4 [滇重楼 (阔瓣)],S5

(南重楼),S6 (五指莲),S9 (多叶重楼) 分布较集中,质量范围 m/z 50 ~ 2 000 液质数据差异较小,可以聚为一类,S7 (黑籽重楼),S8 (长柱重楼) 各自聚为一类,S8 (长柱重楼) 距离 S1 (滇重楼) 最远,与 S1 (滇重楼) 差异较大。

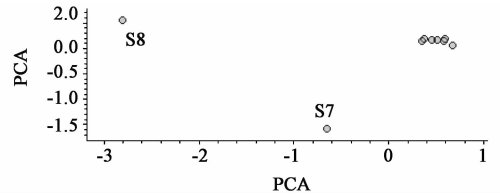


图 4 重楼属 9 种植物根茎成分 PCA 得分

Fig. 4 PCA figure of rhizomes of *Paris*

3 讨论

应用 UPLC-MS 联用方法定性检测重楼属 9 种植物根茎中重楼皂苷 I,重楼皂苷 II,重楼皂苷 III (薯蓣皂苷),重楼皂苷 V,重楼皂苷 VI,重楼皂苷 VII,重楼皂苷 H 及纤细薯蓣皂苷 8 种甾体皂苷有效成分,结果表明,滇重楼,金线重楼,毛重楼,滇重楼 (阔瓣),南重楼,五指莲,黑籽重楼,多叶重楼 8 种重楼属植物根茎中均能检测到 2015 年版《中国药典》(一部) 药材质量控制指标重楼皂苷 I, II, VI, VII^[6],同时还检测到重楼皂苷 V;重楼皂苷 H,薯蓣皂苷,纤细薯蓣皂苷 3 种主要甾体皂苷有效成分差异较大。同时,根据重楼属 9 种根植物根茎正离子模式下液质数据的主成分分析 (PCA) 模型可将 S1 (滇重楼),S2 (金线重楼),S3 (毛重楼),S4 [滇重楼 (阔瓣)],S5 (南重楼),S6 (五指莲),S9 (多叶重楼) 7 种重楼属植物聚为一类,但是其能否替代滇重楼入药还值得进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 李恒. 重楼属植物[M]. 北京:科学出版社,1998:118.
[2] 王跃虎,牛红梅,张兆云,等. 重楼属药用植物的药用价值及其化学物质基础[J]. 中国中药杂志,2015,40(5):833-839.
[3] 赵飞亚,陶爱恩,夏从龙. 基于国内专利结合资源,应用与开发现状的重楼发展策略探讨[J]. 中国中药杂志,2018,43(2):404-409.
[4] 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.
[5] 杨淋,胡侃,赵昱,等. 滇重楼种子无菌萌发及植株形态发生的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):151-154.
[6] 黄圆圆,刘大会,彭华胜,等. 15 种重楼属植物中 8 种

- 甾体皂苷的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18):3443-3451.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 刘立敏,韩多,赵志莲,等. 重楼属药用植物叶中主要次生代谢产物积累差异的研究[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(11):875-879.
- [10] 高佳,程晓昆,班璐,等. 液质联用技术的应用与发展[J]. 当代化工研究, 2016(5):86-87.
- [11] 陈莉. LC-Q-TOF-MS 在中药中的应用研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(S1):292.
- [12] 谢俊大,孙磊. 重楼药材多指标含量分析及化学计量学综合质量评价[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9):1585-1590.
- [13] 戴雪雯,冯丽丽,李海峰. 不同种植基地滇重楼根茎和叶中甾体皂苷类有效成分的差异及相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3):41-48.
- [14] 戴雪雯,冯丽丽,李海峰. 不同种植基地滇重楼根茎中甾体皂苷有效成分差异的研究[J]. 中药材, 2018, 41(4):777-783.

[责任编辑 顾雪竹]