



不同生长年限长柱重楼根茎中主要次生代谢产物的累积变化

周姣姣,陶爱恩,何正春,夏从龙

(大理大学 药学与化学学院,云南 大理 671000)

摘要:为促进长柱重楼的合理采收和资源开发利用,采用紫外分光光度计测定长柱重楼中重楼总皂苷含量;同时采用 HPLC 法测定不同生长年限长柱重楼中重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量,色谱柱为 AgilentC-18 柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),检测波长 203 nm,柱温 25 °C,流动相为乙腈-水,流速 0.9 mL·min⁻¹,进样量 5 μL;对所测数据进行主成分分析和相关性分析。结果表明:长柱重楼中主要次生代谢产物的累积量与生长年限呈非线性关系;主成分分析结果显示七年生的长柱重楼品质最佳;相关性分析结果表明总含量与重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 与重楼皂苷 VI 呈极显著正相关性。综上所述,不同生长年限长柱重楼中主要次生代谢产物的含量不同,其中重楼皂苷 II 总体含量偏高,长柱重楼的采收期以七年生左右为佳。

关键词:长柱重楼;重楼皂苷;次生代谢产物;HPLC;紫外分光光度计

长柱重楼为百合科重楼属植物长柱重楼(*Paris forrestii* (Takht.) H. Li.) 的干燥根茎,分布于云南西北部和西部,生长于海拔1 900~3 500 m的常绿阔叶林、沟谷阔叶林等^[1]。重楼属植物药用价值极高,现代研究表明其主要活性成分为重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII 等,具有显著的抗菌、抗癌、止血等药理活性^[2-3]。2015 年版《中国药典》一部收载重楼为云南重楼(*Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz.) 和七叶一枝花(*Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.)) 的干燥根茎^[4]。随着重楼需求量的不断增长和重楼野生资源的减少,药典品种再难满足市场需求,急需扩大重楼药材的药用来源。

云南民间常将长柱重楼作为重楼药材替代品入药^[5],其药用历史悠久。长柱重楼易栽培、产量高,是重楼药材代用品的首选。黄圆圆等^[6]研究结果表明长柱重楼的化学成分与滇重楼相似;李洪梅等^[7]研究结果表明长柱重楼与云南重楼、七叶一枝花的药效作用相当,可作为重楼替代品进行研究开发。文献报道重楼药材品质受不同采收期的影响极大^[8-9]。然而,目前对不同生长年限长

柱重楼的品质评价缺乏相关研究报道。陈翠等^[10]研究结果表明第 1-4 年为重楼实生苗营养生长期,第 5 年开始进入生殖生长期,即成年植株。鉴于上述研究结果,本文建立长柱重楼中重楼皂苷的 HPLC 含量测定方法,探讨五至十二年生长柱重楼根茎中主要次生代谢产物的累积动态变化,以为长柱重楼的合理采收及资源开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试药材 长柱重楼五年生(S₁)、六年生(S₂)、七年生(S₃)、八年生(S₄)、九年生(S₅)及十年生(S₆)、十一年生(S₇)、十二年生(S₈)共 8 批药材均于 2015 年 10 月采集于云南怒江州兰坪县。滇重楼七年生共 3 批(D₁、D₂、D₃)药材分别于 2015 年 10 月采集于云南文山、曲靖市师宗县雄壁镇和大理洱源县乔后镇大坪村。经大理大学药学与化学学院生药学教研室夏从龙教授鉴定分别为百合科重楼属植物长柱重楼(*P. forrestii* (Takht.) H. Li.) 的干燥根茎和滇重楼(*P. polyphylla* var. *yunnanensis*) 的干燥根茎。样品标本存放于大理大学生药学教研室标本馆。

1.1.2 供试药品和试剂 对照品重楼皂苷 I(批号:GZDD-0605)、重楼皂苷 II(批号:GZDD-0606)、重楼皂苷 VI(批号:GZDD-0608)、重楼皂苷 VII(批号:GZDD-0609)购于贵州迪大生物科技有限责任公司,纯度均大于 98%。

色谱级乙腈(Fisher Scientific,批号:

收稿日期:2017-12-19

基金项目:云南省科技厅面上资助项目(2013FB059);云南省大学生创新创业计划资助项目(201610679009、201610679003)。

第一作者简介:周姣姣(1993-),女,在读硕士,从事中药药物化学成分研究。E-mail:ZJJ107@163.com。

通讯作者:夏从龙(1974-),男,硕士,教授,硕士,从事天然药物资源调查与品质评价研究。E-mail:long7484@126.com。

085884), 色谱级甲醇(赛默飞世尔科技有限公司, A-452-24), 水为超纯水(重蒸水, 自制), 其它试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.3 供试仪器 Agilent 1290 高效液相色谱仪(包括 G4204A 泵、G4226A 自动进样器、G1316C 柱温箱、G4212B 检测器、Agilent Chem-Station 色谱工作站); GH-252 电子天平(日本 AND); SB25-12D 超声波清洗机(功率 500 W, 频率 60 KHz, 宁波新芝生物科技股份有限公司); AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); FY135 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); 艾柯 DZG-303A 超纯水机(成都康宁实验专用纯水设备厂); T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京谱析通用仪器有限责任公司)。

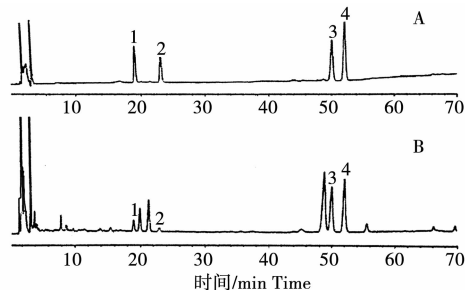
1.2 方法

1.2.1 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱为 AgilentC-18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 检测波长 203 nm, 柱温 25 ℃; 流动相乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0~14 min, 30%~40% A; 14~40 min, 40% A; 40~70 min, 40%~60% A), 流速 0.9 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL。在该色谱条件下, 重楼皂苷 I、II、VI、VII 均被洗脱且达到基线分离, 结果见图 1。

1.2.2 混合对照品溶液的制备 精确称取重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII 四种对照品, 溶于甲醇配制成浓度分别为 0.64、0.46、0.26、0.23 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 按比例 1:1:1:1 混合, 过滤, 备用。

1.2.3 供试品溶液的制备 精密称定长柱重楼

药材粉末(过 40 目筛)0.5 g, 置容量瓶中, 精密加入甲醇 5 mL, 称定质量, 浸泡过夜后, 于 40 ℃ 温度中超声 20 min(功率 500 W, 频率 60 MHz), 再称定质量, 用甲醇补足失量, 按上述方法重复 2 次, 取滤液合并, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。



A:混合对照品; B:长柱重楼药材粉末;
1:重楼皂苷VI; 2:重楼皂苷VII; 3:重楼皂苷II; 4:重楼皂苷I。
A:the mixed reference solution; B:the powder of *P. forrestii*;
1:polyphyllin VI; 2:Polyphyllin VII; 3:Polyphyllin II; 4:Polyphyllin I.

图 1 混合对照品溶液及长柱重楼的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of reference (A) and sample solution (B)

1.2.4 线性关系的考察 分别精确吸取混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL, 分别进样, 记录色谱图, 测定峰面积。以峰面积 Y 对进样量 X 进行线性回归得重楼皂苷 I、II、VI、VII 的回归方程, 结果见表 1。

1.2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL, 按 1.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 记录重楼皂苷 I、II、VI、VII 的峰面积, 相对标准偏差(RSD) 分别为 2.37%、2.05%、2.16%、2.09%。结果表明方法精密度良好。

表 1 长柱重楼中 4 种重楼皂苷标准曲线

Table 1 The standard curve about four kinds of polyphyllin in *P. forrestii*

化合物 Chemical compound	标准曲线 Standard curve	R	线性范围/μg Linearity range
重楼皂 I Polyphyllin I	$Y_I = 366.44X_I + 3.07$	0.9999	0.64~12.80
重楼皂 II Polyphyllin II	$Y_{II} = 377.60X_{II} + 2.42$	0.9999	0.46~9.20
重楼皂 VI Polyphyllin VI	$Y_{VI} = 340.35X_{VI} + 1.63$	0.9999	0.26~5.20
重楼皂 VII Polyphyllin VII	$Y_{VII} = 344.22X_{VII} + 0.37$	0.9999	0.23~4.60

1.2.6 稳定性试验 取同一长柱重楼供试品溶液(S2), 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 记录峰面积。测得重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的 RSD 分别为 2.01%、2.70%、2.71%、2.97%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

1.2.7 重复性试验 取同一长柱重楼样品(S2) 6 份, 按 1.2.3 项下制备供试品溶液, 按 1.2.1 项下

色谱条件进行测定, 记录峰面积, 测得重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量, 其含量的 RSD 分别为 0.53%、2.14%、1.90%、2.77%, 表明方法重复性良好。

1.2.8 加样回收率试验 精密称定已知含量的同一批号的样品 6 份, 添加重楼皂苷对照品溶液适量, 按 1.2.3 项下制备供试品溶液。按 1.2.1 项下色谱条件测定, 计算重楼皂苷 I、II、VI、VII

的平均回收率分别为 101.01%、101.72%、98.62%、101.11%;RSD 分别为 1.31%、2.34%、1.62%、2.10%,加样回收率试验符合分析要求。

1.2.9 皂苷对照品溶液的制备 精密称取薯蓣皂苷元对照品,溶于甲醇配制质量浓度为 0.205 mg·mL⁻¹的对照品溶液。

1.2.10 供试品溶液的制备 取 1.2.3 项下供试品溶液。

1.2.11 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL,置具塞试管内,水浴挥干溶剂,精密加入高氯酸 5 mL,密闭,60℃恒温水浴中加热 15 min,取出冰浴冷却至室温;同时精密吸取 0.4 mL 甲醇溶液按同样的方法处理作为空白溶液,迅速在 408 nm 波长处测定吸光度。以总皂苷质量(X,mg)为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,进行线性回归。薯蓣皂苷元的回归方程为: $A=7.6808X-0.1221$ ($R=0.9997$)。结果表明薯蓣皂苷元在 0.020 5~0.143 5 mg 线性关系良好。

1.2.12 精密度试验 精密吸取对照品溶液 0.4 mL,按 1.2.11 项下显色条件测定 5 次,吸光度的 RSD 为 0.11%。结果表明方法精密度良好。

1.2.13 稳定性试验 取同一供试品溶液(S2),分别于 0、4、8、16、24 h 按 1.2.11 项下显色条件测定吸光度。结果得 RSD 为 1.52%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

1.2.14 重复性试验 取同一批号的样品 5 份,

按 1.2.3 项下制备供试品溶液,按 1.2.11 项下显色条件测定,测得总皂苷的含量。其含量的 RSD 为 0.76%。结果表明该方法重复性良好。

1.2.15 加样回收率试验 精密称定已知含量的同一批号的样品 5 份,添加对照品适量(薯蓣皂苷元),按 1.2.3 项下制备供试品溶液。按 1.2.11 项下显色条件测定,总皂苷的平均回收率为 100.50%;RSD 为 2.58%。

1.2.16 数据分析 运用 SPSS 22.0 对不同生长年限长柱重楼中主要次生代谢产物及重楼皂苷总含量、总皂苷进行相关性分析。运用 SPSS 22.0 对不同生长年限长住重楼中主要次生代谢产物进行主成分分析。

2 结果与分析

2.1 样品含量测定结果

由表 2 可以看出,五至十二年生的长柱重楼中重楼皂苷 VI 和 VII 含量百分比都偏低;五年生、六年生和九年生重楼皂苷 I 含量相对较高,其余年份重楼皂苷 II 含量最高。十年生、十一年生和十二年生长柱重楼未检测到重楼皂苷 I 和重楼皂苷 VII;且七年生未检测到重楼皂苷 VII;八年生未检测到重楼皂苷 I。说明不同生长年限的长柱重楼皂苷含量和种类差别较大。药典规定的重楼皂苷 I、II、VI、VII 总含量在第七年达到峰值;主成分分析结果进一步证实七年生长柱重楼质量最佳。七年生长柱重楼比其它三批不同产地的七年生滇重楼中 4 种重楼皂苷总含量都高。相比重

表 2 长柱重楼和滇重楼根茎中重楼皂苷的含量

Table 2 Contents of polyphyllin in rhizome of *P. forrestii* and *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

编号 No.	生长年限/年 Growth years	重楼皂苷含量/% Polyphyllin content					总皂苷/% The total saponins contents
		I	II	VI	VII	总含量 Total content	
S1	5	0.4502	0.1967	0.0495	0.0101	0.7065	3.8305
S2	6	0.6060	0.2738	0.0616	0.0109	0.9414	4.3880
S3	7	0.4607	2.1924	0.0330	ND	2.6861	3.6645
S4	8	ND	0.4765	0.0110	0.0283	0.5158	4.3428
S5	9	0.6050	0.2734	0.0615	0.0109	0.9508	6.2456
S6	10	ND	0.8421	0.0084	ND	0.8505	4.6957
S7	11	ND	0.4808	0.0103	ND	0.4911	3.5960
S8	12	ND	1.4286	0.0087	ND	1.4373	3.7284
D1	7	0.6768	ND	0.3343	ND	1.0111	3.5348
D2	7	0.4647	0.0889	0.1248	ND	0.6784	3.3561
D3	7	0.7060	ND	0.2247	ND	0.9307	3.6078

楼药材正品来源滇重楼,长柱重楼中的皂苷含量更高。

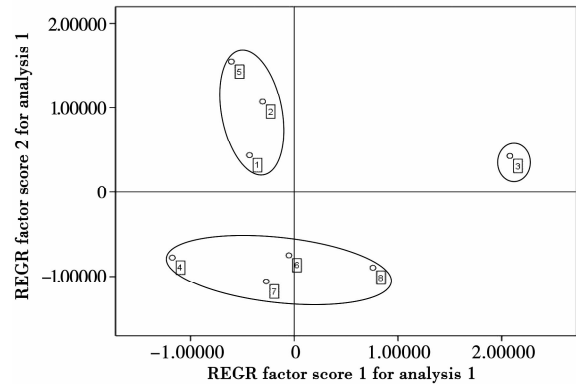
2.2 相关性分析

由表 3 可知,重楼皂苷总含量与重楼皂苷 II 呈极显著正相关性;重楼皂苷 I 与重楼皂苷 VI 呈极显著正相关性。单种成分含量与不同生长年限相关性不显著。

表 3 相关性矩阵
Table 3 Correlation matrix

项目 Items	生长年限 Growth years	重楼皂苷 I Polyphyll in I	重楼皂苷 II Polyphyll in II	重楼皂苷 VI Polyphyll in VI	重楼皂苷 VII Polyphyll in VII	重楼皂苷总含量 Total content of polyphyllin	总皂苷 The total saponins contents
生长年限 Growth years	1						
重楼皂苷 I Polyphyll in I	-0.702	1					
重楼皂苷 II Polyphyll in II	0.224	-0.144	1				
重楼皂苷 VI Polyphyll in VI	-0.686	0.972 * *	-0.360	1			
重楼皂苷 VII Polyphyll in VII	-0.420	0.089	-0.512	0.190	1		
重楼皂苷总含量 Total content of polyphyllin	-0.090	0.293	0.904 * *	0.073	-0.446	1	
总皂苷 The total saponins contents	0.011	0.395	-0.417	0.471	0.295	-0.230	1

** 表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关。
** mean significant correlation at the 0.01 level (bilateral).



1: S1 (即五年生长柱重楼), 以此类推, 2~8依次表示 S2~S8 (即六到十二年生长柱重楼)。
The 1 in the figure represents S1(That is *P. forrestii* in the fifth year), and so on, 2~8 are S2 ~ S8(That is *P. forrestii* in sixth~twelfth year).

图 2 主成分分析散点图

Fig. 2 Principal component analysis scatter plot

3 讨论

3.1 提取方法的考察

对提取溶剂(乙醇,甲醇)进行了考察研究,结果表明,甲醇提取峰较多,效果较好;同时以 4 种重楼皂苷含量为指标,考察了料液比(1:15、1:10 和 1:5)、提取时间(10、20 和 30 min)、提取温度

2.3 主成分分析

由主成分分析散点图(图 2)可知,七年生长柱重楼质量最佳;五年生、六年生和九年生长柱重楼的次生代谢产物含量较相近;八年生、十年生、十一年生及十二年生长柱重楼的次生代谢产物含量较相近,这可能随着生长年限增长,长柱重楼中各成分含量趋于稳定。

(30、40 和 50 ℃)和提取次数(1、2 和 3 次),最终确定供试品溶液的制备方法。

3.2 色谱条件的选择

流动相甲醇-水系统和乙腈-水系统比较结果表明,乙腈-水系统峰数多、分离度高和基线平稳;在此基础上对流速(0.8、0.9 和 1.0 mL·min⁻¹)进行了考察,流速为 0.8 mL·min⁻¹时色谱峰分离度较差,流速为 1.0 mL·min⁻¹时,出峰个数较少,因此流速选择 0.9 mL·min⁻¹;同时以分离度、峰数、峰形、基线稳定为指标,考察了波长(以《中国药典》为基础,设置±5 nm 进行全波长扫描)、梯度洗脱比例,最终确定的色谱条件。

4 结论

从本文研究结果可以看出,五至十二年生的长柱重楼中重楼皂苷 VI 和 VII 含量百分比都偏低;五年生、六年生和九年生重楼皂苷 I 含量相对较高,其余年份重楼皂苷 II 含量最高。十年生、十一年生和十二年生长柱重楼未检测到重楼皂苷 I 和重楼皂苷 VII;且七年生未检测到重楼皂苷 VII;八年生未检测到重楼皂苷 I。说明不同生长年限的长柱重楼皂苷含量和种类差别较大。研究

表明重楼皂苷Ⅱ可明显地抑制子宫瘤、具有免疫调节等作用^[11-13];重楼皂苷Ⅰ能显著地抑制人肝癌、抑制血管生成和抗指环虫等作用^[14-16]。因此,可根据长柱重楼中各次生代谢产物含量来推测不同年限长柱重楼的药理作用,进而有方向地进行生物活性筛选,但其对药效活性的影响需进一步研究。

药典规定的重楼皂苷Ⅰ、Ⅱ、Ⅵ、Ⅶ总含量在第七年达到峰值;主成分分析结果进一步证实七年生长柱重楼质量最佳。这与赵庭周等^[17]研究结果吻合,滇重楼中重楼皂苷含量随生长年份的增加而增加,第七年含量较高。考虑时间、成本等因素,建议长柱重楼5~7年采收。

七年生长柱重楼比其它3批不同产地的七年生滇重楼中4种重楼皂苷总含量都高。相比重楼药材正品来源滇重楼,长柱重楼中的皂苷含量更高。因此值得对长柱重楼的化学成分及药理活性进行深入研究,并将其作为重楼药材的替代品进一步研究与开发。

参考文献:

[1] 李恒. 重楼属植物[M]. 北京:科学出版社,1998:56,182.
[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):110-113.
[3] 王艳霞,李惠芬. 重楼抗肿瘤作用研究[J]. 中草药,2004,36(4):628-630.
[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典,一部[S]. 北京:中国中医药出版社,2015:260.
[5] 陆辉,许继宏,陈锐平,等. 云南重楼属植物资源现状与保护对策[J]. 云南大学学报(自然科学版),2006,28(S1):307-310.
[6] 黄圆圆,康利平,彭华胜,等. 长柱重楼中主要甾体皂苷类成

分的定性定量分析[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3452-3460.
[7] 李洪梅,孙建辉,康利平,等. 重楼同属植物长柱重楼与药用重楼的药效学对比研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3461-3464.
[8] 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):515-519.
[9] 尹显梅,张开元,蒋桂华,等. 华重楼皂苷类成分的动态分布规律对药材质量的影响[J]. 中草药,2017,48(6):1199-1204.
[10] 陈翠,张浩,谭敬菊,等. 云南重楼生长发育特性及皂苷含量动态变化研究[J]. 西南农业学报,2017,30(6):1320-1324.
[11] Xiao X, Zou J, Minh Bui-Nguyen T, et al. Paris saponin II of rhizoma paridis-A novel inducer of apoptosis in human ovarian cancer cells[J]. Biosci Trends 2012, 6(4):201-211.
[12] 王娟,刘瑞洪,肖红波,等. 重楼皂甙Ⅱ对狼疮性肾炎患者外周 CD+4CD+25T 调节细胞表达的细胞因子的影响[J]. 现代生物医学进展,2010,10(1):50-53.
[13] Bian H R, Li X N, Wang H M. Advances in studies and application of rhizoma paridis[J]. J China Med Mater, 2002, 25(3):218-220.
[14] 萧梅芳,戴霞红,贺新春,等. 重楼皂苷Ⅰ对肝癌细胞的增殖及凋亡的影响[J]. 生命科学研究,2011,15(6):519-523.
[15] 毕葳,沈施,王鹏龙,等. 重楼中几个甾体皂苷类成分对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响[J]. 中成药,2012,34(8):1536-1541.
[16] Wang G X, Han J, Zhao L W, et al. Anthelmintic activity of steroidal saponins from Paris polyphylla[J]. Phytomedicine, 2010, 17(14):1102-1105.
[17] 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,2014,5:61-63,66.

Changes of Accumulation of Main Secondary Metabolites in Rhizome of *Paris forrestii* (Takht.) H. Li. of Different Growth Years

ZHOU Jiao-jiao, TAO Ai-en, HE Zheng-chun, XIA Cong-long
(College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China)

Abstract: In order to promote rational collection and resources exploitation of *Paris forrestii* (Takht.) H. Li., we determined the total saponins contents of *P. forrestii* by Ultraviolet Spectrophotometer, and the contents of polyphyllin I, II, VI and VII of *P. forrestii* in the different growth years by HPLC. The measured data were analyzed by principal component analysis and correlation analysis. The results showed that accumulation of main secondary metabolites in rhizome of *P. forrestii* showed non-linear relationships with the different growth years. And the main active components of *P. forrestii* in the seventh year were higher. The result of correlation analysis showed that total content and polyphyllin II, polyphyllin I and polyphyllin VI have significant positive correlation. In summary, *P. forrestii* (Takht.) H. Li. with different growing years differs from each other in polyphyllin. The content of polyphyllin II is high. And the best harvesting time is about 7 years.
Keywords: *Paris forrestii* (Takht.) H. Li.; polyphyllin; secondary metabolites; HPLC; UV-Vis