

华重楼皂苷类成分的动态分布规律对药材质量的影响

尹显梅¹, 张开元¹, 蒋桂华¹, 饶文霞¹, 刘娟汝¹, 尹鸿翔^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川成都 611137

2. 成都中医药大学民族医药学院, 四川成都 611137

摘要: 目的 研究华重楼皂苷类成分及药材生物量积累速度的时间、空间分布规律(随植株生长年限、采挖季节的变化规律及在不同部位的积累特征), 明确最佳种植年限、采收季节、入药部位。**方法** 建立了基于高效液相色谱法-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)同时测定华重楼6种皂苷(重楼皂苷I、II、VI、VII、V、H)量的方法以检测皂苷量的变化; 采用烘干法测定药材折干率以指示生物量积累速度。**结果** 华重楼根茎折干率同生长年限呈正相关, 8年生最高; 随着采收月份呈波浪式, 6月和1月为波峰; 总皂苷构成以重楼皂苷VII、H为主, 总皂苷量随着生长年限呈“V”字型, 2年和8年为顶点; 随着采收季节呈波浪式, 3月和11月为波峰; 植株不同部位的总皂苷分布差异明显, 茎叶总皂苷量>根茎尖段总皂苷量>根茎中段总皂苷量≈根茎尾段总皂苷量, 其中重楼皂苷VII的分布从茎叶向根茎尾端呈明显下降趋势, 而重楼皂苷H则呈显著上升趋势。**结论** 生长年限、采收季节、植株部位对华重楼皂苷的累积有明显影响, 人工栽培华重楼最佳种植年限为8年、最佳采收季节为11月; 仅采用根茎尾段入药会降低商品药材质量; 重楼皂苷VII可能同华重楼的萌芽和茎叶生长有关; 茎叶可作为获取重楼皂苷的重要资源, 对于扩大药源, 提高资源利用效率有重要意义。

关键词: 华重楼; HPLC-ELSD; 重楼皂苷I; 重楼皂苷II; 重楼皂苷VI; 重楼皂苷VII; 重楼皂苷V; 重楼皂苷H; 生长年限; 采收季节; 入药部位

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)06-1199-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.024

Effect of dynamic distribution of steroid saponins from *Paris polyphylla* var. *chinensis* on medical material quality

YIN Xian-mei¹, ZHANG Kai-yuan¹, JIANG Gui-hua¹, RAO Wen-xia¹, LIU Juan-ru¹, YIN Hong-xiang²

1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

2. College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To obtain the optimum cultivation period and best harvesting month of *P. polyphylla* var. *chinensis* by studying on change regularity of biomass accumulation rate and steroid saponins from *P. polyphylla* var. *chinensis* with the changes of its harvesting time and medicinal parts. **Methods** A high performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD) method was established to characterize content of six steroid saponins (*Paris* saponins I, II, VI, VII, V, and H) from *P. polyphylla* var. *chinensis* and its dynamic change regularity was detected; Drying rate was measured by oven-dry method to indicate biomass accumulation rate. **Results** Drying rate increased with the planting ages and reached the highest level in the eighth year. There was a waving trend between drying rate and harvesting time and drying rate reached crest in January and June; The main steroid saponins of *P. polyphylla* var. *chinensis* were *Paris* saponin VII and *Paris* saponin H. The content of total saponins varied by ‘V’ shaped with the increases of planting-year and reached the highest in the second and eighth year, and it changed by waving shape with the change of harvesting month and reached the crest in March and November; There was a distinct difference of total saponins among different parts of *P. polyphylla* var. *chinensis*: stems and leaves > rhizome-forepart > rhizome-middle-part ≈ rhizome-end-part. The distribution of *paris* saponins VII decreased obviously from stems to rhizome-end-part while *paris* saponins H increased gradually. **Conclusion** There were remarkable correlations among steroid saponins accumulation amounts and planting ages, harvesting month, and medicinal parts. The optimum cultivation period is eight years and best harvesting month is in November;

收稿日期: 2016-08-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573545, 81001606); 霍英东教育基金项目(121045); 四川省科技厅应用基础研究项目(2017JY0137); 四川省崇州市现代农业创新驱动试点区(2015-CX00-00004-ZF)

作者简介: 尹显梅(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生药学。Tel: 18782204450 E-mail: 626041103@qq.com

*通信作者 尹鸿翔(1979—), 男, 副教授, 研究方向为中药及民族药资源可持续利用及质量评价。Tel: 13880625680 E-mail: hongxiangy@126.com

The quality of medicinal materials would decline if only rhizome-end-part to be used; *Paris saponin VII* maybe a relative factor for germination and growth of *P. polyphylla* var. *chinensis*; Stems of *P. polyphylla* var. *chinensis* can be an important resource to extract steroid saponins, which have a profound significance to broaden resources of medicinal plants and improve resources utilization efficiency.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara; HPLC-ELSD; *Paris saponin I*; *Paris saponin II*; *Paris saponin VI*; *Paris saponin VII*; *Paris saponin V*; *Paris saponin H*; planting ages; harvesting period; medicinal position

华重楼即七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara, 广泛分布于我国西南地区和长江中下游各省, 作为重楼药材的法定基原收载于《中国药典》2015 年版^[1]。重楼是著名中成药云南白药、宫血宁胶囊、季德胜蛇药等的主要组成分^[2]。近年来, 由于制药工业的快速发展, 对重楼药材的需求大大增加, 野生资源枯竭, 价格飞涨。为了满足需求, 重楼药材主产区的广大药企和农业专业合作社开始积极介入华重楼药材的野生变家种, 因此系统研究和总结华重楼的规范化种植关键技术亟待开展。

在近年的报道中^[3-5], 关于重楼人工种植技术的研究多集中于云南重楼 *P. polyphylla* Smith var. *yunanensis* (Franch.) Hand. -Mazz., 而对于华重楼却鲜有报道, 通过资源调查发现华重楼是四川、重庆、贵州、湖北、湖南、广西、江西等长江流域省份人工栽培的主要品种, 种植规模连年扩大。但问题也随之产生, 首先, 各地华重楼人工栽培起步较晚, 目前多以野生植株移栽为主, 植株的生长年限和采挖季节对药材质量的影响难以明确; 其次, 由于重楼种苗价格高昂, 为了缓解种苗短缺和降低种植成本, 种植户大量地采用重楼根茎切段利用模式, 即采挖后将华重楼根茎拦腰切断, 带顶芽的部分留种, 而后半段干燥出售, 该模式已被申报发明专利 (CN 103907460 A) 并在主产区推广, 造成药市上出现大量仅剩尾部的“半截重楼”, 这对商品药材质量有何影响也不得而知。因此, 本实验以华重楼为研究对象, 测定华重楼皂苷类成分量及药材生物量随植株的生长年限、采挖季节变化规律及在根茎不同部位的累积特征, 为华重楼人工栽培中确定合理的种植年限、采收季节、入药部位提供科学依据, 并阐明华重楼切段利用模式的出现对当前商品药材质量的影响。

1 材料

1.1 仪器和试剂

高效液相色谱仪 Agilent technologies 1200series、蒸发光散射检测器 ALLTECH 3300 ELSD, 色谱柱 Kromasil100-6 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), BP211D 1/10 万电子分析天平, ULUP-I-10T 优普超纯水机 (成都超纯有限公司)。

水为超纯水, 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯 (Fisher 公司), 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 对照品自制, 质量分数均大于 98%。

1.2 样品

华重楼植株采自四川省彭州市白鹿镇华清中药材种植家庭农场的华重楼种植基地, 均为同一母株的种子育苗, 保障了所有样品具有相同的遗传背景、生长环境和明确的种植时间。样品经成都中医药大学尹鸿翔副教授鉴定为华重楼 *P. polyphylla* Smith Var.*chinensis* (Franch.) Hara。

2 方法

2.1 样品的处理

所选母株生长良好且健壮, 每年均可产生 300 粒以上正常成熟种子, 育苗后遴选健壮植株作为下一步实验样品。不同年份样品取自 2~8 年生的植株, 共 7 个年份, 每个年份各取 20 株以保证充足的样本量; 8 年生不同月份样品 1~11 月采的植株, 每个月份各取 20 株。植株清洗干净后参照重楼根茎切段繁殖法分割为地面茎叶、根茎尖段 (包含顶芽部分的新生第 1 个环节)、根茎中段 (含第 6~7 年生长环节)、根茎尾段 (含第 1~5 年生长环节) 4 个部分, 50 °C 下烘干 12 h。烘干的药材按照《中国药典》2015 年版一部重楼水分检查项下的要求 (通则 0832 第二法) 进行含水量检测, 含水量均低于 12%。

2.2 对照品溶液制备

分别取重楼皂苷 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 适量, 精密称定, 溶 10 mL 的甲醇溶液中, 得到质量浓度分别为重楼皂苷 I 0.408 mg/mL、重楼皂苷 II 0.406 mg/mL、重楼皂苷 V 0.391 mg/mL、重楼皂苷 VI 0.400 mg/mL、重楼皂苷 VII 0.380 mg/mL、重楼皂苷 H 0.440 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取重楼粉末 (过 3 号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 95% 乙醇溶液 25 mL, 称定质量, 置于 82 °C 水浴锅中, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用乙醇补足减失的质量, 摆匀,

滤过，取续滤液，用微孔滤膜（0.20 μm）滤过，即得。

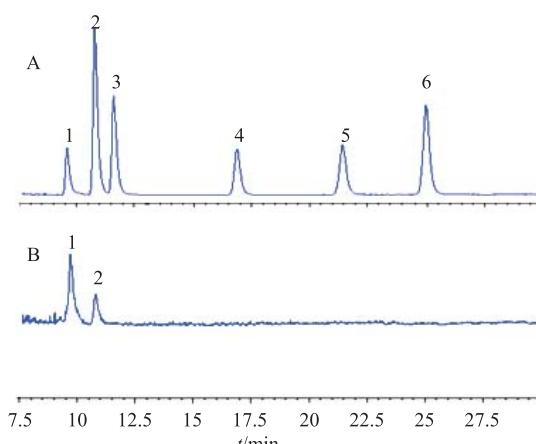
2.4 色谱条件

流动相为乙腈-水系统，梯度洗脱程序见表1，四元泵，柱温30 °C，漂移管温度45 °C，氮气体积流量1.6 L/min，洗脱时间35 min。每个循环完成后用100%乙腈冲洗柱子5 min，并平衡10 min。进样量10 μL，理论塔板数按重楼皂苷I峰计不低于4 000，对照品色谱图见图1。

表1 梯度程序

Table 1 Gradient elution procedures

时间/min	乙腈/%	水/%
0	30	70
5	45	55
20	50	50
30	60	40
35	100	0



1-重楼皂苷VII 2-重楼皂苷H 3-重楼皂苷VI 4-重楼皂苷II

5-重楼皂苷I 6-重楼皂苷V

1-*Paris saponin VII* 2-*Paris saponin H* 3-*Paris saponin VI*

4-*Paris saponin II* 5-*Paris saponin I* 6-*Paris saponin V*

图1 重楼皂苷的混合对照品(A)和5年生华重楼的HPLC-ELSD色谱图(B)

Fig. 1 HPLC-ELSD of reference substances (A) and 5-year-old *P. polyphylla* var. *chinensis* (B)

2.5 线性关系考察

分别精密量取混合对照品溶液0.5、1、2、3、4、5 mL，至25 mL锥形瓶中，加甲醇稀释至刻度，制得不同质量浓度梯度的混合对照品溶液。分别吸取10 μL，注入液相色谱仪，测定各皂苷色谱峰峰面积。以各皂苷对照品进样量的对数为横坐标(X)，色谱峰峰面积的对数为纵坐标(Y)，分别绘制标准曲线，计算回归方程，结果见表2。

2.6 精密度试验

精密吸取上述混合对照品溶液10 μL，重复进样5次，测定重楼皂苷I、II、VI、VII、H、V峰面积，RSD分别为0.51%、0.36%、0.28%、0.64%、0.56%、0.78%，表明仪器的精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一编号供试品溶液，分别于0、1、2、4、8、16、24 h进样10 μL，测定峰面积，计算质量分数。重楼皂苷I、II、VI、VII、H、V质量分数RSD分别为1.23%、1.46%、1.05%、1.19%、1.33%、1.17%，表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.8 重复性试验

取同一华重楼样品5份(8年生)，按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液，进样10 μL，按照“2.4”项下的条件测定峰面积，计算得到重楼皂苷I、II、VI、VII、H、V质量分数RSD均小于1.5%，表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已测定的样品0.25 g，共6份，精密称定，分别加入对照品溶液1 mL。按“2.3”项下的方法制备供试品溶液，进样10 μL，测定峰面积，计算回收率。重楼皂苷I、II、VI、VII、H、V平均回收率分别是99.13%、98.35%、98.35%、97.77%、98.34%、97.77%。RSD分别为1.76%、2.17%、1.56%、2.32%、2.17%、2.32%。

表2 6种重楼皂苷成分线性关系

Table 2 Results of linear relationships of six kinds of saponins

化合物名称	回归方程	线性范围/μg	r
重楼皂苷VII	$Y=1.1925X+4.0237$	0.076~0.760	0.999
重楼皂苷H	$Y=1.3329X+4.6164$	0.088~0.880	0.999
重楼皂苷VI	$Y=1.4408X+6.9953$	0.080~0.800	0.999
重楼皂苷I	$Y=1.8940X+4.3306$	0.080~0.800	0.999
重楼皂苷II	$Y=1.1349X+4.2122$	0.080~0.800	0.999
重楼皂苷V	$Y=1.1087X+4.3985$	0.078~0.780	0.999

2.10 不同生长年限、采收季节及生长部位的华重楼折干率

将鲜品药材清洗干净,去净地上部分以及须根,置通风处至表面水分干燥,称鲜质量并除以药材个数得到平均鲜质量(M_1);将称定质量后药材50℃烘干至恒定质量后,再称取干质量并除以药材个数得到平均干质量(M_2)。计算药材折干率(药材折干率= M_2/M_1)。

2.11 不同生长年限、采收季节及生长部位华重楼重楼皂苷测定

按照“2.3”项的方法制备供试品溶液,精密吸取各溶液10 μL,按照“2.4”项下的条件测定峰面积,结合“2.5”项中所得线性回归方程,计算出各样品中6种皂苷的质量分数。

3 结果与分析

3.1 不同生长年限华重楼折干率及重楼皂苷量变化特征

由图2可知华重楼折干率在第2年最低,随生长年限而增加,第3~5年基本稳定,第6年开始迅速增加,第8年达到最高值32.56%。显然,华重楼根茎折干率同生长年限呈正相关。

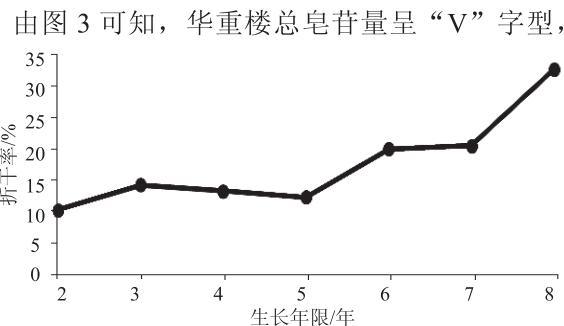


图2 不同生长年限华重楼折干率的变化曲线

Fig. 2 Drying rate changing curve of different cultivation period of *P. polyphylla* var. *chinensis*

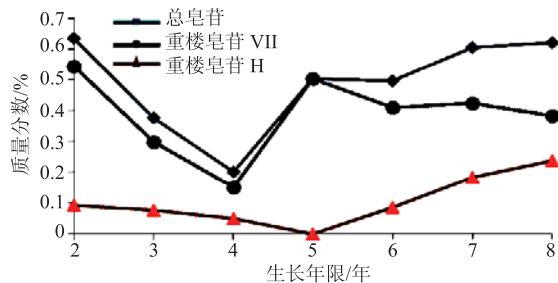


图3 不同生长年限华重楼中重楼皂苷累积曲线

Fig. 3 Accumulation curves of steroid saponins from different cultivation period of *P. polyphylla* var. *chinensis*

即在第2年较高,但第3~4年迅速下降,第4年最低,从第5年开始逐年升高,至第8年达到最高值。华重楼总皂苷主要由重楼皂苷VII和H2种组成,二者随生长年限的动态累积规律各有特点:重楼皂苷VII量呈倒“Z”字型,即第2年较高,随后迅速下降,第4年到最低点,第5年迅速升高,之后逐年缓慢下降但趋于稳定;重楼皂苷H量同总皂苷累积规律相似,在第2年较高,但第3~5年迅速下降,第5年到最低点,从第6年开始迅速升高,至第8年达到最高值。

3.2 不同采收月份华重楼折干率及重楼皂苷量变化特征

由图4可知华重楼折干率随采收月份呈现出典型的波浪式曲线,其中波峰为夏初6月和冬季1月,均高于30%;二者之间为波谷,其中上半年2~3月为谷底,下半年7~8月为谷底,均低于20%。

由图5可知不同采收月份华重楼总皂苷量变化也呈波浪式曲线,其中3月份为第1个波峰,11月份为第2个波峰,均超过1.0%,二者之间为波谷,其中4~8月份量均低于0.5%;重楼皂苷VII、重楼

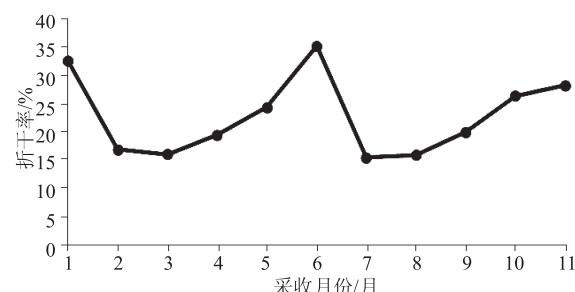


图4 不同采收月份华重楼折干率的变化曲线

Fig. 4 Drying rate curve of *P. polyphylla* var. *chinensis* from different harvesting months

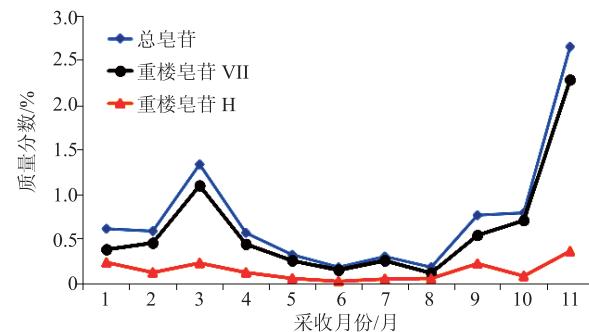


图5 不同采收月份华重楼中重楼皂苷的质量分数变化曲线

Fig. 5 Composition percentage changing curves of steroid saponins from different harvesting months

皂苷 H 的量变化规律同总皂苷变化规律基本一致。

3.3 华重楼根茎不同部位的折干率及重楼皂苷量变化特征

由图 6 可知华重楼根茎尖段部分的折干率最低, 低于 15%以下, 而根茎中段及尾段的折干率都较高且均在 30%附近。

由图 7 和图 8 可知华重楼根茎总皂苷在不同部位的分布差异显著, 尖段部分的量明显高于根茎中段和尾段, 约高出 1 倍。其中, 重楼皂苷 VII 在尖段部分量最高, 约占总皂苷的 93%, 而根茎中段和尾段量迅速降低, 约占总皂苷的 77%~81%; 重楼皂苷 H 的分布趋势却相反, 尖段部分量最低, 约占总皂苷的 6.3%, 根茎中段和尾段显著升高, 根茎中

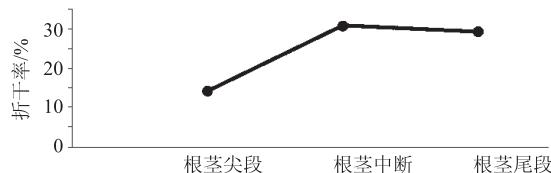


图 6 华重楼根茎不同部位的折干率变化特征

Fig. 6 Drying rate curve of different parts of rhizome

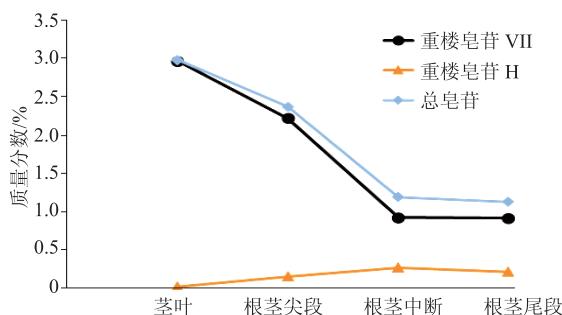


图 7 华重楼不同部位的重楼皂苷质量分数变化特征

Fig. 7 Percentage composition changing curves of *Paris saponins* from different parts of plant

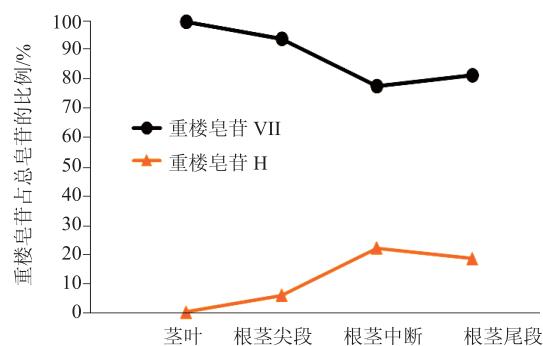


图 8 华重楼不同部位中重楼皂苷 VII、H 量占总皂苷质量分数变化特征

Fig. 8 Changing curves of *Paris saponins* content from different parts of plant as a percentage of total saponins

段量最高, 约占总皂苷的 22.4%。另外, 华重楼上部分(茎叶)的总皂苷量很高, 其中重楼皂苷 VII 占 99%以上。

4 讨论

本实验采用 ELSD 克服了甾体皂苷类成分紫外弱吸收带来的测定不准确、流动相梯度洗脱扰动基线等缺点^[6]。本实验考察了流动相不同色谱条件下的分离效果, 建立了稳定准确的测定方法。

在样品生长年限的选取上, 由于第 1 年苗仅有 1 片心形叶, 尚未进入稳定的营养生长期, 故从第 2 年生植株开始取样; 由于华重楼种植周期一般为 5~8 年, 故取样最长年限为 8 年生植株。产区调查发现, 长江流域产区一般在 9~10 月采摘华重楼成熟果实后采挖药材, 12 月底重楼根茎顶芽已经萌发出土, 不再采挖入药, 所以样品采收月份确定为 1~11 月。

华重楼最佳采挖年限应从根茎生物量、重楼皂苷量等因素综合考虑, 虽然 2 年生的华重楼总皂苷量较高, 但由于第二年重楼根茎生物量才开始积累, 个体细小, 不可入药。产区种植户习惯在 5~8 年后采挖, 根据测定结果, 5 年以上的华重楼总皂苷量达到 0.5%且稳定上升, 但 5 年生药材折干率仅为 12.29%, 表明药材产量较低, 经济效益差。同时, 5~8 年的折干率快速上升, 表明这期间华重楼根茎进入生物量快速累积期, 此间采挖不划算。第 8 年折干率高达 32.56%, 接近 3:1, 同时总皂苷量超过 0.6%, 加上此时鲜质量为历年最高, 应是最佳采收年限。8 年以后虽然各项指标可能进一步上升, 但太长的种植周期加大了种植风险。进一步从采收月份考虑, 折干率较高的是 6 月、11 月及次年 1 月, 总皂苷量较高的是 3、11 月, 综合兼顾果实采收季节, 11 月应是药材最佳采挖月份, 这也符合根茎类药材秋季倒苗后采挖的传统习惯。另外, 在重楼主要依赖野生资源的时代, 由于野生采挖多集中在 4~7 月, 正处在重楼皂苷含量的低谷, 成为导致我国重楼商品药材的合格率低下(约 25%)^[7]的重要原因, 间接说明了发展野生变家种的必要性和紧迫性。

由于根茎尖段部分是华重楼根茎的新生组织, 比中段及尾段有更高的含水量导致了更低的折干率。在低龄根茎中, 根茎尖端部分占有的比例更高, 所以整体含水量高, 较之高龄根茎, 其折干率自然更低。另外, 在不同月份中, 根茎尖端所占比例也不相同, 根据田间观测, 1~3 月是顶芽萌动伸长期,

根茎尖段包含顶芽部分, 导致根茎折干率明显下降; 4~6 月顶芽已发育为茎叶进行光合作用, 根茎顶芽消失而营养物质迅速积累, 使得根茎折干率明显上升; 6~8 月, 次年的新顶芽萌动形成, 与地上茎叶同时存在, 并消耗营养物质, 导致根茎折干率又开始下降; 9~11 月, 新顶芽生长放缓, 而茎叶继续光合作用积累根茎营养物质直到倒苗, 这期间根茎折干率又恢复上升。上述根茎生活史便是图 4 波浪式曲线形成的原因。

由表 5 可知, 华重楼根茎中段和尾段的总皂苷量显著低于根茎尖段, 提示仅采用根茎尾段入药的“半截重楼”会降低商品药材质量。重楼皂苷 VII 在不同部位的分布有显著差异, 根茎尖段的量远高于根茎中段和尾段, 显示重楼皂苷 VII 与新生组织的存在具有密切关系。因此可以解释图 5 中重楼皂苷 VII 的量仅在 3~6 月(顶芽消失期间)明显下降, 而在顶芽存在的其他月份都在上升。有趣的是, 同顶芽类似, 茎叶中重楼皂苷 VII 的量和所占总皂苷比例更高, 由此猜想重楼皂苷 VII 与促进华重楼的生长发育有关, 也提示华重楼茎叶可以作为获取重楼皂苷 VII 的重要资源, 由此提高华重楼资源的利用率, 提升华重楼人工种植的经济效益。重楼皂苷 H 在不同部位的分布也有显著差异, 但和重楼皂苷 VII 的趋势相反, 茎叶和顶芽的量远低于根茎中段和尾段, 说明重楼皂苷 H 不具备促进华重楼

生长发育的作用。另外, 有研究表明, 重楼皂苷 H 是重楼止血生理活性的主要物质基础^[8], 作为华重楼总皂苷的主要成分, 未来应考虑纳入重楼质量控制指标。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Man S L, Gao W Y, Zhang Y J, et al. Antitumor and antimetastatic activities of *Rhizoma Paridis* saponins [J]. *Steroids*, 2009, 74(13/14): 1051-1056.
- [3] 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]. 中药与天然药, 2011, 28(6): 515-519.
- [4] 张烨, 赵倩, 高科江, 等. HPLC 测定不同生长年限滇重楼中薯蓣皂苷元含量 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3280-3281.
- [5] 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, 33(5): 61-66.
- [6] Man S L, Gao W Y, Zhang Y J, et al. Qualitative and quantitative determination of major saponins in *Paris* and *Trillium* by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(29): 2943-2948.
- [7] 尹鸿翔, 张浩, 薛丹, 等. 川滇地区重楼商品药材质量评价 [J]. 中药材, 2007, 30(7): 772-774.
- [8] Wen F Y, Yin H X, Chen C, et al. Chemical characteristics of saponins from *Paris fargesii* var. *brevipetala* and cytotoxic activity of its main ingredient, *paris saponin H* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(4): 627-635.