

基于成分-活性整体相似性的重楼替代资源筛选

张海珠^{1,2}, 赵飞亚¹, 陶爱恩¹, 董洪¹, 李若诗¹, 黎氏文梅¹, 夏从龙^{1,2*}

1. 大理大学药学与化学学院 云南 大理 671000

2. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室 云南 大理 671000

摘要: 目的 考察不同种重楼成分-活性的整体相似性, 建立重楼替代资源筛选的新方法。方法 采用 HPLC 法及镇痛、止血药理学模型比较了重楼属 7 种药用植物中重楼皂苷 I、II、VI、VII 的量及其镇痛、止血的药效, 采用离差标准化法对数据进行标准化, 以《中国药典》2015 年版一部规定的重楼皂苷含量及阿司匹林、云南白药组“镇痛、止血”药效数据作为标准对照, 建立了成分指数和活性指数, 采用 SPSS 20.0 软件对成分指数和活性指数进行主成分分析和聚类分析。结果 重楼属 7 种药用植物主要皂苷类成分的总质量分数为 0.125%~1.649%, 其中长柱重楼最高 (1.649%), 大理重楼最低 (0.125%); 云南重楼镇痛活性最强、小鼠出血停止时间 (BT) 最短、小鼠凝血时间 (CT) 最短; 长柱重楼组小鼠活化部分凝血活酶时间 (APTT) 最短, 黑籽重楼组最长; 南重楼组小鼠凝血酶原时间 (PT) 最短; 大理重楼组小鼠 BT 最长, 多叶重楼组小鼠 CT 和 PT 均最长; 云南重楼、南重楼、黑籽重楼聚为一类, 多叶重楼、长柱重楼、大理重楼、毛重楼聚为一类, 说明南重楼、黑籽重楼与云南重楼的成分-活性整体之间相似度较高, 可考虑作为替代资源使用。结论 通过成分-活性等指标的整体相似性, 评价不同种重楼之间的品质关系, 为濒危植物重楼替代资源的寻找提供了思路和方法。

关键词: 重楼; 替代资源; 整体相似性; 化学计量学; 镇痛活性; 凝血时间

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)18-4366-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.022

A screening method and practice for alternative resources of *Paridis Rhizoma* based on overall similarity of components and activities

ZHANG Hai-zhu^{1,2}, ZHAO Fei-ya¹, TAO Ai-en¹, DONG Hong¹, LI Ruo-shi¹, LI Shi wen-mei¹, XIA Cong-long^{1,2}

1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

2. Yunnan Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R & D, Dali 671000, China

Abstract: Objective To study the overall similarity of composition-activity of different kinds of *Paridis Rhizoma*, and establish a new method for selecting alternative resources. **Methods** The HPLC method was used to detect the content of polyphyllin I, II, VI, and VII, and pharmacological model of analgesic and hemostatic were used to detect the efficacy. The data were standardized using standard deviation method. Using polyphyllin I, II, VI, and VII at minimum 0.6%, aspirin and Yunnan Baiyao Group analgesic and hemostatic efficacy data as standard controls, we also established component and activity indexes. SPSS 20.0 Software was used to analyze the principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) of these seven medicinal plants. **Results** The total content of the main saponins in seven medicinal plants of *Paris* genus ranged from 0.125% to 1.649%, and the maximum content (1.649%) was found in the *P. forrestii* while the minimum content (0.125%) was found in *P. daliensis*. The study also disclosed that *P. polyphylla* var. *yunnanensis* has the most active analgesic activity, and the time of bleeding (BT) in mice and the time of coagulation (CT) in mice were the shortest in *P. polyphylla*. The shortest mice activated partial thrombin time (APTT) was *P. forrestii* and the longest was *P. thibetica*. The shortest prothrombin time (PT) in mice was *P. vietnamensis*. The longest BT in mice was *P. daliensis*. The longest CT and PT in mice was *P. polyphylla*. PCA and HCA results showed that *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, *P. vietnamensis* and *P. thibetica* were in the same class, while *P. pubescens*, *P. daliensis*, *P. polyphylla*, and *P. forrestii* were in another class. It is indicated that the overall similarity of component-activity of *P. vietnamensis*, *P. thibetica*, and *P. polyphylla* var. *yunnanensis* was higher, thus they can be considered as alternative sources. **Conclusion** The quality relations of different kinds of *Paris* genus were evaluated by

收稿日期: 2018-03-01

基金项目: 云南省地方本科高校 (部分) 基础研究联合专项 (2017FH-001-097); 大理大学博士科研启动基金 (KSBY201738)

作者简介: 张海珠, 副教授, 主要从事中药生物活性和质量评价研究。E-mail: 67484645@qq.com

*通信作者 夏从龙, 教授, 主要从事中药资源鉴定及品质评价研究。Tel: (0872)2257417 E-mail: hzningjing@163.com

the overall similarity of the component and activity index, which provides ideas and methods for the search of the replacement resources of the endangered plants.

Key words: *Paridis Rhizoma*; alternative resources; overall similarity; stoichiometry; analgesic activity; time of coagulation

重楼为百合科 (Liliaceae) 重楼属 *Paris* L. 植物的总称, 最早以“蚤休”之名记载于《神农本草经》, 其后历代本草均有记载^[1]。《中国药典》2015 年版收载了云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 和七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara^[2]。现代化学和药理学研究表明重楼属植物化学成分主要为甾体皂苷类化合物, 具有镇痛、止血、抗肿瘤、抗菌作用^[3-5], 目前已应用于我国 80 余种中成药中, 国内相关药厂达 170 多家^[6]。近年来, 由于市场需求量大幅增长, 巨大的需求缺口导致药材价格飞涨, 过度的采挖导致野生重楼资源日益枯竭, 分布于我国境内的野生重楼 80% 已被采挖利用, 剩下的 20% 按目前国内外市场需求测算, 大约可维持 3~7 年, 而人工驯化栽培还存在生长周期长、繁殖率低等技术瓶颈, 严重制约了该产业的良性发展^[7-8]。因此, 寻找新的替代资源已成为当前最为迫切的问题之一。我国重楼属植物有 19 种 18 变种 2 变型^[9], 并且大部分品种在民间均作为药用, 如南重楼在瑶族中可用于治疗溃疡、外伤、痔疮、胃炎^[10-11]; 黑籽重楼在怒族中可用于治疗胃、腹痛, 白带^[12]; 毛重楼在怒族中可用于清热解毒、消肿止痛^[12], 长柱重楼在怒族中用于治疗无名肿痛、蛇虫咬伤^[12]; 狭叶重楼在彝族可用于治疗妇科癌症、消皮肤疔疮癰疽、止外伤瘀肿流血^[13]。这些文献对挖掘重楼新资源, 扩大其药用范围具有一定的参考价值。

“药材好, 药才好”, 药材好的前提是要有“好”的药材评价方法与指标, 药材好的核心含义是临床疗效优^[14-15]。仅以单一方法、单一指标评价药材好坏都存在一定的片面性, 综合多种指标并结合多元统计分析方法从整体上评价其品质, 可避免仅以成分论质量的不足, 实现复杂结果简单化^[16]。鉴于此, 笔者针对重楼属 7 种药用植物的指标成分 (重楼皂苷 I、II、VI、VII) 和镇痛、止血的活性建立一种基于成分-活性整体相似性的重楼替代资源筛选方法, 评价不同种重楼属植物之间的品质关系, 为寻找濒危植物重楼的替代资源提供思路和方法。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF 级健康昆明种小鼠, 体质量 18~22 g, 雌

雄各半, 昆明医科大学动物实验中心提供, 合格证号 SCXK (滇) K2015-0002。

1.2 药材与试剂

样品采集于云南省文山壮族苗族自治州和大理白族自治州, 经大理大学药学与化学学院生药教研室夏从龙教授鉴定为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.、南重楼 *P. vietnamensis* (Takht.) H. Li、毛重楼 *P. pubescens* (Hand. -Mzt.) Wang et Tang、大理重楼 *P. daliensis* H. Li et V. G. Soukup、黑籽重楼 *P. thibetica* Franch.、多叶重楼 *P. polyphylla* Smith、长柱重楼 *P. forrestii* (Takht.) H. Li, 样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	种名	采集地点
S1	云南重楼	大理洱源县杨家登丰乐村
S2	南重楼	文山壮族苗族自治州
S3	毛重楼	大理喜洲花甸坝
S4	大理重楼	大理云龙县漕涧松坡脚新寨
S5	黑籽重楼	大理云龙县漕涧松坡脚新寨
S6	多叶重楼	大理漾濞平坡
S7	长柱重楼	大理云龙县漕涧松坡脚新寨

云南白药 (批号 20161102) 云南白药集团股份有限公司; 阿司匹林肠溶片 (批号 160407), 沈阳奥吉娜药业有限公司; 肝素钠注射液 (批号 51508115), 江苏万邦生化医药股份有限公司; 华法林钠片 (批号 18151108), 上海信谊九福药业有限公司; 凝血酶原时间 (PT) 测试盒、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 测试盒, 南京建成生物工程研究所; 对照品重楼皂苷 I (批号 GZDD-0605, 质量分数 98.22%)、重楼皂苷 II (批号 GZDD-0606, 质量分数 98.22%)、重楼皂苷 VI (批号 GZDD-0608, 质量分数 97.31%)、重楼皂苷 VII (批号 GZDD-0609, 质量分数 98.55%), 贵州迪大生物科技有限责任公司; 甲醇、乙腈, 美国 Fisher 公司; 其余试剂为分析纯。

1.3 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent Technologies 公司, 配有自动进样器, 光电二极管阵列检测器; SB25-120 型超声仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 4 种重楼皂苷的定量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 25 °C; 检测波长为 203 nm; 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱程序: 0~14 min, 30%~40% A; 14~40 min, 40% A; 40~70 min, 40%~60% A; 体积流量为 0.9 mL/min, 进样量 5 μL, 理论塔板数按重楼皂苷 VII 峰计算不低于 10 000。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取重楼皂苷 I、II、VI、VII 4 种对照品适量, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 用色谱级甲醇配制质量浓度分别为 0.64、0.46、0.26、0.23 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称定 S1 样品粉末 (过 40 目筛) 0.5 g, 置试管中, 加甲醇 5 mL, 浸泡过夜后, 初始温度 40 °C 超声 (500 W, 40 kHz) 20 min, 滤过, 取滤液, 重复 3 次。合并滤液, 置 10 mL 量瓶中定容, 滤过, 备用。

2.1.4 检测限、定量限及线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归。用已知质量浓度的对照品溶液不断稀释, 直至得出能被可靠地检测和定量检测的最低质量浓度, 作为检出限和定量限。结果见表 2。

2.1.5 精密度实验 精密吸取“2.1.2”项下对照品

表 2 检测限、定量限和线性关系考察结果

Table 2 Results of limit of detection, limit of quantification, and linearity

成分	线性方程	r^2	线性范围/μg	检出限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
重楼皂苷 I	$Y=366.4X+3.07$	0.999 9	0.64~12.8	1.28	4.26
重楼皂苷 II	$Y=377.6X+2.42$	0.999 4	0.46~9.2	1.84	6.13
重楼皂苷 VI	$Y=340.3X+1.63$	0.999 9	0.26~5.2	1.04	3.46
重楼皂苷 VII	$Y=340.2X+0.37$	0.999 9	0.23~4.6	3.68	12.27

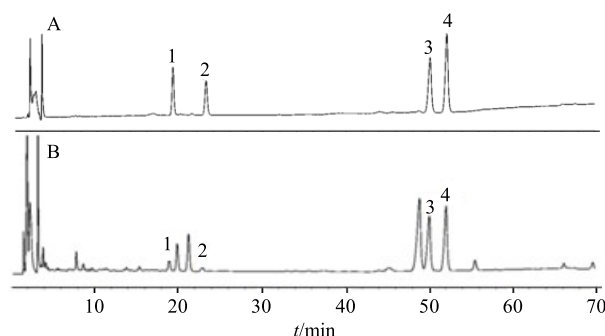
溶液, 连续进样 5 次, 重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的 RSD 分别为 2.38%、2.06%、2.17%、2.10%, 表明该方法精密度良好。

2.1.6 稳定性实验 取“2.1.3”项下供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定峰面积。重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的 RSD 分别为 2.02%、2.71%、2.72%、2.98%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性实验 取 S1 样品粉末 5 份, 按“2.1.3”项下制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定。重楼皂苷 I、II、VI、VII 质量分数的 RSD 分别为 0.54%、2.15%、1.91%、2.78%, 结果表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率实验 精密称定已知质量分数的 S1 样品粉末 5 份, 添加各重楼皂苷对照品适量, 按“2.1.3”项下制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测得重楼皂苷 I、II、VI、VII 的平均回收率分别为 101.04%、101.73%、98.69%、101.17%, RSD 分别为 1.33%、2.34%、1.64%、2.17%。

2.1.9 样品定量测定 吸取供试品溶液和混合对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定各色谱峰的峰面积, 利用标准曲线法计算重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量, 色谱图见图 1, 结果见表 3。



1-重楼皂苷 VI 2-重楼皂苷 VII 3-重楼皂苷 II 4-重楼皂苷 I
1-polyphyllin VI 2-polyphyllin VII 3-polyphyllin II 4-polyphyllin I

图 1 混合对照品溶液 (A) 及供试品溶液 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of reference substance (A) and sample solution (B)

2.2 镇痛、止血活性研究

2.2.1 重楼活性部位的制备 称取南重楼、云南重楼、大理重楼、毛重楼、多叶重楼、黑籽重楼、长柱重楼粗粉各 1 kg, 用甲醇超声提取 3 次, 合并滤液进行浓缩, 冷冻干燥, 得到药物干燥粉末, 密封保存, 备用。

2.2.2 分组 取健康昆明种小鼠, SPF 级, 体质量 18~22 g, 按体质量随机分组, 每组 10 只。醋酸致

表 3 重楼属 7 种药用植物的主要皂苷类成分的质量分数

Table 3 Contents of main ingredient saponins in seven kinds of medicinal plants of *Paris* genus

物种	质量分数/%				质量分数 总和/%
	重楼皂苷 I	重楼皂苷 II	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 VII	
云南重楼	0.125	0.031	0.021	0.084	0.261
南重楼	0.164	1.227	0.037	0.029	1.457
毛重楼	0.042	—	0.021	0.112	0.175
大理重楼	—	0.034	0.084	0.007	0.125
黑籽重楼	0.062	—	0.029	0.215	0.306
多叶重楼	0.766	0.023	0.048	0.065	0.902
长柱重楼	0.668	0.888	0.028	0.065	1.649

—表示未检出

—Representing not detected

小鼠疼痛反应实验分为模型组、阿司匹林组（20 mg/kg）、7 种重楼组（2 g/kg）；小鼠出血时间（BT）、凝血时间（CT）反应实验分为对照组、云南白药组（0.667 g/kg）、7 种重楼组（2 g/kg）；部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）反应实验分为对照组、模型组、云南白药组（0.667 g/kg）、7 种重楼组（2 g/kg）。根据《中药药理研究方法学》中急性毒性实验方法，依据半数致死浓度（LD₅₀）确定重楼属 7 种样品的给药剂量为 2 g/kg，约为 0.5 倍临床等效剂量。

2.2.3 统计学方法 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 11.5 统计分析软件，组间比较采用 *t* 检验。

2.2.4 重楼活性部位对醋酸致小鼠疼痛的影响^[17] 各组小鼠分别 ig 给予相应药物，模型组小鼠给予同体积的生理盐水，给药体积为 0.02 mL/g。末次给药 30 min 后小鼠 ip 0.6% 醋酸溶液 0.02 mL/g，引起深部的大面积而较久的疼痛刺激，致使其产生扭体反应（腹部收缩成“S”形，躯干与后腿伸张、臀部高起及爬行等），观察并记录注射醋酸后 20 min 内小鼠扭体反应，以出现扭体的次数为痛反应指标，判断重楼镇痛作用的效果，结果见表 4。

2.2.5 重楼活性部位对小鼠 BT 的影响 各组小鼠分别 ig 给予相应药物，对照组给予同体积的生理盐水，给药体积为 0.02 mL/g，每天 1 次，连续 7 d。末次给药前小鼠禁食不禁水 12 h，末次给药 1 h 后，用剪刀在小鼠尾尖部约 5 mm 处快速剪断尾部，并立即用秒表计时，刚开始时每 30 秒用滤纸吸取流出的血液，1 min 后，每 10 秒吸取 1 次，直至出血停止时间即为小鼠 BT。结果见表 5。

2.2.6 重楼活性部位对小鼠 CT 的影响 各组小鼠分别 ig 给予相应药物，对照组给予同体积的生理盐水，给药体积为 0.02 mL/g，每天 1 次，连续 7 d。末

表 4 重楼活性部位对醋酸致小鼠扭体反应的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 10$ ）

Table 4 Effects of active part of *P. polyphylla* on torsion reaction of mice induced by acetic acid ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	小鼠扭体次数
模型	—	40.60 ± 6.40
阿司匹林	0.02	17.80 ± 7.24**
云南重楼	2.00	19.10 ± 3.82**
南重楼	2.00	21.90 ± 6.42**
毛重楼	2.00	31.90 ± 7.40* ^{○○△△}
大理重楼	2.00	22.70 ± 3.20** [△]
黑籽重楼	2.00	29.70 ± 6.75** ^{○○△△}
多叶重楼	2.00	31.10 ± 5.28** ^{○○△△}
长柱重楼	2.00	20.10 ± 5.00**

与模型组比较：**P* < 0.05 ***P* < 0.01；与阿司匹林组比较：^{○○}*P* < 0.01；

与云南重楼组比较：[△]*P* < 0.05 ^{△△}*P* < 0.01

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs model group；^{○○}*P* < 0.01 vs aspirin group；[△]*P* < 0.05 ^{△△}*P* < 0.01 vs *P. polyphylla* var. *yunnanensis* group

次给药前小鼠禁食不禁水 12 h，末次给药 1 h 后，用毛细管插入小鼠眼球内眦后静脉丛取血，血液充满毛细管时开始计时，取满后平放在桌面上，每 30 秒折断毛细管的两端约 0.5 cm 并慢慢拉伸，观察有无血丝出现，出现血丝时的时间即为小鼠 CT。结果见表 5。

2.2.7 重楼活性部位对小鼠 APTT 的影响^[18] 各组小鼠前 2 d 分别 ig 给予同体积的生理盐水，第 3 天分别尾 iv 肝素钠（70 U/kg），15 min 后分别 ig 给予相应药物，模型组给予同体积生理盐水，给药体积均为 0.02 mL/g，每日给药 1 次，给药 3 d。末次给药 1 h 后，小鼠眼球取血，3.8% 枸橼酸钠 1 : 9 抗凝，3 000 r/min 离心 10 min，取上层清液，测定 APTT 时间。结果见表 5。

2.2.8 重楼活性部位对小鼠 PT 的影响 各组小鼠

表 5 重楼活性部位对小鼠 BT、CT、APTT、PT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Effects of active part of *P. polyphylla* on BT, CT, APTT, and PT of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	止血活性指标			
		BT/s	CT/s	APTT/s	PT/s
对照	—	501.50 ± 14.47	323.0 ± 11.91	41.50 ± 9.47	20.80 ± 3.43
模型	—	—	—	75.30 ± 13.57**	50.40 ± 10.30**
云南白药	0.667	138.60 ± 6.25**	147.10 ± 7.91**	55.70 ± 6.85**	29.10 ± 10.15*
云南重楼	2.000	61.10 ± 8.57*** [△]	93.80 ± 10.65*** [△]	57.80 ± 9.55*** [●]	27.90 ± 10.86*** ^{●●}
南重楼	2.000	145.80 ± 16.04*** ^{△△}	118.00 ± 5.25*** ^{△△}	70.30 ± 13.48*** ^{△△}	27.70 ± 8.56*** ^{●●}
毛重楼	2.000	206.40 ± 7.70*** ^{△△}	115.80 ± 10.50*** ^{△△}	53.60 ± 9.98*** ^{●●}	37.20 ± 7.55*** ^{●●△}
大理重楼	2.000	215.50 ± 10.48*** ^{△△}	129.60 ± 7.74*** ^{△△}	56.00 ± 11.56*** ^{●●}	36.60 ± 8.80*** ^{●●}
黑籽重楼	2.000	146.20 ± 18.00*** ^{△△}	158.00 ± 12.26*** ^{△△}	70.40 ± 15.25*** ^{△△}	31.00 ± 8.68*** ^{●●}
多叶重楼	2.000	168.30 ± 12.42*** ^{△△}	203.80 ± 10.09*** ^{△△}	58.60 ± 12.32*** ^{●●}	43.60 ± 14.19*** ^{△△}
长柱重楼	2.000	85.60 ± 10.75*** ^{△△}	167.00 ± 8.44*** ^{△△}	50.10 ± 6.93*** ^{●●△}	39.50 ± 5.91*** ^{△△}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ● $P < 0.05$ ●● $P < 0.01$; 与云南白药组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$; 与云南重楼组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ● $P < 0.05$ ●● $P < 0.01$ vs model group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs Yunnan Baiyao group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs *P. polyphylla* var. *yunnanensis* group

前 3 d 分别 ig 给予华法林 (5.2 mg/kg) 和相应药物, 对照组给予等量的生理盐水, 模型组给予华法林和等量的生理盐水, 给药体积为 0.02 mL/g。第 3 天于末次给药 1 h 后, 小鼠眼球取血, 3.8% 枸橼酸钠 1 : 9 抗凝, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层清液, 测定 PT。结果见表 5。

2.3 成分-活性数据标准化

重楼属 7 种药用植物的含量测定数据与药效数据之间的量纲单位、数量级不同, 因此不能进行直接分析、比较, 须对各指标的数值进行无量纲化处理, 以解决数据指标之间的可比性问题^[19]。目前数据标准化方法有对数标准化、反正切标准化、偏差标准化等^[20], 本研究采用离差标准化法^[19]对表中化学和药理活性的原始数据进行标准化, 以《中国药典》2015 年版一部规定重楼皂苷 I、II、VI、VII 的

总和最低限量为 0.6% 以及阿司匹林、云南白药组镇痛、止血药效数据作为标准对照, 利用公式对样品和标准对照原始数据进行标准化处理, 建立成分指数和活性指数。

$$\text{成分指数} = (V_{\text{原/标}} - V_{\text{min}}) / (V_{\text{max}} - V_{\text{min}})$$

$$\text{活性指数} = (V_{\text{模/对}} - V_{\text{原/阿司匹林/云南白药}}) / V_{\text{模/对}}$$

$V_{\text{原/标}}$ 为样品中各成分的质量分数总和或《中国药典》最低要求的含量; V_{max} 为样品中各成分质量分数总和的最大值; V_{min} 为样品中各成分质量分数总和的最小值; $V_{\text{模/对}}$ 为测得镇痛、APTT、PT 药效的模型组活性或 BT、CT 对照组的活性; $V_{\text{原/阿司匹林/云南白药}}$ 为测得样品、阿司匹林组或云南白药组的活性

经数据处理后, 成分、活性数值均在 [0, 1] 内, 各指标均处于同一数量级, 可进行综合对比评价, 结果见表 6。

表 6 重楼属 7 种药用植物重楼皂苷成分含量-活性数据离差标准化变换

Table 6 Polysaccharide saponins content-pharmacodynamic data logarithmic standardization transformation of seven kinds of medicinal plants of *Paris* genus

物种	成分指数	镇痛活性指数	止血活性指数			
			BT	CT	APTT	PT
云南重楼	0.089 2	0.529 6	0.878 2	0.709 6	0.232 4	0.446 4
南重楼	0.874 0	0.460 6	0.709 3	0.634 7	0.066 4	0.450 4
毛重楼	0.032 8	0.214 3	0.588 4	0.641 5	0.288 2	0.261 9
大理重楼	0.000 0	0.440 9	0.570 3	0.598 8	0.256 3	0.273 8
黑籽重楼	0.118 8	0.268 5	0.708 5	0.510 8	0.065 1	0.384 9
多叶重楼	0.509 8	0.234 0	0.664 4	0.369 0	0.221 8	0.134 9
长柱重楼	1.000 0	0.504 9	0.829 3	0.483 0	0.334 7	0.216 3
标准对照	0.311 7	0.561 6	0.723 6	0.544 6	0.260 3	0.422 6

2.4 基于成分-活性整体相似性的化学计量学分析

主成分分析 (principal components analysis, PCA) 是一种多元多维数据挖掘技术, 通过一定相关性多维数据的降维处理, 以较少的不相关的新变量来代替原有的多个变量, 尽可能多地反映原来变量的信息^[21]。分层聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 属于另一类基于定量分类学的数据挖掘技术, 通过衡量不同数值变量间的相似性, 将不同分组变量降维处理分类, 同类对象具有很大的相似性、不同类对象有很大的相异性。通过 PCA、HCA 对重楼属 7 种药用植物的成分指数与镇痛、止血活性指数进行分析, 发现其整体相似性, 评价不同种重楼之间的品质关系。

2.4.1 基于成分-活性的 PCA 采用 SPSS 20.0 软件, 对重楼属 7 种药用植物的成分-活性进行 PCA, 提取出主成分对应特征值大于 1 的 3 个主成分。第 1、2、3 主成分的方差贡献率分别为 39.59%、28.70%、19.10%, 累积贡献率达 87.39%, 能较好地显示样品之间的相互关系。表 7 为各数据变量与主成分的相关性, 代表各数据变量的影响程度。镇痛活性、止血活性 (BT、CT、PT) 对主成分 1 (PC1) 的载荷较大; 指标成分含量对主成分 2 (PC2) 的载荷较大, 并发现对其贡献率最大的活性指标为镇痛、BT、APTT; 另外, 还发现镇痛、止血活性的影响程度大于指标成分含量的影响, 表明药效学-指标成分综合评价该属 7 种药用植物的质量比单一采用化学评价手段具有更强的可靠性和可行性。从图 2 中可以看出云南重楼、南重楼、黑籽重楼与标准对照较为接近, 多叶重楼、长柱重楼为一类, 大理重楼、毛重楼为一类。说明南重楼、黑籽重楼可考虑作为重楼的替代资源使用。

2.4.2 基于成分-活性的 HCA 采用 SPSS 20.0 数据

表 7 重楼属 7 种药用植物离差标准化变换 PCA 载荷数据
Table Standard deviation transform standardized PCA loading data of seven kinds of medicinal plants of *Paris* genus

相关指数	PC1	PC2	PC3
成分指数	0.068	0.806	-0.430
镇痛活性指数	0.779	0.421	0.264
BT	0.642	0.573	-0.054
CT	0.696	-0.491	0.343
APTT	-0.235	0.423	0.867
PT	0.897	-0.344	-0.197

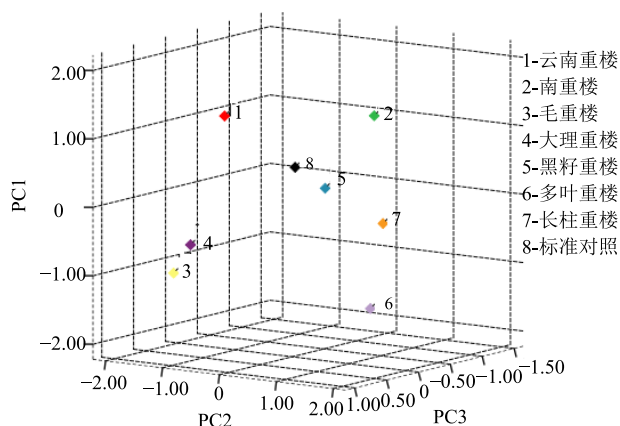


图 2 重楼属 7 种药用植物化学-活性标准化变换数据 PCA 得分图

Fig. 2 Normalized conversion index of drug index PCA score chart of seven kinds of medicinal plants of *Paris* genus

统计学分析软件, 对重楼属 7 种药用植物的成分-活性进行 HCA, 应用 wards 方法, 生成 dendrogram 分层聚类谱系图, 见图 3。由图 3 可知, HCA 可将 7 种重楼属植物分成 2 大类, 云南重楼、南重楼、黑籽重楼与标准对照为 1 类, 多叶重楼、长柱重楼、大理重楼、毛重楼为 1 类。从 HCA 结果中可以看出, 云南重楼与标准对照组距离较近, 品质最优。而黑籽重楼、南重楼与云南重楼的距离相对较近, 说明其成分-活性整体之间相似度较高, 与 PCA 结果能较好吻合, 可以考虑作为替代资源进行研究开发。

3 讨论

3.1 提取条件的考察^[22-23]

本实验分别选取了甲醇、乙醇作为提取溶剂, 鉴于甲醇提取效率较高, 色谱峰较多, 故选择甲醇

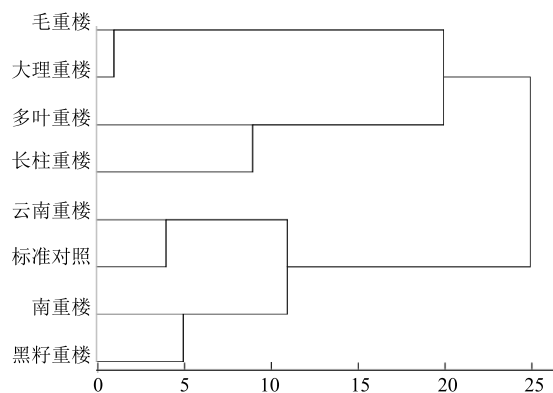


图 3 重楼属 7 种药用植物的成分-活性标准化变换数据分层聚类谱系

Fig. 3 Stratified cluster system of normalized transformation data of drug index of seven kinds of medicinal plants of *Paris* genus

作为提取溶剂。按 $L_9(3^4)$ 正交试验分别考察单次提取时间 (10、20、30 min)、溶剂单次料液比 (1:5、1:10、1:15)、单次提取温度 (30、40、50 °C) 提取次数 (1、2、3 次), 最终确定最佳提取方法为单次料液比为 1:10, 单次提取时间为 20 min, 单次提取温度为 40 °C, 提取次数为 3 次。

3.2 色谱条件、色谱柱与样品给药浓度的考察

以分离度、峰数、峰形、基线稳定为指标, 考察了体积流量 (0.8、0.9、1.0 mL/min), 波长以《中国药典》为基础, 设置 ± 5 nm 进行全波长扫描, 流动相构成比 (乙腈-水、甲醇-水)、梯度洗脱比例, 经过反复多次试验, 选择了“2.1.1”项下实验条件。同时还对 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 进行比较, 在本实验的色谱条件下, 以 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 的分离效果最好, 柱效最高。

3.3 指标成分和活性数据分析

重楼属 7 种药用植物指标成分的总质量分数在 0.125%~1.649%, 不同品种间质量分数差异较大, 长柱重楼最高为 1.649%, 南重楼次之为 1.457%, 而大理重楼最低为 0.125%, 对于含量的差异可能由各采集地生态环境 (海拔、温度、湿度、光照、气候、土壤等) 及种植条件的不同所致^[8,24-25]。7 种重楼属植物的镇痛活性以云南重楼最强, 其次为长柱重楼, 毛重楼最弱。止血活性中对 BT 指标的作用效果以云南重楼最强, 长柱重楼次之, 以大理重楼最弱; 而对 CT 指标的作用效果以云南重楼最好, 以多叶重楼效果最差; 对 APTT 指标的作用效果以长柱重楼最好, 以黑籽重楼最差; 对 PT 指标的作用效果以南重楼最好, 以多叶重楼最差。可见, 不同种重楼属植物除药典规定的成分含量存在差异外, 活性指标也存在显著的差异。其镇痛、止血活性除与指标成分有关外, 可能还与其他成分有关, 还需深入研究。

3.4 指标成分和活性的标准化

中药成分众多、药效多样, 其质量评价与西药相比困难得多。为了避免单一方法、单一指标评价的片面性, 本研究采用成分含量、镇痛活性、止血活性等多种指标对重楼属植物进行综合评价, 以期从化学、活性等多角度为寻找重楼可替代资源提供依据。为了解决不同指标之间的可比性问题, 本实

验采用离差标准化法对原始数据进行了标准化, 并以《中国药典》2015 年版一部规定重楼皂苷 I、II、VI、VII 的总和最低含量及阿司匹林、云南白药组镇痛、止血药效数据作为标准对照, 建立了成分指数和活性指数, 实现了成分-活性数据的标准化。

3.5 不同种重楼属植物之间成分-活性的整体相似性分析

由于指标较多, 很难说明各指标的重要性差异和不同种重楼药材之间成分-活性的整体相似性, 通过建立成分指数和活性指数结合多元统计分析, 挖掘出较少的互不相关的新变量来代替原有的多个变量, 尽可能多地反映原来变量的信息, 从而进行多指标整体相似性分析, 为重楼属 7 种药用植物的质量评价提供可靠的方法。

4 小结

重楼药用价值巨大, 长期的过度采挖导致资源已濒临枯竭, 寻找新的替代资源已成为当前最为迫切的问题之一。本研究提出一种基于成分-活性整体相似性的重楼替代资源筛选方法, 比较了云南重楼、南重楼、毛重楼、大理重楼、黑籽重楼、多叶重楼和长柱重楼等重楼属 7 种药用植物中主要成分的含量及主要的药效, 采用离差标准化法对成分和活性的原始数据进行了标准化, 以《中国药典》2015 年版一部规定重楼皂苷 I、II、VI、VII 的总和最低限量 0.6% 及阿司匹林、云南白药组“镇痛、止血”药效数据作为标准对照, 建立了成分指数和活性指数, 进一步对重楼属 7 种药用植物的成分-活性进行了 PCA 和聚类分析。发现南重楼、黑籽重楼与云南重楼的成分-活性整体之间相似度较高, 可考虑作为替代资源使用。本研究通过成分-活性等指标的整体相似性, 来评价不同种重楼之间的品质关系, 为濒危植物重楼替代资源的寻找提供了思路和方法。

参考文献

- [1] 蒋露, 康利平, 刘大会, 等. 历代本草重楼基原考 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3469-3473.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 王跃虎, 牛红梅, 张兆云, 等. 重楼属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.
- [4] 杨远贵, 张霁, 张金渝, 等. 重楼属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3301-3323.
- [5] 陈雪梅, 杨焕芝, 施敏, 等. 长柱重楼总皂苷的抗肿瘤活性及急性毒性作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017,

- 40(7): 904-910.
- [6] 张万超, 罗敏, 章文伟, 等. 药用植物重楼栽培和种子处理技术专利信息分析 [J]. 中国药房, 2016, 27(7): 1002-1004.
- [7] 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.
- [8] 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, (S1): 317-320.
- [9] 李恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [10] Yunheng J I, Fritsch P W, Heng L I, *et al.* Phylogeny and classification of *Paris* (Melanthiaceae) inferred from DNA sequence data [J]. *Annal Bot*, 2006, doi: 10.1093/aob/mcl095.
- [11] Long C L, Li R. Ethnobotanical studies on medicinal plants used by the red-headed yao people in Jinping, Yunnan Province, China [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 90(2): 389-395.
- [12] 刀志灵, 龙春林, 刘怡涛. 云南高黎贡山怒族对植物传统利用的初步研究 [J]. 生物多样性, 2003, 11(3): 231-239.
- [13] 尹鸿翔, 文飞燕, 张浩. 彝药“麻补”止血活性物质基础及机理研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(1): 177-180.
- [14] 张海珠, 肖小河, 王伽伯, 等. 中药质量评控的第一要义: 效应当量一致性 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1571-1575.
- [15] 张海珠, 谭鹏, 刘振杰, 等. 基于活血生物效价和化学指纹图谱的大黄品质评价研究 [J]. 药学学报, 2017, 52(3): 436-442.
- [16] 肖小河, 王伽伯, 鄢丹, 等. “道地综合指数”的构建及其应用价值 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1513-1516.
- [17] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [18] 陈泣. 大蓟炭止血药效物质基础及止血增效作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [19] 赖先荣, 周邦华, 杜明胜, 等. 6种黄连饮片中6种生物碱的RP-HPLC含量测定及与“治消渴”药效学的谱-效关系分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4579-4586.
- [20] 代晓琳, 马学强, 王甜甜. 改进的主成分分析法对拟南芥基因的分析 [J]. 微型机与应用, 2015, 34(14): 51-53.
- [21] 赵磊, 李继海, 朱大洲, 等. 5种鹿茸营养成分的主成分分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(9): 2571-2575.
- [22] 袁会琼, 刘江, 柳波, 等. “一测多评法”测定不同种重楼植物中的4种重楼皂苷含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(16): 1612-1616.
- [23] 刘江, 段志刚, 段宝忠, 等. 南重楼中4种重楼皂苷超声提取工艺 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(7): 158-160.
- [24] 赵庭周, 王卜琼, 马青, 等. 云南重楼采收期研究 [J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(5): 61-63.
- [25] 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): 771-774.