

毛重楼药材的质量标准研究^Δ

袁会琼*,刘 江,夏从龙[#](大理大学药学与化学学院,云南 大理 671000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-2985-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.29

摘要 目的:建立毛重楼药材的质量标准。方法:从原植物形态、性状特征、显微特征(横切面、粉末)对毛重楼药材进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定药材中重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量;色谱柱为 Agilent C₁₈,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为 0.9 mL/min,检测波长为 203 nm,柱温为 25 ℃,进样量为 5 μL;采用紫外分光光度法测定药材中重楼总皂苷的含量。结果:毛重楼根状茎呈结节状扁圆柱形,略弯曲。横切面木质部导管较大,韧皮部细胞小,粉末有大量淀粉粒,多为单粒。重楼皂苷 I、II、VI、VII 和重楼总皂苷检测进样量线性范围分别为 0.64~12.8、0.46~9.2、0.26~5.2、0.23~4.6、20.5~143.5 μg(*r* 分别为 0.999 9、0.999 9、0.999 9、0.999 9、0.999 7);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<3.0%;加样回收率分别为 96.38%~105.24%(RSD=3.01%,*n*=6)、97.24%~102.57%(RSD=2.50%,*n*=6)、97.19%~101.74%(RSD=1.52%,*n*=6)、93.72%~104.00%(RSD=3.53%,*n*=6)、98.11%~104.50%(RSD=2.57%,*n*=6)。结论:该研究所建标准可用于毛重楼药材的质量控制。

关键词 毛重楼;药材鉴定;含量分析;重楼皂苷;高效液相色谱法

Study on Quality Standard of *Paris pubescens*

YUAN Huiqiong, LIU Jiang, XIA Conglong (College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Yunnan Dali 671000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of *Paris pubescens*. METHODS: Qualitative identification of medicinal material was conducted from original plant morphology, properties and microscopic characteristics (cross section, powder). The contents of parissaponin I, II, VI, VII were determined by HPLC. The determination was performed on Agilent C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 0.9 mL/min. The detection wavelength was set at 203 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 5 μL. The content of total saponins in *P. pubescens* was determined by UV spectrophotometry. RESULTS: The rhizome of *P. pubescens* was nodular flat cylindrical in shape, slightly curved, tiny odor, bitter in taste. The large vessels were found in transverse xylem; phloem cells were small; powder had a large number of starch grains, mostly single grain. The linear ranges of parissaponin I, II, VI, VII and total saponins were 0.64-12.8, 0.46-9.2, 0.26-5.2, 0.23-4.6, 20.5-143.5 μg(*r* were 0.999 9, 0.999 9, 0.999 9, 0.999 9, 0.999 7), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3.0%. The recoveries were 96.38%-105.24% (RSD=3.01%, *n*=6), 97.24%-102.57% (RSD=2.50%, *n*=6), 97.19%-101.74% (RSD=1.52%, *n*=6), 93.72%-104.00% (RSD=3.53%, *n*=6), 98.11%-104.50% (RSD=2.57%, *n*=6). CONCLUSIONS: Established standard can be used for quality evaluation of *P. pubescens*.

KEYWORDS *Paris pubescens*; Drug identification; Content analysis; Parissaponin; HPLC

毛重楼为百合科重楼属植物毛重楼 *Paris mairei* Levl 的干燥根茎,又名慢勃勃(四川彝族语)、重楼、百草药(云南)、猴络臂莲(四川),分布于云南西北部至东北部;生于海拔 1 800~3 500 m 的常绿阔叶林、针阔叶林、云南松林、黄栌林下等^[1]。重楼属植物具有极高的药用价值,其根茎大都含多种甾体皂苷,具有止血、镇痛、收缩子宫和抗肿瘤等活性,临床上常用于治疗子宫出血、泌尿系统感染、外科炎症、肿瘤等疾病^[2-7]。毛重楼药材

根茎味苦、辛,性寒;能清热解毒、平喘止咳、消肿散瘀,常用于治疗疔疮痈肿、咽喉肿痛、咳嗽、蛇虫咬伤、跌扑伤痛等病症^[8-10]。2015 年版《中国药典》(一部)收载重楼为云南重楼 *P. polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 和七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) 的干燥根茎^[11]。由于重楼传统药用部位根茎的自然生长速度十分缓慢(从种子生长为药用药材,一般需 10~15 年),重楼药材长期依赖野生资源,加之主产区乱采滥挖,忽视对资源的保护和繁育,导致重楼资源匮乏,供需矛盾日益突出^[12]。为缓解重楼资源紧缺状况,寻求合适的重楼替代基源植物,扩大重楼属药用植物资源,因此有必要对同属植物毛重楼进行研究。根据文献,现阶段国内对毛重楼的研究主要集中于化学成分分离及其抗肿瘤活性研究等方面^[9-10, 13]。基于

Δ 基金项目:云南省应用基础研究计划项目(No.2013FB059)
* 硕士研究生。研究方向:药用植物的种植资源与品质评价。
E-mail: 1403561641@qq.com
通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:天然药物资源调查与品质评价。E-mail: Long7484@126.com

以上原因,本试验采用传统的鉴别方法与现代科学技术手段相结合,对毛重楼原植物形态、性状和显微特征进行了描述,建立其药材鉴定和有效成分含量测定的方法,以期合理利用重楼属药用植物资源提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

TH-12H型生物组织自动脱水机(上海龙拓仪器设备有限公司);BM-VI型生物组织冷冻包埋机(北京佳源兴业科技有限公司);QP-III型生物组织切片机(孝感泰维科技有限公司);E-400型显微镜(日本Nikon公司);SB25-12D型超声波清洗机(宁波新芝生物科技有限公司,功率:500 W,频率:60 kHz);1290型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司);T6型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 试剂

重楼皂苷 I、II、VI、VII对照品(贵州迪大生物科技有限公司,批号分别为GZDD-0605、GZDD-0606、GZDD-0608、GZDD-0609,纯度均≥98%);薯蓣皂苷元对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111539-200001,纯度:>98%);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

毛重楼药材采自大理白族自治州各县市(大理云龙、大理喜洲、大理漾濞,编号分别为MY140801、MX140803、MY140805),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为真品。

2 方法与结果

2.1 原植物形态

毛重楼原植物形态为茎高11~65 cm的多年生草本,紫色或绿色,光滑,粗糙或密被短毛。叶5~12枚,腹面绿色,背面淡绿色,呈倒披针形,倒卵形至倒卵状披针形,有糠秕状短毛呈密或稍疏状分布。花梗长2.5~18.5 cm,花基数4~5,萼片绿色、无毛,或与叶片一样被毛,呈披针形、卵状披针形;花冠比萼片长,呈黄绿色丝状;雄蕊2轮,锐尖,花丝比花药短;子房1室,绿色或变紫色,具紫色的棱,侧膜胎座4~5;花柱基紫色,角盘状,花柱紫色,柱头与胎座同数,花时直立,果时外卷。果实呈紫色,近球形,果实有棱,上端开裂,种子近球形,有红色多汁的外种皮^[14-15],详见图1。

2.2 性状鉴别

毛重楼药材根状茎呈结节状扁圆柱形,略弯曲,长5~10 cm,直径1~1.5 cm。表面为棕色或棕褐色,密具明显的粗环纹,环纹呈层状突起;结节明显,错落且无规律,结节上有凹陷的须根及茎痕。顶端具鳞叶和茎的残基。质地坚实,断面较平坦,为白色或浅棕色,粉质,气微,味微苦,详见图2。

2.3 显微特征



图1 原植物形态

Fig 1 Original plant morphology



图2 性状特征

Fig 2 Property characteristics

2.3.1 横切面 横切面可见表皮细胞1列,细胞类方形或类长方形,排列紧密、整齐,外壁多平直。皮层宽广,皮层细胞多数呈类圆形,少数呈规则形,细胞内分布大量淀粉粒;皮层薄壁细胞可见草酸钙针晶束;内皮层细胞较小,排列紧密,断续呈环状排列。中柱内有约10~14个周木型维管束,为不规则型或椭圆形,呈环状分布,排列相对紧密。木质部导管较大,呈断续或连续环列于韧皮部的四周,韧皮部细胞小,排列紧密,详见图3。

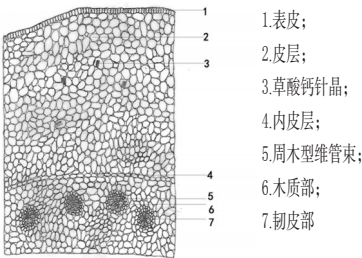


图3 横切面显微特征

Fig 3 Microscopic characteristics of cross section

2.3.2 粉末 粉末为浅灰白色,有大量的淀粉粒,多为单粒,呈类圆形、椭圆形或不规则形,脐点形状多样,可见一字形、点状、星状或人字形等,直径约为3.645~21.87 μm;复粒相对较少,且复粒常有2~3个分粒组成。薄壁细胞中含草酸钙针晶,大多数呈束状分布,长为70.56~176.4 μm,直径为19.6~30.38 μm;可见梯纹、螺旋导管,梯纹导管直径为19.8~43.6 μm,螺旋直径为14.6~39.4 μm,详见图4。

2.4 重楼皂苷含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);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;检测波长:203 nm;柱

温:25 ℃;进样量:5 μL。

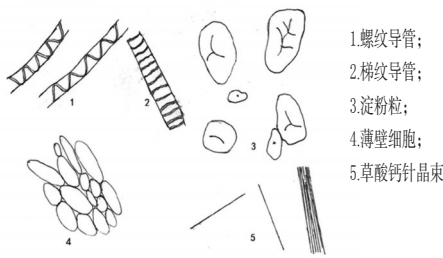


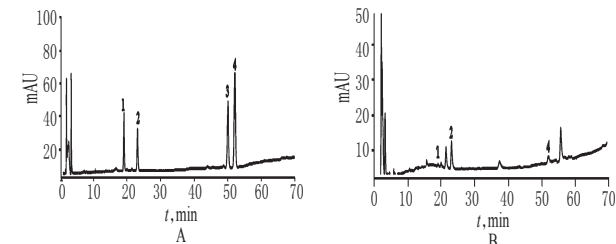
图4 粉末显微特征

Fig 4 Microscopic characteristics of powder

2.4.2 混合对照品溶液的制备 准确称取各待测成分对照品,加甲醇溶解制成重楼皂苷 I、II、VI、VII 质量浓度分别为 0.64、0.46、0.26、0.23 mg/mL 的单一对照品溶液;取上述单一对照品溶液各适量,按 1:1:1:1 (V/V/V/V) 混合,滤过,得混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称定药材样品粉末(过 40 目筛)0.5 g,置于量瓶中,精密加甲醇 5 mL,称定质量,浸泡过夜,超声(温度:40 ℃)处理 20 min,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过,即得。

2.4.4 系统适用性试验 取“2.4.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 5。结果表明,理论板数以重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰计均>10 000,分离度均>1.5,各成分基线分离度好。



A.混合对照品;B.供试品;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.mixed control; B.sample; 1.parissaponin VI; 2.parissaponin VII; 3.parissaponin II; 4.parissaponin I

图5 高效液相色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms

2.4.5 线性关系考察 分别精密量取“2.4.2”项下混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表 1。

表1 回归方程与线性范围

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
重楼皂苷 I	y=366.44x+3.07	0.999 9	0.64~12.8
重楼皂苷 II	y=377.60x+2.42	0.999 9	0.46~9.2
重楼皂苷 VI	y=340.35x+1.63	0.999 9	0.26~5.2
重楼皂苷 VII	y=344.22x+0.37	0.999 9	0.23~4.6
重楼总皂苷	y=7.680 8x-0.122 1	0.999 7	20.5~143.5

2.4.6 精密度试验 取“2.4.2”项下混合对照品溶液适

量,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的 RSD 分别为 2.37%、2.05%、2.16%、2.09% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.4.7 稳定性试验 取“2.4.3”项下供试品(编号:MY140801)溶液适量,分别于室温下放置 0、2、4、6、8、12、24 h 时按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的 RSD 分别为 0.53%、2.14%、1.90%、2.77% (n=7),表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

2.4.8 重复性试验 精密称取同一批样品(编号:MY140801)适量,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,共 6 份,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的 RSD 分别为 0.53%、2.14%、1.90%、2.77% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.4.9 加样回收率试验 取已知含量样品(编号:MY140801)适量,共 6 份,分别加入一定质量待测成分对照品,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
重楼皂苷 I	0.501 0	1.912 7	1.910 0	3.810 7	99.37	100.45	3.01
	0.501 7	1.933 5	1.910 0	3.837 1	99.66		
	0.502 8	2.002 1	1.910 0	4.012 3	105.24		
	0.501 1	1.913 2	1.910 0	3.816 5	99.64		
	0.502 5	2.000 9	1.910 0	3.956 7	102.39		
	0.500 5	1.911 4	1.910 0	3.752 3	96.38		
重楼皂苷 II	0.501 0	2.361 9	2.360 0	4.663 1	97.50	99.03	2.50
	0.501 7	2.368 7	2.360 0	4.667 9	97.42		
	0.502 8	2.374 6	2.360 0	4.795 3	102.57		
	0.501 1	2.362 1	2.360 0	4.657 1	97.24		
	0.502 5	2.369 8	2.360 0	4.774 3	101.88		
	0.500 5	2.351 1	2.360 0	4.654 2	97.58		
重楼皂苷 VI	0.501 0	2.300 3	2.330 0	4.597 3	98.58	99.17	1.52
	0.501 7	2.347 1	2.330 0	4.657 1	99.14		
	0.502 8	2.365 2	2.330 0	4.735 8	101.74		
	0.501 1	2.308 3	2.330 0	4.607 2	98.66		
	0.502 5	2.366 0	2.330 0	4.689 0	99.69		
	0.500 5	2.291 7	2.330 0	4.556 3	97.19		
重楼皂苷 VII	0.501 0	0.943 2	0.940 0	1.853 6	96.85	98.34	3.53
	0.501 7	0.930 8	0.940 0	1.867 5	99.64		
	0.502 8	0.964 7	0.940 0	1.942 3	104.00		
	0.501 1	0.946 5	0.940 0	1.856 1	96.76		
	0.502 5	0.963 9	0.940 0	1.859 2	99.07		
	0.500 5	0.942 9	0.940 0	1.823 9	93.72		
重楼总皂苷	0.501 5	3.355 8	3.300 0	6.611 1	98.64	100.50	2.57
	0.502 5	3.381 5	3.300 0	6.697 3	100.48		
	0.506 8	3.487 7	3.300 0	6.871 5	102.54		
	0.510 2	3.521 9	3.300 0	6.970 4	104.50		
	0.500 6	3.342 3	3.300 0	6.579 8	98.11		
	0.501 2	3.343 5	3.300 0	6.592 0	98.44		

2.4.10 样品中重楼皂苷 I、II、VI、VII 含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品中重楼皂苷 I、II、VI、VII 含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3, %)

Tab 3 Results of contents determination of samples (n=3, %)

样品编号	重楼皂苷 I	重楼皂苷 II	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 VII	重楼总皂苷
MY140801	0.042	-	0.017	0.211	1.03
MX140803	0.044	-	0.020	0.218	1.05
MY140805	0.039	-	0.014	0.209	1.02

注:“-”为未检出

Note:“-” means not detected

2.5 重楼总皂苷(薯蓣皂苷元)的含量测定

2.5.1 显色条件 精密吸取薯蓣皂苷元对照品溶液0.4 mL,置于具塞试管内,水浴挥干溶剂,精密加高氯酸5 mL,密闭,60 ℃恒温水浴中加热15 min,取出冰浴冷却至室温,按紫外分光光度法在400~600 nm波长处扫描吸收光谱。结果显示,对照品溶液在408 nm波长处有明显的吸收峰,且峰形良好,干扰小,因此选择408 nm为最大吸收波长。

2.5.2 对照品溶液的制备 准确量取对照品适量,加甲醇溶解制成薯蓣皂苷元质量浓度为0.2 mg/mL的对照品溶液。

2.5.3 线性关系考察 分别精密量取“2.5.1”项下对照品溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL,按“2.5.1”项下显色条件进样测定,记录吸光度。以重楼总皂苷进样量(x, μg)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性关系见表1。

2.5.4 精密度试验 取“2.5.2”项下对照品溶液适量,按“2.5.1”项下显色条件连续进样测定6次,记录吸光度。结果,薯蓣皂苷元吸光度的RSD=0.11% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.5.5 稳定性试验 取“2.4.3”项下供试品溶液(编号:MY140801)适量,分别于室温下放置0、4、8、16、24 h时按“2.5.1”项下显色条件进样测定,记录吸光度。结果,重楼总皂苷吸光度的RSD=1.51% (n=5),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

2.5.6 重复性试验 精密称取同一批样品(编号:MY140801)适量,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.5.1”项下显色条件进样测定,记录吸光度。结果,重楼总皂苷吸光度的RSD=0.75% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.5.7 加样回收率试验 取已知含量样品(编号:MY140801)适量,共6份,分别加入一定质量的薯蓣皂苷元对照品,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.1”项下显色条件进样测定,记录吸光度并计算加样回收率,结果见表2。

2.5.8 样品中重楼总皂苷的含量测定 取3批样品各适

量,分别按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.1”项下显色条件进样测定,记录吸光度并计算样品中重楼总皂苷含量,结果见表3。

3 讨论

本试验对毛重楼的植物形态、性状和显微特征进行了描述和鉴别,并采用HPLC法测定毛重楼中4种重楼皂苷含量,采用紫外分光光度法测定重楼总皂苷含量,本研究所建标准可用于毛重楼药材的质量控制。结果表明,重楼皂苷 I、VI、VII 总含量平均值为0.27%,低于2015年版《中国药典》(一部)规定的0.6%,重楼总皂苷含量平均值为1.03%,且未检出重楼皂苷 II,这可能与毛重楼的产地、生长年限或本身该成分含量较低有关,提示毛重楼与2015年版《中国药典》(一部)规定的基源品种质量上存在较大差异,是否能将毛重楼替代滇重楼或七叶一枝花入药,将有待进一步的科学验证。

参考文献

[1] 李恒.重楼属植物[M].北京:科学出版社,1998:42、182.
[2] 张烨,吕霜霜,周浓,等.不同生长年限滇重楼中4种重楼皂苷的含量比较[J].中国药房,2011,22(43):4081-4083.
[3] 何含杰,章怀云,陈丽莉,等.重楼皂苷的药理作用和临床应用研究进展[J].中药材,2014,37(3):527-530.
[4] 王羽,张彦军,高文远,等.滇重楼的抗肿瘤活性成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(14):1425-1428.
[5] 陈清,阎姝.重楼的药理作用及其毒性反应的研究进展[J].医药导报,2012,31(7):886-888.
[6] 张亚茹,彭献娜,王彩虹,等.重楼活性化学成分与药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2015,11(2):39-40.
[7] 刘湘丹,王朝晖,徐玉琴,等.中药材重楼研究进展[J].中医药导报,2015,21(15):90-93.
[8] 夏从龙.大理苍山常见药用植物图鉴[M].昆明:云南科技出版社,2016:445.
[9] 刘潇潇,王磊,王强,等.毛重楼的化学成分研究[J].中国中药杂志,2014,39(16):3107-3111.
[10] 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):1366-1369.
[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:260.
[12] 成莉,甄艳,陈敏,等.扩大重楼药用资源研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(16):3121-3124.
[13] 黄贤校,高文远.毛重楼、北重楼和五指莲的化学成分及其抗肿瘤活性研究[D].天津:天津大学,2010.
[14] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第15卷[M].北京:科学出版社,1978:86.
[15] 中国科学院昆明植物研究所.云南植物志:第8卷:下[M].昆明:云南科学技术出版社,2006:662.

(收稿日期:2016-08-05 修回日期:2016-10-12)

(编辑:张 静)