

黑籽重楼的生药学研究^Δ

赵兴蕊*,刘常逊,杨发建,王洪云[#](保山中医药高等专科学校中医药系,云南保山 678000)

中图分类号 R284.1;R282.71 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)23-3246-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.23.17

摘要 目的:对重楼药材原植物黑籽重楼进行系统的生药学研究。方法:对黑籽重楼的植物形态、药材特征、药材横切面及粉末进行观察;以重楼皂苷 I、II、VI、VII 为对照品对药材进行薄层鉴别,采用高效液相色谱法测定黑籽重楼中重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量。结果:黑籽重楼的原植物特征包括具有侧膜胎座,果开裂,无外种皮,于一侧包以深红色多汁的鸡冠状假种皮;查阅文献,黑籽重楼与云南重楼、七叶一枝花在药材性状上的区别主要表现在表面颜色、形状、环纹、断面上,气味上没有明显的差异;黑籽重楼的横切面结构、粉末特征与云南重楼、七叶一枝花没有明显差异;经薄层色谱鉴别,在黑籽重楼根茎中都含有重楼皂苷 I、II、VI、VII,含量分别为 0.117%、0.081%、0.114%、0.204%;重楼皂苷 I、II、VI、VII 的总量为 0.516%,与药典标准(含重楼皂苷 I、II、VI、VII 的总量不得少于 0.60%)存在差异。结论:本研究可为黑籽重楼的鉴定及进一步研究提供科学依据。

关键词 黑籽重楼;性状鉴别;显微鉴别;理化鉴别;高效液相色谱法

Study on Pharmacognosy of *Paris tibetica* Franch

ZHAO Xingrui, LIU Changxun, YANG Fajian, WANG Hongyun (Dept. of TCM, Baoshan College of Traditional Chinese Medicine, Yunan Baoshan 678000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: Conduct a systematic pharmacognostical study on herbs of *Paris tibetica* Franch. METHODS: The plant morphology of *Paris tibetica* Franch, characteristics, cross section and powder were all observed. The polyphyllin I, II, VI and VII were used as reference substance for TLC. HPLC method was used to determine the contents of polyphyllin I, II, VI and VII in *Paris tibetica* Franch. RESULTS: The original plant characteristic of *Paris tibetica* Franch was the lateral membrane placenta, the fruits were cracked without outer seed coat, a dark red juicy cockatoo aril was wrapped on one side. After literature review, the character differences of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. and *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara were mainly manifested in the surface color, shape, ring pattern and cross section, but there was no

- 2010,38(Web Server issue):W609-W614.
- [15] VON MERING C, JENSEN LJ, SNEL B, et al. STRING: known and predicted-protein protein associations, integrated and transferred across organisms[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005,33(Database issue):D433-D437.
- [16] 薛潇春,胡晋红.网络药理学的方法与应用进展[J]. *药学实践杂志*, 2015,33(5):401-405.
- [17] LI YH, YU CY, LI XX, et al. Therapeutic target database update 2018: enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018,46(D1):D1121-D1127.
- [18] HSIN KY, MATSUOKA Y, ASAI Y, et al. SystemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016,44(W1):W507-W513.
- [19] 陈一竹,杨文龙,郭玲玉,等.白术内酯 3 抗血小板作用及其机制[J]. *国际药学研究杂志*, 2016,43(3):514-517.
- [20] 张彩霞,张亚杰,江滨,等.白术内酯 II 促进大肠癌 Lovo 细胞凋亡及对 PARP1 和 Caspase-3 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017,23(5):157-161.
- [21] 郭晴晴,李立,何小鹏,等.白术黄芪汤分子网络及细胞免疫作用的生物信息学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016,22(14):206-210.
- [22] 赵刚,姜亚欣,迟玉花.白术治疗慢传输型便秘的研究进展[J]. *青岛大学医学院学报*, 2017,53(1):124-126.
- [23] 李多,于永强,高会斌,等.白术内酯 I 对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜保护作用[J]. *河北中医药学报*, 2016,31(3):5-8.
- [24] 王嫦鹤,耿庆光,王雨轩.白术内酯 I 对免疫性肝损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2012,37(12):1809-1813.
- [25] 赵玉娇,高耀,周玉枝,等.白术在神经精神系统疾病中的药理作用及机制研究进展[J]. *中草药*, 2017,48(21):4546-4551.

^Δ 基金项目:云南省科技计划项目(州市区域创新能力提升专项);云南省教育厅科学研究基金项目(No.2018JS652,2018JS654)

* 讲师,硕士。研究方向:中药资源开发与利用。E-mail: 287757305@qq.com

[#] 通信作者:副教授,硕士。研究方向:中药化学。E-mail: 71685169@qq.com

(收稿日期:2018-05-16 修回日期:2018-08-26)

(编辑:刘 萍)

obvious difference in odor. There was no significant difference in the transverse section structure and powder characteristics of *P. polyphylla* Smith var. *Yunnanensis* (Franch.) Hand. Mazz and *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara. TLC identification showed that polyphyllin I, II, VI and VII were all found in *Paris thibetica* Franch, the contents were 0.117%, 0.081%, 0.114%, 0.204%, respectively. Total content of polyphyllin I, II, VI and VII was 0.516%, which was different from the standard value of *China Pharmacopoeia* (total content of them was no less than 0.60%). CONCLUSIONS: This study can provide scientific basis for the identification and further research of *Paris thibetica* Franch.

KEYWORDS *Paris thibetica* Franch; Characteristics identification; Microscopic identification; Physicochemical identification; HPLC

重楼属植物全世界共有24个种,我国有7种和8变种^[1]。重楼始载于《神农本草经》,以其根茎入药,具有清热解毒、消肿止痛和熄风定惊之功效^[2],是云南白药、宫血宁胶囊等多种中成药的主要组成药材^[3]。现代研究表明,重楼具有抗肿瘤、抗菌、消炎、止血、止渴、镇静、镇痛等药理作用^[4]。2015年版《中国药典》(一部)收录的重楼属植物只有云南重楼、七叶一枝花^[5],但药材需求量大导致供不应求,植物被大量采挖,资源匮乏日益突出^[6],而该属植物绝大多数种类在不同地区均供药用^[7]。

黑籽重楼(*Paris thibetica* Franch)是重楼属多年生草本植物,主要分布于我国的西藏东南部、云南西北部、四川、甘肃南部、贵州以及不丹和锡金^[8]。黑籽重楼以根茎入药,具有清热解毒、消肿止痛的功效^[9],该种在民间主要作为重楼药材使用。目前药材市场上重楼属药用植物有毛重楼、南重楼、黑籽重楼等18个重楼属植物作为药用植物在利用^[10]。文献报道^[11],黑籽重楼根茎的主要化学成分是甾体皂苷类化合物,与云南重楼和七叶一枝花化学成分类似,并且化学成分中苷元3位连接糖链的甾体皂苷类化合物具有良好的抗肿瘤活性,对人肝癌Bel-7402细胞有细胞毒活性,一定程度上证明了黑籽重楼具有作为重楼替代药材的物质基础。另外,李青等^[12]研究不同产地的13个黑籽重楼样品中10种重楼皂苷的含量发现,从崇州采集的黑籽重楼样品,重楼总皂苷含量高于其他产地,且重楼皂苷I、II、VI、VII的含量之和与其他产地的样品比较也相对较高。现笔者对黑籽重楼的根茎部分进行生药学研究,希望此研究结果能有利于加强对其的鉴别,也能为合理开发、利用和扩大重楼属植物的药用资源提供试验基础。

1 材料

1.1 仪器

BX51显微镜(日本Olympus公司);GoodLook-2000薄层色谱成像系统(上海科哲生化科技有限公司);Waters2695高效液相色谱仪,包括G1311A四元梯度泵、G1313A自动进样器、G2170BA色谱工作站、G1314A紫外检测器(美国Agilent公司)。

1.2 药品与试剂

试验药材于2017年采自于保山地区,样品编号分别

为20170503、20170619、20170706,经杨发建讲师鉴定为百合科重楼属植物黑籽重楼(*Paris thibetica* Franch)的根茎。重楼皂苷I、II、VI、VII对照品(批号:分别为CL-ZI20160517、CLZII20151102、CLZVI20150715、CL-VII20161021,纯度:≥98%,购于南京春秋生物工程有限公司);重楼对照药材(来源于百合科植物云南重楼的根茎,批号:CLYC20160123,购于南京春秋生物工程有限公司);乙腈为色谱纯,水为纯化水,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 植物形态鉴别

通过观察植物器官形态,描述出植物形态。黑籽重楼为多年生草本,茎绿色,有时带紫色,无毛,高20~47 cm;叶7~12枚或8~12枚,绿色,背稍淡,无毛,线形、线状长圆形或披针形,先端长渐尖,基部楔形,长6.5~15 cm,宽1~1.6 cm,通常无柄,或具长约仅2~3 mm的短柄。花梗长3.5~11 cm,果期伸长幅度不大,但从基部外折;花基数4~5个或4~7个,远小于叶数;萼片绿色,线状披针形、披针形,长3.5~8 cm,宽1~1.8 cm,伸展,平伸或稍下弯;花瓣淡绿色,丝状,斜伸,比萼片短,长3~5.8 cm;雄蕊2轮,几乎没有例外,全长18~49 mm;花丝淡绿色,长5~10 mm;药筒长8~15 mm,药隔突出部分很长,淡绿色,长8~27 mm;子房长圆锥形,绿色,明显具棱1室;侧膜胎座4~5个或4~7个,胚珠多数,白色;花柱基紫色,花柱长仅0~1 mm,柱头绿色,长3~7 mm,星状平展。果近球形,直径0.7~1.5 cm,果皮薄,棱翅不明显,从顶部不规则开裂。种子多数,卵形,长2~3 mm,直径2~2.5 mm,亮黑色,光滑,坚硬,于一侧包以深红色多汁的鸡冠状假种皮。花期4月,果6月开裂,为开花较早而果成熟最快的一种^[13]。黑籽重楼的植物形态见图1。

2.2 性状鉴别

观察自然干燥的根茎,描述药材的表面、质地及断面特征,黑籽重楼根茎粗细不规则,幼龄根茎纤细,俗称“蚂蟥重楼”^[9]。根茎呈结节状扁圆柱形,略弯曲,根茎长5~12 cm,粗0.8~3 cm,表面黄褐色,内切面白色,有层状突起的环纹,节较疏,多环节,结节上可见凹陷的茎痕及须根,顶端残留有茎基和鳞叶。质坚实,断面平坦,粉

性或角质,呈白色或浅棕黄色。气微,味微苦、麻。黑籽重楼的根茎干燥品形态见图2。



图1 黑籽重楼的植物形态图

Fig 1 Plant morphology of *Paris thibetica* Franch



图2 黑籽重楼的根茎干燥品形态图

Fig 2 Rhizomatic morphology of dried *Paris thibetica* Franch

2.3 显微鉴别

2.3.1 根茎横切面显微鉴别 取黑籽重楼根茎制作石蜡切片,采用生物组织自动脱水机脱水、生物组织冷冻、包埋机包埋、生物组织切片机切片、染色、干燥、检视,在显微镜下观察组织特征。结果,根茎表皮细胞1列,不规则,类圆形或类长方形,外壁较厚,排列紧密,脊线较密。皮层较中柱宽,细胞不规则形或类圆形,细胞中充满淀粉粒,薄壁细胞间散有多数大的黏液细胞,内含草酸钙针晶束,皮层中可见叶迹维管束和根迹维管束。内皮层不明显。维管束呈散状排列,大多为周木型维管束,为不规则形或类三角形,木质部细胞大,内分布有导管,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。黑籽重楼根茎横切面显微特征见图3。

2.3.2 根茎粉末显微鉴别 将自然干燥根茎粉碎后过80目筛的粉末,取少许粉末放于载玻片上,滴加水合氯醛溶液,于酒精灯外焰处加热透化,反复透化3次,再滴加稀甘油溶液,封片,观察细胞特征。另取少许粉末于另一个载玻片上,滴加稀甘油溶液,封片,观察淀粉粒,在显微镜下观察粉末特征。结果,根茎粉末为浅灰白色。淀粉粒众多,多数为单粒,呈类圆形、椭圆形,脐点为点状、星状或一字形、人字形,直径为2.82~18.75 μm;

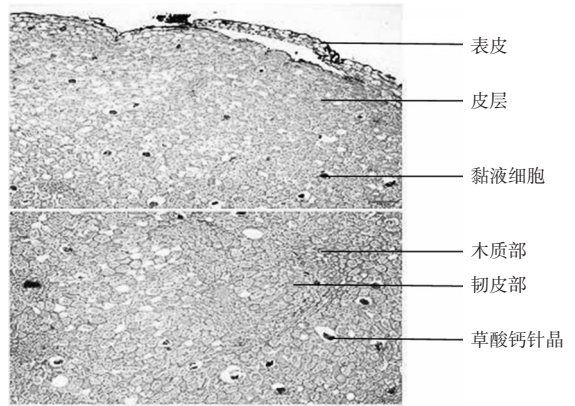


图3 黑籽重楼根茎横切面显微鉴别图(×40)

Fig 3 The microscopic identification of cross section for the root and stem of *Paris thibetica* Franch (×40)

少数为复粒,常由2~3个分粒组成;草酸钙针晶多呈束状存在,少数散状分布,长35~137.48 μm。薄壁细胞类长圆形或不规则形,内富含淀粉粒。可见螺旋、梯纹导管,直径为11.93~25.98 μm。黑籽重楼根茎粉末显微特征见图4。

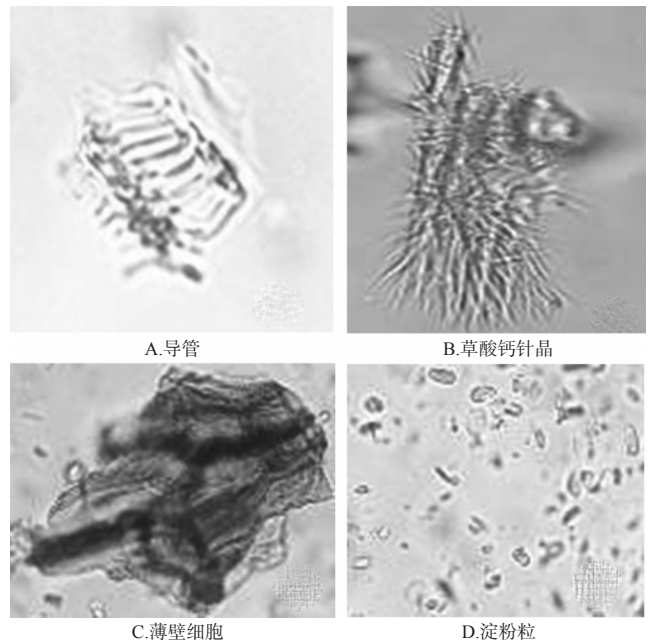


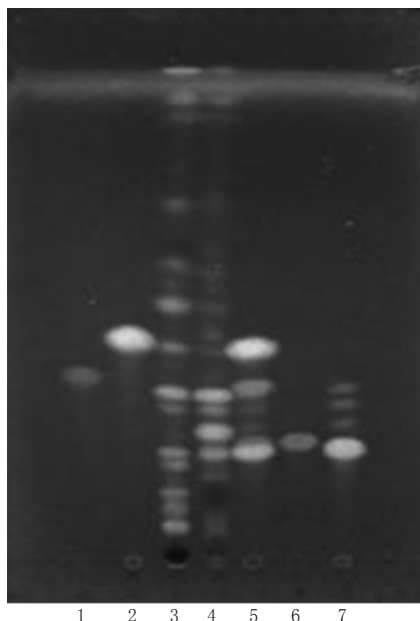
图4 黑籽重楼根茎粉末显微鉴别图(×400)

Fig 4 The microscopic identification of powder for the root and stem of *Paris thibetica* Franch (×400)

2.4 薄层检识

分别取黑籽重楼及云南重楼对照药材粉末0.5 g于圆底烧瓶中,加乙醇10 mL,加热回流30 min,滤液作为供试品溶液;另取重楼皂苷I、II、VI、VII的对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL各含0.8 mg的单溶液及混合溶液作为对照品溶液,按2015年版《中国药典》(一部)附录VIB薄层色谱法试验,分别取供试品溶液和对照

品溶液各 5 μL, 分别点样于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(15:5:1, V/V/V) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干。结果, 在紫外光(365 nm) 下, 供试品溶液与重楼皂苷 I、II、VI、VII 对照品溶液色谱相应位置上出现相同颜色的荧光斑点, 说明黑籽重楼中含有重楼皂苷 I、II、VI、VII 这 4 种成分。黑籽重楼的薄层色谱图见图 5。



注: 1. 重楼皂苷 I; 2. 重楼皂苷 VI; 3. 黑籽重楼; 4. 云南重楼对照药材; 5. 对照品的混合液; 6. 重楼皂苷 II; 7. 重楼皂苷 VII

Note: 1. polyphyllin I; 2. polyphyllin VI; 3. *Paris thibetica* Franch; 4. reference crude herb of *Rhizoma Paridis Yunnanensis*; 5. mixed solution of reference substance; 6. polyphyllin II; 7. polyphyllin VII

图 5 黑籽重楼的薄层色谱图

Fig 5 TLC of *Paris thibetica* Franch

2.5 含量测定

2.5.1 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(0~40 min, 30%→60% A; 40~50 min, 60%→30% A); 检测波长: 203 nm; 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。

2.5.2 溶液的制备 (1) 混合对照品溶液。精密称取重楼皂苷 I、II、VI、VII 的对照品适量, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 配制成质量浓度分别为 0.46、0.40、0.52、0.48 mg/mL 的混合对照品溶液, 混匀, 置于冰箱中(4 °C) 保存, 备用。(2) 供试品溶液。取黑籽重楼的粉末约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞圆底烧瓶中, 加入乙醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.5.3 系统适用性试验 精密量取“2.5.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 在该色谱条件下, 各待测

成分间、待测成分与杂质峰间均能达到基线分离要求, 分离度 > 1.5, 理论板数按重楼皂苷 I 计不低于 5 000。高效液相色谱图见图 6。

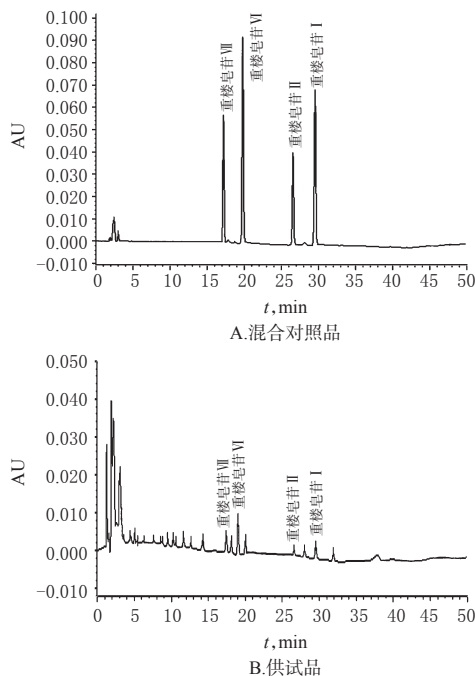


图 6 高效液相色谱图

Fig 6 HPLC chromatograms

2.5.4 线性关系考察 取“2.5.2”项下混合对照品溶液 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0 mL, 加入甲醇溶液定容至 1 mL, 混匀后按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以重楼皂苷 I、II、VI、VII 的进样量为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y) 进行线性回归, 结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果(n=6)

Tab 1 Results of linear relationship investigation (n=6)

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
重楼皂苷 I	y=384 157x+13 809	0.999 4	0.46~4.60
重楼皂苷 II	y=447 257x-9 491	0.999 5	0.40~4.00
重楼皂苷 VI	y=528 257x-16 491	0.999 5	0.52~5.20
重楼皂苷 VII	y=469 457x-26 291	0.999 7	0.48~4.80

2.5.5 精密度的试验 精密量取“2.5.2”项下混合对照品溶液 10 μL, 按“2.5.1”项下色谱条件连续进样 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 0.71%、1.06%、0.87%、1.25% (n=6), 表明仪器精密密度良好。

2.5.6 稳定性试验 取“2.5.2”项下供试品溶液(批号: 20170706), 分别于室温下放置 2、4、6、8、10、24 h 时按“2.5.1”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 1.67%、1.70%、1.67%、1.75% (n=6), 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.5.7 重复性试验 分别精密量取6份供试品溶液(批号:20170706),每份1 mL,按“2.5.1”项下色谱条件连续测定6次。结果,重楼皂苷 I、II、VI、VII峰面积的RSD分别为1.84%、1.41%、1.10%、1.10%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.5.8 加样回收试验 精确量取6份供试品溶液(批号:20170706),每份1 mL,分别加入“2.5.2”项下混合对照品溶液5 mL,再按“2.5.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,重楼皂苷 I、II、VI、VII的平均回收率分别为98.23%、99.32%、97.46%、97.86%,RSD分别为1.63%、1.37%、1.89%、1.92%($n=6$),表明方法的准确度良好。

2.5.9 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.5.2”(2)项下方法制备供试品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$, %)

Tab 2 Content determination of samples($n=3$, %)

批号	重楼皂苷 I	重楼皂苷 II	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 VII
20170503	0.106	0.096	0.108	0.169
20170619	0.118	0.069	0.084	0.264
20170706	0.127	0.078	0.150	0.179
平均值	0.117	0.081	0.114	0.204

2.6 结果

经查阅文献[14],黑籽重楼与其他种的特征区别主要有以下几点:(1)植物形态。黑籽重楼的原植物特征包括具有侧膜胎座,果开裂,无外种皮,于一侧包以深红色多汁的鸡冠状假种皮;黑籽重楼与长柱重楼、毛重楼、云南重楼、七叶一枝花在植物形态上的区别,主要表现在胎座的类型、果是否开裂、有无外种皮、叶是否有毛、花瓣的形状等方面。(2)药材性状特征。黑籽重楼与云南重楼、七叶一枝花在药材性状上的区别主要表现在表面颜色、形状、环纹、断面上,气味上没有明显的差异。(3)显微特征。黑籽重楼的横切面结构、粉末特征与云南重楼、七叶一枝花没有明显差异。(4)化学成分定性与定量分析。经薄层色谱鉴别,重楼皂苷 I、II、VI、VII这4种成分在黑籽重楼根茎中都有,且含量分别为0.117%、0.081%、0.114%、0.204%。2015年版《中国药典》(一部)规定的含重楼皂苷 I、II、VI、VII的总量不得少于0.60%的限量标准^[4],本文研究的黑籽重楼中重楼皂苷 I、II、VI、VII的总量为0.516%,与药典标准(总量不得少于0.60%)存在差异。

3 讨论

通过对中药的大力研究,生药学在我国有了长远的发展,生药学对于准确识别、鉴定中药基源的种类,调查、考证中药的资源起到了极大地推进作用^[15]。通过对

黑籽重楼系统的生药学研究,可为黑籽重楼的鉴定及进一步研究提供科学依据。查阅文献[16]得知,重楼对土壤中不同营养成分具有选择性,在富饶的土壤中,速效磷和速效钾的供应有利于重楼根茎中总皂苷和总多糖的合成与积累,说明土壤营养成分对重楼属植物根茎主要活性成分的含量高低存在一定的影响,不同的产地、不同的土壤,重楼属植物根茎的活性成分存在差异的。所以,在栽培过程中可根据重楼属植物的需肥特性及生长规律有针对性合理地合理施肥,从而使其根茎的品质达到最佳水平。

参考文献

- [1] 李恒.重楼属植物[M].北京:科学出版社,1998:151-154.
- [2] 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.
- [3] 张曼,李彦文,李志勇,等.重楼属药用植物的研究进展[J].环球中医药,2011,4(2):145-148.
- [4] 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):344-347.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 王强,徐国钧.重楼类中药的性状鉴定研究[J].中药材,1990,13(2):16-18.
- [8] 唐铭霞,王丽,翁周.黑籽重楼种内 AFLP 遗传多样性及遗传分化研究[J].四川大学学报(自然科学版),2008,45(2):402-408.
- [9] 杨发建,李铭,杨淳,等.保山市重楼属种质资源初步研究[J].中国民族民间医药,2016,25(9):147-150.
- [10] 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):1-8.
- [11] 景松松,王颖,李雪娇,等.黑籽重楼化学成分及其抗肿瘤活性研究[J].中草药,2017,48(6):1093-1098.
- [12] 李青,文飞燕,尹鸿翔,等.HPLC测定黑籽重楼中的皂苷含量并评价其药材质量[J].华西药学杂志,2013,28(4):395-397.
- [13] 唐进,汪发纛.中国植物志:15卷[M].北京:科学出版社,1978:86-87.
- [14] 符德欢,王丽,郭佳玉,等.4种重楼属药用植物的比较鉴别研究[J].云南中医学院学报,2017,40(4):83-86.
- [15] 许保海,翟胜利.对传统中药学与生药学的比较探讨[J].中国药房,2009,20(15):1121-1123.
- [16] 潘兴娇,张杰,路风中,等.重楼属植物根茎有效成分与菌根侵染率、土壤营养成分之间的相关性[J].中国药房,2016,27(22):3037-3040.

(收稿日期:2018-06-28 修回日期:2018-09-26)

(编辑:余庆华)