

滇重楼产业链上游质量控制关键影响因素探究

陈达菊， 杨 青， 茹瑞红， 陈显梅， 杨羚钰， 申世安
(云南省文山壮族苗族自治州农业科学院, 云南 文山 663099)

摘要：目的 探索影响重楼质量的主要因素，确定重楼产业链上游药材质量控制关键点。**方法** 采用 HPLC-DAD 考察野生重楼与种植重楼有效成分差异，比较研究不同种、不同产地的含量差异，监测不同年限、不同收获期的含量动态变化，并结合折干率设定收获指数，根据收获量算出收获指数。**结果** 种决定了重楼皂苷的种类和多少，产地对重楼皂苷含量的影响显著；随着栽培年限的增加，滇重楼皂苷含量成上升趋势，7 年以后含量增加趋于平缓；收获时间对皂苷含量影响明显，栽培模式对滇重楼皂苷含量的有一定影响，但不显著。**结论** 种的鉴别和限定应该作为市场流通中控制质量的主要手段，可通过收获指数的测定确定药材的最佳收获时间。

关键词：滇重楼；重楼皂苷；折干率；收获指数；质量控制；产业链上游；HPLC

中图分类号：R282 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2021)08-2249-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.08.050

滇 重 楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. --Mazz 是黑药花科重楼属多年生草本植物^[1]，是传统名贵中药材^[2]，2015 年《中国药典》收录主要种之一^[3]。现代研究表明，重楼具有抗肿瘤、抗缺血性损伤、抗病毒、免疫调节、止血、镇痛、抗菌、抗血小板聚集、抗炎等生物活性，是云南白药、宫血宁胶囊、楼莲胶囊、清咽胶囊、季德胜蛇药片、热毒清胶囊、金复康口服液等中成药的主要原料^[4-6]。近年来，人工驯化成为解决市场供需矛盾、实现重楼资源有效保护和可持续利用的主要途径，但是由于种源混杂，采收没有科学的参考指数，药材质量和收获量得不到保证成为了亟待解决的主要问题。

从 1962 年起，国内对重楼的研究就开始兴起^[7]，但是对收获期的研究较少，均根据滇重楼皂苷含量的多少来确定收获期，且各研究者研究得出的结果不一，略显片面，无法作为滇重楼种植业的参考依据。重楼皂苷含量是重楼药材的质量评价指标之一，除了 4 种《中国药典》规定的皂苷外，重楼皂苷 V、重楼皂苷 H 和薯蓣皂苷也具有很好的生物活性，且含量较高^[8-10]。本研究基于 HPLC-DAD 对滇重楼 7 种主要皂苷含量的动态变化以及滇重楼上游质量控制关键点进行了系统分析，并在此基础上设定了收获指数。以期该研究结果为滇重楼种植业和药材上游质量控制提供科学的理论依据和手段，从而保证滇重楼药材的质量和药农的收益，同时为其他中药材质量评价提供参考依据。

1 材料

Agilent 1260 HPLC-UV (美国 Agilent 公司)；DZF-6050MBE 型电热恒温真空干燥箱 (上海博讯实业有限公司)；BRANDSON 8510 型超声波清洗机 (40 kHz, 美国

BRANDSON 公司)；eppendorf 5804 离心机、eppendorf 移液器 (德国 Eppendorf 公司)；CP225D 型分析天平 (德国 Sartorius 公司)；boekel 干浴锅 (美国 Boekel 公司)。

重楼皂苷 I (批号 HN1116XB13)、重楼皂苷 II (批号 R2206F4766)、重楼皂苷 VI (批号 Z10F3B1)、重楼皂苷 VII (批号 R26A6F2816)、重楼皂苷 V (批号 Y19F7H9835)、重楼皂苷 H (批号 C12A8G33615) 和薯蓣皂苷 (批号 P20J7F18116) 对照品购自上海源叶生物科技有限公司。色谱纯甲醇、乙腈购于美国赛默飞公司，其他试剂均为分析纯。

滇楼新鲜根茎根据实验需要分别收集于云南省内不同地区、文山州内不同县市等，皂苷含量动态变化的实验材料取自同一个基地、同一个类型。样品设 2 个重复，滇重楼基源由中国科学院昆明植物研究所李恒鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo C₁₈ (2) 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相水 (A) - 乙腈 (B)，梯度洗脱 (0~40 min, 35%~40% B；40~50 min, 55%~60% B；60~70 min, 35% B)；体积流量 0.8 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 210 nm；进样量 20 μL。按照上述色谱条件进行分析，各成分分离度良好，色谱图见图 1~2。

2.2 对照品溶液制备 分别精密称定减压干燥至恒定质量的重楼皂苷 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 和薯蓣皂苷对照品适量，加纯甲醇溶解并制备成混合质量浓度分别为 0.414、0.512、0.103、0.313、0.668、0.204、0.107 mg/mL 的对照品贮备液。精确量取对照品混合贮备液 1.0、2.5、5.0、7.5、

10 mL添加甲醇适量，精密定容到 10 mL，得到不同梯度浓度对照品。置于 4 ℃ 的冰箱内，临用前经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，备用。

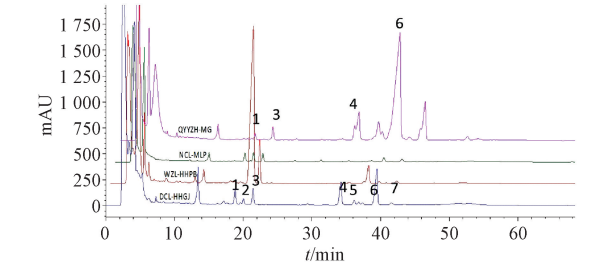
2.3 线性关系考察 精确吸取“2.2”项下系列混合对照品溶液各 20 μL，在“2.1”色谱条件下进样，以对照品的峰面积纵坐标（Y），相应的质量浓度为横坐标（X）进行线性回归，得回归方程分别为重楼皂苷 I $Y=9\,460.4X-4\,900.8$ ($r=0.999\,4$)；重楼皂苷 II $Y=7\,080.4X+7\,949.9$ ($r=0.998\,3$)；重楼皂苷 VI $Y=9\,842.1X-0.313$ ($r=0.999\,4$)；重楼皂苷 VII $Y=6\,668.1X+12\,945$ ($r=0.999\,5$)；重楼皂苷 V $Y=10\,865X+1\,942.2$ ($r=0.999\,4$)；重楼皂苷 H $Y=7\,294.1X-23.8$ ($r=0.999\,4$)；薯蓣皂苷 $Y=9\,691.7X+59.899$ ($r=0.998\,0$)。表明各成分在各自范围内线性关系良好。

2.4 供试品溶液制备 分别精密称定干燥重楼粉末（过 50 目筛）0.25 g，置 15 mL 离心管中，精密加甲醇 5 mL，称定质量，混匀，密封，室温下超声提取 30 min（300 W，40 kHz），取出，放至室温，用甲醇补足减失质量，10 000 r/min离心 8 min，取上清 1.5 mL，60 ℃ 干浴挥发干，300 μL 乙腈溶解，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

按“2.2”项下方法制备对照品溶液，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”色谱条件下进样检测，得到液相色谱图。

2.5 不同种及类型对重楼质量的影响 七叶一枝花采自马关（野生），南重楼采自麻栗坡（野生），五子莲采自红河（野生），滇重楼采自红河（栽培），采回材料清洗干净，沥干水分，称定质量（鲜质量），切片，40 ℃ 烘干，称定质量（干质量），打粉，过 50 目筛，阴凉低温处保存。

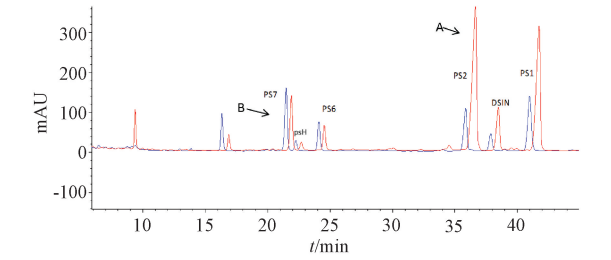
从图 1 可以看出，不同种重楼液相色谱指纹不一样，峰也不一样，只有七叶一枝花和滇重楼含有楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII 等 4 种《中国药典》规定的皂苷，其他 2 种重楼皂苷皆不达标。可见不同种间重楼的有效成分含量差异极大，部分成分甚至没有，所以种的识别应该作为重楼原料质量控制的主要手段。



注：1~7 分别为为重楼皂苷 VII、重楼皂苷 H、重楼皂苷 VI、种类皂苷 II、薯蓣皂苷、重楼皂苷 I、重楼皂苷 V。

图 1 不同种重楼液相色谱指纹差异

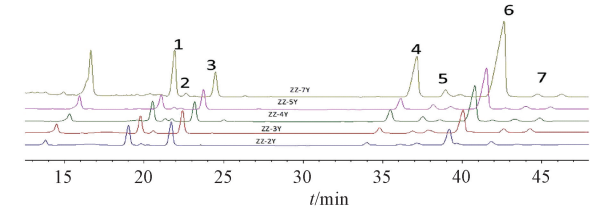
2.6 不同龄期滇重楼皂苷含量变化 2~7 年栽培滇重楼皆为基地育苗移栽，样品均采自文山市平坝镇重楼种植基地，3~10 年野生滇重楼均采自富宁县（判断依据为茎痕），野生及栽培 7 年生重楼对比材料均采自富宁县，从图 3~4 可



注：A 为对照品，B 为滇重楼样品。

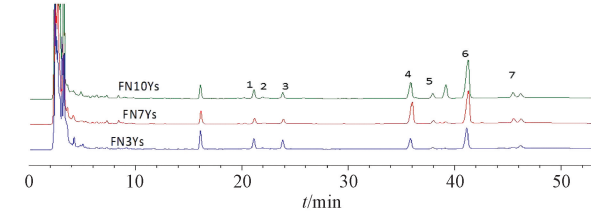
图 2 混合对照品及样品对照色谱图

见在对比材料的产地一致、滇重楼种质类型一致，方法一致的情况下，种植滇重楼（2~7 年）各皂苷色谱峰面积随着年限增加都呈上升趋势，重楼皂苷 I 表现更为明显，野生滇重楼（3~10 年）各皂苷色谱峰面积呈上升趋势。即在 10 年生长期中皂苷含量是随着年限增加而上升，第 7 年增加最为明显，7 年后 1~7 种皂苷升高趋势变缓，而 5 和 6 之间的皂苷峰升高显著。图 5 栽培和野生滇重楼同种类型、产地相同，液相指纹色谱图基本一致，总含量差异不明显，1~3 号皂苷栽培重楼偏高，4~7 号皂苷是野生重楼偏高。



注：1~7 分别为为重楼皂苷 VII、重楼皂苷 H、重楼皂苷 VI、种类皂苷 II、薯蓣皂苷、重楼皂苷 I、重楼皂苷 V。

图 3 2~7 年栽培滇重楼皂苷积累动态变化

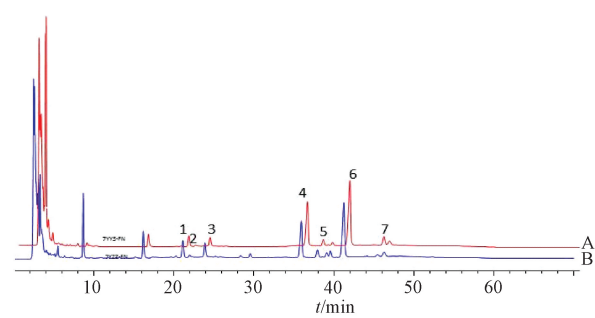


注：1~7 分别为为重楼皂苷 VII、重楼皂苷 H、重楼皂苷 VI、种类皂苷 II、薯蓣皂苷、重楼皂苷 I、重楼皂苷 V。

图 4 3~10 年野生滇重楼皂苷积累动态变化

2.7 不同收获时间对滇重楼皂苷的影响 由于生产中药农主要以收获的滇重楼根茎鲜质量或者是干质量作为收获的主要指标，保证不了药材质量，甚至有的药农收获地下部分是根据农事安排，不能保证质量的同时也不能保证收获量，所以设定一个既能反映干物质收获量又能反映有效成分的指数作为药材种植收获参考指标具有必要性。课题组根据长期调查种植业收获和实验测定数据设定了收获指数，即每克药材中干燥以后所能收获的有效成分含量。

材料均采集于文山州文山市平坝镇，滇重楼 3 年种苗（野生重楼根茎）来源于滇西北，在平坝镇已经种植 5 年，每月 25~28 d 采一次材料，每次采样为 5 年生滇重楼根茎



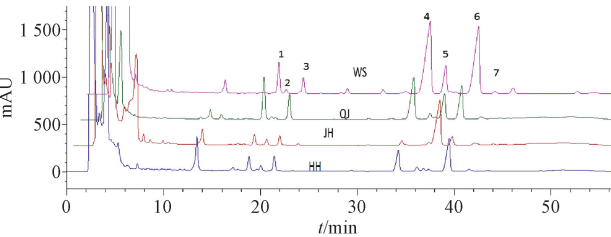
注：A 为野生重楼，B 为栽培重楼。
图5 7年野生与栽培重楼图谱

尾端。设2次重复。取13批重楼药材粉末，进行峰面积测

表1 不同收获期折干率和皂苷含量 (mg/g)

取材时间	编号	折干率/%	皂苷 I	皂苷 II	皂苷	皂苷 VII	皂苷	皂苷 H	薯蓣皂苷	总皂苷	收获指数
2016. 10	A	42. 61	0. 214	0. 674	0. 918	0. 531	4. 937	1. 057	0. 218	8. 542	3. 640
2016. 11	B	40. 01	0. 423	0. 884	1. 775	1. 123	9. 971	4. 134	0. 383	18. 693	7. 479
2016. 12	C	42. 83	0. 274	0. 288	0. 398	1. 334	1. 031	4. 205	0. 199	7. 729	3. 310
2017. 02	D	21. 11	0. 303	0. 589	0. 604	2. 055	0. 619	3. 372	0. 320	7. 862	1. 660
2017. 03	E	34. 90	0. 185	0. 718	0. 700	2. 161	1. 081	3. 017	0. 258	8. 120	2. 834
2017. 04	F	33. 31	0. 329	0. 463	1. 195	0. 464	4. 059	2. 221	0. 300	9. 031	3. 008
2017. 05	G	35. 82	0. 295	0. 861	0. 962	0. 56	0. 008	2. 121	0. 158	4. 965	1. 778
2017. 06	H	19. 17	0. 597	0. 682	1. 017	1. 787	1. 503	3. 777	0. 222	9. 585	1. 837
2017. 07	I	38. 89	0. 194	1. 268	1. 855	1. 790	0. 382	4. 028	0. 379	9. 896	3. 849
2017. 08	J	29. 64	0. 244	1. 164	1. 203	1. 258	6. 094	2. 457	0. 179	12. 599	3. 734
2017. 09	K	45. 40	0. 241	0. 472	0. 824	0. 469	4. 450	1. 827	0. 223	8. 506	3. 862
2017. 10	L	45. 63	0. 064	0. 390	0. 810	0. 241	5. 936	1. 023	0. 215	8. 679	3. 960

2.8 不同产地来源滇重楼皂苷含量差异 分别从云南省滇重楼主产地曲靖、景洪、红河和文山采集滇重楼样品，文山州广南、麻栗坡、马关、西畴、富宁和文山采集滇重楼样品，年限差距小于2年。按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样，得到液相指纹色谱图6~7。从图6可以看出虽然峰面积差异显著，除景洪外，不同产地滇重楼液相指纹图谱基本一致；从图7可以看出，文山州不同县市分布滇重楼皂苷指纹图谱基本一致，含量有所差异，文山和马关产的滇重楼中峰4和峰6明显比其他几个产区偏高，但不同成分间峰面积比例基本一致，部分差异由于材料不完全一致影响。可见不同产地滇重楼皂苷含量差异显著，目前暂未找到变化规律，景洪样品为市场上购买根茎，类型、亚种上不能准确鉴定。

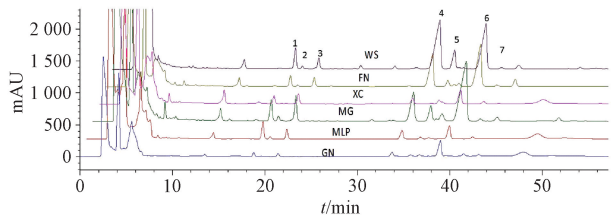


注：1~7 分别为为重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷 H、重楼皂苷Ⅵ、种类皂苷Ⅱ、薯蓣皂苷、重楼皂苷Ⅰ、重楼皂苷Ⅴ。

图6 云南省不同地区滇重楼 HPLC 指纹图谱

定，计算重楼药材中7种成分的含量，结果见表1。

表1显示，不同收获时间滇重楼药材均含有7种皂苷成分。7种皂苷的动态变化，总体基本一致，都呈现2个峰值，集中在6至9月和10至1月，可见皂苷积累较多主要集中在滇重楼的盛花期和果实成熟期。测定结果表明，滇重楼折干率随着不同收获时间变化而变化，9至12月折干率均在40%以上，生长量趋于恒定，6~8、11这4个月皂苷含量较高，收获指数7至12月较高，最高为11月，11月份种子已经收获，根据生产经验，地下部分生长也基本达到最大，地上部分仍可作为产品利用，故一年之中最适宜收获的时间为11月份。



注：1~7 分别为为重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷 H、重楼皂苷Ⅵ、种类皂苷Ⅱ、薯蓣皂苷、重楼皂苷Ⅰ、重楼皂苷Ⅴ。

图7 文山州不同产区滇重楼 HPLC 指纹图谱

3 讨论

黄伟光等^[11]采用 J. W. Rothiock 等氏方法水解提取了重楼薯蓣皂素。近年来，研究人员对滇重楼主要皂苷含量的进行了不同方法的测定分析，并与近源种进行了对比研究^[7,12-14]不同产地滇重楼皂苷含量，其品质受产地、环境因素影响较大，表现出一定的地域性及生境依赖性^[15]，滇重楼生长年限不同，收获期不同，其皂苷含量也有较大差异，1~7年生重楼随年龄增加基本呈上升趋势^[16-20]。HPLC在中药化学成分分析方面应用较多，采用 HPLC 对滇重楼皂苷进行检测分析简便、准确，具有良好的精密度、重复性、稳定性，可用于滇重楼的质量控制及综合评价^[12-23]。

不同种及亚种间皂苷含量有显著差异，目前研究结果表明含有重楼皂苷Ⅰ、重楼皂苷Ⅱ、重楼皂苷Ⅵ、重楼皂苷Ⅶ的重楼有七叶一枝花，滇重楼^[7]，本实验中的七叶一

枝花和滇重楼液相色谱图也都包含了这 4 种皂苷的 4 个主要色谱峰。不同产地重楼的有效成分含量存在明显差异^[15]；尹显梅等^[20]同时测定华重楼 6 种皂苷，认为最佳种植年限为 8 年、最佳采收季节为 11 月份。赵廷周等、夏从龙等^[18-19]也对滇重楼收获期进行了研究，但是结果不一。本实验结果表明了随着时间的变化总皂苷变化的规律与重楼的发芽、开花、结实等有一定关系。滇重楼皂苷含量是衡量滇重楼质量的主要指标之一，重楼除了 2015 年版《中国药典》中规定的 4 种主要皂苷外，重楼皂苷 V、重楼皂苷 H、薯蓣皂苷等也是滇重楼中的主要皂苷，且含量较高，同样具有镇痛、止血、抗肿瘤等功效，所以本实验中主要以这 7 种皂苷作为重楼的主要考察指标，结合折干率，设定了收获指数。

不同种决定了重楼皂苷的种类和多少，种的鉴别和限定应该作为市场流通中控制质量的主要手段，液相指纹图谱、薄层、及新鲜根茎外观均可作为鉴定手段；随着栽培年限的增加，滇重楼皂苷含量成上升趋势，7 年以后含量增加趋于平缓，建议滇重楼种植 7 年以后收获；收获时间对皂苷含量影响明显，干物质的积累量影响药农的经济收成，同时通过近几年来栽培经验，11 月份以后滇重楼地下部分基本达到一年中最大产量，故 11 月为最佳收获期，收获指数则把两者关联起来，通过收获指数测定确定药材的收获时间 11 月份为最佳，产地对重楼皂苷含量的影响显著，推测可能与海拔和种质的鉴定有一定关系，重楼应该有种植区域的限定和溯源体系；栽培模式对滇重楼皂苷含量的也有一定影响，但不显著。本实验中提出了收获指数的定义，并作为确定滇重楼收获期的主要参考指数，本指标既反应了滇重楼收获的干物质量同时也反应了滇重楼的皂苷含量。

致谢：本实验在开展过程中得到了中科院昆明植物所李恒研究员的指导，特此谢意！

参考文献：

[1] 黄玉玲. 广义重楼属叶绿体系统发育基因组学及 DNA 条形码评价[D]. 安徽：中国科学院大学，2017.

[2] 李 恒. 重楼属植物[M]. 北京：科学出版社，1998.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：260.

[4] 何明生，李 秀. 重楼药理作用的研究进展[J]. 世界中医药，2012，7（6）：579-582.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 黄圆圆. 15 种重楼属植物根茎的化学成分分析[D]. 合肥：

安徽中医药大学，2018.

[8] 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 Chromatograph B*, 2010, 878(29): 2943-2948.

[9] Man S L, Gao W Y, Zhang Y J, *et al.* Antitumor and anti-metastatic activities of *Rhizoma Paridis* saponins[J]. *Steroids*, 2009, 74(13/14)：1051-1056.

[10] Zhang T, Liu H, Liu X T, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51（1）：114-124.

[11] 黄伟光，周 俊. 重楼的甾体皂素配基成分研究[J]. 云南医药杂志，1962(1)：64-65.

[12] 叶 方，黄良永，陈 黎，等. 武当山区人工种植重楼中 9 种重楼皂苷含量分析[J]. 中南药学，2016，14(11)：1244-1248.

[13] 王林娜，胡 培，杨光义，等. 6 种重楼属植物不同部位中 9 种皂苷类成分含量比较[J]. 时珍国医国药，2018，29（11）：2635-2638.

[14] 刘伯平. 重楼 HPLC 指纹图谱研究[D]. 成都：西南交通大学，2009.

[15] 李 懿，何 佳，赵庭周，等. HPLC 同时测定不同产地滇重楼中的 6 种重楼皂苷[J]. 中成药，2012，34(1)：113-116.

[16] 王林娜，胡 培，杨光义，等. 不同生长年限的 6 种重楼属植物根茎中 9 种皂苷含量动态累积比较[J]. 中国药师，2018，21(12)：2123-2127.

[17] 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.

[18] 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)：61-63；66.

[19] 夏从龙，周 浓，陈立师，等. 滇重楼不同生长发育期有效成分的变化规律[J]. 时珍国医国药，2011，22(7)：1624-1625.

[20] 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.

[21] 韩 平，阮成江，王海明，等. HPLC 法测定重楼块根中 4 种重楼皂苷含量研究[J]. 大连民族大学学报，2018，20（1）：17-20.

[22] 刘 斌. 鄂西北地区重楼质量控制和品质评价研究[D]. 咸阳：湖北科技学院，2019.

[23] 刘 丽. 重楼的化学成分及质量控制研究进展[J]. 中国民族民间医药，2011，20(21)：28-29.