

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.02.002

不同产地及不同部位黑龙骨中 杠柳毒苷质量分数变化^①

坚玲玲, 高洁, 张建菲, 姜延花

西南大学 农学与生物技术学院, 重庆 400715

摘要: 分析不同产地及不同部位黑龙骨中杠柳毒苷质量分数分布规律, 为黑龙骨药材的合理利用提供理论依据. 用高效液相色谱法对采自不同产地的 28 份黑龙骨样品进行杠柳毒苷质量分数测定. 结果表明, 不同产地黑龙骨茎部杠柳毒苷总质量分数由多到少为云南野生材料, 贵州野生材料, 重庆野生材料, 四川野生材料. 同一产地根木质部杠柳毒苷质量分数最高(0.31~2.24 mg/g); 根韧皮部、茎韧皮部、茎木质部质量分数次之(0.25~1.41 mg/g, 0.09~1.23 mg/g, 0.05~0.34 mg/g); 叶部杠柳毒苷质量分数最低(0.04~0.21 mg/g). 因此, 还可以考虑使用茎韧皮部、茎木质部和根韧皮部入药, 扩大药用资源.

关键词: 黑龙骨; 杠柳毒苷; 质量分数

中图分类号: S718.43

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)02-0008-06

黑龙骨(*Periploca forrestii* Schltr.)为萝藦科(Asclepiadaceae)杠柳亚科(Subfam. Periplocoideae K. Schum)杠柳属(*Periploca* Linn.)藤状灌木^[1]. 黑龙骨作为西南地区著名的民族药, 在不同的地方有不同的别称, 在云南被称为滇杠柳, 在贵州被称为黑骨藤, 重庆、四川被称为黑龙骨或黑骨头, 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》(以下简称标准)以黑骨藤收录此药, 标准中记录黑龙骨以秋、冬两季采挖的干燥根或全株入药^[2]. 黑龙骨药用历史悠久, 苗族、布依族、仡佬族等少数民族均有使用此药的文献记录^[3].

黑龙骨具有舒筋活络、祛风除湿、清热解毒等作用, 现代药理学研究还表明黑龙骨具有强心、抗炎、镇痛和抗肿瘤活性等作用^[4-8]. 杠柳毒苷(periplocin)是黑龙骨的主要化学成分, 具有强心作用, 亦称为杠柳苷 G(periploside G)^[9]. 药学著作《神农本草经》中论述中草药内在化学成分“或取其气, 或取其味, 或取其色, 或取其形, 或取其质, 或取其性情, 或其所生之时, 或其所产之地”^[10-11], 故中草药有效成分的形成也与其产地的生态环境是息息相关的, 因而杠柳毒苷的形成也与黑龙骨的产地生态环境密不可分. 以往的黑龙骨有效成分研究多侧重于杠柳毒苷质量标准的制定^[12], 并未系统地研究云南、贵州、四川、重庆 4 个地区黑龙骨中杠柳毒苷质量分数的差异. 本研究对这 4 个地区及黑龙骨不同部位样品中杠柳毒苷的质量

① 收稿日期: 2016-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30560113); 高等学校学科创新引智计划项目(B12006).

作者简介: 坚玲玲(1990-), 女, 甘肃天水人, 硕士研究生, 主要从事药用植物学的研究.

通信作者: 高洁, 博士, 教授.

分数进行分析, 以期为黑龙骨资源的合理开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及处理

移栽材料收集于西南大学实验基地(2008—2009 年从云南丽江、贵州黄果树、四川青城山、重庆金佛山 4 个主产地移栽种植), 野生材料由主产地野外采集, 样品取样选择地径相同的植株。所有材料经重庆市药用植物种植研究所刘正宇研究员与西南大学高洁教授鉴定和确认。详细情况见表 1。

新鲜植株采集后去除泥沙, 将植株分叶、茎韧皮部、茎木质部、根韧皮部、根木质部 5 个部分, 置于电热恒温鼓风干燥箱 40 °C 烘至恒质量, 粉碎, 过 100 目筛, 粉末备用。

表 1 黑龙骨样品信息

供试材料	采样地点	纬度/N	经度/E	海拔/m	生境
移栽材料	西南大学实验基地	29°81'47"	106°41'05"	293	阳坡
野生材料	云南 云南丽江	26°58'30"	100°10'13"	3 096	阳坡
	贵州 贵州黄果树	25°59'20"	105°40'13"	916	阳坡
	四川 四川青城山	30°53'54"	103°33'40"	1 032	阳坡
	重庆 重庆金佛山	29°04'08"	107°12'55"	1 269	阳坡

1.2 仪器与试剂

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(包括 SPD-20A 紫外检测器, 自动进样器), 日本岛津公司; ODS-2 HYPERSIL C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 赛默飞世尔科技(中国有限公司); 甲醇(色谱纯), 天津市光复精细化工研究所; 乙腈(色谱纯), 国药集团化学试剂有限公司; 本实验用水为超纯水(Ultra pure 系列超纯水机), 上海和泰仪器有限公司; 杠柳毒苷对照品(批号 30/081020, 纯度≥98.0%), 上海标准生物科技有限公司。

1.3 杠柳毒苷质量分数测定方法

采用高效液相色谱法进行测定^[13]。

1.3.1 标准曲线的制作及色谱条件

称取杠柳毒苷对照品 4.8 mg, 置于 10 mL 容量瓶, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 480 mg/L 对照品溶液, 用甲醇稀释成质量浓度为 4.8, 9.6, 19.2, 48.0, 96.0, 192.0 mg/L 的对照品溶液, 以杠柳毒苷标准品浓度(x)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标绘制回归曲线。实验所得杠柳毒苷的回归曲线为 $y=13\ 017x+3\ 165.1$ ($r=0.999\ 9$), 表明杠柳毒苷在 4.8~192.0 mg/L 时线性关系良好。

色谱条件: 流动相为乙腈: 水(26:74), 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 220 nm, 柱温 25 °C。

1.3.2 HPLC 检测

称取药材粉末 1 000 mg, 置 25 mL 锥形瓶中, 加 10 mL 60%(v/v) 甲醇浸提 24 h, 移入 10 mL 容量瓶, 60%(v/v) 甲醇定容, 微孔滤膜(0.45 μm) 过滤, 即得供试品溶液。HPLC 检测, 进样量 10 μL, 3 次重复。以外标法计算不同产地及不同部位杠柳毒苷质量分数。

1.4 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理, Microsoft Excel 软件作图。

2 结果分析

根据 1.3 项下杠柳毒苷测定方法及质量分数计算方法, 得杠柳毒苷对照品及样品 HPLC 图(图 1)。

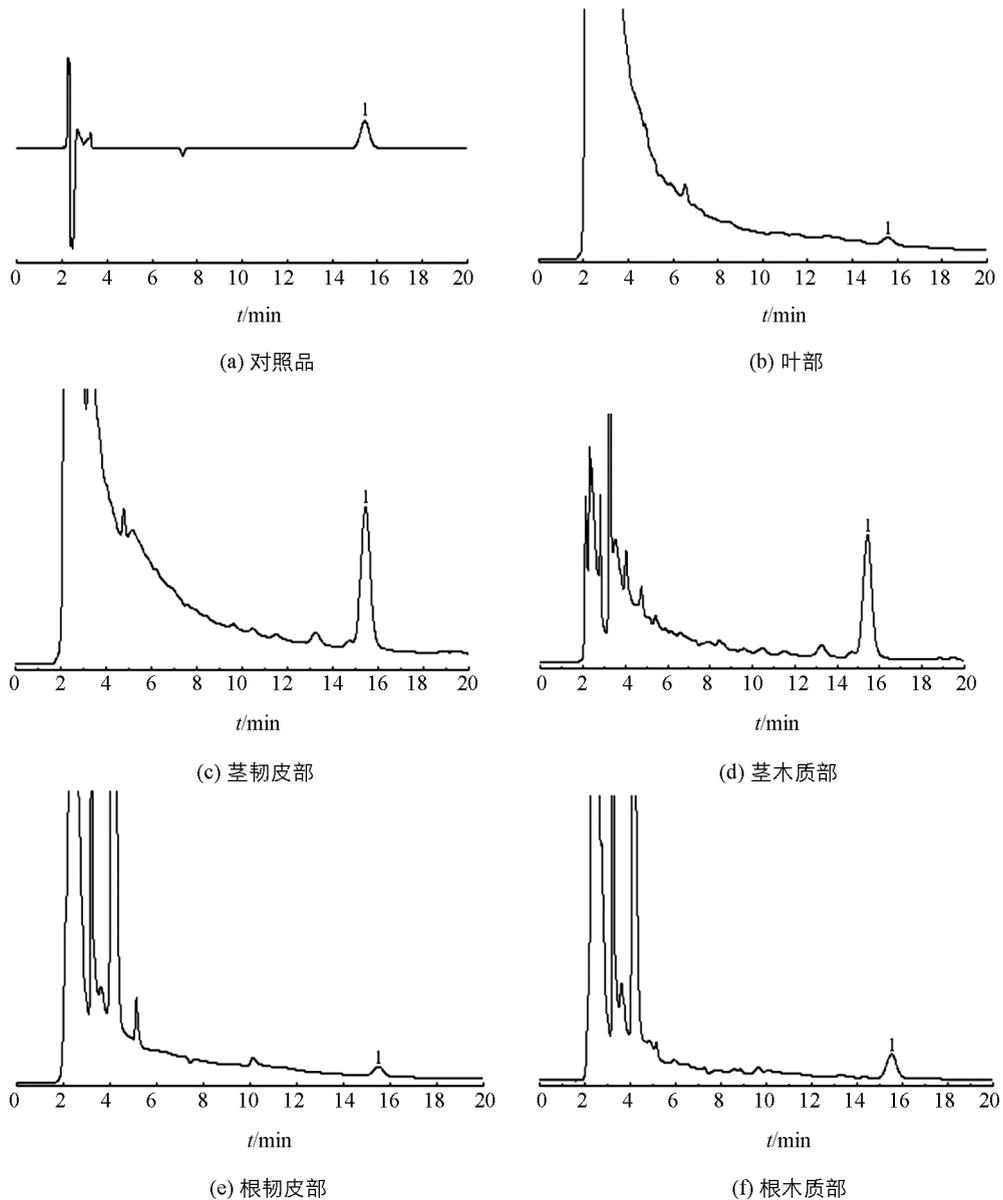


图 1 杠柳毒苷对照品及黑龙骨不同部位样品的 HPLC 图

2.1 同一移栽黑龙骨不同部位杠柳毒苷质量分数比较

由表 2 可知, 4 个材料中云南移栽材料根木质部杠柳毒苷质量分数最高为 2.24 mg/g, 与该材料其他部位的杠柳毒苷质量分数差异有统计学意义. 贵州、重庆移栽材料的根韧皮部杠柳毒苷质量分数与同材料茎木质部和茎韧皮部杠柳毒苷质量分数差异有统计学意义. 与其他部位相比 4 个移栽材料叶部的杠柳毒苷质量分数均最低(贵州移栽除外), 其中四川移栽材料叶中杠柳毒苷质量分数最低, 只有 0.04 mg/g.

表 2 移栽材料不同部位杠柳毒苷质量分数方差分析

/(mg · g⁻¹)

部位	云南移栽	贵州移栽	重庆移栽	四川移栽
叶	0.07 ± 0.031Dd	0.21 ± 0.155Bb	0.12 ± 0.071Bb	0.04 ± 0.011Bb
茎韧皮部	1.23 ± 0.257Bb	0.13 ± 0.076Bb	0.42 ± 0.409Bb	0.09 ± 0.003Bb
茎木质部	0.34 ± 0.006Cc	0.20 ± 0.046Bb	0.19 ± 0.089Bb	0.05 ± 0.007Bb
根韧皮部	0.29 ± 0.002Cc	0.69 ± 0.112Aa	1.41 ± 0.080Aa	0.25 ± 0.118Bb
根木质部	2.24 ± 0.004Aa	0.31 ± 0.063Bb	1.14 ± 0.057Aa	0.69 ± 0.337Aa

注: 表中大写字母不同表示 $p < 0.01$, 小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义.

同一移栽材料中杠柳毒苷质量分数在不同部位的分布规律由多到少一般为根(根韧皮部、根木质部),

茎(茎韧皮部、茎木质部),叶.

2.2 不同移栽黑龙骨同一部位杠柳毒苷质量分数比较

根据表 3, 4 个移栽材料叶中杠柳毒苷质量分数差异无统计学意义. 云南移栽材料茎韧皮部、茎木质部与根木质部中杠柳毒苷质量分数相比其他 3 个材料同一部位杠柳毒苷质量分数差异有统计学意义($p < 0.01$). 重庆移栽材料根韧皮部杠柳毒苷质量分数相比其他 3 个材料根韧皮部差异有统计学意义($p < 0.01$).

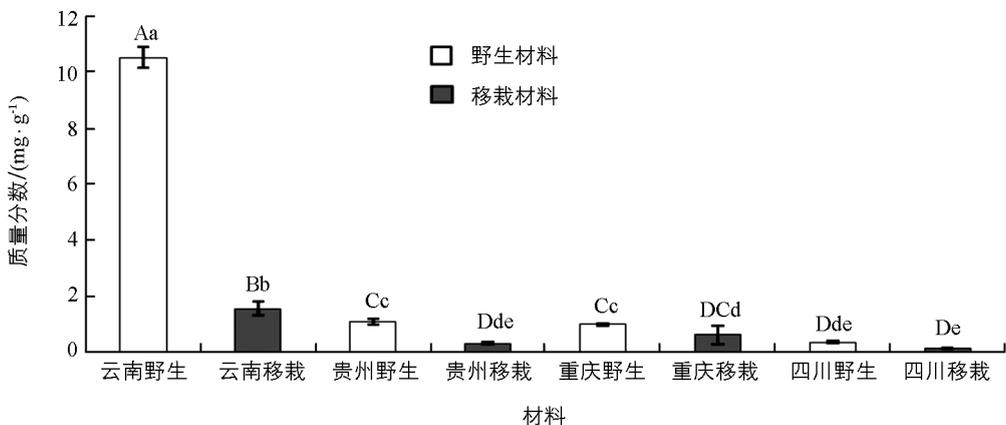
表 3 不同移栽材料同一部位杠柳毒苷质量分数多重比较

材料(I)	材料(J)	叶	茎韧皮部	茎木质部	根韧皮部	根木质部
云南移栽	贵州移栽	0.092	0.000a	0.009a	0.001a	0.000a
	重庆移栽	0.505	0.003a	0.008a	0.000a	0.000a
	四川移栽	0.653	0.000a	0.000a	0.573	0.000a
贵州移栽	云南移栽	0.092	0.000a	0.009a	0.001a	0.000a
	重庆移栽	0.258	0.170	0.917	0.000a	0.000a
	四川移栽	0.044b	0.856	0.008a	0.000a	0.026b
重庆移栽	云南移栽	0.505	0.003a	0.008a	0.000a	0.000a
	贵州移栽	0.258	0.170	0.917	0.000a	0.000a
	四川移栽	0.278	0.129	0.009a	0.000a	0.014b
四川移栽	云南移栽	0.653	0.000a	0.000a	0.573	0.000a
	贵州移栽	0.044b	0.856	0.008a	0.000a	0.026b
	重庆移栽	0.278	0.129	0.009a	0.000a	0.014b

注: a 表示 $p < 0.01$, b 表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义.

2.3 移栽与野生黑龙骨茎部杠柳毒苷总质量分数比较

根据图 2, 将不同产地黑龙骨茎部杠柳毒苷总质量分数进行显著性分析, 云南野生材料茎部杠柳毒苷质量分数远远大于其他材料, 为 10.54 mg/g, 差异有统计学意义; 茎部杠柳毒苷总质量分数分布规律由多到少为云南野生材料, 贵州野生材料, 重庆野生材料, 四川野生材料. 除云南移栽外, 其余 3 个移栽材料的茎部杠柳毒苷质量分数差异无统计学意义. 来自于同一产地野生黑龙骨茎部杠柳毒苷总质量分数高于移栽材料.



图中大写字母不同表示 $p < 0.01$, 小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义.

图 2 移栽与野生黑龙骨茎部杠柳毒苷总质量分数比较

3 讨论

黑龙骨不同部位化学成分类似^[14],但质量分数存在一定的差异.根据本实验测定结果,28份不同产地黑龙骨药材、不同材料部位中杠柳毒苷的质量分数,最低为四川移栽叶部,只有0.04 mg/g,最高为云南野生茎韧皮部,质量分数为5.70 mg/g.同一材料叶部的杠柳毒苷质量分数最低,根部质量分数最高,这与刘菟等^[15]的报道一致.

不同产地野生材料之间茎部杠柳毒苷总质量分数,由多到少依次为云南野生材料,贵州野生材料,重庆野生材料,四川野生材料,4个移栽材料茎部杠柳毒苷总质量分数亦有差异,但其差异无统计学意义,说明不同地域的形态、土壤、水分、气温和光照等诸生态环境不同使黑龙骨同一部位的杠柳毒苷质量分数也有所变化^[16-17].

以往的研究中并未在黑龙骨叶部检测出杠柳毒苷的存在^[18],根据本实验结果,黑龙骨叶中含有杠柳毒苷,因此黑龙骨叶片也可以作为杠柳毒苷提取物的制备原料,从而扩大药用资源.

云南丽江地处青藏高原和云贵高原的过渡区,气候属低纬度高原季风气候,采样点海拔为3 096 m,气温低,昼夜温差可达12~20℃,年平均降水量1 100 mm左右,无霜期303.2 d,黑龙骨生长发育期长.阳光充足,平均全年日照时数为2 500 h,紫外线强,采样地为棕壤土,pH值为5~6,自然肥力较强,营养物质积累多,有利于次生代谢产物杠柳毒苷的产生与合成.西南大学实验基地地处重庆北碚,属亚热带季风湿润气候,平均气温18℃,年降水量1 203 mm,无霜期334 d,平均全年日照时数为1 073 h^[19].说明云南丽江适宜黑龙骨的生长,对将云南丽江黑龙骨移栽至西南大学实验基地后杠柳毒苷质量分数下降的问题,需要从后续的分子生物学方面进行研究.

传统中医药理论认为,茎木类药材一般在秋季采收时有效成分质量分数较高^[20-21],本实验用材料均为秋季采收,究竟春、夏季节的质量分数差异有无统计学意义有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:北京科学出版社,1997.
- [2] 徐树芸.贵州十种民族药的应用研究[J].世界科学技术(中医药现代化),2006,8(6):73-78.
- [3] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳:贵州科技出版社,2003.
- [4] 邓士贤,王德成,王懋德,等.滇杠柳甙的强心作用[J].药学报,1964,11(2):75-79.
- [5] 陈庆,靳风云,陈华国,等.苗族黑骨藤有效部位的筛选研究[J].中国民族民间医药杂志,2005(3):163-165.
- [6] 陈庆,陈华国,靳风云,等.苗药黑骨藤有效部位的筛选研究(二)[J].中国民族民间医药杂志,2006(1):49-51.
- [7] 李晶晶,代云龙,杨耀敏,等.黑骨头抗炎镇痛作用的实验研究[J].云南中医中药杂志,2008,29(1):35-36.
- [8] WANG Jin, WANG Cui-fang, CHEN Jin-xiong, et al. Chemical Constituents of *Periploca forrestii* and Their Cytotoxicity Activity[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 34(24): 3214-3216.
- [9] 张援虎,王锋鹏.杠柳属植物化学成分研究进展[J].天然产物研究与开发,2003,15(2):157-161.
- [10] 黄爽.神农本草经[M].北京:中医古籍出版社,1982:342.
- [11] 张重义,林文雄,林瑞余.中国道地药材研究现状与展望[J].亚热带农业研究,2007,3(4):258-262.
- [12] 孙巍,刘虹,杨虹,等.HPLC测定强心胶囊中杠柳毒苷的含量[J].中成药,2007,29(2):299-301.
- [13] 张宏,袁德彬,赵爱萍.HPLC测定不同产地黑骨藤中杠柳毒苷的含量[J].药物分析杂志,2012,32(2):241-244.
- [14] 朱欣婷.黑龙骨的化学成分研究[D].贵阳:贵州大学,2007.
- [15] 刘菟,石丹,钟可,等.黑骨藤的质量研究[J].湖南中医药大学学报,2007,27(S1):110-111.

- [16] 陈华国, 周 欣, 曹桂红, 等. HPLC 测定黑龙骨中槲皮素-3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖苷含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(10): 1284—1286.
- [17] 齐蕴清. 浅谈中药材的道地性 [J]. 山东中医杂志, 2009, 28(1): 59—60.
- [18] 刘 虹, 杨 虹, 郭俊华, 等. 杠柳不同部位的杠柳毒苷含量 [J]. 中药材, 2006, 29(7): 656—657.
- [19] 陈志军, 查书平, 高阳华, 等. 重庆市日照时间变化规律和特征分析 [J]. 南通大学学报(自然科学版), 2008, 7(2): 55—59.
- [20] 韩宁宁, 郑 芳. 不同采收期忍冬藤中马钱苷含量分析 [J]. 儿科药学杂志, 2013, 19(3): 47—49.
- [21] 杨 丽. 中药学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 7—8.

Changes of Periplocin Contents in Different Parts of *Periploca forrestii* from Different Origins

JIAN Ling-ling, GAO Jie, ZHANG Jian-fei, JIANG Yan-hua

School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Object: To analyze the distribution of periplocin in different parts of *Periploca forrestii* plants originating from different places so as to provide a basis for the rational use of this traditional Chinese medicinal plant species. Methods: High performance liquid chromatography (HPLC) was adopted to determine the periplocin contents of 28 samples of *P. forrestii* collected from different origins. Results: A comparison of the wild species samples from different origins showed that wild *P. forrestii* originating from Yunnan had the highest total periplocin content in the stem, followed in order by those from Guizhou, Chongqing and Sichuan. For *P. forrestii* plants from the same place of origin, the highest contents of periplocin were found in the xylem of the root (0.31—2.24 mg/g), followed by the phloem of the root (0.25—1.41 mg/g), the phloem of the stem (0.09—1.23 mg/g) and the xylem of the stem (0.05—0.34 mg/g), and the leaves of the plant had the lowest periplocin content (0.04—0.21 mg/g). Conclusion: It is also recommended that the stem phloem and xylem, and the root phloem of *P. forrestii* plants be used as medicine so as to expand our medicinal resources.

Key words: *Periploca forrestii*; periplocin; content

责任编辑 周仁惠

