

人参根三醇组皂苷元 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 的 HPLC/ELSD 法测定及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

徐磊^{1,2}, 杨宁³, 关健², 崔炯谟^{1*}, 赵余庆^{3,4*}

1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000

2. 辽宁新中现代医药有限公司, 辽宁 沈阳 110041

3. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

4. 基于靶点药物设计与研究教育部药物重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 建立 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 同步检测的方法; 从人参根皂苷水解产物中筛选发现具有降血糖活性的三醇组皂苷元。方法 采用 HPLC-ELSD 法测定 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT; 采用体外实验测定 4 种皂苷元对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。结果 HPLC-ELSD 测定结果表明, 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 在 0.05~1.0 mg 具有良好的线性关系, 回收率分别为 95.0%、98.4%、103.3%和 96.0%, RSD 分别为 1.05% ($n=4$)、1.87% ($n=4$)、2.15% ($n=4$) 和 1.15% ($n=4$), 质量分数分别为 8.07%、4.55%、1.46%和 4.53%。4 种皂苷元对 α -葡萄糖苷酶呈现出不同强度的抑制活性, 25-OH-PPT 抑制活性强于阿卡波糖。结论 4 种皂苷元降血糖活性强弱顺序为 25-OH-PPT>25-OCH₃-PPT>PPT>PT。HPLC/ELSD 测定方法简单、快速、有效。

关键词: 人参皂苷元; α -葡萄糖苷酶; HPLC/ELSD; 25-OH-PPT; 25-OCH₃-PPT; PPT; PT

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)05-0793-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.05.017

Simultaneous determination 25-OH-PPT, 25-OCH₃-PPT, PPT, and PT by HPLC-ELSD and its inhibition on α -glucosidase activities

XU Lei^{1,2}, YANG Ning³, GUAN Jian², CUI Jiong-mo¹, ZHAO Yu-qing^{3,4}

1. School of Pharamay, Yanbian University, Yanji 133000, China

2. Liao ning Xin zhong Modern Pharmaceutical Company, Shenyang 110041, China

3. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

4. Key Laboratory of Structure-based Drug Design and Discovery, Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To determine the inhibitory activity of rare ginsenosides on α -glucosidase, and to select hypoglycemic compounds from ginsenosides. Meanwhile, to establish a method to determinate the contents of ginsenoside 25-OH-PPT, 25-OCH₃-PPT, PPT, and PT in hydrolysis products of total saponins in ginseng roots. **Results** The inhibitory activity of ginsenosides on α -glucosidase revealed that the inhibitory activities of 25-OH PPT, 25-OCH₃-PPT, PPT, and PT were better than that of positive drug acarbose while PT was worse than acarbose. Meanwhile, HPLC-ELSD results revealed that 25-OH PPT, 25-OCH₃-PPT, PPT, and PT showed good linear relationship in the region of (0.05—1.0) mg/mL. The recoveries were 95.0%, 98.4%, 103.3%, and 96.0%, respectively, RSD values were 1.05% ($n=4$), 1.87% ($n=4$), 2.15% ($n=4$), and 1.15% ($n=4$), respectively, and the content are 8.07%, 4.55%, 1.46%, and 4.53% respectively. **Conclusion** The order of their hypoglycemic activity is 25-OH-PPT > 25-OCH₃-PPT > PPT > PT. Assay method of HPLC/ELSD is simple, fast, and effective.

Key words: ginsenosides; acid hydrolytic; HPLC/ELSD; 25-OH-PPT; 25-OCH₃-PPT; PPT; PT

收稿日期: 2016-03-04

基金项目: 中药标准提取物的工业化色谱制备平台建设 (2009ZX09301-012-105B); 天然活性成分的工业化色谱制备公共服务平台 (2011412004-7)

作者简介: 徐磊 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然活性产物的发现与活性研究。Tel: 18246691730, E-mail: 18246691730@163.com

*通信作者 赵余庆, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事天然药物和药食同源品的活性成分研究。Tel: (024)23986522 E-mail: zzyq4885@126.com
崔炯谟 (1956—), 男, 教授, 朝鲜族, 主要从事生药学与抗溃疡天然药物活性成分研究。Tel: (0433)2732016

E-mail: cuijiongmo@yahoo.com.cn

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 在亚洲拥有数千年的用药历史,具有大补元气、补脾益肺、生津止渴、安神增智等功效。现代药理学研究表明,人参中的主要成分为人参皂苷,人参皂苷具有降血糖、抗肿瘤、抗炎、抗氧化和抑制细胞凋亡等药理活性^[1-2]。人参根中主要含有的皂苷为三醇型人参皂苷,如人参皂苷 Re、Rg₁、Rh₁ 等。临床资料显示,与其他具有降糖功能的中药相比,人参是被研究得最多的一种中药材^[3]。Xie^[4]用 *ob/ob* 小鼠为模型,连续腹腔给药 12 d,结果证实人参皂苷 Re 可以明显降低小鼠的血糖水平,提高葡萄糖耐受能力。有研究表明^[5],人参皂苷 Rb₁ 能够促进 C2C12 骨骼肌细胞和 3T3-L1 脂肪细胞对葡萄糖的利用;人参总皂苷及人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rg₃、Re、Rh₁ 对 α -葡萄糖苷酶均有显著的抑制作用,且强于阳性对照阿卡波糖 3~10 倍^[6]。Han^[7]发现人参皂苷代谢物之一 20S-原人参三醇 (PPT) 能够增加 PPAR γ 转录活性,表明 PPT 可被用作 PPAR γ 激动剂,能够改善糖尿病相关的胰岛素抵抗。叶银^[8]将 3T3-L1 脂肪细胞在胰岛素和人参皂苷 Rg₁ 共培养的情况下,胰岛素呈剂量相关性降低 3T3-L1 脂肪细胞脂联素 mRNA 表达,从而表明人参皂苷 Rg₁ 能够促进脂肪组织的生成,进而促进脂肪对周围环境中葡萄糖的摄入和消耗,从而达到降糖作用。

本课题组前期有关人参皂苷类成分抗肿瘤活性的构效关系研究结果表明,人参皂苷元的活性大于皂苷。25-OH-PPT 和 25-OCH₃-PPT 是本课题组首次从人参茎叶和人参果中发现的三醇型人参皂苷元(图 1)^[9-10],它们的降血糖活性及与 PPT、PT(图 1)、人参皂苷 Rg₁ 活性比较和构效关系分析未见研究。同样对 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 的 HPLC/ELSD 同步检测也未见报道。

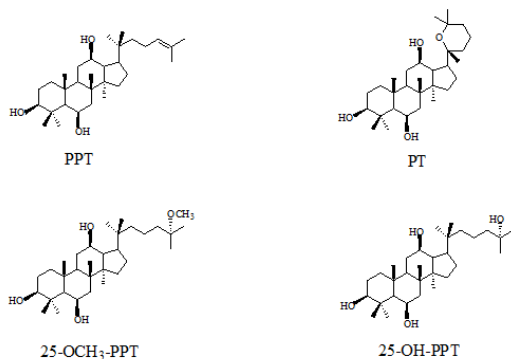


图 1 4 种人参皂苷元的结构

Fig. 1 Chemical structures of four ginseng sapogenins

1 HPLC/ELSD 法同时测定 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT

1.1 材料

人参根总皂苷(辽宁抚顺鑫田人参保健品有限公司,批号 GL130412)。水解制备参考文献方法^[11]。

1.2 器材和试剂

K-501 液相色谱仪(德国诺尔公司);UM-3000 蒸发光检测器(上海通威公司);XWK-34 空气压缩机(天津华生分析仪器有限公司);JS-3050 色谱工作站(大连江申)。人参皂苷元 25-OH-PPT^[9]、25-OCH₃-PPT^[10]、PPT^[12]和 PT^[13]实验室自制,纯度分别为 99.23%、99.36%、99.16%和 99.03%。甲醇(HPLC 级试剂);实验用水为二次蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

1.3 方法和结果

1.3.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C₁₈ (150 mm × 4.5 mm, 5 μ m), 进样体积 20 μ L, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 体积流量 1.0 mL/min;流动相为甲醇(A)-H₂O(B), 梯度洗脱程序: 0~30 min, 70% A; 30~63 min, 80%; ELSD 气化室温度 50 $^{\circ}$ C, 载气体积流量 3 L/min, 空白溶剂、所得混标色谱图与人参根酸水解产物色谱图见图 2。

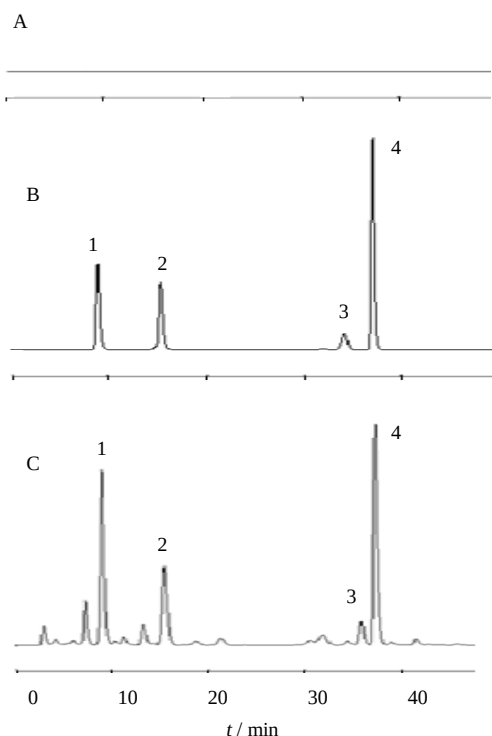
1.3.2 标准品溶液的配制 精确称取 4 种对照品 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 各 1.0 mg, 将其置于 1 mL 量瓶中用甲醇定容,得到质量浓度分别为 1.0、1.0、1.0、1.0 mg/mL 混和对照品储备液。

1.3.3 供试品溶液的制备 精确称取人参根皂苷酸水解产物 10 mg, 将其置于 1 mL 量瓶中用甲醇定容,得到质量浓度为 10 mg/mL 供试品储备液,过 0.45 μ m 滤膜备用。

1.3.4 标准曲线 分别取上述配好的混和对照品储备液稀释得到一系列不同浓度混和对照品操作溶液。进样量 20 μ L, 以样品质量浓度(C)为横坐标, 以峰面积(A)为纵坐标作线性回归, 4 种人参皂苷在所配标准溶液的质量浓度在 0.05~1.0 mg/mL 与峰面积线性关系良好, 线性回归方程见表 1。

1.3.5 精密度实验 精密吸取含 4 种对照品 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 储备液 20 μ L, 1 d 内连续进样 6 次, 其日内精密度 RSD 分别为 1.62%、1.92%、1.86%和 1.57%。

1.3.6 稳定性实验 精确吸取人参根供试品溶液 20 μ L, 分别在 0、2、4、6、8 h 用高效液相色谱进行测定, 计算各峰的峰面积, 各皂苷的 RSD 分别为



1- 25- OH- PPT; 2- 25-OCH₃-PPT; 3- PPT; 4- PT

图2 空白溶剂(A)、混合对照品(B)及样品(C)

HPLC/ELSD 色谱图

Fig. 2 HPLC/ELSD of blank solvent (A), mixed references (B), and samples (C)

表1 4种皂苷元的标准曲线

Table 1 Calibration curves of sapogenins

人参皂苷元	回归方程	r
25-OH-PPT	$A = 2 \times 10^6 X - 96\ 208$	0.999 4
25-OCH ₃ -PPT	$A = 2 \times 10^6 X - 80\ 737$	0.999 6
PPT	$A = 1 \times 10^6 X - 40\ 411$	0.999 3
PT	$A = 5 \times 10^6 X - 21\ 982$	0.999 5

1.69%、2.85%、2.39%、0.36%。

1.3.7 重复性实验 精密称取人参根酸水解产物 6 份, 按“1.3.3”项下方法制备供试品溶液, 分别测定 6 份样品中 4 个皂苷的量, 其 RSD 分别为 1.57%、2.48%、2.19%和 0.36%。

1.3.8 回收率实验 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 实验所得回收率分别为 95.0%、98.4%、103.3%、96.0%, RSD 在 1.05%~2.15%。

1.3.9 样品分析 取样品按照“1.3.3”项下方法平行制备 3 份供试品溶液, 采用外标法计算, 测定的样品中 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 的量分别为 (8.07±0.02) %、(4.55±0.06) %、(1.46±0.22) %、(4.53±0.62) %。

2 酶活性实验

2.1 材料

人参皂苷元 25-OH-PPT^[9]、25-CH₃-PPT^[10]、PPT^[12]和 PT^[13]实验室自制, 质量分数分别为 99.23%、99.36%、99.16%和 99.03%。阿卡波糖(德国拜耳公司, 批号 H19990205)。

2.2 方法

精密称取 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 和 Rg₁ 等 5 种稀有人参皂苷和阿卡波糖, 用 50% DMSO 溶解后配成质量浓度为 10 mg/mL 的标准液。用 50% DMSO 逐级稀释成质量分数为 5.00、2.50、1.25、0.62、0.31 mg/mL 的样品溶液, 待用。

活性实验方法主要参考文献方法^[14-15]并进行适当修改, 以对硝基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)为反应底物, 其原理为通过检测 PNPG 与 α-葡萄糖苷酶反应生成的黄绿色对硝基苯酚(PNP)溶液的吸光度(A)来判断样品抑制活性。取 PNPG (50 mmol/L) 150 μL 加入 800 μL 磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.0), 再加入 20 μL 样品溶液, 空白对照用 50% DMSO 代替。37 °C 孵化 5 min 后, 加入 α-葡萄糖苷酶 (2.0 U/mL) 30 μL, 再次孵化 30 min, 加 2 mL 碳酸钠缓冲液(pH 6.9)结束反应。将各样品分别取 150 μL 转入 96 孔板, 405 nm 下测定 A 值, 计算抑制率。

抑制率 = (空白组 A 值 - 测试样品 A 值) / 空白组 A 值

2.3 结果

不同质量浓度样品对 α-葡萄糖苷酶抑制活性见图 3、4, 25-OCH₃-PPT、25-OH-PPT 和 PPT 对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性明显强于阿卡波糖, 而人参皂苷 Rg₁ 和 PT 对 α-葡萄糖苷酶均表现出一定的抑制活性, 且它们抑制活性均呈质量浓度相关关系, 当质量浓度大于 2.50 mg/mL 时, 其抑制活性的增长趋势趋于平缓。通过比较线下面积和半抑制质量浓度可知, 5 种稀有皂苷和阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制能力为: 25-OH-PPT > 25-OCH₃-PPT > PPT > 阿卡波糖 > Rg₁ > PT。

3 讨论

人参皂苷的活性成分作为一种潜在的降血糖药物一直受到人们的关注, 人参皂苷 25-OH-PPT、25-OCH₃-PPT、PPT、PT 都是来自于人参根酸水解产物的降血糖活性成分。现代药理学研究发现, 对 α-葡萄糖苷酶的抑制可以有效缓解 2 型糖尿病患者餐后的高血糖症状。西方医学通过化学合成法寻找 α-葡萄糖苷酶抑制剂取得了一定进展^[16-17], 而寻找

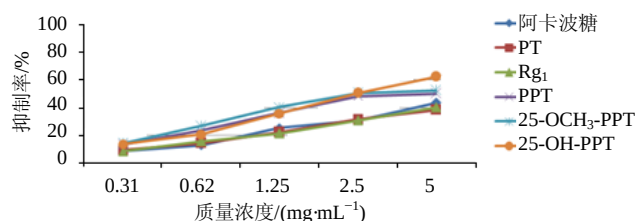


图3 5种人参皂苷对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

Fig. 3 Inhibitory activities of five kinds of rare ginsenosides on α -glucosidase

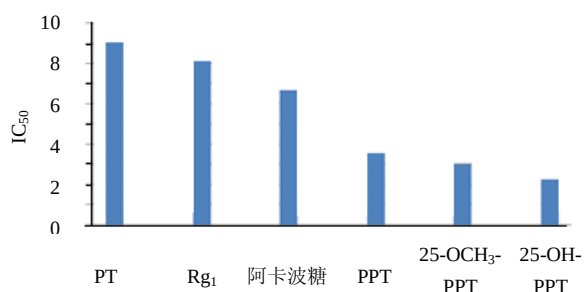


图4 5种稀有人参皂苷与阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50}

Fig. 4 IC_{50} values of five kinds of rare ginsenosides and acarbose on α -glucosidase

安全、有效的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂更是备受关注^[18-21]。本研究通过测定以上4种人参皂苷元 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,发现作用强于阿卡波糖的25-OH-PPT和其类似物。利用HPLC-ELSD测定没有紫外吸收的人参皂苷元显示出快速、准确、简便等特点。上述结果表明为人参降血糖创新药物和保健食品的研发提供了科学依据。

参考文献

- [1] 何道同, 王兵, 陈珺明. 人参皂苷药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 07: 118-121.
- [2] 赵琛, 苏光悦, 赵余庆. 人参皂苷及其衍生物抗结肠癌作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2477-2483.
- [3] Vuksana V, Sievenpiper J L. Herbal remedies in the management of diabetes: Lessons learned from the study of ginseng [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005, 15: 149-1601.
- [4] Xie J T, Mehendale S R, Li X M, et al. Anti-diabetic effect of ginsenoside Re in ob/ob mice [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1740: 319-325.
- [5] Shang W. Ginsenoside Rb₁ stimulates glucose uptake through insulin-like signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Endocrinol*, 2008, 198(3): 561-569.

- [6] 宋纯清. 人参皂苷类成分在制备抑制 α -葡萄糖苷酶活性药物上的应用 [P]. 中国: CN200910194673, 2011-09-5.
- [7] Han K L, Jung M H. Ginsenoside 20S-protopanaxatriol (PPT) activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(1): 110.
- [8] 叶银. 体外胰岛素和人参皂甙 Rg₁ 对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素 mRNA 表达的影响 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [9] 赵余庆, 袁昌鲁, 傅玉琴, 等. 人参茎叶中微量三萜化合物的化学研究 [J]. 药学报, 1990, 25(4): 299-301.
- [10] Zhao J M, Li N, Zhang H, et al. 2011. Novel dammaranetype sapogenins from *Panax ginseng* berry and their biological activities [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 1027-1031.
- [11] 陈业高, 吕瑜平, 桂世鸿. 三七叶甙制备原人参二醇及其差向异构体 [J]. 精细化工, 2003, 20(7): 425-426.
- [12] 于明, 赵余庆. 人参果中三萜类成分的化学研究 [J]. 中草药, 2004, 11(35): 1221-1223.
- [13] 王丹, 柴瑞华, 赵余庆. 人参果总皂苷水解产物中稀有活性皂苷元化学研究 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(1): 12-14.
- [14] Wang H, Du Y J, Son H C, et al. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves [J]. *Food Chem*, 2010, 123(1): 6-13.
- [15] 康文艺, 张丽, 宋艳. 茜草抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1104-1107.
- [16] 张秋兰. 二甲双胍与阿卡波糖治疗2型糖尿病疗效比较 [J]. 现代医院, 2009, 4(6): 20-23.
- [17] 王吉影, 顾耀, 徐乃馨, 等. 阿卡波糖和伏格列波糖治疗2型糖尿病的比较 [J]. 同济大学学报, 2001, 22(2): 32-35.
- [18] John Y C, Liza I, Memg H T, et al. Effects of thiazolidinediones on the triad of type 2 diabetes mellitus, insulin resistance and cardiovascular disease [J]. *Diab Res Clin Pract*, 2007, 78(3): 3-13.
- [19] Han K L, Jung M H, Sohn J H, et al. Ginsenoside 20S-protopanaxatriol (PPT) activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006(29): 110-113.
- [20] Attele A S, Wu J A, Yuan C S, et al. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(11): 1685-1693.
- [21] Yokozawa T, Kobayashi T, Oura H, et al. Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb₂ in streptozotocin-diabetic rats [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, (33): 869-872.