

HPLC-ELSD 法测定人参属药材不同部位中的 20(R)-25-羟基-原人参三醇

胡婉琦¹, 张瑜², 杨宁³, 王巍³, 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. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

4. 沈阳药科大学基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 在人参属资源中研究 20(R)-25-羟基-原人参三醇 [20(R)-25-OH-PPT], 为人参皂苷降血糖作用的创新和研发提供科学依据。方法 色谱柱 Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (70:30); 柱温 35 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; ELSD 气化室温度 87.0 ℃, 载气流速 2.20 L/min; 进样体积 10 μL。采用 HPLC-ELSD 法测定人参属植物不同部位提取物 (以丙酮为溶剂, 采用超声法提取) 中 20(R)-25-OH-PPT。结果 20(R)-25-OH-PPT 在 0.001~0.050 mg/mL 线性关系良好, 在人参茎叶、人参根、人参果、人参花、西洋参茎叶、西洋参根和三七芦头总皂苷中的量分别为 3.74%、2.59%、2.37%、0.40%、0.68%、0.22%和 0.39%, 回收率为 98.54%、97.54%、100.35%、101.46%、97.46%、99.14%和 99.38%。结论 20(R)-25-OH-PPT 存在于人参属植物多个部位中, 可作为人参皂苷降血糖作用开发利用的重要依据。

关键词: 高效液相色谱法; 蒸发光检测器; 超声提取法; 原人参三醇; 20(R)-25-羟基-原人参三醇

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)08-1401-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.026

Determination of 20(R)-25-OH-PPT in different parts of species in *Panax* Linn. by HPLC-ELSD methods

HU Wan-qi¹, ZHANG Yu², YANG Ning³, WANG Wei³, CUI Jiong-mo¹, ZHAO Yu-qing^{3,4}

1. School of Pharmacy, 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 For making full use of our country's rich ginseng resources to look for 25-OH-PPT and provide the scientific basis for the innovation and development of ginsenoside hypoglycemic activity. **Methods** Using chromatographic column Agilent C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase was CH₃OH-H₂O (70:30); Column temperature was 35 ℃; Flow rate was 1.0 mL/min; the boiling chamber temperature of ELSD was 87 ℃; Flow rate of carrier gas was 2.20 L/min; injection volume was 10 μL. Using acetone as the solvent and ultrasonic extraction to extract the medicinal materials, then using the HPLC-ELSD method to determine the contents of 20(R)-25-OH-PPT in different parts of plants in *Panax ginseng*. **Results** 20(R)-25-OH-PPT had a good linear relationship when the concentration was 0.001—0.05 mg/mL. The 20(R)-25-OH-PPT contents in ginseng cauline leaf, ginseng root, ginseng fruit, ginseng flower, cauline leaf of American ginseng, root of American ginseng, and the basal part of stem of *P. notoginseng* were 3.74%, 2.59%, 0.40%, 2.37%, 0.68%, 0.22%, and 0.39%. The recovery rates were 98.54%, 97.54%, 100.35%, 101.46%, 97.46%, 99.14%, and 99.38%. **Conclusion** 25(R)-OH-PPT exists in different parts of *P. ginseng*, and it can be an important basis for the use and development of ginsenoside with hypoglycemic activity.

Key words: high performance liquid chromatography; evaporative light scattering detectors; supersound extraction method; protopanaxatriol; 20(R)-25-OH-PPT

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: “十一五”国家重大新药创制 (2009ZX09102-114); 中药标准提取物的工业化色谱制备平台建设 (2009ZX09301-012-105B)

作者简介: 胡婉琦 (1992—), 女, 新疆塔城人, 在读硕士研究生。Tel: 18512403082 E-mail: 122254535@qq.com

*通信作者 赵余庆 (1957—), 男, 辽宁东港人, 教授, 博士生导师, 主要从事天然药化、药食同源品的活性成分研究。

Tel: (024)23986522 E-mail: zyuq4885@126.com

崔炯谟 (1956—), 男, 朝鲜族, 吉林龙井人, 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.、西洋参 *Panax quinquefolius* L. 和三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科 (Araliaceae) 人参属重要的药用植物, 收载于《中国药典》2015 年版^[1]。研究表明, 人参属植物含有多种化学成分, 其中人参皂苷是评价人参属植物品质的重要指标^[2], 其药理作用包括抗肿瘤^[3-8]、调节血糖^[9-12]、改善心血管功能^[13-15]、抗酒精肝^[16]和延缓衰老^[17-18]等。

人参皂苷在人参中分布广泛, 存在于植物的各个部位中, 但不同部位的人参皂苷量和组成各不相同^[19]。人参皂苷可分为 3 类, 分别是达玛烷型为主的四环三萜类, 以齐墩果酸为主的五环三萜类和其他类型, 而达玛烷型结构的人参皂苷又分为 2 类: 原人参二醇 (PPD) 型和原人参三醇 (PPT) 型。其中原人参三醇型人参皂苷^[20]主要包括人参皂苷 Re、Rg₁ 等。Quan 等^[21]发现人参皂苷 Re 能够通过感应孤儿核受体的小异二聚体伴侣分子 (SHP) 抑制肝葡萄糖的产生。Liu 等^[22]在四氧嘧啶糖尿病小鼠实验研究中发现人参皂苷 Rg₁ 可在一定的剂量范围内降低糖尿病小鼠的血糖。20(R)-25-羟基-原人参三醇 (20(R)-25-OH-PPT, 图 1) 是本课题组 1990 年首次从人参茎叶中发现的原人参三醇型新天然产物^[23], 2008 年又从人参果总皂苷水解产物中获得^[24], 但人参属植物地上其他部分是否含有 20(R)-25-OH-PPT 及其测定未见报道。本课题组大量的前期研究结果显示^[25], 20(R)-25-OH-PPT 具有较强的蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 和 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 表明人参皂苷 20(R)-25-OH-PPT 具有一定的降血糖和改善葡萄糖耐量的功能。

为了寻找 20(R)-25-OH-PPT 的廉价资源, 研制开发防治糖尿病的天然功能食品和创新药物, 本实验采用 HPLC-ELSD 方法, 对辽宁产人参属植物不同部位中的 20(R)-25-OH-PPT 进行了测定, 为人参属植物地上资源含有的 20(R)-25-OH-PPT 综合开发利用提供科学依据。

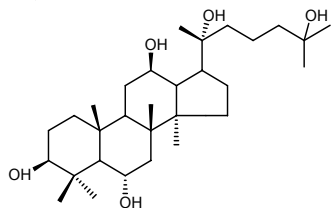


图 1 人参皂苷元 20(R)-25-OH-PPT 的结构

Fig. 1 Chemical structures of ginseng sapogenins 20(R)-25-OH-PPT

1 材料

1.1 仪器与试剂

K-501 液相色谱仪 (德国诺尔公司); ELSD-6000 蒸发光检测器 (美国奥泰公司); 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 (大连江申公司); RE-52A 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); BS124S 型分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); 数控超声波清洗器 KQ3200DB (昆山市超声仪器有限公司)。丙酮 (分析纯, 天津市凯信化学工业有限公司); 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 二次蒸馏水 (实验室自制)。

1.2 药材

人参茎叶总皂苷、人参花总皂苷、人参果总皂苷 (批号 GL130412) 购自辽宁省抚顺市鑫录参茸保健品有限公司; 人参根总皂苷 (批号 WE130402)、西洋参根总皂苷 (批号 AE130420) 购自本溪阳光保健品有限公司; 三七芦头总皂苷 (批号 WE130402) 购自云南文山州三七科学技术研究所; 西洋参茎叶总皂苷 (批号 AL130422) 购自大连天马制药有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相 甲醇-水 (70:30); 柱温 35 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; ELSD 气化室温度 87.0 $^{\circ}$ C, 载气体积流量 2.20 L/min; 进样体积 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定 10.0 mg 对照品 20(R)-25-OH-PPT 由实验室自制, 置于 10.0 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取上述溶液 1 mL, 置于 2.0 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称定人参茎叶、根、花和果总皂苷, 西洋参茎叶和根总皂苷、三七芦头总皂苷粉末各 1.00 g, 分别置于 100 mL 锥形瓶中, 精密加入丙酮 50 mL, 称定质量, 超声处理 1 h, 冷却至室温, 再次称定质量, 用丙酮补足减少的质量, 摇匀。将上清液减压浓缩后, 得到固体产物。精密称取 1.50 mg 固体产物, 置于 1.0 mL 量瓶中, 加甲醇溶解至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即为供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备

精密吸取“2.2”项中对照品溶液 1 mL 于 10 mL

量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 0.05 mg/mL 的对照品溶液,同法制备质量浓度为 0.001、0.005、0.01、0.025 mg/mL 的标准系列溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,记录色谱图。以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积

为纵坐标(Y),绘制标准曲线,进行线性回归计算,线性回归方程 $Y=1 \times 10^7 X+28\ 321$, $R^2=0.999\ 2$,结果表明 20(R)-25-OH-PPT 在质量浓度为 0.001~0.05 mg/mL 内线性关系良好。色谱图见图 2。

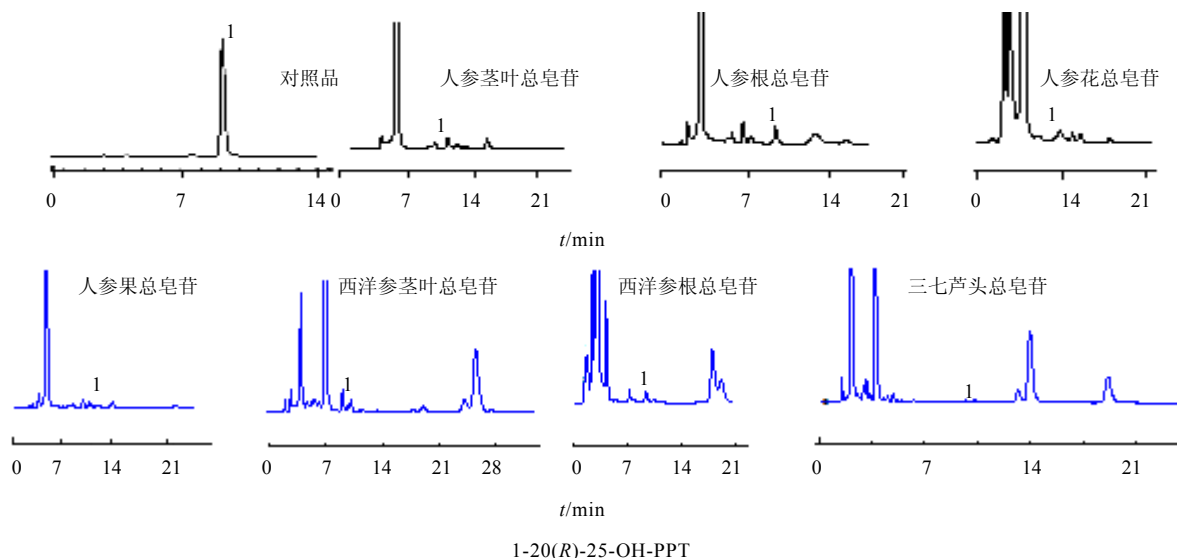


图 2 人参属植物不同部位样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of different parts of species of *Panax* Linn.

2.5 精密度试验

分别取同一对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次,记录峰面积,计算其精密度 RSD 为 1.88%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液,室温下放置,分别在 0、2、4、6、8、24 h 后进样分析,按“2.1”项色谱条件进行测定,记录峰面积,得人参茎叶、根、花和果总皂苷、西洋参茎叶和根总皂苷、三七芦头总皂苷峰面积 RSD 值分别为 1.82%、1.99%、1.92%、1.95%、1.77%、1.78%和 1.97%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批人参茎叶、根、花和果总皂苷、西洋参茎叶和根总皂苷、三七芦头总皂苷各 6 份,按“2.3”项下操作,分别平行制备 6 份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样分析,峰面积的 RSD 值分别为 1.82%、1.97%、1.93%、1.85%、1.96%、1.96%和 1.91%,表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已测定的同一批人参茎叶、根、花、果总皂苷,西洋参茎叶和根总皂苷,三七芦头总皂苷各 9

份,精密称定,分别含 20(R)-25-OH-PPT 为 3.74%、2.59%、0.40%、2.37%、0.68%、0.22%和 0.39%,每 3 份为一组。分别单独加入 1 mL,浓度比分别为 0.5:1、1:1、1.5:1 的对照品溶液,每次进样 10 μ L 进行测定。计算得人参茎叶、根、花和果总皂苷,西洋参茎叶和根总皂苷,三七芦头总皂苷中 20(R)-25-OH-PPT 的平均回收率分别为 98.54%、97.54%、101.46%、100.35%、97.46%、99.14%和 99.38%,RSD 值分别为 1.81%、1.68%、1.76%、1.87%、1.99%、1.84%和 1.92%,表明本方法有良好的准确度。

2.9 样品测定

取各批次样品,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,采用外标一点法计算,测定 7 个样品中 20(R)-25-OH-PPT 的量,其在人参茎叶、根、花和果总皂苷,西洋参茎叶和根、三七芦头总皂苷中的量分别为 3.74%、2.59%、0.40%、2.37%、0.68%、0.22%和 0.39%。可以看出不同植物的同一部位中,人参茎叶、根总皂苷中 20(R)-25-OH-PPT 的量分别高于西洋参茎叶、根总皂苷,而在人参中,20(R)-25-OH-PPT 的量在人参茎叶、根、花和果的总皂苷中依次递减。

3 讨论

人参和其中含有人参皂苷潜在的降血糖作用得到了广泛的研究和关注。从人参茎叶中发现的新天然产物 20(R)-25-OH-PPT 自 20 世纪 90 年代初至今关于该化合物的生物活性、来源分布及药学方面的研究未见报道。因此, 在人参属植物及不同部位中寻找天然存在的 20(R)-25-OH-PPT, 并开展系统的化学及生物学等方面的研究, 对于人参属植物新的药用资源的发现和综合利用及开发 20(R)-25-OH-PPT 的新医药用途和保健作用将具有重要的社会和经济意义。

本研究表明, 20(R)-25-OH-PPT 在人参茎叶、人参果及人参根中的量较高, 西洋参及三七中的各不同部位量较少。其中廉价的人参茎叶含有高质量分数的 20(R)-25-OH-PPT, 具有进行深入研究 and 开发的必要。

蒸发光检测器是一种通用型检测器, 只与样品的质量有关, 与有无紫外吸收无关。人参皂苷紫外吸收较弱, 故本实验采用了 HPLC-ELSD 法, 实现了对 20(R)-25-OH-PPT 的检测及不同来源的量进行了比较分析和评价, 为人参属植物及地上资源的充分开发利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 徐 静, 贾 力, 赵余庆. 人参的化学成分与人参产品的质量评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 199-203.
- [3] 刘雅飞, 崔玉娜, 赵余庆. 基于抗肿瘤活性的达玛烷型人参皂苷 (元) 结构修饰 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1203-1210.
- [4] 郭军辉, 刘雅飞, 赵余庆. 达玛烷-3 β , 12 β , 20, 25-四醇及其衍生物的抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2015, 25(1): 66-73.
- [5] 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.
- [6] 高文芹, 贾 力, 赵余庆. 人参的抗癌作用及其机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 53-58.
- [7] 刘 娜, 朴虎日, 赵余庆. 原人参二醇及其衍生物的化学与抗癌活性研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(5): 384-388.
- [8] 张 虹, 付雯雯, 徐华丽. 20(S)-原人参二醇、人参皂苷 Rh₂ 及人参皂苷 Rg₃ 抗肿瘤作用的对比 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 10(17): 4911-4913.
- [9] 唐伟卓, 赵余庆, 贾 力. 人参和人参皂苷新近研究证明的生物活性和临床用途 [J]. 人参研究, 2010, 22(2): 32-38.
- [10] 孟凡丽, 苏晓田, 郑毅男. 人参皂苷 Rb₃ 对糖尿病模型小鼠的降血糖和抗氧化作用 [J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(4): 553-557.
- [11] 高 钧, 卢守四. 人参皂苷 Re 促进胰高血糖素样肽-1 分泌的研究 [J]. 中国药物与临床, 2011, 11(12): 1383-1385.
- [12] 胡翠华, 徐华丽, 于晓风, 等. 人参二醇组皂苷对实验性 2 型糖尿病大鼠血糖及血脂代谢的影响 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2006, 32(6): 1004-1008.
- [13] 吴红金, 刘宇娜. 人参皂甙 Rg₁ 抑制 ⁶⁰Co 照射诱导心肌细胞凋亡 [J]. 医学综述, 2008, 14(21): 3332-3334.
- [14] 吴红金, 刘宇娜. 人参皂甙 Re 对 ⁶⁰Co 照射诱导心肌细胞凋亡的保护作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(8): 923-924.
- [15] 张凌志, 邸 菁, 柏树令. 人参皂苷预防大鼠心肌梗大的评价 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(2): 233-236.
- [16] 李晓宇, 李 晶, 王一博, 等. 人参皂苷对酒精性肝损伤的保护作用研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(5): 512-515.
- [17] 李成鹏, 张梦思, 刘 俊, 等. 人参皂苷 Rg₁ 延缓脑衰老机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4442-4447.
- [18] 周 玥, 王建伟, 姜 蓉, 等. 人参皂苷 Rg₁ 在造血干/祖细胞连续移植中对抗细胞衰老的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2848-2853.
- [19] 李 闯, 王 义, 张美萍, 等. 人参不同部位皂苷成分的 HPLC 测定 [J]. 吉林中医药, 2010, 30(4): 347-349.
- [20] 唐伟卓, 赵余庆. 原人参三醇及其衍生物的药学及其生物活性的研究进展 [J]. 人参研究, 2010, 16(3): 20-26.
- [21] Quan H Y, Yuan H D, Jung M S, *et al.* Ginsenoside Re lowers blood glucose and lipid levels via activation of AMP-activated protein kinase in HepG2 cells and high-fat diet fed mice [J]. *Inter J Mol Med*, 2012, 29(1): 73-80.
- [22] Liu L, Liu X D, Liu C, *et al.* Increased glucagon-like peptide-1 secretion may be involved in ntidiabetic effects of ginsenosides [J]. *J Endocrinol*, 2013, 217(2): 185-196.
- [23] 赵余庆, 袁昌鲁, 傅玉琴. 人参茎叶中微量三萜化合物的化学研究 [J]. 药学学报, 1990, 25(4): 299-301.
- [24] 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.
- [25] Vuksana V, Sievenpipera J L. Herbal remedies in the management of diabetes: Lessons learned from the study of ginseng [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005, 15: 149-161.