

不同栽培年限竹节参中主要成分含量的动态变化

李玉洲, 何毓敏, 孙志伟, 关乔中, 张海濱, 毛帅, 张长城, 袁丁* (三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002)

摘要 [目的]建立同时测定竹节参药材中3种主要化学成分(竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa和竹节参皂苷IV)的HPLC含量测定方法;在此基础上,考察湖北恩施竹节参各主要成分含量与栽培年限之间的动态变化。[方法]采用HPLC对不同生长年限的竹节参栽培品中竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa、竹节参皂苷IV的含量进行测定。色谱条件:色谱柱为Ultimate XB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm);流动相为乙腈-浓度0.2%乙酸铵溶液(32:68 V/V);流速为1.0 ml/min;检测波长203 nm 柱温30 ℃。[结果]竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa、竹节参皂苷IV的含量分别在0.06~4.00、0.04~3.00、0.04~3.00 μg/ml浓度范围内线性关系良好($r_1=0.9996$ 、 $r_2=0.9994$ 、 $r_3=0.9995$);平均加样回收率分别为100.61%、99.06%、101.12% RSD分别为1.28%、1.63%、0.89%;竹节参中各主要成分含量随栽培年限变化较大。[结论]该方法简便、可靠,可用于测定竹节参各主要成分的含量;通过监测竹节参各主要成分的累积规律,可为制定竹节参规范化栽培措施提供依据。

关键词 竹节参(RHIZOMA PANACIS JAPONICI);含量测定;不同年限;HPLC

中图分类号 S567.5⁺1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2011)33-20411-03

Study on the Dynamic Variation of the Main Constituents of *P. japonicas* in Different Cultivating Years

LI Yu-zhou et al (College of Medical Science, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002)

Abstract [Objective] To establish HPLC method that could determine simultaneously the content of three main chemical constituents like *P. japonicus* saponins V, *P. japonicus* saponins IVa and *P. japonicus* saponins IV in *P. japonicus* medicinal materials, and to study the dynamic variation of three chemical constituents of Hubei Enshi *P. japonicus* in different cultivating years. [Method] The content of *P. japonicus* saponins V, *P. japonicus* saponins IVa and *P. japonicus* saponins IV in each sample of *P. japonicus* was determined by HPLC. The HPLC analysis was performed on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the detection wavelength at 203 nm. Following the injection of sample solution, a elution with acetonitrile-0.2% ammonium acetate (V/V, 32:68) as mobile phase was initiated at a flow rate of 1.0 ml/min. In addition, the column temperature was 30 ℃. [Result] The calibration curve of *P. japonicus* saponins V, *P. japonicus* saponins IVa and *P. japonicus* saponins IV were linear in the range of 0.06-4.00 μg ($r_1=0.9996$), 0.04-3.00 μg ($r_2=0.9994$), 0.04-3.00 μg ($r_3=0.9995$), respectively. The average recovery of the above 3 chemical constituents was 100.61% (RSD=1.28%), 99.06% (RSD=1.63%), 101.12% (RSD=0.89%), respectively. The content of the main constituents in *P. japonicus* differed greatly in different cultivating years. [Conclusion] The method is simple, reliable, and can be used for determining the content of the main constituents in *P. japonicus*. It could provide reference to formulate standardized cultivation measures for *P. japonicus* by monitoring the accumulation of its main constituents.

Key words RHIZOMA PANACIS JAPONICI; Content determination; Different cultivating years; HPLC

竹节参(JAPONICI RHIZOMA PANACIS)为五加科(Araliaceae)人参属(*Panax*)植物竹节参(*Panax japonicas* C. A. Mey.)的干燥根茎,具有散瘀止血、消肿止痛、祛痰止咳、补虚强壮的功效^[1]。其主要成分为三萜皂苷和多糖。目前已分离发现的皂苷类成分主要为齐墩果烷型三萜皂苷,如竹节参皂苷IV、竹节参皂苷IVa、竹节参皂苷V、竹节参皂苷V甲酯、Pjs-1、Pjs-2等;其他类型的包括20(S)-原人参二醇型、20(S)-原人参三醇型三萜皂苷,以及奥寇梯木醇型三萜皂苷等^[2]。为控制竹节参的质量,合理指导用药,李露等人对竹节参中的人参皂苷Rg₁、Re、Rg₂、Rb₁、Rb₂、Rd的含量进行了测定^[3]。近期研究发现,竹节参药材中主要的化学成分为竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa和竹节参皂苷IV;并且在不同生长年限的竹节参栽培品中,这些成分的含量变化差异较大^[4-5]。显然,测定竹节参中主要成分的含量并监测其动态变化,将有助于指导其药材种植和质量控制。因此,试验建立了同时测定竹节参中竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa和竹节参皂苷IV含量的方法。在此基础上,考察了湖北恩施产不同生长年限的竹节参中这3种皂苷的含量变化规律,以期对竹节参的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。竹节参(PANACIS JAPONICI RHIZOMA)分不同栽培年限采集于湖北恩施州宣恩县椿木营乡竹节参基地,经鉴定为植物竹节参(*Panax japonicas* C. A. Mey.)的新鲜根茎。

1.1.2 主要仪器。Waters高效液相色谱仪,包括PDA检测器、Waters2690色谱工作站,购自美国Water公司;Ultimate XB-C₁₈色谱柱,购自美国Welch Materials公司;AN204-N型电子分析天平,购自梅特勒-托利多(上海)有限公司;WP-RO-40B型超纯水机,购自四川沃特科技发展有限公司;KQ-500B型超声波振荡清洗器,购自昆山市超声仪器有限公司。

1.1.3 主要试剂。竹节参皂苷V(自制,纯度大于98%)、竹节参皂苷IVa(自制,纯度大于98%)、竹节参皂苷IV(自制,纯度大于98%)。色谱分析用乙腈为色谱纯,购自美国Baker公司;水为超纯水,其他试剂均为分析纯,市售。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件。色谱柱:Ultimate XB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm)。流动相为乙腈-浓度0.2%乙酸铵溶液(32:68 V/V)。流速为1.0 ml/min。波长203 nm 柱温30 ℃。

1.2.2 对照品溶液的制备。分别精密称取竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa、竹节参皂苷IV适量,加无水甲醇制成1.5 mg/ml的溶液,即得。

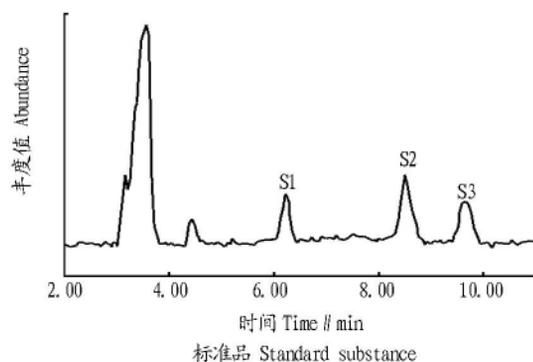
1.2.3 供试品溶液的制备。精密称定0.005 g样品细粉,置

基金项目 国家自然科学基金面上项目(30873383, 31070314)。
作者简介 李玉洲(1984-),男,陕西渭南人,硕士研究生,从事中药药理研究, E-mail: kaoyanlyz@sina.com。* 通讯作者, 博士, 教授, E-mail: xyzyd@ctgu.edu.cn。
收稿日期 2011-10-11

于50 ml容量瓶中,加45 ml浓度50%甲醇,超声提取40 min,用浓度50%甲醇定容,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤,取续滤液,即得。

1.2.4 专属性试验。取上述不同供试品溶液和标准品溶液各10 μl,进样,按“1.2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。

1.2.5 方法学考察。①线性关系的考察。分别精密吸取上述竹节参皂苷V对照品溶液、竹节参皂苷IVa对照品溶液、竹节参皂苷IV对照品溶液10 μl,进样,按“1.2.1”项下色谱条件测定。以浓度(μg/ml)为横坐标,以相应色谱峰的峰面积丰度值为纵坐标绘制标准曲线。②精密度试验。精密吸取等体积的对照品溶液,分别连续进样10 μl,按“1.2.1”项下色谱条件重复测定6次,记录各色谱峰的峰面积并计算RSD。③稳定性试验。精密吸取同一批竹节参供试品溶液,分别于0.3、6、9、12 h测定,记录竹节参皂苷V色谱峰的峰面积并计算RSD。④将对照品溶液进行稀释,以信噪比(S/N) > 3,确定其最低检测限;以信噪比(S/N) > 10,确定其最低定量限。



注: S1: 竹节参皂苷V; S2: 竹节参皂苷IVa; S3: 竹节参皂苷IV。

Note: S1, S2 and S3 referred to *P. japonicus* saponins V, *P. japonicus* saponins IVa and *P. japonicus* saponins IV, respectively.

⑤重复性试验。取1.000 g 6年生竹节参粉末,按“1.2.3”项下供试品溶液的制备方法制备6份,分别取10 μl进样,在“1.2.1”项下色谱条件测定,记录各色谱峰的峰面积并计算RSD。

⑥加样回收率试验。精密称取0.500 g 6年生竹节参样品,分别精确加入一定量的竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa、竹节参皂苷IV对照品,混匀后,按“1.2.1”项下条件重复测定5次,计算平均回收率并计算RSD。

1.2.6 样品含量的测定。取2009~2010年于湖北恩施采集的共12批竹节参药材,经干燥、粉碎后,按“1.2.3”项下方法处理。精密吸取供试品溶液,进样10 μl,用外标法测定竹节参中2种皂苷的含量。

2 结果与分析

2.1 专属性试验 由图1可知,各峰可达到基线分离;样品的色谱图与标准品色谱图中相同的保留时间上有对应的吸收峰,表明样品中含有竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa和竹节参皂苷IV 3种皂苷。

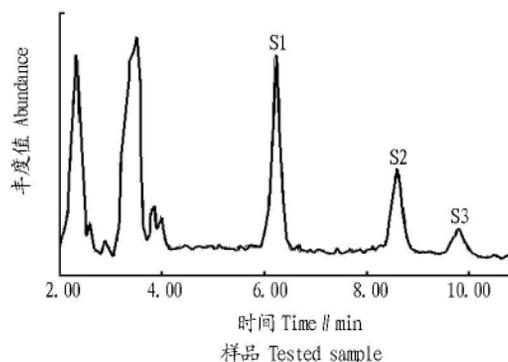


图1 专属性试验色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard substance and tested sample

2.2 方法学考察 ①线性关系的考察。测得3种皂苷的标准曲线方程为:竹节参皂苷V的回归方程为 $y_1 = 2653.2x_1 + 43.246$, $r_1 = 0.9996$;竹节参皂苷IVa的回归方程为 $y_2 = 2883.5x_2 + 53.652$, $r_2 = 0.9994$;竹节参皂苷IV的回归方程为 $y_3 = 2993.23x_3 + 55.283$, $r_3 = 0.9995$;表明竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa、竹节参皂苷IV分别在各自的浓度范围内呈良好的线性关系。②精密度试验。计算出竹节参皂苷V峰面积的RSD为0.45% ($n=6$),竹节参皂苷IVa峰面积的RSD为0.63% ($n=6$),竹节参皂苷IV峰面积的RSD为0.72% ($n=6$)表明仪器精密度良好。③稳定性试验。测定竹节参皂苷V峰面积的RSD为1.53% ($n=5$),竹节参皂苷IVa峰面积的RSD为3.26% ($n=5$),竹节参皂苷IV峰面积的RSD为2.76% ($n=5$)表明供试品溶液在12 h内稳定。④检测限和定量限。当信噪比(S/N) > 3时,测得竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa、竹节参皂苷IV的最低检测限分别为0.73、1.20、0.69 μg/ml。当信噪比(S/N) > 10时,测得竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa、竹节参皂苷IV的定量限分别为3.21、4.25、3.36 μg/ml。⑤重复性试验。测得竹节参药材中竹节参皂苷V的RSD为0.88% ($n=6$);竹节参皂苷IVa的RSD为1.42% ($n=6$);竹节参皂苷IV的RSD为1.21% ($n=6$)表明重复性良好。⑥加样回收率试验。测得竹节参药材中竹节参皂苷V

的平均回收率为100.14% RSD为1.28% ($n=5$);竹节参皂苷IVa的平均回收率为99.93% RSD为1.63% ($n=5$);竹节参皂苷IV的平均回收率为100.16% RSD为0.89% ($n=5$)该方法简便、可靠,可用于测定竹节参各主要成分的含量(表1)。

表1 加样回收率试验($n=5$)

Table 1 Result of recovery test

样品 Sample	竹节参皂苷V <i>P. japonicus</i> saponins V	竹节参皂苷IVa <i>P. japonicus</i> saponins IVa	竹节参皂苷IV <i>P. japonicus</i> saponins IV
样品中含量 Sample content //mg	13.95	45.58	12.35
加样量 Added amount //mg	13.88	45.62	12.36
实测量 Measured content //mg	27.85	91.17	24.73
平均回收率 Average recovery //%	100.14	99.93	100.16
RSD //%	1.28	1.63	0.89

2.3 样品含量的测定 由表2和图2可知,第1年、第2年各主要成分含量较好,但药材重量较小,不宜采收。第6年各主要成分含量相对较高,因此可确定第6年为最佳采收年限。在第3年、第4年竹节参各主要成分的含量降低,原因可能是各主要成分的积累速率小于根茎重量增加的速率。

表2 不同生长年限竹节参3种皂苷含量

Table 2 Content of 3 saponins in different cultivating years of *P. japonicus* mg/g

生长年限 Cultivating years	竹节参皂苷V <i>P. japonicus</i> saponins V	竹节参皂苷IVa <i>P. japonicus</i> saponins IVa	竹节参皂苷IV <i>P. japonicus</i> saponins IV	3种皂 苷总量 Total
1年生 1-year	39.22	142.03	25.01	206.26
2年生 2-year	43.62	142.56	38.63	224.81
3年生 3-year	38.94	127.33	34.50	200.77
4年生 4-year	17.30	56.56	15.32	89.18
5年生 5-year	15.73	51.41	13.93	81.07
6年生 6-year	27.89	91.15	24.70	143.74
7年生 7-year	16.55	54.10	14.66	85.31

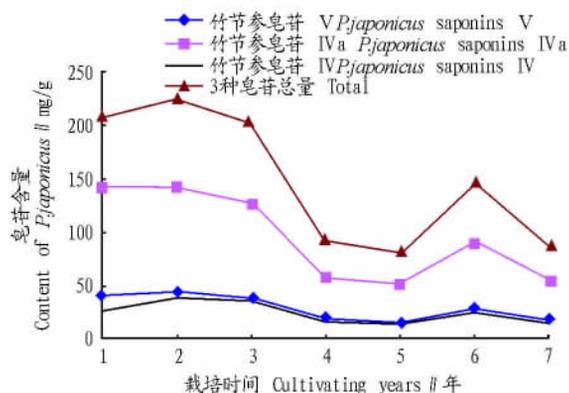


图2 不同生长年限竹节参3种皂苷含量变化趋势图

Fig. 2 Dynamic variation of the content of 3 saponins in different cultivating years of *P. japonicus*

3 讨论

(1) 课题组前期对竹节参药材进行了指纹图谱分析,并对其中主要的色谱峰进行了化学成分分析,经过提取分离、结构鉴定得到竹节参皂苷V、竹节参皂苷IVa、竹节参皂苷IV。

(上接第20386页)

- [24] 杨宝峰. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [25] DIAS C, BORRALHO GRACA J A, GONCALVES L M. *Scilla maderensis*, TLC screening and positive inotropic effect of bulb extracts[J]. Journal of Ethnopharmacology 2000 71(3): 487-492.
- [26] YEO E J, KIM K T, HAN Y S et al. Antimicrobial anti-inflammatory and anti-oxidative activities of *Scilla scilloides* (Lindl.) druce root extract[J]. Food Science And Biotechnology 2006 15(4): 639-642.
- [27] SPARG S G, Van STADEN J, JAGER A K. Pharmacological and phytochemical screening of two Hyacinthaceae species: *Scilla natalensis* and *Ledebouria ovatifolia* [J]. Journal of Ethnopharmacology 2002 80(1): 95-101.
- [28] 傅正良, 王丽芳, 牛广斌. 薤白及其混淆品绵枣儿的鉴别及临床应用[J]. 河北中医 2008 30(6): 641-642.
- [29] 林朝霞, 王者锋. 药用植物绵枣儿的新功能[J]. 包头医学 2006 30(2): 29.
- [30] SILAYO A, NGADJUI B T, ABEGAZ B M. Homoisoflavonoids and stilbenes from the bulbs of *Scilla nervosa* subsp. *Rigidifolia* [J]. Phytochemistry 1999 52(5): 947-955.
- [31] SPARG S G, Van STADEN J, JAGER A K. Pharmacological and phytochemical screening of two Hyacinthaceae species: *Scilla natalensis* and *Ledebouria ovatifolia* [J]. Journal of Ethnopharmacology 2003 80(1): 95-101.
- [32] RIVERA D, OBÓN C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands a review [J]. Journal of Ethnopharmacology 1995 46(2): 73-93.
- [33] 尚彩玲, 丁开宇. 绵枣儿核糖核糖体 DNAITS 序列扩增的研究[J]. 山西

通过精制后经 HPLC-MS 检测,其纯度均大于 98%。

(2) 试验中分别对 5 种流动相(乙腈-水、乙腈-浓度 0.2% 磷酸溶液、乙腈-浓度 0.2% 磷酸二氢钠溶液、乙腈-浓度 0.5% 三氟乙酸、乙腈-浓度 0.2% 乙酸铵溶液)进行了考察,结果以乙腈-浓度 0.2% 乙酸铵溶液的分离效果较好,达到基线分离。

(3) 在对湖北恩施不同年限竹节参栽培品进行含量测定比较时发现,随着栽培年限的增加,各主要成分的含量先降低后升高再降低,在第 3、4 年下降趋势尤为明显,原因可能是各主要成分的积累速率小于根茎重量增加的速率。在第 6 年时各主要成分含量取得极大值,因此可确定第 6 年为最佳采收年限。虽然第 1 年、第 2 年各主要成分含量较好且比第 6 年的高,但药材重量较小,不宜采收。

(4) 在前期试验中,发现不同产地竹节参主要成分有很大差异。因此最佳采收时期的确定还有待采集不同产地的不同年限的竹节参样品进行分析。此外,竹节参各主要成分的药效活性还未明确,因此还需对其药理、药效活性进行研究和比较,确定主要的药效活性成分,进而确定最佳采收年限。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.《中国药典》一部: 成方制剂及单味制剂[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 129.
- [2] MORITA T, TANAKA O, KOHDA H. Saponin composition of thizomes of *Panax japonicus* collected in South Kyushu, Japan, and its significance in oriental traditional medicine [J]. Chem Pharm Bull 1985 33(9): 3852-3858.
- [3] 李露, 成薇, 杨洁. 高效液相色谱法测定竹节参中多种人参皂苷含量[J]. 分析测试新方法 2008 1(14): 19-22.
- [4] 袁丁, 周志勇, 何毓敏. 竹节参化学成分及指纹图谱初步研究[J]. 中国药房 2009 20(18): 1399-1401.
- [5] 胡志远, 袁丁, 何毓敏. 竹节参 HPLC-ELSD 指纹图谱和化学成分分析[J]. 中国中药杂志 2010 35(8): 1009-1012.
- [6] 中医学院学报 2009 10(4): 52-54.
- [34] 孟志卿, 樊家勤. 绵枣儿用于三峡库区植被重建及组织培养快繁研究[J]. 江西农业学报 2007 19(10): 92-93.
- [35] 顾福根, 万志刚, 赵旭平. 地中海绵枣儿的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯 2007 43(1): 118.
- [36] 瞿素萍, 熊丽, 王继华. 绵枣儿叶片植株再生体系的建立[J]. 植物生理学通讯 2006 42(1): 69.
- [36] ZHANG D Y, SHAO W F, LIU Z H et al. Chemical constituents of Pu-erh tea and its inhibition effect on α -amylase *in vitro* [J]. Agricultural Science & Technology 2010 11(1): 130-132.
- [37] 刘世亮, 刘增俊, 杨秋云. 外源糖调节不同碳氮比对烤烟生理生化特性及化学成分的影响[J]. 华北农学报 2007(6): 161-164.
- [38] XIA L Y, ZHANG X Y, WANG T X et al. Study on the chromatographic fingerprint of volatile constituents from acacia honey [J]. Agricultural Science & Technology 2010 11(6): 42-44.
- [39] 赵铭钦, 苏长涛, 姬小明. 不同成熟度对烤后烟叶物理性状、化学成分和中性香气成分的影响[J]. 华北农学报 2008(3): 146-150.
- [40] NIU W, GENG H F, NIU Y et al. Stability of antimicrobial active ingredients of *Bacillus subtilis* B26 [J]. Agricultural Science & Technology 2010, 11(8): 120-124.
- [41] 王守现, 刘宇, 耿小丽. 北京地区 8 个白金针菇栽培菌株的鉴别研究[J]. 华北农学报 2009(1): 219-222.
- [42] 吴春蕾, 曹福磊, 丁云洁. 供锌水平对甘草生长和药用成分含量的影响[J]. 华北农学报 2011(3): 168-172.