

西洋参不同部位皂苷类成分的指纹图谱研究

屈新运 王喆之*

(陕西师范大学生命科学学院 陕西 西安 710062 教育部药用植物资源与天然药物化学重点实验室 陕西 西安 710062)

摘要:以西洋参(*Panax quinquefolium* L.)为材料,分别取主根、须根、芦头、参皮、参芯、茎、叶、花序、果实和芽孢等不同部位为材料,以高效液相法检测其皂苷类成分。利用系统聚类分析法和中药色谱指纹图谱相似度评价系统对各部位的皂苷种类和含量进行分析,将西洋参的不同部位按照成分组成进行了分类。

关键词:西洋参;不同部位;高效液相;聚类分析

A Study on Saponins for Different Parts in *Panax quinquefolium* L.

QU Xin-yun, WANG Zhe-zhi*

College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, Xi'an, Shanxi 710062, China

ABSTRACT: The different parts of *Panax quinquefolium* L. (also called American ginseng), such as mainroot, caulis, leaf, anthotaxy, fruit, fibrous-root, gemma, rhizoma, shell of ginseng, core of ginseng, were studied, in which the saponins in different parts were determined by HPLC method. The kinds and contents of saponins in each part were analyzed by similarity evaluation software and Hierarchical Clustering method of SPSS. In this study, the results show that the kinds and contents of saponins exist evenly in the mainroot, higher in the fibrous root than in the other parts, and higher in the core of ginseng than in the shell of ginseng. So this study will be significant for further developing and protecting medicinal plant resource.

Key Words: *Panax quinquefolium* L.; Different parts; HPLC (= high performance liquid chromatography)

西洋参为五加科人参属植物西洋参(*Panax quinquefolium* L.)的干燥根,又称花旗参、美国人参、洋参等,其性凉、味甘微苦,归心、肺、肾经,功能以补气养阴为主,可滋阴降火,为传统名贵补益药材^[1]。西洋参原产于北美,20世纪70年代引入我国,吉林、北京、山东、陕西等地均有栽培^[2]。西洋参传统以根入药,参根由周皮和次生维管组织构成,人参皂苷主要分布在次生维管组织的薄壁细胞中^[3]。近年来随着需求的不断增大,可供利用的资源严重不足,人们开始把目光投向西洋参的其它部位,开始对西洋参叶、茎、花蕾进行研究开发^[4-8]。本文通过对西洋参不同部位的人参皂苷类成分进行HPLC指纹图谱研究,重点考察其不同部位有效成分含量的差异性,利用中药指纹图谱相似度分析和化学成分的系统聚类分析相结合对西洋参植株各部分化学成分进行分析,为充分开发西洋参资源提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 实验仪器

SHIMADZU LC-2010 高效液相色谱仪(包括自动进样器,紫外检测器,日本SHIMADZU公司);MILLI-Q超纯水仪(MILLIPORE公司);KQ5200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)等。

1.2 试剂

乙腈(美国Fisher公司,色谱纯);甲醇(天津市科密欧化学试剂开发中心,色谱纯);磷酸(天津市化学试剂三厂,分析

纯);所用水为超纯水。

1.3 标准品、材料

标准品:人参皂苷 Rg1(110703-200322),人参皂苷 Re(110754-200320),人参皂苷 Rb1(110704-200318),均购自中国药品生物制品检定所。

植物材料:整株西洋参2005年10月采自陕西留坝西洋参规范化种植基地,其余各地参根样品2005年10月购自各地药市,经陕西师范大学生命科学学院植物分类教研室田先华教授鉴定为五加科植物西洋参(*Panax quinquefolium* L.)和西洋参干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu C₁₈(4.6×150 mm, 5 μm)。流动相为A:乙腈;B:0.05%磷酸水溶液。梯度模式:时间梯度为0→35→45→60→85 min,相应的浓度梯度为溶剂A:18→20→30→30→45%,溶剂B:82→80→70→70→55%;流速为1.0 mL·min⁻¹,检测波长为203 nm,柱温为40℃,进样体积为20 μL。

2.2 西洋参不同部位的划分

将整株西洋参按来源分为单茎和双茎两组,每组不少于30株,分别取果实、茎、叶、花序和根(其中果实和花序较少,合并为一组),根经清洗后又分为参须(细小侧根和须根)和参根(主根),参根再切下芽孢、芦头,剥掉参皮(包括周皮和次生韧皮部),剩余部分即为参芯(次生木质部),分为果实、茎、叶、花

* 作者简介:屈新运,男,在读硕士, E-mail: quxinyun@sohu.com

通讯作者:王喆之,男,教授,博士生导师, E-mail: zzwang@snnu.edu.cn

(收稿日期:2006-02-06 接受日期:2006-03-08)

序、参根、参须、芽孢、芦头、参皮、参芯等 10 个不同部位, 18 个样品, 加上各地参根对照样品 12 个, 共计 30 个样品。(表 1)。低温烘干后粉碎备用。

2.3 对照品溶液制备

精密称取人参皂苷 Rg1 标准品 1. 9mg、人参皂苷 Re 标准品 11. 6mg、人参皂苷 Rb1 标准品 16. 8mg, 置 10mL 容量瓶中, 加色谱纯甲醇定容至刻度, 摇匀, 0. 45μm 微孔滤膜过滤, 即得对照品溶液。

表 1 西洋参样品来源表
Table 1 The samples of Panax quinquefolium L.

序号 No.	名称 name	来源 recourse	序号 No.	名称 name	来源 recourse
1	花序 anthotaxy	陕西留坝 Shanxi Liuba	16	参芯 core	陕西留坝 Shanxi Liuba
2	果实 fruit	陕西留坝 Shanxi Liuba	17	参皮 shell	陕西留坝 Shanxi Liuba
3	茎 caulis	陕西留坝 Shanxi Liuba	18	参须 fibrous- root	陕西留坝 Shanxi Liuba
4	叶 leaf	陕西留坝 Shanxi Liuba	19	茎 caulis	陕西留坝 Shanxi Liuba
5	芽孢 gemma	陕西留坝 Shanxi Liuba	20	芦头 rhizoma	陕西留坝 Shanxi Liuba
6	芦头 rhizoma	陕西留坝 Shanxi Liuba	21	芽孢 gemma	陕西留坝 Shanxi Liuba
7	参须 fibrous- root	陕西留坝 Shanxi Liuba	22	叶 leaf	陕西留坝 Shanxi Liuba
8	参皮 shell	陕西留坝 Shanxi Liuba	23	参根 mainroot	吉林靖宇 Jilin Jingyu
9	参芯 core	陕西留坝 Shanxi Liuba	24	参根 mainroot	北京怀柔 Beijing Huairou
10	参根 mainroot	陕西留坝 Shanxi Liuba	25	参根 mainroot	吉林集安 Jilin Ji an
11	参根 mainroot	陕西留坝 Shanxi Liuba	26	参根 mainroot	吉林集安 Jilin Ji an
12	参根 mainroot	美国 America	27	参根 mainroot	吉林集安 Jilin Ji an
13	参根 mainroot	黑龙江 Heilongjiang	28	参根 mainroot	吉林集安 Jilin Ji an
14	参根 mainroot	北京怀柔 Beijing Huairou	29	参根 mainroot	辽宁桓仁 Liaoning Huanren
15	参根 mainroot	吉林集安 Jilin Ji an	30	参根 mainroot	陕西留坝 Shanxi Liuba

2.4 西洋参样品溶液制备

不同部位样品过 40 目筛后精确称取 0. 5g, 置 50mL 三角瓶中, 加入 80% 甲醇 10mL, 称定重量, 用石蜡膜封口, 超声提取 1h, 80% 甲醇补足重量, 摇匀, 1000rpm 离心 2min, 0. 45μm 微孔滤膜过滤, 即得西洋参供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 稳定性试验: 取主根供试品溶液, 分别于 0h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h 检测指纹图谱, 人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 峰面积 RSD 在 0. 18% ~ 1% 之间, 表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.5.2 精密度试验: 取主根供试品溶液, 连续进样 5 次, 检测

指纹图谱, 人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 峰面积 RSD 在 0. 21% ~ 0. 79% 之间, 表明供试品进样精密度良好。

2.5.3 重复性试验: 分别取西洋参主根粉末各 5 份, 按 2. 3 项下方法制备供试品溶液, 分别检测指纹图谱, 人参皂苷 Re 峰面积 RSD 均在 1. 64% ~ 3% 之间, 表明本法测定的重复性良好。

2.6 高效液相色谱(HPLC- UV)

对标准品和 10 类样品进行测定, 记录 5~ 80 min 色谱图, 见图 1。每个样品测定 3 次, 将留坝西洋参各部位色谱图中平均峰面积(n= 6) 最大的 17 个峰进行比较, 平均保留时间和平均峰面积见表 2。

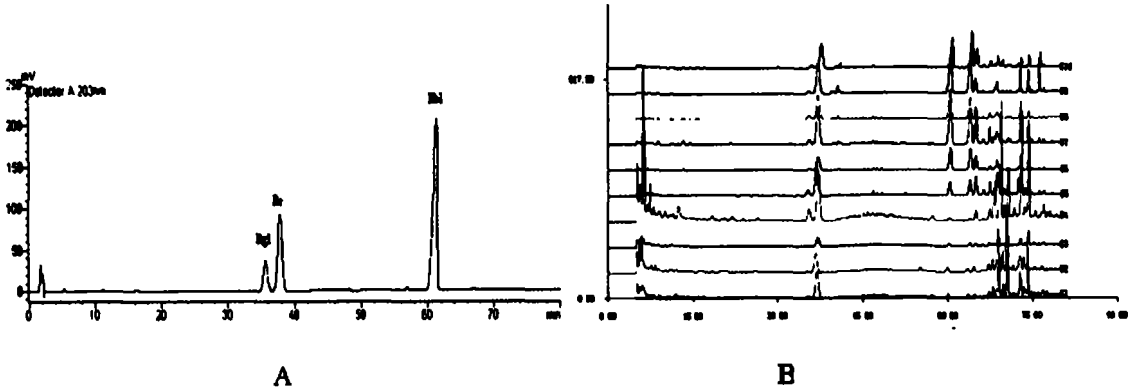


图 1 3 种人参皂苷对照品(A) 及西洋参不同部位(B) 的 HPLC 色谱图
Fig1 HPLC chromatograms of 3 kinds of reference substances (A) and ginsenoside in different parts of Panax quinquefolium L. (B)

注: S1~ S10 分别对应表 1 中 1~ 10 号样品

Notes: S1~ S10 represents the sample of 1~ 10respectively in Table 1

表 2 中 1、2、3 号峰分别为人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1。可见, 不同部位按人参皂苷 Rg1 和人参皂苷 Re 的含量排序为: 叶> 参须> 芽孢> 参芯> 参皮> 花序> 参根> 果实> 芦头> 茎, 其中叶中含量接近茎的 6 倍; 按人参皂

苷 Rb1 的含量排序为: 参须> 参芯> 参根> 参皮> 芦头> 芽孢> 果实> 叶> 花序> 茎, 其中参须含量超过茎中含量的 20 倍。总皂苷含量: 叶> 参须> 芽孢> 果实> 参芯> 参根> 参皮> 芦头> 花序> 茎, 其中叶中含量接近茎中的 7 倍, 与前人

研究基本相同^[9]。由图 2 可见,地上部分和参根各部在 60~75 min 的色谱图差异明显,参根各部 4、5、8 号峰面积较地上部分高,但没有 9 和 10 号峰,叶中 7、12 和 13 号峰是其它各部位的 3 到 15 倍,果实和叶中 10 号峰面积是茎、花及芽孢 10 号峰

的 2 倍以上。
由此可见,西洋参地上部分和参根成分差异较大,参根各部分成分接近,以参须含量最高。地上部分含量差异较大,叶片含量最高,茎含量最低。

表 2 西洋参不同部位主要色谱峰峰面积
Table 2 Area of the main peaks in different parts of Panax quinquefolium L.

编号	保留时间	峰面积									
		Peak areas									
No. of peak	RT (min)	花序	果实	茎	叶	芽孢	芦头	参须	参皮	参芯	参根
		anthotaxy	fruit	caulis	leaf	gemma	rhizoma	fibrous- root	shell	core	mainroot
1	35.499	215	92	66	1237	631	420	626	605	277	303
2	37.07	1890	2093	842	5103	3329	1803	4095	2947	2614	2583
3	60.416	160	510	136	246	1101	1291	3560	2167	3281	2440
4	63.909	147	449	185	124	1253	1879	2789	1873	2928	1934
5	64.93	203	480	151	729	1357	1812	2104	1144	695	1580
6	67.404	268	620	238	994	836	507	975	477	0	374
7	68.156	0	795	17	2303	0	655	401	193	251	236
8	68.688	0	0	0	0	1084	336	646	419	512	641
9	69.858	403	1042	139	815	365	0	0	0	0	0
10	70.606	1209	3081	411	2422	1134	0	0	0	0	0
11	72.442	0	0	54	0	869	0	179	87	81	191
12	72.879	1470	805	364	6391	1059	753	1508	488664	410	
13	74.258	1254	1137	546	3784	1010	894	892	300	632	356
14	74.895	240	311	74	426	168	138	180	72	55	171
15	76.135	41	302	111	0	280	190	219	90	798	659
合计		7500	11717	3334	24574	14476	10678	18174	10862	12788	11878

2.7 聚类分析

应用 SPSS(Statistical Package for the Social Science) 统计分析软件中的系统聚类法(Hirearchical Cluster),以 10 个不同部位西洋参样品的整体 HPLC 色谱数据为特征变量,以皮尔逊相关系数(Pearson Correlation)为区间数据(Interval),以组间均联法(Be-

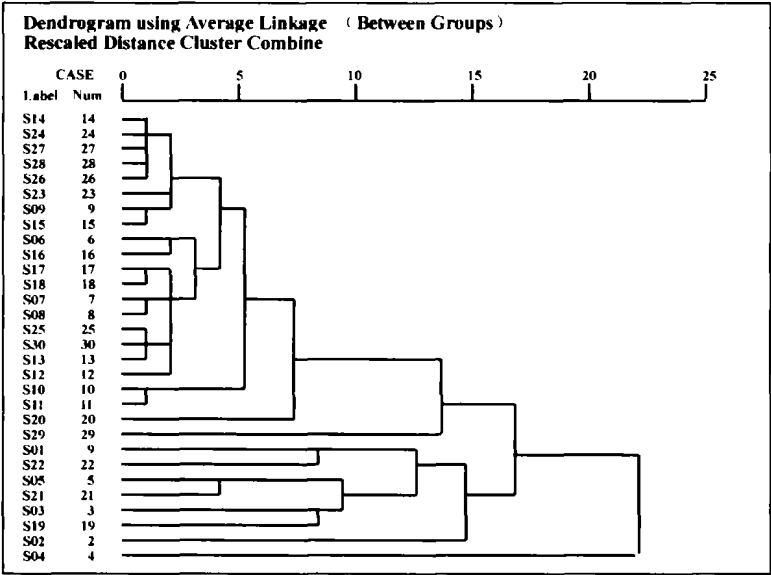
tween - groups Linkage) 进行聚类分析。结果表明参根、参芯、参皮、芦头聚为一类,其中参根各部差异小于不同产地参根差异,花序、芽孢、茎、果实聚为一类,叶与其它各部分差异较大,但与地上部分较为接近。结果见表 3。

表 3 30 批西洋参不同部位样品聚类分析结果

注: S1~ S30 分别对应表 1 中 1~ 30 号样品

Tab. 3 The hierarchical clustering results of the 30 diffreent - part samples

Notes: S1~ S30 represents the sample of 1~ 30 respectively in Table 1.



2.8 相似度评价

采用国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)。该软件具有生成对照图谱的功能,相似度计算方法为夹角余弦法,可支持多点校正。将色谱工作站数据导入中药指纹图谱相似度计算软件,选定以S10(留坝西洋参参根样品)为参照谱,选择保留时间为37.07 min(人参皂苷Re)、60.42 min(人参皂苷Rb1)、63.91和74.26 min的四个峰特征峰为marker峰,进行谱峰匹配,采用夹角余弦算法对各批样品进行整体相似度评价,各样品的相似度依次为:0.421、0.316、0.539、0.218、0.682、0.857、0.855、0.888、0.913、1、0.988、0.888、0.903、0.855、0.888、0.863、0.833、0.833、0.462、0.745、0.532、0.286、0.84、0.832、0.891、0.896、0.861、0.867、0.423、0.861。按照与参根相似度差异,基本可以将西洋参各部位划分为三类:一类成分与根接近,包括芦头、主根(参芯、参皮)、须根,与参根的相似度一般在0.8以上;另一类为叶,与参根的相似度一般在0.3以下;第三类成分与花序接近,包括花序、果实、茎、芽孢,与参根的相似度一般在0.3~0.7。相似度评价与聚类分析结果基本一致,基本反映了西洋参各部位皂苷类成分的差异。

3 讨论

研究发现参根中皂苷类成分的种类和含量分布比较均匀,参须中含量显著高于其它各部分^[10],芦头成分与参根接近,加工时可以保留,参芯中皂苷类成分较参皮略高,可能是由于周皮中含量较低导致。茎叶含量差异较大,实际生产中应加以区别。西洋参叶中人参皂苷含量高,但人参皂苷Rb1较少,人参皂苷Rd较参根高^[11,12],作用异于参根^[13],目前多用于提取皂苷或制作的西洋参含片,但不能代替参根入药。西洋参花序、芽孢、果实等部位产量较低,成分种类和含量与根、叶差异较大,药理性质特殊^[14],应分别收集充分利用。由于用药习惯等因素影响,许多与传统的药材成分接近的其它植物或原植物的其它部位都没有被利用,导致药材原植物的过度开发与浪费。采用指纹图谱技术分析药用植物的不同

部位和近缘植物的化学成分,利用中药相似度评价系统进行相似度分析和SPSS软件聚类分析其差异,可用于筛选化学成分及药理作用相近的代用药材和鉴别药材质量与真伪。对充分开发利用和保护药用植物资源也有重要的意义。

参考文献

- [1] 曹立军,许永华,于淑莲,等.我国西洋参产业发展现状概述[J].人参研究,2002,14(1):36~38
- [2] 邹建伟,杜东娜,李树殿.引种西洋参会不会发生变异[J].人参研究,2001,13(1):8~10
- [3] 苏红文,胡正海.不同年生西洋参的解剖结构及组织化学研究[J].石河子农学院学报,1995,31(3):1~8
- [4] 孟祥颖,李向高,于洋.国产西洋参花蕾化学成分的研究I.人参皂苷的分离、鉴定及含量测定[J].吉林农业大学学报,2000,22(3):1~8
- [5] 丛登立,王丽娟.西洋参茎叶生药学研究[J].吉林农业大学学报,2004,26(5):523~525
- [6] 郑友兰,李向高,鲍建才,等.西洋参芦头化学成分研究[J].中国药学杂志,2005,40(11):815~816
- [7] 刘桂艳.西洋参地上部位化学成分的药理药效学研究概况[J].江苏临床医学杂志,2001,5(5):465~467
- [8] 丁之恩,严平.西洋参果实成分分析及利用价值研究[J].中南林学院学报,1999,12,19(4):48~49
- [9] 鲁歧,孟祥颖,富力,等.国产西洋参化学研究进展[J].人参研究,1995,(4):6~10
- [10] 乔卫,周晶,符敬伟.西洋参侧根及须根的总皂苷含量比较[J].天津药学,2000,11,12(4):83~84
- [11] 许传莲,郑毅男,崔淑玉,等.RP-HPLC法测定西洋参茎叶中6种人参皂苷的含量[J].吉林农业大学学报,2002,24(3):50~52
- [12] Jing-Tian Xie, Sangeeta R. Mehendale, Anbao Wang, Aung H. Hana, Ji An Wua, Joachim Osinski, Chun-Su Yuan. American ginseng leaf: ginsenoside analysis and hypoglycemic activity[J]. Pharmacological Research, 2004,(49):113~117
- [13] 纪凤兰,徐惠波,李延忠,等.西洋参茎叶皂甙药理研究概况[J].特产研究,2000,(1):55~58
- [14] 高燕,杨砚军,宋永贤.西洋参总皂甙降血脂作用的研究[J].中医函授通讯,1997,8,16(4):39~40

(上接第23页)

参考文献

- [1] Orchard S, Hemjakob H, Apweiler R. Annotating the human proteome[J]. Mol Cell Proteomics, 2005 Apr,4(4):435~440
- [2] Hu Y, Huang X, Chen GY, et al. Recent advances in gel-based proteome profiling techniques[J]. Mol Biotechnol, 2004 Sep,28(1):63~76
- [3] Jamet E. Bioinformatics as a critical prerequisite to transcriptome and proteome studies[J]. J Exp Bot, 2004 Sep,55(405):1977~1979
- [4] Andrea Pirondini, Giovanna Visoli, Aliosha Malcevschi, A 2-D liquid-phase chromatography for proteomic analysis in plant tissues, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed[J]. Life Sci., 2006 Mar 20, 833(1):91~100
- [5] Linke T, Ross AC, Harrison EH. Proteomic analysis of rat plasma by two-dimensional liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2006 Jan 31
- [6] Soldi M, Sarto C, Valsecchi C, et al. Proteome profile of human urine with two-dimensional liquid phase fractionation[J]. Proteomics, 2005 Jul,5(10):2641~2647

- [7] 沈肖方,李建远,王海燕,等.重组人附睾特异表达蛋白ESC42及其生物学鉴定[J].中华男科学杂志,2005,11(2)
- [8] Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. Dacheux. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation[J]. Microsc Res Tech, 2003 May 1, 61(1):7~17
- [9] Gatti JL, Druart X, Syntin P, et al. Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoproteins[J]. Biol Reprod, 2000 Apr,62(4):950~958
- [10] Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa[J]. J Reprod Fertil Suppl, 1998,53:119~136
- [11] Vreeburg JT, Holland MK, Orgebin-Crist MC. Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa in vivo[J]. Biol Reprod, 1992,47(4):588~597
- [12] Syntin, P. et al. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis[J]. Biol Reprod, 1996,55(5):956~974
- [13] Fouchecourt, S., S. Metayer, A. Locatelli, F. Dacheux, and J. L. Dacheux. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins[J]. Biol Reprod, 2000,62(6):1790~1803