

竹节参总皂苷提取物质量控制方法研究

张海滨¹, 张长城¹, 关乔中², 何毓敏¹, 袁丁^{1*}

(1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 三峡大学化学与生命科学学院, 湖北 宜昌 443002)

[摘要] **目的:**建立以活性主成分定量的竹节参总皂苷活性相关质量评价方法。**方法:**通过优化得到的竹节参总皂苷提取工艺制备竹节参总皂苷提取物,高效液相色谱法测定提取物中主成分含量,将这些主成分配制与药材提取物总皂苷中含量相当浓度的主成分群,以体外抗氧化模型评价主成分群与提取物活性成分差异。**结果:**总皂苷提取物体外抗氧化活性为 $71.30 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,其中竹节参皂苷 V 含量 $24.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、竹节参皂苷 IV a 含量为 $90.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、竹节参皂苷 IV 含量为 $38.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、Pjs-2 含量为 $41.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,主成分群体外抗氧化能力为 $64.79 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。**结论:**以竹节参总皂苷主成分竹节参皂苷 V、竹节参皂苷 IV a、竹节参皂苷 IV、Pjs-2 作为药效评价指标的准确性高,具有一定的科学性、合理性,竹节参总皂苷供试品中竹节参皂苷 V 含量应 $\geq 24.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,竹节参皂苷 IV a 含量 $\geq 90.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,竹节参皂苷 IV 含量 $\geq 38.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,Pjs-2 含量 $\geq 39.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

[关键词] 竹节参总皂苷; 主成分群; 体外抗氧化; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0068-03

[doi] 10.11653/syfy2013180068

Quality Control Methods for Total Saponins Extract of *Panax japonicus*

ZHANG Hai-bin¹, ZHANG Chang-cheng¹, GUAN Qiao-zhong¹, HE Yu-min¹, YUAN Ding^{1*}

(1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2. Chemistry and Bioscience College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish total saponins from *Panax japonicas* (SPJ) activity related to quality standards by the quantification of main active ingredient. **Method:** The extraction process of total saponins from *P. japonicas* (SPJ) was optimized to obtain total saponin extraction. HPLC was used to determine the content of the main ingredients in the standard extract. The main ingredients were made into the preparations of principal component cluster equal with total saponins of herbal extracts to evaluate the differences between the principal component cluster and the active ingredients of herbal extraction through vitro antioxidant model. **Result:** Vitro antioxidant activity of standard extracts was $71.30 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$; the content of saponin V of *P. japonicus* was $24.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; saponin IV a was $90.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; saponin IV was $38.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; Pjs-2 was $41.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Vitro antioxidant activity of the principal component cluster is $64.79 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** The method taking saponin V, saponin IV a, saponin IV and Pjs-2 from *P. japonicus* as the principal component of the *Panax japonicus* total saponins has a high accuracy, which is scientific and reasonable. In the samples of *Panax japonicus* total saponins, the content of saponin V is no less than $24.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, saponin IV a is no less than $90.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, saponin IV is no less than $38.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, Pjs-2 is no less than $39.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

[Key words] *Panax japonicus* total saponins; principal component group; antioxidant *in vitro*; quality control

中药竹节参在土家族苗族聚居区民间医疗中被誉为“草药之王”^[1],属珍稀濒危的名贵“七类”中草

[收稿日期] 20121213(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31070314)

[第一作者] 张海滨, 硕士生, 从事中药化学及中药资源开发利用研究, Tel:0717-6397366, E-mail: 7765hui@163.com

[通讯作者] *袁丁, 教授, 从事中药药理与中药化学研究, Tel:0717-6397366, E-mail: xyxyd@ctgu.edu.cn

药^[2]。竹节参总皂苷提取物在抗疲劳、抗衰老等方面呈现出显著的药理活性^[3],是具有开发价值的抗氧化天然产物^[4]。本课题前期研究发现不同批次竹节参药材皂苷主成分含量差异较大,为保证供试品的质量,急需建立一种针对竹节参总皂苷的快速简单、稳定性良好的质量标准^[5]。现行中药质量控制主要通过化学定性鉴别或指标性成分检测来实现^[6],但中药是多成分、多靶点作用,并非西药化学成分单一,构效关系明确^[7-8]。本研究前期对不同工艺提取物进行了活性评价^[9],筛选活性较高的总皂苷提取物进行质量控制研究,并以此为基础建立活性主成分的多成分定量方法^[10],实现对竹节参总皂苷的质量控制。

1 材料

Waters2690 型高效液相色谱仪(美国 waters 公司),AB204-N 型分析天平(超杰电子天平),KQ-250B 型超声波清洗器(上海沪超),U-1900 型紫外-可见分光光度计(日立),Power Wave XS2 型酶标仪(美国 Molecular Devices),EYELA N-1100 型旋转蒸发仪(上海爱郎仪器),SHB-B95 型真空泵(予华仪器),ZM100 型粉碎研磨仪(德国 Retsch),DK-600S 型恒温水浴箱(上海精宏实验设备),ZK-82A 型真空干燥箱(上海实验仪器总厂)。

人参皂苷 Ro(批号 110807-200306),Pjs-2(批号 110709-200304),竹节参皂苷 IVa(批号 110906-200306),竹节参皂苷 IV(批号 110809-200305)对照品均为中国药品生物制品检定所提供,供含量测定用,羟自由基试剂盒由南京建成提供,乙腈为色谱纯(美国 TEDIA 公司),水为二次重蒸水,其他试剂均为分析纯。竹节参药材采购于湖北省恩施州椿木营竹节参种植基地,由三峡大学汪鋈植教授鉴定为五加科人参属竹节参 *Japanese ginseng*。

2 方法与结果

2.1 制备竹节参总皂苷供试品 竹节参药材粗粉 100 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 60% 乙醇 500 mL,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)40 min,摇匀,滤过,重复提取 3 次,合并滤液^[11-12],过 D101 大孔吸附树脂柱,用水洗脱至无色,弃去水洗脱液,以 60% 乙醇洗脱,收集 60% 乙醇洗脱液减压浓缩至浸膏^[13],真空干燥,即得精制竹节参总皂苷供试品。

2.2 建立高效液相指纹图谱

2.2.1 色谱条件 采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A),0.2%

磷酸溶液(B),梯度洗脱(表 1),柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm。

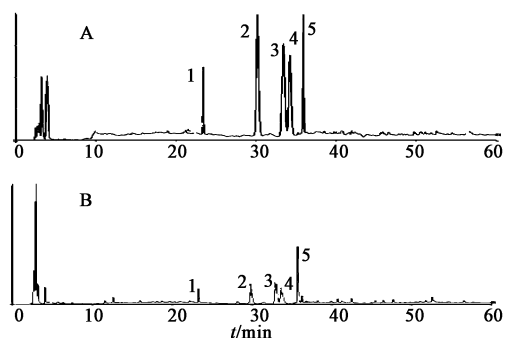
表 1 梯度洗脱程序

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~5	5	95
5~20	5~30	95~70
20~30	30	70
30~50	30~85	70~15
50~60	85	15

2.2.2 参照物溶液的制备 取人参皂苷 Re、竹节参皂苷 V、竹节参皂苷 IVa、竹节参皂苷 IV、Pjs-2 对照品适量,精密称定,分别加甲醇制成 1.5 g·L⁻¹ 的溶液。

2.2.3 供试品溶液的的制备 取本品 10 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇超声使溶解并稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 测定 分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,测定,记录 60 min 的色谱图,即得,见图 1。



1. 人参皂苷 Re; 2. 人参皂苷 Ro; 3. Pjs-2; 4. 竹节参皂苷 IV; 5. 竹节参皂苷 IVa; A. 对照品; B. 供试品

图 1 竹节参 HPLC

2.3 主成分含量测定及其体外活性测试

2.3.1 色谱条件 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 乙酸铵溶液(32:68),流速 1.0 mL·min⁻¹,波长 203 nm,柱温 30 °C。

2.3.2 对照品溶液制备 取竹节参皂苷 V、竹节参皂苷 IVa、竹节参皂苷 IV、Pjs-2 对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释成每 1 mL 中含有竹节参皂苷 V 0.5 mg、竹节参皂苷 IVa 0.9 mg、竹节参皂苷 IV 0.4 mg、Pjs-2 0.4 mg。

2.3.3 含量测定法 分别精密吸取对照品与供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,测定,即得。

2.3.4 体外活性测试 分别精密吸取竹节参皂苷

V 参照物溶液、竹节参皂苷 IV a 参照物溶液、竹节参皂苷 IV 参照物溶液、Pjs-2 参照物溶液各 100 μL , 按照羟自由基试剂盒说明测定各成分的体外抗氧化活性, 见表 2。

表 2 竹节参皂苷体外抗氧化活性测试

单体样品名	主要成分含量比较 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	抑制羟自由基能力 / $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$
竹节参皂苷 V	24.9	4.31 ± 1.02
竹节参皂苷 IV a	90.6	6.63 ± 1.76
竹节参皂苷 IV	38.7	20.24 ± 4.82
Pjs-2	39.6	10.08 ± 2.47

结果显示竹节参皂苷 V、竹节参皂苷 IV a、竹节参皂苷 IV、Pjs-2 均具有一定的抗氧化活性, 其中竹节参皂苷 IV 抑制羟自由基能力达到 $(20.24 \pm 4.82) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, 确定竹节参皂苷 V、竹节参皂苷 IV a、竹节参皂苷 IV、Pjs-2 为有效主成分。

2.4 有效主成分群配比 精密吸取竹节参皂苷 V 参照物溶液 1.66 mL、竹节参皂苷 IV a 参照物溶液 6.04 mL、竹节参皂苷 IV 参照物溶液 2.58 mL、Pjs-2 参照物溶液 2.64 mL, 混匀, 低温吹干溶剂, 加入适量甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀。

2.5 有效主成分和供试品体外活性测试 分别精密吸取供试品溶液 100 μL 和有效主成分群溶液 100 μL , 按照抑制羟自由基试剂盒说明测定体外抗氧化活性, 供试品体外抑制羟自由基能力为 $71.30 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, 有效主成分群体外抑制羟自由基能力为 $64.79 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, 有效主成分群可以作为药效评价指标。

2.6 总皂苷质量标准的确立 竹节参总皂苷供试品中竹节参皂苷 V 的含量应不低于 $24.9 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、竹节参皂苷 IV a 的含量应不低于 $90.6 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、竹节参皂苷 IV 的含量应不低于 $38.7 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、Pjs-2 的含量应不低于 $39.6 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

竹节参总皂苷是民间常用中草药竹节参的主要有效成分, 总皂苷的组成和含量的高低, 将直接影响竹节参的质量和疗效。本研究以竹节参地道药材为研究对象, 以体外抗氧化为药理模型, 在前期工艺优化获得活性较高总皂苷提取物的基础上, 建立竹节参总皂苷的化学指纹图谱, 确定总皂苷的组成以及含量; 通过体外抗氧化模型筛选活性较高的主成分, 同时将活性主成分按照供试品中含量配比成有效主成分群; 通过评价有效主成分群与供试品间体外抗氧化模型活性差异, 发现有效主成分群与供试品间活性相似度较高, 因此有效主成分群可用于总皂苷的药效、质量评价。

本研究对中药竹节参总皂苷进行了整体化学特征和化学组成分布研究, 一定程度上体现了中医药理论的“整体作用”和“协同作用”, 借鉴代谢组学处理复杂问题的研究思路, 以中药化学成分代替生物体代谢物, 同时以体外细胞模型评价预测结果, 验证以部分代替整体活性指标的可行性, 寻找出与药效相关的活性主成分群, 通过竹节参总皂苷化学指纹图谱来实现对竹节参总皂苷多成分含量测定, 从而实现总皂苷质量的控制, 一定程度上解决了化学成分和药效的相关性, 建立了一种快速、简单、科学的评价竹节参总皂苷质量的方法。

[参考文献]

- [1] 胡远浪, 袁丁, 何毓敏, 等. 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(18):2383.
- [2] 陈龙全, 刘杰书. 土家族神药(竹节参)的主要药效及作用机制研究概况[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 67(5):67.
- [3] 袁丁. 竹节参药效物质及药材质量分析研究[D]. 湖北: 湖北中医学院, 2009:26.
- [4] 林启寿. 中药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977:418.
- [5] 王欣, 谢鸣. 中药质量控制面临的问题及其研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1):60.
- [6] 肖小河, 金城, 赵中振, 等. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14):1377.
- [7] 陈纪鹏. 谈中药的质量可控与国际接轨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1):60.
- [8] 王利丽, 周志远, 陈随清, 等. 败酱草质量标准研究[J]. 中医学报, 2012, 27(9):1150.
- [9] Ding X P, Qi J, Chang Y X, et al. Quality control of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves by high-performance liquid chromatography with diode array detection and on-line radical scavenging activity detection [J]. J Chromatogr A, 2009(216):2204.
- [10] Chang Y X, Yan D M, Lin L, et al. Potency fingerprint of herbal products Danshen injection for their quality evaluation[J]. Chem Pharm Bull, 2009, 57(6):586.
- [11] 张秀丽, 于德红, 刘德胜, 等. 正交试验优化梓醇的微波辅助提取工艺[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(18):3487.
- [12] 吴文锦, 李露, 黄凤洪, 等. 超声提取法竹节参总皂苷工艺条件优化[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(34):17072.
- [13] 何毓敏, 鲁科明, 袁丁, 等. 竹节参总皂苷的制备工艺及含量测定[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22):2607.

[责任编辑 顾雪竹]