

园参叶及林下参叶中人参皂苷含量比较

房庆伟, 徐政, 陈旭, 叶冠*

(上海医药集团股份有限公司中央研究院, 上海 201203)

摘要: 目的 建立 UPLC 法同时测定园参叶及林下参叶中人参皂苷 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rg2、Rc、Rb2、Rd 的含量, 并比较两者人参皂苷含量。方法 采用 UPLC CORTECS C₁₈色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.6 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 0.25 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 203 nm。对 8 种人参皂苷进行偏最小二乘法判别分析。结果 8 种人参皂苷在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9999$), 平均加样回收率 97.47%~103.41%, RSD<3.0%。正交偏最小二乘法判别分析可区分 2 种药材, 人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg2 的 VIP 值大于 1。结论 该方法稳定可靠, 原人参三醇类 (人参皂苷 Rg1、Re、Rg2) 和原人参二醇类 (人参皂苷 Rc、Rb1、Rb2、Rd) 人参皂苷的比值可作为园参叶和林下参叶区别的重要依据。

关键词: 园参叶; 林下参叶; 人参皂苷; UPLC

中图分类号: R282

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)06-2059-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.054

人参叶为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥叶, 具有补气、益肺、祛暑、生津之功效^[1]。人参皂苷类成分为人参叶中的主要活性成分, 目前已从人参叶中分离鉴定得到超 250 种人参皂苷^[2-6], 且叶中人参皂苷含量远高于人参根^[7]。现代药理学研究表明, 人参叶具有抗疲劳、抗肿瘤、免疫调节、保护心肺等活性^[8-11]。长期以来, 园参茎叶被用作人参茎叶总皂苷的制备原料^[12], 但其重金属及农残问题突出。林下参生长于山林中, 不施农药, 生长期长, 资源储备日益增多, 因此对于林下参叶的质量控制研究十分必要。本研究测定园参叶、林下参叶中 8 种人参皂苷含量, 并结合正交偏最小二乘判别分析法对 2 种原药材进行比较, 以期为林下参叶的质量控制以及林下参叶与园参叶的区分提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Waters H-CLASS 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); SQP 型分析天平 (德国 Satorius 公司); 3K15 型高速离心机 (德国 Sigma 公司); YF116B 型打粉机 (瑞安市永历制药机械有限公司); 旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司); KQ5200V 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 人参皂苷 Rg1 (批号 110703-201832)、人参皂苷 Re (批号 110754-201827)、人参皂苷 Rd (批号 111818-201603)、人参皂苷 Rb1 (批号 110704-201827)、人参皂苷 Rb2 (批号 111715-201203)、人参皂苷 Rf (批号 111719-201806) 对照品购自中国食品药品检定研究院; 人

参皂苷 Rc (批号 3508)、人参皂苷 Rg2 (批号 3150) 对照品购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。乙腈为色谱纯, 购自德国默克公司; 无水乙醇、甲醇、石油醚 (沸程 60~90 ℃)、正丁醇均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 药材 园参叶 (GGL)、林下参叶 (FGL) 经上海医药集团股份有限公司中央研究院叶冠教授级高级工程师鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥叶。详细信息见表 1。

表 1 林下参叶来源信息

批号	生长年份/年	产地
GGL-1	3	吉林集安市吉马镇
GGL-2	3	吉林白山市抚松县
GGL-3	4	吉林白山市抚松县
GGL-4	3	吉林集安市大陆镇
GGL-5	4	辽宁桓仁县北甸村
GGL-6	4	吉林集安市大陆镇
FGL-1	14	辽宁桓仁县华来镇
FGL-2	16	辽宁桓仁县大东沟村
FGL-3	17	辽宁桓仁县大东沟村
FGL-4	18	辽宁桓仁县北甸村
FGL-5	19	辽宁桓仁县北甸村
FGL-6	16	吉林集安市大陆镇
FGL-7	17	吉林集安市吉马镇

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取各人参皂苷对照品适量,

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1702300)

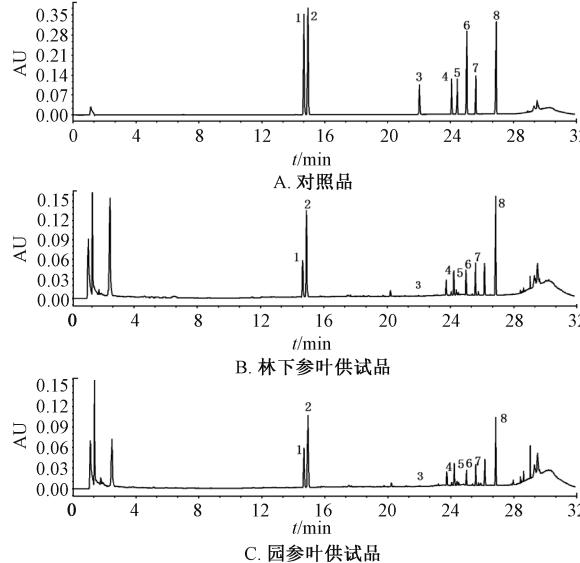
作者简介: 房庆伟 (1994—), 男, 硕士, 从事中药和天然药物研究。Tel: (8621) 20505500, E-mail: fangqw@sphchina.com

* 通信作者: 叶冠 (1974—), 男, 博士, 教授级高级工程师, 从事中药和天然药物研究。Tel: (8621) 20505500, E-mail: yeg@sphchina.com

甲醇溶解定容至2 mL量瓶中, 制成人参皂苷Rg1、Re、Rf、Rb1、Rg2、Rc、Rb2、Rd质量浓度分别为384.38、481.01、103.00、111.26、134.23、321.71、135.07、388.66 μg/mL的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 参考文献[13]报道, 称取园参叶或林下参叶粉末(过4号筛)1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 20 mL 80%甲醇超声提取3次, 每次30 min, 滤纸过滤, 合并滤液, 60 °C减压干燥; 加入20 mL纯水溶解, 石油醚萃取3次, 每次20 mL, 弃石油醚萃取液; 用水饱和正丁醇萃取3次, 每次20 mL, 合并水饱和正丁醇相, 60 °C减压干燥; 甲醇溶解定容至100 mL量瓶中, 4 °C下存储备用。

2.3 色谱条件 UPLC CORTECS C₁₈色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.6 μm); 流动相水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~8 min, 81%A; 8~15 min, 81%~73%A; 15~19 min, 73%~70%A; 19~26 min, 70%~58%A; 26~28 min, 58%~10%A; 28~30 min, 10%~81%A; 30~32 min, 81%A); 体积流量0.25 mL/min; 柱温30 °C; 检测波长203 nm; 进样量2 μL。UPLC色谱图见图1。



1. 人参皂苷Rg1 2. 人参皂苷Re 3. 人参皂苷Rf 4. 人参皂苷Rb1 5. 人参皂苷Rg2 6. 人参皂苷Rc 7. 人参皂苷Rb2 8. 人参皂苷Rd

图1 各人参皂苷UPLC色谱图

2.4 线性关系考察 精密量取“2.1”项下对照品溶液适量, 甲醇稀释, 制成系列浓度的对照品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行回归, 结果见表2。可知各人参皂苷在各自范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 取“2.1”项下对照品溶液适量, 在“2.3”项色谱条件下进样测定6次, 测得人参皂苷Rg1、Re、Rf、Rb1、Rg2、Rc、Rb2、Rd峰面积RSD分别为0.43%、0.41%、0.52%、0.79%、0.75%、0.20%、1.83%、0.53%, 表明仪器精密度良好。

表2 各人参皂苷线性关系

人参皂苷	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
Rg1	$Y=2.582.3X+2.689.3$	0.999 9	1.50~384.38
Re	$Y=2.115.9X+2.526.4$	0.999 9	1.88~481.01
Rf	$Y=2.765.9X+654.4$	0.999 9	0.40~103.00
Rb1	$Y=1.993.8X+491.1$	0.999 9	0.43~111.26
Rg2	$Y=2.086.9X+685.0$	0.999 9	0.52~134.23
Rc	$Y=2.083.4X+1.603.2$	0.999 9	1.26~321.71
Rb2	$Y=1.874.6X+562.4$	0.999 9	0.53~135.07
Rd	$Y=2.195.8X+1.841.3$	0.999 9	1.52~388.66

2.6 重复性试验 取同一份林下参叶粉末, 按“2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 测得人参皂苷Rg1、Re、Rf、Rb1、Rg2、Rc、Rb2、Rd峰面积RSD分别为1.84%、1.80%、1.95%、1.39%、0.69%、1.00%、1.35%、1.94%, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取“2.2”项下林下参叶供试品溶液, 于0、2、4、8、12、18、24 h在“2.3”项色谱条件下进样测定, 测得人参皂苷Rg1、Re、Rf、Rb1、Rg2、Rc、Rb2、Rd峰面积RSD分别为0.37%、0.39%、1.96%、1.14%、0.93%、0.31%、0.85%、0.52%, 表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取各成分含量已知的林下参叶供试品, 加入各对照品适量, 按“2.2”项下方法制备6份供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 计算回收率, 结果见表3。

表3 各人参皂苷加样回收率试验结果

人参皂苷	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%
Rg1	1.120	1.050	2.210	101.84	2.04
Re	3.480	3.210	6.520	97.46	1.95
Rf	0.030	0.050	0.078	96.0	2.28
Rb1	0.095	0.110	0.212	103.41	2.54
Rg2	0.055	0.060	0.112	97.39	1.07
Rc	0.220	0.214	0.425	97.93	0.98
Rb2	0.290	0.302	0.577	97.47	1.53
Rd	0.950	0.970	1.875	98.70	1.57

2.9 含量测定 取园参叶、人参叶样品适量, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样测得, 计算含量, 结果见表4。由表4可知, 园参叶及林下参叶中含量最多的3种人参皂苷为人参皂苷Rg1、Re、Rd。林下参叶随着生长年限的改变, 未观察到其中人参皂苷含量的升高或降低趋势, 且不同产地林下参叶中皂苷含量差异较大。

2.10 含量测定结果统计分析 通过SPSS 21.0软件进行, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

人参皂苷Rg1、Re、Rg2为原人参三醇类(PPTs)成分, 人参皂苷Re、Rb1、Rb2、Rd为原人参二醇类(PPDs)成分, 两类成分在药理活性上有一定差异^[1]。由表5可知, 人参皂苷Rg1、Re、Rd为园参叶和林下参叶

表4 各人参皂苷含量测定结果 (mg/g, $\bar{x} \pm s$, n=3)

批号	人参皂苷 Rg1	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rf	人参皂苷 Rc	人参皂苷 Rb1	人参皂苷 Rg2	人参皂苷 Rb2	人参皂苷 Rd
FCL-1	5.93±0.14	16.90±0.22	0.09±0.01	3.01±0.05	0.35±0.01	0.68±0.00	4.48±0.16	13.72±0.14
FGL-2	5.77±0.12	19.53±0.38	0.11±0.00	3.61±0.09	0.33±0.01	0.74±0.02	5.68±0.11	17.96±0.33
FGL-3	8.08±0.39	16.74±0.72	0.12±0.01	3.62±0.17	0.29±0.02	0.73±0.03	5.53±0.23	17.96±0.68
FGL-4	4.65±0.01	13.01±0.11	0.12±0.01	2.04±0.06	0.26±0.00	0.37±0.00	3.24±0.04	9.33±0.11
FGL-5	5.01±0.04	16.07±0.15	0.08±0.00	2.98±0.02	0.28±0.00	0.52±0.01	4.60±0.05	13.40±0.07
FGL-6	5.48±0.41	12.96±1.08	0.05±0.00	1.24±0.11	0.20±0.02	0.37±0.03	2.55±0.22	6.20±0.51
FGL-7	5.82±0.50	12.78±1.09	0.05±0.00	1.55±0.15	0.18±0.03	0.44±0.04	2.59±0.22	7.77±0.71
GGL-1	11.12±1.59	23.87±3.42	0.05±0.01	4.47±0.07	0.80±0.12	2.95±0.47	5.79±0.89	9.56±1.48
GGL-2	9.47±0.49	28.41±1.59	0.06±0.00	5.56±0.28	0.93±0.07	2.84±0.16	7.08±0.36	12.18±0.75
GGL-3	5.62±0.81	17.82±2.56	0.06±0.01	2.51±0.37	0.53±0.07	0.56±0.07	3.29±0.50	9.18±1.52
GGL-4	6.06±0.46	17.38±1.33	0.07±0.01	2.40±0.18	0.50±0.05	0.87±0.07	3.25±0.24	8.06±0.75
GGL-5	9.51±1.08	18.80±2.12	0.11±0.01	3.64±0.46	0.70±0.09	1.24±0.12	4.70±0.47	8.66±1.13
GGL-6	4.42±0.10	13.82±0.29	0.09±0.00	0.83±0.04	0.37±0.01	0.22±0.01	1.17±0.02	3.80±0.08

表5 园参叶、林下参叶中人参皂苷含量统计 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Rg1+Re+Rd/(mg·g ⁻¹)	(Rg1+Re)/Rd	PPDs/(mg·g ⁻¹)	PPTs/(mg·g ⁻¹)	PPTs/PPDs	总量/(mg·g ⁻¹)
林下参叶组	33.23±7.06	1.93±0.53	18.93±6.31	21.80±3.25	1.24±0.32	40.73±9.40
园参叶组	33.30±10.17	3.56±0.85 **	14.87±6.85 **	27.00±8.40 **	2.04±0.62 **	41.87±15.09

注: 与林下参叶组比较, ** P<0.01。

中的3种主要皂苷类成分, 园参叶及林下参叶三者总量以及总人参皂苷含量并无统计学差异 ($P>0.05$), 但 $(Rg1+Re)/Rd$ 比值有显著性差异 ($P<0.01$)。林下参叶中 PPT 类成分含量相对较低, 而 PPD 类成分相对含量较高, 2类成分比值也有显著性差异 ($P<0.01$)。

2.11 正交偏最小二乘法判别分析 为进一步区分比较园参叶、林下参叶之间的差异, 本研究 SMICA-P 13.0 软件, 采用偏最小二乘法判别分析对3种样本进行分类比较^[14], 结果见图2。在建立的偏最小二乘法判别分析模型中, 其主要参数 R^2X 为 0.950, R^2Y 为 0.772, Q^2 为 0.725, 表明该模型预测能力较好。林下参叶与园参叶明显区分为2组, 说明园参叶及林下参叶化学成分存在差异。变量重要性投影值 (VIP) 结果见图3, 可知人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg2, 以及 $(Re+Rg1)/Rd$ 、PPTs/PPDs、PPTs、Rg1+Re 的 VIP 值大于 1, 说明以上数值贡献较大, 是区分林下参叶及园参叶药材的标志性成分。

3 讨论

本研究测定并比较了园参叶和林下参叶中8种人参皂苷的含量, 分析比较其中人参皂苷 Rg1、Re、Rd 三者之和的含量, PPDs 含量, PPTs 含量, 8种人参皂苷的总含量以及 $(Rg1+Re)/Rd$ 、PPTs/PPDs^[15] 的比值, 并采用正交偏最小二乘法判别分析三者差异。结果显示, 园参叶与林下参叶总皂苷的含量无统计学差异, 但林下参叶中 PPTs 含量明显低于园参叶, 而 PPDs 含量明显高于园参叶, 而 PPTs 和 PPDs 在调控血管生成等活性有相反的作用^[16]。正交偏最小二乘法判别分析结果也显示, 园参叶, 林下参叶具有差异性。根据 VIP 结果可知, 人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg2, 以及 $(Re+Rg1)/Rd$ 、PPTs/PPDs、PPTs、

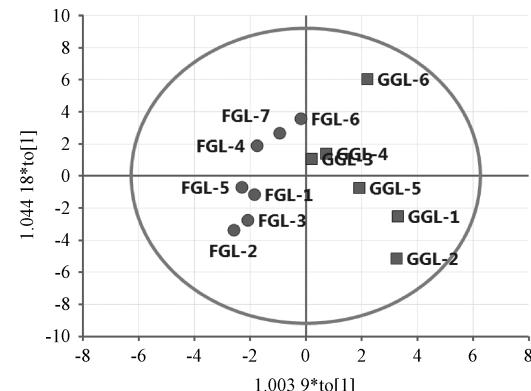


图2 正交偏最小二乘法判别分析图

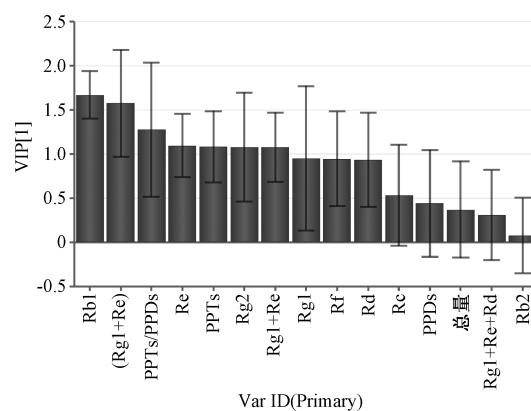


图3 变量重要性投影值 (VIP) 结果

Rg1+Re 是主要的差异性成分。园参叶及林下参叶中 $(Rg1+Re)/Rd$ 、PPTs/PPDs 的比值具有显著性差异, 可作为园参叶及林下参叶区分的重要依据。此外, 课题组后续将会有对林下参及园参叶的药理活性进行进一步比较。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 389-392.
- [2] Qiu S, Yang W Z, Shi X J, et al. A green protocol for efficient discovery of novel natural compounds: characterization of new ginsenosides from the stems and leaves of *Panax ginseng* as a case study [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 893: 65-76.
- [3] Ma L Y, Yang X W. Six new dammarane-type triterpenes from acidic hydrolysate of the stems-leaves of *Panax ginseng* and their inhibitory-activities against three human cancer cell lines [J]. *Phytochemistry Lett*, 2015, 13: 406-412.
- [4] Li K K, Yao C M, Yang X W. Four new dammarane-type triterpene saponins from the stems and leaves of *Panax ginseng* and their cytotoxicity on HL-60 cells [J]. *Planta Med*, 2012, 78(2): 189-192.
- [5] Li K K, Yang X B, Yang X W, et al. New triterpenoids from the stems and leaves of *Panax ginseng* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(6): 1030-1035.
- [6] 陈丽雪, 曲 迪, 华 梅, 等. 不同年生和不同部位人参样品有效成分的比较 [J]. 食品科学, 2019, 40(8): 124-129.
- [7] Lee J W, Choi B R, Kim Y C, et al. Comprehensive profiling and quantification of ginsenosides in the root, stem, leaf, and berry of *Panax ginseng* by UPLC-QTOF/MS [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2147.
- [8] Yu S E, Mwesige B, Yi Y S, et al. Ginsenosides: the need to move forward from bench to clinical trials [J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(3): 361-367.
- [9] 纪瑞锋, 袁 媛, 刘 娟. 人参叶与人参化学及药理活性差异分析 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2269-2272.
- [10] 陆维承. 人参叶和参叶考辨 [J]. 中药材, 2016, 39(1): 213-215.
- [11] Shkryl Y N, Veremeychik G N, Avramenko T V, et al. State of antioxidant systems and ginsenoside contents in the leaves of *Panax ginseng* in a natural habitat and an artificial plantation [J]. *Acta Physiol Plant*, 2018, 40(7): 1-8.
- [12] 常相伟, 赵 翎, 李德坤, 等. 林下山参化学成分及鉴别评价研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1982-1991.
- [13] Shan S M, Luo J G, Huang F, et al. Chemical characteristics combined with bioactivity for comprehensive evaluation of *Panax ginseng* C. A. Meyer in different ages and seasons based on HPLC-DAD and chemometric methods [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 89: 76-82.
- [14] Chang X W, Zhang J J, Li D K, et al. Nontargeted metabolomics approach for the differentiation of cultivation ages of mountain cultivated ginseng leaves using UHPLC/QTOF-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 141: 108-122.
- [15] Kim D, Kim M, Rana G S, et al. Seasonal variation and possible biosynthetic pathway of ginsenosides in Korean Ginseng *Panax ginseng* Meyer [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1824.
- [16] Yue P Y, Mak N K, Cheng Y K, et al. Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides [J]. *Chin Med*, 2007, 2: 6.