

# 不同栽培年限川桔梗中桔梗总皂苷和桔梗皂苷D的含量比较<sup>△</sup>

李心怡\*, 陈玲, 马逾英, 邓薇<sup>#</sup>(成都中医药大学药学院/中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1249-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.23

**摘要** 目的:建立测定川桔梗中桔梗总皂苷及桔梗皂苷D含量的方法,探索不同栽培年限川桔梗药材中2种指标成分的差异。方法:采用紫外-可见分光光度法测定川桔梗中桔梗总皂苷的含量;采用高效液相色谱法测定川桔梗中桔梗皂苷D的含量;比较一年生、二年生及三年生各10份川桔梗药材中桔梗总皂苷及桔梗皂苷D的含量。结果:一年生、二年生、三年生川桔梗药材中桔梗总皂苷含量的平均值分别为2.47%、3.01%、2.47%;桔梗皂苷D含量的平均值分别为0.23%、0.27%、0.33%;即一年生的样品中2种指标的含量均较低,二年生样品的桔梗总皂苷含量最高,三年生样品桔梗皂苷D的含量最高。结论:不同栽培年限的川桔梗药材的指标性成分含量具有一定差异,但二者间并未呈现相关性,建议选用栽培年限为二年生或三年生的药材。

**关键词** 川桔梗;桔梗总皂苷;桔梗皂苷D;栽培年限;含量测定

## Comparison of the Content of Total Saponins and Platycodin D in *Platycodon grandiflorum* from Sichuan of Different Cultivated Years

LI Xinyi, CHEN Ling, MA Yuying, DENG Wei (School of Pharmacy, Chengdu University of TCM/State Key Lab Breeding Base of Systematic Research & Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for content determination of total saponins and platycodin D in *Platycodon grandiflorum* from Sichuan and investigate the difference of 2 indexes in *P. grandiflorum* from Sichuan of different cultivated years. METHODS: The content of total saponins in *P. grandiflorum* from Sichuan was determined by UV spectrophotometry. The content of platycodin D was determined by HPLC. The contents of total saponins and platycodin D were compared among each 10 samples of annual, biennial and triennial *P. grandiflorum* from Sichuan. RESULTS: Average contents of total saponins in annual, biennial and triennial *P. grandiflorum* from Sichuan were 2.47%, 3.01%, 2.47%, respectively; average contents of platycodin D were 0.23%, 0.27%, 0.33%, respectively. The contents of 2 indexes in annual *P. grandiflorum* from Sichuan were in relative low level, while the content total saponins in biennial *P. grandiflorum* from Sichuan was the highest; the content of platycodin D in triennial *P. grandiflorum* was the highest. CONCLUSIONS: The contents of indexes are different among *P. grandiflorum* from Sichuan of different cultivated years. But there is no correlation between them. It is suggested to select biennial and triennial *P. grandiflorum* from Sichuan.

**KEYWORDS** *Platycodon grandiflorum* from Sichuan; Total saponins; Platycodin D; Cultivated years; Content determination

桔梗为桔梗科植物桔梗[*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.]的干燥根,为一常用中药,具有宣肺、利咽、祛痰、排脓的功效<sup>[1]</sup>,同时其也在布依族、朝鲜族、仡佬族、蒙古族、苗族、纳西族、土家族、瑶族、壮族等多个少数民族中广泛使用<sup>[2]</sup>,是我国销量最大的40种传统常用中药材之一<sup>[3]</sup>。桔梗还是一种药食同源的药材,其肉质根是东北朝鲜族制作泡菜的重要原料<sup>[4]</sup>。故桔梗除药用外,还广泛用于食品、化妆品等领域<sup>[5]</sup>。

桔梗中含有大量的三萜皂苷,其是药理活性中的主要成分<sup>[6]</sup>。现已经从桔梗中分离鉴别了四十多种单体皂

苷<sup>[7-10]</sup>,桔梗皂苷D是其主要的活性成分<sup>[11]</sup>。四川省梓潼县是桔梗的道地产区之一,具有栽培历史悠久、栽培面积广等特点。由于市场价格的影响,川桔梗的栽培年限存在差异,多以二年生为主,也会出现一年生和三年生的情况。那么不同栽培年限对其皂苷类成分的含量及其品质有何影响,目前未见相关文献报道。笔者采用紫外法测定川桔梗中桔梗总皂苷的含量,高效液相色谱(HPLC)法测定桔梗皂苷D的含量,研究不同栽培年限对川桔梗品质的影响,为其最佳采收年限的确定提供研究基础。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

1200 HPLC仪,配二极管阵列检测器(美国Agilent公司);A580紫外-可见分光光度计(翱艺仪器有限公司)

<sup>△</sup> 基金项目:四川省科技计划项目(No.2014SZ0229)

\* 硕士研究生。研究方向:中药品种、质量及资源开发。E-mail:lixinyi1213@126.com

<sup>#</sup> 通信作者:讲师,博士。研究方向:中药品质。E-mail:dengwei514@126.com

司);BP121S 万分之一电子分析天平(德国赛多利斯股份公司);SB-3200DTD 超声波清洗器(宁波新艺超声设备有限公司);HWS-26 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);SHB-III 循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司);RE-5203 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

## 1.2 药材

本试验所用的 30 份药材样品均来自四川省梓潼县自采的药材,其原植物经成都中医药大学药学院马逾英教授鉴定,为桔梗科植物桔梗。将样品清洗干净之后置于 60 °C 恒温烘箱中干燥至恒质量,中药粉碎机粉碎,干燥密封保存于封口袋中,备用。样品产地及栽培信息见表 1。

表 1 样品产地及栽培信息

Tab 1 Producing area and cultivation of samples

样品编号	产地	栽培年限	样品编号	产地	栽培年限	样品编号	产地	栽培年限
1	梓潼剑门村	一年生	11	梓潼拦河村	二年生	21	梓潼剑门村	三年生
2	梓潼流泉村	一年生	12	梓潼响水村	二年生	22	梓潼流泉村	三年生
3	梓潼金水村	一年生	13	梓潼五一村	二年生	23	梓潼金水村	三年生
4	梓潼思公村	一年生	14	梓潼九柏村	二年生	24	梓潼思公村	三年生
5	梓潼大坪村	一年生	15	梓潼仁和镇	二年生	25	梓潼大坪村	三年生
6	梓潼金光村	一年生	16	梓潼马迎乡	二年生	26	梓潼金光村	三年生
7	梓潼金石村	一年生	17	梓潼荣耀村	二年生	27	梓潼金石村	三年生
8	梓潼天古村	一年生	18	梓潼文兴乡	二年生	28	梓潼天古村	三年生
9	梓潼马迎乡	一年生	19	梓潼定远乡	二年生	29	梓潼自强镇	三年生
10	梓潼文昌镇	一年生	20	梓潼仁和镇	二年生	30	梓潼大兴乡	三年生

## 1.3 对照品、试剂与其他

桔梗皂苷 D 对照品(北京中科仪友化工技术研究院,批号:151110,纯度:≥98%);甲醇和乙腈均为色谱纯,香兰素及其余试剂均为分析纯,水为纯水。

D-101 大孔吸附树脂、大孔树脂色谱柱(长度:30 cm,内径:3 cm)均来源于成都科龙化工试剂厂。

## 2 方法与结果

### 2.1 桔梗总皂苷的测定

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取桔梗粉末 1.00 g,准确加入 70% 甲醇 40 mL,称定质量,超声处理 40 min(功率:250 W,频率:40 kHz),放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液 20 mL,置于水浴上蒸干,残渣加水 20 mL,微热使溶解,上样于已处理好的 D-101 大孔吸附树脂中,反复上样 5 次后用 100 mL 纯水洗脱,弃去洗脱液,再用 200 mL 的 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压蒸干,残渣加 70% 甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取桔梗皂苷 D 对照品适量,加 70% 甲醇制成每 1 mL 含 1.135 mg 的溶液,即得。

2.1.3 测定波长的选择 精密移取供试品溶液和对照品溶液各 200 μL 置于试管中,70 °C 水浴条件下蒸干,加

入 10% 香草醛试液 0.5 mL、60% 硫酸溶液 5 mL,摇匀,60 °C 水浴加热 15 min,冰水浴冷却 3 min,随行试剂做空白对照,立即在紫外-可见分光光度计中取供试品溶液(样品编号:11)与对照品溶液于 400~800 nm 波长范围内进行扫描,结果见图 1。

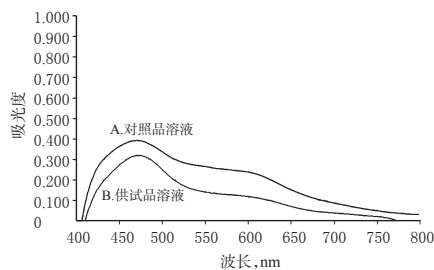


图 1 紫外扫描图

Fig 1 UV scanning spectrum

由图 1 可见,供试品溶液与对照品溶液的最大吸收波长均约为 470 nm,故选取 470 nm 作为检测波长。

2.1.4 标准曲线的绘制 精密吸取桔梗皂苷 D 对照品溶液 40、80、120、160、200、240 μL 置于试管中,按“2.1.3”项下方法测定其吸光度(A)。以对照品溶液的质量浓度(c, μg/mL)为横坐标、A 为纵坐标进行回归,得到方程为  $A=0.009c+0.0279$  ( $R^2=0.9966, n=6$ );表明桔梗皂苷 D 的检测质量浓度线性范围为 8.25~49.53 μg/mL。

2.1.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 200 μL,按“2.1.3”项下方法测定其吸光度,连续测定 6 次。计算其 RSD 值为 0.04% ( $n=6$ ),提示仪器的精密性较好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(样品编号:11)200 μL,按“2.1.3”项下方法显色后于 1、5、10、15、20、25、30、40、50、60 min 时分别测定其吸光度,计算其 RSD 值为 1.13% ( $n=6$ ),表明供试品溶液放置在室温 60 min 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取同一份桔梗药材粉末 6 份(样品编号:11),每份约 1.00 g,准确称定,按“2.1.1”项下方法制备成供试品溶液。精密移取各供试品溶液 200 μL 置于试管中,按“2.1.3”项下方法测定其吸光度。结果,供试品的总皂苷平均含量为 2.12%,RSD 值为 1.94% ( $n=6$ )。

2.1.8 准确度试验 准确称取已知含量的桔梗药材粉末 6 份(样品编号:11),每份约 0.05 g,加入相应量的桔梗皂苷 D 对照品,按“2.1.1”项下方法制备成供试品溶液。精密移取各供试品溶液 200 μL 置于试管中,按“2.1.3”项下方法测定其吸光度。结果,加样回收率为 97.31%~101.18%,RSD 为 1.61% ( $n=6$ )。

2.1.9 测定方法 取各样品,按“2.1.1”项下方法制备成供试品溶液,再精密移取各供试品溶液 200 μL 置于试管中,按“2.1.3”项下方法测定其吸光度,依据标准曲线方程计算各样品中桔梗总皂苷的含量。

### 2.2 桔梗皂苷 D 的测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Diamo-

nil-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.3%磷酸水(乙腈:0→20 min, 10%→15%; 20→35 min, 15%→28%; 35→50 min, 28%→28%; 50→60 min, 28%→40%);检测波长为210 nm;流速为0.8 mL/min;进样量为20 μL;柱温为30 ℃。

取“2.2.2”和“2.2.3”项下供试品溶液(样品编号:11)和对照品溶液进样分析,色谱图见图2。

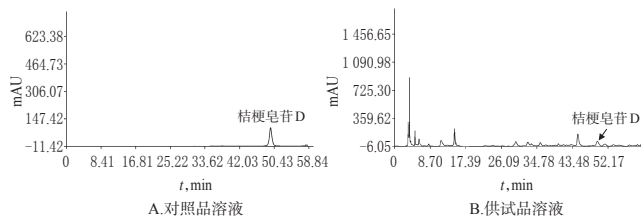


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

由图2可见,待测峰与邻峰分离良好。理论板数以桔梗皂苷D峰计不低于3 000。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密称取供试品粉末2.00 g至锥形瓶中,加甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声提取30 min(功率:250 W,频率:40 kHz),冷却;再次称质量,用甲醇补足减失的质量,过滤,水浴蒸干,加20 mL纯水微热使溶解,用水饱和的正丁醇萃取3次,每次20 mL,合并正丁醇层,减压蒸干,用甲醇溶解,定容至10 mL量瓶中,摇匀,过0.45 μm滤膜,即得。

**2.2.3 对照品溶液的制备** 精密称取桔梗皂苷D对照品适量,加甲醇制成每1 mL含1.4 mg的溶液,即得。

**2.2.4 标准曲线的绘制** 取1.4 μg/μL的对照品溶液4、8、12、14、18、22 μL,分别注入色谱仪中测定,记录色谱。以桔梗皂苷D的进样量为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,得到回归方程为 $y=177.2x-50.542$ ( $R^2=0.9998$ ),结果表明桔梗皂苷D检测进样量线性范围为5.6~30.8 μg。

**2.2.5 精密度试验** 精密吸取对照品溶液10 μL,进样测定,连续进样6次,结果其保留时间的RSD为0.07%( $n=6$ );峰面积的RSD为0.08%( $n=6$ )。提示仪器精密度良好。

**2.2.6 重复性试验** 取同一桔梗药材供试品(样品编号:11),按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,进样测定,结果其保留时间的RSD为0.41%( $n=6$ ),峰面积的RSD为2.18%( $n=6$ )。表示方法重复性良好。

**2.2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液(样品编号:11)分别在室温下放置0、4、8、12、16、24 h后进样测定,结果其保留时间的RSD为0.58%( $n=6$ ),峰面积的RSD为1.46%( $n=6$ )。提示供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

**2.2.8 准确度试验** 准确称取已知含量的桔梗药材粉末6份(样品编号:11),加入相应量的桔梗皂苷D对照

品,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,进样测定,计算得加样回收率为97.57%~101.37%(RSD=1.51%, $n=6$ )。

**2.2.9 测定方法** 取各样品,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,依据标准曲线方程计算各样品中桔梗皂苷D的含量。

### 2.3 样品含量测定结果

各样品含量测定结果见表2。

表2 样品含量测定结果(% , $n=2$ )

Tab 2 Result of content determination of samples(% , $n=2$ )

样品编号	总皂苷含量	桔梗皂苷D含量	样品编号	总皂苷含量	桔梗皂苷D含量	样品编号	总皂苷含量	桔梗皂苷D含量
1	2.62	0.22	11	4.43	0.30	21	1.65	0.25
2	2.12	0.19	12	4.93	0.18	22	2.69	0.35
3	2.16	0.25	13	3.23	0.35	23	2.42	0.34
4	2.54	0.27	14	2.97	0.37	24	2.52	0.50
5	2.44	0.37	15	2.03	0.11	25	3.03	0.33
6	2.50	0.23	16	3.68	0.32	26	2.82	0.44
7	2.45	0.32	17	2.38	0.17	27	2.25	0.33
8	2.61	0.18	18	1.83	0.47	28	2.33	0.36
9	2.60	0.15	19	3.09	0.19	29	2.60	0.29
10	2.16	0.13	20	3.07	0.29	30	2.03	0.32

表2结果表明,一年生样品总皂苷含量为2.12%~2.62%,其平均值为2.42%;桔梗皂苷D含量为0.13%~0.37%,其平均值为0.23%。二年生样品总皂苷含量为1.83%~4.93%,其平均值为3.16%;桔梗皂苷D含量为0.11%~0.47%,其平均值为0.27%。三年生样品总皂苷含量为1.65%~3.03%,其平均值为2.43%;桔梗皂苷D含量为0.25%~0.50%,其平均值为0.35%。在桔梗总皂苷含量方面,一年生与三年生相当,均低于二年生样品;在桔梗皂苷D含量方面,一年生<二年生<三年生,即一年生样品无论是桔梗总皂苷还是桔梗皂苷D的含量均最低,桔梗总皂苷含量以二年生更高,桔梗皂苷D的含量以三年生更高。

### 3 讨论

笔者在本试验前期测定桔梗总皂苷和桔梗皂苷D过程中曾对不同的提取方法、提取溶剂、提取时间以及料液比进行了考察,以选取最优条件进行提取,最终建立了本文的供试品溶液制备方法。

笔者在本课题组前期的产地考察中发现,由于受到市场价格的影响,一些药农仅仅栽培一年就将桔梗采挖,但本试验结果表明,一年生的桔梗药材无论是桔梗总皂苷的含量还是桔梗皂苷D的含量都最低,这可能是由于生长年限较短致成分富集不完全造成的,故建议采挖时最好选用二年生或三年生的药材。

将桔梗总皂苷和桔梗皂苷D的含量综合考虑来看,两者的含量与生长年限并未显示出明显的相关性,二年生和三年生药材中有效成分的含量各有不同。因此,笔者建议不应单独用某一成分作为评价其质量的标准,应

# 无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721增殖和凋亡的影响

刘玉强\*,管美玉,孙建之,才 谦\*(辽宁中医药大学药学院,辽宁大连 116600)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1252-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.24

**摘要** 目的:研究无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721增殖、细胞周期和凋亡的影响,为明确其抗肿瘤作用机制提供参考。方法:采用MTT法考察低、中、高质量浓度的无梗五加果实乙醇提取物(0.92、1.84、3.68 mg/mL)、粗多糖提取物(0.06、0.12、0.24 mg/mL)和精多糖提取物(0.04、0.08、0.16 mg/mL)分别作用24、36、48 h后对人肝癌细胞SMMC-7721的增殖抑制作用;采用流式细胞术考察1.84 mg/mL乙醇提取物、0.24 mg/mL粗多糖提取物和0.16 mg/mL精多糖提取物分别作用24 h后对人肝癌细胞SMMC-7721细胞周期和细胞凋亡的影响。以上试验均设阴性对照(只加细胞不加药物)。结果:与阴性对照比较,无梗五加果实3种提取物均可显著抑制人肝癌细胞SMMC-7721的增殖( $P<0.01$ ),显著降低G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>/M期细胞的百分率( $P<0.01$ ),显著升高S期细胞的百分率( $P<0.01$ ),显著升高细胞凋亡率( $P<0.05$ ),其中以无梗五加果实乙醇提取物的作用最为明显。结论:无梗五加果实3种提取物均能抑制人肝癌细胞SMMC-7721的增殖,阻滞其细胞周期于S期,诱导其凋亡。

**关键词** 无梗五加果实;乙醇提取物;粗多糖提取物;精多糖提取物;人肝癌细胞SMMC-7721;增殖;凋亡

## Effects of 3 Extracts of *Acanthopanax sessiliflorus* Fruits on the Proliferation and Apoptosis of Human Hepatocarcinoma Cells SMMC-7721

LIU Yuqiang, GUAN Meiyu, SUN Jianzhi, CAI Qian (College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of 3 extracts of *Acanthopanax sessiliflorus* fruits on the proliferation and apoptosis of human hepatocarcinoma cells SMMC-7721, and to provide reference for confirming the mechanism of anti-tumor effect. METHODS: MTT assay was adopted to investigate the effects of low-mass concentration, medium-mass concentration and high-mass concentration of ethanol extract (0.92, 1.84, 3.68 mg/mL), crude polysaccharide extract (0.06, 0.12, 0.24 mg/mL) and refined polysaccharide extract (0.04, 0.08, 0.16 mg/mL) from *A. sessiliflorus* fruits on the proliferation and apoptosis of SMMC-7721 cells after treated for 24, 36, 48 h, respectively. Flow cytometry was used to investigate the effects of 1.84 mg/mL ethanol extract, 0.24 mg/mL crude polysaccharide extract and 0.16 mg/mL refined polysaccharide extract on cell cycle and cell

从各方面进行综合考虑。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:277.
- [2] 贾敏如,张艺. 中国民族药辞典[M].北京:中国中医药出版社,2016:1322-1324.
- [3] 刘德军,冯维洗. 桔梗[M].北京:中国中医药出版社,2001:13-15.
- [4] 杨洪升,杨娜,李爽,等. 东北药食同源植物[J]. 中国科技信息,2017,19(9):59-61.
- [5] 陆海洋,彭华胜,桂双英,等. 桔梗质量评价的沿革与变迁[J]. 中国中药杂志,2017,42(9):1637-1640.
- [6] 李盈,王举涛,桂双英,等. 桔梗的化学成分及药理作用研

\* 副教授,博士。研究方向:中药药剂学。电话:0411-85890145。E-mail:liuyuqiang@126.com

# 通信作者:副教授,博士。研究方向:中药化学。电话:0411-85890122。E-mail:caiqianmail@sina.com

究进展[J]. 食品与药品,2016,18(1):72-75.

- [7] INADA A, MURATA H, SOMEKAWA M, et al. Phytochemical studies of seeds of medicinal plants II. A new dihydroflavonol glycoside and a new 3-methyl-1-butanol glycoside from seeds of *Platycodon grandiflorum* A.DC.[J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(11):3081-3083.
- [8] HE ZD, QIAO CF, HAN QB. New triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum*[J]. *Tetraedron*, 2005, 61(8):2211-2215.
- [9] 何美莲,程小卫,陈家宽,等. 桔梗皂苷类成分及其质量分析[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(6):457-460.
- [10] MAZOL I, GLENSK M, CISOWSKI W, et al. Polyphenolic compounds from *Platycodon grandiflorum* A.DC.[J]. *Acta Pol Pharm*, 2004, 61(3):203-208.
- [11] 邹葭霜,单进军,谢彤,等. 桔梗皂苷D的研究进展[J]. 中成药,2014,36(4):823-827.

(收稿日期:2017-07-24 修回日期:2017-09-15)

(编辑:刘 萍)