

五种化感物质对人参幼根皂苷含量的影响

□黄小芳 李 勇 (中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)
(北京协和医学院)

刘时轮 (中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)
(北京协和医学院
(沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110161))

丁万隆** (中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)
(北京协和医学院)

摘 要:采用比色法测定了人参根系分泌物中苯甲酸、邻苯二甲酸二异丁酯、丁二酸二异丁酯、棕榈酸和 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷在 $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对人参幼根总皂苷含量的影响。试验结果表明,酚酸类化感物质能够降低人参皂苷含量,且随浓度增加,人参皂苷含量明显减少。研究结果说明酚酸类化感物质不仅对人参种子萌发、幼苗生长具有自毒作用,而且对人参有效成分的含量有显著影响。

关键词:人参 化感物质 总皂苷 比色法

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)为五加科人参属植物,连作障碍是影响人参规范化种植的突出问题,人参根系分泌物的自毒作用是造成连作障碍现象的原因之一^[1-2]。目前,有关化感物质对植物自毒作用的报道多集中于种子萌发、幼苗生长及生理生化指标评价研究^[3-5],而化感物质对植株有效药用成分的影响尚未见报道。人参皂苷既是人参主要次生代谢产物之一,同时也是重要的药用活性成分。本课题以人参总皂苷含量为研究对象,从有效成分含量的角度就化感物质对人参品质的影响进行了探讨,研究结果了解化感物质及连作障碍对人参品质的影响提供了有价值的参考依据。

一、仪器、试剂与样品

1. 仪 器

UV-2550 紫外分光光度计(岛津),HH-6 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),电子天平,树脂柱($1.5\text{cm}\times 20\text{cm}$)

2. 试 剂

甲醇,95%乙醇,正丁醇,98%浓硫酸均为分析纯(北京化学试剂公司),D101 型大孔吸附树脂(北京慧德易科技有限公司)。

3. 样 品

人参皂苷 Re 对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号:110754-200421)。三年生人参幼苗于 2008 年 4 月采自吉林省抚松县万良镇人参种植基地

收稿日期:2008-12-06

修回日期:2009-01-05

* 国家自然科学基金项目(30672619):人参连作障碍机理与根际微生物失衡之间的关系研究,负责人:丁万隆;国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI09B04-01):人参根病生物防治技术研究,负责人:丁万隆。

** 联系人:丁万隆,教授,主要研究方向:药用植物栽培及病害生物防治,E-mail: wlding@implad.ac.cn。

71 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

地。设定不同浓度五种化感物质及对照营养液培养 30 d, 人参鲜根烘干后研成粉末, 过四号筛, 备用。

二、方法与结果

1. 人参总皂苷的分类、纯化及含量测定

采用大孔吸附树脂分离纯化人参总皂苷^[6-7], 以人参皂苷 Re 为空白对照, 采用比色法检测人参总皂苷含量。

2. 标准曲线的绘制

称取人参皂苷 Re 对照品 5mg, 用甲醇溶解并定容至 10mL, 配制 $0.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准溶液。移液器分别吸取对照品标准溶液 30 μL 、60 μL 、90 μL 、120 μL 、150 μL 和 180 μL 于具塞玻璃试管中, 60℃水浴挥干甲醇, 分别加入 98%浓硫酸 5mL, 60℃恒温水浴 2h, 冷却至室温后, 以 5mL 浓硫酸(98%)为参比液, 用紫外分光光度计在 322nm 波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标, 人参皂苷 Re 含量(C)为横坐标绘制标准曲线(图 1), 求得回归方程: $A=0.0129C+0.0432$, $r=0.9991$, 表明人参皂苷 Re 含量在 15 μg ~90 μg 线性关系良好。

3. 大孔树脂预处理、装柱

称取 D101 大孔树脂 50g, 用 95%乙醇液浸泡 24 h, 湿法装入玻璃柱(1.5cm×15cm), 然后用 80%乙醇以 $1.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速洗涤树脂至洗脱液澄清, 再用蒸馏水将树脂柱中残留乙醇洗脱干净。

4. 大孔树脂的柱效考察

吸取 120 μL 人参皂苷对照品标准溶液于树脂柱, 预吸附 1h, 先用 50mL 蒸馏水洗脱, 用 20%乙醇 50 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 再用 80%乙醇 80mL 洗脱, 收集洗脱液并定容至 100mL, 将洗脱液转移至蒸发皿中水浴挥干乙醇, 残留物用 80%乙醇溶解后转移至 10mL 具塞试管中, 然后按照与标准对照品同样的处理方法测定吸光度, 平行 6 次, 用标准曲线法计算含量, 求得柱效(见表 1)。

5. 供试样品溶液的制备

精密称取 0.1 g 供试样品, 于 50mL 具塞锥形瓶中, 加入 20mL 水饱和正丁醇溶液, 密闭, 超声提取 30min, 冷却至室温后过滤, 精密量取滤液 4.0mL, 水

浴蒸干, 用 5mL 蒸馏水溶解残留物, 转移至 D101 大孔吸附树脂, 预吸附 1h, 以 50mL 蒸馏水洗脱, 弃去洗脱液, 用 50mL 乙醇(20%)洗脱, 弃去洗脱液, 再用 80mL 乙醇(80%)洗脱, 收集洗脱液并定容至 100mL, 摇匀备用。

6. 样品含量测定

吸取供试样品溶液 20mL, 置水浴上蒸干, 残留物用 80%乙醇溶解, 转移至 10mL 具塞试管中, 然后按照与标准对照品同样的处理方法测定吸光度, 用标准曲线法结合大孔树脂柱效计算人参皂苷含量(表 2)。

由表 2 可以看出, 与对照相比, 苯甲酸在 $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对人参幼根皂苷合成有轻微促进作用; 当浓度为 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对人参幼根皂苷合成有轻微抑制作用; 当浓度增加至 $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抑制作用达显著水平 ($P<0.05$)。邻苯二甲酸二异丁酯在 $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对人参幼根皂苷合成有极显著促进作用($P<0.01$), 而在 $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时对人参皂苷

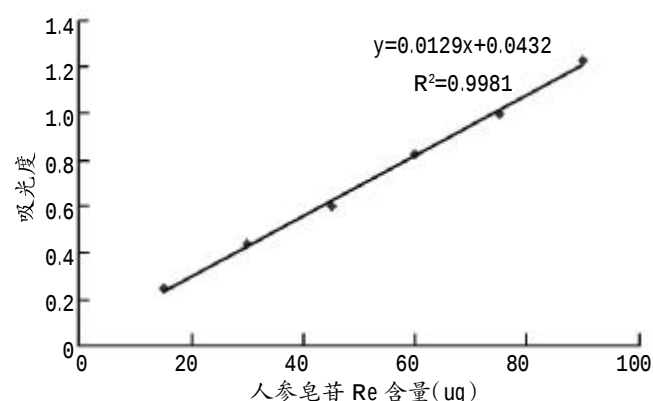


图 1 人参皂苷线性关系图

表 1 大孔树脂柱效考察结果

编号	上样量 (μL)	人参皂苷含量 (μg)	柱效 (%)	平均柱效 (%)	RSD (%)
1	100	32.23	64.47	65.58	2.95
2	100	33.63	67.25		
3	100	33.32	66.64		
4	100	33.94	67.88		
5	100	31.53	63.07		
6	100	32.08	64.16		

注: 柱效=人参皂苷含量/上样量×浓度×100%

合成呈显著抑制作用($P<0.05$)。丁二酸二异丁酯在三种浓度下均对人参幼根皂苷合成有促进作用,且浓度为 $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著促进 ($P<0.05$)。棕榈酸在 $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对人参幼根皂苷合成有极显著抑制作用($P<0.01$),在浓度为 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有助于人参皂苷合成,但作用不显著。2,2-二(4-羟基苯基)丙烷在三种浓度下均对人参幼根皂苷合成起抑制作用,且在浓度为 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制达极显著水平($P<0.01$)。

7. 精密度试验

用移液器吸取对照品标准溶液 $60\mu\text{l}$,连续 6 次测定人参皂苷含量(表 3)。变异系数 $\text{RSD}=1.29\%$,表明仪器性能良好,精密度符合皂苷含量测定要求。

8. 重现性试验

精密称取 0.1g 相同批次对照处理人参样品 6 份,按照 5 和 6 的操作步骤对人参皂苷含量进行测定,考察该方法的重现性(表 4)。人参皂苷平均含量为 $13.28\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{RSD}=1.78\%$,表明该含量测定方法重现性较好。

9. 稳定性试验

用移液器吸取 6 份对照品标准溶液各 $60\mu\text{l}$,分别于 0h, 2h, 4h, 6h, 12h 和 24h 测定吸光度(表 5)。在 6h 内 $\text{RSD}=3.20\%$, 12h 内 $\text{RSD}=5.11\%$, 24h 内 $\text{RSD}=8.71\%$,表明样品溶液在 6h 内显色稳定。

用移液器吸取对照品标准溶液 $60\mu\text{l}$,显色后分别于 0h, 2h, 4h, 6h, 12h 和 24h 测定吸光度(表 5)。在 12h 内 $\text{RSD}=2.18\%$, 24h 内 $\text{RSD}=5.75\%$,表明显色后 12h 内稳定。

三、讨论与结论

国内外报道的有关总皂苷含量的测定方法包括生物测定和化学测定。在生物测定方法中,早期使用最多的是利用皂苷具有溶血作用的特性,以溶血指数计算皂苷含量^[8],该方法不能排除植物样品中其它具有溶血作用成分的干扰。人参皂苷化学测定的基本方法主要有比色法^[9]和薄层法^[10]。近年来,随着对皂苷类成分了解的深入, HPLC^[11]、GC、GC/MS^[12]等方法也被用于皂苷含量测定,这类方法主要用于测定

表 2 人参皂苷含量测定结果

化感物质	浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	人参皂苷含量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD (%)
苯甲酸	1	10.68*	3.88
	0.1	12.49	2.33
	0.01	13.61	2.87
邻苯二甲酸二异丁酯	1	12.43*	3.28
	0.1	14.20**	2.23
	0.01	14.50**	2.80
丁二酸二异丁酯	1	14.37*	3.00
	0.1	13.31	1.78
	0.01	13.68	2.81
棕榈酸	1	9.99**	3.70
	0.1	13.64	2.21
	0.01	11.66**	3.56
2,2-二(4-羟基苯基)丙烷	1	5.91**	3.40
	0.1	10.66**	3.27
	0.01	12.76	2.44
CK		13.10	1.92

注: *表示有显著性差异($P<0.05$);

**表示有极显著性差异($P<0.01$)。

表 3 仪器精密度试验结果

编号	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.495	0.486	0.479	0.503	0.494	0.499
RSD(%)	1.29					

表 4 重现性试验结果

编号	吸光度	人参皂苷含量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	人参皂苷平均 含量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD(%)
1	0.495	13.35		
2	0.486	13.09		
3	0.479	12.88		
4	0.503	13.59	13.28	1.78
5	0.494	13.32		
6	0.499	13.47		

表 5 人参皂苷稳定性试验结果

时间(h)	样品溶液		显色后溶液	
	吸光度	RSD(%)	吸光度	RSD(%)
0	0.476	3.20	0.466	2.18
2	0.470		0.467	
4	0.479		0.466	
6	0.446		0.470	
12	0.424	5.11	0.445	
24	0.379	8.71	0.422	5.75

单体皂苷含量,对仪器设备要求较高。本文采用比色法测定人参总皂苷的含量,并对选定方法的精密度、重现性、稳定性进行了考察,结果表明该方法简便易行,而且精密度、重现性、稳定性均较好,能够满足人参皂苷含量测定的要求。

田义新等^[13]对长白山人参最佳采收期的研究结果显示,人参总皂苷含量随着生长年限的增加而增加,四年生人参皂苷含量为1%~4%,五年生和六年生的人参皂苷含量可达10%以上。而本试验所测得人参皂苷含量普遍在1%左右,含量偏低,这是因为本试验所用材料为三年生人参,人参皂苷尚处于积累上升阶段,没有达到有效成分含量高峰期。试验结果表明,化感物质对人参幼根皂苷的积累有影响。其中,苯甲酸在高浓度时能显著降低皂苷含量;棕榈酸在低浓度和高浓度时,以及2,2-二(4-羟基苯基)丙烷在中高浓度时均能极显著降低皂苷含量;邻苯二甲酸二异丁酯在高浓度时能显著降低皂苷含量,但在中低浓度时却表现了增加皂苷含量的作用,且作用达极显著水平;丁二酸二异丁酯在所设三种浓度下均有升高皂苷含量的作用,只有在高浓度时作用显著。笔者通过研究也发现,苯甲酸、棕榈酸、2,2-二(4-羟基苯基)丙烷三种酚类物质和邻苯二甲酸二异丁酯、丁二酸二异丁酯两种酯类化合物达到一定浓度时能够抑制人参种子萌发和幼苗根系的抗氧化保护性酶活性。本试验进一步说明了化感作用不仅对人参种子萌发、幼苗生长以及各项生理生化指标有影响,而且还影响人参皂苷的合成和积累。

参考文献

- 1 李勇,黄小芳,丁万隆,张锐.不同土壤提取物的化感效应及其化学组成研究.生态环境,2008,17(3):1173~1178.
- 2 陈长宝,刘继永,王艳艳,等.人参根际化感作用及其对种子萌发的影响.吉林农业大学学报,2006,28(5):534~537,541.
- 3 宋亮,潘开文,王进闯,等.酚酸类物质对苜蓿种子萌发及抗氧化酶活性的影响.生态学报,2006,26(10):3393~3403.
- 4 汪思龙,陈龙池,廖利平,等.几种化感物质对杉木幼苗生长的影响.应用与环境生物学报,2002,8(6):588~591.
- 5 郁继华,张韵,牛彩霞,等.两种化感物质对茄子幼苗光合作用及叶绿素荧光参数的影响.应用生态学报,2006,17(9):1629~1632.
- 6 何克江,韩蔚,栾宏伟,等.纯化和分光光度法检测联用的人参总皂苷简易测定方法.药物分析杂志,2003,23(4):284~288.
- 7 杨文志,于淑莲,姜子恒,等.论人参总皂苷的科学定量方法.人参研究,2007,2:7~10.
- 8 Birk Y. Saponins. Toxic Constituents of plant Food Staffs, 2nd ed. Academic Press: New York, 1969, 161~182.
- 9 Hiai S, Oura H, Nakajima T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. Planta Med., 1976, 29: 116~122.
- 10 Fenwick D E, Oakenfull D G. Saponin content of food plants and some prepared foods. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1983, 34: 186~191.
- 11 Hostettmann K, Marston A. Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins, Phillipson J D, Ayres D C, Baxter H, Eds., Cambridge University Press: Cambridge, U.K, 1995, 125~135.
- 12 Tava A, Odoardi M. Saponins from Medicago Spp.: Chemical characterization and biological activity against insects. Saponins Used in Food and Agriculture, Waller G R, Yamasaki K, eds., Plenum Press: New York, 1996, 97~109.
- 13 田义新,尹春梅,盛吉明,等.长白山人参最佳采收期的确定.中草药,2005,36(8):1239~1241.

Effects of Five Allelochemicals on Ginsenosides in Ginseng Seedling Roots

Huang Xiaofang¹, Li Yong¹, Liu Shilun^{1,2}, Ding Wanlong¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

(2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

The effects of diisobutyl succinate, 1,2-benzenedicarboxylic acid bis (2-methylpropyl) ester, palmitic acid, and

(Continued on Page 70)