抗抑郁 20(*S*)-原人参二醇型人参皂苷成分分析

杨红艳[1]，龚韦凡[2]，李竣[2]，张华林[1]

（1.岭南师范学院化学化工学院，广东湛江 524048）（2.中南民族大学药学院，湖北武汉 430074）

摘要：本文研究了抗抑郁活性三七叶总皂苷提取物中的 20(*S*)-原人参二醇（PPD）型人参皂苷成分。采用对照品以及文献对比相结合的方法，初步分析该活性提取物的人参皂苷成分；采用高效液相色谱法，色谱条件为：甲醇-0.2%磷酸溶液（70:30）为流动相，检测波长 203 nm，柱温为 30 ℃，同时测定提取物中人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3，三七皂苷 Fc 这 5 个代表性的 PPD 型人参皂苷活性成分的含量。结果鉴别出 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 等 15 个成分，其中 13 个为 PPD 型人参皂苷。HPLC 含量测定中，Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 分离良好，分离度 1.5 以上，平均加样回收率分别为 98.92±2.67%（RSD=2.73%）、99.51±1.33%（RSD=1.34%）、100.09±1.45%（RSD=1.45%）、100.53±2.24（RSD=2.22%）、100.12±1.74%（RSD=1.74%）。本研究表明抗抑郁活性三七叶总皂苷主要是 PPD 型人参皂苷成分，其中 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 的总含量高达 38.67±0.18%。

关键词：抑郁；三七茎叶；人参皂苷；20(*S*)-原人参二醇型；高效液相色谱法

文章篇号：1673-9078(2018)05-251-256 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.036

Components Analysis of the Antidepressant 20(*S*)-Protopanoxadiol Type Ginsenosides

YANG Hong-yan[1], GONG Wei-fan[2], LI Jun[2], ZHANG Hua-lin[1]

(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China)

(2.College of Pharmacy, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract: The 20(*S*)-protopanoxadiol type (PPD) ginsenosides of the antidepressant total saponins extracted from the leaves of *Panax Notoginseng* (TSLPN) were investigated in this study, and the ginsenoside composition of TSLPN were analyzed by reference substances and literature. The content of 5 representative PPD ginsenosides including ginsenoside Rb_1, Rc, Rb_2,Rb_3 and notoginsenoside Fc was determined simultaneously by the high performance liquid chromatography (HPLC) with the chromatographic condition as follows: mobile phrase, methanol-0.2% phosphoric acid solution (70:30), detection wavelength, 203 nm, colunm temperature, 30 °C. Results showed that 15 components including Rb_1, Rc, Fc, Rb_2, and Rb_3 were identified, of which 13 components were PPD ginsenosides. Rb_1, Rc, Fc, Rb_2, and Rb_3 were well seperated by HPLC, and the resolutions were above 1.5. In addition, the average recovery rates were 98.92±2.67% (RSD=2.73%), 99.51±1.33% (RSD=1.34%), 100.09±1.45% (RSD=1.45%), 100.53±2.24 (RSD=2.22%), 100.12±1.74% (RSD=1.74%), respectively. Consequently, TSLPN was mainly composed of the PPD ginsenosides, and the total content of Rb_1, Rc, Fc, Rb_2, and Rb_3 was as high as 38.67±0.18%.

Key words: depression; caudexes and leaves of *Panax Notoginseng*; Ginsenoside; 20(*S*)-Protopanaxadiol-type; high performance liquid chromatography

抑郁症（depression）是一组以显著而持久的心境低落为主要特征的综合症，是常见精神疾病之一。世界卫生组织的统计表明，世界上前 10 种致人残疾或丧失劳动能力的疾病中，抑郁症居第 5 位，并且具有逐步上升的趋势。三七叶总皂苷为五加科（Araliaceae）植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen 茎叶的提取物，是传统中成药七叶神安片的主要原料，具有益气安神、活血止痛的功效，临床用于心气不足、心血瘀阻所致的心悸、失眠、胸痛和胸闷等。三七叶总皂苷和来源于三七根茎的三七总皂苷一样含有丰富的人参皂苷成分，不同的是前者主要含 20(*S*)-原人参二醇（PPD）型人参皂苷，几乎不含 20(*S*)-原人参三醇（PPT）型人参皂苷[1]。

收稿日期：2017-12-26

基金项目：国家自然科学基金项目（81202435）；广东省自然科学基金项目（2014A030307025）；广东省公益研究与能力建设专项（2016A020226021）；广东省高等学校高层次人才项目（QBS201502）；广东省 2015 年“扬帆计划”培养高层次人才项目

作者简介：杨红艳（1979-），女，讲师，主要从事天然药物有效成分研究

通讯作者：张华林（1979-），男，博士，副教授，主要从事中药新药开发

我们从三七叶总皂苷中进一步的分离、精制获得具有良好抗抑郁活性的三七叶总皂苷提取物，其作用机制涉及五羟色胺能系统（5-HT）、去甲肾上腺素能系统（NE）以及多巴胺能系统（DA）等三种神经递质系统[2]。进一步的分子作用机制研究表明，该提取物的抗抑郁作用也与 cAMP 反应元件结合蛋白（CREB）及脑源性神经营养因子（BDNF）这两种与抑郁症相关的神经调节因子以及 cAMP-PKA-CREB-BDNF 、TrKB-ERK-CREB-BDNF 这两条上游神经信号转导通道有密切关联[3,4]。

此外我们从总提取物、有效组分、有效成分三个层面进行药效评价，分析其起效的物质基础，结果表明以人参皂苷 Rb_3、Rb_1、Rb_2、Rc 和三七皂苷 Fc 等为代表的 PPD 型人参皂苷是重要的活性成分[5,6]。

本文针对 PPD 型人参皂苷成分，采用高效液相色谱法对抗抑郁三七叶总皂苷提取物的成分进行初步的定性分析，并对 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2 和 Rb_3 这 5 种活性成分同时进行含量测定，为该活性提取物建立质量标准提供依据，为研发抗抑郁中药新药打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与原料

三七叶总皂苷由本实验室制备，人参皂苷 Rb_1(批号：GR-134-170304)，人参皂苷 Rb_2(批号：GR-133-161129)，人参皂苷 Rb_3(批号：GR-133-161226)，人参皂苷 Rc(批号：GR-134-170107)，三七皂苷 Fc(批号：GR-134-170409)以及三七皂苷 R_1、Fa、Fe，人参皂苷 Rg_1、Rd、F_1、C-K、Rh_2、Rg_3，原人参二醇等对照品均购自南京泽朗医药有限公司；色谱甲醇、乙腈购自美国 Tedia 公司；其他试剂为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

Waters 2695 高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；Milli-Q plus system 超纯水仪，美国 Millipore，Milford，MA；KQ-500E 型超声仪，昆山市超声仪器有限公司；AL204 电子天平，瑞士 MettlerToledo 公司；DK-8B 型电热恒温水槽，上海精宏实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 三七叶总皂苷成分定性分析

色谱条件：Agilent ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）:0.2%磷酸溶液（B），线性梯度洗脱（*V/V*），洗脱时间程序见表 1，流速 0.3 mL/min，柱温 35 ℃，检测波长为 203 nm，进样量为 10 μL。样品溶液制备：精密称取三七叶总皂苷样品适量，置于 10 mL 容量瓶中，加入适量甲醇，超声溶解，放置室温，定容，摇匀后用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，弃初滤液，取续滤液进样。

表 1 梯度洗脱时间程序

Table 1 Time program of gradient elution

Time/min	0~19	19~25	25~40	40~65	65~100	100~140	140~154	154~155	155~160
A/%	32→35	35→38	38→42	42	42→60	60→80	80→85	85→32	32
B/%	68→65	65→62	62→58	58	58→40	40→20	20→15	15→68	68

1.2.2 人参皂苷 Rb_1、Rb_2、Rc、Rb_3 与三七皂苷 Fc 的含量测定

色谱条件：Agela Venusil XBP C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇:0.2%磷酸溶液（70:30），等度洗脱，流速为 0.8 mL/min，柱温为 30 ℃，检测波长为 203 nm，进样量为 10 μL。

系列浓度对照品溶液的制备：精密称取 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 对照品适量，置于 10 mL 容量瓶中，加甲醇溶解并定容，得对照品储备液。将对照品储备液逐步稀释，得到系列浓度的对照品溶液。

样品溶液制备：精密称取三七总皂苷样品适量，置于 10 mL 容量瓶中，加入适量甲醇，超声溶解，放置室温，定容，摇匀后用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，弃初滤液，取续滤液进样。

1.2.3 数据分析与处理

人参皂苷成分定性分析研究，采用对照品对照并结合相关文献[7]进行高效液相色谱图分析，确定色谱峰的归属。

含量测定实验线性方程采用 SPSS 17.0 完成，其他数据结果采用平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 三七叶总皂苷成分定性分析结果

三七叶总皂苷的 HPLC 图谱（见图 1），共标定色谱峰 36 个。对色谱峰进行定性分析，结果见表 2。

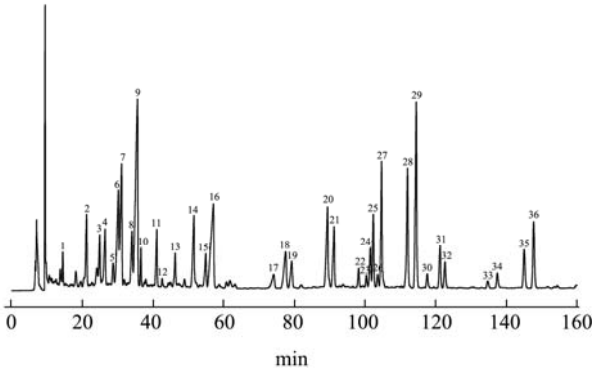


图 1 三七叶总皂苷 HPLC 分析图谱

Fig.1 HPLC analysis of total saponins from the leaves of *Panax Notoginseng*

2.2 人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc、Rb3 与三七皂苷 Fc 的含量

2.2.1 色谱条件的确定及系统适应性试验

Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 均为带 4~5 个糖基的 PPD 型人参皂苷，化学性质较为接近，给色谱分离带来困难，故文献采用梯度洗脱的方法，但是会出现一定的基线漂移的现象[8]。实验中选择以等度洗脱为基础，对不同流动相体系（甲醇:0.2%磷酸溶液，乙腈:水，乙腈:磷酸溶液，甲醇:水，甲醇:磷酸溶液，乙腈:甲醇:水等），不同色谱柱（Agela Venusil XBP C_{18}、Agilent ZORBAX SB-C_{18}、Ultimate AQ-C_{18}、Inertsil ODS-3、Eclipse XDB-C_{18}-USP L_1、Diamonsil C_{18} 等）以及不同的柱温条件（35、30、25、20 ℃）的分离效果进行比较，最后确定采用 Agela Venusil XBP C_{18} 色谱柱，柱温为 30 ℃，甲醇-0.2%磷酸溶液（70:30）等度洗脱，彻底解决了基线漂移的问题，而且能够使 Rb_1、Rc、Rb_2、Fc、Rb_3 这 5 种成分达到良好分离，分离度均大于 1.5，色谱图见图 2。

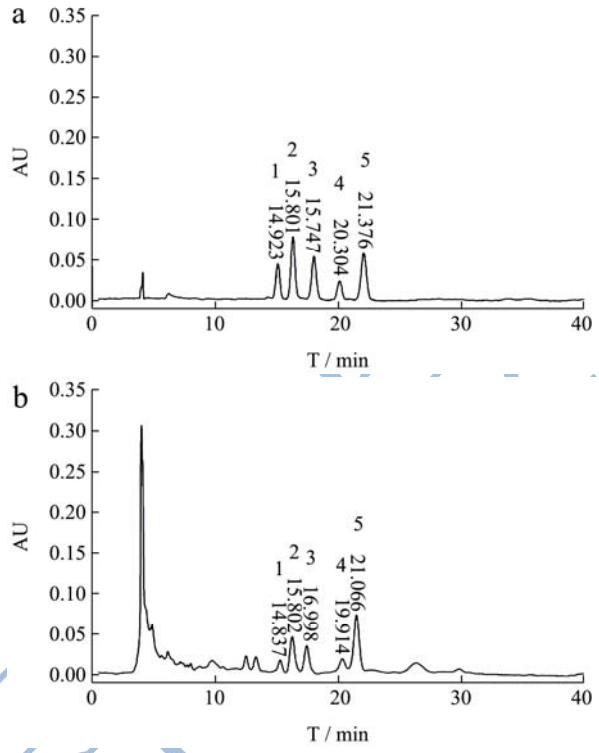


图 2 混合对照品（a）、三七叶总皂苷（b）的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A), total saponins from the leaves of *Panax Notoginseng* (B)

注：1.人参皂苷 Rb_1；2.人参皂苷 Rc；3.三七皂苷 Fc；4.人参皂苷 Rb_2；5.人参皂苷 Rb_3。

2.2.2 线性关系

取系列浓度对照品溶液，按照 1.2.2 项下色谱条件测定，记录各成分的峰面积。以峰面积 A 和对照品浓度 C(mg/mL)作线性回归，得到线性方程，结果见表 3。

表 2 三七叶总皂苷 HPLC 成分分析结果

Table 2 HPLC analysis of the components of total saponins from the leaves of *Panax Notoginseng*

峰号	定性	保留时间/min	峰号	定性	保留时间/min
1	三七皂苷 R_1	9.447	19		79.273
2	人参皂苷 Rg_1	21.18	20	人参皂苷 Rg_3	89.427
3	三七皂苷 Fa	24.913	21		91.267
4		26.45	22		98.203
5	人参皂苷 Rb_1	28.69	23		100.397
6	人参皂苷 Rc	30.207	24		101.52
7	三七皂苷 Fc	31.11	25		102.37
8	人参皂苷 Rb_2	34.057	26		103.61
9	人参皂苷 Rb_3	35.59	27		104.707
10		36.563	28		112.06
11	人参皂苷 Rd	41.06	29		114.52

转下页

接上页

12	人参皂苷 F1	42.573	30	人参皂苷 C-K	117.633
13	三七皂苷 Fe	46.28	31	人参皂苷 Rh2	121.27
14		51.567	32		122.657
15		54.94	33		134.757
16		57.073	34	原人参二醇	137.467
17		74.167	35		145.077
18		77.537	36		147.77

表 3 人参皂苷 Rb_1、Rc、Rb_2、Rb_3 与三七皂苷 Fc 的线性方程

Table 3 Linear equations of ginsenosides Rb_1, Rc, Rb_2, Rb_3 and notoginsenoside Fc

成分	线性方程	线性范围/(mg/mL)	R^2
人参皂苷 Rb_1	Y=2644532X-9263	0.058~0.580	0.9995
人参皂苷 Rc	Y=2272390X-5206	0.107~1.070	0.9990
三七皂苷 Fc	Y=2637708X-11185	0.111~1.110	0.9990
人参皂苷 Rb_2	Y=2908934X-47104	0.036~0.360	0.9998
人参皂苷 Rb_3	Y=2824485X-8919	0.109~1.090	0.9993

2.2.3 精密度试验

取系列浓度对照品溶液中的任意一份，连续进样 5 次，测定各成分的峰面积，分别计算 RSD 值。结果 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 的 RSD 值分别为 0.64%、1.07%、0.53%、1.69%和 1.49%，表明仪器的精密度良好。

2.2.4 稳定性试验

精密称取三七总皂苷，按照 1.2.2 项下操作，制备样品溶液，分别在 0，4，8，12，24，36，48 h 内进样，测定各成分的峰面积，分别计算 RSD 值。结果 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 的 RSD 值分别为 1.95%、1.57%、1.41%、1.85%、1.25%，表明样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.5 重现性试验

精密称取三七叶总皂苷，按照 1.2.2 项下操作，平行制备 6 份样品溶液，分别进样，测定各成分的峰面积，分别计算 RSD 值。结果 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 的 RSD 值分别为 1.85%、1.15%、1.06%、1.22%、0.73%，表明该含量测定方法重现性良好。

2.2.6 加样回收率试验

精密称取已知含量三七总皂苷样品适量，根据样品中所含 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 含量的 50%、100%、150%，加入各对照品，按照“2.2.3”样品溶液制备项下操作，平行制备 9 份样品溶液，进样，测定各成分的峰面积，计算加样回收率及 RSD 值，结果见表 4，平均回收率均在 99%~101%之间，表明该含量测定方法对于 5 种成分的准确度较高。

2.2.7 样品测定

按照 1.2.2 样品溶液制备项下操作，平行制备 6 份样品溶液，测定抗抑郁三七叶总皂苷的主要成分 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 的含量，结果见表 5。

表 4 加样回收率试验结果

Table 4 Results of recovery tests

成分	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
人参皂苷 Rb_1	0.24	0.12	0.36	100.00	98.92±2.67	2.70
			0.36	100.00		
			0.36	100.00		
		0.24	0.47	95.83		
			0.49	104.17		
			0.47	95.83		
		0.36	0.60	100.00		
			0.59	97.22		
			0.59	97.22		

转下页

接上页

			1.48	102.04		
		0.49	1.46	97.96		
			1.46	97.96		
			1.96	100.00		
人参皂苷 Rc	0.98	0.98	1.96	100.00	99.51±1.33	1.34
			1.95	98.98		
			2.43	98.64		
		1.47	2.44	99.32		
			2.46	100.68		
			1.20	100.00		
		0.40	1.22	102.50		
			1.21	102.50		
			1.59	98.75		
三七皂苷 Fc	0.80	0.80	1.60	100.00	100.09±1.45	1.45
			1.59	98.75		
			2.00	100.00		
		1.20	1.99	99.17		
			1.99	99.17		
			0.41	100.00		
		0.14	0.42	100.00		
			0.42	100.00		
			0.57	103.57		
人参皂苷 Rb_2	0.28	0.28	0.57	103.57	100.53±2.24	2.22
			0.56	100.00		
			0.69	97.62		
		0.42	0.69	97.62		
			0.71	102.38		
			2.33	98.72		
		0.78	2.35	101.28		
			2.33	98.72		
			3.11	99.36		
人参皂苷 Rb_3	1.56	1.56	3.12	100.00	100.12±1.74	1.74
			3.12	100.00		
			3.88	99.15		
		2.34	3.89	99.57		
			4	104.27		

表 5 三七叶总皂苷 5 种人参皂苷的含量测定结果（%）

Table 5 Content determination of five ginsenosides in total saponins from the leaves of *Panax Notoginseng* (%)

样品	人参皂苷 Rb_1	人参皂苷 Rc	三七皂苷 Fc	人参皂苷 Rb_2	人参皂苷 Rb_3	合计
1	2.39	9.78	8.00	2.84	15.63	38.64
2	2.36	9.62	7.89	2.86	15.74	38.47
3	2.41	9.70	7.95	2.82	15.59	38.47
4	2.31	9.86	7.87	2.92	15.72	38.68

转下页

现代食品科技

接上页

5	2.41	9.88	7.84	2.85	15.90	38.88
6	2.32	9.85	8.06	2.84	15.81	38.88
平均	2.37±0.04	9.78±0.10	7.94±0.08	2.85±0.34	15.73±0.11	38.67±0.18

3 结论

3.1 本课题对抗抑郁作用三七叶总皂苷提取物进行初步的成分分析，从中鉴定出 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 等 15 种人参皂苷成分，其中 13 种为 PPD 型人参皂苷。对其中的 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 这 5 种代表性 PPD 型人参皂苷活性成分同时进行含量测定，总含量高达 38.67±0.18%。上述结果表明该活性提取物主要以 PPD 型人参皂苷为主。我们之前的实验使用硅胶柱层析技术将三七叶总皂苷按照极性的大小切割成三个部位，同时进行抗抑郁活性的对比研究，结果发现富含 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 的部位活性最强，我们也单独分析了 Rb_3、Rb_1、Rb_2 等化合物的活性，结果发现上述化合物，尤其是三七叶总皂苷里面含量最高的 Rb_3(>10%)具有明显的抗抑郁作用[5,6]。此外其它的文献也报道了 Rb_3、Rb_1、Rc 等 PPD 型化合物的抗抑郁活性[9,10]。我们推测 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 等 PPD 型人参皂苷成分是三七叶总皂苷抗抑郁作用的物质基础，应该是多成分协同整合共同发挥抗抑郁作用。

3.2 本研究采用 HPLC 法对 Rb_1、Rc、Fc、Rb_2、Rb_3 这 5 种代表性活性成分同时进行含量测定，该方法准确可靠，可用于抗抑郁作用三七叶总皂苷提取物的质量控制。然而三七叶总皂苷中还有若干的未知成分需要采用 HPLC-ESI-MS 等方法进一步确定。

参考文献

[1] Wan J B, Yang F Q, Li S P, et al. Chemical characteristics for different parts of *Panax notoginseng* using pressurized liquid extraction and HPLC-ELSD [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41: 1596-1601

[2] Xiang H, Liu Y X, Zhang B B, et al. The antidepressant effects and mechanism of action of total saponins from the caudexes and leaves of *Panax notoginseng* in animal models of depression [J]. Phytomedicine, 2011, 18(8-9): 731-738

[3] Zhang HL, Li Z, Zhou ZL, et al. Effects of total saponin from leaves of *panax notoginseng* on the brain monoamine neurotransmitters and neurotrophic factors in a depressive rat model [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31 (12): 32-41

[4] 张华林,周中流,杨红艳,等.三七叶总皂苷对慢性应激抑郁大鼠行为学及海马体 cAMP、PKA、BDNF 的影响[J].现代食品科技,2015,31(3):1-5
ZHANG Hua-lin, ZHOU Zhong-liu, YANG Hong-yan, et al. Effects of total saponins in *Panax notoginseng* leaves on behavior and levels of cAMP, PKA, and BDNF in rats exposed to chronic unpredictable mild sress [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(3): 1-5

[5] Zhou H J, Zhang H L, Cui J H, et al. Protopanaxadiol saponins in the caudexes and leaves of *panax notoginseng* could be the main constituents that contribute to its antidepressant effects [J]. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014, 6(11): 301-311

[6] Zhang HL, Li Z, Zhou ZL, et al. Antidepressant-like effects of ginsenosides: A comparison of ginsenoside Rb_3 and its four deglycosylated derivatives, Rg_3, Rh_2, compound K, and 20(*S*)-protopanaxadiol in mice models of despair [J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2016, 140: 17-26

[7] 孔海宁,韩金玉,黄鑫.三七茎叶提取物指纹图谱的建立[J].化学工业与工程,2007,24(3):211-214
KONG Hai-ning, HAN Jin-yu, HUANG Xin. Construction of chromatographic fingerprint of saponins in *Panax Notoginseng* Leaves [J]. Chemical Industry and Engineering, 2007, 24(3): 211-214

[8] 崔翰明,张春光,林海,等.HPLC 法测定三七不同药用部位中有效成分含量[J].中药材,2009,32(12):1810-1813
CUI Han-ming, ZHANG Chun-guang, LIN Hai, et al. Determination of effective components in different positions of *Panax Notoginseng* by HPLC [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(12): 1810-1813

[9] Yamada N, Araki Hiroaki, Yoshimura H. Identification of antidepressant-like ingredients in ginseng root (*Panax ginseng* C.A. Meyer) using a menopausal depressive-like state in female mice: participation of 5-HT2A receptors [J]. Psychopharmacology, 2011, 216(4): 589-599

[10] Cui J H, Jiang L X, Xiang H. Ginsenoside Rb_3 exerts antidepressant-like effects in several animal models [J]. Journal of Psychopharmacology, 2012, 26(5): 697-713