

人参茎叶皂苷对醛糖还原酶的抑制作用

孟凡丽

(辽宁农业职业技术学院 农学院园艺系, 辽宁 营口 115009)

摘要:以五年生人参茎叶为材料,提取总皂苷,用30%、50%、80%乙醇洗脱人参茎叶总皂苷获取不同种类和含量人参皂苷,测定不同浓度乙醇洗脱人参茎叶皂苷对醛糖还原酶(AR)抑制作用。结果表明:不同浓度乙醇洗脱人参茎叶皂对AR都有一定的抑制作用,其中对AR抑制作用最强的是80%乙醇洗脱人参茎叶皂苷对AR抑制作用超过阳性对照依帕司他(EPS)($P < 0.01$),30%乙醇洗脱人参茎叶皂苷和50%乙醇洗脱人参茎叶皂苷对AR抑制作用有一定的抑制,但没有超过EPS。醛糖还原酶抑制剂对糖尿病并发症,尤其是对糖尿病微血管并发症有很好的治疗效果。综上所述,人参茎叶提取总皂苷在糖尿病微血管并发症治疗方面有一定的应用价值。

关键词:人参茎叶;人参皂苷;醛糖还原酶抑制剂

中图分类号:R284.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)01-0110-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2017.01.0110

人参皂苷是人参的主要活性成分之一,前期研究发现^[1],人参皂苷Rg2、Rg1、Rd对醛糖还原酶(AR)具有较强的抑制作用,在糖尿病并发症治疗方面具有潜在的应用价值,尤其是在糖尿病微血管并发症方面^[2-3]。在前期研究的基础上,拟系统分析人参茎叶皂苷对醛糖还原酶的抑制功效,并深入探讨了不同浓度酒精洗脱对人参茎叶皂苷在醛糖还原酶抑制作用的差异,以期揭示人参茎叶不同洗脱方法的皂苷在治疗糖尿病并发症方面潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

五年生人参茎叶从吉林省抚松县人参基地采集;新鲜牛眼睛从营口市北方精制牛肉厂购买。

试验所用试剂和仪器有Sigma公司的NADPH, Solarbio公司的DL-甘油醛;扬子江药业集团生产依帕司他(EPS);乙腈、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、硫酸铵、85%磷酸、95%乙醇从沈阳市新化试剂厂购买。精密科学仪器有限公司760CRT双光束紫外可见分光光度仪;上海安亭科学仪器的GL-12B高速冷冻离心机;Solarbio公司的MD₃₄透析袋。

1.2 方法

1.2.1 人参茎叶总皂苷的提取 晾干人参茎叶用粉碎机粉碎,称取2 kg,按茎叶与水1:30比例

煮沸3 h,重复3次;然后浓缩;再用95%乙醇进行萃取,取上清液,浓缩至干;得到人参茎叶总皂苷粗提取物。

1.2.2 不同浓度乙醇洗脱人参茎叶总皂苷的制备 称取人参茎叶总皂苷粗提取物80 g, AB-8大孔树脂,分别用30%、50%、80%乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩至干。

1.2.3 醛糖还原酶(AR)提取 醛糖还原酶的提取方法参照Federico等^[4-5]的体系略加修改。取新鲜牛眼500 g,去除牛眼睛肌肉及血管组织获得晶状体,用预冷的磷酸钾缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH6.2)漂洗2次,再加入3倍体积的磷酸钾缓冲液, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速电动匀浆离心3 min,再 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min。将上清液转移到新的离心管中,缓慢加入硫酸铵至0.40饱和度,间断式搅拌1 h;再 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,时间为15 min,取上清液加入硫酸铵至0.50饱和度,间断式搅拌1 h; $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,时间为15 min,取上清液加入硫酸铵至0.75饱和度,间断式搅拌3 h, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,时间为15 min,取沉淀用少量的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液溶解,透析12 h,即得AR粗提物,分装, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。注意上述所有操作均在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

1.2.4 不同浓度乙醇洗脱人参茎叶皂苷对AR抑制作用的测定 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,酶总体积活性检测体系为3 mL,主要有: $163.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 醛糖还原酶液 0.4 mL , $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH

收稿日期:2016-12-03

作者简介:孟凡丽(1978-),女,山西省临汾市人,硕士,讲师,从事天然产物的开发与研究。E-mail:mengerr@163.com。

0.5 mL, 40 mmol·L⁻¹ DL-甘油醛 0.6 mL, 1.0 mL的 0.1 mol·L⁻¹ pH 6.2 磷酸钾缓冲液以及 0.5 mL的 0.1 mg·mL⁻¹不同浓度乙醇洗脱人参茎叶皂苷溶液。加入底物 DL-甘油醛时,反应开始;用 760CRT 双光束紫外可见分光光度仪在 340 nm 波长下,记录 NADPH 每分钟吸光值的下降,以此来表示被测试样对 AR 抑制作用。每 30 s 的间隔时间,测定一次试样的吸光值,特别强调的是,这样测定吸光值最少要记录 3 min。0.1 mg·mL⁻¹ EPS 为阳性对照,双重蒸馏水设为空白对照。被测试样对 AR 的抑制率,按照公式计算:

待测试样对 AR 抑制率/% = [1 - (A₂ - A₀)/(A₁ - A₀)] × 100

式中,A₀为未加醛糖还原酶、底物和样品,即每分钟 NADPH 自然吸光值的下降。A₁为未加样品,加入醛糖还原酶、底物,每分钟 NADPH 吸光值的下降。A₂为加醛糖还原酶、底物和样品,每分钟 NADPH 吸光值的下降。

1.2.5 HPLC 分析不同浓度乙醇洗脱人参茎叶皂苷 用美国安捷伦高效液相色谱仪分析,用 C18(150 mm×6.0 mm,5 μm)柱,在 203 nm 波长下,流动相水(A)和乙腈(B),进行梯度洗脱分析:最开始条件 B18.5%,到 24 minB 变为 22%,26 min 时 B 变为 26%,30 min B 变为 32%,50 min B 变为 33.5%,55 min B 变为 38%;柱温 30 ℃;流速 1.5 mL·min⁻¹;进样量为 20 μL。

1.2.5 统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,试验数据表示为 $\bar{X} \pm S$ 。

2 结果与分析

2.1 不同浓度乙醇洗脱人参茎叶总皂苷得率

从表 1 看出,用 AB-8 大孔吸附树脂洗脱人参茎叶总皂苷结果为,30%乙醇洗脱得率最高为

表 1 不同浓度乙醇洗脱人参茎叶皂苷得率
Table 1 Yield rate of ginsenoside from stem and leaf of ginseng with different concentrations ethanol

乙醇浓度/% Alcohol concentration	质量/g Weight	得率/% Yield rate
30	19.6418	24.55
50	14.1948	17.74
80	2.6751	3.34

24.55%,50%乙醇洗脱得率为 17.74%,80%乙醇洗脱得率为 3.34%。说明人参茎叶总皂苷对不同浓度的乙醇洗脱其得率不同,且其主要集中在 30%乙醇洗脱部分。

2.2 不同浓度乙醇洗脱人参茎叶皂苷对 AR 抑制作用

从表 2 可以看出,0.1 mg·mL⁻¹ 浓度不同浓度的乙醇洗脱人参茎叶皂苷对 AR 具有一定的抑制作用。80%乙醇洗脱人参茎叶皂苷对 AR 的抑制最强的,与阳性对照相比达到了极显著差异(P<0.01),表明 80%乙醇洗脱得到的人参茎叶皂苷对 AR 的抑制作用最强。而同样浓度 30%乙醇洗脱人参茎叶皂苷和 50%乙醇洗脱人参茎叶皂苷提取物对 AR 起到一定的抑制作用,但与阳性对照相比没有显著差异。

总之,80%乙醇洗脱人参茎叶皂苷对 AR 抑制最强,80%乙醇洗脱人参茎叶皂苷具有开发价值,可用于糖尿病并发症的治疗。

表 2 不同浓度乙醇洗脱人参茎叶皂苷对醛糖还原酶的抑制作用
Table 2 Inhibitory effect of ginsenoside from stem and leaf of ginseng with different concentrations ethanol elution on AR

处理 Treatments	对 AR 抑制率/% Inhibitory rate
30%乙醇洗脱人参茎叶皂苷	25.79±1.13
50%乙醇洗脱人参茎叶皂苷	34.23±1.44
80%乙醇洗脱人参茎叶皂苷	69.28±2.52**
EPS(CK)	45.31±2.87

n=10, $\bar{X} \pm S$. ** means P<0.01.

2.3 HPLC 分析结果

为了明确不同洗脱液洗脱 AB-8 大孔吸附树脂人参皂苷的种类,利用 HPLC 分析结果表明(见表 3):30%乙醇洗脱下来主要人参皂苷 Rg1 和 Re,其浓度分别为 8.10%和 24.86%;50%乙醇洗脱下来主要人参皂苷 Rb1、Rg2、Rc、Rb2、Rb3 和 Rd,而且 Rd 的浓度高达 38.08%;80%乙醇洗脱下来主要人参皂苷 Rd,其含量 20.68%。

进一步分析发现人参茎叶总皂苷含量最高的是人参皂苷 Re,接下来是人参皂苷 Rd、Rg1、Rb3、Rb2、Rc、Rg2、Rb1。

表 3 不同乙醇洗脱人参茎叶皂苷含量

Table 3 Ginsenoside content from stem and leaf of ginseng with different concentrations ethanol elution

人参皂苷种类	30%乙醇洗脱液/%	50%乙醇洗脱液/%	80%乙醇洗脱液/%	人参茎叶总皂苷含量/(mg·g ⁻¹)
Kind of ginsenoside	30% ethanol elution	50% ethanol elution	80% ethanol elution	Ginsenoside content from stem and leaf of ginseng
Rg1	8.10			0.80
Re	24.86			2.44
Rb1		7.05		0.12
Rg2		7.78		0.14
Rc		13.31		0.39
Rb2		13.43		0.60
Rb3		15.89		0.68
Rd		38.08	20.68	1.63

3 结论与讨论

为了探讨不同浓度乙醇洗脱获得的人参茎叶的人参皂苷对 AR 的抑制效果不同,本研究采用高效液相色谱确定了不同洗脱方法获得的人参皂苷的种类和含量,前期黄新生^[6]等人用高效液相色谱法对 6 种人参皂苷 Rb1、Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 测定人参茎叶浸膏及人参根中的人参皂苷含量,确定了高效液相色谱法可用于人参皂苷的含量测定。本试验利用高效液相色谱分析不同浓度洗脱获得的人参皂苷的主要成分时,采用梯度洗脱的方法,初始平衡条件含水多 81.5%,乙腈 18.5%,开始走柱子才逐渐增加乙腈浓度,这与前人报道高效液相色谱法测定人参茎叶皂苷含量的条件,流动相的条件 A:20%;乙腈 B:80% 乙腈和乙腈-水(82:18)相比,可减少乙腈用量,降低成本。本研究发现对于人参茎叶来说,不同浓度乙醇洗脱大孔吸附树脂人参皂苷种类不同,含量也不同,这样可以起到初分的作用,可以通过点硅胶薄层层析板点来变换乙醇浓度,当 30%乙醇洗脱人参茎叶提取总皂苷人参皂苷 Re 在薄层板消失,即可更换 50%乙醇洗,当人参皂苷 Rb1、Rc、Rb2、Rb3 都消失,只留下人参皂苷 Rd 即可更换 80%的乙醇,用于指导大量初分人参茎叶总皂苷。

本试验发现不同浓度乙醇洗脱人参茎叶皂对 AR 都有一定的抑制作用,其中对 AR 抑制作用最强的是 80%乙醇洗脱人参茎叶皂苷($P < 0.01$),对 AR 抑制作用超过 EPS,30%乙醇洗脱人参茎叶皂苷和 50%乙醇洗脱人参茎叶皂苷对 AR 抑制作用有一定的抑制,但没有超过 EPS。

进一步利用高效液相色谱法分析发现 30%乙醇洗脱人参茎叶皂苷主要成分是人参皂苷 Rg1、Re,50%乙醇洗脱液人参皂苷主要有人参皂苷 Rb1、Rg2、Rc、Rb2、Rb3,80%乙醇洗脱液人参皂苷主要皂苷 Rd。另外人参茎叶总皂苷含量最高的是人参皂苷 Re,接下来是人参皂苷 Rd、Rg1、Rb3、Rb2、Rc、Rg2、Rb1。

我们前期的研究表明^[1]人参皂苷对 AR 抑制作用大小按照顺序排列依次为人参皂苷 Rg2、Rg1、Rd,对 AR 没有抑制作用的是人参皂苷 Re、Rb3、Rb2、Rc、Rb1。推测 80%乙醇洗脱人参茎叶皂苷对 AR 抑制有很强的抑制作用主要是因为其中含有对 AR 有抑制作用且含量较高的人参皂苷 Rd;而 30%乙醇洗脱人参茎叶皂苷虽然含有人参皂苷 Rg1,但含量太少,所以对 AR 有抑制作用较差;50%乙醇洗脱人参茎叶皂苷虽然含有人参皂苷 Rg2,但含量少,所以对 AR 抑制作用较差。

总之,人参茎叶皂苷对醛糖还原酶有抑制作用,而对醛糖还原酶有抑制作用最强的是 80%乙醇洗脱液。醛糖还原酶抑制剂与糖尿病并发症治疗,尤其是在糖尿病微血管并发症方面有很好的治疗效果。综上所述,人参茎叶提取总皂苷在糖尿病微血管并发症治疗方面有一定的应用价值,其作用机理有待进一步研究。

参考文献:

[1] 孟凡丽,苏晓田,刘发贵,等. 人参皂苷对醛糖还原酶的抑制作用[J]. 中国药理学通报,2011,27(6):827-830.

[2] 唐青涛. 中草药来源的醛糖还原酶抑制剂研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2012(S): 217-219.

[3] 吕立华,王俊杰,吴卫华,等. 醛糖还原酶抑制剂的研究进

- 展[J]. 中南药学, 2008, 6(5): 589-591.
- [4] Federico D S, Giampaolo P, Concettina L M, et al. Spirohydantoin derivatives of thiopyrano[2,3-b] pyridine-4(4H)-one as potent in vitro and in vivo aldose reductase inhibitors[J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(2): 491-499.
- [5] 赵新超, 关景丽, 高培平. 醛糖还原酶抑制剂筛选模型的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(21): 1813-1815.
- [6] 黄新生. 高效液相色谱法测定人参茎叶浸膏及人参根中的人参皂苷含量[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 173-175.

Study on Inhibitory Effect of Saponin of Ginseng Stems and Leavea on Aldose Reductase

MENG Fan-li

(Department of Agronomy and Horticulture, Liaoning Agricultural Technology College, Yingkou, Liaoning 115009)

Abstract: The ginseng stems and leaves that had 5 years old as material, which were extracted total ginsenosides, which different types and contents of ginsenoside eluted with 30%, 50% and 80% ethanol, and different concentrations of ethanol elution ginseng stems and leaves ginsenoside on aldose reductase (AR) inhibition were determined. The results showed that the elution of 80% ethanol had the strongest inhibitory effects on aldose reductase (AR), which was significantly stronger than that of the positive control of EPS ($P < 0.01$); the elutions of 30% and 50% ethanol both had certain inhibitory effects on AR, while that was not better than that of EPS. Aldose reductase inhibitor especially had a good therapeutic effect on diabetic microvascular complications. Above all, the total ginsenoside of ginseng stems and leaves had certain application value in the treatment of diabetic microvascular complications.

Keywords: ginseng stems and leaves; ginsenosides; aldose reductase inhibitor

黑龙江省农业“一减七增”调结构

作为我国第一产粮大省,黑龙江省近年来农业结构失衡带来的影响日益显现,玉米“一粮独大”问题尤为突出。对此,黑龙江省深入推进农业结构调整,推动农业生产由种得好向卖得好转变,以卖得好倒逼种得好,并取得阶段性成效,实现了“一减七增”,即玉米种植面积减少 128.13 万 hm^2 , 水稻、大豆、小麦、马铃薯、杂粮杂豆、经济作物和饲料饲草作物分别比 2015 年有所增加。

黑龙江省的做法是,在保障国家粮食安全的前提下,调整区域结构,建立农产品优势产业带。按照“调减玉米、稳定水稻、增加大豆杂粮、扩大草蓆果蔬”的种植结构调整方向,调减北部第四、第五积温带高纬度地区的籽粒玉米面积;在有水源条件的松花江、嫩江沿岸和三江平原等地区,适度扩大优质水稻种植面积;在北部麦豆主产区恢复发展高蛋白食用大豆和强筋小麦种植,促进合理轮作;加快平原区尤其是西部半干旱地区发展杂粮杂豆、优质北药、经济作物;积极扩大粮牧结合区青贮玉米、紫花苜蓿、燕麦和饲用大豆等饲料饲草作物种植。

在巩固提升优势区产能的同时,调整内部结构,优化粮经饲种植比例。积极推广米改豆、米改麦、米改杂等种植模式,把粮仓变为“粮仓+肉库+奶罐”。黑龙江省不断加大玉米收储政策宣传,落实玉米生产者补贴、大豆目标价格补贴政策,探索开展耕地轮作试点。全省整合 9.75 亿元推动玉米改种大豆轮作试点,每 667 m^2 补贴 150 元,实施米改豆 43.33 万 hm^2 。结构调整难度大的市县出台激励政策,共安排 3.1 亿元专门用于结构调整。通过建设精深加工产业和畜牧产业,以龙头企业带动基地专业品种生产。

调整品质结构,提高农产品市场竞争力。一方面,注重普通品种品质提升。在玉米上,重点引导玉米种植户在品种选用上退回一个积温带,确保提质降水、安全成熟。据统计,黑龙江全省已退回一个积温带玉米面积超过 66.67 万 hm^2 。在玉米优势产区,重点发展高淀粉、高赖氨酸加工型专用品种,2016 年加工型专用玉米面积达到 600 万 hm^2 以上。在水稻上,重点发展品质优、适口性好的水稻生产。在大豆上,重点发展食用型非转基因高蛋白大豆种植。另外,加快发展绿色有机农产品。2016 年全省绿色有机食品认证面积达到 493.33 万 hm^2 , 占全省农作物播种面积近三分之一。

——经济日报