

DOI:10.19403/j.cnki.1671-1521.2018.01.005

林下山参与园参理化性质的比较研究

杨文志, 娄子恒, 王明芝, 杜跃中, 潘晓鹏, 张引, 张立臣, 高宇
(吉林人参研究院·吉林通化·134001)

摘要:目的 通过比较研究林下山参与园参理化性质的特点,进一步认识林下山参与园参的内在区别。方法 通过比较林下山参与园参的皂苷含量,皂苷 HPLC 图谱,皂苷 TLC 图谱,乙醚浸出物的含量及参粉的密度,得出林下山参与园参相区别的重要特征。结果 二者在总皂苷的含量,皂苷 Rb1 的含量,以及总皂苷的 HPLC 检测图谱及参粉密度的区别特征突出,可作为林下山参与园参之间的鉴别依据。结论 林下山参与园参在理化性质方面存在一定的区别。

关键词:高效液相色谱;薄层色谱;总皂苷;皂苷 Rb1;乙醚浸出物;密度

Comparative Research on Physicochemical Property of Forest Mountain Ginseng and Garden Ginseng

YANG Wen-zhi, LOU Zi-heng, WANG Ming-zhi, DU Yue-zhong, PAN Xiao-peng, ZHANG Yin, ZHANG li-chen, GAO Yu
(Jilin Ginseng Research Institute, Jilin Tonghua, 134001)

Abstract:Objective: To comparatively study the physical and chemical characteristics of Forest Mountain Ginseng(FMG) and Garden Ginseng(GG) in order to further understanding the inner differences of FMG and GG. Method: With contrast and t-test to compare content and chromatograms of HPLC and TLC of ginsenoside, ether extract and ginseng powder density between FMG and GG. Result: With significantly characteristics of content of ginsenoside and Rb1, and HPLC as well as ginseng powder density, they can be used for basis to identify FMG and GG. Conclusion: Between FMG and GG has a certain difference in terms of physical and chemical properties.

Keywords:HPLC; TLC; Ginsenosides; Ginsenoside-Rb1; Ether extract; Powder Density

林下山参一词来源于中国药典。2005年中国药典在人参项下规定了“播种在山林野生状态下自然生长的”人参称为“林下参”,习称“籽海”,而将栽培的人参称为“园参”,至此野生种植方式下所生产的人参有了自己的名字。2010年版中国药典沿用林下参的定义,但将“林下参”改为“林下山参”;2015年版中国药典延用了“林下山参”的名称。

林下山参与园参相比较有三个基本特点,一是生长环境是自然的野生环境,散播并与其它植物伴生生长;二是生长期间不进行人工管理,不除草,不打药,不追肥,任其自然生长;三是生长时间长,一般要15年采收。可以说林下山参就是人播天成的自然竞争的产物,因此,林下山参与园参在形态特征及生长规律方面产生了明显的区别^[1],更接近于野生人参;在国标 GB/T18765-2015 中,野山参指的就是林下山参中的特定部分。

形态特征方面,典型林下山参应具有细长的根茎

(芦),枣核状的不定根(芋),主根(体)纵向短粗,横向伸展分成两支,形似人体,外皮(皮)紧凑致密,肩部有深入的环纹(纹),须根上有较大的瘤状凸起的愈伤组织(珍珠疙瘩)等明显特征,这6个方面,即“芦”、“芋”、“体”、“皮”、“纹”、“点”是林下山参感官鉴定的药材特征,是区别于园参的主要形态特征,也是林下山参等级分类的依据。由于林下山参生长在野生自然状态下,因此生长极其缓慢,1~5年尚为幼苗期,一般10年之后才开始被采挖。而“播种后,自然生长于深山密林15年以上的人参”又被称为“野山参”^[2]。

林下山参非常受市场欢迎,目前,林下山参无论从种植规模还是产量规模,都对人参经济产生了重大影响,林下山参正创造巨大的经济效益,其价格从几千元人民币每公斤到十几万不等,甚至有单支价格就过万的野山参。相比之下,园参的价格则数百元至千元每公斤不等。此外相对于园参,林下山参具有绿色可持续的经济特点,表现在:a.林下山参种植是绿色

生态循环经济的方式,它不破坏森林,人工播种后自然适应生态生长,甚至在生长到一定阶段后,会自然传播,循环再生;b.林下山参没有农药和化肥污染。相对于非林地栽参及大田栽参,有学者称林下培育人参是一种高效复合的生态经济模式,可有效缓解高经济效益人参种植业与高生态效益林业之间的矛盾^[3]。

2012年,卫生部批准“5年及5年以下人工种植的人参”为新资源食品(卫生部公告2012年第17号),这就意味着林下山参与园参在使用上产生了区别,因此为进一步认识林下山参与园参的区别,本项目对林下山参与园参的理化性质进行了比较研究,从而为林下山参的鉴别提供理论依据。

1 材料与试剂

林下山参采自于吉林省集安市、安图县和辽宁省桓仁县三地,参龄10年至18年,经吉林人参研究院姜子恒研究员鉴定为林下山参。园参采自于吉林省集安、通化、抚松、靖宇等地。林下山参与园参粉碎过筛60目。

对照品人参皂苷Rb1、Rb2、Rb3、Rd、Re、Rg1、Rg3分别购于中检所。对照品用甲醇溶解,制备成对照品溶液。

试剂:甲醇、乙醇、正丁醇、乙醚、乙酸乙酯、正己烷、石油醚、茴香醛、硫酸、香兰素、硅胶G等均为国产分析纯试剂;乙腈:天津四友,色谱纯;水为超纯水。

2 仪器与设备

高效液相色谱仪(Agilent1260),Agilent TC-C₁₈柱(4.6mm×250mm,5μm);双光束紫外可见分光光度计(普析通用TU-1901);电子天平(德国BP211D Sartorius,十万分之一);超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司AS515,250W);水浴(上海科析试验仪器);实验室超纯水机(阿修罗)。

3 方法

3.1 人参总皂苷含量测定线性关系的考察

精密称取Re 12.22mg,甲醇溶解并稀释至10mL,摇匀制得Re对照品溶液,浓度1.22mg/mL。精密吸取Re对照品溶液20、30、40、60、80、100μL于25mL具塞试管中,低温烘干,各加8%香草醛无水乙醇溶液0.5mL,72%硫酸5mL,随行空白;摇匀,于60℃水浴显色10min;取出,放于冰水中冷却10min后,用分光光度计于544nm比色测试吸光度。以Re的质量为横座标,吸光度为纵座标,绘制标准曲线,得线性方程为 $Y=0.00614 \times C-0.00983$; $r_2=0.9996$,人参皂苷Re在22~108μg范围内呈现良好的线性关

系。

3.2 总皂苷及单体皂苷供试品溶液的制备

精密称取林下山参与园参供试样品1g,用滤纸包好,置索氏提取器中,氯仿回流3h,取出滤纸包,挥干氯仿,将参粉转移到25ml容量瓶中,加水饱和正丁醇浸泡过夜,次日超声30min,静置至室温;将正丁醇提取液过滤,移取续滤液25ml,水浴挥干。残渣用甲醇溶解,转移至5ml容量瓶中,成供试品,作为总皂苷、单体皂苷及特征图谱的供试溶液。

3.3 高效液相色谱方法与条件

3.3.1 单体皂苷含量测试

流动相:乙腈(A)-水(B);流速:1ml/min;检测波长:203;柱温30℃;梯度洗脱:19%A/(0→35)min, (19%→29%)A/(35→55)min, 29%A/(55→70)min, (29%→40%)A/(70→100)min。

3.3.2 皂苷特征图谱

流动相^[4]:乙腈(A)-水(B);流速:1ml/min;检测波长:203;柱温30℃;梯度洗脱:19→20%A/(0→25)min, (20%→31%)A/(25→35)min, (31%→40%)A/(35→60)min, (40%→80%)A/(60→90)min, (80%→100%)A/(90→120)min。

3.4 人参单体皂苷含量测定线性关系的考察

精密称取人参皂苷Rb1、Re、Rg1对照品适量,加甲醇配成5个梯度混合供试品溶液,各取供试品溶液20μl进样,以质量为横座标,响应值为纵座标,进行线性回归,得回归方程如下:

$$Y_{(Rg1)} = 164.72 C - 3.33, \quad r = 0.9989;$$

$$Y_{(Re)} = 157.80 C + 12.04, \quad r = 0.9949;$$

$$Y_{(Rb1)} = 256.62 C + 178.70, \quad r = 0.9969;$$

结果表明,皂苷Rb1、Re、Rg1在3μg~6μg之间有较好的线性关系。

3.5 薄层色谱方法

3.5.1 层析方法

展开剂:正己烷:乙酸乙酯—85:15。

显色剂:茴香醛:浓硫酸:乙醇—1:1:18。

上行层析。层析后,取出展开后的薄层板,晾干,喷以显色剂溶液,在90℃加热至斑点显色清晰。

3.5.2 样品溶液的制备

称取林下山参与人参样品各2g,滤纸包好,置于索氏提取器中,加乙醚浸泡过夜,次日回流8h;回收乙醚提取液,残渣用正己烷定容5ml,作为层析用供试样品。

3.6 人参乙醚浸出物测定

称取2g左右的林下山参与园参供试样品,用乙

醚浸泡过夜,次日回流 8h,收集乙醚提取液于蒸发皿中,于 50℃水浴上挥干,然后在 50℃烘箱干燥 3h,称定残渣与蒸发皿的重量,减去蒸发皿的重量后,记录残渣的重量。

3.7 人参密度的测定方法

称取烘干的供试人参样品 0.5g,置于装有 3mL 甲醇的 5mL 量筒中,使参粉全部落入到甲醇试剂中,静置 30min,让参粉全部自然沉积于量筒底部,待上部甲醇液体澄清,记录参粉在甲醇中的容积。

$$\text{参粉密度(g/mL)} = \text{样重(g)} / \text{参粉体积(mL)}$$

方法学研究表明:

a.样品在甲醇中的体积在 12h 内稳定,满足测试要求。

b.样品量在 0.2g~1.0g 之间,称样量与参粉体积之间呈线性关系。

$$Y(\text{mL}) = 0.0387 + 2.0814 \times X(\text{g}); r = 0.9998$$

4 结果与分析

4.1 林下山参与园参总皂苷的测试结果与比较分析

经检测各年生的林下山参与园参的皂苷含量,结果见表 1,发现林下山参无论是总皂苷含量,还是皂苷 Rg1、Re 及 Rb1 的含量,与园参的都有交叉;但经统计分析,林下山参总皂苷含量平均值高于园参总皂苷含量的平均值,且差异显著,因此林下山参总皂苷含量与园参总皂苷含量有差别;而三种单体皂苷中,只有 Rb1 的含量表现为差异显著,以林下山参的平均含量为高;因此皂苷含量高是林下山参的一个重要特征,见图 1、图 2。

从皂苷含量与参龄的关系角度看,林下山参与园参都表现为 Rb1 含量是随着参龄的增长而增加的,而 Rg1 和 Re 的含量则表现为下降趋势,见图 3、图 4。

表 1 林下山参与园参皂苷含量检测数据表

	参龄	总皂苷 (%)	Rg1 (%)	Re (%)	Rb1 (%)
林下山参	10	4.95	0.34	0.47	0.64
(n=3)		(RSD=18.99%)	(RSD=95.59%)	(RSD=72.40%)	(RSD=22.83%)
林下山参	12	3.75	0.72	0.40	0.55
(n=3)		(RSD=2.69%)	(RSD=25.17%)	(RSD=3.26%)	(RSD=76.17%)
林下山参	14	5.78	0.34	0.42	0.58
(n=3)		(RSD=24.29%)	(RSD=29.15%)	(RSD=38.30%)	(RSD=13.96%)
林下山参	16	5.27	0.68	0.36	0.90
(n=3)		(RSD=33.10%)	(RSD=91.47%)	(RSD=67.67%)	(RSD=40.00%)
林下山参	18	3.75	0.33	0.34	0.71
(n=3)		(RSD=45.81%)	(RSD=32.41%)	(RSD=7.33%)	(RSD=8.21%)
园参	1	2.58	0.24	0.54	0.30
(n=3)		(RSD=11.47%)	(RSD=10.54%)	(RSD=10.87%)	(RSD=16.35%)
园参	2	3.08	0.40	0.46	0.34
(n=3)		(RSD=16.75%)	(RSD=12.25%)	(RSD=4.61%)	(RSD=4.15%)
园参	3	4.00	0.48	0.44	0.68
(n=3)		(RSD=24.02%)	(RSD=5.90%)	(RSD=24.09%)	(RSD=14.54%)
园参	4	3.10	0.55	0.32	0.46
(n=3)		(RSD=17.55%)	(RSD=5.14%)	(RSD=17.69%)	(RSD=0.00%)
园参	5	3.35	0.38	0.34	0.56
(n=3)		(RSD=16.09%)	(RSD=33.68%)	(RSD=50.00%)	(RSD=54.46%)
林下山参皂苷平均值		4.70	0.48	0.40	0.68
(n=15)					
园参皂苷平均值		3.05	0.39	0.41	0.46
(n=15)					
T (检验) 值及判断		T**=4.259	T=1.090	T=0.230	T**=3.067

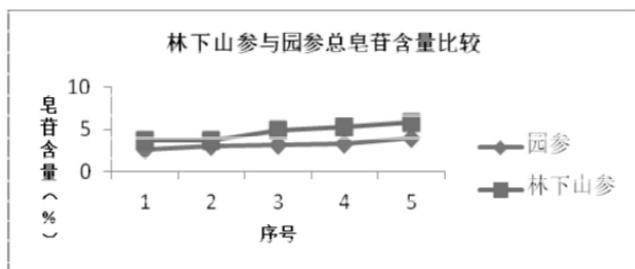


图1 林下山参与园参总皂苷含量比较
注:图中皂苷含量数据采用升序排列作图

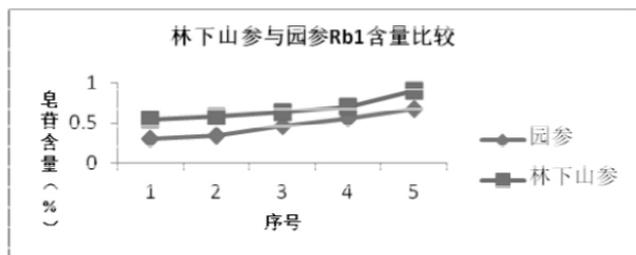


图2 林下山参与园参 Rb1 含量的比较
注:图中皂苷含量数据采用升序排列作图

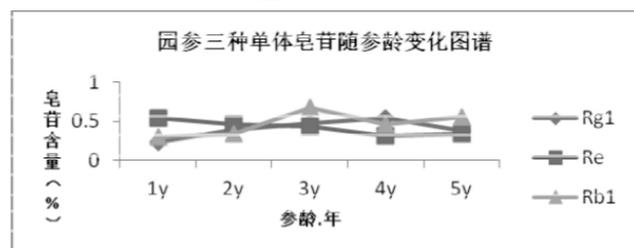


图3 园参三种单体皂苷含量随参龄变化图谱
注:“y”代表“年生”

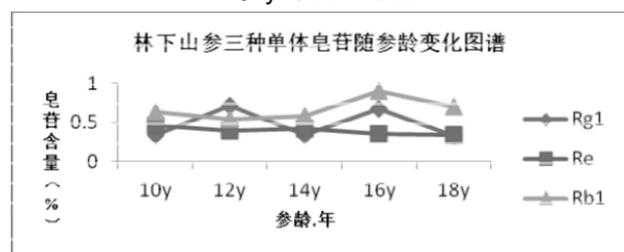


图4 林下山参三种单体皂苷含量随参龄变化图谱
注:“y”代表“年生”

4.2 林下山参与园参的皂苷 HPLC 图谱比较

按照皂苷特征图谱检测方法,发现林下山参与园参的 HPLC 图谱呈现较大的区别,这种区别表现在林下山参在 70~80min 的图谱区域内出现了新部位群,经对照品比对,其中含有皂苷 Rg₃。在林下山参不同参龄的十余次检测中,Rg₃ 出现概率大于 90%,而这个区域出现新部位群是百分之百。园参在十余例的检测中,仅出现一次该新部位群(5年生靖宇县样品,原因尚不明确),其它各不同产地(集安市、抚松县、通化县)各参龄的园参均没有在该部位出现新部位群,说明林下山参在时间和空间的作用下,与园参相对比,

产生了新的成分部位,这一点是林下山参与园参的重要不同,也是林下山参的重要特征,见图 5、图 6。

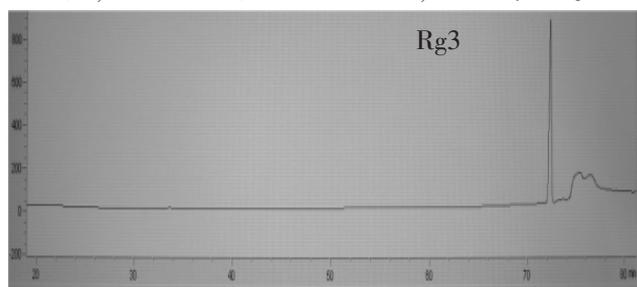


图5 对照品 Rg₃-HPLC 图谱

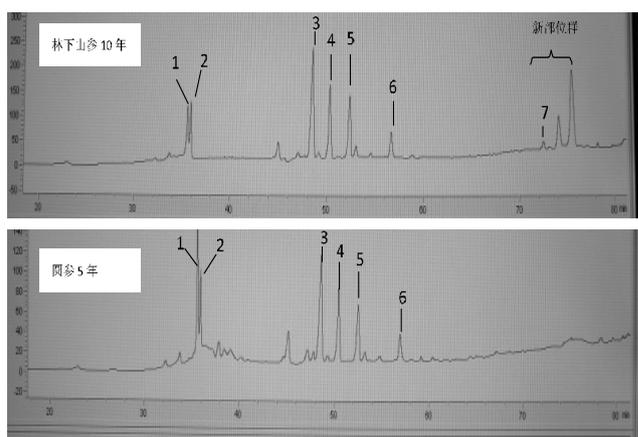


图6 林下山参与园参 HPLC 色谱图的比较

注:1-Rg₁;2-Re;3-Rb₁;4-Rc;5-Rb₂;6-Rd;7-Rg₃

4.3 林下山参与园参乙醚浸出物的比较

实验表明:尽管林下山参乙醚浸出物含量的平均值是 0.90%,且 95% 的概率在 1.07% 以下;园参乙醚浸出物含量的平均值是 1.19%,95% 的概率在 0.9% 以上,但通过 t 检验比较,林下山参乙醚浸出物的含量与园参乙醚浸出物的含量差异不显著,说明乙醚浸出物的量对林下山参与园参的不构成区别特征,TLC 图谱也基本说明这一点。

表2 林下山参与园参乙醚浸出物数据

检测数据 (mg/mL)	平均值 (mg/mL)	置信区间 (95%)	T 值
林下山参 1.53 1.02 0.87 0.90	0.90	(0.72, 1.07)	1.989
0.85 0.56 0.89 0.53 0.92 0.99	(RSD:29.02%)		(< 0.83.
园参 1.08 1.25 0.88 1.89	1.19	(0.90, 1.47)	2.145
1.58 1.00 1.34 0.91 0.75.	(RSD:31.03%)		t0.05=

林下山参的乙醚浸出物含量略低于园参,这个结果有些出人意料,但仔细分析,可推测园参是在富营养的土地上生长的,施有大量的人工肥,可能会产生更多的萜类物质,这可能是园参检测结果高的原因。

林下山参与园参薄层层析所展现的斑点是基本相同的,林下山参与园参均可产生 5 个共同的可见斑

点, 见图 7, 斑点的 Rf 值分别是: 1-Rf0.025, 2-Rf0.22, 3-Rf0.56, 4-Rf0.87, 5-Rf0.97; 但园参的 2-Rf-0.22 斑点多不清析, 揭示林下山参的乙醚成分与园参的基本一致, 但在量上存在差异。

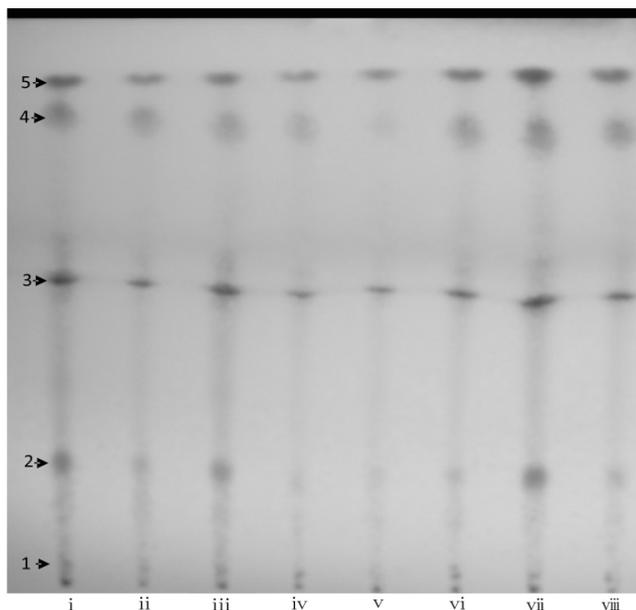


图 7 林下山参与园参乙醚浸出物薄层色谱图

注: i. 林下山参 10 年; ii. 靖宇园参 5 年; iii. 林下山参 12 年; iv. 集安园参 5 年; v. 林下山参 14 年; vi. 安图园参 5 年; vii. 林下山参 16 年; viii. 抚松园参 5 年。

4.4 林下山参与园参密度的比较

经检测, 林下山参粉单位体积的质量比园参粉低, 经 t 检验, 差异极显著。

林下山参粉平均密度约 0.46g/mL (参粉质量/参粉在甲醇中体积), 而园参粉约 0.59g/mL。因此林下山参与园参的密度是有区别的, 单位体积下, 林下山参粉要比园参粉密度小。参粉密度的不同是区分林下山参与园参的一个特征。

林下山参粉与园参粉密度检测结果见表 3。

表 3 林下山参粉与园参粉密度数据

检测数据 (mg/mL)	平均值 (mg/mL)	置信区间 (95%)	T**值
林下山参 0.4354 0.3137 0.4782 0.3716	0.3917	(0.36, 0.43)	16.833 (> t _{0.01} =3.012)
0.3855 0.3721 0.3858 0.3858 0.3339 0.4552	(RSD:11.85%)		
园参 0.5890 0.5897 0.8380 0.7163	0.5942	(0.52, 0.67)	
0.6272 0.5004 0.5281 0.5264 0.5009 0.5265	(RSD:18.33%)		

5 讨论

5.1 林下山参与园参虽然只是生产模式上产生了区别, 如在种植方式、环境要求、管理方式、生长时间及作货期等要素的不同, 但却可以使林下山参与园参无论是在感官, 还是在理化性质方面, 均产生了明显的差别, 这为它们的鉴别提供了进一步的依据。

本研究发现, 林下山参产生了 Rg3 皂苷, 而园参却不具有, 而且林下山参 HPLC 图谱上具有新部位群的产生, 这具有重要的鉴别意义。

除皂苷外, 林下山参与园参乙醚浸出物的含量有所不同, 表现在林下山参乙醚浸出物的含量低于园参的乙醚浸出物含量, 但组成成分基本一致, 这说明环境和作货期对脂类代谢也产生了影响。

此外, 林下山参粉的密度显著地低于园参粉的密度, 这一点是首次发现并被提出; 而测定方法是本研究的一个创新方法。之所以要用甲醇作测定媒介, 是因为甲醇密度小, 具有快速浸润的特点, 参粉可以快速地自由沉降于底部, 稳定后即可读出参粉的体积。如果直接将参粉装入容器中测定, 参粉沉降的稳定可能受到很多外界因素的影响, 比如是否墩实等等, 这样就造成结果的不稳定。

5.2 人参皂苷是人参的主要有效成分之一, 是大家关注的一类化合物。本实验结果显示, 林下山参皂苷含量与园参皂苷含量差异较为显著。但同一年生的人参中, 因产地或者个体的差别, 人参皂苷含量差别也很大, 因此仅靠皂苷含量不能鉴别出林下山参与园参, 需要结合多指标来实现鉴别的目的。

参 考 文 献

[1] 马小军, 汪小全, 肖培根, 等. 国产人参种质资源研究进展[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(5):289~292.
 [2] GB/T 18765-2015 野山参鉴定及分等质量[S]. 2015.
 [3] 王贺新, 宋相录. 我国林下育参研究现状及其复合经营效益[J]. 辽宁林业科技, 2002(6):32~33.
 [4] Yongjuan Li, Feifei Gao, etc. The Analysis on Purple Ginseng of Non-polar Saponins by Reverse Liquid Chromatography. Proceedings of 2012 International Conference on Ginseng.