

人参皂苷 Rg₁ 的提取纯化及其含量测定^Δ

王乐乐*, 董志#, 刘媛, 程玉洁, 唐红(重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0605-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.11

摘要 目的: 提取和纯化人参皂苷 Rg₁, 并测定其含量。方法: 采用超声法提取人参总皂苷, 使用硅胶柱层析法分离、纯化人参皂苷 Rg₁, 采用高效液相色谱法测定人参皂苷 Rg₁ 含量。结果: 采用硅胶柱层析法分离 50 g 人参, 可得到人参皂苷 Rg₁ 9.91 g, 其纯度为 89.63%。结论: 此提取方法简单、准确, 成本较低, 所获产品纯度较高, 可作为获得人参皂苷 Rg₁ 的有效方法。

关键词 超声法; 硅胶柱层析法; 高效液相色谱法; 人参皂苷 Rg₁; 提取

Extraction and Purification of Ginsenoside Rg₁ and Content Determination

WANG Le-le, DONG Zhi, LIU Yuan, CHENG Yu-jie, TANG Hong (School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To extract and purification ginsenoside Rg₁ and to determine the content of it. METHODS: Ultrasonic extraction was used to extract total saponin of *Panax ginseng*. Ginsenoside Rg₁ was separated and purified with silica gel column chromatography. HPLC method was used to determine the content of ginsenoside Rg₁. RESULTS: 9.91 g ginsenoside Rg₁ was obtained with the purity of 89.63% in 50 g *P. ginseng*. CONCLUSION: The method is simple, accurate and low cost, and the purity is satisfied. So, this technology is suitable to prepare ginsenoside Rg₁.

KEY WORDS Ultrasonic extraction; Silica gel column chromatography; HPLC; Ginsenoside Rg₁; Extract

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为五加科人参属多年生草本植物, 喜阴凉、湿润的气候, 多生长于昼夜温差小的海拔

500~1 100 m 山地缓坡或斜坡地的针阔混交林或杂木林中。人参有益智安神、大补元气、补脾益肺的功效, 其主要有效成

nodosin 水溶液的降解受溶液 pH 值影响, 属于酸碱催化反应。nodosin 在 30 h, pH 1.0 溶液和 12 h, pH 11.0 溶液中的 HPLC 分别见图 1 中 C、D; nodosin 水溶液降解的 pH-速率曲线见图 4。

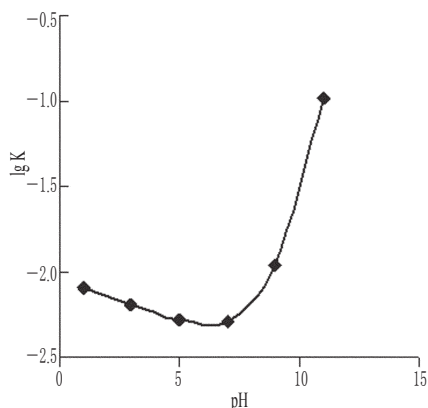


图4 nodosin 水溶液降解的 pH-速率曲线

Fig 4 pH-degradation rate curves of nodosin solution

3 讨论

^Δ 基金项目: 重庆市科技计划项目资助(No.CSTC, 2009BA5086)

* 硕士研究生。研究方向: 神经药理学及新药开发。电话: 023-86979425。E-mail: cappuccino5206@163.com

通信作者: 教授, 博士研究生导师, 博士。研究方向: 神经递质与受体药理以及新药研发。电话: 023-68486678。E-mail: zhidong073@hotmail.com

药物稳定性考察是处方前研究的重要组成部分, 对选择合理剂型和制剂工艺具有重要指导意义。

本试验研究显示, nodosin 在水中溶解度较小, 水溶液也不稳定, 而且随着温度升高, 降解加速。25 °C 室温下, nodosin 的有效期 t_{90} 仅为 190.22 h, 4 °C 下 t_{90} 为 2 299.37 h。

nodosin 的稳定性还受环境中酸、碱性的影响, 属于酸碱催化的降解反应, 尤其在碱性环境中, 降解速度比酸性环境快, 在 pH 5~7 范围内的中性偏酸环境中, 较为稳定。因此, 对于 nodosin 的血管外给药制剂适宜选择固体剂型, 静脉给药制剂适宜制成注射用无菌粉末, 并且制备过程中还要注意溶液受 pH 值和温度的影响。

参考文献

- [1] Yan FL, Wang CM, Guo LQ, et al. A new ent-kaurane diterpenoid from *Isodon nervosus*[J]. *J Chem Research*, 2008, 2008(9):522.
- [2] 海广范, 闫琰, 刘巨源, 等. Enmein、serrinB、nodosin 和 lasiodonin 对 HL60 细胞株和 lovo 细胞株的增殖抑制作用[J]. *新乡医学院学报*, 2008, 25(6):564.
- [3] He F, Xiao WL, Pu JX, et al. Cytotoxic ent-kaurane diterpenoids from *Isodon sinuolata*[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70:1 462.
- [4] 倪林, 李树华, 卢海啸, 等. HPLC 法测定显脉香茶菜中 Nodosin 的含量[J]. *广东药学院学报*, 2010, 26(6):605.

(收稿日期: 2012-02-06 修回日期: 2012-04-22)

分是人参皂苷,其生理活性作用极为广泛^[1]。目前为止已分得的单体皂苷有40多种,其中主要为人参皂苷Ra₁、Ra₂、Ra₃、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁、Rg₂、Rg₃、Rh₁等,由于单体皂苷的药理作用不同,所以有必要从人参中提取单体皂苷,并进行深入研究^[2]。有研究报道,人参皂苷Rg₁具有抗血栓、抗衰老、抗氧化、减轻神经功能损伤的作用。人参皂苷Rg₁已作为复方制剂的主要成分之一在临床上用于治疗脑血管疾病。为了进一步研究其药理作用机制,首先需要找到其适合的分离制备方法。

人参总皂苷提取方法较多,其中超声波提取法简单、用时短、收率高,成为目前应用较多的方法^[3]。笔者通过硅胶柱层析技术从提取得到的人参总皂苷中分离出人参皂苷Rg₁,并且通过高效液相色谱(HPLC)法检测其纯度和含量^[4]。

1 材料

1.1 仪器

RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);DT-100A 分析天平(北京光学仪器厂);1100 HPLC 仪(美国 Agilent 公司);KQ-500E 医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);薄层层析板(青岛市基亿达硅胶试剂厂);玻璃层析柱(上海达丰玻璃仪器厂)。

1.2 药材

人参购自重庆市药材市场,经重庆医科大学中医药学院何先元副教授鉴定为真品。

1.3 试剂

人参皂苷Rg₁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110754-200822);200~300目硅胶(北京天宇祥瑞科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果^[5-8]

2.1 人参总皂苷的提取

称取人参粉末样品50g,10倍水浸泡12h后,放入超声波清洗器中提取(温度:40℃,功率:500W,频率:40kHz),提取6次(20min/次)后,减压抽滤,加入15ml水溶解,加入石油醚脱脂5次,每次30ml,取水层,加水饱和正丁醇萃取5次,收集正丁醇液,减压蒸去溶剂,得人参总皂苷。

2.2 人参皂苷Rg₁含量测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex C₁₈(250mm×4.6mm,5μm);流动相:乙腈-水(20:80,V/V);流速:1.0ml/min;检测波长:205nm;柱温:30℃;进样量:10μl。

2.2.2 线性关系考察 精密称取人参皂苷Rg₁对照品3.5mg,加甲醇溶解并定容至10ml,得0.35μg/μl的对照品溶液。取上述对照品溶液10、20、30、40、50μl分别进样,以峰面积积分值(y)为纵坐标,进样量(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=57.346x+53.93$ ($r=0.9997$)。结果表明,人参皂苷进样量在3.5~17.5μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.3 人参皂苷Rg₁的分离

2.3.1 硅胶柱层析分离人参皂苷Rg₁ 装柱:取200~300目硅胶作分离胶,用漏斗装入玻璃层析柱内铺放均匀,其上装入少量四氢呋喃溶解的人参总皂苷,最上层置脱脂棉,乙醇-乙酸乙酯=1:3(V/V)洗脱液洗脱,用若干200ml锥形瓶收集洗脱液,

每瓶100ml,得到分离出的样品溶液,备用。

2.3.2 薄层色谱法鉴别人参皂苷Rg₁ 将分离出的样品溶于甲醇中,作为样品溶液。微量点样器吸取“2.2.2”项下人参皂苷Rg₁对照品溶液及“2.3.1”项下样品溶液适量,点样于薄层层析板上,电吹风吹干,以乙醇-乙酸乙酯(1:2,V/V)为展开剂,展开,10%硫酸溶液显色。结果,样品溶液色谱中,从第6瓶开始,与对照品色谱相应位置处,有相同颜色的斑点出现,表明此时有人参皂苷Rg₁被洗脱出来;而第8~20瓶中的人参皂苷Rg₁纯度较高(薄层色谱显示斑点为单一点),单独收集,备用。这一结果表明,经硅胶柱层析分离可得到纯度较高的人参皂苷Rg₁。

2.4 硅胶柱层析的条件优化

2.4.1 静态吸附与解吸附 准确称取经预处理的柱层析硅胶1.000g,置于三角瓶中,加入“2.1”项下人参总皂苷提取液20ml,室温条件下振荡12h,静态吸附。每隔1h取样一次,共10h,分别按“2.2”项下方法测定其中人参皂苷Rg₁含量,按下式计算吸附率(A): $A/\%=(c_0-c)/c_0 \times 100\%$ (式中, c_0 为人参皂苷Rg₁初始质量浓度; c 为任一时刻吸附液中人参皂苷Rg₁质量浓度)。加入40ml乙醇-乙酸乙酯(1:3,V/V)洗脱剂于吸附了人参皂苷Rg₁的硅胶中,室温条件下解吸附,每隔1h取样一次,共10h,分别测定其中人参皂苷Rg₁含量,按下式计算解吸率(D): $D/\%=c_0V_0/m \times 100\%$ (式中, c_0 为解吸液中人参皂苷Rg₁质量浓度; V_0 为脱附液体积; m 为初始吸附量)。并绘制吸附率和解吸率随时间变化的曲线(见图1)。由图1可知,吸附率随时间增加而增加,当吸附6h时,超过90%的人参皂苷Rg₁已被吸附,再延长时,吸附趋于稳定;解吸率先随时间增加而迅速增大,在7h时解吸率达到92.5%,然后变得稳定。

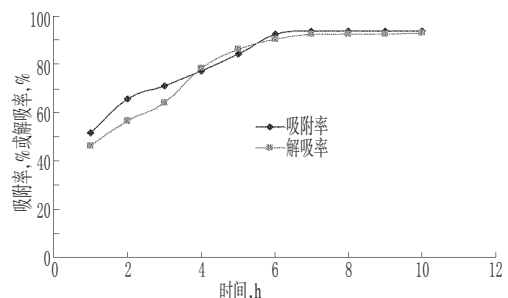


图1 吸附率和解吸率随时间变化的曲线

Fig 1 Relationship of adsorption rate and desorption rate with time

2.4.2 硅胶用量对分离的影响 按“2.3.1”项下方法,取不同质量比(1:2,1:3,1:4)的生药与硅胶混合物,考察不同硅胶用量对分离的影响。按体积收集流出的组分,每份100ml。发现尽管使用不同用量的硅胶,但人参皂苷Rg₁质量浓度较高的流出组分仍集中在第8~20瓶,当生药与硅胶质量比为1:3时,流出的组分中人参皂苷Rg₁的质量浓度最高,表明这个阶段是人参皂苷Rg₁的集中脱附区域,这一结果有利于流出组分的收集和产品纯化。

2.4.3 洗脱剂中乙醇体积分数对分离的影响 基于人参皂苷Rg₁的分子结构,乙醇体积分数对其脱附有重要影响,故按

“2.3.1”项下方法操作,考察不同比例的乙醇-乙酸乙酯(1:2、1:3, *V/V*)洗脱剂对人参皂苷 Rg_1 分离的影响。结果,当使用不同乙醇体积分数的溶剂洗脱时,大部分产物在第8~20瓶流出的组分中洗出。当洗脱剂中乙醇-乙酸乙酯的体积比为1:3时,第8~20瓶流出的组分中含有的人参皂苷 Rg_1 最多。不同比例洗脱剂下人参皂苷 Rg_1 的质量浓度变化见图2。

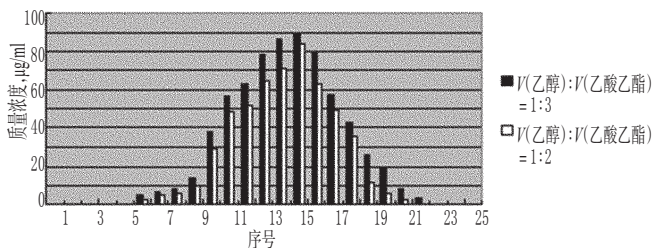


图2 不同比例洗脱剂下人参皂苷 Rg_1 的质量浓度变化

Fig 2 Mass concentration of ginsenoside Rg_1 with different proportions of eluent

2.4.4 洗脱流速对分离的影响 按“2.3.1”项下方法操作,考察不同流速(1.5、2.5、4 ml/min)对人参皂苷 Rg_1 分离的影响。结果,当洗脱流速为1.5 ml/min时,从第5瓶开始,人参皂苷 Rg_1 被大量洗出,到第15瓶,所含产物基本洗净,可见产物流出太快,分离不彻底。而在2.5、4.0 ml/min的流速下,大部分产物都集中在第8~20瓶中,流出的组分中人参皂苷 Rg_1 最高的质量浓度是在2.5 ml/min流速下获得的。以上试验表明,硅胶柱层析分离人参皂苷 Rg_1 的最优条件为生药与硅胶按质量比1:3混合,洗脱剂为乙醇-乙酸乙酯(1:3, *V/V*)的混合溶液,洗脱流速为2.5 ml/min。不同流速下人参皂苷 Rg_1 的质量浓度变化见图3。

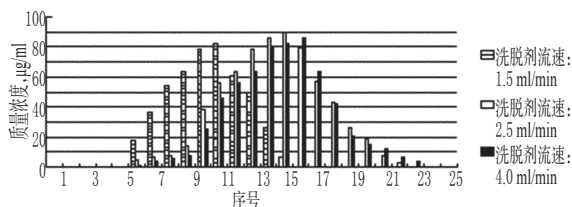


图3 不同流速下人参皂苷 Rg_1 的质量浓度变化

Fig 3 Mass concentration of ginsenoside Rg_1 at different flow rates

2.5 进一步纯化人参皂苷 Rg_1

经硅胶柱层析分离的人参皂苷 Rg_1 , 仍然含有少量的人参

皂苷 Re 杂质,需要对分离后的人参皂苷 Rg_1 进一步纯化。合并第8~20瓶溶液,按“2.3.1”项下方法进行第2次过柱,收集、合并第2次洗脱的溶液。

2.6 人参皂苷 Rg_1 的含量测定

将“2.5”项下第2次收集的溶液,用旋转蒸发仪蒸去溶剂后,少量甲醇溶解,定容至100 ml量瓶中,精确吸取1 ml于量瓶中,定容至200 ml,按“2.2”项下方法测定人参皂苷 Rg_1 含量。结果,在优化的硅胶柱层析条件下,提取出的人参皂苷 Rg_1 纯度达到了89.63%。

3 讨论

本试验通过对影响吸附与解吸附的各种因素的研究,最后使用乙醇与乙酸乙酯的混合洗脱剂洗脱,硅胶柱层析法分离和纯化人参提取液中的人参皂苷 Rg_1 , 结果该方法显示了优越的分离性能,每50 g人参可获得约9.91 g、纯度为89.63%的人参皂苷 Rg_1 。

参考文献

- [1] 张宪臣, 王淑敏, 陈光, 等. 人参总皂苷超声提取工艺的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(6): 58.
- [2] 胡霞敏, 严常开, 胡先敏. 人参皂苷 Rg_1 对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(2): 193.
- [3] 张春红, 张连学, 李向高, 等. 人参皂苷常规水提取法和新提取方法的比较研究[J]. 中药材, 2006, 1(10): 1 040.
- [4] 杨博, 富瑶瑶, 付绍平, 等. 人参皂苷 Re 的分离提纯[J]. 大连工业大学学报, 2009, 28(4): 258.
- [5] 范晨怡, 章晓骅, 魏惠华, 等. 五味子醇甲的提取纯化工艺研究[J]. 中国药房, 2007, 18(12): 896.
- [6] 袁小红. 莲心子4种提取方法的比较研究[J]. 中国药房, 2006, 17(8): 637.
- [7] 王秀云. 柱层析-HPLC法测定阳强保肾丸中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房, 2008, 19(15): 1 179.
- [8] 蔡向阳, 夏金华. RP-HPLC法同时测定丹七片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rg_1 的含量[J]. 中国药房, 2007, 18(36): 2 837.

(收稿日期:2012-02-20 修回日期:2012-10-14)

全国食品药品监督管理暨党风廉政建设工作会议在京召开

本刊讯 2013年1月10日至11日上午,全国食品药品监督管理暨党风廉政建设工作会议在京召开。会议总结了2012年食品药品监管工作,分析了当前和今后一段时间监管形势,部署了2013年食品药品监管工作和党风廉政建设任务,表彰了全国食品药品监管系统先进集体和先进工作者。会议提出,要解放思想、改革创新,同心协力、攻坚克难,切实保障人民群众饮食用药安全,为全面建成小康社会作出新的贡献。

人力资源和社会保障部副部长、党组成员兼国家公务员

局党组书记、副局长杨士秋宣读了人力资源和社会保障部、国家公务员局关于表彰全国食品药品监管系统先进集体和先进工作者的决定。卫生部党组书记、副部长张茅出席会议并讲话。国家食品药品监督管理局局长、党组书记尹力作工作报告。中央纪委驻国家食品药品监管局纪检组长、局党组成员于贤成作党风廉政建设工作报告。国家食品药品监督管理局副局长、党组副书记吴演作会议总结。