

正交试验优选人参中丙二酰基人参皂苷的提取工艺研究

孙光芝¹, 王继彦², 刘 志¹, 李向高³, 张俊杰¹, 郑毅男^{3*}

(1. 吉林农业大学生物防治研究所, 吉林 长春 130118; 2. 长春医学院, 吉林 长春 130118;

3. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118)

丙二酰基人参皂苷(malonyl-ginsenoside)又称为丙二酸单酰基人参皂苷,是一类极性大,亲水性强,极易溶于水的酸性皂苷,另外该类化合物分子中酰基键极不稳定,很容易水解,遇酸、碱或在热水、热甲醇条件下都会发生水解反应脱去丙二酸,成为相应的人参皂苷^[1~4]。丙二酰基人参皂苷 Rb₁ 具有促进小鼠齿状突长时程增效作用,对神经生长因子诱导外培养鸡胚的背根神经突的外生长有增强作用^[5,6];本课题组也发现该类皂苷的提取物(以 M-Rb₁、M-Rb₂、M-Rc 为主)具有很强的降糖活性,能降低糖尿病模型小鼠血糖,促进肝糖元合成。然而该类皂苷在总皂苷的提取工艺中,常常和水溶性杂质一起被废弃掉。为了减少这部分皂苷的损失,为开发新药提供技术储备,本实验对人参中丙二酰基人参皂苷的提取工艺进行了优化研究。

1 实验材料、仪器与试剂

实验材料系 2004 年 9 月上旬采于抚松县的鲜人参的根(主根),经吉林农业大学中药材学院李向高教授鉴定。

Agilent 1100 高效液相色谱仪;旋转蒸发仪。

乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。丙二酰基人参皂苷 M-Rb₁、M-Rb₂ 和 M-Rc 对照品为自制,质量分数分别为 99.54%、99.39%、99.42%。

2 方法与结果

2.1 丙二酰基人参皂苷的 HPLC 测定

2.1.1 色谱分析条件:μ-Bondapak™C-18 色谱柱;柱温:35℃;检测波长:203 nm;体积流量:1 mL/min;流动相:乙腈-0.05 mol/L KH₂PO₄(25:75);进样量:20 μL。

2.1.2 供试品溶液的制备:鲜人参根切碎,精密称取 2.5 g,按正交试验设计的工艺进行提取,40℃下浓缩提取液,用 30%乙腈溶解,定容至 10 mL 量瓶中,摇匀放置,用前用 0.25 μm 滤膜滤过,即得。

2.1.3 对照品溶液的制备:精密称取丙二酰基人参

皂 M-Rb₁、M-Rb₂ 和 M-Rc 对照品分别为 3.70、3.00、2.50 mg,用 30%乙腈定溶于 2 mL 量瓶中,摇匀,然后精密吸取 0.1 mL 对照品溶液置于 1 mL 量瓶中,用 30%乙腈稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 标准曲线的制备:分别吸取上述对照品溶液 10、20、40、80、160、320、640 μL,分别置于 1 mL 量瓶中,加 30%乙腈稀释至刻度,制备成不同质量浓度的系列对照品溶液。分别精密吸取不同质量浓度的系列对照品溶液各 20 μL 进样,测定峰面积。以色谱峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),绘制标准曲线,计算回归方程。

M-Rb₁: $Y = 2\ 685.005\ 0\ X - 5.341\ 0$, $r = 0.999\ 79$,线性范围:0.018 53~1.185 92 mg/mL。
M-Rb₂: $Y = 2\ 139.320\ 3\ X - 5.815\ 7$, $r = 0.999\ 66$,线性范围:0.015 4~0.988 2 mg/mL。
M-Rc: $Y = 2\ 114.054\ 1\ X - 3.880\ 1$, $r = 0.999\ 61$,线性范围:0.012 9~0.825 0 mg/mL。

2.1.5 稳定性试验:取供试品溶液,精密吸取 20 μL,按上述色谱条件,分别于 0、2、4、8 h 检测峰面积,计算得丙二酰基人参皂苷 M-Rb₁、M-Rb₂ 和 M-Rc 的 RSD 分别为 1.00%、1.35%、2.64%。

2.1.6 精密度试验:取丙二酰基人参皂苷 M-Rb₁、M-Rb₂ 和 M-Rc 的对照品溶液,精密吸取 20 μL,按上述色谱条件进行分析,连续 5 次,测定峰面积,计算得其 RSD 分别为 1.63%、1.65%和 1.95%。

2.1.7 重现性试验:取同一鲜人参根样品 5 份,制备供试品溶液,分别精密吸取 20 μL,按上述色谱条件,测定峰面积,结果 M-Rb₁、M-Rb₂ 和 M-Rc 的 RSD 分别为 3.49%、4.09%和 3.79%。

2.1.8 回收率试验:采用加样回收法。分别取质量分数 M-Rb₁ 0.240%、M-Rb₂ 0.188%、M-Rc 0.117%的鲜人参根碎末 0.5 g,用 80%甲醇冷浸提取 5 次,40℃下浓缩提取液,用 30%乙腈溶解,定容至 2 mL 量瓶中,摇匀放置,用 0.25 μm 滤膜滤过。

收稿日期:2005-11-09

作者简介:孙光芝(1967—),女,吉林长春人,副研究员,主要从事中药活性物质研究与开发。

* 通讯作者 郑毅男 E-mail: jlnxdhs@126.com

精密取 6 份样品,分别准确加入一定量的人参皂苷 M-Rb₁、M-Rb₂、M-Rc 对照品,按上述色谱条件测定,结果 M-Rb₁ 平均回收率为 100.72% (RSD 为 2.67%);M-Rb₂ 平均回收率为 100.25% (RSD 为 2.48%);M-Rc 平均回收率为 101.09% (RSD 为 2.15%)。

2.1.9 测定:采用外标法计算丙二酰基人参皂苷 M-Rb₁、M-Rb₂ 和 M-Rc。

2.2 提取工艺的正交设计:由于丙二酸单酰基人参皂苷是极性大、亲水性强皂苷,受热易转化脱去丙二酸单酰基,因此在红参和加热高温提取的提取物中,不含有 M-Rb₁、M-Rb₂ 和 M-Rc 3 种酸性皂苷^[7]。为避免丙二酰基人参皂苷的转化,本实验采用冷浸方法提取。根据预试验,以溶剂倍数(A)、溶剂体积分数(B)、提取时间(C)和提取次数(D)为影响因素,各取 3 个水平,考察指标为丙二酰基人参皂苷总量(M-Rb₁、M-Rb₂ 和 M-Rc 3 种丙二酰基人参皂苷的量之和)。采用 L₉(3⁴)正交表,因素水平见表 1,试验结果见表 2。

表 1 因素水平
Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A/倍	B/%	C/h	D/次
1	10	20	8	3
2	15	50	12	4
3	20	80	16	5

表 2 L₉(3⁴)正交试验结果

Table 2 Result of L₉(3⁴) orthogonal test

序号	A	B	C	D	丙二酰基皂苷/%
1	1	1	1	1	1.147
2	1	2	2	2	1.192
3	1	3	3	3	1.296
4	2	1	2	3	1.251
5	2	2	3	1	0.986
6	2	3	1	2	0.889
7	3	1	3	2	1.184
8	3	2	1	3	1.261
9	3	3	2	1	1.214
K ₁	3.635	3.582	3.297	3.347	10.42
K ₂	3.126	3.439	3.657	3.265	
K ₃	3.659	3.399	3.466	3.808	
k ₁	1.212	1.194	1.099	1.116	
k ₂	1.042	1.146	1.219	1.088	
k ₃	1.220	1.133	1.155	1.269	
R	0.178	0.061	0.120	0.181	

可见各因素对丙二酰基人参皂苷提取量影响程度依次为 D>A>C>B,B 的影响不仅不显著,且影响很小,A、C、D 3 因素影响显著,A 影响最大,最佳水平组合为 A₃B₁C₂D₃。

2.3 验证试验:鲜人参根切碎,精密称取 2.5 g,用 80%甲醇冷浸提取,合并提取液,于 40℃下浓缩后,用 30%乙腈溶解,定容至 10 mL 量瓶中。结果丙二酰基人参皂苷的量为 1.286%,与表 2 中数据相比紧次于最高的量值。因而确定丙二酸单酰基人参皂苷提取最佳工艺为:溶剂倍数为 20 倍,甲醇体积分数为 20%,提取时间 12 h,提取次数 5 次。

3 讨论

溶剂的倍数、提取时间和提取次数均为丙二酰基人参皂苷的提取量有显著的影响,溶剂的体积分数对丙二酰基人参皂苷的提取量影响较弱,认为 20%~80%甲醇均可,从节约的角度应用 20%甲醇,从提取中性皂苷的角度应用 80%甲醇。

提取丙二酰基人参皂苷优化组合是 A₃B₁C₂D₃,即溶剂倍数为 20 倍,甲醇体积分数为 20%,提取时间 12 h,提取次数 5 次。

工艺中采取冷浸和低温保藏是为了尽量减少丙二酰基人参皂苷的转化,20%甲醇提取与高体积分数甲醇相比丙二酰基人参皂苷的量多而其他皂苷相对减少,20%甲醇提取有利于丙二酰基人参皂苷的分离制备。

笔者在研究人参皂苷的过程中,从中国鲜人参中发现了两种丙二酰基人参皂苷,至此已发现的丙二酰基人参皂苷有 5 个;除了已知的 5 个丙二酰基人参皂苷外,是否还有其他丙二酰基人参皂苷,需要进一步研究探讨。

文献已报道丙二酰基人参皂苷 Rb₁ 具有一定的药理活性,本课题组亦发现其降糖活性,那么其他丙二酰基人参皂苷单体是否也有药理活性尚需进一步探讨。

References:

- [1] Kitagawa I, Taniyama T, Hayashi T, et al. Malonyl-ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, four new malonylated dammarane-type triterpene oligoglucoside from *Ginseng Radix* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31 (9): 3353.
- [2] Kitagawa I, Taniyama T, Yoshikawa M, et al. Chemical studies on crude drug processing. VI. Chemical structures of malonyl-ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, and Rd isolated from the root of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37 (11): 2961-2970.
- [3] Wang J Y, Li X G, Zheng Y N, et al. Separation and identification of malonyl-ginsenosides from fresh ginseng [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18 (2): 105-107.
- [4] Zhuo Y, Song F R, Liu S Y, et al. Study on constituents of ginsenoside from *Panax quinquefolium* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23 (9): 551-552.
- [5] Abe K, Cho S, itagawa I, et al. Differential effects of ginsenoside Rb₁ and malonylginsenoside Rb₁ on long-term potentiation in the dentate gyrus of rats [J]. *Brain Res*, 1994, 649 (1-2): 7-11.
- [6] Nishiyama N, Cho S, Kitagawa I, et al. Malonylginsenoside Rb₁ potentiates nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth of cultured chick embryonic dorsal root ganglia [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17 (4): 509.