

表9 4种方法提取液含药血清吸光度测定结果

Table 9 Serum fingerprint of four kinds of extracting solution by absorbance

峰序	SBEE法		SBE法		WE法		AE法	
	nm	A	nm	A	nm	A	nm	A
1	576.0	0.051	576.0	0.053	576.0	0.057	576.0	0.055
2	541.0	0.062	540.0	0.059	542.0	0.078	541.0	0.078
3	414.1	0.720	413.2	0.480	414.1	0.630	280.2	0.050
4	280.3	0.045	280.3	0.120	281.2	0.580	272.1	0.930
5	271.2	0.963	270.3	0.070	271.2	0.350	265.2	0.450
6	265.2	0.973	265.2	0.270	265.3	0.010	251.2	0.530
7	250.2	0.927	250.2	0.030	250.3	0.680		
8			204.1	0.298				
$\bar{X}$	1.963		1.798		1.874		1.489	
$Y_U$	0.8834		0.0825		0.4514		-1.4174	

表10 4种方法提取液血清指纹图谱标准化值

Table 10 Standardized value of serum fingerprint in four kinds of extracting solution

方法	$Y_{200}$	$Y_{250}$	$Y_{280}$	$Y_U$	$Y_{总}$
SBEE	0.9856	0.8318	0.9867	0.8834	0.9219
SBE	0.5474	-0.8875	-0.1928	0.0825	-0.1126
WE	-0.2999	0.5638	-0.0117	0.4514	0.1759
AE	-1.2331	-0.5081	-0.7823	-1.4174	-0.9852

法)的血清指纹图谱进行研究比较,对指纹图谱峰面积和个数以及紫外吸收度进行了标准化处理,加权求和后得标准化值,结果以新西兰兔用药后2h含药血清的指纹图谱的综合Y值最大,4种方法提取液给药后2h含药血清的综合Y值,以SBEE液最大,进一步说明半夏白术天麻汤用SBEE法提取较其他3种提取方法优越。

通过DAD检测器和紫外全波长扫描,该样品在220、250、280nm处有较强吸收,故分析这3个检

测波长下的血清指纹图谱。

4种方法提取液220nm处含药血清HPLC指纹图谱的标准化值Y的大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{SBE} > Y_{WE} > Y_{AE}$ ;250nm处的标准化值Y的大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{WE} > Y_{SBE} > Y_{AE}$ ;280nm处的标准化值Y的大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{WE} > Y_{SBE} > Y_{AE}$ (WE和SBE的Y值无显著性差异, $P > 0.05$ );吸光度的标准化值Y的大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{WE} > Y_{SBE} > Y_{AE}$ ;4种方法提取液血清指纹图谱的综合Y值大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{WE} > Y_{SBE} > Y_{AE}$ 。说明SBE液中吸收短波长的成分较多,WE液吸收较长波长的成分较多。SBEE液无论短波长还是长波长,均有较强吸收,说明SBEE液中成分的数量和种类多于其他3种提取液,能较大程度的提取活性混合成分。

不同的分析方法只能检测到相应结构的成分,应该使用多种分析方法,多角度分析验证。这个问题有待继续研究探讨。对于指纹图谱中各个峰位所对应的成分的确定也有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 王淑玲,孙秀梅,张兆旺,等.半夏白术天麻汤4种方法提取液指纹图谱比较[J].杭州师范大学学报:自然科学版,2010,9(2):127-134
- [2] 王淑玲,张兆旺,孙秀梅,等.半仿生-酶法提取的半夏白术天麻汤中甘草次酸的含量测定[J].承德医学院学报,2008,25(2):119-120
- [3] 李小娜,王巧,张国华,等.山茱萸提取液指纹图谱及其不同有效部位的血清指纹图谱研究[J].中华中医药杂志,2006,21(10):617-619
- [4] 孙秀梅,张兆旺,郭婕,等.黄精不同炮制品半仿生提取液与水提取液成分的比较[J].中草药,2007,38(11):1648-1651

## 正交试验优选人参中人参皂苷Rg<sub>1</sub>的酶解工艺研究

赵啸虎<sup>1</sup>,张红梅<sup>3</sup>,杨金蕊<sup>1</sup>,郭建鹏<sup>1,2\*</sup>

(1. 延边大学药学院,吉林 延吉 133000;2. 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室,吉林 延吉 133002;3. 长春市人民医院 药剂科,吉林 长春 130000)

**摘要:**目的 优化酶解法提取人参皂苷Rg<sub>1</sub>的工艺条件。方法 采用高效液相色谱法为测定方法,以人参皂苷Rg<sub>1</sub>提取率为指标,通过正交设计试验进行优选。结果 纤维素酶酶解为最优方法,且酶用量、酶解时间、酶解温度对人参皂苷Rg<sub>1</sub>提取率有显著性影响;提取人参皂苷Rg<sub>1</sub>的最佳工艺条件为:纤维素酶用量为1.4%,酶解60min,酶解温度为45℃。结论 优化后的提取工艺简单、稳定、提取率高。

**关键词:**人参;人参皂苷Rg<sub>1</sub>;正交设计;酶解;高效液相色谱

中图分类号:R286.02 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)08-1279-04

\* 收稿日期:2009-10-12

基金项目:吉林省中医药管理局中医药科技资助项目(08SYS-102)

作者简介:赵啸虎(1984-),男,硕士研究生,研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: xiaohu2062@tom.com

\* 通讯作者 郭建鹏 Tel: (0433) 2660607 E-mail: gjp807@ybu.edu.cn

## Enzymolysis technology of ginsenoside R<sub>g1</sub> from *Panax ginseng* by orthogonal design

ZHAO Xiao-hu<sup>1</sup>, ZHANG Hong-mei<sup>3</sup>, YANG Jia-wei<sup>1</sup>, GUO Jian-peng<sup>1,2</sup>

(1. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain & Functional Molecules, Ministry of Education, Yanji 133002, China; 3. Department of Pharmacy, Changchun People's Hospital, Changchun 130000, China)

**Abstract: Objective** To optimize the enzymolysis technology of ginsenoside R<sub>g1</sub>. **Methods** Taking ginsenoside R<sub>g1</sub> content as the index, orthogonal design method was used for optimization and HPLC for determination. **Results** Cellulase enzymolysis was the best extracting process, and enzyme amount, enzymolysis time, and enzymolysis temperature had obvious effect on the extraction of ginsenoside R<sub>g1</sub>. The optimum extraction technologies were as follows: cellulase amount was 1.4%, enzymolysis time 60 min, the enzymolysis temperature 45 °C. **Conclusion** The optimization extraction technology is simple, steady, and the extracting rate is high.

**Key words:** *Panax ginseng* C. A. Mey.; ginsenoside R<sub>g1</sub>; orthogonal design; enzymolysis; HPLC

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根, 主要成分为人参皂苷及多糖等, 其中人参皂苷 R<sub>g1</sub> 具有使中枢神经兴奋, 抗疲劳, 改善记忆、学习机能以及治疗勃起功能障碍等作用<sup>[1-2]</sup>。酶解法是近年来用于天然植物有效成分提取的一项新型技术。选用恰当的酶, 可较温和地将植物组织分解, 加速有效成分的释放, 从而提高提取率<sup>[2-4]</sup>。采用酶解法提取人参, 不仅能降低生产成本, 减少工序, 而且有利于提高有效成分的提取率。因此本实验对比了水提法与多种酶解法对人参皂苷 R<sub>g1</sub> 提取率的影响, 通过正交试验优选酶解法提取人参皂苷 R<sub>g1</sub> 的工艺条件, 为酶解法在人参提取中的应用提供实验依据。

### 1 仪器与试剂

日立 L-2400 高效液相色谱仪; 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对照品(中国药品生物制品检验所, 批号 110703-200726); 纤维素酶(0.5 U/mg, Sigma 公司, 批号 20071015); 果胶酶(0.4 U/mg, Sigma 公司, 批号 20070918); 甲醇为色谱纯; 水为重蒸馏水; 其余试剂均为分析纯; 人参为市售, 经延边大学药学院刘永镇教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根。

### 2 方法与结果

#### 2.1 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 的高效液相色谱法测定<sup>[5]</sup>

2.1.1 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(19:81); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温 30 °C。

2.1.2 对照品溶液的配制: 精密称取人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对照品 5.0 mg 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液, 其质量浓度为

0.5 mg/mL。

2.1.3 供试品溶液的配制: 分别将不同提取方法得到的样品溶液浓缩至稠膏, 用甲醇超声 30 min 溶解, 定容至 50 mL, 即得。

2.1.4 系统适用性试验: 分别取人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入色谱仪, 测定, 见图 1。理论塔板数按人参皂苷 R<sub>g1</sub> 峰计算不低于 2 000。该色谱条件下, 样品可得到较好的分离。

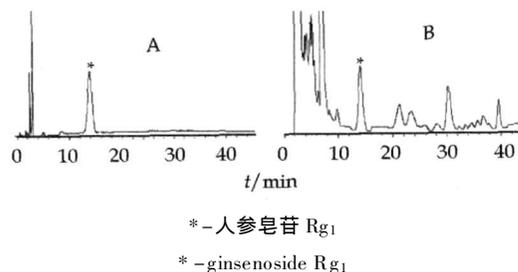


图 1 人参皂苷 R<sub>g1</sub> (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图谱  
Fig 1 HPLC Chromatograms of ginsenoside R<sub>g1</sub> reference substance (A) and sample (B)

2.1.5 线性关系的考察: 精密量取人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对照品溶液 2、6、10、14、18 μL, 注入色谱仪, 测定峰面积, 以峰面积(Y)对进样量(X)进行回归, 得回归方程为  $Y = 411.401X + 66.917$ ,  $r = 0.9998$ , 线性范围 1.00~9.00 μg。

2.1.6 精密度试验: 精密吸取人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对照品溶液, 每次进样 10 μL, 重复进样 5 次, 以峰面积为指标, 测定, 结果显示 RSD 为 0.21%。

2.1.7 稳定性试验: 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12 h, 进样 10 μL, 测定人参皂苷 R<sub>g1</sub> 峰面积, 计算得 RSD 为 1.06%。

2.1.8 重现性试验: 精密称取同一批样品 5 份, 制

备供试品溶液, 进样 10 μL, 测定, 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 质量分数的 RSD 为 1.80%。

2.1.9 加样回收率试验: 精密量取样品溶液适量, 共 6 份, 精密加入人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对照品 0.30 mg, 制备供试品溶液, 进样 10 μL, 测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.12%, RSD 为 1.55%。

2.2 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 提取工艺的选择<sup>[4]</sup>

2.2.1 水提法: 称取过 14 目的人参粗粉 20 g, 加入 14 倍量水浸泡 2 h, 回流提取 2 次, 每次 60 min。提取液滤过, 定容至 500 mL, 即得。

2.2.2 醇提法: 称取过 14 目的人参粗粉 20 g, 加入 14 倍量 80% 乙醇浸泡 2 h, 回流提取 2 次, 每次 60 min。提取液滤过, 定容至 500 mL, 即得。

2.2.3 纤维素酶酶解法<sup>[6]</sup>: 称取过 14 目的人参粗粉 20 g, 加入 10 倍量水浸泡 2 h, 加热煮沸 5 min, 冷却, 置恒温水浴锅中, 加入新鲜配制的 5% 纤维素酶溶液, 用量为 0.35 g, 搅拌, 酶解 45 min, 酶解温度为 65 °C, 酶解结束后加热回流提取 2 次, 每次 45 min, 收集提取液, 滤过, 定容至 500 mL, 即得。

2.2.4 果胶酶酶解法<sup>[7]</sup>: 称取过 14 目的人参粗粉 20 g, 加入果胶酶 0.35 g, 同纤维素酶酶解法操作, 即得。

2.2.5 混合酶酶解法<sup>[7]</sup>: 称取过 14 目的人参粗粉 20 g, 加入纤维素酶与果胶酶各 0.175 g, 同纤维素酶酶解法操作, 即得。

2.2.6 提取方法比较: 以上样品制备供试品溶液, 各重复测定 3 次, 结果见表 1。

表 1 各提取方法的对比试验结果( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Comparison of extracting methods ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

提取方法	人参皂苷 R <sub>g1</sub> 提取率/(mg · g <sup>-1</sup> )
水提法	1.17 ± 0.052
醇提法	1.55 ± 0.054
纤维素酶酶解法	1.58 ± 0.050
果胶酶酶解法	1.26 ± 0.057
混合酶酶解法	1.39 ± 0.055

结果表明, 不同方法提取人参皂苷 R<sub>g1</sub> 提取率依次为纤维素酶酶解法> 醇提法> 混合酶酶解法> 果胶酶酶解法> 水提法。因此在本实验条件下提取人参皂苷 R<sub>g1</sub> 的最优方法为纤维素酶酶解法。

2.3 纤维素酶酶解法工艺条件的优选

2.3.1 提取流程: 称取人参 20 g 加水浸泡 2 h 后, 加热煮沸 5 min, 冷却, 降温至约 40 °C, 置恒温水浴锅中, 酶解, 酶解结束后加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 收集提取液, 滤过, 即得。

2.3.2 正交试验优化酶解工艺条件: 影响人参皂苷

R<sub>g1</sub> 提取率的因素有酶解时间、酶用量、酶解温度、pH 值、提取次数等。根据文献报道<sup>[7-8]</sup>和预试验, 其中酶解时间、酶用量、酶解温度对人参皂苷 R<sub>g1</sub> 提取率影响较大。因此以样品中人参皂苷 R<sub>g1</sub> 提取率为评价指标, 采用正交设计试验优选纤维素酶酶解人参的最佳提取工艺。因素水平设置见表 2, 正交试验安排及结果见表 3、4, 方差分析结果见表 5。

表 2 因素与水平

Table 2 Factors and levels

水平	因素		
	A 酶解时间/min	B 酶解温度/°C	C 酶用量/%
1	30	45	0.8
2	45	55	1.1
3	60	65	1.4

表 3 正交试验安排及结果

Table 3 Arrangement and results of orthogonal design

试验号	A	B	C	D(空白)	人参皂苷 R <sub>g1</sub> 提取率/(mg · g <sup>-1</sup> )
1	3	3	1	3	1.45
2	1	2	3	3	1.72
3	3	1	3	2	2.06
4	1	3	2	2	1.52
5	2	3	3	1	1.60
6	3	2	2	1	1.85
7	2	2	1	2	1.63
8	2	1	2	3	1.95
9	1	1	1	1	1.61

表 4 多水平均值检验

Table 4 Multiple comparison of levels

因素(I)	因素(J)	均数差(I, J)	标准差	P
A(1)	A(2)	-0.110 0	0.035 6	0.091
	A(3)	-0.170 0	0.035 6	0.041
A(2)	A(3)	-0.060 0	0.035 6	0.234
B(1)	B(2)	0.140 0	0.035 6	0.059
	B(3)	0.350 0	0.035 6	0.010
B(2)	B(3)	0.210 0	0.035 6	0.028
C(1)	C(2)	-0.210 0	0.035 6	0.028
	C(3)	-0.230 0	0.035 6	0.023
C(2)	C(3)	-0.020 0	0.035 6	0.631

表 5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F 值	显著性
A	0.045	2	0.022	11.737	P > 0.05
B	0.186	2	0.093	49.000	P < 0.05
C	0.097	2	0.049	25.632	P < 0.05
误差	0.004	2	0.002		

结果表明, 因素 A 对人参皂苷 R<sub>g1</sub> 提取率无显著性影响, B、C 因素具有显著性影响, 各因素对人参皂苷 R<sub>g1</sub> 提取率影响的主次关系为 B > C > A。考虑生产成本, 实验条件下优化水平的最佳组合为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>, 即酶解时间 60 min, 纤维素酶用量为

1.4%, 酶解温度为 45 ℃。

2.3.3 验证试验: 分别按上述酶解最优提取工艺条件提取人参皂苷  $R_{g1}$ , 重复进行 3 次平行试验。结果, 人参皂苷  $R_{g1}$  提取率为  $(2.05 \pm 0.047)$  mg/g, 与正交试验最大值 2.06 mg/g 接近。

### 3 讨论

本实验结果提示, 与传统水提和醇提相比, 采用纤维素酶酶解提取人参皂苷  $R_{g1}$  提取率更高, 溶剂用量减少, 对设备无特殊要求, 适合于工业化大生产。酶解法提取最佳工艺条件为, 酶解时间 60 min, 纤维素酶用量为 1.4%, 酶解温度为 45 ℃。酶解后用水回流提取 2 次, 每次 1 h。优化后的提取工艺稳定、可行。

### 参考文献

- [1] 黎阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-166
- [2] 陈琳琳, 贾伟国, 苏华等. 人参用于治疗勃起障碍的最新机制及临床研究[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(2): 116-120
- [3] 陈栋, 周永传. 酶法在中药提取中的应用和进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(2): 99-101
- [4] 杨皓明, 齐巍, 何志敏, 等. 复合酶法提取丹参中丹参素的研究[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1161-1164
- [5] 宋宏新, 刘静, 张彦娟. 半仿生酶法提取三七皂苷工艺研究[J]. 中草药, 2009, 40(6): 905-907
- [6] 孙艳, 张卫同, 陈海滨, 等. HPLC 法测定参芪颗粒中人参皂苷  $R_{g1}$  和  $R_e$  [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1009-1010
- [7] 郭建鹏, 张红梅. 高山红景天酶解工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(17): 1817-1819
- [8] 李元波, 殷辉安, 唐明林, 等. 复合酶解法提取三七皂苷的实验研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4): 488-492
- [9] 傅博强, 谢明勇, 周鹏, 等. 纤维素酶法提取茶多糖[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(7): 4

## 清咽滴丸极性成分的高效液相指纹图谱及其模式识别的研究

张铁军<sup>1</sup>, 韩世柳<sup>2</sup>, 田成旺<sup>1</sup>, 朱宏吉<sup>2\*</sup>

(1 天津药物研究院, 天津 300193; 2 天津大学化工学院, 天津 300072)

**摘要:** 目的 研究清咽滴丸的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱建立了清咽滴丸极性部分的 HPLC 的指纹图谱, 收集了不同批次的 12 批产品进行测定, 并使用主成分分析对指纹图谱进行了模式识别研究。采用 HPLC-DAD 技术进行了药材与制剂的相关性分析。结果 通过主成分分析可知, 甘草苷为其中比较重要的指标。相关性研究表明, 所确定的共有峰中有 6 个色谱峰来自甘草, 5 个色谱峰来自诃子。结论 此方法可较系统地用于清咽滴丸的质量控制。

**关键词:** 清咽滴丸; 指纹图谱; 主成分分析

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1282-04

### HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition method of polar components in Qingyan Dropping Pill

ZHANG Tie-jun<sup>1</sup>, HAN Shi-liu<sup>2</sup>, TIAN Cheng-wang<sup>1</sup>, ZHU Hong-ji<sup>2</sup>

(1 Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2 School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** **Objective** To establish a method for the quality control of Qingyan Dropping Pill. **Methods** An HPLC method was developed to establish the fingerprint of polar components in Qingyan Dropping Pill, and 12 samples from various batches were analyzed. Furthermore, principal component analysis (PCA) was used to differentiate and evaluate the whole fingerprints. The relationship between Qingyan Dropping Pill and their original herbs were investigated with HPLC-DAD method. **Results** The result showed that liquiritin was the key component of quality control. Among the chromatographic peaks, there were six chromatographic peaks coming from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; Five chromatographic peaks coming from *Chebulae Fructus*. **Conclusion** This method can be used as quality control for Qingyan Dropping Pill.

**Key words:** Qingyan Dropping Pill; fingerprint; principal component analysis (PCA)

\* 收稿日期: 2009-10-15