

人参茎叶水提液中人参皂苷热稳定性研究及其有效期推算

林龙飞,杨培,闫磊,张慧,倪健*
(北京中医药大学中药学院,北京 100102)

[摘要] 目的:研究水煎煮提取过程中加热时间、温度对人参茎叶水提液中人参皂苷的影响及受热后人参皂苷含量的变化情况,并且推算人参茎叶水提液的有效期。方法:采用高效液相色谱法测定不同加热条件下人参茎叶水提液中人参皂苷 R_{g1}、Re 的含量(Agilent Extend-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(19:81),洗脱程序:等度 40 min,检测波长 203 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,并以经典恒温法推算其有效期。结果:2 种人参皂苷在不同温度下加热 12 h,均会发生不同程度的降解反应,其中,100 ℃条件下降解速率最快,80 ℃次之,60 ℃相对较慢,分别降至约初始含量的 20%、60%、80%,以 lgK 对 1/T 进行一元线性回归,得回归方程,人参皂苷 R_{g1}:lgK = -2 396.2/T + 5.587 3,人参皂苷 Re:lgK = -2 518.2/T + 5.901 6,通过回归方程计算人参茎叶水提液中人参皂苷 R_{g1}、Re 的有效期分别为 30.1 和 37.6 h。结论:人参茎叶水提液中人参皂苷 R_{g1}、Re 的含量,随加热时间延长而不断下降,温度越高,下降速率越快;人参茎叶水提液的有效期较短,故含人参茎叶水提液的制剂中间体应在其有效期内完成制剂。

[关键词] 人参茎叶; 人参皂苷; 稳定性; 降解; 高效液相色谱; 有效期
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0137-05

Studies on Thermal Stability of Ginsenosides Aqueous Solution
from the Stem and Leaf of Ginseng and Calculate the Term of Validity

LIN Long-fei, YANG Pei, YAN Lei, ZHANG Hui, NI Jian*
(College of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] Objective: The influence of heating time and temperature on the content of ginsenosides from stems and leaves of ginseng during water decoction process was researched to calculate the term of validity. Method: The HPLC was used to determine the content of ginsenoside R_{g1} and ginsenoside Re extracted in different heating conditions. An Agilent Extend-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water (19:81) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was maintained at 30 ℃ and the detection wavelength was set at 203 nm. The term of validity was caculated by classical homeothermia. Result: When the heat comes to 12 h, ginsenoside R_{g1} and ginsenoside Re had different degree of degradation, and they degraded rapidly when temperature is at 100 ℃. It' s only 20 percent of the initial content at 100 ℃, and 60% at 80 ℃, 80% at 60 ℃. With simple linear regression analysis to 1/T as lgK, the regression equations are: lgK = -2 396.2/T + 5.587 3 for ginsenoside R_{g1}, lgK = -2 518.2/T + 5.901 6 for ginsenoside Re. The term of validity of ginsenoside R_{g1} and ginsenoside Re were calculated as 30.1 h and 37.6 h. Conclusion: The content of ginsenoside R_{g1} and ginsenoside Re decreased with time increasing and temperature increasing. The term of validity about stems and leaves of *Panax ginseng* is in short period. So, intermediate which contains water extract of stems and leaves of *P. ginseng* should accomplish the preparation within the term of validity.

[Key words] stems and leaves of *Panax ginseng*; ginsenoside; stability; degradation; HPLC; term of validity

[收稿日期] 20120703(003)
[基金项目] “教育部创新团队发展计划”(IRT0810)
[第一作者] 林龙飞,在读硕士,从事中药制剂新剂型与新技术研究,E-mail:linlongfei0417@126.com
[通讯作者] *倪健,教授,博士生导师,中药制剂新剂型与新技术,Tel:010-84738607,E-mail:njtem@263.net

人参为五加科人参属药用植物,刺激和抑制中枢神经系统、调节免疫系统、内分泌系及抗肿瘤、改善心血管系统的作用等^[1],可通过上调神经营养因子的表达发挥神经元保护作用^[2]。人参的主要活性成分是人参皂苷,人参地上部分(包括茎、叶、花、果)均有较好的药理作用,如抗衰老、抗应激、抗肿瘤、调节免疫功能、糖皮质激素样作用^[3]及和抗病毒、戒毒、美容作用^[4],尤其是人参茎叶,具有与人参根相似的药理作用^[5]。人参茎叶中含有多种人参皂苷,如人参皂苷 Re, Rh₁, Rh₂, Rg₁, Rg₂, Rg₃等^[6],并且含有较高含量的人参皂苷 Rg₁, Re^[7],其具有多种生理活性,在神经系统中,具有营养神经和神经保护的作用^[8-10],人参皂苷 Re 可保护血清剥夺损伤的神经细胞,提高神经细胞成活率,抑制神经细胞损伤、凋亡^[11],并且可以抑制急性缺血再灌注损伤诱导心肌细胞凋亡^[12],其对阿尔茨海默病的治疗有重要的意义。中药炮制过程可能会发生水解反应、氧化反应、置换反应、异构化反应和分解反应等^[13]。采用水煎煮提取人参茎叶中的人参皂苷是目前的常用方法^[14],但水煎煮提取中加热时间、温度对人参茎叶水提液中人参皂苷的影响有多大,一直没有相应的研究报道。本实验以人参茎叶中人参皂苷 Rg₁, Re 为检测指标,采用 HPLC 测定水煎煮提取中温度对其含量的影响。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,配备 G1314B 二极管阵列检测器,安捷伦化学工作站),HH-4 型恒温水浴锅(国华电器有限公司),移液器(德国 brand 公司)。

1.2 试剂 人参皂苷 Re 对照品(供含量测定用,中国药品生物制品检定所),人参皂苷 Rg₁对照品(供含量测定用,中国药品生物制品检定所,批号),乙腈(色谱纯, ThermoFisher 公司),水(高纯水,自制),甲醇(色谱纯, ThermoFisher 公司)。

1.3 试药 人参茎叶(北京本草方源药业有限公司,批号 20110607)由北京中医药大学中药学院生药系刘春生教授鉴别为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 人参茎叶浓缩液的制备 取人参茎叶 100 g,加 10 倍量水,煎煮两次,每次 1 h,合并滤液,浓缩至 200 mL,即每 1 mL 含有 0.5 g 生药的水溶液,即人参茎叶浓缩液样品。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Extend-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(19:81)等度洗脱 40 min,检测波长 203 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃^[15]。

2.2.2 对照品的制备 取经五氧化二磷减压干燥 12 h 的人参皂苷 Rg₁, Re 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含人参皂苷 Rg₁ 1.024 g·L⁻¹、人参皂苷 Re 1.346 g·L⁻¹,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取人参茎叶浓缩液样品 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.2.4 线性关系考察 上述混合对照品溶液,依次用甲醇稀释 1,2,3,5,10 倍,得一系列对照品溶液,依次吸取上述对照品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,分别以对照品的含量(*X*)为横坐标,峰面积积分值(*Y*)为纵坐标进行线性回归,从相关系数看,2 种单体人参皂苷对照品均呈良好的线性关系,色谱图见图 1,结果见表 1。

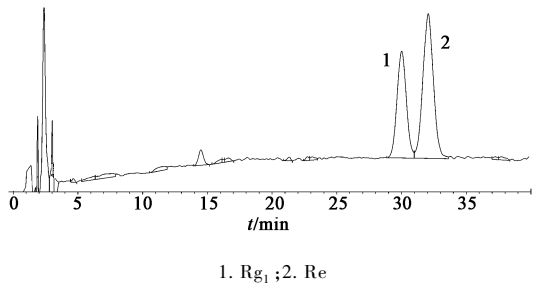


图 1 人参皂苷对照品 HPLC

表 1 人参皂苷 Rg₁, Re 线性回归方程(*n* = 5)

对照品	方程	线性范围/μg	R ²
人参皂苷 Rg ₁	<i>Y</i> = 158.7 <i>X</i> + 9.809	(1.024 ~ 10.24) μg	0.999
人参皂苷 Re	<i>Y</i> = 174.86 <i>X</i> + 58.784	(1.346 ~ 13.46) μg	0.999

2.2.5 仪器精密度考察 配制人参皂苷 Rg₁, Re 浓度分别为 0.298, 0.495 g·L⁻¹的混合对照品溶液,精密吸取该对照品溶液各 10 μL,连续进样 6 次,结果人参皂苷 Rg₁, Re 峰面积 RSD 分别为 0.12%, 0.09%, 0.18%, 0.14%, 0.33%。结果表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取人参茎叶浓缩液样品 6 份,按 2.2.3 项下方法操作,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,测得人参皂苷 Rg₁, Re 的含量,并计算其 RSD,结果见表 2。

表 2 人参茎叶水提液中人参皂苷含量的重复性试验

实验号	人参皂苷含量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
Rg ₁	0.797 836	0.780 748	0.784 964	0.794 223	0.783 793	0.798 454	0.98
Re	1.391 54	1.370 96	1.389 32	1.381 94	1.376 67	1.398 71	0.74

2.2.7 稳定性试验 取制备好的供试品溶液,分别于 0,4,8,12,18,24 h 测定,测得人参皂苷 Rg₁,Re 色谱峰的峰面积,计算 RSD 分别为 1.78%,1.47%,结果表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

2.2.8 回收率试验 精密量取已知含量的样品人参茎叶浓缩液 5 mL,共 6 份,分别精密加入人参皂苷 Rg₁,Re 对照品,按 2.2.3 项下方法操作,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 3。

表 3 人参皂苷回收率试验

人参皂苷	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
Rg ₁	3.700	2.048	5.703	97.80	99.15	1.33
	3.700	2.048	5.721	98.68		
	3.700	2.048	5.781	101.61		
	3.700	2.048	5.715	98.39		
	3.700	2.048	5.731	99.17		
	3.700	2.048	5.733	99.27		
Re	6.698	2.692	9.371	99.29	100.79	1.07
	6.698	2.692	9.416	100.97		
	6.698	2.692	9.421	101.15		
	6.698	2.692	9.445	102.04		
	6.698	2.692	9.382	99.70		
	6.698	2.692	9.433	101.60		

2.3 人参皂苷水溶液热稳定性研究 取人参茎叶浓缩液样品 105 mL,分为 21 份,每份 5 mL,分别置于 25 mL 量瓶中。随机取出 3 份,作为未加热对照组,其余 18 份,分为 3 组,每组 6 份,置恒温水浴锅中以 60,80,100 ℃加热,分别在 1,2,4,6,8,12 h 各取出一份,以甲醇定容至 25 mL,作为供试品。

2.3.1 HPLC 测定结果 取上述样品按 2.2 项下方法测定,结果见表 4,图 2,3。

由结果可知,2 种人参皂苷在加热 12 h 内,发生了不同程度的降解反应,含量随着加热时间延长,呈不断下降趋势。加热温度对人参皂苷分解速率影响较大,100 ℃加热 12 h 人参皂苷降至初始含量的 20% 以下,60 ℃下加热分解速率相对较慢。

表 4 不同加热时间、温度下测得人参皂苷 Rg₁、Re 的含量

加热温度 /℃	加热时间 /h	人参皂苷 Rg ₁ 含量 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	人参皂苷 Re 含量 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
60	未加热	0.790 766	1.384 07
	1	0.757 811	1.373 774
	2	0.743 483	1.376 278
	4	0.712 915	1.296 696
	6	0.687 443	1.242 435
	8	0.656 557	1.185 113
80	12	0.567 085	1.036 8
	1	0.760 04	1.357 078
	2	0.750 169	1.358 748
	4	0.714 826	1.340 939
	6	0.581 413	1.063 235
	8	0.469 015	1.131 965
100	12	0.442 269	0.808 904
	1	0.675 343	1.230 47
	2	0.641 91	1.097 461
	4	0.463 284	0.847 026
	6	0.302 806	0.53 927
	8	0.253 453	0.494 748
	12	0.106 03	0.209 53

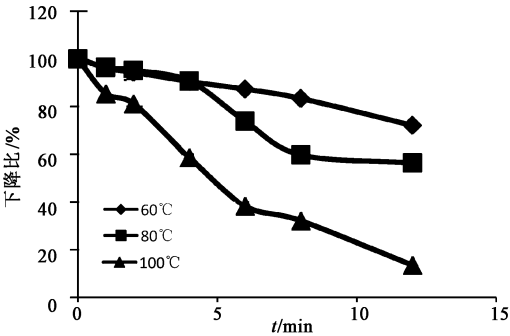


图 2 人参皂苷 Rg₁ 随加热时间含量变化

2.3.2 人参茎叶浓缩液有效期推算 采用经典恒温法^[16]进行计算,根据一级反应速度方程式,lgC = -Kt/2.303 + lgC₀,求出人参皂苷 Rg₁,Re 在不同温度下的反应速度常数 K,结果见表 5。

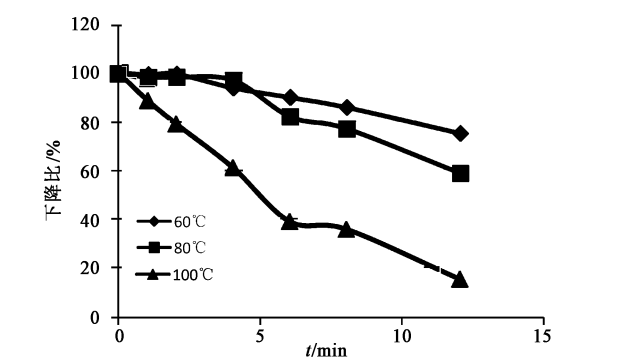


图 3 人参皂苷 Re 随加热时间含量下降情况

表 5 不同温度下人参皂苷 Rg₁,Re 的
反应速度常数 K,1/T 及 lgK

人参皂苷	温度/℃	速度常数/K	1/T	lgK
Rg ₁	60	0.028	0.003 003	-1.552 84
	80	0.048	0.002 833	-1.318 76
	100	0.168	0.002 681	-0.774 69
Re	60	0.024	0.003 003	-1.619 79
	80	0.048	0.002 833	-1.318 76
	100	0.157	0.002 681	-0.804 1

以 lgK 对 1/T 进行一元线性回归得
人参皂苷 Rg₁:lgK = -2 396. 2/T + 5. 587 3
人参皂苷 Re:lgK = -2 518. 2/T + 5. 901 6
将常温 25 ℃ 即 298 K 带入到上述方程中得出:
人参皂苷 Rg₁, Re 在常温下的速度常数分别为:
0.003 5,0.002 8,将速度常数分别代入有效期计算公式:
 $t_{0.9} = 0. 105\ 4/K_{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$
得:Rg₁ t_{0.9} = 30. 1 h
Re t_{0.9} = 37. 6 h

3 讨论

王芳曾用初均速法研究不同温度下人参茎叶皂苷药物中人参皂苷 Re 含量变化情况^[17],结果表明人参皂苷 Re 在高温下会有一定的降解,但对人参皂苷水溶液在加热条件下其含量变化情况没有研究。本研究表明人参皂苷 Rg₁, Re 随加热时间延长、加热温度的升高均发生不同程度的降解反应。人参皂苷属于三萜皂苷类化合物按其结构可分为达玛烷型齐墩果烷型和奥克梯隆型三类^[18],其中人参皂苷 Rg₁,Re 均为四环三萜类化合物,人参皂苷 Re 比人参皂苷 Rg₁ 多一个鼠李糖基^[19],人参皂苷在胃酸中可去糖基化^[20],并且通过酸、碱、酶等水解方法

可以使人参皂苷发生水解反应而生成人参皂苷元^[21-22],所以,推测人参皂苷 Rg₁,Re 在加热条件下发生水解,脱掉糖基,生成皂苷元。提示在人参皂苷提取物制备过程中,若要保留大部分的原型皂苷,应缩短人参皂苷水溶液的受热时间和尽量避免高温加热,故在提取、浓缩的过程中可以考虑采取减压设备;在中药制剂的生产过程中,如果含有人参皂苷水溶液的制剂中间体应尽快完成制剂,并要保证在人参皂苷水溶液的有效期内完成。除此之外,陈木洲等^[23]研究表明调节提取溶剂及制剂的酸碱度可影响人参皂苷的提取率,有将人参皂苷酸降解物作为药物的应用^[24],也有研究使用微生物发酵法可以使人参皂苷产生生物转化^[25]等。

本研究提示了一定浓度人参皂苷水溶液中人参皂苷的热稳定性,至于不同浓度时,是否也会发生类似的变化规律,以及人参皂苷在其他条件下是否也会发生降解反应、降解产物如何等方面还有待更进一步的研究。

[参考文献]

[1] 王悦虹,娄大伟,于晓洋,等. 人参的药理学作用研究进展[J]. 吉林化工学院学报,2010,27(2):38.
[2] 王中立,戴建国,陈琳,等. 人参拮抗高皮质激素血症致神经元损伤的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):94.
[3] 李勇,李敏,王喜,等. 人参茎叶皂甙增强糖皮质激素受体转录激活效应的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2004,24(8):710.
[4] 何道同,王兵,陈珺明. 人参皂苷药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(7):118.
[5] 孔宪生. 人参茎叶皂苷药理研究[J]. 黑龙江医药,2002,15(3):202.
[6] 申书昌,孙秀佳,唐晓慧,等. 人参茎叶的化学成分研究[J]. 齐齐哈尔大学学报,2008,24(3):43.
[7] 胡杰,秦雪梅,郭小青,等. HPLC-ELSD 法测定人参茎叶中人参皂苷 Rg₁,Re,Rd 的含量[J]. 山西医科大学学报,2008,39(12):1095.
[8] 徐丽,张敏,陈文芳. 人参皂苷 Rg₁ 对多巴胺能神经元的保护作用及 ICH182,780 的阻断作用[J]. 山西医科大学学报,2007,38(8):677.
[9] 刘纯青,马涛. 人参皂苷 Re 对 MPTP 致帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元的保护作用[J]. 沈阳药科大学学报,2005,22(1):35.
[10] 徐丽,刘黎星,陈文芳. 人参皂苷 Rg₁ 对 PD 模型大鼠纹状体多巴胺含量的影响及其机制探讨[J]. 中国中药杂志,2008,33(15):1856.

北细辛不同提取物中总马兜铃酸的含量测定

于艳¹,修丽丽²,魏新智¹,孙科峰^{1*}

(1. 辽宁中医药大学附属医院,沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学,辽宁 大连 116600)

〔摘要〕 目的:测定北细辛不同提取物中总马兜铃酸的含量,为其临床应用提供实验依据。方法:以水、乙酸乙酯、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇提取北细辛药材,以马兜铃酸 A 为对照,采用紫外分光光度法,检测波长为 390 nm。结果:马兜铃酸 A 含量在 3.0 ~ 30.0 mg·L⁻¹与吸收度呈良好线性关系, $Y = 19.844X + 0.0272$ ($r = 0.9996$),平均回收率为 98.51%,RSD 1.32%。北细辛不同提取物中总马兜铃酸的含量为 1.34% ~ 3.15%,以水提取物含量最低,95%乙醇提取物含量最高。结论:方法测定结果准确可靠,重复性好,可用于北细辛提取物中总马兜铃酸的含量测定。

〔关键词〕 北细辛; 提取物; 总马兜铃酸; 紫外分光光度法

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0141-03

Determination of Total Aristolochic Acid
in Different Extracts of *Asarum heterotropoides*

YU Yan¹, XIU Li-li², WEI Xin-zhi¹, SUN Ke-feng^{1*}

(1. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;
2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

〔Abstract〕 Objective: To determine the content of total aristolochic acid in different extracts of *Asarum*

〔收稿日期〕 20120607(011)
〔第一作者〕 于艳,硕士,主管中药师,从事中药制剂分析和中药新药研发, Tel:18909816763, E-mail: yuyangirl@yahoo.com.cn.
〔通讯作者〕 *孙科峰,博士,主任医师,从事中药复方配伍规律及中药药效组分筛选评价研究。

[11] 宋志斌,朱成琳,师方园,等. 人参皂苷 Re 体外抗氧化能力及其对血清剥夺神经细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):225.

[12] 高莹,杨积武,王艳春,等. 人参皂苷 Re 对大鼠心肌缺血再灌注细胞凋亡及 Caspase-3 的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(2):123.

[13] 蔡宝昌,秦昆明,吴皓,等. 中药炮制过程化学机理研究[J]. 化学进展,2012,24(4):637.

[14] 曾庆荣,刘放,张振坤. 从人参茎叶中提取人参皂苷的研究[J]. 化工时刊,2009,23(6):26.

[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:8.

[16] 张兆旺. 中药药剂学[M]. 2 版,北京:中国中医药出版社,2007:454.

[17] 王芳. 初均速法预测人参茎叶皂苷的稳定性[J]. 中国现代应用药学杂志,2007,24(3):217.

[18] 林美好,刘海宇,刘金平,等. 人参皂苷的化学研究进展[J]. 人参研究,2011,4:43.

[19] 郭娜. 人参皂苷的化学研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2005:10.

[20] 郑志忠,明艳林. 人参皂苷体内代谢及其产物的生物活性[J]. 海峡药学,2012,24(1):9.

[21] 马晓宁,李巍,赵余庆;西洋参花蕾总皂苷水解产物中稀有抗肿瘤成分的化学研究//2009 年中国药学会暨第九届中国药师周论文集[C]. 长沙:中国药学会,2009-11-21.

[22] 马佳慧. 人参二醇制备新型人参皂苷元的化学研究[D]. 长春:吉林大学,2010:6.

[23] 陈木洲,刘延辉,黄姬,等. 酸碱度对人参皂苷提取率及其稳定性影响分析[J]. 中国实用医药,2011,20(6):146.

[24] 尹建元,孟勤,李巍,等. 人参皂苷酸降解物制备工艺及其应用,中国:CN101828712A[P],2010-09-15.

[25] 宋学洲,高文斌,郑毅男,等. 人参皂苷生物转化研究最新进展[J]. 人参研究,2012,1:34.

〔责任编辑 顾雪竹〕