

人参皂苷Rb₃对照品的制备研究*饶高雄¹,张维明¹,王梅²,范亚刚²,陈纪军³

(1.云南中医学院中药学院,云南昆明 650200;2.云南省药品检验所,云南昆明 650011;

3.中国科学院昆明植物研究所,云南昆明 650204)

摘要:目的:以三七叶为原料,研究人参皂苷Rb₃对照品的制备与分析技术。方法:通过色谱方法分离三七叶中人参皂苷Rb₃,用光谱方法鉴定结构,并用TLC、HPLC方法检查纯度和标定含量。结果:人参皂苷Rb₃对照品经TLC检查无杂质斑点,二维及三维HPLC检查为单一成分,峰纯度因数999.60,含量为99.84%。结论:人参皂苷Rb₃对照品达到中药质量标准用化学对照品技术要求,已列入《中国药典》2005年版。

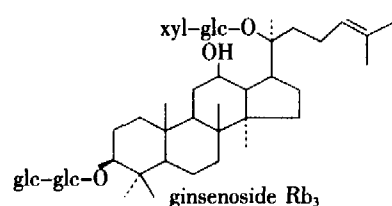
关键词:人参皂苷Rb₃;对照品;制备方法;三七叶;七叶神安片

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1000-2723(2006)02-0008-03

人参皂苷Rb₃(ginsenoside Rb₃)是三七叶的主要化学成分之一,属原人参二醇型三萜皂苷。对三七叶药材,以三七叶为原料制成的中药制剂、功能食品等,人参皂苷Rb₃是质量控制的标志性成分。三七叶含有人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rb₃等性质类似的皂苷成分,制备含量达98%以上的人参皂苷Rb₃对照品是比较困难的。在三七叶制剂“七叶神安片”载入《中国药典》2005年版的技术基础工作中,我们成功建立了人



参皂苷Rb₃对照品的制备方法,为制定“三七叶总皂苷”和“七叶神安片”中人参皂苷Rb₃含量测定项目打下了

了基础,现将其系统的制备和检查方法报道如下。

1 仪器与材料

1.1 仪器

熔点用Yanaco显微熔点仪测定,温度未校正;旋光用Jasco-20C旋光仪测定;IR用Bio-RadFTS-135红外光谱仪测定,KBr压片;UV用ShimadzuUV-2401紫外光谱仪测定;MS用VGAuto Spec-3000质谱仪测定,负离子FAB。NMR用Bruker AM-400核磁共振仪测定,TMS为内标。HPLC分析用Waters 1525液相色

谱仪(配2487紫外检测器和2996二极管阵列检测器);色谱柱用C₁₈烷基键合硅胶柱(MerckC₁₈4.6×150mm,依利特C₁₈4.6×150mm)。

1.2 材料

三七叶采于云南文山三七GAP种植基地,晒干备用。分离用D₁₀₁吸附树脂为天津农药集团树脂厂产品;硅胶及硅胶G薄层板为青岛海洋化工厂产品;反相硅胶Rp-18及Rp-18薄层板为Merck公司产品;葡聚糖凝胶LH-20为Pharmacia公司产品。活性炭、氯仿、甲醇、乙醇等试剂用普通化学纯或分析纯试剂。HPLC分析用色谱纯溶剂。

2 提取分离

2.1 提取

三七干叶10kg切碎,用水煮提二次,每次加8倍量水,煮提2h。合并煮提液,减压浓缩至10L,放置过夜后离心分离药液。药液加入5倍量95%乙醇混匀,静置过夜,滤过,减压回收溶剂得浸膏1200g。

取D₁₀₁吸附树脂10kg装柱(Φ25cm×220cm),先用95%乙醇预洗至流出液检查无残留,再用纯化水洗净柱子备用。取三七叶浸膏加入2400ml水搅散,加到处理好的树脂柱上使皂苷吸附完全。树脂柱以纯化水洗脱至流出液近无色,再用50%乙醇洗脱皂苷,减压回收溶剂得粗皂苷约500g。粗皂苷溶于5L甲醇中,加入粉末活性炭50g回流1h脱色,趁热过滤,回收

* 基金项目:云南省中青年学术和技术带头人培养基金资助

收稿日期:2005-10-25

修回日期:2006-02-22

作者简介:饶高雄(1965~),男,贵州人,教授,主要从事中药化学成分及中药质量控制技术研究。

溶剂后得到三七叶总皂苷(约400g)。

2.2 分离

三七叶总皂苷100g溶解于甲醇中,吸附于300g硅胶上,晾干后以3 000g硅胶柱色谱分离,用氯仿-甲醇-水溶剂系统梯度洗脱(100:10:0.5~50:50:5),各流份以薄层色谱检查合并,得到以人参皂苷Rb₃为主的部位21g。

此部位以Rp-18柱色谱分离,用甲醇-水溶剂系统梯度洗脱(5:5~7:3),流份经Rp-18薄层色谱检查合并,得到人参皂苷Rb₃粗品11g。粗品再以RP-18中压柱色谱分离,以甲醇-水溶剂系统洗脱(6:4),流份经Rp-18薄层色谱检查合并,得到人参皂苷Rb₃约5g。

经Rp-18色谱分离的人参皂苷Rb₃,再用葡聚糖凝胶LH-20色谱纯化,以甲醇洗脱,流份经HPLC检测,收集含量大于98.5%的部分,即得人参皂苷Rb₃对照品2.1g。

3 结构鉴定

本品为白色粉末,味苦。易溶于水和甲醇、乙醇,不溶于乙酸乙酯和氯仿等有机溶剂。取本品5mg置试管中,加10mL水溶解,剧烈震荡,产生大量持久性的泡沫。取本品1mg溶于乙酸酐,滴加浓硫酸-乙酸酐(1:20)溶液,产生颜色变化,由黄色逐渐变为红色、紫红色,长时间放置后,逐渐褪色。

熔点 191~194℃。旋光 $[\alpha]_D^{25} +8.25$ (c0.11, CH₃OH)。元素分析 C (58.53%), H (8.34%), O (33.12%) [计算值 C (59.00%), H (8.41%), O (32.65%)]。

IRv (KBr)cm⁻¹: 3419 (vs, OH), 2882 (s, C-H), 1634 (s, C=C), 1039 (vs, C-O); 有强的OH、C-O、C-H吸收,无芳环信号,提示为萜类配糖体成分。UVλ (CH₃OH)nm: 202.5 (4390), 只有末端吸收,说明没有芳环和共扼系统。FAB MS m/z: 1077 [M-1]⁻, 946 [M-1-132]⁻, 915 [M-1-162]⁻, 783 [M-1-132-162]⁻; 其中m/z 1077为失去H原子的准分子离子峰,对应分子式为C₅₃H₉₀O₂₂,而m/z 946、915为二个糖链分别失去末端五碳糖(木糖)、六碳糖(葡萄糖)的碎片信号。¹H NMR和¹³C NMR(C₅D₅N)数据和文献报道^[3]一致。

通过理化性质的研究对比,光谱测定数据分析,其结构确证为人参皂苷Rb₃。

4 人参皂苷Rb₃的纯度考察及含量标定

4.1 薄层色谱(TLC)

取本品溶于甲醇制成1mg/ml的溶液。定量吸取点于硅胶G薄层板上,考察显色情况。结果表明点样量0.5~1μg斑点即非常明显,可确定薄层色谱的常规点样量为1μg即可。硅胶G薄层板分别以A: CHCl₃-CH₃OH-H₂O(6.5:3.5:1, 下层)、B: n-BuOH-EtOAc-H₂O(4:1:5, 上层)、C: CHCl₃-EtOAc-CH₃OH-H₂O(15:40:25:10, 下层)三种溶剂系统展开,色谱晾干后喷10%H₂SO₄-EtOH显色,于105℃加热至斑点清晰。结果表明,本品以各溶剂系统展开的色谱均为单一斑点,点样量增至12μg也未见其它杂质斑点(图1)。

4.2 高效液相色谱(HPLC)

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;乙腈-水(25:75)为流动相,流速1ml/min;柱温30℃;二维谱检测波长203nm,理论塔板数按照人参皂苷Rb₃峰计算应不低于30 000;三维谱用二极管阵列检测器作200nm~400nm波长扫描。

取人参皂苷Rb₃对照品适量,用流动相溶解制成含量约为1mg/ml的储备液,使用时按需要用流动相稀释。吸取供试品液适量,注入液相色谱仪测定,结果表明:

(1) 二维谱中,人参皂苷Rb₃峰保留时间约20min,信号采集至120min无杂质峰出现,最低检出限0.012μg(S/N≥3)。按照面积归一化计算,含量为99.84%(图2)。

(2) 三维谱中,人参皂苷Rb₃峰保留时间约20min,信号采集至120min无杂质峰出现,人参皂苷Rb₃峰纯度因数为999.60(图3)。

上述薄层色谱(TLC)、高效液相色谱(HPLC)方法检查、测定的结果证明,所制备的人参皂苷Rb₃对照品为单体化合物,纯度大于98%,符合中药质量标准用化学对照品(含量测定用)的技术要求。

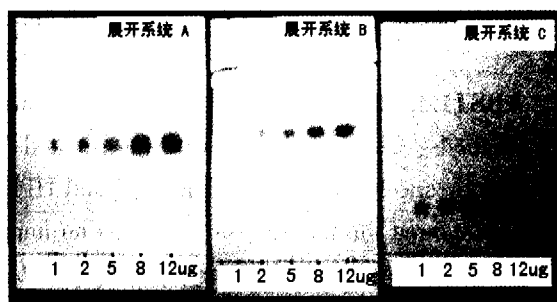
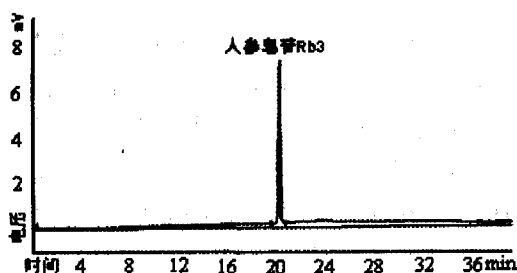
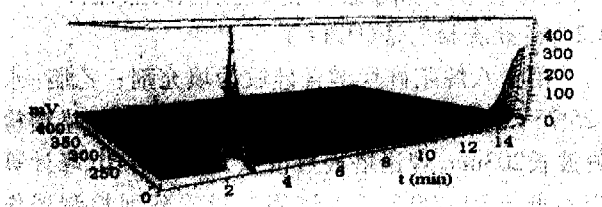


图 1 人参皂苷 Rb₃ 的 TLC 图谱

图2 人参皂苷 Rb₃ 的二维 HPLC 图谱图3 人参皂苷 Rb₃ 的三维 HPLC 图谱

5 人参皂苷Rb₃的稳定性考查

将人参皂苷Rb₃对照品按20mg/瓶分装于棕色样品瓶中,密封。置于温度40℃、相对湿度75%的药品稳定性试验箱内进行加速试验,于0,1,2,3,6个月取样进行TLC、HPLC检查。结果证明,人参皂苷Rb₃对照品性质稳定,TLC无杂质斑点,HPLC分析无杂质峰出现,含量未下降。加速试验的结果提示本品至少可以在棕色样品瓶密封情况下保存2年以上。

6 结果与讨论

针对中药所含有效成分或标志性成分,建立比

较客观的鉴别和含量测定指标,提高和完善中药质量标准,是中药现代化的主要标志之一。在此过程中,很多质量分析工作经常受制于缺乏化学成分对照品,因此,研究中药质量标准用化学对照品的制备分析方法,是对中药现代化具有重大意义的应用基础研究。

我们对人参皂苷 Rb₃ 的研究,成功建立了人参皂苷 Rb₃ 对照品的制备方法,并为药品检验机构、生产厂家进行该品种的质量研究提供了合格的对照品。作为三七叶制剂“七叶神安片”载入《中国药典》2005年版技术基础工作的一部分,人参皂苷 Rb₃ 成为法定对照品,对“七叶神安片”最终能载入《中国药典》2005年版提供了强有力的支撑。

三七是云南特产中药材,已经能够形成很大的产业,但三七叶相关产品不多,其资源利用率还很低。人参皂苷 Rb₃ 对照品研究成功并收入药典,对以三七叶研发药品、食品等,提供了质量控制的研究基础,将会对三七产业的发展产生积极的促进作用。

[参考文献]

- [1]魏均娟,杜元冲.三七-现代科学研究及应用[M].昆明:云南科技出版社,1996.115.
- [2]国家药典委员会.中华人民共和国药典(2005年版一部)[M].北京:化学工业出版社,2005.303.
- [3]Tsong-ren Yang, Ryoji Kasai,Jun Zhou and Osamu Tanaka. Dammarane Saponiins of Leaves and Seeds of Panax Notoginseng [J].Phytochemistry,1983, 22 (6): 1473-1478.

(编辑:迟越)

Studies on Preparation of Standard Substance Ginsenoside Rb₃

RAO Gao-xiong¹, ZHANG Wei-ming¹, WANG Mei², FAN Ya-gang², CHEN Ji-jun³

(1. Yunnan College of TCM, Kunming Yunnan 650200; 2. Yunnan Bureau of Medicine Test, Kunming Yunnan 650011; 3. Kunming Institute of Botany, Kunming Yunnan 650204)

ABSTRACT: Objective: To study the preparation and analysis technique of standard substance ginsenoside Rb₃. Methods: The ginsenoside Rb₃ was isolated from Panax leave by chromatographer, and its structure was identified by spectrum analysis. The TLC and HPLC were employed for inspection its purity and content. Results: The TLC showed the ginsenoside Rb₃ has no impurity spot. Two-dimension and Three-dimension HPLC indicated that it's a single peak with the purity factor 999.60, and its content was 99.84%. Conclusion: The ginsenoside Rb₃ has been gathered as a standard substance by the Chinese pharmacopoeia 2005 edition.

KEY WORDS: Ginsenoside Rb₃; Standard Substance; Preparation; Panax leave; Qiye-Shenan Tablet