

西洋参总皂苷的分离纯化工艺

韩婧,冯丽君,闫磊,林龙飞,倪健*
(北京中医药大学药学院,北京 100102)

[摘要] 目的:研究大孔吸附树脂法纯化西洋参总皂苷的工艺条件及参数。方法:以西洋参总皂苷含量为指标,考察上样液质量浓度、洗脱溶媒及其用量、除杂溶媒及其用量等条件,优选大孔树脂纯化工艺条件。结果:西洋参总皂苷最佳纯化工艺为 0.8 BV 上样液(0.5 g·mL⁻¹)通过 HPD-300 大孔树脂,4 BV 水洗,3 BV 10% 乙醇洗脱,5 BV 70% 乙醇洗脱,收集 70% 乙醇洗脱液,以人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Re 计总皂苷纯度为 50.83%。结论:采用该优选方法可较好地分离、纯化西洋参总皂苷。

[关键词] 大孔吸附树脂;西洋参;总皂苷;分离纯化
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)10-0066-03

Separation and Purification Technology of
Total Saponins from *Panax quinquefolium* by Macroporous Resin

HAN Jing, FENG Li-jun, YAN Lei, LIN Long-fei, NI Jian*
(College of Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology parameters of total saponins from *Panax quinquefolium* by macroporous resin. **Method:** With the content of total saponins as index, purification technology was optimized by investigating the concentration of sample liquid, elution solvent and the amount of it, impurity solvent and the amount of it, et al. **Result:** Optimum purification technology was: 0.8 BV sample liquid (0.5 g·mL⁻¹) passed HPD-300 resin, eluted by 4 BV water and 3 BV 10% ethanol, eluted by 5 BV 70% ethanol, collected eluate, purity of total saponins was up to 50.83% (sum of ginseng saponin Rg₁, ginseng saponin Rb₁ and ginseng saponin Re). **Conclusion:** This method had a better separation and purification capacity for total saponins for *Panax quinquefolium*.

[Key words] macroporous resin; *Panax quinquefolium*; total saponins; separation and purification

西洋参为五加科植物西洋参的干燥根,具有补气养阴、清热生津之功效,原产于美国、加拿大^[1-2],主要用于气热烦倦、咳嗽痰血、内热消渴、口燥咽干^[3]等。目前,已在西洋参中鉴定和发现了多种皂苷类成分,其中人参皂苷 Rb₁ 含量是人参中的 2~3 倍^[4]。目前,多采用大孔树脂法分离、纯化西洋参总皂苷^[5]。但工艺参数和条件多不明确。本试验旨在研究大孔树脂纯化西洋参总皂苷的工艺条件,

并进行优化,从而富集得到人参皂苷 Rb₁ 等皂苷类成分。

1 材料

TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用一起有限责任公司),玻璃柱(1.5 cm×30 cm),HPD-300 型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司)。人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re 等对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110703-200424,110704-200921,110754-200822),西洋参药材(北京同仁堂饮片厂,批号 00280198)经北京中医药大学刘春生教授鉴定为五加科植物 *Panax quinque folium* L. 的干燥根。高氯酸、冰醋酸、香草醛均为分析纯。

[收稿日期] 20111123(004)
[第一作者] 韩婧,硕士,Tel: 13466312450, E-mail: sherryjing1110@163.com
[通讯作者] *倪健,博士,教授,从事中药制药研究,Tel:010-84738607, E-mail:njtem@263.net

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 标准曲线的制备 精密称取干燥至恒重的人参皂苷 Re 对照品 3 mg,加甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,摇匀。分别精密吸取上述溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 mL 于具塞试管中,置水浴上挥干溶剂,加入新配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,在 65 ℃ 水浴中加热 20 min,立即置冰水中冷却 15 min,加入冰醋酸 5.0 mL 摇匀,相应试剂随行空白对照,在 554 nm 波长处测定吸收度(A),以 A 为纵坐标,人参皂苷 Re 质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A = 0.0055C - 0.0331$ ($r = 0.9979$)。结果表明人参皂苷 Re 取样量在 12 ~ 240 μg 线性关系良好。

2.1.2 显色稳定性 对照品溶液显色后,每间隔 1 min 测定其 A 。结果放置 20 min 后其 A 相对稳定, RSD 1.83%。

2.1.3 重复性试验 取样品溶液 1 份,按含量测定方法平行测定 6 次,结果 RSD 2.28%,表明重复性良好。

2.1.4 回收率试验 取同一批号西洋参适量,分别称定样品 6 份,每份 0.2 g,精密称定。精密加入人参皂苷 Re 对照品 0.01 g,按含量测定方法测定西洋参总皂苷含量,计算回收率。结果 RSD 0.26%,平均回收率 96.56%,表明回收率良好。

2.2 样品测定 吸取西洋参洗脱液一定量,水浴挥干,照标准曲线制备项下方法自“加入新配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL”起,依法测定 A ,按回归方程计算,即得。

2.3 上柱液的制备 称取西洋参饮片,加 6 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,过滤,合并滤液,减压回收乙醇并浓缩至含生药 0.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,作为上柱供试液。

2.4 树脂型号的选择^[6-7] 选取 3 种型号大孔吸附树脂,即 HPD-300, D101, AB-8。取 3 种处理好的大孔吸附树脂各 5 mL,置具塞锥形瓶中,精密加入西洋参上柱液 30 mL (0.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),振摇,放置 24 h,抽滤,用 50 mL 蒸馏水洗涤树脂,合并抽滤液及水洗液定容于 100 mL 量瓶中,摇匀,紫外测定法测定西洋参总皂苷含量,计算比吸附量分别为 13.75, 12.99, 12.20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

取上述水洗后的大孔吸附树脂,加 95% 乙醇 50 mL 浸泡 24 h,抽滤,并用 95% 乙醇 50 mL 洗涤树脂,合并乙醇液,定容于 100 mL 量瓶中,摇匀,

紫外测定法测定西洋参总皂苷含量,计算解吸率分别为 64.64%, 36.86%, 62.21%。结果表明,3 种大孔吸附树脂对西洋参总皂苷均有一定的吸附能力,各种树脂对皂苷的吸附不同点主要体现在吸附量大小和解吸附能力强弱上。综合比较发现,HPD-300 型大孔吸附树脂性能最佳。故本试验选择采用 HPD-300 型大孔吸附树脂来进一步纯化西洋参总皂苷。

2.5 上柱液浓度考察 分别取含生药量 0.25, 0.5, 1.0 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的上柱液 20, 10, 5 mL, 分别过 10 mL HPD-300 大孔吸附树脂柱,以 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速进行动态吸附,水洗除杂质至 Molish 反应呈阴性,5 BV 95% 乙醇洗脱,洗脱流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集乙醇洗脱液,测定西洋参总皂苷含量分别为 127.36, 137.36, 121.00 mg; 计算转移率分别为 51.48%, 55.52%, 48.91%; 总皂苷纯度依次为 64.49%, 69.55%, 74.28%。由结果可知,上样液质量浓度为 0.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,转移率与总皂苷纯度均较高。

2.6 上样量考察 取已处理好的 HPD-300 大孔吸附树脂 10 mL,装柱,吸取西洋参样品液过柱,控制吸附流速 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 左右,分段接收吸附后流出液,测定总皂苷含量,以上样量(X)和总皂苷泄漏量(Y)为坐标绘制泄漏曲线,见图 1。由图 1 可知,在第 5 份样品处明显突跃,即上样量为 0.8 BV 时有明显泄漏,说明样品液最大上样量为 0.8 BV。

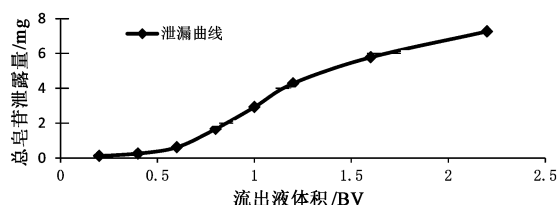


图1 西洋参样品液泄露曲线

2.7 水洗体积的考察 分别吸取 0.8 BV 西洋参上柱液,上 2 根相同 HPD-300 树脂柱(树脂量 10 mL),蒸馏水洗脱,洗除糖等杂质至 Molish 反应呈阴性。结果水洗至 4 BV 时,清洗液接近无色, Molish 反应呈阴性,故确定水洗体积为 4 BV。

2.8 乙醇体积分数及体积的考察 分别吸取 0.8 BV 西洋参上柱液以 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速上 3 根相同 HPD-300 树脂柱(树脂量 10 mL),4 BV 水洗,依次用体积分数 50%, 60%, 70% 的乙醇各 16 BV 梯度洗脱,洗脱速度 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集洗脱液,每 1 BV 收集 1 份,收集 8 份后,以 2 BV 收集 1 份,收集 4 份,分别编号 1 ~ 12,紫外分光法测定各部分洗脱液

中总皂苷含量分别为 204.27, 240.48, 268.26 mg, 绘制洗脱曲线, 计算转移率分别为 41.05%, 48.33%, 54.86%; 总西洋参皂苷纯度分别为 79.17%, 85.76%, 91.57%。解析曲线见图 2, 结果表明 50%乙醇, 60%乙醇洗脱曲线峰较钝, 均存在拖尾现象, 且转移率不高; 70%乙醇解吸曲线峰尖锐, 无拖尾现象, 转移率较高, 故选择 70%乙醇作为洗脱溶剂。70%乙醇洗至 5 BV 后, 西洋参总皂苷被洗脱下的量已经极少, 故洗脱体积确定为 5 BV。

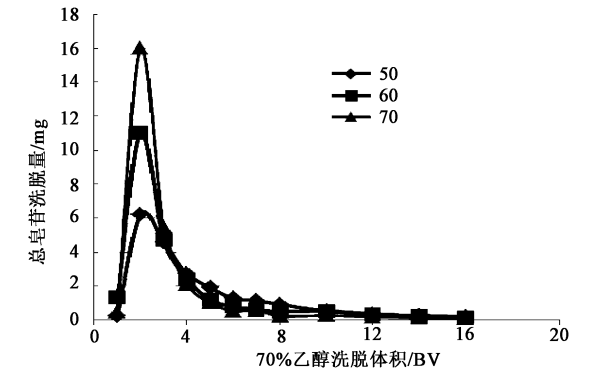


图 2 总西洋参皂苷洗脱曲线

2.9 除杂醇体积分数及体积的确定 按上述试验条件, 分别吸取 0.8 BV 西洋参上柱液上柱, 4 BV 水洗, 依次用 10% 乙醇, 20% 乙醇洗脱至流出液颜色明显变浅, 收集各部分洗脱液, 紫外分光法测定各部分洗脱液中总皂苷含量, 并计算转移率及西洋参总皂苷纯度, 结果见表 1。由表 1 可知, 10% 乙醇, 20% 乙醇洗脱, 当洗至 3 BV 时流出液颜色明显变浅, 故选择乙醇除杂洗脱体积为 3 BV。选择 20% 乙醇作为除杂溶剂时, 西洋参总皂苷会有一定量的泄漏, 而出膏量未显著上升; 为了达到既有除杂效果又避免总皂苷损失的效果, 选择 10% 乙醇作为除杂溶剂。

表 1 除杂醇体积分数及体积的考察

乙醇体积 分数/%	洗脱流份 /BV	总皂苷洗 脱量/mg	总皂苷泄 漏量/mg	总皂苷泄漏 量均值/mg	出膏量 /g
10	1	0.21	0.51	0.17	0.025
	2	0.19			
	3	0.11			
20	1	0.34	1.11	0.37	0.031
	2	0.51			
	3	0.25			

2.10 验证试验 按优选工艺条件进行实验, 按《中国药典》中西洋参“含量测定”项下方法测得, 计算总皂苷的平均转移率为 50.30%, RSD 1.82%; 提取物平均纯度(以人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Re 计)为 50.83%, RSD 0.19%; 总皂苷平均

含量为 214.58 mg, RSD 1.83%。说明优选的树脂分离、纯化工艺条件合理、可行、稳定。

3 讨论

皂苷为西洋参中主要的成分, 所含人参皂苷 Rb₁ 含量是人参中的 2~3 倍^[4], 实验表明人参皂苷 Rb₁ 具有治疗抑郁症、老年痴呆症等作用^[8]。本试验通过利用大孔吸附树脂对西洋参进行纯化, 所得西洋参提取物中人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Re 三者的含量达到了 50.83%, 为其进一步分离和纯化奠定基础。

目前应用大孔吸附树脂法分离、纯化皂苷类成分的报道较多^[9], 有关人参皂苷的现代药理学研究也充分证明人参皂苷的药用价值^[10]。但有效分离、纯化西洋参总皂苷的研究报道尚不多见。本试验系统研究了应用大孔吸附树脂分离、纯化皂苷的相关工艺参数, 为进一步深入研究西洋参皂苷奠定基础。

[参考文献]

[1] Shibata S, Tanaka O, Soma K, et al. Studies on saponins and sapogenins of ginseng [J]. Tetrahedron Letters, 1965, 11 (3) : 207.

[2] Kasai R, Tanaka O, Chen S E. Futher study on dammarane-saponins of leaves and stems of American Ginseng Panax quinquefolium [J]. Planta Medica, 1981, 42 (4) : 406.

[3] 刘玉梅, 张军, 匙峰, 等. 参元片的提取工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (10) : 18.

[4] 曲文华. 西洋参皂苷 Rb₁ 分离、纯化工艺的研究 [J]. 吉林中医药, 2006, 26 (7) : 51.

[5] 刘继华, 朱涛, 卢丹, 等. 利用大孔吸附树脂提取西洋参果肉总皂苷 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2004, 30 (5) : 819.

[6] 刘中秋, 蔡雄, 赖小平, 等. 大孔吸附树脂富集纯化三七总皂苷工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7 (3) : 4.

[7] 王光忠, 张明, 葛如斌, 等. 大孔树脂纯化盾叶薯蓣总皂苷的工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (5) : 25.

[8] 张均田. 人参皂甙 Rg₁ 和 Rb₁ 药理作用的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 5 (20) : 5.

[9] 刘瑞源, 钟平, 戴开金. 大孔吸附树脂提取中草药有效成分的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15 (6) : 3.

[10] 窦德强, 勒玲, 陈英杰. 人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望 [J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16 (2) : 511.

[责任编辑 仝燕]