

西洋参茎叶总皂苷中分离纯化拟人参皂苷 F₁₁ 工艺

田旭,任媛媛,李平亚,王翠竹,刘金平*
(吉林大学再生医学科学研究所,长春 130021)

[摘要] 目的:优选从西洋参茎叶总皂苷中分离纯化拟人参皂苷 F₁₁ 的最佳工艺。方法:以拟人参皂苷 F₁₁ (PF₁₁) 提取率为指标,建立 HPLC-ELSD 检测 PF₁₁ 的方法,并优选 AB-8 大孔吸附树脂纯化西洋参茎叶总皂苷中 PF₁₁ 的工艺。结果:最佳工艺为西洋参茎叶总皂苷过 10 倍量 AB-8 大孔吸附树脂柱,流速 5 mL·min⁻¹,依次用 7.5 BV 30%~33% 乙醇,8 BV 35%~40% 乙醇进行洗脱,收集 35%~40% 乙醇洗脱液,回收乙醇,蒸干,得 PF₁₁ 粗品纯度 >50.0%。结论:大孔吸附树脂分离拟人参皂苷 F₁₁ 方法简单、快速、可行。

[关键词] 拟人参皂苷 F₁₁; 大孔吸附树脂; 分离纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0024-03

Separation and Purification Technology of Pseudo-ginsenoside F₁₁ from Total Saponins in Leaves and Stems of *Panax quinquefolium*

TIAN Xu, REN Yuan-yuan, LI Ping-ya, WANG Cui-zhu, LIU Jin-ping*

(Research Institute of Regenerative Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize optimum separation and purification technology of pseudo-ginsenoside F₁₁ from total saponins in leaves and stems of *Panax quinquefolium*. **Method:** PF₁₁ was determined by HPLC-ELSD with yield of PF₁₁ as index, and AB-8 type macroporous adsorption resin was chosen to purify PF₁₁ from total saponins in leaves and stems of *P. quinquefolium*. **Result:** Optimum technology was: total saponins in leaves and stems of *P. quinquefolium* passed 10 times the amount of AB-8 macroporous adsorption resin with flow rate 5 mL·min⁻¹, eluted with 7.5 BV 30% ethanol-33% ethanol, discard eluate, then eluted with 8 BV 35% ethanol-40% ethanol, collected eluate, recovered ethanol, evaporated, purity of pseudo-ginsenoside F₁₁ was more than 50%. **Conclusion:** This method of PF₁₁ was separated by macroporous adsorption resin was simple, rapid and feasible.

[Key words] pseudo-ginsenoside F₁₁; macroporous adsorption resin; separation and purification

[收稿日期] 20110625(005)

[基金项目] 吉林省科技厅重大项目(20096039)

[第一作者] 田旭,在读硕士,从事天然药物化学成分及其生物活性的研究,Tel:13194361009,E-mail:tianxu09@mails.jlu.edu.cn

[通讯作者] *刘金平,博士后,副教授,从事药物化学研究,Tel:0431-85619803,E-mail:liujp@jlu.edu.cn

- [2] Jung H Kim, Sang L L, Young B H, et al. Isolation of isoguanosine from *Croton tiglium* and its antitumor activity [J]. Arch Pharm Res, 1994, 17(2):115.
- [3] 陈武, 陈鹏英, 刘鹏, 等. 巴豆生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(7):1450.
- [4] 王明艳, 瞿融, 许冬青. 巴豆生物碱诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):119.
- [5] Liebich H M, Lehmann R, Stefano C D, et al. Analysis of traditional Chinese anticancer drugs by capillary electrophoresis [J]. J Chromatography A, 1998, 795(2):388.
- [6] 凌云, 赵红玉, 潘兴亮, 等. 高效液相色谱法测定巴豆中巴豆苷的含量[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(11):1057.

[责任编辑 全燕]

拟人参皂苷 F₁₁ (PF₁₁)为奥克梯隆型人参皂苷,属四环三萜类皂苷。是西洋参区别于人参的特征成分^[1]。PF₁₁存在于西洋参的各位部位,尤其在西洋参的茎叶中含量较高(约6%~8%),具有镇痛^[2]、改善记忆获得障碍^[3]、钙通道激活作用^[4]等生物活性。本文以PF₁₁的提取率为指标,以大孔吸附树脂为分离手段进行快速分离工艺的筛选。

1 仪器与试剂

SHIMADAZU LC-10AT 型高效液相色谱仪(SEDEX 75 型蒸发光散射检测器,日本岛津),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,PF₁₁对照品(自制,含量>99.0%,批号101028),AB-8大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂),西洋参茎叶总皂苷(吉林省靖宇第一参厂,批号20101028)。

2 方法与结果

2.1 PF₁₁含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 Diamonsil(钻石)C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,迪马公司),流动相甲醇-水(71:29),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温室温,流速1.0 mL·min⁻¹,理论板数以PF₁₁计算不小于3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 取PF₁₁对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL约含0.7 mg的溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取分离得到的PF₁₁粗品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL约含1.0 mg的溶液。

2.1.4 专属性试验 采用PF₁₁粗品和破坏性试验(酸、碱水解),得到含有杂质和降解产物的试样,进行测定。

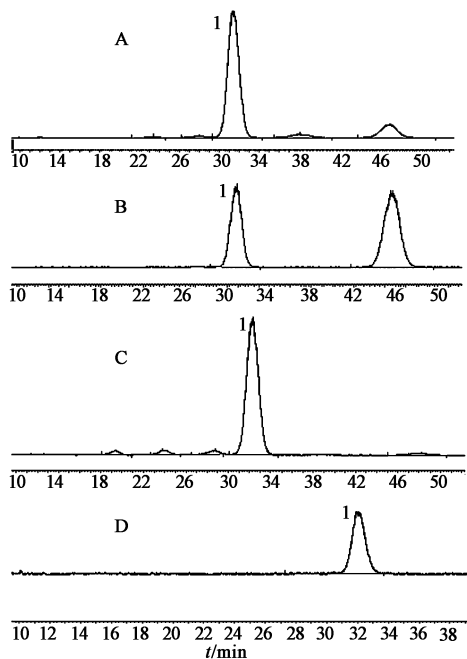
供试品溶液1(PF₁₁粗品)的制备 取PF₁₁粗品适量,加甲醇制成每1 mL约含2 mg的溶液。

供试品溶液2(酸水解产物)的制备 取供试品溶液1,加入1% HCl 80℃水浴加热回流1 h,冷却,即得。

供试品溶液3(碱水解产物)的制备 取供试品溶液1,加入5% NaOH,80℃水浴加热回流1 h,冷却,即得。

取供试品溶液1,2,3各20 μL,进样,记录色谱图。结果表明各杂质与PF₁₁均基线分离并检出。说明本测定方法可以正确的测定出PF₁₁,专属性良好。见图1。

2.1.5 线性关系考察 精密量取PF₁₁对照品溶液(0.644 g·L⁻¹)2,4,6,8,10,12,14 μL进样。以对照品峰面积的对数为纵坐标,对照品进样量对数为



A. 样品; B. PF₁₁ 酸水解产物; C. PF₁₁ 碱水解产物; D. 对照品; 1. PF₁₁

图1 PF₁₁粗品 HPLC

横坐标。回归方程为 $\lg A = 1.310 0C + 5.203 1$ ($r = 0.999 9$)。结果表明PF₁₁在1.288~9.016 μg呈良好的线性关系。

2.1.6 稳定性试验 精密量取供试品溶液各10 μL,于0,4,8,24 h分别测定PF₁₁的峰面积。结果RSD 0.91%,表明供试品溶液在24 h内保持稳定。

2.1.7 精密度试验 精密量取供试品溶液10 μL,重复测定6次。结果RSD 0.74%,表明在本测定条件下,精密度良好。

2.1.8 重复性试验 同一批样品,按正文方法独立测定6次。结果RSD 0.56%。表明重复性良好。

2.1.9 回收率试验 精密量取已知含量的供试品10 mg,准确加入PF₁₁对照品适量,按供试品溶液制备,依法测定,计算回收率,结果表明回收率良好。结果见表1。

2.2 大孔吸附树脂快速分离工艺筛选^[5-6]

2.2.1 上样量考察 取同一批号的西洋参茎叶总皂苷100 g,溶于1 000 mL水中,加至200 mL AB-8大孔吸附树脂柱上(径高比为1:10),监测流出液,如出现皂苷反应(皂苷反应:取洗脱液20 μL,点于硅胶G薄层板上,喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃加热显色。如显紫色,说明有皂苷),说明树脂已明显有皂苷泄漏。结果表明,流出液为400 mL时,即5倍量的树脂出现皂苷泄漏现象。为得证有效成分不损失,采用10倍量的树脂进行吸附。

表 1 PF₁₁ 加样回收率试验

No.	取样量 /mg	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	9.7	9.55	11.9	21.60	100.7	100.03	1.48
2	10.3	10.14	12.1	22.10	99.4		
3	9.4	9.26	12.5	21.75	100.0		
4	6.4	6.30	7.8	13.88	98.4		
5	5.6	5.52	8.1	14.00	102.8		
6	7.1	6.99	7.5	14.40	99.4		
7	4.3	4.24	4.2	8.38	99.3		
8	4.0	3.94	4.0	7.82	98.5		
9	3.9	3.84	3.9	7.88	101.8		

2.2.2 洗脱液速度考察 将 1 000 mL 的药液加于 1 000 mL AB-8 大孔吸附树脂柱, 分别按照 3, 5, 7 mL·min⁻¹ 的流速考察了对 PF₁₁ 的分离效果, 结果表明以 5 mL·min⁻¹ 流速洗脱, 能达到人参皂苷 Re 和 PF₁₁ 的完全分离。

2.2.3 上样溶液质量浓度考察 分别考察了以 50, 100, 150 g·L⁻¹ 3 种不同质量浓度的溶液上样。结果表明, 150 g·L⁻¹ 上样时易造成大孔吸附树脂堵塞, 且人参皂苷 Re 和 PF₁₁ 分不开。100 g·L⁻¹ 的上样时二者容易分开, 故采用 100 g·L⁻¹ 上样。

2.2.4 洗脱液的考察 取同一批号的西洋参茎叶总皂苷 100 g, 溶于 1 000 mL 水中, 加于 1 000 mL AB-8 大孔吸附树脂柱, 依次不同体积分数乙醇进行洗脱, 收集洗脱液, 回收乙醇, 蒸干, 得洗脱物。取各洗脱物适量, 加甲醇制成 1 g·L⁻¹ 的供试品溶液, 以 HPLC-ELSD 法检测 PF₁₁ 的含量, 计算从西洋参茎叶总皂苷 100 g 中分离 PF₁₁ 的产率, 结果见表 2。

表 2 不同体积分数乙醇对 PF₁₁ 分离的影响考察

乙醇体积 分数/%	洗脱物质量 /g	洗脱物中 PF ₁₁ 含量/%	PF ₁₁ 产率/%
25 ~ 30	2.8	-	-
30 ~ 33	4.5	4.4	0.2
35 ~ 40	14.2	50.2	7.1
40 ~ 45	12.6	2.4	0.3
45 ~ 50	8.2	-	-
80 ~ 85	36.7	-	-

注:“-”未检查。

由结果可知当乙醇体积分数为 35% ~ 40% 时得到的 PF₁₁ 量最多。故洗脱时先采用 30% 乙醇 ~ 33% 乙醇进行洗脱, 然后以 35% 乙醇 ~ 40% 乙醇进行洗脱, 得到 PF₁₁ 的粗品。

2.2.5 洗脱剂用量的确定 取西洋参茎叶总皂苷 100 g, 溶于 1 000 mL 水中, 加于 1 000 mL AB-8 大孔吸附树脂柱, 流速为 mL·min⁻¹, 依次以 30% 乙醇 ~ 33% 乙醇, 35% 乙醇 ~ 40% 乙醇进行洗脱, 收集洗脱液, TLC 检测, 30% 乙醇 ~ 33% 乙醇洗脱至无人参皂苷 Re 为止用量为 7 500 mL, 即 7.5 BV; 35% 乙醇 ~ 40% 乙醇进行洗脱至无 PF₁₁ 为止用量为 8 000 mL, 即 8 BV。

2.3 验证试验 按以上工艺条件, 进行 3 批试验验证, 结果提取物干浸膏中 PF₁₁ 质量分数分别为 51.1%, 50.2%, 52.3%。说明工艺稳定可行。

3 讨论

本文建立了 HPLC-ELSD 法测定 PF₁₁ 含量的方法, 结果表明该方法简便、准确、灵敏度高、重现性好, 可用于拟人参皂苷 PF₁₁ 的含量测定。PF₁₁ 是西洋参中的特征成分, 具有较好的生物活性, 传统的提取分离方法是采用硅胶柱色谱进行分离, 成本高、时间长、含量低。本文应用 AB-8 大孔吸附树脂为 PF₁₁ 的快速分离提供了新方法, 与传统的硅胶柱色谱法比较, 具有工艺简单, 快速, 产率高的优点。

[参考文献]

- [1] 刘淑芬, 王晓霞. 假人参皂甙 24(R)-F₁₁ 鉴别人参参与西洋参的显著标志[J]. 中草药, 1995, 26(10): 540.
- [2] Li Z, Wu C F, Pei G, et al. Antagonistic effect of pseudo ginsenoside-F₁₁ on the behavioral actions of morphine in mice[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 66(3): 595.
- [3] 李竹. 拟人参皂苷 F₁₁ 的中枢神经保护作用及其作用机理研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2000.
- [4] 陈霞, 杨世杰, 陈丽, 等. 西洋参茎叶皂苷及单体对心脏的作用[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(10): 617.
- [5] 刘继华, 卢丹, 刘金平, 等. 从人参果肉中提取人参皂苷 Re 的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(2): 14.
- [6] 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.

[责任编辑 仝燕]