

三萜皂苷定性定量分析方法研究进展

王晓颖¹,刘大有^{1*},夏忠庭¹,旋秀俊²

(1. 长春中医学院,吉林 长春 130021; 2. 吉林省中医院,吉林 长春 130021)

三萜皂苷分布于五加科、桔梗科、远志科、豆科、伞形科等植物中,许多中药如人参、柴胡、甘草等都含有三萜皂苷。经药理和临床证明,三萜皂苷具有免疫、防治心血管疾病、抗肿瘤等多方面的生物活性和药理作用。三萜皂苷由含有 30 个碳原子的皂苷元和各种糖、酸构成。由于构成三萜皂苷的糖的种类、数目和连接方式不同,使三萜皂苷的结构比较复杂。基于三萜皂苷基本骨架的通性和某些官能团的特性,可以进行定性定量分析,现将近年来文献报道的分析方法综述如下:

1 分析方法

1.1 比色法 (colorimetry): 在皂苷类成分的分析测定中,颜色反应仍占较为重要的地位。比色法就利用这些颜色反应对皂苷进行分析测定。这些颜色反应虽较灵敏,但专属性较差。用于三萜皂苷颜色反应的试剂有浓硫酸、香草醛-浓硫酸、香草醛-冰醋酸、香草醛-高氯酸等。李润平等^[1]采用硫酸-香草醛比色法,在 450 nm 处测定了商陆皂苷含量。高山林等^[2]利用香草醛-高氯酸试剂与罗汉果皂苷反应显色,然后进行比色,测定了大、中、小 3 种罗汉果中总皂苷含量。比色法常用于人参总皂苷的测定。显色剂主要有:香草醛-高氯酸-冰醋酸、香草醛-高氯酸-80% 磷酸、香草醛-70% 硫酸水溶液等。

1.2 分光光度法 (spectrophotometry): 分光光度法不仅能测定有色物质,还能精确测定有共轭等结构的无色物质,属于经典、成熟的方法。因其简便、灵敏、适应面广,常用于三萜皂苷的分析测定。吴洪兰等^[3]采用分光光度法以 5% 香草醛-冰醋酸溶液为显色剂,在 550 nm 最大吸收处测定了人参花蕾中总皂苷的含量。

近年来,分光光度法在分析测定三萜皂苷的方法上有了相当的进展,在上述常规的分光光度法之外,增添了导数光谱法、多波长光谱法、差示分光光度法、正交函数光度法等。

1.3 薄层色谱法 (TLC): 可以使某一成分与其他成分或杂质分离,排除干扰,从而进行定性或定量分析。由于其简便易行,并可以同时作多个样品点的平行分析,因此得到广泛的应用。近年来,单纯的 TLC 法仅用来定性分析,通过同板或异板 R_f 值来鉴定成分,古老的目视比较法等薄层定量方法已被薄层紫外分光光度法 (TLC-UV)、薄层扫描法 (TLCS) 取代。

TLC-UV 法将样品溶液点于硅胶板上,展开,斑点定位、挖取斑点、洗脱、定容,于最大波长处进行紫外分光光度

法定量分析。Vanhaelen-fastre 等^[4]用高效薄层 (HPTLC) 法分离了人参中的 6 种主要皂苷,用氯化亚硫酸显色,加热后在最大吸收波长 275 nm 处分别测定了其含量。

TLCS 法是定量分析中应用普遍、快速、准确的方法。其线性范围、精密性、重复性和加样回收等各项方法学研究方面均获良好的结果。TLCS 法在测定人参皂苷含量上有较多的应用^[5]。Lostante 等^[6]用 HPTLC 扫描法,以丙醇-乙酸乙酯-水 (3:5:4:5:2) 为展开剂,检测波长为 212 nm,对七叶皂苷进行了含量测定。

由一维 TLCS 法上发展起来的二维 TLCS 也应用于人参皂苷等的不同三萜皂苷的分析。

1.4 高效液相色谱法 (HPLC): HPLC 法的分离效能高、分析速度快及仪器化等特点正好适应中药成分的多样、复杂等特点,因而, HPLC 法在中药化学成分分析方面得到了迅速的发展和应用。

HPLC 法根据仪器所接检测器的不同,可分为:高效液相紫外分光光度 (HPLC-UV) 法、高效液相-蒸发光检测 (HPLC-ELSD) 法、高效液相-荧光检测 (HPLC-FD) 法等。

HPLC-UV 法应用较多。Yoshikawa 等^[7]以 HPLC 法测定了从欧马栗中提取的七叶皂苷 I a I b II a II b 4 个主要成分的含量,同时测定了日本马栗树的成分和组成。Kuwajima 等^[8]用 HPLC 法对不同甘草中甘草皂苷的含量以及加工前后甘草中化学成分变化进行了研究。

Samukawa 等^[9]用 Superpher Rp-C₁₈ 柱以 (a) CH₃CN-H₂O-0.1% H₃PO₄ (21:74:8); (b) CH₃CN 线性梯度洗脱分离测定了 22 种人参皂苷。许旭东等^[10]首次建立了总木属植物中 6 种化学成分的 RP-HPLC 法,用 Supelco SIL-LC-18 柱,以甲醇-4% 乙酸四氢呋喃 (500:110:1) 为流动相,于 205 nm 处对总木属 11 种植物中 2 种三萜皂苷进行了定量分析。

光电二极管阵列检测器是紫外检测器的一种,它同时可以得到定性、定量及色谱峰是否为单一组分的信息,是当前色谱新技术之一,现已逐渐应用于三萜皂苷等中药有效成分的分析^[11]。

对于一些没有紫外吸收的样品,通常用蒸发光散射检测器 (ELSD) 与 HPLC 联用检测含量。ELSD 灵敏度高,对流动相系统温度变化不敏感,可以梯度洗脱,与 UV 检测器相比扩大了 HPLC 的应用范围,消除杂质和流动相的紫外吸收

* 收稿日期: 2001-12-28

作者简介: 王晓颖 (1978-), 女, 吉林珲春人, 2000 年毕业于长春中医学院中药系, 获工学学士学位, 现为本院中药学硕士研究生, 主要从事中药有效成分及新药开发的研究。Tel (0431)5955911-6468 E-mail wangxy623@yeah.net

* 通讯作者

干扰,无需测定校正因子就可定量。Li等^[12]用该法对北美人参中伪人参皂苷F进行了检测。

HPLC与荧光检测器(FD)联用,可用来分析能产生荧光或其衍生物能发荧光的物质^[13]。

1.5 气相色谱法(GC):气相色谱法是以气体为流动相的一种色谱法,目前由于使用了高效能的色谱柱,高灵敏度的检测器和微机处理,使气相色谱成为一种分析速度快、灵敏度高、应用范围广的分析方法。近年来,GC与质谱、光谱等联用,为未知物的定性、定量分析开辟了一个广阔的前景。Lee等^[14]用GC等方法对从Sponge Melophylus isis中提取的新三萜皂苷成分进行了分析。Ohana等^[15]运用GC-MS和其它光谱法对豌豆*Pisum sativum* L.中的新的三萜皂苷成分进行了分析鉴定。

1.6 毛细管电泳法(CE):又称高效毛细管电泳(HPCE),是最近几年来发展最快的分析方法之一。CE是经典电泳技术和现代微柱分离相结合的产物。其具有三高二少的特点:高灵敏度、高分辨率、高速度、样品少、成本低。在实际工作中,结合传统电泳的工作方式与色谱技术的特点,形成以下几种分离模式:毛细管区带电泳(CZE)、胶束动电毛细管电泳(MECC)、毛细管等速电泳(CITP)、毛细管凝胶电泳(CGE)、毛细管等电聚焦电泳(CIEF)及近年刚刚兴起的毛细管电色谱(CEC)。其中用于三萜皂苷分析较多的是CZE和MECC。

Emara等^[16]在60 mmol/L硼酸缓冲液, pH 10,分离电压12 kV条件下,用HPCE成功地分离并测定了*Trifolium alexandrinum* L.种子中的齐墩果酸型三萜皂苷。彭军等^[7]用HPLC法、CZE法、MECC法测定了甘草制品中甘草酸的含量,测定结果表明,MECC法与HPLC法分析数据接近,比较准确,而且前者比HPLC法分离效率高,溶剂量少,是一种很有发展潜力的分析方法。

1.7 超临界流体色谱法(SFC):超临界流体色谱技术是20世纪80年代发展起来的一种崭新的色谱技术。由于它具有气相和液相色谱所没有的优点,并能分离和分析气相和液相色谱不能解决的一些对象,使之应用广泛,发展十分迅速。李云华等^[18]以SFC法测定了三七及其制品中人参二醇及人参三醇的含量,使用15%硫酸乙醇-水(1:1)直接进行水解,克服了文献报道的水解不完全,结果不稳定,不能定量回收的缺点。

1.8 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF-MS):MALDI-TOF-MS在复杂体系各组分的定性分析中所表现出的高效性已被人们广泛利用。在定量方面,人们已从MALDI-TOF-MS用于蛋白质定量向中药定量上发展。袁湘林等^[19]用MALDI-TOF-MS法对人参皂苷Rg₃进行了定量,并考察了定量时不同内标物、不同检测方式对定量结果的影响。

1.9 酶免疫测定法(EIA):是一种测定液相内微量物质的方法。用酶标记已知抗体或抗蛋白(抗抗体)或标记抗原,与待查配体(抗原或抗体)材料混合反应后,将抗原抗体结合

物用适当方法分离出来,再加入酶的底物邻苯二胺(OPD)显色,用酶标仪测定待测物质的含量。Yoon等^[20]用EIA法定性分析微量人参皂苷Rf后,又用该法定量检测了人参皂苷Rf和Rg。Yoon等还比较了EIA和HPLC这两种方法,它们的线性回归方程为 $Y(\text{EIA}) = 1.31X(\text{HPLC})$,相关系数分别为11.48和0.98。

2 结语

综上所述,以上9种方法已在三萜皂苷的定性、定量分析中取得了成功,并在三萜皂苷的研究中起到了重要的作用。随着科技的不断发展,将有更多先进的分析方法用于三萜皂苷的定性、定量分析,这些强有力的新兴分析手段必将以快速、准确、选择性强、稳定性好、灵敏度高、样品用量少、消耗少、自动化等特点在三萜皂苷类复杂成分分析中发挥重大作用。

参考文献:

- [1] 李润平,郑汉臣,宓鹤鸣,等.不同采收期垂序商陆有效成分含量测定[J].第二军医大学学报,1997,18(5):418-420.
- [2] 高山林,汪红.罗汉果皂甙的含量测定[J].天然产物研究与开发,2001,13(2):36-39.
- [3] 吴洪兰,李奎平,孟祥学,等.分光光度法测定人参花蕾中总皂甙的含量[J].时珍国药研究,1998,9(2):140.
- [4] Vanhaelen-Fastre R J, Facs M L, Vanhaelen M H, et al. High-performance thin-layer chromatographic determination of six major ginsenosides in *Panax ginseng* [J]. J Chromatogr A, 2000, 868(2): 269-276.
- [5] Corthout J, Naessens T, Apers S, et al. Quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng* roots and ginseng preparations by thin layer chromatography-densitometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 1999, 21(1): 187-192.
- [6] Lostatini A. Estin in pharmaceutical oral dosage forms quantitative densitometric HPTLC determination [J]. Farmaco, 1999, 54(11-12): 728-732.
- [7] Yoshikawa M, Murakami T, Onuki K, et al. Bioactive saponins and glycosides. XII. Horse chest-nut. (3): Quantitative analysis of escins I a, I b, II a and II b by means of high performance liquid chromatography [J]. Yakugaku Zasshi, 1999, 119(1): 81-87.
- [8] Kuwajima H, Taneda Y, Cnen W Z, et al. Variation of chemical constituents in processed licorice root: quantitative determination of saponin and flavonoid constituents in bark removed and roasted licorice roots [J]. Yakugaku Zasshi, 1999, 119(12): 945-955.
- [9] Samukawa K I, Hideyuki Y A, Hideaki M A, et al. Simultaneous analysis of saponins in ginseng radix by high performance liquid chromatography [J]. Chem Pharm Bull, 1995, 43(1): 137.
- [10] 许旭东,张曙明,张聿梅.反相高效液相色谱法测定总木属植物中二萜酸、三萜酸和三萜皂甙的含量[J].药学报,1998,(33):933-935.
- [11] He X G. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extrain by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric technique [J]. J Chromatogr A, 2000, 880(2): 203-232.
- [12] Li W, Fitzloff J F. Determination of 24(R)-pseudoginsenoside F(11) in North American ginseng using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2001, 25(2): 257-265.
- [13] Shangguan D, Han H, Zhao R, et al. New method for high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection of ginsenosides [J]. J Chromatogr A, 2001, 910(2): 367-372.
- [14] Lee H S, Seo Y, Cho K W, et al. New triterpenoid saponins

- from the Sponge *Melophylus isis* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63 (7): 915-919.
- [15] Ohana P, Delmer D P, Carlson R W, *et al*. Identification of a novel triterpenoid saponin from *Pisum sativum* as a specific inhibitor of the diguanylate cyclase of *Acetobacter xylinum* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(2): 144-152.
- [16] Emara S, Mohamed K M, Masujima T, *et al*. Separation of naturally occurring triterpenoidal saponins by capillary zone electrophoresis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2001, 15(4): 252-256.
- [17] 彭 军,王 复,朱明华,等. 高效液相色谱法和毛细管电泳法测定甘草制品中甘草酸的含量 [J]. *色谱*, 1999, 17(1): 90-92.
- [18] Li X H, Li X L, Hong L, *et al*. Determination of panaxadiol and panaxatriol in ginseng and its preparations by capillary supercritical fluid chromatography (SFC) [J]. *Biomed Chromatogr*, 1992, 6(2): 88-90.
- [19] 袁湘林,张玉奎,邹汉法,等. 基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于人参皂甙 R_g的定量分析. *分析化学* [J]. 2001, 29(1): 11-14.
- [20] Yoon S R, Nah J J, Kim S K, *et al*. Determination of finsenoside Rf and Rg2 from *Panax ginseng* using enzyme immunoassay [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(7): 1144-1147.

香菇有效成分提取分离及分析方法研究进展

边洪荣,李小娜,潘海宇,张海岚

(华北煤炭医学院 药理学系,河北 唐山 063000)

香菇堪称食用菌的上品,营养丰富,香郁诱人,食药兼用,健脾益气,调和阴阳。其主要成分有香菇多糖(lentinan, LN T)、香菇嘌呤(eriadenine)、核苷酸、维生素、三萜类化合物、大量的蛋白质和氨基酸、多种矿物质及膳食纤维素等^[1]。现将其主要成分的提取分离及分析方法综述如下。

1 香菇多糖

香菇多糖是香菇中的重要药用成分,具有较强抗肿瘤活性。是以 β -D-(1 $\rightarrow$ 3)葡萄糖残基为主链,(1 $\rightarrow$ 6)葡萄糖基为侧链的葡聚糖,相对分子质量约为50万。1969年最先由日本学者证实有抑制小鼠S₁₈₀肉瘤生长的作用,作为优良的免疫调节剂进入临床,国内于1988年引进并实现国产化^[2]。另一些香菇中的多糖物质由D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、L-阿拉伯糖及D-木糖构成。王金华等用热水、稀酸、稀碱提取香菇多糖,多糖经分级表明,在香菇子实体中至少含有7种香菇多糖^[3]。

1.1 提取分离:目前,国内提取香菇多糖主要采取的方法有水提醇沉法、盐析法、超滤法、酶法、复合酶解法、色谱法等。传统的香菇多糖的提取方法是水提醇沉法,先用热水提取,然后用乙醇沉淀,除掉水提取液中的杂质,其工艺比较简单,易于推广^[4]。

任国梅等^[5]用蒸馏水在90℃~100℃加热回流提取,用氯仿-正丁醇去蛋白,经水流动透析,用72%乙醇沉淀多糖,得水提香菇多糖,收得率为3.32%。其子实体残渣用1 mol/L NaOH提取,充氮防氧化,调pH值至中性,经透析,沉淀为碱提非水溶性多糖,收得率为0.36%。上清液为碱提水溶性多糖,收得率1.94%。王卫国等^[6]基于原来的提取方法工艺复杂,收率低,成本高,普通肿瘤病人无法接受,通过对香菇多糖提取纯化条件进行正交设计优化研究。结果表明,香菇多糖提取最佳工艺条件为:pH7.0,96℃浸提4h,

料水比为1:20,醇析浓度为70%,蛋白质去除时样品与氯仿-正丁醇为1:1,氯仿-正丁醇为1:0.25,萃取时间为30 min效果最好。由于乙醇沉淀的方法醇用量大,生产成本低,胡稳奇等^[7]采用盐析法提取香菇多糖,将水提液用一定饱和度的硫酸铵进行沉淀处理。结果表明,用80%硫酸铵盐析的效果比等量的95%乙醇沉淀更好。

工业化用酶在中药的提取制备中,取得了较好的效果,可提高收率,具有较大的应用潜力^[8]。张欣等^[9]采取了酶法提取香菇多糖,结果表明,利用复合酶解法结合热水浸提法提取菇柄多糖,提取率达7.13%(克多糖/100克菇柄干品),是热水浸提法的3.43倍,酶解的最适作用条件为pH4.5,温度46℃,时间80 min。陈哲超等^[10]采用复合酶解法提取香菇多糖蛋白,采用复合酶解和热水浸提法分离纯化香菇中多糖蛋白的综合程序。与单纯热水浸提法等其它方法相比,本法能显著提高香菇有效成分的浸提效果,总氨基酸与必需氨基酸百分比含量均提高2倍以上,香菇多糖含量提高了4倍,且酶解后大大改善了糖类的分布,抗肿瘤、抗病毒活性的具较高相对分子质量的葡聚糖物质含量也明显提高,效果极其显著。郑宗坤等^[11]采用螺旋卷式超滤器对香菇多糖进行提取研究。结果表明,在此实验范围内,用超滤作预处理较离心法效果好,超滤温度为25℃,pH值接近浸提介质的pH,超滤压力为0.15~0.18 MPa,制得香菇多糖的纯度为74.4%,回收率79.6%,是以D-葡聚糖为主的混和多糖。

1.2 分析方法

1.2.1 鉴别:多糖可以发生颜色反应^[3],与蒽酮试剂作用后溶液呈蓝绿色,与酚-硫酸反应溶液均呈桔红色。在浓硫酸作用下与 α -萘酚反应,在多糖溶液与硫酸界面出现紫色环,搅拌后溶液呈紫色,与斐林试剂呈阴性反应。

陈孜等^[12]利用薄层色谱法鉴别香菇多糖,选用硅胶H

* 收稿日期:2002-01-22

作者简介:边洪荣(1955-),女,天津人,副教授。主要研究方向为中草药的提取、分离及分析。Tel:0315-3725674