

表 3 以积雪草苷为指标方差分析表

Table 3 Variance analysis with asiaticoside as marker

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.086	2	0.043	774	$P < 0.01$
B	0.023	2	0.012	207	$P < 0.01$
C	0.01	2	0.005	90	$P < 0.01$
D	0.0015	2	0.0008	13.5	$P < 0.01$
误差 Se	0.0005	9	0.00006		

$F_{0.05}(2,9) = 4.26$ $F_{0.01}(2,9) = 8.02$

表 4 以黄芪甲苷为指标方差分析表

Table 4 Variance analysis with astragaloside IV as marker

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.043	2	0.0215	483.75	$P < 0.01$
B	0.031	2	0.0155	348.75	$P < 0.01$
C	0.036	2	0.018	405.00	$P < 0.01$
D	0.030	2	0.015	337.50	$P < 0.01$
误差 Se	0.0004	9	0.00004		

$F_{0.05}(2,9) = 4.26$ $F_{0.01}(2,9) = 8.02$

按最佳工艺条件进行提取 ($n=3$), 提取液滤过, 滤液蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 100 mL, 分别精密吸取 2 mL, 稀释至 10 mL, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。分别采用 HPLC 法按前述色

谱条件测定积雪草苷、黄芪甲苷含量, 结果积雪草苷转移率为 65.2%, 黄芪甲苷为 56.1%。

3 讨论

提取溶剂浓度选择是根据积雪草苷、黄芪甲苷的理化性质, 分别以水、40%、70%、95% 乙醇溶液 8 倍量, 提取两次, 每次 2 h。供试品经处理后, 以积雪草苷、黄芪甲苷对照品为对照, 采用 TLC 法^[2], 定量点样, 以氯仿-甲醇-水 (13: 7: 2) 的下层溶液为展开剂, 10% 硫酸乙醇溶液显色, 结果 40%~60% 乙醇斑点明显, 故设定 30%、50%、70% 乙醇为提取溶剂。

References

[1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol I .
[2] Zheng H Z. Modern Study and Application of Chinese Materia Medica (中药现代研究与应用) [M]. Vol I . Beijing Xueyuan Press, 1997.
[3] Chen Y, Jiang Y. Determination of asiaticoside and made-casoside in *Centella asiatica* (L.) Urban by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2000, 22(3): 227-228.
[4] Sha S Y, Xu L S. The Analysis Method of Effective Constituents in Chinese Materia Medica (中草药有效成分分析法) [M]. Beijing People's Medical Publishing House, 1997.

强极性大孔吸附树脂对三七皂苷的分离纯化研究

欧来良, 史作清*, 施荣富, 王 重, 王瑞芳*

(南开大学 吸附分离功能高分子材料国家重点实验室 高分子化学研究所, 天津 300071)

摘 要: 目的 探索一种高效、实用的分离纯化三七皂苷的技术。方法 根据三七皂苷的结构特征, 选用强极性吸附树脂 ADS-2, 并对 ADS-2 树脂的吸附性能进行了系统研究。采用 HPLC 法对产品中人参皂苷 R_{g1}、Re、Rb₁ 和三七皂苷 R_i 进行了测定。结果 ADS-2 树脂对三七皂苷具有较高的吸附选择性, 50% 乙醇作为脱附剂, 产品中有效成分含量为: 人参皂苷 R_{g1} 31.7%, Re 5.40%, Rb₁ 5.79%, 三七皂苷 R_i 29.7%, 产率为 7.73%。结论 大孔 ADS-2 吸附树脂对三七皂苷的分离纯化简单、高效, 易于工业化生产。

关键词: ADS-2 吸附树脂; 三七皂苷; 吸附分离

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)10-0905-03

Studies on separation and purification of saponins from *Panax notoginseng* with strongly polar macroporous adsorption resin

O U Lai-liang, SHI Zuo-qing, SHI Rong-fu, WANG Zhong, WANG Rui-fang
(State Key Laboratory of Functional Polymeric Materials for Adsorption and Separation,
Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Key words ADS-2 porous adsorption resin; saponins of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; adsorption and separation

三七为我国传统中药材, 具有化瘀止血、活血定痛之功效, 主要含有皂苷、黄酮、甾醇、多糖等成分。

* 收稿日期: 2002-10-29
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29974015)
* 通讯作者 Tel (022) 23503935

三七皂苷是其发挥药效的主要活性成分。在三七所含有的 28 种皂苷中又以人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 的生理活性较为明确^[1,2]。近年来随着吸附分离技术在中药制备中的广泛应用,也有有关应用 D_{101} 型大孔吸附树脂富集纯化三七皂苷的报道^[3],但较多地局限于三七总皂苷的提取分离,同时建立在以总皂苷含量为质控指标的质量标准,也不能反映三七总皂苷内在组成的变化,从而给中药制剂的稳定性、疗效等带来不确定性。本实验通过强极性大孔吸附树脂对三七皂苷的分离性能研究,确定了仅通过“吸附-脱附”的简单生产工艺即可得到较高纯度三七皂苷,并利用 HPLC 法对提取物中人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 进行了定量分析。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪 (Waters 公司), BSZ-100 自动部分收集器, HL-2 恒流泵, BUCHER-144 旋转蒸发器。

所用三七药材经河北安国市医药公司鉴定系五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根; 人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 对照品 (中国药品生物制品检定所)。强极性 ADS-2 树脂 (本实验室合成), 工业乙醇、乙腈 (色谱级)、纯水 (自制)。

2 方法与结果

2.1 三七中皂苷含量测定方法

2.1.1 色谱条件: 色谱柱为 Alltima Amino 100A ($5\mu m$, $250 mm \times 4.6 mm$); 流动相: 乙腈-水 (85:15); 流速: $1.0 mL/min$; 柱温: 室温; 检测波长: $210 nm$ 。

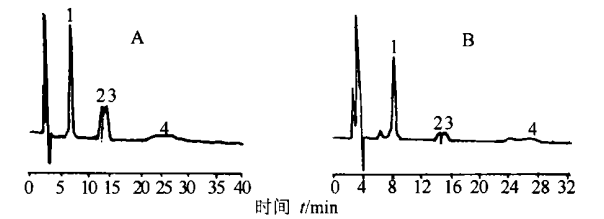
2.1.2 标准曲线的制备: 取人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 对照品各约 $5 mg$, 精密称定, 置 $5 mL$ 容量瓶中, 加甲醇至刻度。分别取 $20, 10, 5, 2, 1 \mu L$ 注入高效液相色谱仪中, 在上述的条件下进行分析, 记录色谱峰面积。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 结果见表 1。

2.1.3 供试品溶液的制备: 称取三七粗粉 $50 g$, 用 70% 乙醇 $80^\circ C$ 回流提取 2 次 ($300 mL, 3 h; 200 mL, 2 h$)。滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇, 滤去不溶物, 共得滤液 $350 mL$ (HPLC 测定人参皂苷 R_{g1} 为 $4.76 mg/mL$)。

2.1.4 三七提取物中皂苷成分的分析: 精确称取三七提取物约 $20 mg$ 于 $10 mL$ 量瓶中, 甲醇定容。静置, 取上清液 $20 \mu L$, 按上述色谱条件进行 HPLC 分析。三七中皂苷定量采用外标法。色谱图见图 1。

表 1 三七中皂苷的标准工作曲线
Table 1 Standard curve equation of saponins from *P. notoginseng*

名称	回归方程	<i>r</i>	线性范围 ($\mu g \cdot mL^{-1}$)
人参皂苷 R_{g1}	$Y = 6.127x - 484.486$	0.996	38.5~770
人参皂苷 R_e	$Y = -4.692x + 39.537$	0.998	20~400
人参皂苷 R_{b1}	$Y = 23.389x - 184.410$	0.991	30~600
三七皂苷 R_1	$Y = -21.116x + 412.804$	0.992	20~400



1-人参皂苷 R_{g1} 2-人参皂苷 R_e 3-三七皂苷 R_1 4-人参皂苷 R_{b1}
1-ginsenoside R_{g1} 2-ginsenoside R_e
3-notoginsenoside R_1 4-ginsenoside R_{b1}

图 1 三七中皂苷对照品 (A) 和三七提取物 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of *P. notoginseng* saponins (A) and *P. notoginseng* extraction (B)

2.2 ADS-2 树脂的预处理及再生: 取一定量的 ADS-2 树脂, 湿法装柱, 用工业乙醇洗至加水不浑浊, 大量水洗至无醇, 分别用 5% HCl 和 5% NaOH 处理, 用水洗至中性, 备用。用 3~4 倍床体积 5% NaOH 即可再生。

2.3 ADS-2 树脂对三七中人参皂苷 R_{g1} 的动态吸附: 精确称取 $10 mL$ 上述经预处理的树脂, 装入交换柱, 通入供试样品溶液, 控制吸附流速为 $1 BV/h$, 分别收集流出液。采用 HPLC 法测定流出液中人参皂苷 R_{g1} 的浓度 (因三七中人参皂苷 R_{g1} 的含量最高, 本实验以其作为考察 ADS-2 树脂的指标)。树脂的吸附量按 (原液浓度 - 流出液浓度) $\times$ 吸附体积 / 树脂体积计算。绘制吸附曲线, 见图 2。吸附饱和后的树脂用纯水淋洗至中性, 50% 乙醇解吸 (控制 $1 BV/h$), 分别收集解吸液, 依次测定人参皂苷 R_{g1} 浓度, 绘制解吸曲线。见图 3。

可以看出, 当吸附流速为 $1 BV/h$ 时, ADS-2 树脂可以处理 3 倍树脂床体积浓度为 $4.76 mg/mL$ 的三七提取液而不发生泄露, 此时树脂床共吸附人参皂苷 R_{g1} $142.8 mg$, 相当于三七生药量 $4.28 g$, 树脂的工作吸附量为 $14.28 mg/mL$ 。吸附饱和时可处理 8 倍床体积的提取液, 饱和吸附量达 $21.64 mg/mL$ 。用 50% 乙醇作为解吸液, 当吸附流速为 $1 BV/h$ 时, 解吸峰非常集中, 无明显的拖尾现象, 用 4

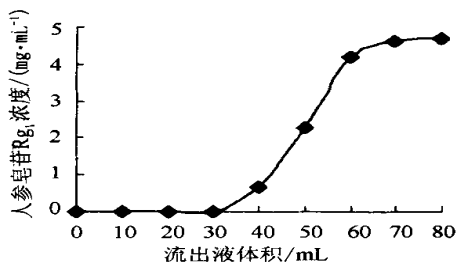


图 2 ADS-2树脂的吸附曲线

Fig. 2 Adsorption curve on ADS-2 porous resin

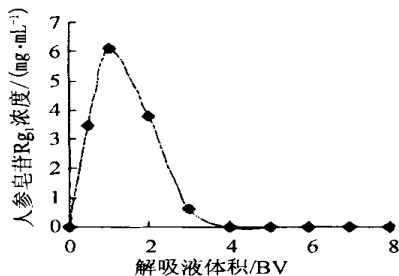


图 3 ADS-2树脂的解吸曲线

Fig. 3 Desorption curve on ADS-2 porous resin

倍树脂床体积的解吸液即可基本将三七中皂苷成分从树脂上解吸下来。可见 ADS-2树脂具有良好的解吸性能。

2.4 ADS-2树脂分离、纯化三七皂苷

2.4.1 洗脱溶剂的选择: ADS-2树脂是一种多功能吸附树脂,有针对性地选择合适的洗脱剂,将会达到良好的分离精制的目的。三七中所含皂苷均为达玛烷型,不含人参中所特有的齐墩果烷型皂苷,因此三七中的皂苷成分虽具有较大的极性,却只能靠范德华力吸附在树脂上。实验曾考察了亲水性有机溶剂甲醇、乙醇、丙酮对三七皂苷的解吸性能,结果解吸率在 95% 以上,但从价廉、安全和卫生的角度考虑,选用乙醇较佳。本实验对不同浓度的乙醇作为脱附剂对 ADS-2树脂的脱附性能进行考察。

2.4.2 三七皂苷的提取富集和分离: 取上述经预处理的树脂各 20 mL 分别装入 3 支交换柱,根据动态吸附的实验结果,20 mL ADS-2树脂可以处理 60 mL 4.76 mg/mL 的提取液而不发生泄露,因此分别取供试品溶液各 60 mL 通入以上 3 支交换柱,控制流速 1 BV/h,吸附完毕后,用蒸馏水洗至中性,然后分别用 70%、50%、30% 乙醇解吸,收集洗脱液,

浓缩、真空干燥、粉碎得白色粉末。分析结果见表 2。

表 2 不同浓度的乙醇对三七提取物中皂苷成分的影响

Table 2 Effect of different ethanol concentrations on saponins in *P. notogiseng* extraction

洗脱液	人参皂苷 R _{G1} %	人参皂苷 R _E %	人参皂苷 R _I %	人参皂苷 R _{B1} %	产率 %
30% 乙醇	30.2	4.95	5.67	20.1	6.50
50% 乙醇	31.7	5.40	5.79	29.7	7.75
70% 乙醇	27.4	4.09	6.75	15.3	9.95

由表 2 可知,随着洗脱液浓度的升高,产品的产率也相应提高。乙醇浓度较低,虽然得到的产品纯度较高,但产率却很低;浓度太高时有大量的弱极性杂质一起流出,导致有效成分的含量下降;50% 乙醇作为洗脱液,相对较理想。

3 讨论

3.1 带有少量可交换功能基的大孔强极性吸附树脂 ADS-2 是一种多功能吸附树脂,各种功能基针对不同极性的中药成分产生不同的吸附作用,根据树脂结构和所要提取成分的结构特点,选用不同极性的洗脱液,可以达到对不同中药成分分离纯化的目的。ADS-2 用于三七皂苷的分离,50% 乙醇作为洗脱液,产品纯度人参皂苷 R_{G1} 为 31.7%, R_E 为 5.40%, R_{B1} 为 5.79%, 三七皂苷 R_I 为 29.7%, 产率为 7.75%。

3.2 ADS-2 树脂用于三七皂苷提取较为理想的工艺路线为: 20 倍量的 70% 乙醇回流提取两次 (3 h, 2 h), 回收乙醇, 滤过得澄清水溶液, 通入 ADS-2 树脂柱, 控制流速 1 BV/h, 吸附完毕用 50% 乙醇洗脱, 浓缩、干燥即得白色三七皂苷产品。

3.3 ADS-2 树脂用于三七皂苷类纯化, 具有产品色泽好, 生产过程中不是用毒性有机溶剂, 对产品、环境无污染, 利于工业化生产等优势。

References

- [1] Zhang B, Jin S A, Kuang X. Effects of R_{B1} on calcium channel of guinea pig ventricular myocytes [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(10): 624-626.
- [2] Zhang B, Jin S A, Kuang X, et al. Effects of R_{G1} on calcium channel of guinea pig ventricular myocytes [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1998, 14(1): 33-35.
- [3] Liu Z Q, Cai X, Lai X P, et al. Studies on purification of *Panax notogiseng* saponins (PNS) with macroporous resin [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2001, 7(3): 4-6.