

# 泡沫浮选-固相提取分离富集三七提取液中的人参皂苷

张 瑞 李 娜 张寒琦 王 影 高仕谦 任瑞冰 孙 颖\*

( 吉林大学化学学院 , 长春 130032 )

**摘 要** 采用泡沫浮选-固相提取联用法 , 分离富集三七中的  $R_1$  ,  $R_{g_1}$  , Re , Rc ,  $Rb_2$  ,  $Rb_3$  , Rd 和  $Rb_1$  , 并用液相色谱法测定其含量 . 检测灵敏度和选择性都有所提高 . 对泡沫浮选过程的载气流量、浮选时间、样品溶液 pH 值和固相提取柱的洗脱条件进行了优化 . 原人参二醇型皂苷  $R_1$  , Rc ,  $Rb_2$  ,  $Rb_3$  , Rd , 和  $Rb_1$  的回收率在 85.0% ~ 97.5% 之间 , 而原人参三醇型皂苷  $R_{g_1}$  和 Re 的回收率很低 . 原人参二醇型皂苷测定的相对标准偏差都小于 6.03% . 本研究为分离纯化三七提取液中低浓度原人参二醇型皂苷的简便有效的方法 .

**关键词** 固相提取; 泡沫浮选; 高效液相色谱; 三七; 人参皂苷

## 1 引 言

三七(*Panax notoginseng* ( Burk. ) F. H. Chen) 是五加科植物 , 有散瘀止血、消肿止痛的功效<sup>[1-3]</sup> . 三七中含有多多种人参皂苷及与人参皂苷类似的成分 . 人参皂苷具有耐缺氧、降血糖血脂、改善微循环、增强机体免疫力、抗炎、抗衰老<sup>[4]</sup>、保护心肌、保护脑组织<sup>[5]</sup> 及抗肥胖<sup>[6]</sup> 等多种药理活性 . 人参皂苷按其苷元部分的结构不同主要分为原人参二醇型皂苷、原人参三醇型皂苷和齐墩果酸<sup>[7]</sup> . 泡沫浮选法是基于溶液中待分离组分具有表面活性 , 或通过向其中加入表面活性剂将目标物带出溶液主体使之分离浓缩的方法<sup>[8-10]</sup> , 广泛应用于金属离子、表面活性剂、蛋白质及中药有效成分的分离富集<sup>[11-13]</sup> . 人参皂苷具有表面活性剂的特性 , 在搅拌或通入气体时可产生稳定的泡沫<sup>[14]</sup> , 因此可采用浮选分离技术对其进行分离富集<sup>[15]</sup> . 但是当溶液中待测物浓度很低时 , 即使进行了泡沫浮选富集后也检测不到目标物 . 固相提取法虽然方便简单 , 但是当样品溶液量大时耗时长 . 本研究采用泡沫浮选与固相提取联用法分离富集三七提取液中的人参皂苷 , 同时进行了 2 次分离富集 , 为分离富集溶液中低浓度物质提供了新方法 .

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪( 日本岛津公司) ; KQ5200E 型超声波清洗器( 昆山市超声仪器有限公司) ; 3202S 型酸度计( 瑞士 Mettler 公司) ; Heidolph 旋转蒸发仪( 德国) ; OASIS HLB 固相提取柱 ( 1 mL , 10 mg , 美国 Waters 公司) ; 自制浮选装置如图 1 所示 .

8 种人参皂苷( 纯度均为 99% )  $R_1$  ,  $R_{g_1}$  , Re ,  $Rb_1$  , Rc ,  $Rb_2$  ,  $Rb_3$  和 Rd 购自中国药品生物制品检定所 , 用甲醇溶解得到不同浓度的人参皂苷标准溶液 . 三七样品购于当地药店 . 乙腈( HPLC 级 ) , 其它试剂均为分析纯 . 实验用水经过 MilliQ 系统纯化 .

### 2.2 实验方法

**2.2.1 样品制备** 将样品烘干 , 粉碎过孔径为 425  $\mu\text{m}$  的筛子 , 用三氯甲烷加热脱脂 3 h , 自然晾干备用 . 称取 20 mg 样品 , 超声提取 2 h , 在 50  $^{\circ}\text{C}$  下旋转蒸发至干 , 加入 160 mL 水 , 制得样品溶液 . 称取 20 mg 样品 , 加入适量标准溶液 , 搅拌 24 h , 氮气吹干 , 制成加标样品 , 并按上述方法制成加标样品溶液 .

**2.2.2 泡沫浮选-固相提取** 如图 1 所示 , 将样品溶液过滤后加入浮选瓶中 . 浮选瓶的截面积直径为 5 cm , 将氮气以一定流速通过浮选瓶和固相提取柱 , 其中泡沫未经破乳直接引入固相提取柱 , 富集完

2010-08-27 收稿; 2010-11-01 接受

\* E-mail: analchem@jlu.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

全后用适量洗脱剂洗脱固相提取柱。洗脱液引入 HPLC 分析。

**2.2.3 固相提取** 通过固相提取柱的溶液约为 7 mL。为了进行比较,取 7 mL 样品溶液,以 2 mL/min 的流速通过固相提取柱,用 500  $\mu$ L 甲醇洗脱,将洗脱液过滤,引入 HPLC 进行分析。

**2.2.4 泡沫浮选** 将 160 mL 样品溶液倒入浮选瓶中进行泡沫浮选,不经过固相提取柱,将浮选液过滤,引入 HPLC 进行分析。

**2.2.5 色谱条件** Eclipse XDB C<sub>8</sub> 色谱柱(416 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m),柱温 25  $^{\circ}$ C,流动相流量 1.5 mL/min,进样体积 20  $\mu$ L,检测波长为 203 nm。流动相为乙腈(A)和水(B),梯度洗脱:0~25 min,18% A;25~26 min,18%~30% A;26~50 min,30% A。

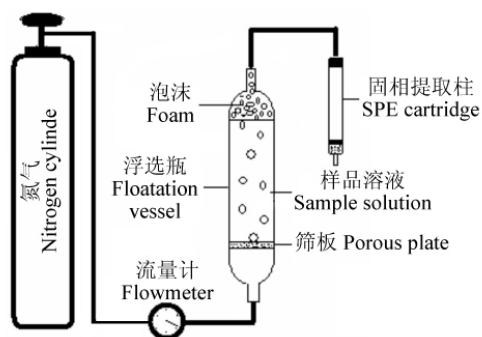


图1 泡沫浮选-固相提取联用装置

Fig.1 Foam flotation-SPE system

## 3 结果与讨论

### 3.1 泡沫浮选条件的优化

**3.1.1 载气流量** 实验结果表明,当载气流量较小时,载气的载带能力较弱,不能有效地将人参皂苷从溶液中带至溶液表层。随着载气流量的增大,人参皂苷的收率先升后降。这可能是由于当载气流量过大时,溶液中产生涡旋将溶液表层的泡沫带回到溶液中,同时富集的杂质也增多,导致人参皂苷的收率降低。因此选择 40 mL/min 作为最佳载气流量。

**3.1.2 浮选时间** 由图 2a 可知,浮选时间过短,人参皂苷的富集不完全;浮选 30 min 后,人参皂苷的收率基本不变,因此浮选时间选择 30 min。

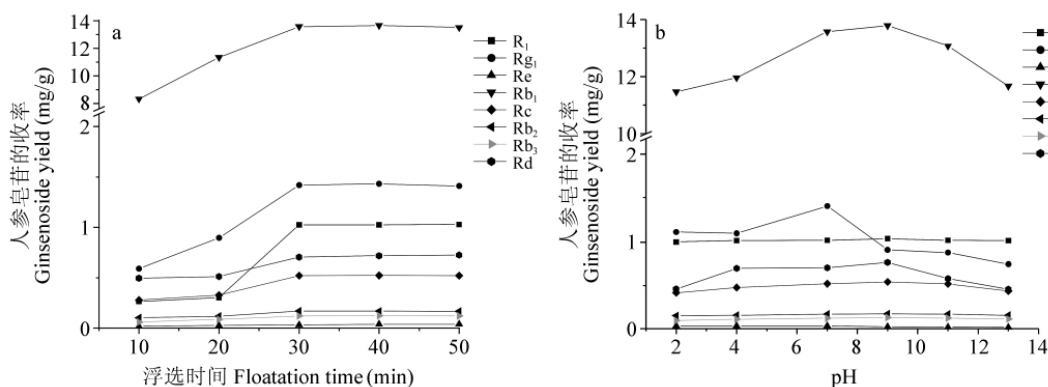


图2 浮选时间(a)和样品液pH值(b)对人参皂苷收率的影响

Fig.2 Effect of floatation time (a) and pH value of sample solution (b) on yields of ginsenosides

**3.1.3 样品溶液 pH 值** 考察了样品溶液 pH 值对浮选效率的影响,结果如图 2b 所示。随着溶液 pH 值的增加,人参皂苷的收率先升后降,可能是由于 pH 值影响人参皂苷的存在形式。pH 值过高时,人参皂苷可能发生降解,影响收率。为了分离二醇组皂苷和三醇组皂苷,同时富集二醇组皂苷,pH 值选择 9.0。

### 3.2 固相提取条件的优化

**3.2.1 洗脱剂的选择** 比较了甲醇、乙醇、丙酮和乙腈为洗脱剂时人参皂苷的收率。由图 3 可知,以甲醇为洗脱剂时洗脱效果最佳,因此选择甲醇为洗脱剂。

**3.2.2 洗脱剂流量** 由图 4 可见,洗脱剂流量对 Rb<sub>1</sub> 的收率有较大影响,对其它人参皂苷收率的影响不大。当洗脱剂流量为 37.5  $\mu$ L/min 时,Rb<sub>1</sub> 的洗脱效果最佳。本研究中洗脱剂流量选择为 37.5  $\mu$ L/min。

**3.2.3 洗脱剂用量** 洗脱剂用量从 200  $\mu$ L 增加到 400  $\mu$ L 时,均不能将被测物完全洗脱;洗脱剂用量达到 500  $\mu$ L 才能得到满意的收率。因此本研究中洗脱剂用量选择 500  $\mu$ L。

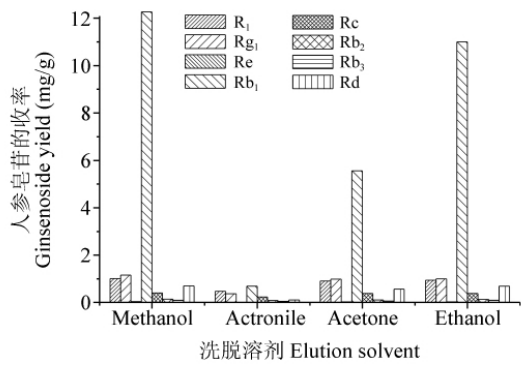


图 3 洗脱剂对人参皂苷收率的影响

Fig. 3 Effect of type of elution solvent on yields of ginsenosides

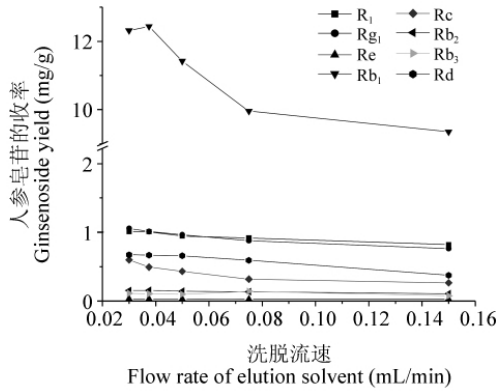


图 4 洗脱液流速对人参皂苷含量的影响

Fig. 4 Effect of flow rate of elution solvent on yields of ginsenosides

3.3 泡沫浮选法、固相提取法及泡沫浮选-固相提取联用法的比较

由图 5 可知 样品溶液中人参皂苷的浓度过低，分别使用泡沫浮选法和固相提取法富集其中的人参皂苷，二者的富集效果均不佳。采用泡沫浮选-固相提取联用法对样品液中低浓度人参皂苷进行分离富集，其结果令人满意。

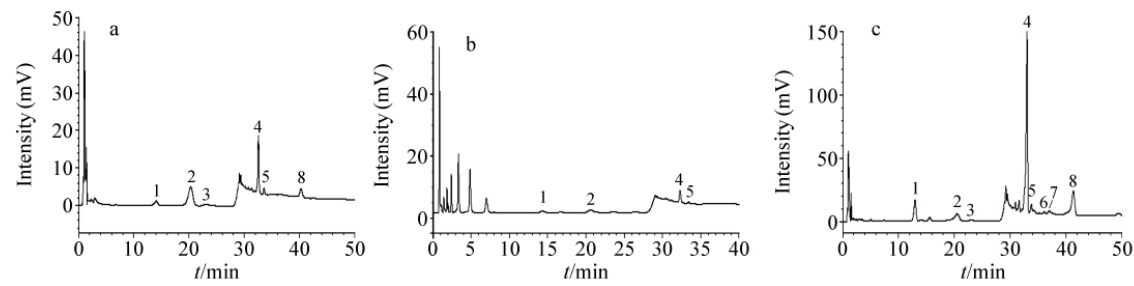


图 5 样品经 (a) 固相提取法、(b) 泡沫浮选法及 (c) 泡沫浮选-固相提取法富集后的液相色谱图

Fig. 5 Chromatograms of analytical solution obtained by (a) SPE, (b) foam floatation (FF) and (c) FF-SPE  
1. R<sub>1</sub>; 2. R<sub>g1</sub>; 3. R<sub>e</sub>; 4. R<sub>b1</sub>; 5. R<sub>c</sub>; 6. R<sub>b2</sub>; 7. R<sub>b3</sub>; 8. R<sub>d</sub>.

3.4 标准曲线

以人参皂苷浓度( *c* )为横坐标, 色谱峰面积( *A* )为纵坐标, 绘制标准曲线, 对应的线性回归方程和检出限( LOD )见表 1。

表 1 8 种人参皂苷的标准曲线、浓度范围和检出限  
Table 1 Linear calibration equations for determination of ginsenosides

| 人参皂苷<br>Ginsenosides | 标准曲线<br>Calibration curve | 相关系数<br>( <i>r</i> ) | 浓度范围<br>Concentration range<br>( mg/L ) | 检出限<br>LOD<br>( mg/L ) |
|----------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| R <sub>1</sub>       | $A = 12085.3c - 19416.1$  | 0.9999               | 3.75 ~ 480                              | 2.11                   |
| R <sub>g1</sub>      | $A = 8493.9c - 13965.1$   | 0.9997               | 7.50 ~ 480                              | 4.02                   |
| R <sub>e</sub>       | $A = 52388.3c - 28447.1$  | 0.9997               | 6.25 ~ 100                              | 1.04                   |
| R <sub>b1</sub>      | $A = 5121.3c - 23816.6$   | 0.9995               | 11.48 ~ 1470                            | 4.91                   |
| R <sub>c</sub>       | $A = 6827.9c - 10547.3$   | 0.9993               | 5.31 ~ 340                              | 3.95                   |
| R <sub>b2</sub>      | $A = 12984.9c - 6768.6$   | 0.9998               | 3.13 ~ 200                              | 1.09                   |
| R <sub>b3</sub>      | $A = 20887.0c - 6134.5$   | 0.9995               | 6.25 ~ 100                              | 1.57                   |
| R <sub>d</sub>       | $A = 7093.0c - 1635.1$    | 0.9992               | 2.81 ~ 180                              | 1.99                   |

3.5 精密度

对于同一样品, 1 d 内分析 5 次, 求得日内精密度; 对于同一样品, 在 3 d 内每天分析 1 次, 求得日间精密度, 结果如表 2 所示。

表 2 3 种三七样品的日内精密度和日间精密度  
Table 2 Intraday and interday precision for determing ginsenosides

| 分析物<br>Analyte  | Sample 1               |                                           |                                           | Sample 2               |                                           |                                           | Sample 3               |                                           |                                           |
|-----------------|------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                 | 含量<br>Found<br>( mg/g) | 日内精密度<br>Intra-day<br>RSD<br>( % , n = 5) | 日间精密度<br>Inter-day<br>RSD<br>( % , n = 5) | 含量<br>Found<br>( mg/g) | 日内精密度<br>Intra-day<br>RSD<br>( % , n = 5) | 日间精密度<br>Inter-day<br>RSD<br>( % , n = 5) | 含量<br>Found<br>( mg/g) | 日内精密度<br>Intra-day<br>RSD<br>( % , n = 5) | 日间精密度<br>Inter-day<br>RSD<br>( % , n = 5) |
| R <sub>1</sub>  | 1.02                   | 4.3                                       | 5.9                                       | 1.08                   | 5.2                                       | 6.1                                       | 0.94                   | 4.4                                       | 5.3                                       |
| Rg <sub>1</sub> | 1.42                   | 4.8                                       | 6.7                                       | 1.06                   | 6.0                                       | 6.9                                       | 1.01                   | 5.1                                       | 6.3                                       |
| Re              | 0.03                   | 5.7                                       | 6.2                                       | 0.02                   | 4.7                                       | 5.5                                       | 0.02                   | 4.6                                       | 5.9                                       |
| Rb <sub>1</sub> | 13.58                  | 3.1                                       | 3.2                                       | 14.21                  | 2.1                                       | 3.7                                       | 12.88                  | 2.7                                       | 3.0                                       |
| Rc              | 0.52                   | 5.1                                       | 5.8                                       | 0.41                   | 3.1                                       | 5.7                                       | 0.39                   | 5.1                                       | 5.1                                       |
| Rb <sub>2</sub> | 0.17                   | 3.0                                       | 4.5                                       | 0.11                   | 4.7                                       | 4.5                                       | 0.12                   | 3.8                                       | 4.2                                       |
| Rb <sub>3</sub> | 0.12                   | 4.3                                       | 5.6                                       | 0.10                   | 4.0                                       | 5.1                                       | 0.10                   | 4.1                                       | 4.9                                       |
| Rd              | 0.70                   | 6.0                                       | 6.1                                       | 0.80                   | 5.1                                       | 6.2                                       | 0.68                   | 5.1                                       | 5.6                                       |

3.6 回收率

由表 3 可知 ,除了三醇组皂苷外 ,二醇组皂苷 R<sub>1</sub> ,Rc , Rb<sub>2</sub> , Rb<sub>3</sub> , Rd 和 Rb<sub>1</sub> 均得到了令人满意的回收率。实验表明 ,本方法可以将二醇组皂苷与三醇组皂苷分离 ,并且富集了二醇组皂苷。

表 3 加标样品中人参皂苷的回收率  
Table 3 Recoveries of ginsenosides in spiked samples

| 人参皂苷<br>Ginsenosides | 原含量<br>Original<br>( mg/g) | 加入量<br>Added<br>( mg/g) | 测得量<br>Found<br>( mg/g) | 回收率<br>Recovery<br>( %) | 相对标准偏差<br>RSD<br>( % , n = 3) |
|----------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| R <sub>1</sub>       | 1.02                       | 0.72                    | 1.63                    | 85.0                    | 4.0                           |
| Rg <sub>1</sub>      | 1.42                       | 1.72                    | 1.75                    | 19.1                    | 5.9                           |
| Re                   | 0.03                       | 0.19                    | 0.06                    | 16.2                    | 5.3                           |
| Rb <sub>1</sub>      | 13.58                      | 15.02                   | 28.23                   | 97.5                    | 3.0                           |
| Rc                   | 0.52                       | 0.33                    | 0.82                    | 92.3                    | 5.0                           |
| Rb <sub>2</sub>      | 0.17                       | 0.86                    | 0.99                    | 95.1                    | 4.0                           |
| Rb <sub>3</sub>      | 0.12                       | 0.30                    | 0.39                    | 90.0                    | 4.4                           |
| Rd                   | 0.70                       | 0.68                    | 1.35                    | 96.1                    | 5.6                           |

References

1 SONG Ru , YUAN Ji-Min , LIU Xin( 宋 茹 ,袁继民 ,刘 欣) . *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*( 中国现代应用药学杂志) , **2005** , 22( 1) : 69-71

2 HUANG Yong-Zhuo , WANG Ning-Sheng( 黄永焯 ,王宁生) . *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology* ( 中药新药与临床药理) , **2003** , 14( 3) : 180-182

3 FENG Li-Jian , HUANG Lin , ZHUO Hui-Qin , HUANG He-Qing( 冯丽剑 ,黄 琳 ,卓慧钦 ,黄河清) . *Chinese J. Anal. Chem.* ( 分析化学) , **2009** , 37( 12) : 1727 ~ 1732

4 WANG Wei-Xia , WANG Qian( 王卫霞 ,王 谦) . *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy* ( 中华中医药杂志) , **2005** , 20( 4) : 234 ~ 236

5 LI Mao-Quan , XIA Lun-Zhu , ZHANG Jun-Ru , MENG Mei , GAO Jia-Rong( 李毛全 ,夏伦祝 ,章俊如 ,孟 楣 ,高家荣) . *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*( 安徽医药) , **2009** , 13( 3) : 261 ~ 262

6 JIA Gui-Yan , ZHANG Jing , HAN Li-Kun , ZHENG Yi-Nan( 贾桂燕 ,张 晶 ,韩立坤 ,郑毅男) . *Natural Product Reserch and Development*( 天然产物研究与开发) , **2005** , 17( 2) : 160 ~ 162

7 Gafner S. , Bergeron C. , Mccollom M M. *J. Agric. Food Chem.* , **2004** , 52: 1546 ~ 1550

8 LIU Jian , WANG Jiu-Si , LÜ Jiang-Ping , KONG Ai-Ping , JIANG Yan-Ling( 刘 剑 ,王九思 ,吕江平 ,孔爱平 ,江艳玲) . *Advances in Fine Petrochemicals*( 精细石油化工进展) **2008** , 9( 6) : 50 ~ 53

9 Rubin A J , Lapp W L. *Anal. Chem.* , **1969** , 41( 8) : 1133 ~ 1136

10 Walkowiak W , Bhattacharyya D , Grieves P B. *Anal. Chem.* , **1976** , 48( 7) : 976 ~ 979

11 Kordialik-Bogacka E , Ambroziak W. *J. Sci. Food Agr.* , **2004** , 84: 1960 ~ 1968

- 12 LIANG Qing, WU Zhao-Liang, HU Bin, ZHENG Hui-Jie, SHI Pan-Hong( 梁 擎, 吴兆亮, 胡 滨, 郑辉杰, 石盼红). *Modern Chemical Industry*( 现代化工), **2008**, 28(7): 43 ~ 46
- 13 WANG De-Jin( 汪德进). *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*( 中国卫生检验杂志), **2007**, 17( 11): 1929 ~ 1931
- 14 Prat M D, Benito J, Compañó R, Hernández-Arteseros J A, Granados M. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1041: 27 ~ 33
- 15 WANG Yu-Tang, LIU Xue-Bo, YUE Tian-Li, LIU Lin-Wei, ZHANG Han-Qi ( 王玉堂, 刘学波, 岳田利, 刘邻渭, 张寒琦). *Chem. J. Chinese Universities* ( 高等学校化学学报), **2009**, 30(9): 1713 ~ 1716

# Separation and Enrichment of Ginsenosides from Extracts of Root of *Panax Notoginseng* Burk. F. H. Chen. by Foam Floatation-Solid Phase Extraction

ZHANG Rui , LI Na , ZHANG Han-Qi , WANG Ying , GAO Shi-Qian , REN Rui-Bing , SUN Ying<sup>\*</sup>  
( College of Chemistry Jilin University , Changchun 130012)

**Abstract** Foam floatation-solid phase extraction was applied to the separation and enrichment of ginsenosides from extracts of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen. The selectivity and sensitivity for determining the ginsenosides were improved. The experimental conditions, including the flow rate of nitrogen gas, floatation time and pH value of sample solution, for foam floatation and elution conditions for SPE were examined and optimized. Average recoveries for protopanaxadiol (PPD) ginsenosides R<sub>c</sub>, R<sub>b2</sub>, R<sub>b3</sub>, R<sub>d</sub>, and R<sub>b1</sub> were between 85.01% and 97.51%. The relative standard deviations (RSDs) were lower than 5.8% for the PPD ginsenosides. The FF-SPE was applied to both the separation and concentration for the PPD ginsenosides. The proposed method shows a potential in the separation and concentration of trace analytes in the solution samples.

**Keywords** Solid phase extraction; Foam floatation; High performance liquid chromatography; *Panax notog-insen*( Burk. ) F. H. Chen.; Ginsenosides;

( Received 27 August 2010; accepted 1 November 2010)

《核磁共振谱学: 在有机化学中的应用》(第二版)

该书深入地系统地论述了 NMR 谱学的全部内容。对氢谱、碳谱、二维谱、蛋白和核酸的 NMR 分析等问题作了深入的阐述。在  $^1\text{H}$  NMR 中,对氢谱涉及的自旋-自旋耦合、核间奥氏效应 (NOE)、分子立体结构和手性中心对相邻质子的作用等作了详细说明。对  $^{13}\text{C}$  NMR 谱的去耦技术和在非去耦条件下的  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  耦合、 $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  耦合等问题作了概述。该书用一章的篇幅对  $^2\text{D}$  NMR 作了专门的论述;对蛋白、核酸生物大分子的核磁共振研究进展作了详细的介绍,并给出了大量参考文献;还对 NMR 的某些前言研究工作作了介绍。新书最后附了大量谱图供大家参考,特别是对许多谱图作了表征。该书理论服务于应用,是从事有机化学、药物化学、植物化学、生物化学、石油化工、材料化学、生命科学研究的科研人员 and 高等院校师生很好的参考书和工具书,也可作为 NMR 谱学的教科书。

该书( ISBN 978-7-122-07165-4) 由化学工业出版社出版,王乃兴 编著,定价 88.0 元。