

不同地区绞股蓝总皂苷的分析及纯化

秦江¹, 陈良华^{1,2}, 刘轩¹, 张树峰², 童庆宣², 陈清西^{1*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 厦门华侨亚热带植物引种园药用植物与植物药研发中心, 福建 厦门 361002)

摘要: 采用紫外-可见分光光度法测定产自福建、湖北、广西、云南、浙江和陕西 6 种不同产地绞股蓝总皂苷的含量, 并通过高效液相色谱法(HPLC)比较这 6 种绞股蓝总皂苷组成成分的差异性。结果表明: 产自湖北的绞股蓝总皂苷的含量最高, 达到了 11.46%, 而福建绞股蓝则为 9.10%。HPLC 图谱结果表明产自陕西、浙江和广西地区的绞股蓝中的总皂苷成分比福建、云南和湖北地区的复杂。通过静态吸附、动态洗脱研究和比较了 D101、HP-20、DM130 及 AB-8 等 4 种大孔吸附树脂对绞股蓝总皂苷的富集纯化性能, 发现 DM130 在饱和吸附和不饱和吸附两种状态条件下均对绞股蓝总皂苷的富集纯化效果最佳。以乙醇作为洗脱剂, 对于动态洗脱方法最佳的乙醇体积分数为 70%, 对绞股蓝总皂苷的洗脱效果最好。

关键词: 绞股蓝总皂苷; 大孔吸附树脂; 高效液相色谱

中图分类号: Q 356.1

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)01-0125-05

绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino] 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 多年生落叶草质宿根藤本植物, 除含有甾醇、多糖、酮类、氨基酸、微量元素等成分外, 还含有多种绞股蓝皂苷。同时绞股蓝也是目前已知的除五加科 (Araliaceae) 人参属 (*Panax quinquefolium*) 以外, 唯一含有人参皂苷类成分的植物, 其皂苷与人参所含皂苷的生理活性类似, 其中绞股蓝皂苷 III、IV、VII 和 XII 分别与人参皂苷 Rb1、Rb2、Rd 和 F2 的化学结构相同^[1], 因此绞股蓝一直都是研究开发备受关注的药用植物。Megalli 等^[2]通过病态朱克脂肪大鼠模型证明了绞股蓝具有改善高血脂症和糖尿病的药理学效应; Circosta 等^[3]研究了绞股蓝叶水提取物对麻醉豚鼠的心血管活动的影响, 结果显示, 可以有效地预防冠状动脉痉挛、心率不齐和加压反应的发生。Chen 等^[4]研究发现经绞股蓝皂苷处理 2 d 后的 Hep3B 和 HA22T 细胞, DNA 染色体减少并形成亚 G1 峰, 实验结果表明绞股蓝皂苷可通过诱导人肝肿瘤细胞系 Hep3B 和 HA22T 发生凋亡而造成肿瘤细胞的死亡, 并通过细胞形态学观察验证了此结论。肖增平等^[5]研究发现绞股蓝提取物对四氯化碳诱导的小鼠肝损伤有明显的改善作用。此外, 绞股蓝还对脑、

肾脏、肺等组织器官具有保护和预防病变作用^[6-8]。

绞股蓝种类繁多, 在我国境内分布就有 14 种之多, 目前对绞股蓝的研究主要集中在对绞股蓝总皂苷的研究上。覃章铮等^[9]曾对早前发现的 84 种绞股蓝皂苷进行过相关的综述性报道。目前又有报道称从绞股蓝中分离出的绞股蓝皂苷已达到 136 种之多^[10]。多样的绞股蓝种类为不同研究需要提供了广阔的选材空间, 本课题组曾研究和比较了绞股蓝总皂苷经过酶及微生物转化前后的相关生物学活性。本文主要报道了对不同产地绞股蓝的总皂苷含量测定和高效液相色谱 (HPLC) 分析, 同时评价了 4 种不同大孔树脂在饱和吸附及不饱和吸附条件下对绞股蓝总皂苷的吸附性能和不同浓度的乙醇对皂苷的洗脱能力。

由于绞股蓝种类繁多, 且同种绞股蓝皂苷含量及组成成分又受到产地土壤结构、采收季节及光照条件等诸多环境因素影响, 这对定量和定性研究绞股蓝总皂苷及其深入的药理药效研究带来一定的不稳定性。本文从全国 6 个不同省份采集绞股蓝全草, 以超声法^[11]提取各个产地的绞股蓝总皂苷, 对其总皂苷含量及所含皂苷成分做初步分析。

1 材料与方法

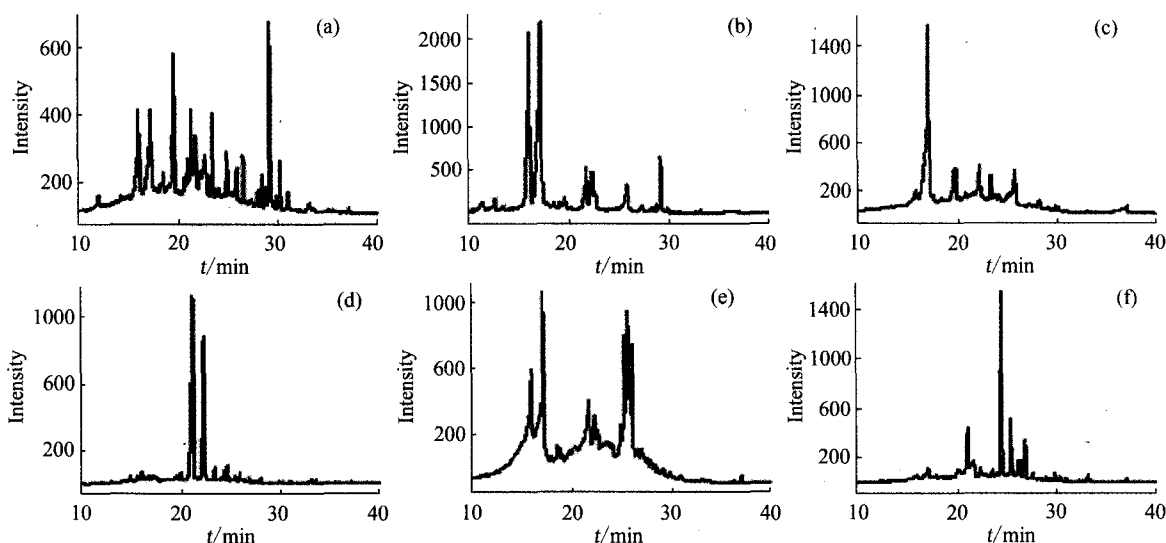
1.1 材料

6 种绞股蓝全草分别取自福建三明、湖北房县、广

收稿日期: 2011-03-19

基金项目: 国家基础科学人才培养基金项目 (J1030626); 厦门市科技创新项目 (3502Z20081143)

* 通信作者: chenqx@xmu.edu.cn



(a)~(f)分别为产自陕西、浙江、云南、福建、广西及湖北地区的绞股蓝总皂苷 HPLC 图谱。

图 1 6 处产地的绞股蓝总皂苷的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of total gypenosides of *G. pentaphyllum* from six provinces

西大瑶山区、云南西双版纳、浙江缙云和陕西平利；标准品人参皂苷 Rb1 购自中国药品生物制品检定所；大孔吸附树脂 D101、HP-20、DM130 为安徽三星树脂科技有限公司；大孔吸附树脂 AB-8 为沧州宝恩吸附材料科技有限公司；薄层层析板为青岛海洋化工厂；色谱纯乙腈为德国 Merck 试剂产品；其他试剂均为国产分析纯；蒸馏水为重蒸水。

1.2 方法

1.2.1 绞股蓝总皂苷的分离提取

绞股蓝总皂苷的提取参考文献[12]，并对其方法进行适当调整。将 6 处产地的绞股蓝全草干燥后，分别剪成小段，粉碎成粉末状。粉碎后绞股蓝用 75% (体积分数，下同) 乙醇 50 °C 超声提取 3 次，每次 50 min。将提取液过滤，合并 3 次提取液，减压浓缩成浸膏状，用蒸馏水定容，获得 6 处产地绞股蓝总皂苷提取液。

1.2.2 HPLC 分析

绞股蓝皂苷具有四环三萜的达玛烷型结构，其紫外最大吸收波长为 203 nm。通过 HPLC 对不同产地绞股蓝总皂苷分析，HPLC 的分析条件为：色谱柱：Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6mm×150 mm, 5 μm)；DAD 检测器，检测波长为 203 nm；柱温：25 °C；流动相流速：1 mL/min；流动相为水(A)/乙腈(B)溶剂系统，洗脱梯度为 0~8 min, V(A) : V(B) = 80 : 20; 8~20 min, V(A) : V(B) = 80 : 20~65 : 35; 20~35 min, V(A) : V(B) = 65 : 35~30 : 70; 35~40 min, V(A) :

V(B) = 30 : 70; 40~50 min, V(A) : V(B) = 30 : 70~0 : 100; 50~60 min, V(A) : V(B) = 0 : 100; 60~70 min, V(A) : V(B) = 0 : 100~80 : 20。

1.2.3 绞股蓝总皂苷含量的测定

按照文献[13]的方法，并作适当调整，称量 Rb1 标准品 20 mg，用水配成 2 mg/mL，在具塞试管中依次分别加入 0, 20, 40, 60, 80 和 100 μL，各管用蒸馏水补齐至 100 μL。然后各加入 1 mL 的质量分数为 5% 香草醛-高氯酸溶液，60 °C 水浴加热 15 min，取出后冷却至室温，加入 2.9 mL 冰醋酸，在 550 nm 下测定各管吸光值，以吸光值作为纵坐标，Rb1 含量作为横坐标，绘制标准曲线。以标准品 Rb1 的测定方法为参照，在相同条件下测定样品液的消光系数，从而计算绞股蓝总皂苷含量。

1.2.4 大孔吸附树脂对绞股蓝总皂苷的吸附和纯化性能的测定

以福建绞股蓝提取液作为测试对象，比较 D101、HP-20、DM130 和 AB-8 这 4 种大孔吸附树脂对绞股蓝总皂苷的吸附和富集纯化性能。大孔吸附树脂经预处理后，各称取 25 g 加入绞股蓝提取液 150 mL，震荡吸附 24 h，取吸附后的上清液作为样品，分别测定吸附前后提取液中的绞股蓝总皂苷含量。将吸附后的大孔吸附树脂分别装柱，蒸馏水冲洗至流出液澄清后，以 70% 乙醇洗脱，收集洗脱液减压浓缩至 150 mL，测定其中的绞股蓝总皂苷含量。按照下列公式计算比吸附量、比解吸附量和解吸率：

$$S_o = (C_o - C_r) \times V / m,$$

$$S_p = C_c \times V / m,$$

$$D_s = (C_o - C_r) / C_o \times 100\%,$$

$$D_o = C_c / (C_o - C_r) \times 100\%,$$

其中, S_o 为比吸附量, 表示每克大孔吸附树脂所吸附的皂苷的质量; C_o 为吸附前提取液浓度; C_r 为吸附后提取液浓度; S_p 为比解吸量, 表示每克大孔树脂饱和和吸附后所能洗脱下来的皂苷的质量; C_c 为洗脱液定容后浓度; V 为溶液体积; m 为大孔吸附树脂质量。 D_s 为吸附率, 表示一定质量的大孔吸附树脂静态吸附的皂苷质量与吸附前的皂苷质量的比值; D_o 为解吸率, 表示一定质量的大孔吸附树脂经洗脱后所得皂苷质量与其吸附皂苷质量的比值。

2 结果与讨论

2.1 绞股蓝总皂苷的 HPLC 图谱

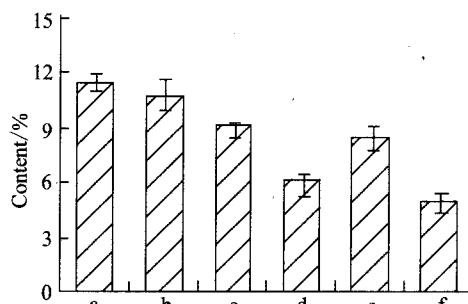
6 处不同产地的绞股蓝总皂苷粗提液, 经 HPLC 分析, 结果表明(图 1)这 6 处产地的绞股蓝所含有的总皂苷组成成分有很大差异。其中, 陕西、浙江和广西地区的绞股蓝总皂苷 HPLC 图谱的峰形相对复杂, 故推测其所含的皂苷种类较多。而云南、福建及湖北地区的绞股蓝总皂苷 HPLC 图谱的峰型则较为简单, 皂苷种类相对较少, 尤其是福建地区的绞股蓝具有两个非常明显的峰, 且杂峰较少。

2.2 不同产地的绞股蓝总皂苷含量

以 Rb1 为标准品, 以样品浓度 X 为横坐标, 吸光值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 获得线性回归方程为 $Y = 0.0146X + 0.0079$, $R^2 = 0.998$ 由标准曲线和回归方程可知标准品 Rb1 在质量浓度为 $0 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 呈良好线性关系。测定湖北房县、广西大瑶山、福建三明、云南西双版纳、浙江缙云和陕西平利这 6 个地区绞股蓝总皂苷含量分别为 11.46%, 10.79%, 9.10%, 6.12%, 8.52% 和 4.93%, 结果如图 2 所示。表明产自湖北和广西地区的绞股蓝总皂苷含量较高, 而陕西和云南地区的绞股蓝总皂苷含量则相对较低。

2.3 大孔吸附树脂对绞股蓝总皂苷比吸附量、比解吸量及解吸率测定

绞股蓝总皂苷经 4 种大孔吸附树脂 24 h 的饱和吸附后, 分别上层析柱用 70% 乙醇洗脱皂苷, 计算测得 4 种大孔吸附树脂 D101、HP-20、DM130 及 AB-8 对绞股蓝总皂苷的比吸附量、比解吸量及解吸率。结果见表 1, 在饱和状态下, D101、HP-20、DM130 及 AB-



a. 湖北; b. 广西; c. 福建; d. 云南; e. 浙江; f. 陕西。

图 2 不同地区绞股蓝总皂苷含量

Fig. 2 The contents of total gypenosides of *G. pentaphyllum* from different areas

表 1 饱和及不饱和吸附条件下 4 种大孔吸附树脂吸附纯化能力比较

Tab. 1 The comparison of the adsorption and purification capacity among four 4 kinds of macroporous resins in saturated and unsaturated conditions

大孔吸附树脂	比吸附量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	比解吸量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	解吸率 (饱和)/ %	吸附率 (不饱和)/ %	解吸率 (不饱和)/ %
D101	245.75	169.92	69.14	95.62	89.25
HP-20	230.96	183.02	79.24	97.09	96.59
DM130	201.37	162.25	80.57	98.40	99.37
AB-8	234.25	146.36	62.48	99.99	90.23

8 的对绞股蓝总皂苷的比吸附量分别为 245.75, 230.96, 201.37 和 234.25 mg/g , 比解吸量分别为 169.92, 183.02, 162.25 和 146.36 mg/g , 解吸率分别为 69.14%, 79.24%, 80.57% 和 62.48%。由此可知饱和状态下 D101 对绞股蓝总皂苷比吸附量最大, 但解吸率较低皂苷不易被洗脱; DM130 对绞股蓝总皂苷比吸附量相对低, 但解析率最高总皂苷较容易用乙醇洗脱; 在柱层析分离纯化皂苷中, 为了防止上样样品的漏液损失, 树脂一般是在不饱和状态下吸附。本实验测定不饱和状态下 D101、HP-20、DM130 及 AB-8 对绞股蓝皂苷的吸附率分别为 95.62%, 97.09%, 98.40% 及 99.99%, 解吸率分别为 89.25%, 96.59%, 99.37% 和 90.23%, 由此可知不饱和状态下 DM130 对绞股蓝总皂苷的解吸率最大, 由此对 4 种大孔吸附树脂比较测定综合评价, DM130 更适合用于绞股蓝总皂苷的富集纯化。

2.4 DM130 纯化绞股蓝乙醇洗脱浓度的选择

参照文献[14]的方法, 经适当修改。选用 DM130 对绞股蓝总皂苷进行纯化, 考察不同体积分数的乙醇

洗脱剂对绞股蓝总皂苷的洗脱能力. 50 g DM130 装于层析柱(3 cm×30 cm), 绞股蓝样品上样吸附后, 采用不同体积分数乙醇溶液梯度洗脱, 每个梯度均洗脱 200 mL, 每管 50 mL 等体积收集, 共收集 20 个组分. 其中 1~4 管为蒸馏水洗脱部分, 5~8 管为 30% 乙醇洗脱部分, 9~12 管为 50% 乙醇洗脱部分, 13~16 管为 70% 乙醇洗脱部分, 17~20 管为 100% 乙醇洗脱部分. 用分光光度法测定每管的总皂苷含量, 以管号为横坐标(X), 总皂苷含量为纵坐标(Y), 绘制 DM130 分离绞股蓝总皂苷的洗脱曲线(图 3), 由洗脱曲线可知绞股蓝总皂苷主要集中在 50% 及 70% 的乙醇洗脱液中, 其他体积分数乙醇的洗脱液中含有的总皂苷量都较少, 因此用 DM130 纯化绞股蓝总皂苷用水冲洗去除水溶性色素和多糖后, 可直接选用 70% 乙醇为洗脱剂, 即可把皂苷从树脂中洗脱下来.

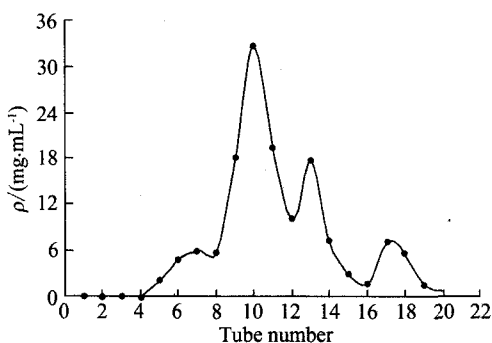


图 3 DM130 纯化绞股蓝总皂苷的洗脱曲线

Fig. 3 The curve of total gypenosides by gradient elution of ethanol of macroporous resins DM130

3 讨论

生长环境对绞股蓝的生长及皂苷的产量有重要影响, 且各产地的绞股蓝品种也不尽相同. 本文通过 HPLC 分析比较不同产地绞股蓝总皂苷组成成分的差异性, 结果表明不同产地绞股蓝总皂苷成分差异明显, 因此可通过 HPLC 指纹图谱鉴别不同产地绞股蓝品种. 皂苷是绞股蓝发挥其药理活性的主要化学成分, 选择总皂苷含量较高的绞股蓝品种可直接提高绞股蓝的经济价值. 本文比较不同产地绞股蓝总皂苷含量, 对绞股蓝的开发利用和深入研究有一定的参考意义.

大孔吸附树脂目前在天然产物纯化中广泛应用, 用于皂苷纯化的树脂型号也较多, 如: 王笏^[13]将 D101 用于西洋参中人参皂苷的分离纯化, 郑军献^[15]等将 AB-8 用于白芍总皂苷的分离, 王治平^[16]等以 XDA-5

优化黄芪总皂苷的纯化工艺. 树脂有极性、非极性和弱极性树脂之分, 且树脂的孔径大小和连接基团的差异都对皂苷的吸附产生影响. 本文以静态吸附和动态洗脱这两种方式, 分别比较了在饱和吸附及不饱和吸附条件下, 4 种不同的大孔吸附树脂 D101、HP-20、DM130 及 AB-8 对绞股蓝总皂苷的吸附性能, 结果表明 DM130 对绞股蓝总皂苷具有很强的吸附能力, 且能够被乙醇有效地洗脱下来, 适合用于绞股蓝总皂苷的纯化制备.

参考文献:

- [1] 张涛, 袁弟顺. 绞股蓝的功效成分与绞股蓝皂甙研究进展[J]. 江西农业学报, 2008, 20(9): 60-63.
- [2] Megalli S, Davies N M, Roufogalis B D. Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat[J]. J Pharm Pharm Sci, 2006, 3(9): 281-291.
- [3] Circosta C, de Pasquale R, Occhiuto F, et al. Cardiovascular effects of the aqueous extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino[J]. Phytomedicine, 2005, 12(9): 638-643.
- [4] Chen J C, Chung J G, Chen L D. Gypenoside induces apoptosis in human Hep3B and HA22T tumour cells[J]. Cytobios, 1999, 393(100): 37-48.
- [5] 肖增平, 吉爱国, 宋淑亮, 等. 绞股蓝多糖对小鼠四氯化碳肝损伤的保护作用[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(3): 186-188.
- [6] 王竹筠, 邱培伦. 绞股蓝总皂甙对家兔急性不完全性脑缺血的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1992, 3(6): 204-206.
- [7] 狄灵, 孙万森, 吴喜利, 等. 绞股蓝总皂甙对肾性贫血大鼠血浆促红细胞生成素含量的影响[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2003, 3(24): 273-274.
- [8] Circosta C, de Pasquale R, Palumbo D R, et al. Bronchodilatory effects of the aqueous extract of *Gynostemma pentaphyllum* and gypenosides III and VIII in anaesthetized guinea-pigs[J]. J Pharm Pharmacol, 2005, 8(57): 1053-1058.
- [9] 覃章铮, 赵蕾, 毕世荣, 等. 绞股蓝的皂苷成份及资源[J]. 天然产物研究与与开发, 1992, 4(1): 83-98.
- [10] 沈宏伟, 肖彦春, 车仁国, 等. 绞股蓝化学成分研究的现状[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1561-1564.
- [11] 赵兵, 王玉春, 欧阳藩, 等. 超声波在植物提取中的应用[J]. 中草药, 1999, 30(9): 284-286.
- [12] 谭文, 陶湘辉, 周跃斌. 绞股蓝皂苷提取工艺的研究[J]. 科技资讯, 2008(14): 103-104.
- [13] 王笏, 袁崇均, 陈帅, 等. 大孔吸附树脂和丙酮沉淀分离

- 纯化西洋参中人参二醇类和三醇类皂苷[J]. 四川中医, 2007, 25(10): 31-33.
- [14] 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): 4-6.
- [15] 郑军献, 浦锦宝, 胡轶娟, 等. 大孔吸附树脂分离纯化白芍总皂苷的研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(11): 38-40.
- [16] 王治平, 高英, 李卫民, 等. 大孔吸附树脂纯化黄芪总黄酮和总皂苷的研究[J]. 中药材, 2010, 33(7): 1163-1166.

Analysis and Purification of Total Gypenosides Sourced from Different Dreas

QIN Jiang¹, CHEN Liang-hua^{1,2}, LIU Xuan¹, ZHANG Shu-feng²,
TONG Qing-xuan², CHEN Qing-xi^{1*}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. The Research and Development Center for Medicine Plant and Plant Drugs, Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen 361002, China)

Abstract: Content and composing analyses of the total gypenosides of these six kinds of gypenoside of *Gynostemma pentaphyllum* sourced from Fujian, Hubei, Guangxi, Yunnan, Zhejiang and Shanxi provinces of China were made by ultraviolet-visible spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC). It was found that the *G. pentaphyllum* from Hubei province got the highest content of total gypenosides of 11.46%, while the Fujian got 9.1%. It was showed from the HPLC fingerprints that the composing of the total gypenosides of *G. pentaphyllum* sourced from Shanxi, Zhejiang and Guangxi were much complex than Fujian, Yunnan and Hubei. The capability of adsorption and purification of these four kinds of macroporous resins named D101, HP-20, DM130 and AB-8 respectively were studied by means of static sorption and dynamic desorption. The result showed that DM130 got the best effect of adsorption and purification among these four in two conditions. Meanwhile, the optimum concentration of alcohol was established associated with the dynamic desorption method and it was proved that the most of gypenosides can be eluted by 70% alcohol.

Key words: total gypenosides; macroporous resin; HPLC