

G-821 树脂提取三七叶皂苷的工艺研究

刘 睿, 高 巨, 王春红, 施荣富*

(南开大学 功能高分子材料教育部重点实验室, 高分子化学研究所, 天津 300071)

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的块根, 具有活血化瘀、消肿止痛的作用, 且能滋补强身。其主要活性成分为三七总皂苷。三七叶与块根有相似的药理作用, 其主要活性成分亦为三七总皂苷, 以人参皂苷 Rb_1 、 Rg_1 、Re 和三七皂苷 R_1 为主要成分。对于三七叶中有效成分的提取常采用传统的溶剂法、平面色谱和硅胶柱色谱等^[1]。但是这些方法或者工艺落后、产品质量分数不高, 或者不利于大规模生产。目前树脂吸附法已用于分离纯化已知活性天然产物, 并显示出高效、简单、快速、适于产业化等诸多优点。因此, 本实验采用树脂吸附法提取三七叶总皂苷, 使其达到较高的质量分数。在筛选了 AB-8、D-380、G-821 树脂后, 发现强极性树脂 G-821 对三七叶皂苷的分离纯化有良好的作用。

1 材料与仪器

三七叶购于云南省文山州; 甲醇、乙腈为色谱纯; 人参皂苷 Re、 Rg_1 、 Rb_1 和三七皂苷 R_1 对照品均购于中国药品生物制品检定所; G-821 树脂由本实验室合成; AB-8 树脂、D-380 树脂由南开和成公司提供。Waters 高效液相色谱仪: Waters 510 HPLC 泵, Waters 484 紫外检测器。

2 方法和结果

2.1 上样液的制备: 取 10 g 粉碎的干三七叶, 投入到带有搅拌的三口瓶中, 加入 100 mL 70% 乙醇, 升温至 60 ℃, 搅拌提取 3 次, 每次各 1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 用 95% 乙醇沉淀, 至不再产生沉淀为止, 滤过除去沉淀, 旋转蒸发除去乙醇, 定容到 100 mL, 即得。

2.2 定量成分的确定: 三七总皂苷的成分中主要包含人参皂苷 Rb_1 、Re、 Rg_1 和三七皂苷 R_1 , 但是这 4 种成分的 HPLC 法检测很难在同一个流动相里实现^[5], 因此采用流动相水-乙腈(80:20)用于测定人参皂苷 Re、 Rg_1 、三七皂苷 R_1 , 水-乙腈(69:31)用于测定人参皂苷 Rb_1 , 结果见图 1。可见三七叶皂

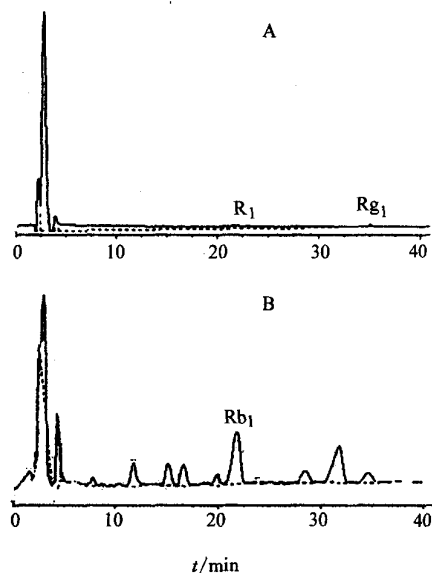


图 1 三七叶皂苷中人参皂苷 Rg_1 、三七皂苷 R_1 (A) 和人参皂苷 Rb_1 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of ginsenosides Rg_1 , and notoginsenoside R_1 (A) and ginsenoside Rb_1 (B) from *P. notoginseng* leaves saponins

苷成分中人参皂苷 Rb_1 的量较大, 人参皂苷 Rg_1 、Re 和三七皂苷 R_1 的量很小, 因此选用人参皂苷 Rb_1 作为衡量三七叶皂苷的一个参照。

2.3 色谱条件: Turner Kromasil C_{18} 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 水-乙腈(69:31); 体积流量为 0.8 mL/min; 检测波长为 210 nm; 柱温为常温。

2.4 标准曲线的绘制: 精确配制 4 mg/mL 人参皂苷 Rb_1 对照品溶液, 分别稀释 2、4、5、10、20 倍, 进样测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 线性回归, 得曲线方程 $Y = 1.645 \times 10^{-7} X + 0.0279$, $r = 0.9961$ 。

2.5 相关指标的确定: 收率以得到人参皂苷 Rb_1 的质量与提取使用三七叶的质量相比计算而得, 质量分数以三七叶皂苷中人参皂苷 Rb_1 的比例表示。

2.6 树脂的比较: 分别用 3 种树脂对提取的三七叶

溶液进行了吸附,结果见表 1。可以看出 G-821 树脂对分离纯化三七叶皂苷的效果明显好于其他两种树脂。

表 1 3 种树脂的比较

Table 1 Comparison of three resins' capability			
树 脂	类 型	效 果	人 参 皂 苷 Rb ₁ 质量分数/%
AB-8	弱极性树脂 —COOR	提取的皂苷含有大量杂质	68
D-380	极性树脂—NH ₂	吸附的皂苷不能被洗脱	0
G-821	强极性树脂 —NR ₄ ⁺	较好地分离色素、杂质和有效成分	83

2.7 吸附和洗脱性能的研究:G-821 树脂的床体积为 15 mL,吸附时流量为 1 BV/h,吸附完成后用水洗去其中的杂质。然后分别用 2 倍床体积(BV)的 30%、50%、70%、95%乙醇,以流量为 1 BV/h 对吸附在 G-821 树脂上的三七叶皂苷进行洗脱。收集洗脱液,测定其中人参皂苷 Rb₁ 的质量浓度,分别为 6.898、7.732、12.396、3.259 mg/mL。可以看出,70%乙醇的洗脱性能最好。

2.8 树脂的吸附和洗脱曲线:G-821 树脂为季胺基功能基树脂,装柱 15 mL,通过处理,转换为 NH₄⁺Cl⁻型树脂^[2]。将转为水相的清亮的提取液上柱,上柱液质量浓度为 6.037 mg/mL,流量为 1 BV/h,每 15 min 收集一次,进行 HPLC 法测定,得到树脂吸附曲线,见图 2。可以看出,G-821 的工作吸附量为 5BV 的提取液,相当于每克树脂可以吸附 75 mg 的三七叶皂苷;饱和吸附量为 7 倍床体积,相当于每克树脂可以提纯 100 mg 以上的三七叶皂苷。

吸附结束后,以 3 倍床体积水洗去杂质,然后用 70%乙醇溶液以 1 BV/h 进行洗脱,每 15 min 收集一次,进行 HPLC 法测定,得到树脂动态洗脱性能曲线,见图 3。可以看出,只要用 2 倍床体积的洗脱剂就能达到洗脱的目的,70%乙醇对吸附在 G-821 上的三七叶皂苷洗脱能够达到少量、快速的要求,洗脱性能良好。

2.9 树脂的再生和重复试验:将 G-821 树脂用乙醇进行再生,进行重复试验,每个周期后再用同样的方法再生,结果见表 2。可以看出,树脂的性能稳定,再生性和重复性良好。

3 讨论

实验中发现,如果用 1BV 和 2BV 水来洗,得到的三七叶皂苷粗提物发黏,含有较多的杂质;用

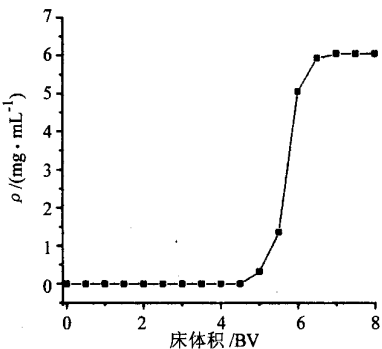


图 2 G-821 树脂对三七叶皂苷的吸附曲线
Fig. 2 Adsorption curve of *P. notoginseng* leaves on G-821 resin

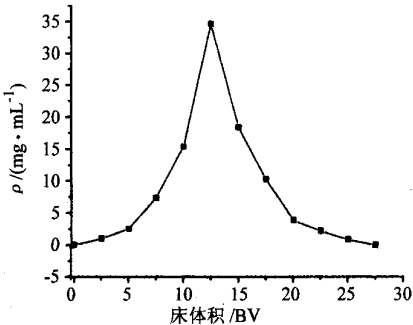


图 3 G-821 树脂动态洗脱性能曲线
Fig. 3 Stripping curve of *P. notoginseng* leaves on G-821 resin

表 2 G-821 树脂再生后的结果

Table 2 Results of regenerating G-821 resin		
再生次数	人 参 皂 苷 Rb ₁ 收率/%	人 参 皂 苷 Rb ₁ 质量分数/%
第 1 次	4.02	82.6
第 2 次	3.99	83.9
第 3 次	4.02	82.8
第 4 次	4.07	82.1
第 5 次	3.95	83.5

3BV 水洗时,杂质较少,而用 4BV 水洗时,产率降低。所以选用 3BV 水来洗除杂质。

树脂对三七叶皂苷的吸附量很大,1 g 树脂一次能够处理 7.5~10 g 三七叶,经过树脂除去杂质后,最后收率为 4.05%,质量分数为 83.4%。笔者在工厂进行了中试规模的生产,干三七叶投料 2.1 t,分 25 批生产,最后得到了约 87.5 kg 三七叶皂苷,产率都在 4%以上,质量分数在 80%~85%,与文献报道相符^[3]。

本实验采用的溶剂主要是水和乙醇。在提取分离三七叶总皂苷的整个工艺中不使用和接触其他有机溶剂,因而“三废”无污染,生产环保安全,实现真正意义上的天然、绿色产品。

References:

[1] Xu X X, Xia L Z, Gao J R. Capability of macroporous ad-

- sorption resin on separate and pure *Panax notoginseng* [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2003, 1(10): 79.
- [2] Ou L L, Shi Z Q, Shi R F, et al. Studies on separation and purification of saponins from *Panax notoginseng* with strong-

ly polar macroporous adsorption resin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药) 2003, 34(10): 905.

- [3] Geng J L, Shen Y, Song X W. Developments studies on saponins in *Panax notoginseng* leaves [J]. *J Yunnan Coll Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 2001, 24(3): 7.

罗布麻、绿茶及其配伍对活性氧清除能力的比较

徐仰仓

(天津科技大学 海洋生物制品研究室, 天津 300457)

茶叶中含有多种对人体健康有益的物质,能有效清除氧自由基和脂类自由基,预防脂质过氧化,提高血清 SOD 酶的活性,延缓衰老^[1]。罗布麻茶是近年来常见的一种保健茶,具有清除过氧亚硝酸离子^[2],清除羟自由基^[3],抑制脂质过氧化^[4],提高血清中 SOD、CAT 和 GSH-PX 酶活性的作用^[5]。罗布麻和绿茶的抗氧化能力的差别以及将两者混合,实现功能互补还未见研究报道。因此本实验考察了绿茶和罗布麻抗氧化能力的差异以及两者混合后抗氧化能力的改变。

1 仪器与材料

AL204 电子天平(梅特勒-托利多上海有限公司),752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器有限公司),电热恒温水浴锅(天津市中环实验电炉有限公司)。

芦丁、氮蓝四唑(NBT)为 Sigma 公司产品,核黄素、血红蛋白为生化试剂,其他试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

罗布麻干叶和绿茶干叶购自天津市中新药业药店,产地均为云南。

2 方法和结果

2.1 样品溶液的制备:罗布麻干叶和绿茶干叶购回后,以芦丁为对照,采用 UV 法测定其中黄酮的量^[6],结果罗布麻干叶中的黄酮的质量分数为 45.2 mg/g,茶叶中的黄酮的质量分数为 79.6 mg/g。将 100%罗布麻、50%罗布麻+50%绿茶,100%绿茶 3 种配伍样品以 50%乙醇 37℃水浴浸提 24 h,减压浓缩至 20 mL,即得罗布麻、罗布麻+绿茶、绿茶醇提液。

2.2 提取液对超氧阴离子(O_2^-)的清除作用:采用核黄素-NBT 还原法^[7]测定。0.1 mL 醇提液、0.2 mL 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mL 1.5 mmol/L NBT, 2.55 mL 磷酸缓冲液(pH 7.8), 0.05 mL 0.12 mmol/L 核黄素组成反应体系,25℃下光照 10 min,在 560 nm 波长下测定样品组吸光度(A_1)值,同法以水为对照组成反应体系,测定对照组吸光度(A_2)值,计算清除率[清除率=($A_2 - A_1$)/ $A_2 \times 100\%$]。结果茶叶、茶叶+罗布麻和罗布麻醇提液的清除率分别为 71.4%、52.3%、38.1%($n=3$)。可见茶叶醇提液的清除效果最好,茶叶+罗布麻醇提液的清除效果次之,罗布麻醇提液的清除效果最差。

2.3 对羟自由基($\cdot OH$)的清除作用: $\cdot OH$ 自由基由 Fenton 反应产生,采用水杨酸比色法测定 $\cdot OH$ 自由基^[7]。0.5 mL 10 mmol/L 水杨酸,样品组采用 2.8 mL 0.4 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)+0.2 mL 醇提液,对照组采用 3.0 mL 0.4 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4), 0.5 mL 3.8 mmol/L Fe^{2+} -EDTA 溶液, 1 mL 4 mmol/L H_2O_2 组成反应体系,25℃反应 90 min 后,用乙醚抽提 2,3-二羟基苯甲酸,分别在 510 nm 波长处测定样品组吸光度(A_1)和对照组吸光度(A_2),计算清除率[清除率=($A_2 - A_1$)/ $A_2 \times 100\%$]。结果茶叶、茶叶+罗布麻和罗布麻醇提液的清除率分别为 18.6%、48.8%、69.8%($n=3$)。可见茶叶醇提液对 $\cdot OH$ 的清除效果最差,茶叶+罗布麻醇提液的清除效果次之,罗布麻醇提液的清除效果最好。

2.4 对过氧化氢(H_2O_2)的清除作用:采用碘化钾

收稿日期:2006-09-19

基金项目:国家自然科学基金项目(30670493);天津市高等学校科技发展基金项目(20040711)

作者简介:徐仰仓(1964—),男,甘肃人,副教授,博士(后),从事自由基研究,在该领域内发表学术论文 20 余篇,获省部级奖 1 项。

Tel: (022)60601458 Fax: (022)60600358 E-mail: xuyc@tust.edu.cn