

中国临床药理学杂志, 2004, 20(1): 72-75.

[3] 牟永平, 吴刚, 周立社, 等. Caco-2细胞模型在药物研究中的应用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(5): 536-539.

[4] Meunier V, Bourrie M, Berger Y. The human intestinal epithelial cell line Caco-2: pharmacological and pharmacokinetic applications[J]. *Cell Biol Toxicol*, 1995, 11(3-4): 187-194.

[5] Gan L L, Dhiren R T. Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23(1): 77.

[6] Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (clonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in manfact or myth[J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763-766.

泡沫分离法分离重楼中重楼皂苷的工艺研究

兰洁, 李锐, 韩丽, 杨明*, 王瑾
(成都中医药大学药学院, 四川 成都 611130)

摘要: 目的 研究泡沫分离法分离重楼皂苷的半间歇式操作工艺。方法 以富集比、回收率、纯度比为评价指标, 对操作方式、气流速度、进料浓度、pH 值、进料体积、温度进行单因素考察, 研究其对泡沫分离效果的影响。结果 在气流速度为400 mL/min, 进料质量浓度约为0.3 mg/mL, pH 7, 液相高度维持在30 cm, 温度为40℃时, 重楼皂苷泡沫分离的富集比为25.7, 回收率为42.1%, 泡沫液总皂苷纯度为41.4%, 相比原料液纯度提高4.5倍。结论 泡沫分离技术可较好地用于重楼中皂苷的分离。

关键词: 重楼皂苷; 泡沫分离; 富集比; 回收率; 纯度比

中图分类号: R 286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)01-0044-04

Separation of polyphyllin from *Rhizoma Paridis* by foam fractionation technique

LAN Jie, LI Rui, HAN Li, YANG Ming, WANG Jin

(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China)

Abstract: Objective To study the process of foam fractionation of polyphyllin in semi-batch mode.

Methods Taking enrichment ratio, recovery rate of polyphyllin, and purity ratio as the performance criteria and using single examining method to examine the operational parameters, i.e. operation mode, air flow rate, initial feed concentration, solution pH value, initial feed height and temperature on separation performance. The optimal conditions of the process were obtained finally. **Results** The separation performance is good when gas flow rate is 400 mL/min, initial feed concentration (polyphyllin content) is 0.3 mg/mL, pH value is 7, feed height is 30 cm, and feed temperature is 40℃. The enrichment ratio is 25.7, recovery ratio is 42.1%, and the foam liquid purity of total polyphyllin is 41.4%, which is 4.5 times higher than that in feed purity. **Conclusion** Foam fractionation technique could be applied to separate polyphyllin.

Key words: polyphyllin; foam fractionation; enrichment ratio; recovery rate; purity ratio

重楼为百合科植物云南重楼或七叶一枝花的干燥根茎, 主要有效成分是甾体皂苷。甾体皂苷按苷元的不同分为两类: 一类为薯蓣皂苷元(diosgenin)的糖苷, 另一类为偏诺皂苷元(pennogenin)的糖苷, 连接的糖主要有D-葡萄糖、L-鼠李糖和L-呋喃阿拉伯糖3种^[1]。重楼皂苷具备了两亲性分子结构, 具有表面活性, 其水提液轻微振摇即可产生丰富的泡沫。泡沫分离技术是根据表面吸附原理, 基于溶液中溶质

(或颗粒) 间表面活性的差异, 表面活性强的物质优先吸附于分散相与连续相的界面处, 通过鼓泡使溶质选择性的聚集在气-液界面并借助浮力上升至溶液主体上方形成泡沫层, 从而分离、浓缩溶质或净化液相主体的过程^[2]。中药中皂苷类成分具有亲水性的糖体和疏水性的皂苷元, 是一种优良的天然表面活性成分, 在强烈搅拌或沸腾时就能产生稳定的泡沫, 并且泡沫反应也是鉴别中药皂苷类成分常用的

* 收稿日期: 2007-02-25

基金项目: 国家“十五”科技攻关重点项目(2004BA721A43)

作者简介: 兰洁(1982—), 女, 四川崇州人, 在读硕士生, 研究方向: 中药新制剂和新剂型的研究。E-mail: jane_blue77@yahoo.com.cn

* 通讯作者 杨明 Tel: (028) 61800456 E-mail: yangming16@126.com

定性分析方法^[3]。根据泡沫分离技术的原理和中药皂苷类成分的理化性质,将此技术应用于分离、富集中药粗提液中具有表面活性的皂苷类成分,是对泡沫分离技术现代应用研究的大胆延伸,也是中药领域的一大创新。已有报道应用该技术用于人参皂苷^[3]、甘草皂苷^[4]、三七皂苷^[5]的分离。本研究以重楼提取液为分离对象,采用自制泡沫分离装置,单因素试验考察重楼皂苷的泡沫分离工艺操作方式和操作参数,如气流速度、进料质量浓度、pH值、温度、液相高度、回流速度对泡沫分离过程的影响,以筛选最佳工艺条件。

1 仪器与材料

UV—1700 紫外分光光度计(日本岛津);FA 1104 型电子天秤(上海精科天平厂);自制的泡沫分离塔^[6]。

薯蓣皂苷元(中国药品生物制品检定所提供,供定量测定用,批号1539-200001)。高氯酸、盐酸、氢氧化钠、正丁醇、95%乙醇均为分析纯,水为重蒸水。

重楼饮片购自四川德仁堂中药饮片公司,经笔者鉴定为七叶一枝花的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 原料液的制备:重楼饮片100 g(药材中含重楼总皂苷为2.57%),加12倍量70%乙醇热回流提取3次,每次2 h,滤除药渣,合并药液。取适量重楼提取液,回收乙醇至无醇味,高速离心。取上清液作为待处理的原料液(其中总皂苷的质量浓度为1.66 mg/mL)。

2.2 泡沫分离操作方法:将原料液加入分离塔中,再从塔底通气,富集得到的泡沫由塔顶排入贮槽,而经泡沫分离得到的残留液则由塔底排出。分别测定原料液、泡沫液、残留液中重楼总皂苷和固性物的量,计算回收率、富集比和质量分数以筛选出重楼总皂苷的最佳泡沫分离工艺条件。

2.3 评价指标的规定:以富集比、回收率和纯度比评价泡沫分离效果

回收率=泡沫液中重楼总皂苷的总质量/原料液中重楼总皂苷的总质量×100%

纯度比=泡沫液中重楼总皂苷的纯度(%) / 原料液中重楼总皂苷纯度(%)

纯度=药液中的总皂苷的质量/药液浓缩得固形物的质量×100%

富集比=泡沫液中重楼总皂苷的质量浓度/原料液中重楼总皂苷质量浓度

固形物的测定:移取25或50 mL(V)考察对象,

置于已恒重的蒸发皿中(质量为 M_2),水浴挥干,再置于105℃烘箱中烘干,称量其质量(质量为 M_1),计算 $(M_2 - M_1) / V$,作为固形物质量浓度。

2.4 重楼总皂苷的测定

2.4.1 供试品溶液的制备:分别移取原料液、分离所得的泡沫液或者残留液10 mL,用水饱和正丁醇萃取4次,每次10 mL,合并萃取液,挥干溶剂,残渣用95%乙醇溶解,转移至25 mL量瓶中,并加至刻度。

2.4.2 对照品溶液的制备:精密称取薯蓣皂苷元对照品5 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.4.3 标准曲线的制备:取薯蓣皂苷元对照品约5.6 mg,精密称定,置10 mL量瓶中,用甲醇溶解定容,摇匀得对照品溶液。精密吸取对照品溶液50、75、125、175、225、250 μ L,于10 mL试管中,挥干溶剂后,分别加入5 mL高氯酸,于65℃水浴加热15 min,取出,置冰水浴中冷却,在407 nm处测定吸光度值。以测定样品质量对吸光度值进行回归,得标准曲线: $A = 0.0071X - 0.0814$, $r = 0.9998$ 。

2.4.4 测定:精密移取对照品溶液和供试品溶液各200 μ L,于10 mL空白试管中,挥干溶剂,加入5 mL高氯酸显色,摇匀,于65℃水浴恒温15 min^[7],取出冰水浴冷却2 min,以高氯酸为空白,在407 nm测定吸光度值,并计算质量浓度。

2.5 操作方式的选择:泡沫分离操作方式一般分为间歇式和连续式两类。间歇式与连续式的设备很相似,只是没有添加药液的回流装置^[8]。连续式又可分为简单塔、提馏塔、精馏塔和复合塔^[8]。间歇式操作简单,药液一次性倒入,可得到富集比较高的泡沫,但其属于不稳定操作,相关组成相关的参数都在变化,如分离塔底部料液浓度、液相高度等。而连续式操作可维持液相高度不变,但液相是流动的,与气泡接触时间不够长,而回收率偏低。综合考虑几种操作方式及实验条件,本实验在半间歇式下(残液返回加料槽中),比较了简单塔(分离塔底部加料)、提馏塔I(分离塔中部加料)和提馏塔II(分离塔顶部加料)对泡沫分离效果的影响,结果见表1。可见提馏塔式比简单塔式的结果较好。因为原料液在分离塔内逆向与上升气泡流接触、传质,在不改变液相高度和泡沫层高度的同时,延长了气液传质时间,吸附量增大,回收率升高。但同时延缓了泡沫的排液,富集比有所下降。当进料口位置升高时,这种作用更明显,泡沫夹带太多液体,来不及排液就带出分离塔,故富集比下降至4.54,泡沫液纯度也下降。因此,选用提馏式,进料口高度适中,可得到较好的操作结果。

表1 操作方式对富集比、回收率和纯度比的影响

Table 1 Effect of operation modes on enrichment ratio, recovery rate, and purity ratio

操作方式	富集比	回收率/%	纯度比
简单塔	23.60	16.52	3.33
蒸馏塔	19.17	17.25	4.12
提馏塔	4.70	28.22	2.09

2.6 气流速度的影响: 在同台设备上, 室温下进行半间歇式操作, 液相高度为 30 cm、进料总皂苷质量浓度为 0.4 mg/mL、pH 7, 考察不同气流速度对分离效果的影响, 见图1。可见随着气流速度的增大, 富集比呈下降趋势, 纯度比也下降。因为气流速度加快, 气泡在分离设备中停留时间短, 表面活性物质吸附时间缩短, 且含液量增多, 故富集比和纯度提高比降低。气流量的增加, 可以增大界面面积, 从而有利于溶质的分离, 但由于泡沫量的增加, 夹带量也增多, 溶质随夹带液体进入泡沫液, 故回收率提高。纯度比也随着气流速度的提高而降低, 说明气流速度越快, 不利于选择性吸附, 因为各物质传质速率不同, 气泡在分离塔中停留时间会影响吸附到气液界面上皂苷和其他物质的量。综合几个评价指标, 气流速度为 400 mL/min 时分离效果较好。

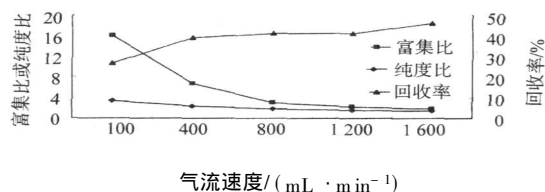


图1 气流速度对富集比、回收率和纯度比的影响

Fig. 1 Effect of air flow rate on enrichment ratio, recovery rate, and purity ratio

2.7 进料中总皂苷质量浓度的影响: 在同台设备上, 室温下进行半间歇式操作, 气流速度为 400 mL/min, 液面高度为 30 cm、pH 7, 考察不同进料中总皂苷质量浓度(将制得的重楼总皂苷质量浓度为 1.66 mg/mL 的原料液依次加水稀释 0、2、3、4、6、8、12 倍)对分离效果的影响, 见图2。可见, 质量浓度较低时, 富集比较高。因为质量浓度较低时, 生成的泡沫较大, 较不稳定, 聚并破碎情况较多, 因此液体夹带量少, 富集比较高, 但因为泡沫总表面积小, 吸附的物质少, 回收率低。随着质量浓度增大, 易生成大量细密、稳定的泡沫, 不易排液, 聚并破碎情况较少, 虽然吸附量增多, 回收率有所上升, 但富集比被削弱。纯度比变化趋势与富集比相似, 当质量浓度增大时, 原料液中其他物质竞争吸附作用增大, 泡沫液中总皂苷纯度会降低。综合各指标, 当原料液中总皂苷质量浓度在

0.3 mg/mL 附近时, 可得到较好的分离效果。

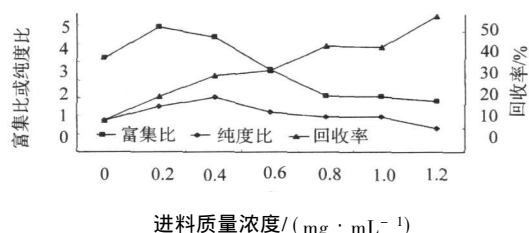


图2 进料浓度对富集比、回收率和纯度比的影响

Fig. 2 Effect of initial feed concentration on enrichment ratio, recovery rate, and purity ratio

2.8 pH 值的影响: 同台设备上, 室温下进行半间歇式操作, 气流速度为 400 mL/min、液相高度为 30 cm、进料液中总皂苷质量浓度为 0.4 mg/mL, 考察不同原料液 pH 值对分离效果的影响, 见图3。重楼原料液为中性体系, 改变 pH 值对纯度比影响不大, 而富集比在碱性时降低, 回收率在酸性时下降明显。当原料液调至酸性, 泡沫稳定性变差, 泡沫破裂聚并情况增多, 分离平衡时间急剧缩短, 收集到的泡沫液很少, 故回收率降低。当原料液调至碱性时, 药液溶解性改善, 起泡性增强, 泡沫体积略有增加, 故回收率略有增加, 但富集比降低。综合来看, 调节 pH 值不能提高重楼皂苷泡沫分离效果, 甚至降低其分离效果。这可能与重楼皂苷为中性皂苷, pH 值的变化虽对其溶解状态无太大影响, 但会影响原料液中其他组分的溶解性, 同时也改变了体系的离子强度和电荷分布, 对于体系的表面张力及溶质在气液界面处的吸附、泡沫的排液和泡沫的稳定性都产生一定的影响, 从而降低了分离效果。

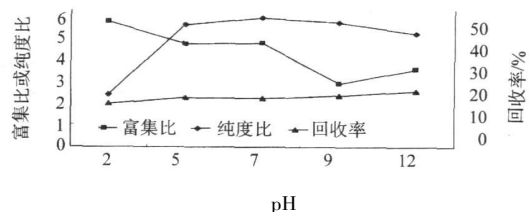


图3 pH 值对富集比、回收率和纯度比的影响

Fig. 3 Effect of solution pH value on enrichment ratio, recovery rate, and purity ratio

2.9 液相高度的影响: 同台设备上, 室温下进行半间歇式操作, 气流速度为 400 mL/min、进料液中总皂苷质量浓度为 0.4 mg/mL、pH 7, 考察不同液相高度对分离效果的影响, 见图4。可见富集比和纯度提高比随液相高度的增加而降低。设备固定, 高度不变的情况下, 增加液面高度, 可延长液相与气相接触时间, 有利于吸附传质, 但同时会缩短泡沫层高度, 而导致泡沫排液时间减少, 持液量增加, 而影响了富

集比和纯度。合适的液面高度应既能增加物质吸附,同时也保证一定的泡沫层高度利于排液。综合各指标,当液相高度在 30 cm 时,泡沫分离效果较佳。

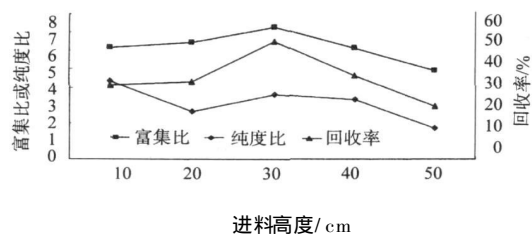


图4 液相高度对富集比、回收率和纯度比的影响

Fig. 4 Effect of initial feed height on enrichment ratio, recovery rate, and purity ratio

2. 10 温度的影响: 同台设备上, 进行半间歇式操作, 气流速度为 400 mL/min、进料液中总皂苷质量浓度为 0.4 mg/mL、液相高度为 30 cm, pH 7, 考察不同温度对分离效果的影响, 见图5。可见温度对纯度比影响不大, 即对泡沫分离的选择性无太大影响, 主要影响富集比和回收率。实验过程中, 温度升高, 药液的起泡性有较大改善, 收集的泡沫液明显增多。并且温度的升高会降低泡沫液膜的表面黏度, 减小了扩散阻力, 吸附阻力降低, 吸附量增大, 但表面黏度是泡沫稳定性的主要影响因素^[9], 当黏度减小时, 泡沫液膜易变薄, 泡沫不稳定, 容易破裂。因此只有温度适宜才能得到好的泡沫分离效果, 即当原料液温度为 40 ℃ 时, 分离效果较好。

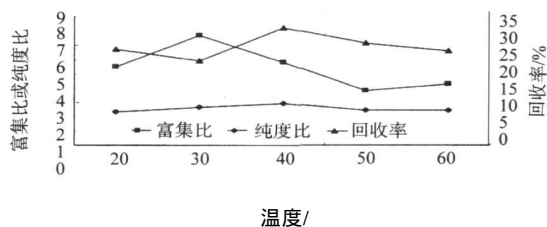


图5 温度对富集比、回收率和纯度比的影响

Fig. 5 Effect of feed temperature on enrichment ratio, recovery rate, and purity ratio

2. 11 验证试验: 根据考察所得的优化工艺条件, 进行最佳工艺验证试验。称取重楼饮片 200 g, 制备原料液, 将原料液稀释 6 倍, 以重楼总皂苷计约为 0.3 mg/mL, 量取 10 L 药液从塔中部恒速加料, 维持液相高度 30 cm, 残液回流至贮液槽, 气流速度为 400 mL/min, 温度为 40 ℃, pH 7 条件下进行 3 次泡沫分离试验, 结果见表 2。

3 讨论

重楼皂苷是一种具有表面活性的中药有效成

表2 验证试验结果

Table 2 Verification of technique under optimal conditions

批号	富集比	回收率 / %	纯度比	泡沫纯度 / %
1	26.93	41.53	4.55	39.99
2	24.57	45.03	4.61	45.22
3	25.61	39.65	4.32	38.93

分, 其药液具有良好的起泡性和泡沫稳定性, 具备了泡沫分离的前提条件。本实验探讨了操作模式、气流速度、进料质量浓度、pH 值、液相高度、温度对重楼皂苷的半间歇式泡沫分离效果的影响。低气流速度、低原料液质量浓度可得到高富集比和泡沫液纯度, 而高回收率则需要高气速、高液相高度、高原料液质量浓度和适当温度(以提高起泡性); 药液 pH 值改变不能改善分离效果。综合考虑各评价指标, 对操作条件进行筛选, 以优化的工艺进行泡沫分离, 即气流速度为 400 mL/min, 进料质量浓度约为 0.3 mg/mL, pH 7, 液相高度维持在 30 cm, 温度为 40 ℃。结果重楼总皂苷富集比为 25.7, 泡沫液总皂苷纯度为 41.4%, 是原料液纯度的 4.5 倍, 但回收率欠佳, 为 42.1%。针对工艺回收率偏低的问题, 有望在今后的研究中通过改进设备、添加起泡剂或稳泡剂、技术耦合等方法得以解决。

目前重楼皂苷的提取、分离工艺主要采用的是有机溶剂提取、大孔吸附树脂分离精制, 但存在选择性差、有机溶剂耗量大、环境污染较严重、成本较高等缺点。本实验为重楼皂苷的分离精制引入泡沫分离技术, 利用该技术的绿色环保、设备简单、操作简便、运行成本低且特别适于处理低浓度药液等特点, 在甾体皂苷分离精制工艺方面进行大胆创新和尝试。

参考文献:

- [1] 齐荣, 余兆祥, 李佟茗. 泡沫分离技术及其发展现状[J]. 辽宁化工, 2004, 33(9): 517-522.
- [2] 修志龙. 泡沫分离法分离人参皂苷[J]. 过程工程学报, 2001, 1(3): 289.
- [3] 傅博强, 李欢, 刘勃, 等. 泡沫分离对甘草酸的纯化和富集[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18: 57-61.
- [4] 王良贵, 孙小梅, 李步海. 三七粗提液中皂甙与多糖泡沫分离的研究[J]. 分析科学学报, 2003, 19(3): 267-269.
- [5] 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(3): 345-347.
- [6] 苏艳桃, 韩丽, 马鸿雁, 等. 间歇式泡沫分离提取甘草中甘草酸的工艺研究[J]. 中草药, 2007, 38(3): 365-368.
- [7] 王强, 徐国钧. 七叶一枝花类商品药材总皂甙含量测定[J]. 中药材, 1989, 12(7): 33-35.
- [8] Noble M, Brown A, Jauregi P, et al. Protein recovery using gas-liquid dispersions[J]. J Chromatogr B, 1998, 711: 31-43.
- [9] 徐燕莉. 表面活性剂的功能[M]. 北京: 化工出版社, 2000.