

绞股蓝总皂苷的闪式提取和纯化工艺研究

刘振洋¹, 刘延泽², 刘改岚², 赵余庆^{3*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032; 2. 河南金鼎科技发展有限公司, 河南 郑州 450016;

3. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 比较并优选绞股蓝总皂苷的粗提和精制工艺。方法 以绞股蓝总皂苷为测定指标, 采用分光光度法测定, 比较不同的提取方法所得绞股蓝总皂苷, 并考察6种不同型号的树脂对绞股蓝总皂苷的静态和动态的吸附及解吸性能的比较。结果 闪式提取和乙醇回流提取所得绞股蓝总皂苷分别为32.69%、31.19%; HPD-700型树脂对绞股蓝总皂苷的吸附量与解吸率均较高, 洗脱率达到80.34%。结论 采用闪式提取和选择HPD-700树脂纯化是可行的绞股蓝总皂苷粗提及精制工艺。

关键词:绞股蓝; 绞股蓝总皂苷; 闪式提取法; 提取工艺; 纯化工艺; 树脂

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)07-1071-03

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 又名七叶胆, 甘茶蔓, 为葫芦科绞股蓝属多年生蔓生草本, 全草入药, 其味甘、微苦, 性凉无毒。绞股蓝皂苷具有明显的抗肿瘤作用, 并且对神经、血液、循环、内分泌系统和消化系统等多方面疾病具有防治作用, 还有明显的强壮作用和抗疲劳作用, 延长细胞寿命, 降低血脂、血糖水平, 增强机体免疫功能^[1]。绞股蓝总皂苷的粗提多采用传统的加热回流提取和超声提取等方法, 本研究利用闪式提取器应用于绞股蓝总皂苷的粗提, 并同加热回流提取和超声波提取进行比较。绞股蓝总皂苷的纯化方法中, 树脂吸附法是较为常用的一种纯化方法^[2,3]。本研究通过对一系列不同型号的树脂进行筛选, 并确定树脂的吸附容量和洗脱溶媒, 优选出大孔吸附树脂纯化绞股蓝总皂苷的最佳工艺条件, 为工业化应用提供参考。

1 仪器和试剂

JHBE-50S 闪式提取器(河南金鼎科技发展有限公司); BS-124S 精密电子天平(德国赛多利斯公司); UV-2800AH 紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司); RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣盛华仪器厂); KQ3200DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); THZ-823 气浴恒温振荡器(江苏金坛市医疗器械厂)。

人参皂苷 Rb₁ 对照品(实验室自制); 甲醇、乙醇、冰醋酸、高氯酸、香草醛均为分析纯; D-101 大孔吸附树脂(天津农药股份有限公司); AB-8、ADS-7、

HPD-100、HPD-300、HPD-700 大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工); 绞股蓝全草购自陕西省平利县, 经过笔者鉴定。

2 方法与结果

2.1 绞股蓝总皂苷的测定

2.1.1 对照品溶液的制备: 精密称取人参皂苷 Rb₁ 对照品 10 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 2 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 标准曲线的绘制^[4]: 精密吸取人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液 30、70、110、150、190、230 μ L 分别置具塞刻度试管中, 挥干甲醇, 分别加入新配制的 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.4 mL、高氯酸 1.6 mL, 摇匀, 密塞, 置 60 $^{\circ}$ C 水浴中加热 15 min, 取出, 立即冷却至室温, 分别精密加冰醋酸 10 mL, 摇匀。以空白试剂为对照, 照分光光度法试验, 在 1 h 以内测定 560 nm 波长处的吸光度值(A)。以人参皂苷 Rb₁ 的质量为纵坐标, A 为横坐标, 求得回归方程为 $A = 1.3307 X - 0.007$, $R^2 = 0.9993$ 。结果表明, 当人参皂苷 Rb₁ 取样量在 0.06 ~ 0.46 mg 与 A 呈良好的线性关系。

2.1.3 精密度试验: 精密吸取人参皂苷 Rb₁ 溶液 1 mL, 挥干甲醇, 显色后, 在 560 nm 波长处测定 A 值, 结果 RSD 为 1.7% ($n=6$)。

2.1.4 稳定性试验: 精密吸取人参皂苷 Rb₁ 溶液 1 mL, 显色后, 每隔 10 min 在 560 nm 波长处测定 A 值, 结果在 1 h 内 RSD 为 2.4% ($n=7$), 表明对照品

* 收稿日期: 2008-11-19

基金项目: 辽宁省天然药物现代分离与工业化制备工程技术研究中心资助项目(2006-19-10)

* 通讯作者 赵余庆 Tel: (024) 23986522 E-mail: zzyq4885@126.com

在显色 1 h 之内稳定性良好。

2.1.5 回收率试验:精密称取 5 份样品各 10 g,置具塞锥形瓶中,精密加入人参皂苷 Rb_1 溶液 84.5 μg ,制备供试品溶液,测定 A 值,计算得总皂苷平均回收率为 96.5%,RSD 为 1.2%($n=6$)。

2.1.6 样品中总皂苷的测定:精密称取绞股蓝总皂苷 10 mg 置 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 200 μL 置 15 mL 具塞试管中,挥干甲醇后按标准曲线的绘制项下“分别加入新配制的 5%香草醛冰醋酸溶液……”起进行测定。

2.2 绞股蓝总皂苷粗提工艺不同方法的比较:考虑到用甲醇提取绞股蓝总皂苷得到的糖杂质除不净,且有甲醇残留;用水提取绞股蓝总皂苷在萃取时耗用的有机溶剂多,成本高;用乙醇提取易挥干,成本低,危害小,且更适合工业化生产。综合多方面因素,选用乙醇作为提取介质,并且参考文献中最佳的超声波和乙醇回流提取工艺,同闪式提取法进行比较。

2.2.1 超声波提取^[5]:精密称取绞股蓝粉末 20 g 置 250 mL 锥形瓶中,加 8 倍量 70%乙醇,在 60、50 Hz 超声提取 30 min,连续提取 3 次,合并提取液,抽滤,减压回收干燥。

2.2.2 乙醇回流提取^[6]:精密称取绞股蓝粉末 20 g 置 500 mL 圆底烧瓶中,加 8 倍量 70%乙醇,沸水回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,抽滤,减压回收干燥。

2.2.3 闪式提取器提取:精密称取绞股蓝粉末 20 g,加 10 倍量 70%乙醇闪式提取 2 次,第 1 次 3 min,第 2 次 1 min,合并提取液,抽滤,减压回收干燥。

2.2.4 提取方法比较:分别按照以上 3 种方法提取,并按标准曲线的绘制项下方法操作,测定 A 值,利用回归方程计算出绞股蓝总皂苷的量。3 种不同提取方法对人参皂苷提取率的影响见表 1。

采用超声波、乙醇回流、闪式提取器粗提绞股蓝总皂苷,从提取物中总皂苷上分析,乙醇回流和闪式提取法略高;从时间上来考察,所用的时间相差较

表 1 不同提取方法的比较结果

Table 1 Comparison of various extracting methods				
提取方法	时间/ min	温度/	收率/ %	提取物中总皂苷/ %
超声波提取	90	60	9.45	21.0
乙醇回流提取	360	100	11.50	31.2
闪式提取器提取	4	室温	12.10	32.7

大,其中,利用闪式提取器提取仅需 4 min,快速而节省时间;从提取温度上来看,超声法和乙醇回流法的提取温度分别为 60、100,而利用闪式提取器提取是在常温下进行的,最大程度的避免了对皂苷的破坏。综上所述,利用闪式提取器提取绞股蓝总皂苷是一种更安全,更快速,更节能,更高效的绞股蓝总皂苷提取的新方法。

2.3 大孔吸附树脂富集纯化绞股蓝总皂苷的工艺参数考察与优化

2.3.1 绞股蓝样品溶液的制备:按照闪式提取法的提取方法提取绞股蓝粗粉 100 g,合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,将浓缩物加蒸馏水溶解,滤过,定容至 200 mL(含生药 0.2 g/mL),测定得总皂苷质量浓度为 17.4 mg/mL。

2.3.2 大孔吸附树脂的预处理:将待处理的大孔吸附树脂用乙醇湿法装柱,继而用乙醇洗脱,不时检测流出的乙醇,当流出的乙醇与水按 1:1 混合不显白色混浊,即可用大量的蒸馏水冲洗至无醇味后备用。

2.3.3 树脂类型的选择:取已处理好的 AB-8、ADS-7、D-101、HPD-100、HPD-300、HPD-700 树脂各 3 g 置 100 mL 具塞锥形瓶中,吸取绞股蓝样品液 25 mL 于锥形瓶中,放入恒温(25℃)摇床中振荡 24 h,振动频率为 140 r/min,达到饱和吸附后滤出,收集吸附液。精密吸取同体积的 70%乙醇溶液 25 mL 于锥形瓶中,振摇约 30 min,放置 2 h,收集洗脱液。测定吸附液、洗脱液的质量浓度,并计算饱和吸附量[饱和吸附量 = [(初始质量浓度 - 吸附后的质量浓度) × 吸附液体积 / 干树脂质量]、洗脱量、洗脱率[洗脱率 = (洗脱液质量浓度 × 洗脱液的体积) / 吸附量 × 100%]。结果见表 2。

表 2 树脂对绞股蓝总皂苷的静态吸附-洗脱性能结果

Table 2 Static adsorption-elution results of total saponins in <i>G. pentaphyllum</i> on resins						
树脂类型	样品液/ (mg · mL ⁻¹)	吸附后样品液/ (mg · mL ⁻¹)	洗脱液/ (mg · mL ⁻¹)	饱和吸附量/ (mg · g ⁻¹ 干树脂)	洗脱量 (mg · g ⁻¹ 干树脂)	洗脱率/ %
AB-8	17.4	2.97	5.23	120.25	83.43	69.38
ADS-7	17.4	9.01	3.25	69.92	50.20	71.79
D-101	17.4	3.60	4.88	115.00	77.65	67.52
HPD-100	17.4	3.33	4.64	117.25	73.89	63.02
HPD-300	17.4	3.34	3.77	117.17	60.04	51.24
HPD-700	17.4	3.92	5.68	112.33	90.25	80.34

可以看到,在以上的6种大孔吸附树脂中,AB-8、D-101、HPD-100、HPD-300、HPD-700型树脂对绞股蓝总皂苷的静态吸附能力均较好,其中AB-8的静态饱和吸附量最大,但是同其他几种树脂相比并无显著的差异。在静态洗脱中,HPD-700型树脂吸附的绞股蓝总皂苷更易洗脱,综合考虑其吸附量与解吸率均较高,且洗脱率达到80.34%,因此,选用的大孔吸附树脂为HPD-700。

2.3.4 不同体积分数的乙醇液对绞股蓝总皂苷洗脱效果的比较:将绞股蓝总皂苷提取液通过树脂柱,分别用10%、30%、50%、70%、80%、95%乙醇200 mL进行洗脱,收集洗脱液并测定总皂苷的质量浓度,计算洗脱率。结果见图1。

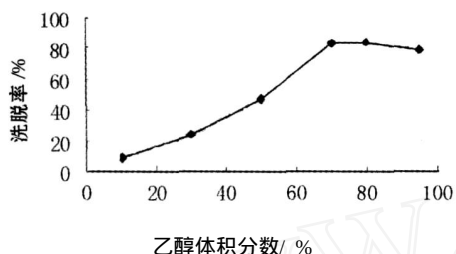


图1 不同体积分数的乙醇对绞股蓝总皂苷洗脱的比较

Fig 1 Comparison of elution results of total saponins in *G. pentaphyllum* with different concentration alcohol

可知绞股蓝总皂苷的洗脱取决于乙醇的体积分数,乙醇体积分数越高,洗脱率越高。综合工业化生产的诸多因素,确定先用蒸馏水洗去水溶性杂质,再用70%乙醇液洗脱,收集70%乙醇洗脱部分。

2.3.5 吸附容量的确定:吸取绞股蓝样品液40 mL上柱,预吸附1 h,过柱流出液重吸附1次,先用水洗至流出液不显Molish反应,再用70%乙醇液洗脱,控制流速1.5 mL/min,收集洗脱液,平行3份,测定

样品液中绞股蓝总皂苷的质量浓度,计算吸附容量[吸附容量=(上柱液中总皂苷量-平均过柱液中总皂苷量)/干树脂质量],结果树脂吸附总皂苷量为609.2 mg,树脂吸附容量为121.8 mg/g干树脂。

3 讨论

闪式提取器是根据组织破碎原理设计而成的一种新型提取器,是中药提取领域的一项新技术,其原理是在适当溶剂存在下,利用高速机械剪切力和搅拌力,迅速破坏植物细胞组织,使组织细胞内部的化学成分(或有效成分)与溶剂充分接触,使有效成分快速溶解转移,在很短时间内达到内外溶解平衡,然后滤过即可。实验中可以看出,利用闪式提取器提取作为一种新技术,有着相对较高的效价比,其所用时间仅为常规回流提取的数十至数百分之一,而且避免了不耐热成分的破坏,且收率高,操作简便,节约能源,因此可以广泛应用于工业化生产。

树脂法是目前公认的比较好的皂苷富集和纯化方法,替代传统的正丁醇萃取,使纯化工艺更为简单,效率大幅度提高,收率和纯度也得到很大程度的改善。HPD-700大孔吸附树脂具有吸附快、解吸率高、吸附量大等优点,非常适合绞股蓝总皂苷的纯化。

参考文献:

- [1] 潘峰,刘迪,黄翠霞. 绞股蓝皂甙的药理与临床研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15 (5): 674-676.
- [2] 卫志贤,冉敏,李宝璋,等. 绞股蓝皂甙在D-101树脂上的吸附研究[J]. 化学工程, 1998, 26(5): 58-61.
- [3] 方道. 绞股蓝总皂苷的提纯及含量测定[J]. 安徽医药, 1998, 2(3): 35.
- [4] 蒋伟哲,周燕文,李锦荣. 广西6种绞股蓝中总皂的含量比较[J]. 中国药业, 2006, 15 (3): 26-27.
- [5] 宋小妹,崔九成,强军,等. 超声法提取绞股蓝总皂苷的工艺研究[J]. 中成药, 1998, 20(5): 4-5.
- [6] 董玉春. 绞股蓝总皂苷提取工艺研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(6): 48-49.

射干配方颗粒的制备工艺和质量标准研究

田成旺¹, 马丽娜², 张铁军^{1*}, 韩世柳³

(1. 天津药物研究院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学, 天津 300193; 3. 天津大学, 天津 300072)

摘要:目的 优化射干配方颗粒制备工艺,建立射干配方颗粒的质量标准。方法 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计安排试验,用TLC对射干配方颗粒进行定性鉴别,用HPLC法进行测定。结果 射干配方颗粒制备工艺为加10倍量

* 收稿日期: 2008-11-17

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAI06A01-02), 天津市科技发展规划项目(043180911)

作者简介: 田成旺(1978—), 男, 山东泰安人, 硕士, 目前主要从事中药新药的研究与开发工作。

Tel: (022) 23006843 E-mail: chew_tian@126.com

* 通讯作者 张铁军 Tel: (022) 23006848 E-mail: tiezheng4@sina.com