

大孔吸附树脂富集纯化白花刺参总皂苷的工艺研究

吴春蕾, 刘 圆, 张志锋*, 徐 彦

西南民族大学 少数民族药物研究所, 四川 成都 610041

摘要: 目的 研究大孔树脂吸附法富集和纯化白花刺参总皂苷的工艺参数及条件。方法 以总皂苷为考察指标, 对 HPD-100、HPD-300、HPD-722、D-101、SA-2、AB-8、ADS-7、X-5 8 种大孔吸附树脂富集和纯化总皂苷的吸附和解吸性能进行评价。结果 HPD-100 树脂纯化总皂苷的最佳条件分别为: 吸附条件为药液的质量浓度为 0.25 g/mL; pH 值为 5.32; 洗脱液体积流量为 1.5 BV/h; 最佳吸附容量为 3.4 mL/g; 解吸条件为用 2 BV 的蒸馏水洗脱除去杂质后, 换用 60%乙醇 4 BV 洗脱。通过 HPD-100 树脂纯化后, 白花刺参总皂苷的纯度由 21.30% 上升为 58.19%, 平均回收率为 91.58%。结论 建立 HPD-100 大孔吸附树脂富集和纯化白花刺参总皂苷的方法简便可行、专属性强, 并且可以为中草药有效成分的大规模生产提供参考。

关键词: 白花刺参; 总皂苷; 大孔吸附树脂; 富集; 纯化

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)06-1130-05

Enrichment and purification of total saponins in *Morina nepalensis* with macroporous adsorption resins

WU Chun-lei, LIU Yuan, ZHANG Zhi-feng, XU Yan

Ethnic Pharmaceutical Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Key words: *Morina nepalensis* D. Don var. *alba* (Hand. -Mazz.) Y. C. Tang; total saponins; macroporous adsorption resin; enrichment; purification

白花刺参是川续断科刺参属植物白花刺参 *Morina nepalensis* D. Don var. *alba* (Hand. -Mazz.) Y. C. Tang 的全草, 为传统藏药, 其藏药名为“江才嘎保”, 始载于《四部医典》^[1]。刺参属植物主要分布于西藏、青海、甘肃、云南、四川等省区, 在我国有 4 种 2 变种^[2]。其中白花刺参是国家卫生部颁布的《藏药药品标准》中收录的 3 种来源的藏药刺参药材之一, 具有健胃、催吐之功效; 可用于关节疼痛、小便失禁、腰痛、眩晕及口眼歪斜; 外用治疗疮、化脓性创伤; 还具有抗肿瘤作用^[3-4]。

已有文献报道白花刺参含有甾醇、生物碱、三萜皂苷、黄酮和木脂素等各类化合物, 其中皂苷类成分是白花刺参的主要成分^[5-11]。目前, 总皂苷的提取分离方法有水提法、醇提法、萃取法和树脂吸附法, 微波辅助提取^[12]、闪式提取^[13]等, 其中树脂吸附法具有操作简便、无污染、成本低等优点^[14-17]。

大孔吸附树脂分离技术是目前应用较广的一种中药深加工技术, 已广泛应用于中草药有效成分的分离纯化^[18], 但应用大孔吸附树脂分离纯化白花刺参总皂苷的工艺尚未见报道。本实验采用大孔树脂吸附法, 以白花刺参中主要有效成分总皂苷的收率和纯度为评价指标, 对 HPD-100、HPD-300、HPD-722、D-101、SA-2、AB-8、ADS-7、X-5 等 8 种树脂进行考察, 优选出富集效果最佳的大孔树脂型号、吸附和解吸等工艺条件及参数, 为白花刺参总皂苷的制备提供科学依据。

1 仪器与材料

TU—1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用股份有限公司); METTLER AE240 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); W201B 恒温水浴锅 (上海申顺生物科技有限公司); PHS—3 型酸度计 (北京华瑞博远科技发展有限公司)。

收稿日期: 2010-10-27

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目 (2009JY0017); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (09NZYZJ01)

作者简介: 吴春蕾 (1983—), 女, 在读研究生。Tel: 15842551223 E-mail: hainanleilei@yahoo.com.cn

*通讯作者 张志锋 Tel: 13882291149 E-mail: zhangzhf99@gmail.com

齐墩果酸(批号 110709-200304, 中国药品生物制品检定所), 大孔吸附树脂 HPD-100、HPD-300、HPD-722、D-101(沧州宝恩化工有限公司), SA-2、AB-8、ADS-7(天津欧瑞科技有限公司), X-5(西安蓝深特种树脂有限公司); 香草醛(广东汕头市西陇化工厂)、高氯酸、冰醋酸、无水乙醇(成都化学试剂有限公司)等均为分析纯。

白花刺参药材于2008年7月采自四川省甘孜藏族自治州康定县境内, 由四川大学华西药学院张浩教授鉴定为白花刺参 *Morina nepalensis* D. Don var. *alba* (Hand.-Mazz.) Y. C. Tang 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 吸附原液的制备

取白花刺参药材适量, 粉碎成粗粉。加6倍量80%乙醇加热回流提取2次, 每次1h, 提取液滤过, 合并滤液, 减压浓缩至无醇味, 加蒸馏水定容至含生药0.50 g/mL, 储存备用。以下各项试验根据具体情况调整样品液质量浓度。

2.2 白花刺参总皂苷的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品6.04 mg, 置50 mL量瓶中, 加甲醇溶解定容, 即得120.8 μg/mL齐墩果酸对照品溶液。

2.2.2 线性关系考察 精密移取齐墩果酸对照品溶液0.2、0.4、0.6、1.0、1.4、1.8、2.0 mL分别置10 mL具塞试管中, 水浴挥去溶剂, 依次精密加入临时配置的5%香草醛-冰醋酸溶液0.2 mL和高氯酸0.8 mL, 混匀, 密塞, 于65℃恒温水浴加热15 min, 取出立即冰水浴冷却2 min, 加冰醋酸5 mL, 混匀; 去除齐墩果酸, 按上述方法加试剂得空白溶液; 在400~600 nm波长扫描, 对照品在545 nm处有最大吸收。将上述溶液在波长545 nm处测定吸光度值。以吸光度值为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=41.708 X-0.0384$, $r=0.9995$, 表明齐墩果酸在4.02~40.2 μg/mL线性关系良好。

2.2.3 样品测定 吸取2 mL吸附原液, 加甲醇定容于50 mL量瓶中, 精密吸取1 mL定容后的溶液置10 mL具塞试管中, 按“2.2.2”项方法测定吸光度值, 并计算白花刺参总皂苷的质量浓度。

2.3 大孔吸附树脂型号的筛选

2.3.1 大孔吸附树脂的预处理及含水量的测定 新购入的大孔树脂, 用95%乙醇浸泡24 h, 充分溶胀, 装色谱柱。先用95%乙醇洗柱至流出的乙醇液与蒸馏水混合不出现白色浑浊, 且流出乙醇液在200~

400 nm处, 以95%乙醇为空白对照, 不产生紫外吸收峰。然后用蒸馏水洗至洗脱液无醇味, 备用。各取1 g树脂采用干燥法测定含水量。

2.3.2 静态吸附性能比较 分别精密称取已处理好的8种大孔吸附树脂, 每份相当于相应干树脂1 g, 置50 mL量瓶中, 精密加入吸附原液20 mL(0.25 g生药/mL), 每隔10 min振摇1次, 持续1 h, 然后静置24 h, 使其达到饱和和吸附, 从上清液中取样, 测定白花刺参总皂苷的质量浓度, 计算其吸附量, 结果见表1。

表1 8种树脂静态饱和和吸附量

Table 1 Static saturation adsorption by eight kinds of resins

树脂种类	总皂苷质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		饱和吸附量/(mg·g ⁻¹)
	吸附前	吸附后	
HPD-100	5.90	1.67	42.33
HPD-300	5.90	2.05	38.53
HPD-722	5.90	2.11	37.93
D-101	5.90	2.48	34.23
SA-2	5.90	3.15	27.53
AB-8	5.90	2.31	35.93
ADS-7	5.90	2.92	29.83
X-5	5.90	3.02	28.83

2.3.3 静态解吸性能比较 将饱和吸附量较大的HPD-100、HPD-300、HPD-722、D-101、AB-8 5种树脂滤出, 吸干表面水分, 置50 mL量瓶中, 精密加入70%乙醇20 mL, 每隔10 min振摇1次, 持续1 h, 然后静置24 h, 吸取上清液, 测定白花刺参总皂苷的质量浓度, 计算其解吸量及解吸率, 结果见表2。

表2 5种树脂静态洗脱

Table 2 Static saturation elution by five kinds of resins

树脂种类	解吸液质量浓度/		解吸率/%
	(mg·mL ⁻¹)	解吸量/(mg·g ⁻¹)	
HPD-100	3.99	39.83	94.08
HPD-300	3.21	32.06	83.20
HPD-722	3.08	30.75	81.03
D-101	2.96	29.61	86.73
AB-8	3.26	32.63	90.82

由表1、2结果可知, 在静态吸附饱和状态下, HPD-100型树脂对白花刺参总皂苷的静态吸附量较大, HPD-300、HPD-722、AB-8次之, 均明显高于

其他 4 种树脂。在静态洗脱中, HPD-100 型树脂吸附的总皂苷较易洗脱, 洗脱率最大, 解吸能力最强。综合饱和和吸附量和洗脱率两项指标, 选用 HPD-100 型吸附树脂富集纯化白花刺参总皂苷。

2.4 HPD-100 树脂吸附白花刺参总皂苷的影响因素研究

称取已处理好的 HPD-100 树脂(均相当于干树脂 10 g), 湿法装柱(柱规格 50 cm×2 cm), 分别取 50 mL 药液按不同白花刺参总皂苷质量浓度、洗脱体积流量和药液 pH 值进行动态吸附, 吸附完毕后, 加 2 BV 蒸馏水洗脱, 收集洗脱液, 测定白花刺参总皂苷, 计算比吸附量。

2.4.1 药液质量浓度对树脂吸附效果的影响 固定体积流量 2 BV/h 和药液 pH 值为 5.32, 考察药液质量浓度(生药)分别为 0.13、0.17、0.21、0.25、0.29、0.33 g/mL 时的比吸附量。从表 3 可以看出, HPD-100 富集总皂苷的能力随着质量浓度的增加而提高。当药液质量浓度为 0.25 g/mL 时, 比吸附量达到最大, 此后随质量浓度的增加, 比吸附量有所下降, 故药液质量浓度宜控制在生药 0.25 g/mL 较好。

表 3 总皂苷的质量浓度与比吸附量的关系

Table 3 Relationship between concentration of total saponins and comparative mass of adsorption

$\rho/(\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	比吸附量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
0.13	14.05
0.17	15.95
0.21	19.96
0.25	23.45
0.29	22.01
0.33	21.12

2.4.2 洗脱液体积流量对树脂吸附效果的影响 固定质量浓度生药 0.25 g/mL 和药液 pH 值为 5.32, 考察洗脱液体积流量为 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 BV/h 7 个水平的比吸附量。由表 4 可知, 富集总皂苷的能力随洗脱液体积流量的增加而降低。可能是由于洗脱流速慢, 有利于上柱液中有有效成分在树脂床中被充分树脂吸附。当洗脱液体积流量分别为 1 BV/h 和 1.5 BV/h 时, 总皂苷的比吸附量没有明显变化, 为了缩短洗脱时间, 故选择最佳洗脱液体积流量为 1.5 BV/h。

2.4.3 药液 pH 值对树脂吸附效果的影响 固定质量浓度生药 0.25 g/mL 和体积流量 1.5 BV/h, 考察

药液 pH 值分别为 2.33、3.30、4.30、5.32、6.29、7.20、8.34 时的比吸附量。从表 5 可以看出, 药液的酸碱度对树脂的吸附性能有一定的影响, 药液的酸性或碱性过大都不利于树脂吸附。当 pH 值为 5.32 时, 比吸附量最大, 此后随着 pH 值增加, 比吸附量逐渐下降, 因此药液 pH 值在 5.32 左右较好。

表 4 洗脱液体积流量与比吸附量的关系

Table 4 Relationship between eluent velocity and comparative mass of adsorption

洗脱液体积流量/ $(\text{BV}\cdot\text{h}^{-1})$	比吸附量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
1.0	19.745
1.5	19.637
2.0	19.351
2.5	18.570
3.0	18.150
3.5	17.850
4.0	17.290

表 5 pH 值与比吸附量的关系

Table 5 Relationship between pH value and comparative mass of adsorption

pH 值	比吸附量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
2.33	19.15
3.30	19.67
4.30	20.98
5.32	22.26
6.29	21.23
7.20	20.04
8.34	18.82

2.5 HPD-100 树脂对白花刺参总皂苷动态吸附性能的考察

精确量取 250 mL 样品溶液(生药 0.25 g/mL), 缓慢加入已处理好的 HPD-100 树脂床中(相当于干树脂 15 g), 控制体积流量 1.5 BV/h, 每 10 mL 收集 1 个流份, 并跟踪测定各洗脱液流份中白花刺参总皂苷的质量浓度, 绘制总皂苷在树脂柱上的动态吸附泄漏曲线。图 1 表明, HPD-100 树脂可以处理 50 mL 生药质量浓度为 0.25 g/mL 的白花刺参药液而未表现出明显泄漏现象, 即 1 g HPD-100 树脂的最佳吸附容量为 3.3 mL, 相当于 0.83 g 生药。因此考虑实际生产工艺中上样量不能超过 50 mL 药液, 以免造成白花刺参总皂苷的大量泄漏, 损失得率。

2.6 洗脱溶媒的确定

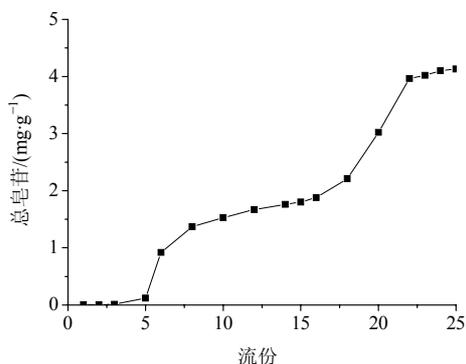


图 1 HPD-100 树脂对总皂苷动态吸附泄露曲线

Fig. 1 Dynamic adsorption leaky curve of total saponins on column packed with HPD-100 resin

精确量取 50 mL 样品溶液 (生药 0.25 g/mL) 缓慢加入已处理好的 HPD-100 树脂床中 (相当于干树脂 15 g), 吸附完毕后, 依次用蒸馏水, 20%、40%、60%、80%、95%乙醇 (洗脱剂用量均为 4 BV), 收集各段洗脱液, 每个柱体积收集 1 个流份, 分别测定各洗脱液流份中白花刺参总皂苷的质量浓度, 绘制洗脱曲线, 见图 2。可以看出, 蒸馏水和 95%乙醇洗脱液中白花刺参总皂苷很少, 20%、80%乙醇洗脱部位中白花刺参总皂苷也很少, 主要集中在 40%~60%乙醇洗脱部分。因此 60%乙醇溶液作为洗脱液较为理想。

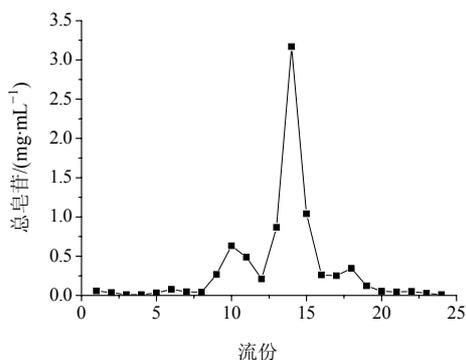


图 2 不同体积分数乙醇对总皂苷洗脱效果的影响

Fig. 2 Eluting efficiency of different concentrations of ethanol solution to total saponins

2.7 洗脱剂用量的考察

精确量取 50 mL 样品溶液 (生药 0.25 g/mL) 缓慢加入已经处理好的 HPD-100 树脂床中 (相当于干树脂 15 g), 吸附完毕后, 先用 200 mL 蒸馏水洗脱至无色, 继以 60%乙醇 400 mL 进行洗脱, 分段收集洗脱液, 每个柱体积收集 1 份, 分别测定各洗脱液流份中白花刺参总皂苷的质量浓度, 见图 3。

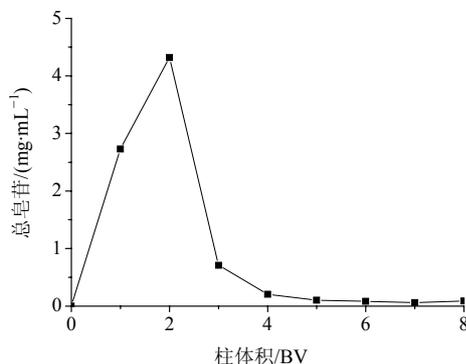


图 3 HPD-100 树脂对总皂苷的动态解吸曲线

Fig. 3 Dynamic desorption curve of total saponins on column packed with HPD-100 resin

结果显示用 60%乙醇作为解吸液, 解吸峰非常集中, 无明显的拖尾现象, 5 BV 洗脱液中的白花刺参总皂苷质量浓度几乎为零, 说明用 4 BV 60%乙醇已将总皂苷洗脱完全。故确定洗脱剂最佳用量为 4 BV。

2.8 验证试验

精密吸取白花刺参样品溶液 (生药 0.25 g/mL) 2 份, 每份 50 mL, 其中 1 份按上述优化条件上柱洗脱, 收集 60%乙醇洗脱液, 将洗脱液和另 1 份药液减压干燥, 制备干浸膏, 称质量, 测定总固物, 并测定上柱前后白花刺参样品中总皂苷含量。采用相同方法进行 3 次重复试验, 结果见表 6。可见以 HPD-100 型大孔吸附树脂柱前后的总固物和总皂苷为指标, 大孔吸附树脂法可以有效去除杂质, 使总皂苷质量分数由 21.30%上升为 58.19%, 说明 HPD-100 型大孔吸附树脂可用于白花刺参总皂苷的富集和纯化 (总皂苷收率 = 纯化后样品的总皂苷量 / 上柱前样品的总皂苷量)。

表 6 大孔吸附树脂对白花刺参总皂苷的纯化 (n=3)

Table 6 Purification of total saponins with macroporous adsorption resin (n=3)

样 品	总固物/ g	总皂苷量/ mg	总皂苷 纯度/%	总皂苷 收率/%
上柱前样品	2.140	455.81	21.30	—
纯化后样品	0.716	417.47	58.19	91.58

3 讨论

白花刺参的主要成分为三萜皂苷类成分, 迄今为止, 已经从白花刺参中分离并鉴定出多个五环三萜皂苷类成分, 主要为齐墩果酸类化合物, 目前, 国内尚无白花刺参皂苷类成分的法定对照品, 故本实验采用紫外分光光度法测定其总皂苷含量时, 选

用了与白花刺参皂苷类成分结构接近的齐墩果酸为对照品。

本实验以不同型号大孔吸附树脂为分离材料,对白花刺参提取液进行分离纯化,通过静态吸附解吸实验和动态吸附解吸实验,考察了其吸附与解吸性能,实验结果表明 HPD-100 型大孔吸附树脂富集总皂苷具有吸附快、解吸率高、吸附容量大的优点,在白花刺参富集、纯化总皂苷工艺中具有一定的应用价值。

在使用大孔吸附树脂进行纯化时,药液上柱前必须进行抽滤或离心等预处理以除去不溶物和一些杂质。上样液的澄清度较好时,能提高总皂苷的纯化率,亦能提高树脂的使用寿命。

HPD-100 型大孔树脂对白花刺参总皂苷有良好的吸附及解吸性能,其纯化的最佳工艺条件为白花刺参上样药液生药质量浓度为 0.25 g/mL, pH 值为 5.32,洗脱体积流量为 1.5 BV/h,洗脱剂为 60%乙醇溶液,洗脱剂用量为 4 倍树脂床容积。因此,在此优化条件下,用 HPD-100 型大孔树脂纯化总皂苷,乙醇洗脱物中白花刺参总皂苷质量分数由 21.30%上升为 58.19%,平均回收率为 91.58%。说明工艺可行,为白花刺参总皂苷的富集和纯化提供了科学依据。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第七十三卷. 北京: 科学出版社, 1986.
- [3] 中华人民共和国卫生部药品标准——藏药标准 [S]. 1995.
- [4] 杨竞生, 初称江措. 迪庆藏药 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 1969.
- [5] 滕荣伟, 谢鸿妍, 李海舟, 等. 白花刺参中两个新三萜皂苷 [J]. 有机化学, 2002, 22(8): 560-564.
- [6] Teng R W, Xie H Y, Wang D Z, et al. Four new ursane-type saponins from *Morina nepalensis* var. *alba* [J]. *Magn Reson Chem*, 2002, 40(9): 603-608.
- [7] Teng R W, Xie H Y, Liu X K, et al. Four new oleanane type saponins from *Morina nepalensis* var. *alba* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(2): 75-82.
- [8] Teng R W, Wang D Z, Yang C R. Monepaloside K, a new triterpenoid saponin from *Morina nepalensis* var. *alba* Hand. -Mazz. [J]. *Chin Chem Lett*, 2002, 13(3): 251-252.
- [9] Teng R W, Zheng Q A, Wang D Z, et al. Two new saponins from *Morina nepalensis* var. *alba* [J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(1): 122-126.
- [10] Teng R W, Xie H Y, Liu X K, et al. Two new acylated flavonoid glycosides from *Morina nepalensis* var. *alba* Hand. -Mazz. [J]. *Magn Reson Chem*, 2002, 40(6): 415-420.
- [11] 滕荣伟, 周志宏, 王德祖, 等. 白花刺参中的咖啡酰基奎宁酸成分 [J]. 波谱学杂志, 2002, 19(2): 167-174.
- [12] 欧阳丽娜, 李兰林, 吴雪, 等. 正交设计优选竹节参总皂苷微波提取工艺的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1639-1642.
- [13] 刘振洋, 刘延泽, 刘改岚, 等. 绞股蓝总皂苷的闪式提取和纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1071-1073.
- [14] 梁少玲, 蔡宇, 杨燕霞, 等. 大孔树脂吸附在黄酮及皂苷类成分分离纯化中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 277-278.
- [15] 胡晨旭, 魏峰, 郭治昕, 等. 大孔吸附树脂分离纯化连翘酯苷 A 的工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 732-735.
- [16] 刘帅英, 徐文峥, 李水福. 赤芍中芍药苷的大孔吸附树脂纯化研究 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1480-1482.
- [17] 石忠峰, 陈蔚文, 李卫民, 等. 大孔吸附树脂纯化黄芪总皂苷的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1322-1325.
- [18] 廖茂梁, 尚海花, 胡静, 等. 树脂分离纯化枳实中辛弗林的工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 129-133.