

大孔吸附树脂纯化桔梗皂苷的研究

王梓^{1,2}, 李伟¹, 李月茹^{1,3}, 刘文丛¹, 郑毅男^{1,2}, 张晶^{1*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学发展学院, 吉林 长春 130118

3. 吉林农业大学 农业部参茸检测中心, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 研究大孔吸附树脂富集、分离纯化桔梗皂苷工艺条件及参数。方法 以 HPLC 法测定桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 的总量为考察指标, 考察 5 种大孔吸附树脂分离纯化桔梗皂苷的吸附性能, 重点筛选并优化 D-101 大孔吸附树脂富集桔梗皂苷的各种工艺参数。结果 D-101 大孔吸附树脂在 4 h 后达到最大吸附量 15.4 mg/g, 40%乙醇溶液可以使桔梗皂苷类成分大部分(解吸率 $\geq 90\%$)从树脂床上解吸附。结论 D-101 大孔吸附树脂对桔梗皂苷吸附性能好, 完全适合用于工业化富集分离纯化桔梗皂苷类成分。

关键词: 桔梗; 桔梗皂苷 D; 去芹糖桔梗皂苷 D; 大孔吸附树脂; HPLC

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)09-1743-04

Purification of platycodins from *Platycodonis Radix* by macroporous resin

WANG Zi^{1,2}, LI Wei¹, LI Yue-ru^{1,3}, LIU Wen-cong¹, ZHENG Yi-nan^{1,2}, ZHANG Jing¹

1. College of Chinese Material Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. Ginseng and Antler Products Testing Center of the Ministry of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Key words: *Platycodonis Radix*; platycodin D; deapio-platycodin D; macroporous resin; HPLC

桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根^[1]。药理学研究证明, 桔梗皂苷为其主要的有效成分, 具有抗肿瘤, 降血糖, 抗肥胖等多种药理活性^[2], 其中桔梗皂苷 D (platycodin D) 与去芹糖桔梗皂苷 D (deapio-platycodin D) 为桔梗中的主要活性成分, 具有抑制胰脂肪酶和抗肿瘤活性^[3-4]。本实验以桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 的总量为考察指标对 5 种大孔吸附树脂工艺参数进行了筛选, 采用 D-101 大孔吸附树脂技术优化了桔梗皂苷类成分分离纯化工艺, 结果令人满意, 为桔梗皂苷类成分的分离纯化提供理论参考。

1 仪器与材料

Agilent1100 系列高效液相色谱仪 (G1322A Degasser; G1311A Quat Pump; G1318A Colcom; G1314A VWD, 美国 Agilent 公司); D-101、AB-8、NKA-9 和 NKA-12 型大孔吸附树脂购于天津南开大

学化工厂, ADS-7 型树脂购于天津南开和成科技有限公司; 桔梗购自长春吉林大药房, 经吉林农业大学中药材学院郑毅男教授鉴定; 桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 对照品为本实验室自制, 质量分数均 $\geq 98.8\%$; 乙腈为色谱纯, 乙醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0~30 min, 15%~22% A; 30~60 min, 22%~25% A; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm; 柱温为室温。

2.1.2 混合对照品溶液制备 分别精密称定桔梗皂苷 D 7.2 mg、去芹糖桔梗皂苷 D 12.2 mg, 加甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 即得。

收稿日期: 2010-10-28

基金项目: 吉林省科技厅项目 (20100938); 吉林省教育厅项目 (吉科教合 2010); 吉林农业大学青年科研启动基金 (2009B)

作者简介: 王梓 (1983—), 女, 讲师, 研究方向为天然产物化学与新药研究。Tel: (0431)84533304 E-mail: wangzi8020@126.com

*通讯作者 张晶 Tel: (0431)84533304-8011 E-mail: zhjing0701@126.com

2.1.3 供试品溶液制备 取桔梗提取液及上柱后各部分的干燥物各 0.2 g, 精密称定, 用流动相 (15% 乙腈) 超声溶解并定容于 5 mL 量瓶中, 作为供试品溶液, 分析前过 0.22 μm 滤膜。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 2.0、5.0、7.5、10.0、15.0、20 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积的积分值。以进样量为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标进行线性回归, 得回归方程: 桔梗皂苷 D $Y=3.26X-8.23$ ($R^2=0.9996$), 去芹糖桔梗皂苷 D $Y=5.22X+1.06$ ($R^2=0.9994$); 表明桔梗皂苷 D 在 72~720 μg/mL、去芹糖桔梗皂苷 D 在 122~1 220 μg/mL 线性关系良好。色谱图见图 1。

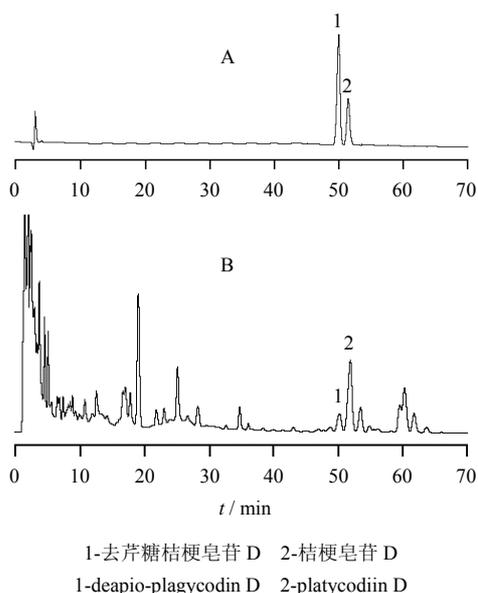


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

2.2 上柱样品液的制备

取干燥后的桔梗药材 100 g, 粉碎成 40 目左右的粗粉, 用 70% 甲醇冷浸 24 h 后用超声波提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩回收甲醇, 再用蒸馏水定容至 500 mL (含生药 0.2 g/mL, 桔梗皂苷 D 与去芹糖桔梗皂苷 D 分别为 119 mg、205 mg)。

2.3 大孔吸附树脂的预处理与再生

取大孔树脂适量, 丙酮浸泡 12 h 后装柱洗脱, 洗脱至洗脱液蒸干后无残留物。以乙醇湿法装柱, 冲洗至流出液与水 1:3 混合不浑浊为止。最后以蒸馏水冲洗柱体直至无醇味, 预处理完毕, 备用; 再生通过 5% 盐酸溶液浸泡 4~6 h, 用水冲洗至中性, 再用 2% 氢氧化钠溶液浸泡 4~6 h, 用水冲洗至中

性, 再生完毕, 待用。

2.4 静态-吸附解吸试验筛选树脂型号

准确称取已处理好的 D-101、AB-8、ADS-7、NKA-12、NKA-9 型大孔吸附树脂各 5 g, 置具塞三角瓶中, 分别加入样品液 75 mL, 室温水浴振荡 12 h, 滤去液体, 用蒸馏水清洗树脂 3 次至滤出液体无混浊为止。将所有滤出液合并后浓缩至干, 用流动相定容于 5 mL 量瓶中, 测定吸附前后样品液中桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 的总量, 计算吸附率。将已饱和过的树脂用 95% 乙醇浸泡并在室温下水浴振荡 12 h, 滤出液体, 用 95% 乙醇反复洗涤 3 次, 合并滤液后蒸干, 用甲醇定容于 5.0 mL 量瓶中, 测定滤液中桔梗皂苷 D 与去芹糖桔梗皂苷 D 的总量, 计算解吸率。结果见表 1。

$$\text{吸附率} = (C_0V_0 - C_1V_1) / (C_0V_0)$$

$$\text{解吸率} = C_2V_2 / (C_0V_0 - C_1V_1)$$

C_0 为样品溶液中桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 质量浓度之和, V_0 为样品溶液体积, C_1 为流出液中桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 质量浓度之和, V_1 为流出液体积, C_2 为解吸液中桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 质量浓度之和, V_2 为解吸液体积

表 1 不同大孔吸附树脂的吸附率与解析率

Table 1 Adsorption and desorption rates of different types of macroporous resins

树脂类型	吸附率/%	解吸率/%
D-101	95.3	95.1
AB-8	92.1	91.5
ADS-7	85.2	87.9
NKA-12	93.5	93.2
NKA-9	92.1	91.2

可以看出, 除 ADS-7 型树脂外, 其他吸附树脂都表现了良好的吸附和解吸附性能, 但 D-101 树脂最好, 本实验选用 D-101 树脂进行富集工艺研究。

2.5 工艺参数考察

2.5.1 静态吸附动力学考察 将一定量树脂放入样品液中, 搅拌使其充分吸附达到饱和。以吸附时间为横坐标, 吸附量为纵坐标, 绘制桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 在 D-101 大孔树脂上的吸附动力学曲线 (图 2)。可以看出, 初始吸附速率较快, 2 h 后吸附量开始缓慢增加, 4 h 后基本达到最大吸附量。

2.5.2 动态饱和吸附量的测定 精密量取 D-101 树脂 10 g, 采用纯水湿法装柱。将样品液以 3 BV/h 的

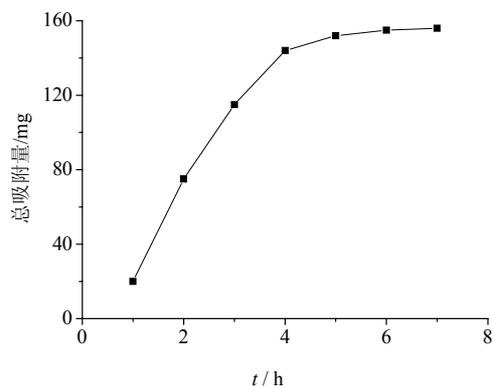


图 2 桔梗皂苷 D 与去芹糖桔梗皂苷 D 总吸附量随时间变化
Fig. 2 Adsorption quantity change of platycodin D and deapioplatycodin D at different times

体积流量缓缓加入到树脂柱上,共加入 15 倍树脂床体积的样品液,每处理 1 BV 的样品液收集一次流出液,减压回收溶剂,甲醇定容,测定桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 的总量,绘制动态吸附曲线,确定 D-101 大孔树脂动态吸附曲线,结果见图 3。可以看出,从第 5 个流份开始,桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 出现泄露,到第 10 份时二者的泄露曲线趋于平缓,此时 D-101 吸附树脂的动态吸附已饱和,通过计算得出 D-101 大孔树脂对二者的动态饱和吸附量为 15.4 mg/g。

2.5.3 洗脱液质量浓度对解吸性能的影响 分别配制 20%、30%、40%、50%、60%乙醇的洗脱液,先用水洗至流出液无色,再用配制好的乙醇液以相同体积流量依次进行动态洗脱,测定洗脱液中桔梗皂苷 D 与去芹糖桔梗皂苷 D 的量,计算洗脱率 [洗脱率 = (洗脱液中桔梗皂苷 D 与去芹糖桔梗皂苷 D 的量/样品液中桔梗皂苷 D 与去芹糖桔梗皂苷 D 的量)],结果见图 4。可以看出,在乙醇体积分数为

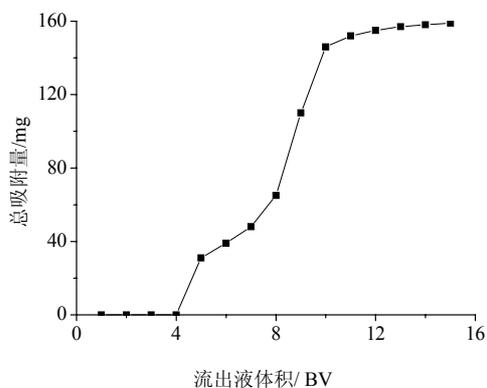


图 3 D-101 树脂动态吸附性能曲线

Fig. 3 Curve of dynamic absorption power of D-101 resin

40%时洗脱率已接近最大值,乙醇的体积分数过大会把较多色素等杂质一并冲洗下来从而影响产品质量,乙醇体积分数过低则有效组分未能充分解吸附,故确定最佳乙醇解吸体积分数为 40%。

2.5.4 洗脱量的确定 取样品溶液 30 mL 上样于 10 g 已处理好的 D-101 大孔树脂柱上,静置吸附 4 h 后,用蒸馏水洗脱至无色,再用 40%乙醇共 200 mL 依次洗脱,每 20 mL 一个流份,HPLC 检测桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 的总量,确定洗脱效果,见图 5。结果显示至第 8 份洗脱液中桔梗皂苷 D 和去芹糖桔梗皂苷 D 未能检出,表明 160 mL 的 40%乙醇液能够将桔梗皂苷类成分完全从 D-101 大孔吸附树脂上解吸附,从而确定洗脱溶媒为上样体积的 5.3 倍左右。

2.6 验证试验

按上述优选的工艺条件进行 3 次平行试验,并计算桔梗皂苷 D 与去芹糖桔梗皂苷 D 的收率,结果

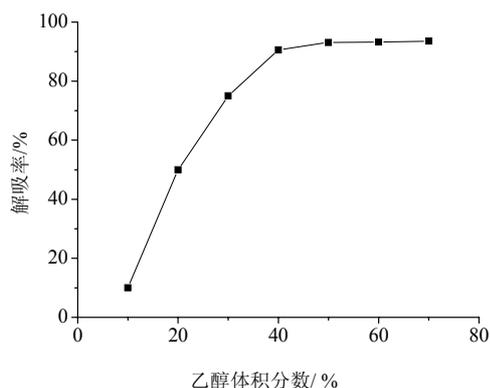


图 4 桔梗皂苷 D 与去芹糖桔梗皂苷 D 解吸率随乙醇体积分数变化

Fig. 4 Desorption rate change of platycodin D and deapioplatycodin D with different ethanol contents

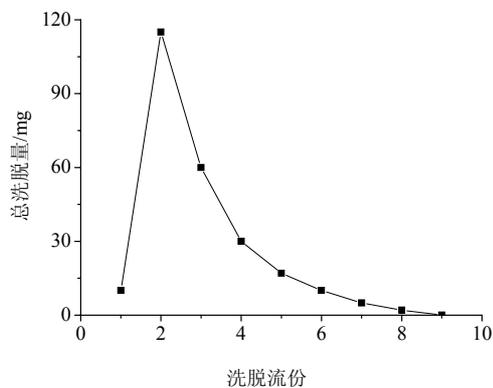


图 5 洗脱量的选择

Fig. 5 Selection of eluting volume

表明二者收率均大于 85.2%，树脂收集物中，二者的质量分数分别提高 4.5 倍和 6.2 倍。经过一系列考察得出的 D-101 大孔树脂分离、纯化和富集桔梗总皂苷的工艺合理、可行、稳定。

3 讨论

近年来，大孔树脂吸附技术被广泛应用于中药有效成分的分离纯化^[5-8]，D-101 大孔树脂因其价格低廉，吸附性能好等特点成为当前使用最为广泛的树脂型号之一^[9-10]。分离纯化中草药有效组分可以为工业化生产提供理论参考，具有一定意义。本实验对比其他 4 种型号吸附树脂（AB-8、ADS-7、NKA-12、NKA-9），优选 D101 树脂，并研究了 D-101 富集纯化工艺条件，提供了其分离纯化桔梗皂苷的重要工艺参数，结果表明 D-101 大孔吸附树脂完全适合桔梗皂苷的分离纯化，且较低的乙醇体积分数（40%）便能够将桔梗皂苷类成分完全从树脂床上解吸附，有效富集了以桔梗皂苷 D 与去芹糖桔梗皂苷 D 为主的桔梗皂苷类成分。

桔梗中皂苷类成分较为复杂，大都为双糖连皂苷，利用高效液相色谱法测定树脂处理前后样品液中两种主要皂苷的量，能够准确、科学地反映桔梗皂苷类成分在 D-101 树脂上的吸附与解吸等特点，此工艺稳定，可行，适合于工业化生产。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 付文卫, 窦德强, 裴月湖. 桔梗的化学成分和生物活性研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(3): 184-191.
- [3] Xu B J, Han L K, Zheng Y N, *et al.* *In vitro* inhibitory effect of triterpenoidal saponins from *Platycodi Radix* on pancreatic lipase [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(2): 180-185.
- [4] Kim Y S, Kim J S, Choi S U, *et al.* Isolation of a new saponin and cytotoxic effect of saponins from the root of *Platycodon grandiflorum* on human tumor cell lines [J]. *Planta Med*, 2005, 71(6): 566-568.
- [5] 杨书良, 杨波, 田凤, 等. 大孔吸附树脂富集刺五加中紫丁香苷和刺五加总苷的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1327-1330.
- [6] 刘欣, 高月娟, 王建明, 等. 大孔吸附树脂对丁香叶中丁香苦苷的富集工艺研究 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1655-1659.
- [7] 金汝城, 李贵文, 马素丽. 大孔吸附树脂法分离纯化当归中阿魏酸的工艺研究, 中草药, 2008, 39(9): 1324-1327.
- [8] 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.
- [9] 贾存勤, 李阳春, 屠鹏飞, 等. D-101 型大孔吸附树脂预处理方法的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 193-196.
- [10] 叶勇, 施敏荣. D-101 大孔树脂对丹酚酸 B 分离工艺的优化 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(20): 1557-1560.