

大孔吸附树脂分离纯化单叶铁线莲总皂苷的研究

孙晓博^{1,3}, 张 凯^{1,2}, 李兰林^{1,2}, 向大雄^{1,2*}

1. 中南大学湘雅二医院 湖南省中药制剂新技术重点实验室, 湖南 长沙 410011

2. 中南大学药学院, 湖南 长沙 410013

3. 益阳市中心医院, 湖南 益阳 413000

摘要:目的 研究大孔吸附树脂分离纯化单叶铁线莲总皂苷的工艺条件, 为单叶铁线莲总皂苷的工业化生产提供实验依据。方法 采用比色法测定总皂苷; 比较了5种大孔吸附树脂的静态饱和吸附量、静态解吸率, 筛选出适宜的树脂; 对最佳树脂进行动态吸附、解吸试验, 确定最佳的吸附洗脱工艺。结果 D-101大孔树脂对单叶铁线莲总皂苷有较好的吸附分离性能。最佳工艺条件为: 上样液质量浓度为生药0.2 g/mL, pH值为5, 上样体积流量为1 BV/h; 4 BV蒸馏水洗脱杂质; 4 BV 70%乙醇洗脱总皂苷, 洗脱体积流量2 BV/h。按此工艺条件生产的总皂苷质量分数达到71.53%, 收率86.02%, 精制度达238.81%。结论 D-101大孔吸附树脂适合富集纯化单叶铁线莲中总皂苷。

关键词: 单叶铁线莲; 总皂苷; 大孔吸附树脂; 分离纯化; 比色法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-1977-05

Separation and purification of total saponins from *Clematis henryi* by macroporous resins

SUN Xiao-bo^{1,3}, ZHANG Kai^{1,2}, LI Lan-lin^{1,2}, XIANG Da-xiong^{1,2}

1. Key Laboratory of Chinese Materia Medica Preparation of Hunan Province, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China

3. Yiyang Central Hospital, Yiyang 413000, China

Abstract: Objective To study the technological parameters of enriching and purifying total saponins from *Clematis henryi* by macroporous resins. **Methods** The content of saponins was determined by colorimetry; The optimum macroporous resins were selected by comparing static adsorptive capabilities and desorption ratio of five kinds of resins; The dynamic adsorption and desorption of D-101 resin were researched to obtain the optimum parameters. **Results** The D-101 resin showed the best adsorptive and desorptive capabilities; The optimum technological parameters were obtained as follows: The concentration of sample solution is crude drug 0.2 g/mL, the pH value of sample solution is 5 at flow rate of 1 BV/h; Then washed with 4 BV purified water, the desorption of saponins was washed with 70% ethanol at washing rate of 2 BV/h. The purity of total saponins obtained was 71.53%, the transfer ratio reached 86.02% and refine ratio reached 238.81%. **Conclusion** Using D-101 resin to enrich and purify total saponins from *C. henryi* is feasible.

Key words: *Clematis henryi* Oliv.; total saponins; macroporous resins; separation and purification; colorimetry

单叶铁线莲 *Clematis henryi* Oliv. 为毛茛科铁线莲属植物, 以干燥块根入药, 民间长期用于治疗跌打肿痛、各类炎症, 具有清热解毒、活血消肿、行气止痛的功效^[1]。同属其他植物如威灵仙等, 具

有驱风除湿、通络止痛的功效, 研究表明该属植物主要含皂苷类成分^[2], 且其药理活性主要与其含有的皂苷类成分相关^[3-4]。目前提取有效成分常采用传统的乙醇回流提取法, 所得产品总皂苷的量低,

收稿日期: 2010-12-11

基金项目: 湖南省中医药科研计划项目 (2010042)

作者简介: 孙晓博 (1985—), 男, 湖南邵阳人, 硕士, 主要从事天然药物新资源及新剂型的开发。

Tel: (0731)85292093 E-mail: sunxiaobo16@126.com

*通讯作者 向大雄 Tel: (0731)85292093 E-mail: xiangdaxiong@163.com

难以达到药用的要求。近年来,大孔吸附树脂广泛应用于天然产物的富集^[5-6]。微波萃取能里外同时加热,消除了热梯度,有效地保护物料中的功能成分,使萃取质量大大提高,已有文献使用微波提取有效成分取得较好结果^[7]。本实验采用微波辅助提取单叶铁线莲总皂苷,并进一步采用大孔吸附树脂富集,探索最佳工艺条件和参数,确立纯化单叶铁线莲总皂苷的可行方法,为其开发应用提供实验依据。

1 仪器及材料

Specord—50 型紫外-可见分光光度计(德国耶拿分析仪器股份公司),恒温水浴锅(上海医疗器械五厂),Mettler 分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),RE52—98 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),NJL07—3 型微波提取器(南京杰全微波设备有限公司),YB—Z 真空恒温干燥箱(天津药典标准仪器厂)。HPD-100 型大孔树脂购自沧州宝恩大孔树脂有限公司;D-101、AB-8、LX-68 型大孔树脂购自西安蓝晓科技有限公司;S-8 型大孔树脂购自南开和成科技有限公司。

单叶铁线莲药材(购于湖南湘西燎原药业中心),经中南大学药学院李劲平博士鉴定为毛茛科铁线莲属植物单叶铁线莲 *Clematis henryi* Oliv. 干燥根;齐墩果酸对照品(批号为 10709-200304,购自中国药品生物制品检定所);其他试剂均为分析纯,水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 单叶铁线莲总皂苷的测定

2.1.1 线性关系考察^[8] 精密称定齐墩果酸对照品 4.5 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,定容至刻度,摇匀,得 0.45 mg/mL 对照品溶液。

精密吸取齐墩果酸对照品溶液 80、160、240、320、400、480 μ L 于 10 mL 具塞试管中,70 $^{\circ}$ C 水浴蒸干,加入新配制的 5%香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,摇匀,置 60 $^{\circ}$ C 水浴中加热 15 min,流水冷却,准确加入冰醋酸 5 mL,摇匀。以紫外-可见分光光度计在 400~760 nm 扫描,结果齐墩果酸在 552 nm 处有最大吸收。选取 552 nm 为测定波长。以齐墩果酸质量为横坐标,吸光度(A)值为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y=3.6724X-0.0059$, $r=0.9997$,表明齐墩果酸在 36~216 μ g 线性关系良好。

2.1.2 供试品溶液的制备与总皂苷的测定 取单叶

铁线莲药材粉末 1.0 kg,预先浸渍 12 h,依次以 10、10、8 倍量 70%乙醇微波提取 3 次,微波功率 300 W,每次 4 min。趁热滤过,合并提取液,回收乙醇,用蒸馏水定容至 5 L 即为样品液(含生药 0.2 g/mL),放置冰箱冷藏。准确量取单叶铁线莲样品液 10 mL,等量石油醚脱脂 3 次,等量水饱和正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇层,水浴挥干,甲醇溶解并定容至 50 mL。精密吸取此溶液 100 μ L,按“2.1.1”项下方法测定 A 值,计算样品液中总皂苷的量,结果平均质量分数为 10.53 mg/mL, RSD 为 1.37% ($n=6$)。

2.2 大孔树脂型号选择

取预处理好的湿树脂抽滤除去水分后,准确称取 5 g 于具塞三角瓶中,准确加入上述样品液 50 mL,室温放置 4 h,每隔 10 min 振摇 1 次,使皂苷充分吸附,滤过,测定滤液中总皂苷的质量浓度,计算各种树脂的静态饱和吸附量和吸附率。

将吸附饱和的树脂放入具塞三角瓶中,准确加入 95%乙醇 50 mL,室温放置 4 h,每隔 10 min 振摇 1 次,使皂苷充分解析,滤过,测定滤液中总皂苷的质量浓度,计算各种树脂的静态解吸率。结果见表 1。结果表明,D-101 树脂对单叶铁线莲总皂苷有较高静态吸附量和静态解吸率,表现出最佳的综合性能。故选择 D-101 大孔树脂作为纯化单叶铁线莲总皂苷的最佳树脂进行动态吸附-洗脱性能的研究。

饱和吸附量=(吸附前溶液中总皂苷的质量浓度-吸附后溶液中剩余总皂苷的质量浓度) $\times$ 溶液体积

吸附率=饱和吸附量/样品液吸附前的总皂苷量

解吸率=解析液体积 $\times$ 解析液中总皂苷质量浓度/饱和吸附量

2.3 D-101 大孔树脂对单叶铁线莲总皂苷动态吸附-洗脱参数考察

2.3.1 上样液质量浓度对动态吸附的影响 准确称

表 1 不同树脂静态吸附量和解吸率的比较

Table 1 Static adsorption and desorption of different macroporous resins

树脂型号	饱和吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%	解吸率/%
D-101	60.53	57.48	95.83
HPD-100	49.77	47.26	94.37
AB-8	54.03	51.31	91.59
S-8	59.25	56.27	84.31
LX-68	36.39	34.56	87.97

取经预处理的 D-101 树脂 10 g ($V=28$ mL), 湿法装柱。配制不同质量浓度的单叶铁线莲总皂苷溶液, 以 1 BV/h 的体积流量上柱吸附, 继以 4 BV 蒸馏水 2 BV/h 的体积流量洗脱杂质, 收集过柱残液和水洗液, 测定总皂苷, 计算比吸附量。结果见表 2。实验结果显示, 上样液质量浓度过低或过高都不利于总皂苷的吸附, 最佳上样质量浓度为生药 0.2 g/mL。

比吸附量 = (上样液质量浓度 × 上样液体积 - 过柱液质量浓度 × 过柱液体积 - 水洗液质量浓度 × 水洗液体积) / 树脂质量

表 2 上样液质量浓度对动态吸附的影响
Table 2 Effect of concentration on adsorption amount

上样液/ (g·mL ⁻¹)	上样体 积/mL	过柱液/ (mg·mL ⁻¹)	水洗液/ (mg·mL ⁻¹)	比吸附量/ (mg·g ⁻¹)	吸附 率/%
0.1	100	0.51	0.26	43.89	83.36
0.2	50	0.55	0.35	45.32	86.08
0.3	33.3	1.12	0.43	40.80	77.49
0.4	25	1.56	0.41	39.09	74.25

2.3.2 上样体积流量对动态吸附的影响 准确称取经预处理的 D-101 树脂 10 g ($V=28$ mL), 湿法装柱。取 50 mL 上样液, 分别以 0.5、1、2、3、4 BV/h 的体积流量上样吸附; 4 BV 蒸馏水 2 BV/h 的体积流量洗脱杂质, 收集过柱残液和水洗液, 测定其中总皂苷, 计算比吸附量。结果见表 3。可知, 较低的上柱体积流量有利于皂苷的吸附, 上柱液体积流量太大, 皂苷来不及扩散到树脂内表面而发生漏过。0.5 BV/h 的上样体积流量和 1 BV/h 的上样体积流量结果相差不大, 考虑节省操作时间, 确定最佳吸附体积流量为 1 BV/h。

2.3.3 上样液 pH 值对动态吸附的影响 准确称取经预处理的 D-101 树脂 10 g ($V=28$ mL), 湿法装柱。取 50 mL 上样液 5 份, 加入盐酸调节 pH 值分别为 4、5、6、7、8, 以 1 BV/h 上样吸附, 4 BV

表 3 吸附体积流量对动态吸附的影响

Table 3 Effect of flow rate on adsorption amount

上样液体积 流量/(BV·h ⁻¹)	过柱液/ (mg·mL ⁻¹)	水洗液/ (mg·mL ⁻¹)	比吸附量/ (mg·g ⁻¹)	吸附率/ %
0.5	0.67	0.23	46.06	87.48
1	0.69	0.25	46.93	89.14
2	0.87	0.29	45.19	85.83
3	1.32	0.34	41.51	78.84
4	1.77	0.39	40.33	76.60

蒸馏水 2 BV/h 洗脱杂质, 收集过柱残液和水洗液, 测定其中总皂苷, 计算比吸附量。结果见表 4。由实验结果可知, 上样液 pH 值对动态吸附结果影响较大。五环三萜皂苷元上常含有羧基, 多为酸性皂苷。这些酸性皂苷在植物体内常与钙、镁等离子结合成盐而存在, 当提取液呈弱酸性时, 三萜皂苷以分子形式存在, 有利于树脂的吸附。因此上样液的 pH 值宜控制在 5 左右。

表 4 上样液 pH 值对动态吸附的影响

Table 4 Effect of pH value on adsorption amount

上样液 pH 值	过柱液/ (mg·mL ⁻¹)	水洗液/ (mg·mL ⁻¹)	比吸附量/ (mg·g ⁻¹)	吸附率/ %
4	0.93	0.23	45.98	87.33
5	0.81	0.22	48.77	92.63
6	1.01	0.24	43.35	82.34
7	1.13	0.21	39.93	75.84
8	1.27	0.27	33.57	63.76

2.3.4 洗脱溶媒的选择 准确称取经预处理的 D-101 树脂 10 g ($V=28$ mL), 湿法装柱。按前面考察所得的最佳条件上样吸附后, 4 BV 蒸馏水 2 BV/h 洗脱杂质, 再依次用蒸馏水及 30%、50%、70%、95%乙醇 4 BV 上柱洗脱, 洗脱体积流量 2 BV/h。收集各洗脱液, 检测其总皂苷; 浓缩洗脱液至干, 真空干燥至恒定质量, 计算总皂苷质量分数。结果见表 5。可以看出, 单叶铁线莲皂苷主要集中在 50% 和 70%乙醇洗脱液中, 且 70%乙醇洗脱所得的总皂苷质量分数较高。因此选择 70%乙醇为洗脱溶媒。

2.3.5 洗脱剂用量对动态解吸的影响 准确称取经预处理的 D-101 树脂 10 g ($V=28$ mL), 湿法装柱。按前面考察所得的最佳吸附工艺条件上样后, 4 BV 蒸馏水 2 BV/h 洗脱杂质, 继用 6 BV 70%乙醇洗脱, 体积流量控制为 2 BV/h, 每树脂床体积收集为 1 份, 分别编号为 1、2、3、4、5、6, 计算总皂苷的洗脱

表 5 不同洗脱剂对总皂苷解吸的影响

Table 5 Effect of different eluting agents on desorption of total saponins

洗脱剂	总皂苷洗脱量/mg	总固形物/mg	质量分数/%
蒸馏水	1.6	37.1	4.29
30%乙醇	7.7	69.6	10.99
50%乙醇	84.1	171.7	49.00
70%乙醇	286.3	403.2	71.11
95%乙醇	13.7	59.4	23.01

量、洗脱率。结果见表 6。结果表明,第 5、6 份洗脱液中总皂苷质量浓度已经很低,可认为 4 BV 时已经把总皂苷基本洗脱完全,从生产成本及洗脱效率方面综合考虑,选定 4 BV 为最佳的洗脱剂用量。

洗脱量=洗脱液质量浓度×洗脱液体积

洗脱率=洗脱量/(上样液质量浓度×上样液体积)

表 6 洗脱剂用量对总皂苷解吸的影响

Table 6 Effect of eluent amount on desorption of total saponins

编号	总皂苷洗脱量/mg	洗脱率/%
1	142.59	27.07
2	157.65	29.94
3	114.13	21.68
4	26.27	4.99
5	6.57	1.22
6	3.66	1.02

2.3.6 洗脱剂体积流量对动态解吸的影响 准确称取经预处理的 D-101 树脂 10 g ($V=28$ mL) 4 份,湿法装柱。按前面考察所得的条件上样吸附后,4 BV 蒸馏水 2 BV/h 洗脱杂质,继用 4 BV 70%乙醇分别以 1、2、3、4、5 BV/h 洗脱,计算总皂苷洗脱量。结果见表 7。体积流量小有利于皂苷在树脂和洗脱液间进行扩散和平衡,因而较小的洗脱体积流量有较好洗脱效果。根据实验结果,采用 1 BV/h 和 2 BV/h 的体积流量洗脱效果相差并不明显,考虑到生产效率,采用 2 BV/h 的洗脱体积流量。

表 7 洗脱剂体积流量对总皂苷解吸的影响

Table 7 Effect of eluent flow rate on desorption of total saponins

体积流量/(BV·h ⁻¹)	总皂苷洗脱量/mg
1	435.59
2	437.65
3	424.13
4	406.27
5	389.57

2.3.7 冲洗杂质用水体积的考察 准确称取经预处理的 D-101 树脂 10 g ($V=28$ mL) 5 份,湿法装柱。按前面考察所得的条件上样吸附后,分别用 1、2、3、4、5 BV 蒸馏水以 2 BV/h 体积流量冲洗,继用 4 BV 70%乙醇以 2 BV/h 洗脱,计算总皂苷洗脱量,减压浓缩,真空干燥,称定质量,计算总皂苷质量

分数。结果见表 8。由结果可知,水洗能提高总皂苷的质量分数,超过 4 BV 则对其质量分数没有明显的影响,过多水洗会损耗总皂苷,且浪费时间。综合考虑,选择 4 BV 为洗脱杂质用水量。

表 8 不同体积水洗对除杂效果的影响

Table 8 Effect of different amount of washing water on impurities

蒸馏水用量/ BV	总皂苷洗脱量/ mg	总固形物/ mg	质量分数/ %
1	433.59	697.13	62.20
2	429.65	629.62	68.23
3	424.13	601.77	70.48
4	423.27	593.25	71.35
5	421.66	591.46	71.29

2.3.8 工艺重复验证试验 准确称取经预处理的 D-101 树脂 10 g ($V=28$ mL),湿法装柱。取样品液 50 mL,调节 pH 值为 5,以 1 BV/h 上样,4 BV 蒸馏水 2 BV/h 洗脱杂质,4 BV 70%乙醇以 2 BV/h 洗脱总皂苷,收集洗脱液,测定其中总皂苷的量。减压回收,干燥称定质量,计算洗脱液总固形物中总皂苷的质量分数;另取 50 mL 样品液,挥干称定质量,计算上样液总固形物中总皂苷质量分数;计算收率、精制度。以上试验平行 3 份,实验结果见表 9。可知,纯化后单叶铁线莲总皂苷质量分数由原来的 29.95%提高到 71.53%,收率达到 86.02%,精制度达到 238.81%,纯化效果较好。

收率=洗脱液总固形物中总皂苷的质量/上柱液中总皂苷的质量

精制度=洗脱液总固形物中总皂苷的质量分数/上柱液总固形物中总皂苷的质量分数

2.3.9 树脂使用次数对纯化性能的影响 准确称取经预处理的 D-101 树脂 10 g ($V=28$ mL),湿法装柱。根据已确定的最佳吸附及洗脱条件,在此树脂柱上反复进行吸附和洗脱试验 8 次,计算使用 2、4、6、8 个周期所得产品的质量分数、收率,结果见表 10。结果表明,D-101 树脂连续使用 6 次后,纯化能力逐渐下降。其原因可能是随着吸附-洗脱次数的增加,残留在树脂上不被洗脱下来的杂质增加,使吸附减弱或丧失。因此在使用 6 次之后,应对树脂进行再生处理。

3 讨论

单叶铁线莲是土家族民间常用药材,药用历史

表9 验证试验 ($n=3$)
Table 9 Validation test ($n=3$)

编号	质量分数/%		收率/%	精制度/%
	精制前	精制后		
1	30.45	71.79	85.25	235.76
2	29.52	70.65	86.15	239.29
3	29.89	72.16	86.64	241.38

表10 树脂使用次数对总皂苷质量分数和收率的影响
Table 10 Effect of using times on content and yield

树脂使用次数	质量分数/%	收率/%
2	72.47	86.14
4	72.35	86.11
6	71.61	84.95
8	68.10	78.37

悠久,但其有效成分的提取方法是传统的水提、醇提,所得产品纯度低。本实验利用微波辅助初步提取后,利用大孔树脂纯化初提物,较大地提高了纯度;且实验所用试剂安全无毒,提取方法简便易行,适合工业化生产。

大孔树脂近年来广泛应用于天然药物有效部位的分离与纯化,但目前没有一套由权威机构制订的使用考察方案,各个使用单位在树脂考察方面也不尽相同。本实验根据大孔树脂的吸附、洗脱两个特点,静态法选择出最佳的纯化树脂,并确定了上样量,动态法考察最佳工艺参数,分别以提取液上样质量浓度、上样体积流量、上样液 pH 值、洗脱溶剂选择、洗脱溶剂用量、洗脱体积流量等为考察项目,逐一进行考察,比较全面地制订了一套树脂工

艺考察方案。

吸附过程为一放热过程,故还应控制上样液的温度在较低的范围。实验经验表明,提取液在上柱前进行抽滤或离心等预处理除去沉淀和杂质,使上样液澄清,有利于产物纯度的提高,亦能提高树脂的使用寿命。树脂柱的粗细也会影响分离效果,树脂柱过细,容易产生气泡;树脂柱过粗,吸附难以完全;通常树脂柱最佳径高比一般选择在 1:7~1:10。

参考文献

- [1] 湖南省中药材标准 [S]. 2009.
- [2] 孙 凤,杨得坡. 铁线莲属植物的化学成分研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2660-2668.
- [3] Du Z Z, Zhu N, Ze-ren-wang-mu N, et al. Two new antifungal saponins from the Tibetan herbal medicine *Clematis tangutica* [J]. *Planta Med*, 2003, 69(6): 547-551.
- [4] Ding Q, Yang L X, Yang H W, et al. Cytotoxic and antibacterial triterpenoids derivatives from *Clematis ganpiniana* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(3): 382-385.
- [5] 朱 珊,刘岱琳,王淑萍,等. 大孔吸附树脂法对固公果根中鞣质的吸附解吸研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 896-900.
- [6] 王春民,刘 刚,费 艳,等. 大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 58-60.
- [7] 焦士龙,褚治德,马一太. 均匀设计法优选微波提取石菖蒲挥发油的工艺研究 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1665-1666.
- [8] 黄卫平,杨 红,王 筋,等. 溶石胶囊中威灵仙总皂苷的含量测定研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(4): 338-339.