

高纯度积雪草总苷的制备工艺研究

陈俊^{1,2,3}, 张小龙^{1,2}, 杨时^{1,2}, 原少伟^{1,2}, 丁岗^{1,2,3}, 王振中^{1,2,3}, 萧伟^{1,2,3*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 研究高纯度积雪草总苷的制备工艺。方法 采用大孔树脂分离技术与重结晶技术相结合的方法, 优选最佳积雪草总苷制备工艺参数, 同时建立积雪草总苷 HPLC 检测方法。结果 积雪草药材采用 75%乙醇回流提取、回收乙醇、水沉、酸沉, 通过 HPD-100 大孔树脂柱富集后, 再采用醋酸乙酯重结晶方法, 可制备质量分数 90%以上的积雪草总苷。结论 该工艺稳定性高、重复性好, 适合于制备高纯度的积雪草总苷。

关键词: 积雪草; 积雪草总苷; 积雪草苷; 羟基积雪草苷; 积雪草苷 B; HPLC

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)04-0504-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.010

Preparing technology of asiaticosides with high-purity

CHEN Jun^{1,2,3}, ZHANG Xiao-long^{1,2}, YANG Shi^{1,2}, YUAN Shao-wei^{1,2}, DING Gang^{1,2,3}, WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, XIAO Wei^{1,2,3}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

3. Jiangsu Enterprise Academician Workstation, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To study the preparing technology of asiaticosides with high purity. **Methods** Macroreticular resin column chromatography and recrystallization were used to optimize the preparing technology of asiaticosides. HPLC method was established for the content determination of asiaticosides. **Results** *Centella asiatica* was subjected to 75% ethanol distillation, water and acid precipitation, HPD100 macroreticular resin separation, and recrystallization in acetic ester. Then asiaticosides with high purity over 90% were obtained. **Conclusion** The process is stable and feasible, and it could be used for the preparation of high-purity asiaticosides.

Key words: *Centella asiatica* (L.) Urban; asiaticosides; asiaticoside; madecassoside; asiaticoside B; HPLC

积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 为伞形科积雪草属植物, 又称崩大碗、马蹄草、老鸦碗、铜钱草、铁灯盏等, 分布于我国陕西、长江流域及以台湾、福建等南方各省区^[1]。该植物全草入药, 《神农本草经》中将其列为中品, 性寒, 味苦、辛, 具有清热利湿、解毒消肿之功效。《中国药典》2010 年版收载积雪草为常用中药材, 具有清热利湿、解毒消肿的功效, 用于湿热黄疸、中暑腹泻、石淋血淋、痈肿疮毒、跌扑损伤等; 临床上也常用于传染性肝

炎、流行性脑脊髓膜炎的疗效, 具有抗氧化、抗胃溃疡、抑制肿瘤细胞增生等作用^[2-4]。现代研究表明积雪草的主要活性成分为三萜皂苷、黄酮、挥发油、多炔烯烃等, 其中三萜皂苷类成分为积雪草的主要活性成分, 具有显著的抗增生、抗纤维化、抗抑郁、抗癌症、抗氧化和改善智力等作用^[5-13]。《中国药典》2010 年版收录积雪草总苷为积雪苷片的原料, 要求控制积雪草总苷以羟基积雪草苷和积雪草苷总量计, 不得少于 55.0%^[14]。本课题主要针对积雪草苷、

收稿日期: 2013-10-09

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划 (2006BAI11B03)

作者简介: 陈俊, 男, 工程师, 研究方向为中药新药研究与开发。Tel: (025)86587930-8103 E-mail: enjoysuly@163.com

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337/13905136437 E-mail: wzzhz-nj@163.net

羟基积雪草苷和积雪草苷 B, 采用现代提取纯化技术进行高纯度积雪草总苷的制备工艺研究。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 二元泵, DAD 检测器 (美国安捷伦科技公司); Mettler AE 240 电子天平 (德国梅特勒-托利多公司); SYZ—A 石英亚沸高纯水蒸馏器 (常州普天仪器制造有限公司); Buchi R210 旋转蒸发仪 (瑞士步琪实验仪器公司)。

积雪草由安徽丰原铜陵中药饮片有限公司提供 (批号 20080214、20080914、20080920、20080926), 经南京中医药大学吴德康教授鉴定为伞形科积雪草属植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 的干燥全草。对照品羟基积雪草苷 (批号 110893-200201)、积雪草苷 (批号 110892-200403), 中国食品药品检定研究院; 对照品积雪草苷 B (成都曼思特生物科技有限公司, 批号 20030312, 98%)。乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); HPD-100、D-101、AB-8 大孔树脂 (河北沧州宝恩化工有限公司); 水 (重蒸水); 甲醇、醋酸乙酯 (分析纯, 南京化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 积雪草总苷定量测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 对照品 12.80、16.00、12.80 mg, 以甲醇溶解于同一个 10 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得混合对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取积雪草总苷供试品适量, 精密称定, 加甲醇制成积雪草总苷 5 mg/mL 的供试品溶液, 摇匀, 即得。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈ 100 A 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃; 检测波长为 205 nm; 体积流量 1 mL/min; 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱程序: 0~30 min, 22%乙腈; 30~35 min, 22%~28%乙腈; 35~45 min, 28%乙腈。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取一定量的对照品储备液, 用甲醇稀释为积雪草苷和积雪草苷 B 质量浓度分别为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 mg/mL、羟基积雪草苷质量浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/mL 的混合对照品溶液。按上述色谱条件进样 10 μL 测定。以进样量为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得积雪草苷回归方程为 $Y=2\,504.566X-16.043$, $r=0.999\,9$; 羟基积雪草苷回归方程为 $Y=1\,722.724X-8.816$, $r=0.999\,8$; 积雪草苷 B 回归方程为 $Y=2\,285.305$

$X+27.739$, $r=0.999\,9$ 。结果表明, 积雪草苷和积雪草苷 B 在 2.0~64.0 μg, 羟基积雪草苷在 2.5~80.0 μg, 均具有良好的线性关系。

2.1.5 测定方法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

2.2 药材提取制备

根据文献报道^[15-16], 结合积雪草总苷的理化性质, 本研究采用 75%乙醇对积雪草药材进行回流提取。具体提取方法: 加 10 倍量 75%乙醇, 提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 回收乙醇备用。

2.3 除杂方法考察

高体积分数的乙醇提取时, 在得到积雪草总苷的同时, 也提取出了部分的脂溶性成分, 本研究首先采用醇提水沉的工艺对积雪草提取液进行部分除杂, 即积雪草醇提液减压回收乙醇至无醇味, 浓缩至相当于生药材 1 g/mL, 加 4 倍量水, 边加边搅拌, 冷藏过夜, 离心, 取离心液。

文献报道^[4-5]积雪草中三萜类成分除积雪草总苷外, 还含有积雪草酸、羟基积雪草酸, 均为弱酸性物质。为了去除积雪草酸、羟基积雪草酸, 本研究采用调节 pH 值至强酸性使之沉淀析出而达到除杂的目的。经过对比研究, 最终确定用 2 mol/L 盐酸调节水沉上清液 pH 值至 2.0, 冷藏过夜后离心, 取离心液, 干燥, 加适量甲醇溶解, 按“2.1”项下方法测定积雪草总苷的量, 测得积雪草苷为 7.5%, 羟基积雪草苷为 9.1%, 积雪草苷 B 为 7.4%, 3 种苷总量可提高到 24.0%。实验结果表明, 积雪草水沉上清液调节 pH 值为 2.0 时, 可去除部分杂质。最终确定沉淀法除杂工艺, 即积雪草醇提液减压回收乙醇至无醇味, 浓缩至相当于生药材 1 g/mL, 加 4 倍量水, 边加边搅拌, 冷藏过夜, 离心, 取离心液。离心液用 2 mol/L 的盐酸调节 pH 值为 2.0, 冷藏过夜, 离心, 取离心液。

2.4 大孔树脂富集工艺考察

根据相关文献及专利信息, 从积雪草中制备积雪草总苷的方法主要有溶剂萃取法、大孔树脂法, 从产业化的可行性及制备成本考虑, 本研究拟利用大孔树脂来制备积雪草总苷。

2.4.1 大孔树脂型号考察 通过文献调研和前期的预实验发现苯乙烯型非极性或非极性的大孔树脂对积雪草苷类的三萜皂苷吸附分离效果显著, 因此本课题选用价格低廉的生产中比较常用的 3 种苯乙烯型大孔树脂 HPD-100、D-101、AB-8 进行考察^[17]。

取酸沉后的积雪草水溶液, 平行 3 份, 按照生药材-湿树脂 2:1 的比例, 分别加于已处理好的 HPD-100、D-101、AB-8 大孔树脂柱上 (径高比为 1:10), 以 0.5 BV/h 的体积流量过树脂柱, 依次用 5 个柱体积 (BV) 的水、2 BV 的 40%乙醇、5 BV 的 70%乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗脱, 收集 40%、

70%乙醇洗脱液; 回收乙醇, 真空干燥, 得干膏, 按“2.1”项下方法测定积雪草总苷的量, 结果见表 1。实验结果表明, HPD-100 大孔树脂在相同的洗脱条件下对积雪草总苷的洗脱能力远比 D-101、AB-8 大孔树脂强, 因此选择 HPD-100 大孔树脂对积雪草总苷进行精制。

表 1 不同型号大孔树脂对积雪草苷量的影响

Table 1 Effects of different kinds of macroporous resins on contents of asiaticosides

树脂型号	样品名称	洗脱液体积 / mL	得膏量 / mg	积雪草总苷 / mg
D-101	40%乙醇洗脱液	157	440.23	20.46
	70%乙醇洗脱液	416	304.51	172.13
HPD-100	40%乙醇洗脱液	154	418.26	15.23
	70%乙醇洗脱液	402	329.64	303.93
AB-8	40%乙醇洗脱液	190	422.56	13.47
	70%乙醇洗脱液	498	341.63	169.82

2.4.2 洗脱液乙醇体积分数的考察 取酸沉后的积雪草水溶液, 平行 9 份, 按照生药材-湿树脂 2:1 的比例分别加于已处理好的 HPD-100 大孔树脂柱上 (径高比为 1:10), 以 0.5 BV/h 的体积流量过树脂柱, 用 5 BV 的水洗涤树脂柱, 再分别用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、95%乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗脱, 收集 8 BV 的乙醇洗脱液, 回收乙醇, 真空干燥, 残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 滤过, 按“2.1”项下方法测定积雪草总苷的量, 结果见表 2。实验结果表明, 10%、20%乙醇洗脱物中均未检出积雪草苷、羟基积雪草苷、积雪草苷 B; 30%乙醇洗脱物中总苷的量小于 8 mg, 因此选择 30%乙醇作为树脂洗脱除杂的条件; 50%、60%乙醇洗脱物中积雪草苷、羟基积雪草苷的总量较其他洗脱物高, 且 50%、60%乙醇洗脱物中积雪草苷、羟基积雪草苷的总量相差不大, 考虑生产成本, 确定采用 50%乙醇洗脱, 收集 50%乙醇洗脱液。

2.4.3 50%乙醇洗脱用量的考察 取酸沉后的积雪草水溶液, 按照生药材-湿树脂 2:1 的比例, 分别加于已处理好的 HPD-100 大孔树脂柱上 (径高比为 1:10), 以 0.5 BV/h 的体积流量洗脱, 依次用 5 BV 水、4 BV 30%乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗涤树脂柱除杂, 再用 50%乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗脱, 分别收集每个床层体积的洗脱液, 共收集 10 BV。洗脱液回收乙醇, 干燥, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 滤过, 按“2.1”项下方法测定积雪

表 2 不同体积分数的乙醇洗脱对积雪草总苷量的影响

Table 2 Effects of different concentration of ethanol on contents of asiaticosides

洗脱液	积雪草苷 / mg	羟基积雪草苷 / mg	积雪草苷 B / mg	积雪草总苷 / mg
10%乙醇	—	—	—	—
20%乙醇	—	—	—	—
30%乙醇	1.98	3.21	2.51	7.70
40%乙醇	17.75	21.39	16.98	56.12
50%乙醇	27.37	36.76	25.47	89.60
60%乙醇	27.27	36.90	25.71	89.88
70%乙醇	19.36	26.92	17.50	63.78
80%乙醇	16.91	26.87	14.08	57.86
95%乙醇	14.23	26.86	11.92	53.02

草总苷的量, 结果见表 3。实验结果表明, 50%乙醇第 1~4 个 BV 的洗脱液中积雪草总苷的量逐渐上升, 4 倍量时达到最高值, 8 倍量时总苷得率已达到 81.7%, 而在第 8 个 BV 后, 总苷的量已经明显降低。因此确定 50%乙醇洗脱较佳体积为 8 BV, 即上样后, 依次用 5 BV 水、4 BV 30%乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗涤树脂柱除杂, 再用 50%乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗脱, 收集 8 BV 的 50%乙醇洗脱液。

2.5 精制方法考察

通过大孔树脂富集后积雪草总苷的质量分数可达到 60%~65%, 为了制备高纯度积雪草总苷 (质量分数≥90%), 必须对积雪草总苷做进一步的纯化。通过文献调研^[18], 纯化积雪草总苷应用较多的

表 3 不同用量 50%乙醇对积雪草总苷量的影响

Table 3 Effects of different volumes of 50% ethanol on contents of asiaticosides

洗脱液 / BV	积雪草苷 / mg	羟基积雪草苷 / mg	积雪草苷 B / mg	积雪草总苷 / mg	得率 / %	总得率 / %
1	1.72	2.10	1.84	5.66	2.5	2.5
2	3.57	4.47	3.52	11.56	5.2	7.7
3	8.75	10.88	7.94	27.57	12.4	20.1
4	16.47	21.56	16.97	55.00	24.7	44.8
5	13.97	15.88	12.31	42.16	19.0	63.8
6	7.24	8.15	7.02	22.41	10.1	73.9
7	4.15	4.06	4.22	12.43	5.6	79.5
8	1.76	1.60	1.58	4.94	2.2	81.7
9	0.94	1.06	1.10	3.10	1.3	83.0
10	0.65	0.66	0.58	1.89	0.1	83.1

为溶剂提取法和结晶法。分别考察了水饱和正丁醇萃取、醋酸乙酯结晶、丙酮结晶法对积雪草总苷纯化的效果。

取积雪草总苷粗品粉末 100 mg, 精密称定, 平行 3 份。其中 1 份加 10 mL 水溶解, 滤过, 用氯仿振摇提取 2 次, 每次 10 mL, 弃去氯仿液; 水液用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次 (20、20、10、10 mL), 合并正丁醇液。正丁醇液蒸干, 残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液。另外 2 份加 10 mL 甲醇溶解, 滤过, 分别加入 8 倍量的醋酸乙酯、丙酮至析出白色结晶,

边加边搅拌, 冷藏 1 h, 抽滤, 分别用少量醋酸乙酯、丙酮洗涤结晶, 真空干燥。分别取结晶物 10 mg, 精密称定, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液。按“2.1”项下方法测定积雪草总苷的量, 结果见表 4。实验结果表明, 正丁醇萃取积雪草总苷的质量分数为 95.40%, 醋酸乙酯结晶积雪草总苷的质量分数为 93.02%, 丙酮结晶为 79.29%, 纯化效果依次为正丁醇萃取>醋酸乙酯结晶>丙酮结晶。从产业化的可行性、制备成本等方面综合考虑, 确定醋酸乙酯结晶法为较佳的纯化方法。

表 4 不同纯化方法对积雪草总苷量的影响

Table 4 Effects of different methods of purification on contents of asiaticosides

纯化方法	称样量 / mg	积雪草苷 / mg	羟基积雪草苷 / mg	积雪草苷 B / mg	积雪草总苷 / %
丙酮结晶	13.11	3.47	3.74	3.18	79.29
醋酸乙酯结晶	13.90	4.36	4.59	3.98	93.02
正丁醇萃取	11.01	3.46	3.81	3.23	95.40

2.6 验证试验

综合以上研究结果, 得出高纯度积雪草总苷的最佳提取工艺: 积雪草药材加 75%乙醇回流提取 2 次, 每次 10 倍量提取 1 h, 滤过, 合并滤液; 滤液减压回收乙醇, 浓缩至相当于生药材 1 g/mL, 冷却至室温; 加 4 倍量水, 边加边搅拌, 4 °C 冷藏过夜; 离心, 取上清液, 用 2 mol/L 的盐酸调节 pH 值至 2.0, 4 °C 冷藏过夜; 离心, 取上清液; 按生药材-湿树脂 2:1 的比例加于已处理好的 HPD-100 大孔树脂柱上 (径高比为 1:10), 提取物水溶液以 0.5 BV/h 的体积流量过树脂柱, 先用 5 BV 水洗涤树脂

柱, 再用 4 BV 30%乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗涤树脂柱, 最后用 50%乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗脱, 收集 8 BV 50%乙醇洗脱液; 洗脱液减压回收乙醇至无醇味, 干燥, 粉碎; 用适量甲醇溶解, 滤过, 加入 8 BV 醋酸乙酯, 4 °C 冷藏 1 h, 滤过, 以少量醋酸乙酯洗涤结晶物, 真空干燥, 粉碎, 即得。按上述优选的制备工艺条件进行验证, 所得结果见表 5。3 批验证试验结果表明, 积雪草总苷的制备工艺稳定性良好、可重复性强, 工艺合理、可行。

积雪草总苷是积雪草中主要的活性成分, 本实验通过系统的提取、精制、分离、纯化研究, 建立

表5 验证试验结果
Table 5 Results of verification test

批号	投料量 / g	质量分数 / %				积雪草总苷 / g	总苷转移率 / %
		积雪草苷 B	羟基积雪草苷	积雪草苷	积雪草总苷		
20080914	1 000	27.45	37.42	26.12	90.99	8.4	83.7
20080920	1 003	28.77	39.36	26.94	95.07	8.2	81.9
20080926	1 001	28.43	38.70	26.90	94.03	7.9	78.9

了高纯度积雪草总苷的制备工艺,可使积雪草总苷的质量分数到达90%以上,其中羟基积雪草苷的质量分数高于35%、积雪草苷和积雪草苷B的质量分数均高于25%。该工艺使用有机溶剂少且均可回收再利用,工艺的稳定性、重复性良好,有望进一步开发应用于工业化大生产。

3 讨论

在工艺研究预试验中,本课题对不同产地、不同采集时间的药材进行了对比分析,研究表明秋季采收药材较佳,可以避免药材中过多的叶绿素影响分离效果。

在水沉、酸沉考察研究中发现,酸沉、水沉顺序对实验结果存在不同的影响,研究结果表明,先酸沉后水沉,其效果优于先水沉再酸沉。

根据预实验结果,结合文献报道,本课题将大孔树脂上样量定为生药材-湿树脂2:1的比例,但在实际的生产中,应尽可能提高树脂柱的径高比,且应着重考察树脂量与药材上样量的比例关系,以提高树脂的利用率。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [4] Qin L P, Zhuang W G, Zheng H C, et al. Advances in study on *Centella asiatica* [J]. *World Notes: Phytomed*, 1997, 12(4): 154-157.
- [5] 何明芳, 孟正木, 沃联群. 积雪草化学成分的研究 [J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(2): 91-931.
- [6] Zainol M K, Abd-Hamid A, Yusof S, et al. Antioxidative

activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *Food Chem*, 2003, 81: 575-581.

- [7] 谢举临, 利天增, 祁少海, 等. 积雪草苷对体外培养的成纤维细胞的作用 [J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(1): 41-43.
- [8] Babu T D, Uttan G K, Padikkala J. Cytotoxic and antitumor properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) [J]. *J Ethnopharmacol*, 1995, 48: 53-57.
- [9] Cheng L, Guo J S, Luk J, et al. The healing effects of *Centella* extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats [J]. *Life Sci*, 2004, 74: 2237-2249.
- [10] 祁少海, 谢举临, 利天增, 等. 积雪草苷对烧伤增生性瘢痕作用的实验研究 [J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 53-561.
- [11] 陈瑶, 韩婷, 秦路平, 等. 积雪草甙对小鼠抑郁行为和脑内氨基酸含量的影响 [J]. 中药材, 2003, 26(12): 870-872.
- [12] 陈军, 华维一, 孙宏斌. 积雪草酸及其衍生物的生物活性研究概况 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 458-460.
- [13] 陈瑶, 秦路平, 郑汉臣, 等. 积雪草甙对抑郁症大鼠神经内分泌功能的影 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(11): 1224-1226.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [15] 陈瑶, 韩婷, 秦路平, 等. 正交设计法优选积雪草总苷的提取工艺 [J]. 中药材, 2003, 26(3): 204-205.
- [16] 陈怡, 高文远, 于泉林, 等. 田口试验设计法优选积雪草提取工艺 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1714-1716.
- [17] 黄怀鹏, 刘彩霞, 高国领, 等. 大孔树脂纯化积雪草总苷的工艺研究 [J]. 中药材, 2008, 31(7): 1072-1075.
- [18] 董朝敏. 积雪草黄酮和皂苷的提取分离及其性质研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2007.