

竹节参总皂苷的大孔吸附树脂纯化与离子交换树脂脱色工艺研究

何春喜^{1,2}, 余泽义², 何毓敏^{2*}, 许成², 张长城², 袁丁^{1,3*}

1. 三峡大学生物与制药学院, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

3. 三峡大学仁和医院, 湖北 宜昌 443002

摘要: **目的** 优化竹节参总皂苷大孔吸附树脂纯化和离子交换树脂脱色的工艺方法。**方法** 以竹节参皂苷 IVa 为对照品, 采用香草醛-高氯酸显色后用分光光度法测定竹节参总皂苷的量; 以动态吸附和静态解吸附实验方法筛选适宜型号的大孔吸附树脂并优化分离纯化工艺参数; 以竹节参总皂苷保留率、脱色率为指标筛选合适类型的离子脱色树脂并优化其脱色效果。**结果** X-5 型大孔吸附树脂对竹节参总皂苷有较好的纯化效果, 其最佳纯化条件为上样质量浓度为生药 0.2 mg/mL, 上样量为每克树脂 10 g 生药, 洗脱剂为 70%乙醇, 洗脱剂用量为每克树脂 5 mL; 脱色工艺研究表明, 732 型阳离子交换树脂对大孔吸附树脂法得到的竹节参皂苷粗品具有良好的脱色效果, 优化后的脱色工艺的操作方法是大孔吸附树脂醇洗脱液经回收溶剂至无醇味后, 调整浓缩液 pH 值为 10, 上样于 732 型阳离子交换树脂, 收集流出液脱色率大于 50%的馏份, 此时每克树脂脱色竹节参总皂苷量为 290.5 mg。经减压干燥后, 最终获得的精制竹节参总皂苷外观呈类白色至黄白色, 其质量分数大于 85.0%, 总转移率超过 70.0%。**结论** 建立的方法能较好地分离纯化竹节参总皂苷, 适用于工业化生产。

关键词: 竹节参; 总皂苷; 纯化; 脱色; 大孔吸附树脂; 离子交换树脂; 竹节参皂苷 IVa; 吸附; 保留率

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)06-1146-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.015

Purification of macroporous adsorption resin and decolorization of ion exchange resin of total saponins of *Panax japonicus*

HE Chun-xi^{1,2}, YU Ze-yi², HE Yu-min², XU Cheng², ZHANG Chang-cheng², YUAN Ding^{1,3}

1. College of Biological and Pharmaceutical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. Medical Science College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

3. Ren-He Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: **Objective** To establish a simple and effective extraction method for the preparation of total saponins of *Panax japonicus* (TSPJ). **Methods** Combination of macroporous adsorption and ion exchange resin chromatography was adopted in the present study. For quality evaluation, chikusetsusaponin IVa was used as reference, and vanillin-perchloric acid was applied as chromogenic reagent to determine total saponin content at 545 nm. **Results** X-5 macroporous resin offered better adsorption and desorption capacities for TSPJ than other macroporous resins. The optimum purification process was confirmed as follows: The sample solution concentration was 0.2 mg/L; The sample volume was 10 g/g, and eluting with 5 mL of 70% aqueous ethanol solutions on 1 g wet macroporous resin column. Followed this step, decoloring of TSPJ was studied and the decoloring capacity of two different types of ion exchange resins was evaluated. The result showed that 732-type cation exchange resin was the better resin for decolorization of the TSPJ. The total saponin products with higher purity and quality were obtained, with the mass fraction more than 85.0%, and the transfer rate of TSPJ was more than 70.0%. **Conclusion** The results show that the total saponins can be separated and purified effectively from *P. japonicus*. The preparation method is simple, effective, and efficient for large-scale preparation of TSPJ.

Key words: *Panax japonicus* C. A. Mey.; total saponins; purification; decolorization; adsorptive macroporous resin; ion exchange resin; chikusetsusaponin IVa; adsorption; retention rate

收稿日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目——基于分子谱系地理学与谱-效关联方法研究竹节参资源品质差异形成机制 (31570329)

作者简介: 何春喜 (1993—), 男, 在读硕士研究生。Tel: 18371746290 E-mail: 1037121946@qq.com

*通信作者 何毓敏 (1980—), 男, 博士, 讲师, 主要从事药物植物资源与天然药物化学研究。E-mail: hym0811@163.com

袁丁 (1964—), 男, 教授, 博士生导师。E-mail: yuanding9732@163.com

竹节参为五加科 (Araliaceae) 人参属 *Panax* Linn. 植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥呈竹鞭状根茎, 是我国西南地区民间常用中草药, 收载于 1975 年及以后历版《中国药典》, 功效为散瘀止血、消肿止痛、祛痰止咳、滋补强壮, 常用于癆嗽咯血、跌扑损伤、病后虚弱等^[1]。竹节参中含三萜皂苷、多糖、黄酮和挥发油等成分^[2-3]。现代药理学研究表明, 以竹节参皂苷 IVa、V 为代表的皂苷类成分具有抗氧化、抗炎镇痛、抗衰老、抗疲劳、降糖等多种药理活性^[4-7]。

随着竹节参皂苷药理学研究的深入, 开发一种实用、高效的竹节参总皂苷提取工艺成为其开发利用的重要环节。目前对竹节参皂苷的提取工艺的研究较多, 主要包括水提法^[8]、醇提法^[9]、微波法^[10]、泡沫分离法精制^[11]、丙酮沉淀法精制^[12]、树脂吸附法精制^[13]等。本课题组曾对竹节参总皂苷的不同提取工艺进行了比较研究^[9,14], 认为不同工艺各具优势和特点, 且所得竹节参总皂苷的质量分数均可超过 50%, 其中尤以大孔树脂吸附分离的纯化效果最佳。然而实验发现, 大孔吸附树脂法对色素的去除并不理想, 所得产品颜色较深, 影响外观。为此, 本实验通过对竹节参中总皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺和离子交换树脂脱色工艺^[15]进行研究, 探索制备高品质竹节参皂苷的工艺开发流程, 为其工业化生产提供实验依据。

1 仪器与材料

U-5500 型紫外-可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; LD4-40 型低速大容量离心机, 北京京立离心机有限公司; FD-1C-80 型冷冻干燥仪, 北京博医康实验有限公司; AB204-N 型电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; Starter 3100 型实验室 pH 计, 奥豪斯仪器有限公司。

竹节参药材产于湖北省恩施州椿木营乡, 经三峡大学医学院何毓敏博士鉴定为五加科人参属植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥根茎, 符合《中国药典》2015 年版竹节参项下的相关规定。对照品竹节参皂苷 IVa, 批号 51415-02-2, 质量分数 >98%, 购于成都植标化纯生物技术有限公司。

大孔吸附树脂 X-5、D101、AB-8 购于南开大学化工厂; HP-20 购于日本三菱化学公司; DM-130 购于山东鲁抗医药股份有限公司。732 型阳离子交换树脂和 D941 型阴离子交换树脂购于山东鲁抗医药股份有限公司。各树脂的理化性能参数见表 1。

表 1 不同型号树脂的理化性能参数

Table 1 Physical parameters of different types of adsorptive macroporous resins

类型	极性	孔径/ nm	比表面积/ (m ² ·g ⁻¹)	含水量/%
X-5	非极性	29~30	500~600	56~66
DM-130	弱极性	9~10	500~550	65~75
AB-8	弱极性	13~14	480~550	65~75
HP-20	非极性	29~30	500~600	56~66
D101	非极性	9~11	550~600	65~75

实验所用乙醇、香草醛、高氯酸、冰醋酸、盐酸、氢氧化钠均为分析纯, 水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 竹节参总皂苷的定量测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备 竹节参皂苷 IVa 为竹节参药材中主要的皂苷类有效成分, 以此作为总皂苷定量测定的对照品。精密称取竹节参皂苷 IVa 对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加 70%乙醇溶解并稀释至刻度线, 摇匀, 制成 0.31 mg/mL 的竹节参皂苷 IVa 储备液, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 除杂并干燥后的竹节参药材粉碎, 过 60 目筛。称取竹节参药粉 1 000 g, 用 3 倍量的 70%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 离心分离提取液和药渣。提取液合并后, 经减压浓缩转移至 5 000 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 制成 0.2 g/mL 生药量的供试品溶液, 备用。

2.1.3 显色方法与检测波长的确定 参考文献报道方法^[12], 精密量取竹节参皂苷 IVa 对照品溶液 0.5 mL 及供试品溶液 0.1 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 挥干溶剂, 分别加入 0.2 mL 新配制的 5%香草醛-冰醋酸、0.8 mL 高氯酸, 于 60 °C 水浴加热 20 min 后, 立即取出冰浴 3 min, 加入冰醋酸 5 mL 稀释并摇匀, 常温放置 5 min 后于 400~700 nm 波长进行扫描。随行试剂作空白对照。结果显示对照品和样品溶液在 545 nm 处均呈现良好的最大吸收, 空白对照无干扰 (图 1)。因而选择 545 nm 作为测定波长。

2.1.4 工作曲线的绘制 精密量取竹节参皂苷 IVa 对照品溶液 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL, 分别按“2.1.3”项下的显色方法操作, 于 545 nm 波长处测定吸光度 (*A*) 值。以 *A* 值为纵坐标 (*Y*), 竹节参皂苷 IVa 质量分数为横坐标 (*X*) 进行线性回归,

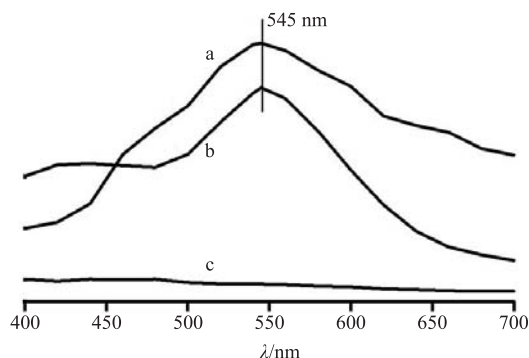


图 1 对照品 (a)、供试品 (b) 和空白对照 (c) 溶液的可见光吸收曲线

Fig. 1 UV-Vis adsorption curves for solutions of reference substance (a), test sample (b), and blank (c)

得回归曲线方程 $Y=5.3856X+0.0663$, $R^2=0.9992$ 。结果表明,在本实验条件下,竹节参皂苷 IVa 在 62~217 μg 与其 A 值具有良好的线性关系。

2.1.5 竹节参供试品溶液中总皂苷的定量测定 取竹节参供试品溶液 1.0 mL 置于 25 mL 量瓶中,加入 70%乙醇稀释至刻度,摇匀。准确量取 0.1 mL,于 545 nm 波长处测定 A 值。根据工作曲线计算供试品溶液中的总皂苷量为 26.53 mg/mL。

2.2 大孔吸附树脂预处理及最佳树脂筛选

竹节参皂苷由非极性的三萜皂苷元和极性的糖基组成,可被非极性或弱极性的吸附树脂吸附。当树脂具有合适的孔径和较高的比表面积时,具有优良的吸附性能。根据文献报道^[16-22],筛选了通常用于皂苷纯化的 5 种大孔吸附树脂 X-5、DM130、AB-8、HP-20、D101 进行比较。

2.2.1 大孔吸附树脂的预处理 参考文献报道的方法^[23],将新购买的各型号大孔吸附树脂装入洁净的树脂柱内,以 95%乙醇洗至流出液加 3 倍量水后无白色混浊现象,改用蒸馏水冲洗至无醇味,即可使用。

2.2.2 静态饱和吸附法筛选大孔吸附树脂 称取经预处理后的每种树脂各 3 份,每份 35 g,置于具塞

锥形瓶中。分别加入竹节参供试品溶液 45 mL,室温放置 3 h,每 15 min 振摇 1 次。充分吸附后测定上清液 A 值,并计算吸附总量、比吸附量和吸附率。

抽滤充分吸附后的树脂,并用 100 mL 双蒸水分次洗涤,至不滴水为止,置于具塞锥形瓶中,加入 45 mL 70%乙醇,轻缓振摇后同条件放置 3 h,测定解吸液 A 值,并计算解吸量、比吸附量和解吸率。结果见表 2。可以看出 X-5 和 HP-20 树脂的 5 个指标均比其他型号树脂高,而两者皂苷的纯化效果没有明显差异,因而选择 HP-20、X-5 树脂作进一步参数优化。

$$\text{吸附总量 } (M_{\text{吸}}) = (C_0 - C_1)V_0$$

$$\text{解吸量 } (M_{\text{解}}) = C_2V_{\text{洗}}$$

$$\text{比吸附量} = M_{\text{吸}}/M_{\text{树脂}}$$

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_1)/C_0$$

$$\text{解吸率} = M_{\text{解}}/M_{\text{吸}}$$

C_0 为供试品溶液皂苷质量浓度 (mg/mL), C_1 为吸附后溶液中皂苷质量浓度 (mg/mL), C_2 为解吸后溶液中皂苷质量浓度 (mg/mL), V_0 为供试品溶液体积 (mL), $V_{\text{洗}}$ 为解吸液体积 (mL), $M_{\text{树脂}}$ 为树脂用量 (mg)

2.2.3 各树脂动态吸附曲线的测定 准确称取预处理好的 HP-20、X-5 大孔吸附树脂各 10 g,分别装入树脂色谱柱中 (内径 2.5 cm, 径高 60 cm),用供试品溶液上样,每 10 mL 收集馏份 1 次,共 20 次,依次编号 fr. 1~20。各馏份按“2.1.5”项方法测定 A 值,并计算总皂苷量。以各馏份编号为横坐标,总皂苷量为纵坐标,绘制动态吸附曲线。结果见图 2。由图 2 可以看到,对于 X-5 大孔吸附树脂,fr. 5 以后各馏份的总皂苷量明显增高,表明在该馏份以前上样液未有明显泄露,此时对应的上样量为 50 mL。而 HP-20 型树脂在 50 mL 之前泄露量明显比 X-5 型多,所以 X-5 型树脂对其具有更好的动态吸附能力。因此,本实验选择 X-5 大孔吸附树脂作为进一步工艺考察对象。

表 2 不同型号大孔吸附树脂对竹节参总皂苷的静态吸附及解吸附结果 ($n=3$)

Table 2 Static adsorption and desorption capabilities of TSPJ by five types of adsorptive macroporous resins ($n=3$)

树脂类型	吸附总量/mg	比吸附量/(mg·g ⁻¹)	解吸量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%	解吸率/%
DM130	423.25	12.09	336.57	85.4	79.5
D101	448.66	12.82	327.19	90.5	72.9
X-5	450.12	12.86	357.20	90.8	79.4
AB-8	432.01	12.34	342.67	87.2	79.3
HP-20	449.05	12.83	355.60	90.6	79.2

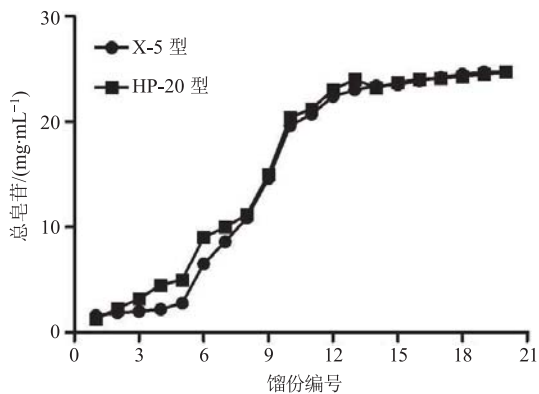


图 2 X-5 和 HP-20 大孔树脂对竹节参总皂苷的吸附曲线
Fig. 2 Dynamic adsorption curves of TSPJ on X-5 and HP-20 macroporous resins

2.3 X-5 大孔吸附树脂纯化竹节参总皂苷的工艺参数考察与优化

2.3.1 预装柱 准确称取经预处理后的树脂 15 g，加入树脂色谱柱（内径 2.5 cm，径高 60 cm）中，静置 1 h，使树脂颗粒得到充分沉降，备用。

2.3.2 上样液质量浓度的筛选 准确吸取供试品溶液 4 份，分别加水稀释成含生药 0.05~0.20 g/mL 的上样液，滤过后分别加入到树脂色谱柱中，预吸附 1 h，用双蒸水冲洗至 Molish 反应呈阴性，再用 70% 乙醇洗脱至 Lambert-Beer (L-B) 反应呈阴性，收集 70% 乙醇洗脱液，将洗脱液减压回收溶剂后，冷冻干燥，称定并记录，取各洗脱液按“2.1.5”项方法测 A 值，并根据工作曲线计算总皂苷量和总皂苷转移率。结果见表 3。由表 3 可以看出，总皂苷转移率随上样质量浓度的增大而呈上升趋势。当上样液质量浓度在 0.20 g/mL 时，竹节参总皂苷质量分数为 80.9%，转移率为 90.5%，比其他上样质量浓度对应的分离纯化效果好。但如果继续增大上样液质量浓度，容易造成溶质析出。所以上样质量浓度选择为生药 0.20 g/mL，即原液质量浓度。

转移率 = $M_{洗} / (V_{上样} \times C_{上样})$

$M_{洗}$ 为洗脱物中总皂苷的质量 (mg)， $V_{上样}$ 为上样液用量 (mL)， $C_{上样}$ 为上样液中总皂苷的质量浓度 (mg/mL)

2.3.3 最佳上样量的筛选 取供试品溶液上柱，每 10 mL 收集馏份，共收集 20 次，依次编号为 fr. 1~20。各馏份按“2.1.5”项方法测 A 值并计算总皂苷量，以各馏份编号为横坐标，总皂苷量为纵坐标绘制泄露曲线。结果见图 3。由图 3 可以看出，当上样液体积小于 50 mL，皂苷泄露量很少。但如果继续上样，皂苷会大量泄露，所以选择 50 mL 为最佳

表 3 不同上样液质量浓度对吸附效果的影响 (n = 3)
Table 3 Effects of different sample solutions on absorption properties (n = 3)

上样液质量浓度/ (g·mL ⁻¹)	上样量/ mL	洗脱物 质量/g	总皂苷质量 分数/%	转移率/ %
0.05	240	0.765 9	76.8	55.4
0.10	120	0.843 2	77.6	64.3
0.15	80	1.099 8	79.4	80.4
0.20	60	1.209 5	80.9	90.5

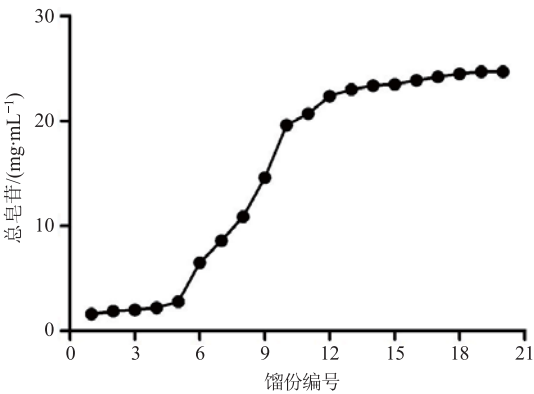


图 3 X-5 大孔吸附树脂上样吸附泄露曲线
Fig. 3 Dynamic leakage curve of TSPJ on column chromatography packed with X-5 macroporous resin

上样量。如果用于工艺大规模生产，为了简便操作，最佳上样量则换算成每克树脂 10 g 生药。

2.3.4 洗脱剂的筛选 准确量取供试品溶液 40 mL，上样于 4 根规格相同的 X-5 树脂柱，预吸附 1 h 后，均以双蒸水冲洗至 Molish 反应呈阴性，分别用 30%、50%、70%、90% 乙醇洗脱至 L-B 反应呈阴性。收集各体积分数乙醇洗脱液。经回收溶剂和冷冻干燥后，不同体积分数乙醇的洗脱产物经配制成适宜体积分数的 70% 乙醇溶液测 A 值，按工作曲线计算总皂苷量，并计算转移率。结果见表 4。由表 4 可以看出，随着乙醇的体积分数增加，洗脱液中总皂苷量随之增加。在 70% 和 90% 乙醇中的总皂苷质量

表 4 不同洗脱剂对竹节参总皂苷解吸附的影响 (n = 3)
Table 4 Effect of different eluting agent on desorption of TSPJ (n = 3)

乙醇体积分 数/%	洗脱物中总 皂苷质量/g	总皂苷质量 分数/%	转移率/%
30	0.988 0	67.9	63.2
50	1.005 4	76.4	72.4
70	1.181 2	80.0	89.0
90	1.218 0	78.7	90.3

分数(分别为 80.0%和 78.7%)相差不明显,但 90%乙醇洗脱后的洗脱液经干燥后比其他体积分数乙醇洗脱的干燥物颜色要深,可能一些色素也随着高体积分数乙醇被洗脱下来。为了所得产品最优化,同时也考虑生产成本,选择 70%乙醇为最佳洗脱剂。

2.3.5 洗脱剂用量的确定 准确吸取供试品溶液 40 mL 上柱,预吸附 1 h,双蒸水洗脱至 Molish 反应呈阴性。然后用 70%乙醇洗脱,每 5 mL 收集馏份 1 次,共收集 20 次,依次编号为 fr. 1~20。按“2.1.5”项方法测各馏份 A 值并按工作曲线计算总皂苷量,以各馏份编号为横坐标,总皂苷量为纵坐标绘制洗脱曲线。结果见图 4。结果显示,当洗脱剂体积为 30 mL 时,解吸液中总皂苷质量浓度就已达到最大值,到 75 mL 时,总皂苷已基本洗脱完全。因此确定洗脱剂用量为 75 mL。为了工业化简便计算,可换算成每克树脂 5 mL 洗脱剂。

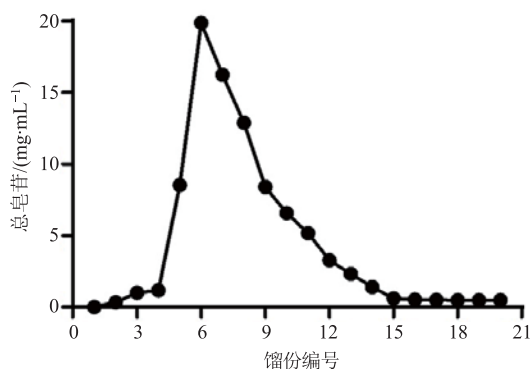


图 4 X-5 型吸附树脂的洗脱曲线

Fig. 4 Elution curve of X-5 macroporous resin

2.3.6 竹节参总皂苷最佳纯化工艺参数确定及其验证 根据以上实验优选工艺,准确吸取供试品溶液 40 mL,按“预装柱”项下方法装柱上样,预吸附 1 h,双蒸水洗脱至 Molish 反应呈阴性。然后用 70%乙醇洗脱,收集洗脱液,冷冻干燥,洗脱物经配制成 70%乙醇溶液后测 A 值,并按工作曲线计算总皂苷量,平行操作 3 次。各次结果的总皂苷量分别为 84.6%、82.5%、86.1%,对应的皂苷转移率为 89.4%、88.2%、90.3%。由于所得产品颜色偏黄褐色,需进一步对其进行脱色工艺研究。

2.4 脱色工艺的研究

2.4.1 离子交换树脂的预处理 D941 型阴离子交换树脂先用 5% HCl 溶液浸泡 3 h,用双蒸水洗至中性,再用 5% NaOH 溶液浸泡 3 h,最后用双蒸水洗至中性。732 型阳离子交换树脂则先用 5% NaOH 溶

液浸泡 3 h,用双蒸水洗至中性,再用 5% HCl 溶液浸泡 3 h,最后用双蒸水洗至中性,备用。

2.4.2 竹节参总皂苷脱色原液的制备 准确称取 2 份经 X-5 型大孔吸附树脂纯化后的竹节参总皂苷样品 25 g,1 份用双蒸水溶解并定容至 1 000 mL (A 液),1 份用 70%乙醇溶解并定容至 1 000 mL (B 液),摇匀后备用。

2.4.3 色值分析^[24] 竹节参总皂苷脱色原液为棕黄色溶液,用波长为 420 nm 的可见光检测色素杂质的量变化,原液颜色较深时,用对应的溶剂稀释后测定。

2.4.4 脱色原液中总皂苷的定量测定 取 A 液和 B 液各 1.0 mL 分别置于 25 mL 量瓶中,加入 70%乙醇稀释至刻度,摇匀。准确量取 0.1 mL 按“2.1.3”项下的显色方法操作,于 545 nm 波长处测定 A 值。根据工作曲线计算 A 液中的总皂苷量为 20.75 mg/mL;同法测得 B 液中总皂苷量为 20.69 mg/mL。

2.4.5 树脂的筛选 准确称取 2 份预处理后的 D941 型阴离子交换树脂各 15 g,置于具塞三角瓶中,分别加入 25 mL A 液和 B 液。另取 2 份预处理后的 732 型阳离子交换树脂各 15 g,同法操作,共计 4 份。静置 1 h 后,对各上清液进行色值分析并测定 A 值,计算脱色率和保留率。结果见表 5。

$$\text{脱色率} = (D_1 - D_2) / D_1$$

$$\text{保留率} = C_2 / C_1$$

D_1 为脱色原液 A 值, D_2 为脱色后溶液 A 值, C_1 为脱色原液中总皂苷的质量浓度 (mg/mL), C_2 为脱色后溶液中皂苷质量浓度 (mg/mL)

由表 5 可以看出,无论用 A 液还是 B 液上样,732 型阳离子交换树脂比 D941 型阴离子交换树脂的脱色率和保留率都要高;阳离子树脂在 A 液中对皂苷的脱色率和保留率高。所以选择用 732 型阳离子性树脂对竹节参粗总皂苷的 A 液(即水溶液)进行脱色研究。

2.4.6 pH 值的确定 准确量取 20 mL A 液置于锥

表 5 脱色工艺树脂筛选结果 ($n = 3$)

Table 5 Screening results of two different types of ion exchange resin on decoloration test ($n = 3$)

树脂类型	A 液		B 液	
	脱色率/%	保留率/%	脱色率/%	保留率/%
732	81.7	89.0	69.4	87.3
D941	69.7	24.3	31.5	53.0

形瓶中,共 5 份,分别调节 pH 值为 3、5、7、9、11,各加入 15 g 预处理后的 732 型阳离子交换树脂,静置 1 h,然后对上清液进行色值分析并测定 A 值,计算脱色率和保留率。结果见图 5。从图 5 中可以看到,各 pH 值条件下总皂苷保留率能稳定在 90% 左右;脱色率在酸性条件下低于碱性条件,在 pH 为 10 的时候已经达到 90% 以上,继续增加 pH 值脱色率变化不明显。故而确定 pH 10 为最佳 pH 值。

2.4.7 最大上样量的确定 准确称取预处理后的 732 型阳离子交换树脂 10 g 装柱,加入 A 液,每 10 mL 收集 1 次,共收集 20 次,依次编号为 fr. 1~20,分别进行色值分析并计算脱色率,以各馏份编号为横坐标,各馏份的脱色率为纵坐标绘制脱色曲线(图 6)。由图 6 可知,随着流出液体积的增加,色素脱色率逐渐降低,当流出液体积达到 140 mL 时,脱色率为 50%,如果继续上样,脱色效果明显下降,

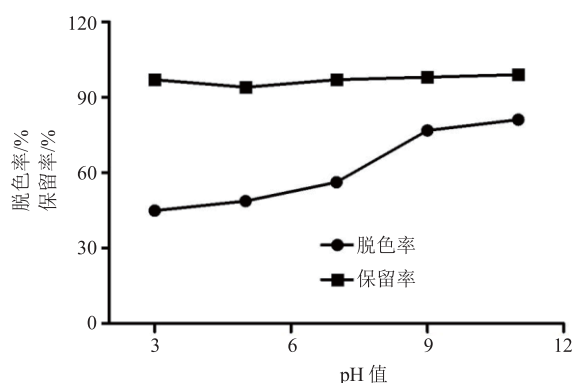


图 5 不同 pH 值下脱色率和竹节参总皂苷保留率的比较
Fig. 5 Effect of pH value of sample solution on the decolorization rate and transfer rate of TSPJ on 732-type cation exchange resin

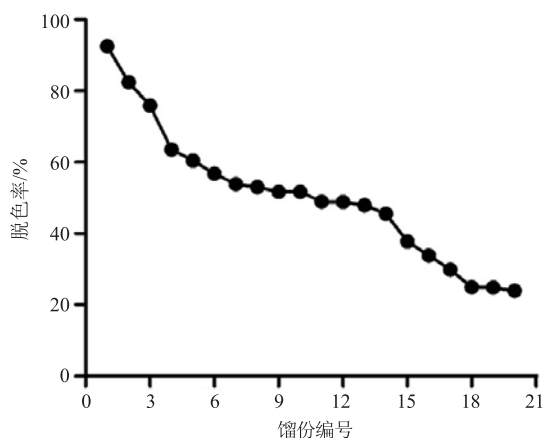


图 6 732 型阳离子交换树脂对竹节参总皂苷的脱色曲线
Fig. 6 Decolorizing curve of TSPJ on column chromatography packed with 732-type cation exchange resin

所以确定最大上样量为 140 mL,即当流出液达到 140 mL 时,需要对该离子树脂再生后使用。根据 A 液的总皂苷量,可以将其换算成每克脱色树脂处理竹节参总皂苷质量为 290.5 mg。

2.5 竹节参总皂苷最佳制备工艺参数确定及其验证试验

根据上述考察结果,最终确定选用 X-5 型大孔树脂进行纯化,上样液为生药 0.2 mg/mL,上样量为每克树脂 10 g 生药,预吸附 1 h,双蒸水洗脱至 Molish 反应呈阴性,用 70%乙醇洗脱,洗脱剂用量为每克大孔吸附树脂 5 mL,收集洗脱液;经回收乙醇、冷冻干燥后,加水制成总皂苷量约为 20 mg/mL 的脱色原液,调节 pH 值为 10,加入装有 732 型阳离子交换树脂的树脂柱,最大上样量为每克脱色树脂不超过 290.5 mg 竹节参总皂苷;收集洗脱液,减压浓缩并冷冻干燥,即得竹节参精制皂苷。按上述最佳工艺条件进行验证,验证结果见表 6。

表 6 纯化与脱色工艺验证结果

Table 6 Verification test of TSPJ purified by X-5 macroporous resin and 732-type cation exchange resin

编号	总皂苷质量分数/%	转移率/%
1	85.5	73.2
2	85.6	73.1
3	85.4	73.3
平均值	85.5	73.2

由于上述工艺方案中,纯化环节对醇洗脱液进行乙醇回收和冷冻干燥的过程耗时耗能,故考虑将 X-5 大孔吸附树脂的醇洗脱液经回收乙醇,直接通过 732 型阳离子交换树脂柱,收集流出液的脱色率大于 50%的馏份,经减压浓缩合并冷冻干燥,可得到竹节参精制皂苷。实际试验的结果,得到的产品呈类白色,其总皂苷质量分数达到 86.4%,总皂苷的总转移率达到 75.6%,与前述工艺验证的结果基本一致。

3 讨论

竹节参所含成分复杂,主要为皂苷类,同时还有大量的氨基酸、多糖类成分,以及少量挥发油及无机盐等。采用乙醇溶液作为溶媒从竹节参中提取总皂苷,较以水为溶媒的提取方法具有更高的提取效率,但所得醇提浸膏颜色呈暗黑或棕褐色,易吸湿,不易干燥。近年来,大孔吸附树脂广泛运用于活性天然产物的分离纯化,具有操作简单、成本

低、污染小的优点,经大孔树脂吸附分离所得提取物体积小、易存储、容易制成外型美观的产品,能够解决了产品的粗、大、黑等问题^[25]。本实验选取了 5 种树脂进行竹节参皂苷静态吸附/解吸附,以及动态吸附试验的筛选研究,结果表明,X-5 型大孔树脂是一种比较理想的树脂,吸附量大,解吸率高,较适合竹节参总皂苷的纯化。

经树脂分离纯化得到的总皂苷去除了大部分水溶性多糖和色素等杂质,但其中脂溶性的色素杂质的量较高,影响产品的外观,在一定程度上降低了产品的品质,因此有必要对竹节参皂苷提取物作进一步的脱色工艺研究。离子型交换树脂起初用于硬水的软化,后来被广泛运用到天然产物的脱色过程中。离子型交换树脂同大孔吸附树脂一样,是通过与化合物相互作用力不同而分离的,不同的是离子型树脂含有酸碱性基团,能够吸附带电离子。本实验使用 732 阳离子交换树脂对大孔树脂吸附分离后的竹节参总皂苷粗品进行脱色,并对其脱色工艺参数进行优化,所得产品较脱色前的外观明显得到改善,呈类白色,微有晶体光泽,其总皂苷量可达 86.4%,并具有较高的转移率。验证试验的结果亦表明,本实验研究的工艺稳定性较好,适于工业化生产,具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 欧阳丽娜, 向大位, 吴雪, 等. 竹节参化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 1023-1027.
- [3] 顿耀艳, 袁丁. 竹节参化学成分的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1909-1911.
- [4] 范崔生. 中药采收鉴别应用全书 [M]. 南昌: 江西科技出版社, 1995.
- [5] 郭群, 喻秀兰, 胡晓雪. 竹节参的化学及药理研究进展 [J]. 中国现代中药, 2004, 6(12): 17-19.
- [6] 贾放. 竹节参皂苷类成分的研究 [D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.
- [7] 左锐, 袁丁. 竹节参化学成分和药理活性研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(9): 838-839.
- [8] 姚琰, 黄传俊, 汪忠波. 竹节参总皂苷的提取工艺研究 [J]. 中国药师, 2009, 12(11): 1542-1544.
- [9] 张海滨, 张长城, 何毓敏, 等. 竹节参总皂苷不同提取工艺的比较研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(18): 3457-3460.
- [10] 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.
- [11] 张海滨, 何毓敏, 张长城, 等. 泡沫分离法提取竹节参总皂苷的工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 18-20.
- [12] 王小宁, 王黎, 刘少静, 等. 竹节参总皂苷的纯化方法研究 [J]. 应用化工, 2012, 41(5): 781-783.
- [13] 王箭, 袁崇均, 陈帅, 等. 大孔吸附树脂和丙酮沉淀分离纯化西洋参中人参二醇类和三醇类皂苷 [J]. 四川中医, 2007, 25(10): 31-33.
- [14] 何毓敏, 鲁科明, 袁丁, 等. 竹节参总皂苷的制备工艺及含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2607-2611.
- [15] 冯思欣, 吕竹芬, 陈燕忠, 等. 离子交换树脂法脱除板蓝根粗多糖中色素的研究 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30(2): 160-163.
- [16] 王晓林, 李珍, 钟方丽. 大孔树脂法纯化玉竹总皂苷的工艺研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(18): 83-87.
- [17] 罗仓学, 杨转萍, 李祥. 大孔树脂分离纯化黄姜中薯蓣皂苷工艺研究 [J]. 食品科技, 2011, 36(5): 229-232.
- [18] 欧阳丽娜, 吴雪, 李兰林, 等. 大孔吸附树脂富集纯化竹节参总皂苷工艺条件优选 [J]. 中成药, 2011, 33(7): 1163-1168.
- [19] 吴春蕾, 刘圆, 张志锋, 等. 大孔吸附树脂富集纯化白花刺参总皂苷的工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1130-1134.
- [20] 孙治国, 张琳, 田景奎, 等. 重楼总皂苷的纯化工艺研究 [J]. 药学实践杂志, 2009, 27(6): 455-458.
- [21] Gayer C P, Craig D H, Flanigan T L, et al. Preparative enrichment and separation of astragalosides from *Radix Astragali* extracts using macroporous resins [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(15): 2278-2286.
- [22] Wan J B, Zhang Q W, Ye W C, et al. Quantification and separation of protopanaxatriol and protopanaxadiol type saponins from *Panax notoginseng*, with macroporous resins [J]. *Sep Purif Technol*, 2008, 60(2): 198-205.
- [23] 李红冰, 唐玲, 陈跃龙, 等. D101 型大孔吸附树脂纯化油茶皂苷的工艺研究 [J]. 中国药房, 2009, 20(12): 900-902.
- [24] 范云鸽, 施荣富. 离子交换树脂对三七叶总皂苷的脱色精制研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2320-2323.
- [25] 罗玺, 唐庆九, 张劲松, 等. 灵芝多糖树脂法脱色工艺优化 [J]. 食品科学, 2011, 32(16): 5-10.