

三七总皂苷分离纯化工艺研究

郑明,瞿林海,楼宜嘉* (浙江大学药学院,杭州 310058)

摘要:目的 研究 D-101 型大孔吸附树脂分离纯化三七总皂苷的工艺条件及参数。方法 以三七总皂苷的含量为考察指标,研究三七总皂苷纯化过程中,D-101 型大孔吸附树脂吸附容量、洗脱溶媒及其用量,并用正交试验法优选最佳洗脱条件。结果 通过 D-101 型大孔吸附树脂纯化后,70%乙醇洗脱液干燥后总固体中三七总皂苷纯度可达 90%。结论 本纯化工艺设计科学合理,成本低、污染少,可作为纯化三七总皂苷成分生产工艺的依据。

关键词:三七总皂苷;大孔吸附树脂;分离纯化

中图分类号:R284.2 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)02-0118-03

Studies on Separation and Purification of Total Arasaponin

ZHENG Ming, QU Lin-hai, LOU Yi-jia* (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the technical parameters of total arasaponin purification with macroporous resin. **METHODS** Conditions for the optimizing elution were studied under the index of the content of total arasaponin. **RESULTS** The purity of total arasaponin was up to 90% after removing the part of 70% ethanolic elution. **CONCLUSION** The method was a suitable purification for total arasaponin.

KEY WORDS: total arasaponin; macroporous resin; separation and purification

三七为五加科植物三七 *Panax notogiseng*(burk.) F. H. Chen 的干燥根,具有止血、活血化瘀和消肿止痛的功效^[1],其主要活性成分是三七总皂苷。现代药理研究发现,三七总皂苷的药理活性主要在于改善血液系统和心血管系统功能、滋补强壮、调节免疫等方面^[2]。目前,三七总皂苷的纯化多采用大孔吸附树脂法,但是具体工艺条件及参数还有待完善。本实验以三七为材料,以三七总皂苷的含量为考察指标,运用 D-101 型大孔吸附树脂对提取液进行分离纯化,对树脂纯化过程影响因素进行系统全面的考察,以期得到高收率、高纯度的三七总皂苷,为三七总皂苷成分生产工艺提供实验依据。

1 材料、仪器和试剂

三七药材(云南特安呐三七产业股份有限公司,经浙江大学药学院生药教研室鉴定,总皂苷含量为 8.07%);人参皂苷 Re 对照品(中国药品生物制品检定所);高氯酸、冰醋酸、香草醛均为分析纯。

W201B 恒温水浴锅(上海申顺生物科技有限公司);SENCO_{R-201} 旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司);循环水式多用真空泵 SHB-III A(河南省太康科教器材厂);冷冻干

燥器(LGJO.5-II,军事医学科学院实验仪器厂);UV-9100 紫外可见分光光度计;色谱柱(1.5 cm × 30 cm,浙江大学材料化工学院玻璃厂);大孔吸附树脂(D-101 型,天津海光化工有限公司)。

2 含量测定

2.1 标准曲线的制备

精密称取对照品人参皂苷 Re 6.0 mg 左右,用甲醇定容至 10 mL。分别精密吸取上述溶液适量,常温下挥干溶剂,加入 0.2 mL 5% 香兰素-冰醋酸溶液(新鲜配制),0.8 mL 高氯酸,60℃ 水浴 15 min,流水冷却 2 min,精密加入 5 mL 冰醋酸,摇匀后于 550 nm 测得吸光度。

2.2 三七总皂苷测定方法

称取样品约 20 mg,甲醇定容至 10 mL,经 0.45 μm 膜过滤,弃初滤液,收集续滤液,照标准曲线制备项下方法测定吸光度,计算样品的含量。

3 大孔吸附树脂纯化工艺条件的筛选^[3]

3.1 上柱溶液的制备

称取三七粉末(8 目~40 目),按照本实验室前期正交实验所得三七最佳提取工艺进行提取,提取条件为加 10 倍量

基金项目:浙江省中医药管理局点资助项目(No. 2003KF001);浙江省科技厅计划重点资助项目(No. 2004C33106)

作者简介:郑明(1979-),男,浙江衢州人,硕士研究生,研究方向:中药药理学和新药开发。E-mail: zhengming_nol@126.com

* 通讯作者:楼宜嘉, E-mail: yijialou@zju.edu.cn Tel/Fax: 76-571-88208403

70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h 过滤, 合并滤液, 减压浓缩至一定体积 (0.3 g 生药 /mL), 即得; 经测定总皂苷含量为 23.49 mg/mL。

3.2 大孔吸附树脂柱的制作

取新购的大孔吸附树脂适量, 置密闭容器内, 加 95% 乙醇使完全浸没树脂, 放置 2 d 将树脂装填于玻璃色谱柱 (1.5 cm × 30 cm) 内, 用 95% 乙醇洗至滤液与水 (1:3) 混合不产生浑浊; 再用蒸馏水洗至无乙醇味备用。

3.3 吸附容量的确定

吸取三七样品液 (0.3 g 生药 /mL) 80 mL 上柱, 预吸附 1 h 过柱流出液重吸附 1 次, 先用水洗至流出液不显 Molish 反应, 依次用 50%、70%、90% 乙醇梯度洗脱, 控制流速 1.5 mL/min 左右, 洗脱至无皂苷检出, 平行 3 份。洗脱液照三七总皂苷含量测定方法测定总皂苷含量, 计算吸附容量, 结果见表 1。

表 1 吸附容量的确定

Tab 1 The adsorption capacity				
实验号	总吸附量 /mg	树脂干重 /g	吸附容量 / (mg/g 干树脂)	吸附容量均值 / (mg/g 干树脂)
1	1649.78	6.79	243.09	237.26
2	1631.44	6.92	235.64	
3	1548.83	6.64	233.05	

3.4 洗脱溶媒的选择

吸取三七样品液 (0.3 g 生药 /mL) 30 mL 上柱, 先用水洗至流出液不显 molish 反应, 依次用 30%、50%、70%、90% 乙醇溶液各 120 mL 梯度洗脱, 控制流速 1.5 mL/min 左右, 每种醇浓度分别收集洗脱液 30 mL 4 份, 共 16 份。以收集洗脱液先后编号, 测定三七总皂苷含量, 并计算结果。以收集瓶编号 (X) 和总皂苷含量 (Y) 为坐标绘制洗脱曲线, 见图 1。

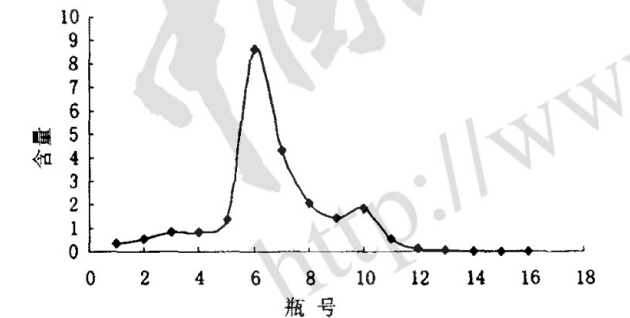


图 1 三七总皂苷大孔吸附树脂梯度洗脱曲线

Fig 1 Cogent cuve of total arasaponin in different ethanolic elution

注: 1~4 30% 乙醇收集液; 5~8 50% 乙醇收集液; 9~12 70% 乙醇收集液; 13~16 90% 乙醇收集液

Note 1~4 30% ethanolic elution; 5~8 50% ethanolic elution; 9~12 70% ethanolic elution; 13~16 90% ethanolic elution

图 1 显示: 三七总皂苷主要集中在 50%、70% 乙醇洗脱液中, 而 30% 乙醇洗脱的可能是非脂溶性成分。同时, 另取三七样品液二份, 每份 30 mL 分别上柱, 用水洗至流出液不显 molish 反应, 再用 50%、70% 乙醇溶液各 120 mL 洗脱, 控制流速 1.5 mL/min 测定总皂苷含量, 见表 2。

表 2 50%、70% 乙醇洗脱比较

Tab 2 Comparison of 50%, 70% ethanolic elution				
洗脱液	总固物 /mg	总皂苷 /mg	总皂苷洗脱率 /%	总皂苷纯度 /%
50% 乙醇	610.90	544.68	72.14	89.16
70% 乙醇	755.90	646.03	85.57	85.47

表 2 的结果显示: 70% 乙醇洗脱液总皂苷的量和洗脱率均明显高于 50% 乙醇, 两者总皂苷纯度差异不大, 而且实验中发现 70% 乙醇洗脱速度明显快于 50% 乙醇。故确定洗脱溶媒为先用蒸馏水洗去水溶性杂质, 再用 70% 乙醇溶液洗脱三七总皂苷, 收集 70% 乙醇洗脱部分。

3.5 洗脱溶媒用量

根据上述结果确定的吸附容量和洗脱溶媒, 吸取三七样品液 (0.3 g 生药 /mL) 30 mL 上柱, 蒸馏水用量分别为 65、85、105 mL, 然后用 70% 乙醇 120 mL 洗脱, 依次洗脱, 分段收集, 洗脱液减压浓缩, 冷冻干燥, 称量总固物重量并测定三七总皂苷含量, 结果见表 3。

表 3 三七总皂苷不同条件洗脱参数考察

Tab 3 Results of the cement of total total arasaponin in different elution condition				
70% 乙醇 /mL	蒸馏水 /mL	洗脱量 /mg	洗脱率 /%	总固物中皂苷量 /%
60	65	640.40	84.82	93.99
	85	637.50	84.44	
	105	640.00	84.77	
30	65	64.40	8.53	92.64
	85	66.60	8.82	
	105	39.90	5.28	
30	65	10.60	1.40	90.98
	85	10.40	1.38	
	105	6.90	0.91	

从表 3 结果可以看出, 3 种洗脱条件所得总固物无明显差异, 总皂苷含量均在 90% 以上, 故确定蒸馏水用量为 65 mL。前 90 mL 70% 乙醇洗脱率均在 90% 以上, 由此确定解吸洗脱溶媒 70% 乙醇用量为 90 mL。

3.6 最佳洗脱条件的优化

根据预试验结果, 上样量、吸附流速、洗脱流速对洗脱影响较大。因此采用正交实验法, 以上样量、吸附流速、洗脱流速为因素, 每个因素选择 3 个水平进行试验, 考虑因素及水平见表 4 用 $L_9(3^4)$ 安排试验。

表 4 $L_9(3^4)$ 正交实验设计

Tab 4 Design of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment				
因素	A	B	C	D
水平	上样量 (%柱吸附容量, mL)	吸附流速 (%上样量, mL/min)	洗脱流速 (%上样量, mL/min)	(空白)
1	90	2.5	5	
2	70	5	10	
3	50	10	15	

从表 5 表 6 的结果可以看出, 各因素对洗脱条件的影响程度依次为 $A > C > B$ 。因此各因素最佳水平组合选择为 A3B1C1。

表 5 正交实验直观分析表

Tab 5 Result of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	洗脱率 /%
1	90	2.5	5		0.877
2	90	5	10		0.766
3	90	10	20		0.658
4	70	2.5	10		0.892
5	70	5	20		0.817
6	70	10	5		0.849
7	50	2.5	20		0.909
8	50	5	5		0.990
9	50	10	10		0.990
均值 1	0.767	0.893	0.905	0.895	
均值 2	0.853	0.858	0.883	0.841	
均值 3	0.963	0.832	0.795	0.847	
极差	0.196	0.061	0.110	0.054	

表 6 方差分析表

Tab 6 Variance analysis

方差来源	方差平方和	自由度	均方	F值
A	0.058	2	0.029	11.600
B	0.005	2	0.0025	1.000
C	0.020	2	0.010	4.000
误差项	0.005	2	0.0025	1.000

Note: $F_{0.05(2,2)} = 19$

3.7 验证实验

根据试验结果,按最佳优化条件进行 3 次试验,测得洗脱液中三七总皂苷平均含量为 90%,与预测值接近,总皂苷转移率达到 82%,证明此方法可行。

4 讨论

4.1 洗脱溶媒选择过程中,同类文献^[1]一般只绘制了洗脱曲线,便得出了最佳洗脱溶媒,但是这步工艺是在同一根色谱柱上进行的,由于上柱液中总皂苷是定量的,不同浓度乙醇洗脱存在先后问题,很难判定 50%乙醇、70%乙醇的洗脱效果。因此,本研究采用两根色谱柱,把 50%乙醇、70%乙醇单独分开洗脱进行比较,从三七总皂苷洗脱量、洗脱率及洗脱速度等方面进行考察。这样,工艺条件的选择更加具体、

直观、科学,明显优于同类文献。

4.2 文献报道^[2]三七总皂苷的纯化多用 50%乙醇洗脱,而本实验采用 70%乙醇洗脱更完全,总固体中总皂苷含量约为 90%,洗脱率大于 85%,优于同类文献报道结果,而且洗脱速度明显加快,利于工业大生产,故选择 70%乙醇洗脱。

4.3 文献报道^[3],不同上柱液浓度对三七总皂苷得率的影响结果表明,随着上柱液浓度的降低,三七总皂苷的纯度下降,但其得率开始增加,达到一个最大值时却开始下降,因此,在吸附分离时,上柱液浓度宜适中,在 0.3 ~ 0.5 g 生药 / mL 比较合适。

4.4 本实验室前期参考文献报道及对不同类型树脂进行筛选,同时考虑生产成本和污染问题,最后选择 D-101 型大孔吸附树脂作为纯化树脂。本研究结果也证明,D-101 型大孔吸附树脂具有吸附快,解吸率高,吸附量大,洗脱率高,再生简便等特点,适合三七总皂苷的分离、纯化,可为建立可控性的生产工艺流程提供参考。

4.5 本研究首次采用洗脱液在硅胶板上点样,不用展开剂展开,直接用显色剂(酸酐:浓硫酸 = 1:9)喷雾显色的方法,全程检测三七总皂苷的洗脱情况,防止总皂苷成分的流失。该方法简便、灵敏、快速,适用于定性检测。

致谢:感谢浙江大学药学院药物分析和代谢研究室姚彤炜教授在药物含量测定上提供的帮助。

参考文献

[1] LI J S. Textbook of Identificology of Chinese Traditional Medicine (中药鉴定学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1998: 132.

[2] ZHANG J, ZHAO C W, ZHAO R. Pharmacodynamic research of *Radix Notoginseng* [J]. China Pharm (中国药业), 2003, 12 (11): 76-77.

[3] DOU S H, RAO J H. Study on purification process of total saponins of *Rubus parvifolius* L. with macroreticular resin [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2003, 25(3): 185-188.

收稿日期: 2006-08-25