

阴离子交换树脂纯化三七发酵产物中总皂苷的工艺优选

贺帅, 闫炳雄, 许文迪, 邱智东, 王伟楠*
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] **目的:**为了得到高纯度的三七总皂苷,利用阴离子交换树脂对三七发酵产物进行纯化,优选纯化工艺参数。**方法:**选用三七发酵产物为研究对象,以总皂苷含量或纯度为指标,采用单因素试验考察树脂型号、径高比、上样液质量浓度、上样流速、吸附时间、洗脱剂种类、洗脱液用量、洗脱流速、上样液 pH 等条件对洗脱液中总皂苷含量的影响。**结果:**选取 D301 型阴离子树脂,径高比 1:8.3,上样液质量浓度 $0.25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,树脂干重-生药量(1:0.64),上样流速 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,上样液 pH 9,吸附时间 15 min,洗脱流速 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,加水 5 BV 洗脱杂质,加 60% 乙醇 4 BV 对目标成分进行洗脱。三七发酵产物中总皂苷纯度 $>90\%$ 。**结论:**利用阴离子交换树脂纯化三七发酵产物中总皂苷的方法简便可行,纯化效果好,能满足于工业生产的要求,为该有效部位的新药及相关产品开发提供参考。

[关键词] 阴离子交换树脂;三七;发酵产物;总皂苷;人参皂苷 Re

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0021-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230021

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151022.1421.046.html>

[网络出版时间] 2015-10-22 14:21

Optimization of Purification Process for Total Saponins in Fermentation Products of Notoginseng Radix et Rhizoma by Anion Exchange Resin HE Shuai, YAN Bing-xiong, XU Wen-di, QIU Zhi-dong, WANG Wei-nan* (Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification process of total saponins in fermentation products of Notoginseng Radix et Rhizoma by anion exchange resin. **Method:** Single factor tests were conducted on resin type, diameter-height ratio of resin column, flow rate, absorption-influencing factors and elution-influencing factors, in order to ensure purity of total saponins in fermentation products of Notoginseng Radix et Rhizoma. **Result:** D301 anion resin was selected, its optimum purification parameters were as follows: diameter-height ratio of 1:8.3, dry weight of resin-fermentation products of 1:0.64, sample solution concentration of $0.25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sample solution pH of 9, flow rate of $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, adsorption time of 15 minutes. In addition, impurities were removed by 5 BV of distilled water before 4 BV of 60% ethanol was used to elute target compounds. Purity of total saponins had been successfully purified to more than 90%. **Conclusion:** This study achieves a simple, efficient and repeatable process with excellent purification performances for total saponins in fermentation products of Notoginseng Radix et Rhizoma, based on which industrial production can be fulfilled. It provides a theoretical support for new drug and related products development of total saponins in fermentation products of Notoginseng Radix et Rhizoma.

[Key words] anion exchange resin; Notoginseng Radix et Rhizoma; fermentation products; total saponins; ginsenoside Re

三七是传统名贵中药材之一,功效化瘀止血、活血定痛^[1-3]。其主要活性成分为皂苷类,尤其是稀

有人参皂苷 Rh₁, Rh₂, Rg₃, Ck 等^[4-6],该类成分具有较强的抗肿瘤、抗心肌缺血等药理作用。关于提高

[收稿日期] 20150717(013)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20140204014YY)

[第一作者] 贺帅,硕士,从事中药新剂型与新技术研究, Tel:15604482948, E-mail:1176536544@qq.com

[通讯作者] *王伟楠,博士,讲师,从事中药化学相关领域研究, Tel:15500070857, E-mail:cnweinanwang@163.com

三七药材中稀有皂苷类成分的含量已成为其深度开发利用的关键问题。

将现代生物技术与传统中药优势相结合,是改善中药药效物质基础的重要手段之一,早在 1 000 年前中药发酵技术就已经在我国出现,中药材经过微生物发酵之后,化学成分发生了变化,有的由大分子降解成小分子,易于被人体吸收,提高药材的生物利用度;有的增加了有效成分或有效部位的含量,改善了药效^[7-9]。本课题组前期以三七药材为基质,利用特定菌种进行发酵,得到发酵产物。通过成分分析发现,三七药材发酵后总皂苷含量增多,总多糖含量减少,单体皂苷中人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 的含量大幅度降低,而人参皂苷 Rd, Rh₁, Rh₂, Rg₃, Ck 等的含量增多;这些稀有皂苷普遍具有提高免疫功能、抑制肿瘤细胞生长和转移等作用^[10-14], 具有极高的药用研究价值。

目前,三七总皂苷的纯化手段主要以大孔吸附树脂为主,但纯化效率不理想,往往需要辅助其他技术才能得到较高的纯度^[15-17]。而且发酵之后的物质基础产生了变化,相对于纯化三七药材中的总皂苷,生物样品的引入增加了纯化的难度,故传统的大孔树脂纯化总皂苷的方法并不适用。阴离子交换树脂是分子中含有碱性基团的离子交换树脂,在水中具有碱性,能以其氢氧根离子或非金属离子交换吸附溶液中的阴离子,且具有易于放大生产、流程简单、操作方便、分离效果好等优点,已经在一些药材的总皂苷纯化中得到了成功的应用^[18-22]。本实验拟利用阴离子交换树脂对三七发酵产物中总皂苷进行纯化,优化工艺流程,为该部位的新药及相关产品开发提供参考。

1 材料

TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京浦析通用有限责任公司), EL-204 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), TG328(S) 型分析天平(上海精科分析仪器厂)。D301 [-N(CH₃)₃OH], 201X7 [-N(CH₃)₂], D315 [-NH₂] 型阴离子树脂均购于沧州宝恩吸附材料科技有限公司;人参皂苷 Re 对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110754-201324),三七药材(购于吉林国安药业有限公司,批号 20140501,经长春中医药大学姜大成教授鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* 的干燥根和根茎),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总皂苷粗提物的制备 取定量三七发酵产物,

加 8 倍量 60% 乙醇于 70 °C 加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,减压回收溶剂,55 °C 真空干燥至粉末状,备用^[23]。

2.2 总皂苷的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定人参皂苷 Re 对照品 5.06 mg,置 25 mL 量瓶中,加适量甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 标准曲线绘制 精密量取人参皂苷 Re 对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中,低温挥去溶剂,精密加入新配制的 5% 香草醛冰乙酸溶液 0.4 mL 和高氯酸 1.0 mL, 摇匀。混合液在 60 °C 恒温水浴加热 15 min,置冷水浴中冷却 5 min,加入冰乙酸 5 mL,摇匀,以试剂作空白,消除气泡后,按 2010 年版《中国药典》的紫外-可见分光光度法(附录 V A)项下规定,在 540 nm 处测定吸光度 A。以质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.025\ 56C - 0.001\ 81$ ($r = 0.999\ 6$),线性范围 6.325 ~ 37.95 mg·L⁻¹。

2.3 单因素试验分析

2.3.1 树脂类型 取新的 D301, 201X7, D315 型阴离子树脂,加水反复冲洗至流出液澄清且无杂质,湿法装柱,用 4% 氢氧化钠溶液 2 BV 浸泡 4 h,水洗至中性,加 4% 盐酸溶液 2 BV 浸泡 4 h,水洗至中性,用 4% 氢氧化钠溶液浸泡,备用。称取上述预处理后的 3 种树脂各 2 份,每份 40 g,吸干表面水分,测定干重,分别加入一定质量浓度的过饱和提取液 20 mL,静置吸附 30 min,滤过,滤液加甲醇定容至 100 mL,测定滤液中剩余皂苷类成分的含量。向饱和和吸附的树脂中加入 90% 乙醇 240 mL,超声洗脱,减压回收洗脱液,挥干,加甲醇定容,测定洗脱液中总皂苷含量,计算洗脱率。

$$\text{吸附量} = (C_0 - C_1) \times V_2 / M$$

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_1 / C_0) \times 100$$

$$\text{洗脱量} = C_2 \times V_2 / M$$

$$\text{洗脱率} = (C_2 \times V_2 / Q \times M) \times 100$$

式中 C₀ 为上样液中总皂苷初始质量浓度, C₁ 为吸附后过滤液中总皂苷质量浓度, C₂ 为洗脱液中总皂苷质量浓度, V₁ 为上样液体积, V₂ 为洗脱体积, M 为干树脂的质量, Q 为吸附量。见表 1。结果选用 D301 型阴离子树脂。使用过的 201X7 型树脂颜色极深,2 次使用时吸附率急剧下降,推测该类型树脂对皂苷类和多糖类成分易形成死吸附,不适合此类成分的分离纯化。

2.3.2 上样量 取预处理好的 D301 型阴离子树

表 1 不同类型阴离子树脂对三七发酵产物中总皂苷含量的影响
Table 1 Effects of different types of anion exchange resin on content of total saponins in fermentation products of Notoginseng Radix et Rhizoma

树脂型号	干重 /g	树脂饱和 吸附量/mg	洗脱率 /%	RSD /%
201X7	9.4	412.7	57.45	2.7
D301	7.4	423.8	74.08	2.0
D315	8.0	403.0	70.82	2.4

脂 40 g, 共 4 份, 湿法装柱, 分别按干树脂与药材比例 1:0.64, 1:0.68, 1:0.72, 1:0.76 的提取液上样, 吸附一定时间后, 加水 6 BV 除杂, 加 90% 乙醇 6 BV 洗脱, 计算洗脱液中总皂苷质量分别为 321.89, 328.47, 320.03, 319.97 mg, 洗脱率依次为 65.70%, 55.86%, 50.24%, 46.64%。故选择干树脂-药材 (1:0.64) 为宜。

2.3.3 上样液质量浓度 取预处理好的 D301 型阴离子树脂 40 g, 共 5 份, 湿法装柱, 精密吸取一定量三七发酵产物提取液, 质量浓度分别稀释为 0.25, 0.35, 0.5, 0.75, 1.00 g·mL⁻¹, 上样, 吸附一定时间, 加水 6 BV 除杂, 弃去水洗液, 加 90% 乙醇 6 BV 洗脱, 收集洗脱液, 计算洗脱液中总皂苷质量分别为 329.42, 317.24, 312.84, 311.07, 307.69 mg。故选择上样液质量浓度 0.25 g·mL⁻¹。

2.3.4 吸附时间 上样及洗脱方法同 2.3.3 项, 控制吸附时间分别为 5, 10, 15, 20, 25 min, 收集醇洗脱液, 计算总皂苷含量。结果发现在 5~15 min, 吸附时间越长, 洗脱液中总皂苷含量越高, 于 15 min 时达 341.89 mg; 当吸附时间达 20 min 时, 洗脱液中总皂苷含量开始降低, 说明吸附时间过长, 造成了死吸附, 还有部分皂苷类成分吸附在树脂柱上, 无法洗脱, 洗脱率降低, 故选择吸附时间 15 min。

2.3.5 树脂柱径高比 树脂柱的内径越小, 柱高越大, 则柱效越高, 样品溶液和洗脱溶液的流速减慢, 样品与树脂充分接触, 吸附率提高; 但树脂吸附饱和后, 随着洗脱溶剂的变换, 可能会产生树脂膨胀和溶液气泡, 导致流速进一步减慢, 最后甚至形成堵塞或死吸附, 洗脱率降低; 内径越大, 柱高越小, 扩散性好, 洗脱速度快, 但吸附率和洗脱后的总皂苷纯度均有所下降。分别称取经预处理好的 D301 型阴离子树脂 40 g, 共 5 份, 分别装入内径 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0 cm 的树脂柱中, 测量高度分别为 18, 16, 15, 12.5, 11 cm, 计算径高比分别为 1:11.25, 1:9.4, 1:8.3, 1:6.58, 1:5.5, 上样及洗脱方法同 2.3.4 项, 收集洗脱液, 测定总皂苷含量。结果表明树脂柱的

径高比为 1:8.3 时, 洗脱液中总皂苷质量 (349.09 mg) 高于其他径高比。

2.3.6 上样液 pH 精密吸取三七发酵产物提取液 20 mL, 用 2% 氢氧化钠溶液调节 pH 分别为 7, 8, 9, 10, 11, 上样及洗脱方法同 2.3.5 项, 收集醇洗脱液并测定总皂苷含量。结果发现当 pH 为 7, 8 时, 洗脱液中总皂苷含量趋于平稳; 当 pH 9 时, 洗脱液中皂苷类成分含量达最高值 353.10 mg; 而 pH >9 时, 洗脱液中总皂苷含量急剧下降, 推测部分皂苷类成分在强碱溶液中发生水解或产生死吸附, 导致了这种结果, 故选择 pH 9。

2.3.7 洗脱剂体积分数 取预处理好的 D301 型阴离子树脂 40 g, 共 5 份, 湿法装柱, 上样条件同 2.3.6 项, 样品进行洗脱时, 加水 6 BV 洗脱, 弃去水洗液, 分别加体积分数为 20%, 40%, 60%, 75%, 90% 的乙醇溶液各 6 BV 洗脱, 收集洗脱液, 计算总皂苷质量分别为 4.11, 197.16, 359.22, 351.21, 358.57 mg, 纯度依次为 10.59%, 71.63%, 91.62%, 90.86%, 90.29%。说明 20% 乙醇在阴离子交换树脂上洗脱能力较弱, 随着乙醇体积分数的增加, 总皂苷的洗脱率逐渐增加。采用 60% 乙醇时, 洗脱的总皂苷含量最高, 纯度也较好; 虽然 75% 乙醇和 90% 乙醇洗脱部位中总皂苷含量与 60% 乙醇洗脱部位中差别不大, 但随着脂溶性成分的增加, 总皂苷的纯度相对较低, 且从安全和经济的角度考虑, 故选择 60% 乙醇为洗脱剂。

2.3.8 洗脱剂用量 上样条件同 2.3.7 项, 加水进行洗脱, 收集洗脱液, 每个柱体积 (BV) 为 1 份, 将洗脱液浓缩、干燥至恒重, 称量干燥物质量。结果表明当连续收集洗脱液至第 5 份时, 洗脱液近无色, 干燥物质量低于 0.01 g, 说明已经基本洗脱完全, 故加水量选择 5 BV。上样及洗脱条件同 2.3.7 项, 加水 5 BV 除杂, 加 60% 乙醇洗脱, 连续收集洗脱液, 每 1 BV 为 1 份, 共收集 6 份, 测定每份洗脱液中总皂苷含量。结果当洗脱液体积达 5 BV 时, 总皂苷质量 (4.92 mg) 急剧下降, 若再继续洗脱, 既增加了药物生产成本和总皂苷中脂溶性杂质, 又消耗了时间, 故乙醇用量设定 4 BV。

2.3.9 洗脱流速 一般流速越慢, 洗脱率越高, 洗脱效果越好, 相同洗脱液体积, 流速慢, 有充分的时间与吸附在离子树脂上的有效物质进行交换, 洗脱液中溶质的浓度就越高。控制洗脱速度分别为 2, 4, 6 BV·h⁻¹, 上样及洗脱方法同 2.3.8 项, 收集乙醇洗脱液。结果表明以 2 BV·h⁻¹ 的流速洗脱时, 洗脱

液中总皂苷含量最高(361.89 mg)。

2.4 验证试验 以 D301 型阴离子树脂为纯化树脂,湿法装柱,径高比设定 1:8.3,以树脂(干重)-生药量(1:0.64)为上样量,上样液质量浓度 0.25 g·mL⁻¹,吸附 15 min 后,加 5 BV 水洗除杂,加 60% 乙醇 4 BV 洗脱,流速均 2 BV·h⁻¹,收集乙醇洗脱液,回收溶剂,干燥,得提取物分别为 373.69,357.73,362.71 mg,总皂苷纯度依次为 90.70%,92.78%,92.40%。说明优选的工艺稳定、可重复性良好。

3 讨论

三七发酵产物的主要成分为多糖类、皂苷类和其他不含糖的大分子及小分子成分,糖分子在碱性条件下会带一定量的负电荷,因此会被阴离子交换树脂所吸附,糖与皂苷均可吸附在阴离子树脂上,从而与其他非含糖类化合物进行分离。同时阴离子交换树脂还拥有物理吸附的特性,当用水将洗脱液洗至中性之后,水溶性糖类成分会被洗脱,而脂溶性的皂苷类成分会保留,实现糖与皂苷的分离。

不同型号的树脂对皂苷类成分的吸附性能会有一些的差异。前期通过筛选,确定了用于三七发酵产物总皂苷纯化的阴离子交换树脂型号,又对总皂苷纯化的工艺参数进行了系统优化,得到了一套简便可行、纯化效率高的方法。为了便于工业放大生产,本文又对树脂的再生时间进行了考察,证明 D301 型树脂可多次重生再利用,在 8 个使用周期之内,得到的三七发酵产物总皂苷纯度均 >90%,为三七发酵产物总皂苷的开发和利用奠定了基础,为其他药材中总皂苷类成分的分离和纯化提供参考。

[参考文献]

[1] 张海港,李晓辉,李淑惠,等.三七总皂苷对烫伤大鼠心肌 Gs α mRNA 表达的影响[J].中草药,2001,32(11):1000-1002.

[2] 高瑞兰,徐卫红,林筱洁,等.三七皂苷对造血细胞 GATA-1 和 GATA-2 转录调控蛋白的诱导作用[J].中华血液学杂志,2004,25(5):281-284.

[3] 陈北阳,李花,熊艾君.三七总皂苷对脑缺血再灌注后海马 CA1 区损伤的影响[J].湖南中医学院学报,2004,24(4):4-6.

[4] 唐婧姝,裴清华.三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(15):210-213.

[5] 马丽森,肖培根.三七总皂苷对突触体谷氨酸释放及谷氨酸受体特异性结合的影响[J].中国药理学通

报,1998,14(4):311-313.

[6] 屈泽强,谢智光,王乃平,等.三七总皂苷抗衰老作用的实验研究[J].广州中医药大学学报,2005,22(2):130-132.

[7] 李国红,张克勤,沈月毛.枯草芽孢杆菌对 50 种中药的发酵及抗菌活性检测[J].中药材,2006,29(2):154-157.

[8] 贾艳姝.黄芪乳酸菌发酵工艺研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2012.

[9] 董枚,郭芳.六味地黄发酵液的抗瘤和减毒作用[J].现代中西医结合杂志,2002,11(18):1753-1754.

[10] 邓晶,蒋永新.人参皂苷 CK 抗肿瘤活性研究进展[J].现代肿瘤医学,2009,17(11):2234-2236.

[11] 朱春燕,叶丽红.人参皂苷 Rd 抑制非小细胞肺癌的生长及作用机制[D].南京:南京中医药大学,2014.

[12] 华海清,沈小昆,秦淑奎,陈慧英.人参皂苷 Rg₃ 对裸鼠肝移植瘤的作用研究[J].临床肿瘤学杂志,2007,12(12):897-901.

[13] 何鑫,何翦太.人参皂苷 Rh₂ 对人肝癌 bel-7402 细胞增殖和凋亡的影响[D].长沙:中南大学,2012.

[14] 陈晓东,孔隶.人参皂苷 Rh₂ 对荷结肠癌 CT-26 小鼠抗瘤作用及免疫指标的影响[D].天津:天津医科大学,2012.

[15] 谢茵,邢桂琴,刘秀芬.三七提取液中三七总皂苷的分离纯化工艺研究[J].山西医科大学学报,2006,37(6):613-615.

[16] 刘中秋,蔡雄,赖小平,等.大孔吸附树脂富集纯化三七总皂苷工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(3):4-6.

[17] 石召华,熊富良,李崇明,等.大孔吸附树脂分离纯化三七总皂苷工艺研究[J].中成药,2004,26(1):10-12.

[18] 杨悦武.一种三七总皂苷的制备方法:中国,CN101085802A[P].2005-12-12.

[19] 张平.一种三七总皂苷的制备方法:中国,CN1634970A[P].2005-07-06.

[20] 张国华.一种三七总皂苷的提纯方法:中国,CN101450091A[P].2009-06-10.

[21] 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):2320-2321.

[22] 吴瑾瑾,夏聪华,葛卫红,等.阴离子树脂交换法纯化猕猴桃根多糖的工艺研究[J].浙江中医药大学学报,2010,34(6):906-910.

[23] 桂双英,周亚球.正交试验法优选人参总皂苷的提取工艺[J].时珍国医国药,2003,14(10):591-592.

[责任编辑 刘德文]