

三步碱沉法制备地榆总皂苷的工艺优选

代良敏¹, 熊永爱¹, 杨桂燕¹, 林影影¹, 杨明^{1,2*}

- (1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137;
2. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的:通过正交试验与三步沉淀法优选地榆总皂苷的提取与纯化工艺条件。方法:采用 HPLC-ELSD 测定地榆皂苷-I 的含量,流动相[甲醇-乙腈(1:1)]-水梯度洗脱,蒸发光散射检测器的漂移温度 100 ℃,气体流速 3.0 L·min⁻¹。以地榆皂苷-I 转移率为指标,通过正交试验优选地榆总皂苷的提取工艺;采用三步碱沉法,以鞣质清除率与地榆皂苷-I 含量为评价指标,通过单因素试验优选纯化工艺。结果:地榆总皂苷最佳工艺条件为加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,提取液加 10% 氢氧化钠溶液调 pH 12~14,静置 12 h,离心去沉淀,上清液用 10% 氢氧化钠溶液调 pH 12~13,静置 24 h,离心,沉淀于 70 ℃减压干燥至干,用 30 倍量无水乙醇回流 30 min,减压回收乙醇至有固形物析出,固形物减压干燥 12 h。地榆总皂苷纯度 91.32%。结论:优选的地榆总皂苷提取纯化工艺路线简单、稳定,制备的地榆总皂苷得率、纯度高,适合工业化生产。

[关键词] 地榆;总皂苷;碱沉法;地榆皂苷-I;鞣质

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2;R942 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0009-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180009

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160727.1605.014.html>

[网络出版时间] 2016-07-27 16:05

Optimization of Three-step Alkali Precipitation Method for Preparation of Total Saponins in Sanguisorbae Radix

DAI Liang-min¹, XIONG Yong-ai¹, YANG Gui-yan¹, LIN Ying-ying¹, YANG Ming^{1,2*}

- (1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China; 2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and purification technology of total saponins in Sanguisorbae Radix by orthogonal test and three-step precipitation method. **Method:** HPLC-ELSD method was employed to determine the content of ziyuglycoside-I with mobile phase of [methanol-acetonitrile (1:1)]-water for gradient elution. Taking transfer rate of ziyuglycoside-I as index, orthogonal test was adopted to optimize extraction technology of total saponins. Three-step alkali precipitation method was used, single factor tests were adopted to optimize purification technology of total saponins with clearance of tannins and ziyuglycoside-I content as indexes. **Result:** The best process was as follows: reflux extracted twice with 8 times the amount of 70% ethanol, each time for 1.5 h, adding 10% NaOH to adjust pH of extract between 12-14, stewing it for 12 hours,

[收稿日期] 20151025(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373976);国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09103002-013)

[第一作者] 代良敏,在读硕士,从事中药新制剂、新剂型和新技术研究,Tel:18782903677,E-mail:1542227478@qq.com

[通讯作者] *杨明,博士,教授,从事中药制剂学研究,E-mail:yangmin16@126.com

collecting supernatant solution after centrifugation, adding 10% NaOH to adjust pH of supernatant solution between 12-13, stewing it for 24 hours, collecting the precipitate after centrifugation, dried the precipitate at 70 °C, then reflux extracted 30 min with 30 times the amount of ethanol, vacuum recovery of ethanol, dried 12 h. Purity of total saponins in *Sanguisorbae Radix* was 91.32%. **Conclusion:** The optimized extraction and purification technology of total saponins in *Sanguisorbae Radix* is simple and stable with high yield and purity, which is suitable for industrial production.

[**Key words**] *Sanguisorbae Radix*; total saponins; alkali precipitation method; ziyuglycoside- I; tannins

地榆具有凉血止血、解毒敛疮的功效,主要含有鞣质、皂苷和黄酮类等物质^[1],其中皂苷类成分质量分数约 5%。目前已从地榆中分离出 50 余种三萜及其皂苷类成分^[2]。皂苷类成分以乌苏烷型为主,其次还有齐墩果烷型和达玛烷型^[3]。现代药理学研究表明地榆中皂苷类成分具有升高白细胞、抗肿瘤等活性^[4-5]。查阅目前国内外文献与专利(专利号 101862385A 与 102631441A)获知^[6],地榆总皂苷缺少一种理想的提取方法,专利中报道的制备方法都比较复杂,主要采用大孔树脂分离纯化,由于地榆皂苷类成分有其独特的理化性质,而大孔树脂有其局限,因此造成得率和纯度都比较低,限制了地榆皂苷类成分的成药性研究。

现代研究表明,五环三萜类皂苷在强碱条件下,可生成溶于高体积分数乙醇而不溶于低体积分数乙醇或水的有机盐^[7]。前期研究发现地榆皂苷类成分也具有这种理化性质。为制备高纯度的地榆总皂苷,同时为适应工业化大生产的需要,本实验拟建立一种以乙醇和氢氧化钠为主要提取纯化原料,通过三步碱沉法得到高纯度的地榆皂苷,并建立地榆皂苷-I 的含量测定方法,为地榆总皂苷制剂原料的制备及质量控制提供参考。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 3300 型蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司), BT25S 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利科学仪器有限公司),JA2003 型 1/千电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司),BT25S 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。地榆饮片(批号 20141202)购自四川科伦药业股份有限公司,经成都中医药大学中药鉴定教研室卢先明教授鉴定为蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* 的干燥根;地榆皂苷-I 对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号 D-022-140728,纯度 > 98%),水为超纯水,乙腈、甲醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 地榆皂苷-I 的含量测定

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取地榆皂苷-I 对照品 10.18 mg,置于 10 mL 量瓶中,加适量甲醇使溶解,摇匀,超声 30 min,冷却,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取地榆总皂苷粉末 0.1 g,置于 25 mL 量瓶中,加入甲醇 40 mL,超声 30 min,冷却,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密移取 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

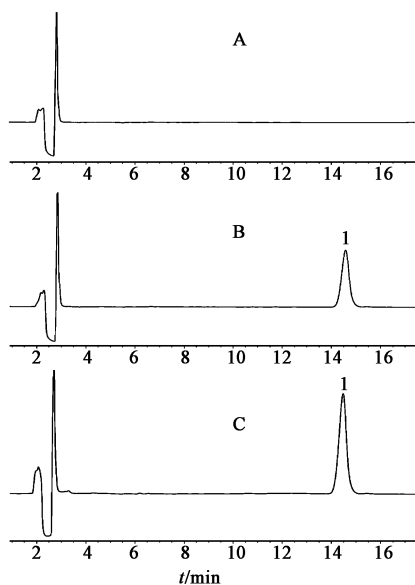
2.1.3 HPLC-ELSD 分析条件 以甲醇-乙腈(1:1)为流动相 A,水为流动相 B,梯度洗脱(0 ~ 25 min, 45% ~ 65% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,蒸发光散射检测器的漂移温度 100 °C,气体流速 3.0 L·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.1.4 专属性考察 分别配制空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,见图 1。结果显示在该分析条件下,地榆皂苷-I 色谱峰理论塔板数 > 5 000,与其他组分的色谱峰分离良好,且阴性无干扰,说明本方法具有较好的专属性。

2.1.5 标准曲线考察 精密移取适量地榆皂苷-I 对照品储备液于量瓶中,用甲醇稀释至 509 mg·L⁻¹,分别吸取 2,4,6,8,10,20 μL 按 2.1.3 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $\lg Y = 1.631 \lg X + 2.312$ ($r = 0.9998$),线性范围 1.018 ~ 10.018 μg。

2.1.6 精密度试验 将地榆皂苷-I 对照品溶液和供试品溶液按 2.1.3 项下条件重复进样 6 次,计算峰面积的 RSD 分别为 0.4%,1.0%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 分别精密称取 6 份同一批次的地榆样品各约 0.1 g,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下条件测定,计算地榆皂苷-I 的平均质量分数 59.7 mg·g⁻¹,RSD 0.5%,说明该方法重复性良好。



A. 阴性样品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 地榆皂苷-I

图 1 地榆总皂苷的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of total saponins from Sanguisorbae Radix

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液和对照品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 10, 12 h 按 2.1.3 项下条件分析, 计算地榆皂苷-I 峰面积的 RSD 分别为 0.1%, 1.5%, 表明供试品溶液和对照品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.9 准确度试验 精密称取已知含量的地榆总皂苷粉末 9 份, 每份约 0.05 g, 各精密加入不同量的地榆皂苷-I 对照品溶液, 制备 3 个不同质量浓度的样品 ($n=3$), 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 计算地榆皂苷-I 含量, 结果平均加样回收率 100.72%, RSD 1.5%, 见表 1, 表明该方法稳定可靠。

表 1 地榆皂苷-I 的加样回收率试验

Table 1 Recovery test of ziyuglycoside-I

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.050	4.950 83	3.971 71	9.102 25	104.52		
0.051	5.445 91	4.348 70	9.801 46	100.16		
0.049	4.851 81	3.901 02	8.781 28	100.73		
0.048	4.703 29	4.697 35	9.392 06	99.82		
0.053	5.594 43	5.612 44	11.191 69	99.73	100.72	1.5
0.052	5.297 38	5.289 64	10.601 70	100.28		
0.048	4.505 25	5.412 30	9.950 76	100.61		
0.052	4.802 30	5.781 08	10.601 34	100.31		
0.050	5.049 84	6.062 08	11.130 19	100.30		

2.2 提取工艺考察^[8-9] 取同一批干燥的地榆粗粉(过 5 号筛)共 9 份, 每份 40 g, 选择乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数为考察因素, 以地榆皂苷-I 转移率为评价指标, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。由直观分析可知, 各因素对醇提工艺的影响顺序为 $B > A > D > C$ 。以极差最小的因素 C 为误差项进行方差分析, 结果各因素对提取工艺均无显著影响。综合实际成本考虑, 确定最佳工艺组合 $A_2B_2C_2D_2$, 即加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h。

表 2 地榆总皂苷乙醇提取工艺正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of extraction process of total saponins in Sanguisorbae Radix

No.	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数/次	地榆皂苷-I 转移率/%
1	60	6	1	1	30.55
2	60	8	1.5	2	76.32
3	60	10	2	3	80.10
4	70	6	1.5	3	64.52
5	70	8	2	1	89.25
6	70	10	1	2	90.10
7	80	6	2	2	55.32
8	80	8	1	3	75.23
9	80	10	1.5	1	70.78

表 3 醇提工艺方差分析

Table 3 Variance analysis of ethanol extraction process

方差来源	SS	MS	F	P
A	583.719	9.864	4.213	>0.05
B	1 820.061	17.417	13.137	>0.05
C(误差)	138.546	4.805	1.000	
D	203.472	5.823	1.469	>0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ 。

2.3 地榆总皂苷纯化工艺优化

2.3.1 pH 称取地榆粗粉(过 5 号筛)800 g, 加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 过滤, 合并 2 次滤液, 放冷, 平均分成 5 份, 加入 10% 氢氧化钠溶液分别调 pH 至 9 ~ 10, 10 ~ 11, 11 ~ 12, 12 ~ 13, 13 ~ 14。静置过夜, 离心 ($4 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min) 收集沉淀(经检测为鞣质), 结果鞣质得率依次为 5.66%, 7.54%, 9.86%, 11.36%, 11.95%; 地榆皂苷-I 质量分数依次为 6.34%, 8.41%, 10.98%, 11.56%, 12.78%。故选择调节提取液 pH 12 ~ 14。

取已调 pH 12 ~ 14 的 70% 乙醇提取液, 减压浓

缩至乙醇体积分数约 30% ~ 40%, 加水调乙醇体积分数至 20%, 等分为 4 份, 用 10% 氢氧化钠溶液分别调 pH 至 11 ~ 12, 12 ~ 13, 13 ~ 14, 14 ~ 15, 静置过夜, 离心 ($4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min), 收集沉淀, 结果地榆总皂苷(单独以地榆皂苷-I 含量计)的纯度依次为 62.76%, 85.04%, 75.68%, 66.16%; 沉淀得率依次为 2.09%, 4.61%, 3.64%, 2.42%。故选择调节提取液 pH 12 ~ 13。

2.3.2 乙醇用量 取同一批地榆总皂苷 1.0 g, 共 3 份, 按 2.3.1 项下方法制得纯度 85% 的地榆总皂苷, 分别加 20, 30, 40 倍量乙醇回流 20 min, 结果地榆总皂苷纯度依次为 88.10%, 89.02%, 89.03%, 故初步确定乙醇用量为 30 倍。

2.3.3 回流时间 取同一批地榆总皂苷 1.0 g, 共 3 份, 按 2.3.1 项下方法制得纯度 85% 的地榆总皂苷, 分别加 30 倍量乙醇回流 20, 30, 40 min, 结果地榆总皂苷纯度依次为 89.05%, 95.31%, 95.01%, 故确定回流时间 30 min。

2.3.4 验证试验 分别称取 3 批地榆粗粉(过 5 号筛), 每份 500 g, 按优选的工艺进行验证试验, 结果地榆总皂苷纯度分别为 91.21%, 91.23%, 91.52%, 说明优选的工艺条件稳定可行。

3 讨论

地榆皂苷-I 占地榆总皂苷质量分数的 60% 以上^[10], 属于三萜类皂苷。地榆皂苷类成分仅有末端吸收, 紫外检测响应值低且干扰较大, 确定采用蒸发光散射检测器进行检测, 为满足地榆总皂苷提取物作为制剂原料时质量控制的准确灵敏、简便实用等要求, 本研究还建立了地榆皂苷-I 的含量测定方法。通过方法学研究表明该方法灵敏、准确、干扰少、重复性好。地榆中皂苷类成分主要为五环三萜类皂苷。此类化合物的苷元结构较大, 极性低, 具有亲脂性, 而糖部分极性大, 具有亲水性, 这种结构类型的中药有效成分较适合采用乙醇提取^[3]。同时, 化学研究表明地榆含有鞣质, 亲水性强, 为得到高纯度的地榆总皂苷, 采用了高体积分数乙醇提取^[11]。

影响地榆皂苷类成分纯度的主要是鞣质, 为了获得高纯度的地榆总皂苷, 本研究旨在尽可能地除去鞣质。前期研究得知地榆皂苷类成分在强碱的条件下很稳定, 皂苷类成分的结构不会破坏, 所以采用

三步碱沉法制备地榆总皂苷。碱性醇沉为鞣质的常用去除方法, 在高浓度的醇提取液中加入碱溶液除鞣质, 在高浓度醇溶液中, 鞣质与碱反应, 缩合成复合物沉淀下来, 此步骤可以除去鞣质; 将除去沉淀的提取液进行浓缩, 调至稀醇状态, 再加碱使溶液成强碱状态, 皂苷类成分与碱发生反应成盐生成沉淀, 将沉淀收集, 此时沉淀中仍然夹杂着少量鞣质类成分, 因此, 进一步用无水乙醇回流纯化, 使皂苷盐溶于无水乙醇, 从而和鞣质得以分离, 最终得到高纯度的地榆总皂苷。本研究以高浓度醇提取后碱沉淀除鞣质-低浓度醇调 pH 收沉淀-无水乙醇回流纯化分离三步完成了对地榆总皂苷的制备, 基本符合工业化生产要求。

[参考文献]

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 重庆: 重庆出版社, 2006: 185.
- [2] 秦国伟, 陈梅玉, 徐任生. 地榆化学成分的研究[J]. 中草药, 1991, 22(11): 483-485.
- [3] 于蓓蓓, 钟方晓, 董学. 地榆化学成分研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(S1): 103-105.
- [4] 秦三海, 李坤, 周玲, 等. 地榆总皂苷抗肿瘤的实验研究[J]. 山东医药, 2010, 50(15): 24-26.
- [5] 代燕平, 高小平, 吴建明, 等. 地榆总皂苷对巨核祖细胞增殖分化及相关受体表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1685-1689.
- [6] 曹爱民, 张东方, 沙明, 等. 地榆中皂苷类化合物分离、鉴定及其含量测定[J]. 中草药, 2003, 34(5): 397-399.
- [7] 刘海宇, 张庆贺, 刘金平, 等. 达玛烷型三萜皂苷结构修饰研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 269-273.
- [8] 魏凤林, 朱春波, 朱立平, 等. 三七总皂苷提取工艺优选[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(12): 722-723.
- [9] 张学文, 韦玮, 程悦, 等. 地榆药材中总皂苷及地榆皂苷-I 的含量测定[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(2): 186-191.
- [10] 谭鹏, 蒲旭峰, 文永盛, 等. HPLC-ELSD 法测定地榆升白片中地榆皂苷-I 的含量[J]. 中药与临床, 2013, 4(4): 21-23.
- [11] 赵启铎, 舒乐新, 蔡广知. 酸枣仁总黄酮和总皂苷部位制备工艺的稳定性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 27-29.

[责任编辑 刘德文]