藤三七总皂苷的大孔树脂纯化工艺优选

蒋珍藕[1*],邱宏聪[1,2],邓聿胤[1]
(1. 广西中医药研究院,南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室,南宁 530022)

[摘要] **目的**:优选藤三七总皂苷的大孔树脂分离纯化工艺。**方法**:采用 UV 测定总皂苷含量。通过静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号;以总皂苷动态吸附量和洗脱率为指标,利用正交试验优选藤三七总皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺条件。**结果**:选用 D101 型大孔吸附树脂分离纯化藤三七总皂苷,最佳工艺条件为上样液质量浓度 0.1 $g\cdot mL^{-1}$,上样流速 1 $BV\cdot h^{-1}$,径高比 1∶10,上样量(药材量-树脂)0.2 $g\cdot mL^{-1}$,乙醇体积分数 40%,乙醇用量 8 BV,洗脱流速 2 $BV\cdot h^{-1}$;藤三七总皂苷纯度 >50%。**结论**:优选的纯化工艺合理可行,可较好地分离纯化藤三七总皂苷。

[关键词] 藤三七; 总皂苷; 分离纯化工艺; 大孔吸附树脂; 正交试验
[中图分类号] R284.2;R284.1;R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)02-0026-04
[**doi**] 10.11653/syfj2014020026

Optimization of Purification Technology for Total Saponins from *Anredera cordifolia* by Macroporous Resin

JIANG Zhen-ou[1*], *QIU Hong-cong*[1,2], *DENG Yu-yin*[1]
(1. *Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science*, *Nanning* 530022, *China*;
2. *Guangxi Key Laboratory of Tradtitonal Chinese Medicine Quality Standards*, *Nanning* 530022, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To optimize separation and purification process of total saponins from *Anredera cordifolia* by macroporous resin. **Method**: The content of total saponins was determined by UV. Model of macroporous resin was screened by static adsorption-elution test; Orthogonal test was adopted to optimize separation and purification process of total saponins from *A. cordifolia* by taking dynamic adsorption capacity and elution rate as indexes. **Result**: D101 macroporous resin was selected, its optimum separation and purification process conditions were determined as follows: the concentration of sample solution 0.1 $g\cdot mL^{-1}$, adsorption velocity 1 $BV\cdot h^{-1}$, ratio of diameter-high of cation resin column 1∶10, quality proportion of crude drug-resin 0.2 $g\cdot mL^{-1}$, ethnol concentration 40%, elution velocity 2 $BV\cdot h^{-1}$, eluent volume 8 BV; Purity of total saponins from *A. cordifolia* under these conditions could reach above 50%. **Conclusion**: Optimized separation and purification process was reasonable and feasible, it could easily separate and purify total saponins from *A. cordifolia*.

[**Key words**] *Anredera cordifolia*; total saponins; separation and purification process; macroporous resin; orthogonal test

藤三七为药食同源植物,功能滋补强壮、活血化瘀、通脉止痛、降脂降血压,常用于治疗腰膝痹痛、病后体弱、跌打损伤、高脂血症等[1-2],药理研究证实藤三七具有降血糖[3]、抗脂质过氧化[4]、抗菌消炎[5-6]、抗 HIV[7] 等药理活性,化学成分包括皂苷类和黄酮类等[7-8]。在前期对藤三七总皂苷和总黄酮提取工艺研究的基础上,本实验采用大孔树脂法纯化藤三七总皂苷,为藤三七资源的深入研究和开发利用提供参考。

[收稿日期] 20130617(002)
[基金项目] 广西医疗卫生重点科研课题(重 2010112)
[通讯作者] *蒋珍藕,硕士,副主任中药师,从事中草药开发研究,Tel: 0771-5868275, E-mail: zhenoujiang@163.com

1 材料

UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司),

LIBROR AEL-200 型电子天平（日本岛津公司）。齐墩果酸对照品（中国食品药品检定研究院，批号 110709-200505），DM130，ADS-17，LS-300 型大孔吸附树脂（西安蓝深特种树脂有限公司），D101 型大孔吸附树脂（西安蓝晓科技有限公司），藤三七［采自南宁市马山县郊区，经广西中医药研究院饶伟源副主任中药师鉴定为落葵科落葵薯属多年生蔓生藤本植物落葵薯 *Anredera cordifolia*（Tenore）Steenis 地上部分，自然通风条件下阴干］，乙醇为 95% 食用酒精，水为蒸馏水，其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 总皂苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取适量齐墩果酸对照品，加乙醇制成 200 $mg \cdot L^{-1}$ 的溶液，即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取藤三七药材粗粉 0.5 g，精密加入乙醇 50 mL，称定质量，超声处理（80 W，50 kHz）60 min，放冷，称定质量，用乙醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 线性关系 精密称取齐墩果酸对照品 10.8 mg，置 50 mL 量瓶中，加甲醇使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为贮备液。精密量取贮备液 0.1，0.3，0.6，1，2，3 mL，以相应试剂为空白参比，分别置于 10 mL 具塞比色管中，于 80 ℃水浴中挥去溶剂，加 5% 香草醛-冰醋酸 0.30 mL 和高氯酸 0.80 mL，摇匀，于 70 ℃水浴中保温 15 min，取出，冰浴中冷却 5 min，加冰醋酸至 5 mL，于 539 nm 处测定吸光度（A），以齐墩果酸质量浓度为横坐标，A 为纵坐标，得回归方程 $Y = 0.026\ 1X + 0.016\ 3$（$r = 0.999\ 5$），线性范围 2.16～64.80 $mg \cdot L^{-1}$。

2.2 纯化工艺优选

2.2.1 藤三七提取液的制备 取藤三七药材粗粉 2 kg，加 12 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次，每次 2 h，合并提取液，滤过，滤液减压回收乙醇至无醇味，加水定容至 2 L，摇匀，备用，即生药质量浓度 1 $g \cdot mL^{-1}$，测得总皂苷质量浓度 16.26 $g \cdot L^{-1}$。

2.2.2 树脂预处理 取大孔吸附树脂，用 95% 乙醇浸泡 24 h，充分溶胀后湿法装柱，用 95% 乙醇以 2 $BV \cdot h^{-1}$ 的流速清洗至流出液与水混合（1∶5）不呈白色混浊为止，用水清洗柱子至流出液无醇味，备用。

2.2.3 大孔树脂型号筛选 选择 4 种不同型号（DM130，D101，ADS-17，LS-300）大孔吸附树脂进行静态吸附-洗脱试验。取藤三七提取液 40 mL，加水至 400 mL，搅匀，放置 24 h，滤过，滤液均分成 4 份，作为供试品溶液。量取已处理好的不同型号大孔吸附树脂各 30 mL，分别置于 250 mL 具塞磨口锥形瓶中，分别加入供试品溶液，浸渍 24 h（每隔 4 h 振摇 1 次），充分吸附后，滤过，滤液蒸干，测定总皂苷含量，计算静态饱和吸附量分别为 2.63，3.05，1.89，2.21 $g \cdot L^{-1}$。过滤所得树脂另置于 250 mL 具塞磨口锥形瓶中，加 50% 乙醇 60 mL，每隔 20 min 振摇 1 次，持续 4 h，静置 12 h，滤过，滤液蒸干，测定总皂苷含量，计算静态洗脱率分别为 56.34%，68.66%，53.17%，47.52%。结果表明 D101 型大孔树脂的静态饱和吸附量及洗脱率均高于其他 3 种型号树脂，故选择 D101 型树脂分离纯化藤三七总皂苷。

静态饱和吸附量 =（样品中总皂苷质量 − 吸附后滤液中总皂苷质量）/树脂体积；

静态洗脱率 = 洗脱液中总皂苷质量/（样品中总皂苷质量 − 吸附后滤液中总皂苷质量）× 100%

2.2.4 吸附条件考察[9-10] 选取上样液质量浓度、上样流速、径高比为考察因素，以总皂苷吸附量为考察指标，每个因素设计 3 个水平，按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，因素水平见表 1。取藤三七提取液 10 mL，共 9 份，等分为 3 组，每组质量浓度分别为 0.05，0.1，0.2 $g \cdot mL^{-1}$，将样品液上样至处理好的 9 份等量（20 mL）D101 型大孔树脂上，收集流出液，蒸干，测定总皂苷含量，试验安排及结果见表 2，方差分析见表 3。

由直观分析可知，各因素对藤三七总皂苷吸附条件的影响顺序为 $A > C > B$。方差分析表明各因素对吸附条件的影响均无显著性，确定最佳吸附工艺条件为 $A_2B_1C_2$，即上样液质量浓度 0.1 $g \cdot mL^{-1}$，上样流速 1 $BV \cdot h^{-1}$，径高比 1∶10。

2.2.5 上样量考察 取藤三七提取液 10 mL，共 2 份，按优选的吸附条件上柱，收集流出液，蒸干，测定总皂苷含量，计算平均动态饱和吸附量 3.42 $g \cdot L^{-1}$，即每 mL 的 D101 型大孔吸附树脂对总皂苷的饱和吸附量为 3.42 mg（约相当于生药 0.2 g），故确定上柱总皂苷质量与树脂的比例应 <3.4∶1。

动态饱和吸附量 =（样品中总皂苷质量 − 流出液中总皂苷质量）/树脂体积

2.2.6 洗脱条件优选[11] 在预试验基础上，以总皂苷动态洗脱率为考察指标，选取洗脱流速、乙醇体积分数及用量为考察因素，每个因素设计 3 个水平，因素水平见表 4。取藤三七提取液 10 mL，共 9 份，按优化的条件进行吸附，按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，收集洗脱液，减压浓缩，真空干燥，测定总皂苷含

量,计算动态洗脱率,试验安排及结果见表 5,方差分析见表 6。

动态洗脱率 = 洗脱液中总皂苷质量/(样品中总皂苷质量 - 吸附后滤液中总皂苷质量)×100%

表 1 藤三七总皂苷的 D101 型大孔树脂吸附条件正交试验因素水平

水平	A 上样液质量浓度/g·mL^{-1}	B 上样流速/BV·h^{-1}	C 径高比
1	0.05	1	1:8
2	0.10	2	1:10
3	0.20	3	1:12

表 2 藤三七总皂苷树脂吸附条件正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	总皂苷吸附量/mg
1	1	1	1	1	46.38
2	1	2	2	2	41.54
3	1	3	3	3	38.96
4	2	1	2	3	66.45
5	2	2	3	1	56.19
6	2	3	1	2	54.10
7	3	1	3	2	41.27
8	3	2	1	3	39.18
9	3	3	2	1	52.49
K_1	126.88	154.10	139.66	155.06	
K_2	176.74	136.91	160.48	136.91	
K_3	132.94	145.55	136.42	144.59	
R	16.62	5.73	8.02	6.05	

表 3 吸附条件方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	493.46	2	246.73	8.92	>0.05
B	49.25	2	24.62	0.89	>0.05
C	113.65	2	56.83	2.05	>0.05
D(误差)	55.34	2	27.67		

注:$F_{0.05}(2,2)=19$(表 6 同)。

表 4 藤三七总皂苷的 D101 型大孔树脂洗脱条件正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/BV	C 洗脱流速/BV·h^{-1}
1	20	8	1
2	40	10	2
3	60	12	3

表 5 藤三七总皂苷树脂洗脱条件正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	总皂苷动态洗脱率/%
1	1	1	1	1	64.73
2	1	2	2	2	66.96
3	1	3	3	3	68.28
4	2	1	2	3	96.88
5	2	2	3	1	90.94
6	2	3	1	2	74.63
7	3	1	3	2	69.12
8	3	2	1	3	58.74
9	3	3	2	1	69.36
K_1	199.97	230.73	198.10	225.03	
K_2	262.45	216.64	233.20	210.71	
K_3	197.22	212.27	228.34	223.90	
R	21.74	6.15	11.70	4.77	

表 6 洗脱条件方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	907.36	2	453.681	21.47	<0.05
B	62.04	2	31.02	1.47	>0.05
C	241.12	2	120.56	5.71	>0.05
D(误差)	42.26	2	21.13		

由直观分析可知,各因素对洗脱工艺的影响顺序为 $A>C>B$。方差分析表明因素 A 对洗脱工艺的影响具有显著性,最佳洗脱工艺条件为 $A_2B_1C_2$,即乙醇体积分数 40%,乙醇用量 8 BV,洗脱流速 2 BV·h^{-1}。

2.3 验证试验 取藤三七提取液 3 份,每份 200 mL,分别按优选的吸附、洗脱条件进行试验,结果干膏中总皂苷质量分数分别为 52.78%,54.82%,53.46%,表明藤三七醇提物经 D101 型大孔吸附树脂分离纯化后,总皂苷纯度 >50%,且具有较好的重复性。

3 讨论

大孔吸附树脂是近年来国内外应用广泛的分离技术,具有性质稳定、处理简单、再生方便等优点,尤其皂苷类成分通过大孔吸附树脂的分离纯化,可得到有效富集。藤三七含有较多的黏液质,因此,藤三七提取液上柱前一定要选择适宜的滤材滤过,或离心后取上清液,否则容易造成柱子堵塞,影响藤三七总皂苷的分离纯化。

枇杷花叶含片的处方工艺优选及药效学试验考察

张娜[1],吴绍康[1],沈先荣[2*],蒋定文[2],何颖[2],王庆蓉[2],刘玉明[2],葛卫红[1*]
(1. 浙江中医药大学中药体外代谢实验室,杭州 310053;
2. 海军医学研究所防护医学研究室,上海 200433)

[摘要] **目的**:优选枇杷花叶含片(LFLBT)的处方工艺并通过药效学试验验证其祛痰、止咳及抗炎的药理活性。**方法**:以口感和崩解时限为综合评价指标,通过正交试验考察微晶纤维素、甘露醇、阿斯巴甜、柠檬酸用量对 LFLBT 处方工艺的影响;采用酚红排泌法、浓氨水喷雾引咳法和二甲苯致小鼠耳肿胀法验证 LFLBT 的祛痰、止咳及抗炎活性。**结果**:最佳处方工艺为每 30 g 枇杷花叶提取物中加入微晶纤维素 70 g 和甘露醇 5 g,另加入 0.5% 阿斯巴甜和 1% 柠檬酸,以 95% 乙醇为黏合剂制粒。与空白组相比,LFLBT 高剂量组能明显增加小鼠的酚红排泌量;LFLBT 中剂量组和高剂量组能延长浓氨水所致的小鼠咳嗽潜伏期并减少小鼠 3 min 内的咳嗽次数;LFLBT 高剂量组能明显抑制二甲苯引起的小鼠耳肿胀。**结论**:优选的处方工艺简单可行,制备的 LFLBT 具备一定的清咽利喉活性。

[关键词] 枇杷花;枇杷叶;清咽利喉;祛痰作用;止咳作用;抗炎作用;口含片
[中图分类号] R283.6;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)02-0029-04
[doi] 10.11653/syfj2014020029

Pharmacodynamics Investigation and Prescription Process Optimization of Loquat Flowers and Leaves Buccal Tablets

ZHANG Na[1], *WU Shao-kang*[1], *SHEN Xian-rong*[2*], *JIANG Ding-wen*[2], *HE Ying*[2],

[收稿日期] 20130627(002)
[基金项目] 全军医学科技“十二五”重大专项(AS11J003)
[第一作者] 张娜,在读硕士,从事中药药理与新产品开发研究,Tel:18616942327,E-mail:shining_nana@126.com
[通讯作者] * 葛卫红,教授,博士生导师,从事中药药理与新产品开发研究,Tel:13905622241,E-mail:geweihong@hotmail.com;
* 沈先荣,研究员,博士生导师,从事中药及海洋药物研究,Tel:13701913595,E-mail:xianrong_sh@163.com

[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.第 26 卷[M].北京:科学出版社,1996:46.
[2] 国家中医药管理局中华本草编委会.中华本草.第 2 卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:760.
[3] LIN H Y. Studies on the chemical constituents and antihyperglycemic effect of *Boussingaultia gracilis*[D]. Taichung: China Medical College, 1986.
[4] 仇洁,周永标,谭玉兰,等.落葵薯提取物清除氧自由基及抗脂质过氧化作用[J].中药材,2004,27(8):608.
[5] Tshikalange T E, Meyer J J M, Hussein A A. Antimicmbial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 96(3):515.
[6] 刘佳,陈晓辉,钱忠直,等.RP-HPLC 法测定藤三七不同部位中腺苷的含量[J].沈阳药科大学学报,2009,26(9):724.
[7] LIN H Y, KUO S C, LIN T D, et al. A new sapogenin from *Boussingaultia gracilis*[J]. J Nat Prod, 1988, 51(4):797.
[8] 顾琼,马云保,张雪梅,等.藤三七中一个新黄烷醇和抗 HIV 活性成分[J].高等学校化学学报,2007,28(8):1508.
[9] 方达任,张志.正交试验法优选大孔树脂对黄芪总皂苷动态吸附工艺的研究[J].中国药师,2009,12(12):1747.
[10] 杨军宣,吴天骄,尹蓉莉,等.正交设计法优选酸枣仁皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(12):63.
[11] 杨明,张中文,沈红,等.D101 大孔树脂分离连翘酯苷条件的优化及检测[J].中国药学杂志,2009,44(22):1685.

[责任编辑 仝燕]