

大孔树脂纯化大蒜总皂苷的工艺优选

柏冬, 王瑞海, 李景远, 刘丽梅*

(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 优选大蒜总皂苷的大孔树脂纯化工艺。方法: 以总皂苷转移率为指标, 采用单因素试验考察树脂型号、吸附性能(吸附容量、上样液质量浓度、pH、吸附速度)、洗脱性能(洗脱剂浓度、流速、体积), 优选大蒜总皂苷纯化工艺。结果: 优选的纯化工艺条件为采用 AB-8 型大孔树脂, 树脂-生药 1: 1.3, 上样液质量浓度 $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 7, 吸附速度 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 加 30% 乙醇 3 BV 除杂, 95% 乙醇 5 BV 洗脱, 洗脱速度 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 大蒜总皂苷纯度 $> 65\%$ 。结论: AB-8 型大孔树脂可用于纯化大蒜提取物中总皂苷, 优选的纯化工艺稳定可行。

[关键词] 大蒜; 总皂苷; 大孔树脂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0004-04

[doi] 10.11653/syfy2013120004

Optimization of Purification Technology of Total Saponins from *Allium sativum* with Macroporous Resins

BAI Dong, WANG Rui-hai, LI Jing-yuan, LIU Li-mei*

(Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of total saponins from *Allium sativum* with macroporous resin. **Method:** With transfer rate of total saponins as index, single factor tests were adopted to optimize purification process parameters, such as type of macroporous resin, adsorption capacity of resin (adsorption capacity, the concentration of sample solution, pH and adsorption speed) and elution performance (the concentration, flow rate and volume of eluent). **Result:** Optimized purification technology was as following: selected AB-8 macroporous resin, ratio of crude drug-resin 1.3:1, the concentration of sample solution $0.8 \text{ g} \cdot$

[收稿日期] 20121211(010)

[基金项目] 国家重大新药创制科技专项(2009ZX09301-005-11)

[第一作者] 柏冬, 博士, 助理研究员, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 010-64014411-2592, E-mail: baidong2000@126.com

[通讯作者] * 刘丽梅, 研究员, 从事中药药效物质基础研究, E-mail: liulimeihb@sina.com

[10] Kawano Y, Alto, M Sasatsu, et al. Preparation of orally disintegrating tablets with taste-masking function; masking effect in granules prepared with correctives using the dry granulation method and evaluation of tablets prepared using the taste-masked granules [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2010, 130(1): 81.

[11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 感官分析 方法学 排序法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 2.

[12] 叶萍. 苦味受体及其传导机制的研究进展 [J]. 国外医学·口腔医学分册, 2003, 30(6): 453.

[13] 刘晶晶. 苦味机理及苦味物质的研究概况 [J]. 食品科技, 2006, 31(8): 21.

[14] 张小滨, 侯新朴. 掩盖药物不良臭味的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(1): 43.

[15] 于飞千, 刘臻, 潘卫三. 药物制剂中苦味掩盖方法的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(15): 1171.

[责任编辑 全燕]

mL⁻¹, pH 7, adsorption speed 2 BV·h⁻¹, removed impurities with 30% ethanol, eluted with 5 BV of 95% ethanol, elution speed 3 BV·h⁻¹. Under these conditions, purity of total saponins was over 65%. **Conclusion:** AB-8 macroporous resin could be adopted to purify total saponins from *A. sativum*, this optimized purification technology was stable and feasible.

[**Key words**] *Allium sativum*; total saponins; macroporous resin

大蒜总皂苷是大蒜有效成分之一,具有降脂、抗凝血、抗肿瘤、和抗菌等功效^[1-4],其皂苷类型为呋甾皂苷和螺甾皂苷,目前已分离并确认了10种呋甾皂苷和7种螺甾皂苷^[5]。目前,大蒜总皂苷的提取原料多为脱水蒜粉,一般用体积分数40%~80%的乙醇提取^[6]。本实验以生大蒜为原料,充分利用大蒜提取挥发油后的蒜渣,双提后乙醇提取,经树脂纯化,使提取物中大蒜总皂苷纯度>50%,符合中药五类新药申报的要求。

1 材料

SPS202F型电子天平(奥豪斯公司),DS200型高速组织捣碎机(江苏江阴周庄科研器械厂),挥发油提取器(北京玻璃仪器厂),98-1-B型电热套(天津泰斯特仪器有限公司),8453型紫外-可见分光光度计(美国安捷伦),P225D型电子天平(德国赛多利斯),HY-4A型数显调速多用振荡(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)。

大蒜(山东金乡,经山东金乡农业局程堂高级农技师鉴定为百合科植物大蒜 *Allium sativum* L. 的鳞茎)AB-8, D4020, S-8型大孔树脂(天津南开大学化工厂),DM-130, CD-180型大孔树脂(山东鲁抗医药股份有限公司),HPD-100型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),薄层色谱板(青岛海洋化工厂分厂),皂苷对照品(Proto-iso-eruboside-B, 实验室自制,纯度>98%)。

2 方法和结果

2.1 大孔树脂类型的筛选 分别取已处理好的6种大孔吸附树脂,抽滤至不滴水为准,各称取50 g(W),湿法装于3.2 cm×40 cm玻璃柱中。按优选的工艺进行提取^[7],调整药液生药质量浓度1.79 g·mL⁻¹,测定总皂苷质量浓度(C₀)^[8]。取6份提取液,每份60 mL(V₀),上样流速2 BV·h⁻¹,收集流出液,用500 mL蒸馏水洗脱,水洗液与流出液合并(V₁),各树脂柱均继续用700 mL 95%乙醇以2 BV·h⁻¹洗脱,收集醇洗脱液(V₂),测定水洗液与醇洗液中总皂苷浓度(分别为C₁, C₂),见表1,结果表明采用AB-8型大孔树脂纯化大蒜总皂苷的转移率最高。

$$\text{吸附量} = (C_0 \times V_0 - C_1 \times V_1) / W;$$

$$\text{吸附率} = [(C_0 \times V_0 - C_1 \times V_1) / C_0 \times V_0] \times 100\%;$$

$$\text{洗脱量} = C_2 \times V_2 / W;$$

$$\text{洗脱率} = [C_2 \times V_2 / (C_0 \times V_0 - C_1 \times V_1)] \times 100\%;$$

$$\text{转移率} = (C_2 \times V_2) / (C_0 \times V_0) \times 100\%$$

表1 不同型号大孔树脂动态吸附试验考察

树脂型号	吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率 /%	洗脱量 /mg·g ⁻¹	洗脱率 /%	转移率 /%
D4020	1.72	69.23	0.63	36.59	25.33
HPD-100	1.80	72.51	0.76	42.25	30.64
DM-130	1.65	66.65	0.70	42.15	28.10
AB-8	1.82	73.26	0.81	44.37	32.50
S-8	1.20	48.35	0.62	51.82	25.06
CD-180	1.10	44.45	0.13	11.39	5.06

2.2 大孔树脂吸附性能考察^[9]

2.2.1 吸附容量 称取AB-8型大孔树脂50 g,湿法装柱。取大蒜提取液(1.82 g·mL⁻¹)以2 BV·h⁻¹上样,分段收集流出液(1~10份,每份9 mL;11~19份,每份27 mL),测定上样液及各流出液中总皂苷质量浓度,以生药量-树脂量为横坐标,总皂苷泄漏率(流出液质量浓度/上样液质量浓度)为纵坐标,绘制吸附曲线,见图1。

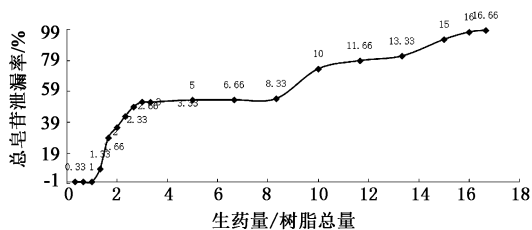


图1 树脂对大蒜皂苷的吸附曲线

由图1可知,当上样生药量达树脂量的1.33倍时,总皂苷泄漏率达8.34%。当泄漏率为10%时,可认为达到穿透点,故确定每100 g AB-8型大孔树脂可吸附130 g大蒜的提取液。

2.2.2 上样液质量浓度 称取AB-8型大孔树脂50 g,湿法装柱。取大蒜提取液(1.60 g·mL⁻¹)5份,每份42 mL,分别用水稀释成1.6,1.2,0.8,0.4,0.1 g·mL⁻¹的药液,以2 BV·h⁻¹上样,用500 mL水

洗脱,水洗液与流出液合并,用 95% 乙醇 5 BV 洗脱,收集乙醇洗脱液,测定水洗液与醇洗液中总皂苷质量浓度,见表 2,结果表明当上样液质量浓度为 $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,总皂苷的转移率最高。

表 2 上样液质量浓度对 AB-8 型大孔树脂纯化效果的影响

上样液质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	吸附量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	吸附率 /%	洗脱量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	洗脱率 /%	转移率 /%
0.1	2.53	86.98	0.79	31.44	27.35
0.4	2.58	88.76	0.86	33.30	29.56
0.8	2.66	91.67	0.90	33.61	30.81
1.2	2.65	91.39	0.86	32.33	29.55
1.6	2.56	88.18	0.82	31.88	28.11

2.2.3 上样液 pH 称取 AB-8 型大孔树脂 50 g,湿法装柱。取大蒜提取液 ($0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 份,每份 83 mL,用 pH 试纸测定药液 pH 7.0,其他两份药液分别用稀 HCl 和 5% NaOH 调节 pH 至 4.0,10.0。按 2.2.2 项下方法上样,依次用水和 95% 乙醇洗脱,测定水洗液与醇洗液中总皂苷质量浓度,见表 3,结果表明当药液 pH 7.0 时,皂苷转移率最高。

表 3 上样液 pH 对 AB-8 型大孔树脂纯化效果的影响

上样液 pH	吸附量 / mg	吸附率 /%	洗脱量 / mg	洗脱率 /%	转移率 /%
10	5.30	88.13	1.75	33.04	29.12
4	5.31	88.42	1.58	29.74	26.29
7	5.46	90.80	1.93	35.34	32.09

2.2.4 吸附流速 称取 AB-8 型大孔树脂 50 g,湿法装柱。取大蒜提取液 ($0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 份,每份 83 mL,分别以 2,4,6 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 上样,按 2.2.2 项下方法依次用水、95% 乙醇洗脱,测定水洗液与醇洗液中总皂苷质量浓度,见表 4,结果表明当流速为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 时,总皂苷转移率最高。

表 4 上样液吸附流速对 AB-8 型大孔树脂纯化效果的影响

上样速度 / $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$	吸附量 / mg	吸附率 /%	洗脱量 / mg	洗脱率 /%	转移率 /%
2	5.46	90.80	1.93	35.34	32.09
4	5.42	90.24	1.46	26.95	24.32
6	5.23	87.06	1.36	26.01	22.65

2.3 大孔树脂洗脱性能考察

2.3.1 乙醇体积分数 称取 AB-8 型大孔树脂 500 g,装于 $4 \text{ cm} \times 100 \text{ cm}$ 玻璃柱中。取大蒜提取液 ($0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 831 mL,按优选的吸附工艺上样,依

次用水及体积分数 10%,30%,50%,70%,95% 的乙醇各 4 BV 梯度洗脱,分段收集洗脱液,每份 1 BV。样品进行 TLC 检识^[8],减压干燥,测定各样品中总皂苷质量,以洗脱溶剂为横坐标,总皂苷质量分数为纵坐标,绘制洗脱曲线见图 2,TLC 检识见图 3。

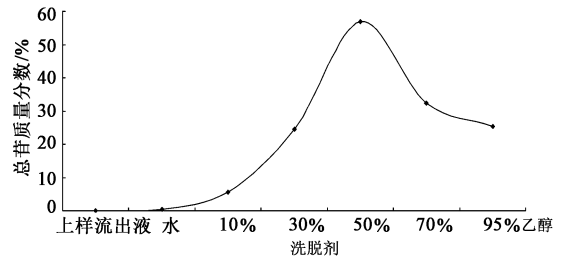
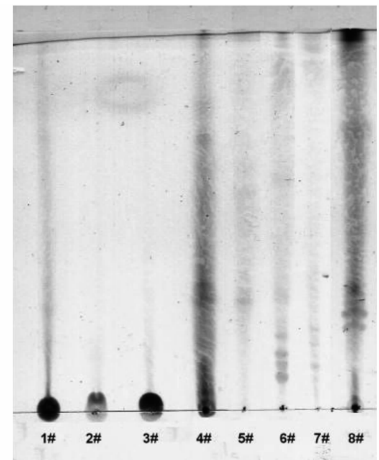


图 2 洗脱物中总皂苷质量分数



1#. 上样液;2#. 上样流出液;3#. 水洗液;
4#. 10% 乙醇洗脱液;5#. 30% 乙醇洗脱液;6#. 50% 乙醇洗脱液;
7#. 70% 乙醇洗脱液;8#. 95% 乙醇洗脱液

图 3 不同体积分数乙醇洗脱样品的 TLC

由图 3 可知,大蒜总皂苷样品主要集中在 50% ~ 95% 的乙醇洗脱物中。图 2 表明 10% 乙醇洗脱样品中总皂苷质量分数很低,仅 5.50%,故可将 10% 乙醇洗脱样品作为杂质舍弃;30% 乙醇洗脱样品中大蒜总皂苷质量分数 24.62%,因此,进一步利用药效学试验确定是否收集此部分洗脱样品。

采用人胃癌 MKN45, AGS, HGC-27 细胞,对 3 个不同样品进行药效学比较。样品 1 为提取液上样后经 5 BV 水洗除杂后,30% 乙醇 7 BV 的洗脱产物;样品 2 为 30% 乙醇洗脱后,95% 乙醇 4 BV 的洗脱产物;样品 3 为提取液上柱后经 5 BV 水洗除杂后,95% 乙醇 4 BV 的洗脱产物。各样品对胃癌细胞的半数杀伤浓度 (IC_{50}) 见表 5^[5],结果表明样品 2 药效活性最强,故确定洗脱工艺为药液上样后用 30% 乙

醇洗脱除杂,用95%乙醇洗脱,收集洗脱液。

表5 各样品对人胃癌 MKN45, AGS 和 HGC-27 细胞

杀伤作用的 $IC_{50} (\bar{x} \pm s)$ $g \cdot L^{-1}$

样品	MKN45	AGS	HGC-27
1	5.87 ± 2.01	5.10 ± 1.93	2.90 ± 0.66
2	1.13 ± 0.68	0.73 ± 0.25	0.64 ± 0.40
3	2.77 ± 1.20	2.50 ± 1.06	1.40 ± 0.61

2.3.2 洗脱剂体积 称取 AB-8 型大孔树脂 100 g, 湿法装柱。取大蒜提取液 ($0.8 g \cdot mL^{-1}$) 3 份, 每份 162.5 mL, 按优选的吸附工艺上样, 用 4 BV 30% 乙醇以 $2 BV \cdot h^{-1}$ 洗脱除杂, 分段收集流出液, 每份 1 BV, 回收溶剂, 减压干燥, 计算出膏率; 继续用 7 BV 95% 乙醇以 $2 BV \cdot h^{-1}$ 洗脱, 分段收集流出液 (1~5 份, 每份 0.2 BV; 6~10 份, 每份 1 BV), 回收溶剂, 减压干燥, 计算出膏率, 并测定每份样品中总皂苷含量, 结果表明 3 BV 30% 乙醇可将 99% 杂质除去, 5 BV 95% 乙醇可将 97% 总皂苷洗脱完全。见图 4。

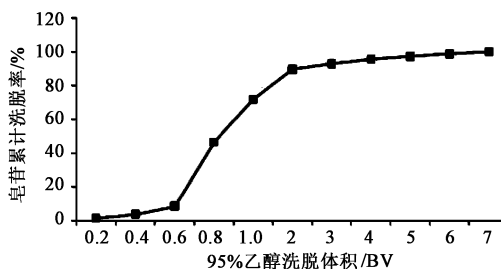


图4 95%乙醇对总皂苷洗脱率的影响

2.3.3 洗脱流速 称取 AB-8 型大孔树脂 100 g, 湿法装柱。取大蒜提取液 ($0.8 g \cdot mL^{-1}$) 3 份, 每份 162.5 mL, 按优选的吸附工艺上样, 用 3 BV 30% 乙醇以 $2 BV \cdot h^{-1}$ 流速除杂, 用 5 BV 95% 乙醇洗脱, 洗脱流速分别为 1, 2, 3, 4, 5 $BV \cdot h^{-1}$, 收集各流出液, 测定各样品中总皂苷含量, 计算总皂苷转移率分别为 27.34%, 29.16%, 29.28%, 28.97%, 25.92%, 表明以 3 $BV \cdot h^{-1}$ 洗脱时, 总皂苷转移率最高。

2.4 验证试验 取大蒜 3 份, 每份 150 g, 按优选的提取及纯化工艺进行试验, 减压回收, 测得样品中总皂苷质量分数分别为 65.51%, 65.31%, 69.19%, 说明该工艺稳定, 样品质量可控。

2.5 中试试验 称取大蒜 3 份, 每份 200 kg, 按优选的工艺进行中试试验, 结果 3 批样品中总皂苷质量分数分别为 70.81%, 69.14%, 76.91%, 表明优

选的纯化工艺稳定可行, 可推广使用。

3 讨论

采用静态法筛选大孔树脂型号时, 发现不同类型的大孔树脂吸附、解吸能力均有差别, 本试验以总皂苷转移率为评价树脂的吸附与解吸综合能力的指标。静态筛选结果显示, 非极性树脂 (D4020, HPD-100) 优于弱极性树脂 (DM-130, AB-8) 和极性树脂 (S-8, CD180)。前两类树脂的转移率很接近, 故还应取决于树脂的动态筛选结果, 因为动态筛选试验更符合树脂对样品纯化的实际过程。动态筛选结果显示, AB-8 型大孔树脂不仅能较好地吸附样品, 还能有效地解吸附, 故最终选择 AB-8 型大孔树脂。

[参考文献]

- [1] Matsuura H, Ushiroguchi T. Further studies on steroidal glycosides from bulbs, roots and leaves of *Allium sativum* L[J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(10):2741.
- [2] Nishino H, Yoshioka K, Iwashima A, et al. Glycyrrhetic acid inhibits tumor-promoting activity of teleocidin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two stage mouse skin carcinogenesis[J]. Jpn J Cancer Res, 1986, 77(1):33
- [3] Harwood H J, Chandler C E, Pellarin L D, et al. Pharmacologic consequences of cholesterol absorption inhibition: alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin b-tigogenin cellobioside (CP-88818; tiqueside) [J]. J Lipid Res, 1993, 34(3):377.
- [4] 薛欣, 张立石, 柏冬, 等. 大蒜 3 个有效部位联合应用对人胃癌 MKN45 细胞的杀伤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):152.
- [5] Harunobu Amagase. Clarifying the real bioactive constituents of garlic[J]. J Nutr, 2005, 136(3):716S.
- [6] 罗红, 高钮琪. 大蒜总皂苷的制备方法及其产品和应用. 中国:CN101474383[P], 2009-07-08.
- [7] 王瑞海, 柏冬, 刘丽梅. 大蒜总多糖、总皂苷的提取纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):60.
- [8] 柏冬, 王瑞海, 刘丽梅. 大蒜皂苷对照品的制备及比色法测定大蒜皂苷提取物中总皂苷的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(9):1.
- [9] 史作清, 施荣富. 吸附分离树脂在医药工业中的应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2008:49.

[责任编辑 全燕]