

大孔树脂富集纯化红毛五加中总苷类成分的工艺优选

李莹^{1,3}, 李艳丹¹, 刘圆^{1*}, 夏清²

(1. 西南民族大学民族医药研究所, 成都 610041; 2. 四川中医药高等专科学校药检系, 四川 绵阳 621000; 3. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 优选大孔树脂富集、纯化红毛五加中总苷类成分的工艺条件及参数。方法: 建立 RP-HPLC 测定红毛五加总苷类成分含量, 以紫丁香苷和齐墩果酸的洗脱率为指标, 考察 10 种不同型号大孔树脂富集、纯化总苷类成分的吸附性能和洗脱参数。结果: 选取 X-5 型大孔树脂, 优选的纯化工艺为红毛五加总苷提取液生药质量浓度 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 调节药液 pH 10, 用 4 BV 80% 乙醇洗脱。结论: X-5 型大孔树脂可很好地用于富集、纯化红毛五加总苷类成分。

[关键词] 红毛五加; 总苷类; 大孔树脂; 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0024-05

Optimization of Enrichment and Purification Technology for Total Glycosides from *Acanthopanax giraldii* by Macroporous Resin

LI Ying^{1,3}, LI Yan-dan¹, LIU Yuan^{1*}, XIA Qing²

(1. Ethnic Medicine Institute of Minority Pharmaceutical, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine Inspection, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang 621000, China; 3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize technology conditions and technical parameters of enrichment and purification process for total glycosides from *Acanthopanax giraldii* by macroporous resin. **Method:** A RP-HPLC method was adopted to determine the content of total glycosides in *A. giraldii* with elution ratio of syringin and oleanolic acid as indexes, adsorption characteristics and elution parameters of enrichment and purification technology were investigated from 10 kinds of macroporous resin. **Result:** X-5 was the best macroporous resin; Optimum purification technology was: the concentration of total glycosides extraction from *A. giraldii* $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH of liquid 10, eluted with 4 BV 80% ethanol. **Conclusion:** X-5 macroporous resin could be well used for enrichment and purification of total glycosides from *A. giraldii*.

[Key words] *Acanthopanax giraldii*; total glycosides (TGA); macroporous resin; RP-HPLC

红毛五加野生资源丰富, 在四川等地均有分布, 是我国特有植物, 在藏、羌族等 13 个民族医中均有药用^[1]。其功效为祛风除湿、强筋壮骨^[2]。红毛五加含有多糖、挥发油和苷类等多种活性成分, 现代药

理研究表明红毛五加总苷(TGA)具有抗炎、中枢抑制、抑制吗啡依赖动物的戒断反应、改善脑缺血所致大鼠学习记忆障碍等药理作用^[3-8], 故研究其有效成分的富集纯化十分必要。大孔树脂被广泛应用于

[收稿日期] 20120307(009)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAI27B07); 四川省科技支撑计划项目(2011SZ0233); 四川省中医药管理局科技专项(2008-32)

[第一作者] 李莹, 在读博士, 讲师, Tel: 15108474417, E-mail: liyiyidz@163.com

[通讯作者] *刘圆, 教授, 博士, 副院长, 从事少数民族药物的研究和教学, Tel: 028-85522322, E-mail: yuanliu163@yahoo.com.cn

天然活性物质的分离纯化领域,具有吸附性能好、对有机成分选择性较高、价格低廉、可再生利用等优点。本实验拟采用 RP-HPLC 测定洗脱液中紫丁香苷和齐墩果酸的含量,并以此 2 种成分为指标,通过对 10 种不同类型的大孔树脂富集、纯化红毛五加总苷类成分的吸附性能和洗脱参数进行研究,探索工艺流程,为传统多民族药材红毛五加的现代化研究和应用提供可参考的试验数据。

1 材料

2695 型高效液相色谱(美国 Waters, Empower 色谱工作站), AE240 型电子分析天平(梅特勒), Milli Q 超纯水机(美国 MILLIPORE), 紫丁香苷、齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 111574-200201, 10700-200304), 甲醇为色谱纯,水为 Milli-Q 级,其余试剂均为分析纯。

红毛五加药材样品采于四川省阿坝藏族羌族自治州小金县两河乡大板村,经刘圆教授鉴定为五加科五加属植物红毛五加 *Acanthopanax giraldii* Harms 的干燥茎皮。市售 AB-8, D101, DM130, HPD100 型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩), D-103, D101-I, D-102, H-103, X-5 型大孔吸附树脂(天津大钧科技), D140 型大孔吸附树脂(成都中蓝晨光化工研究院)。

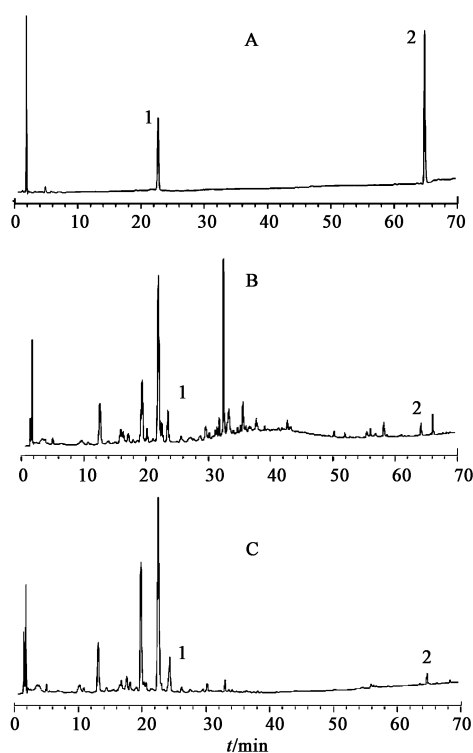
2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 Krosasil C₁₈ 色谱柱(Dikma 公司, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(基线 5% A, 0~10 min, 15% A; 10~22 min, 30% A; 22~35 min, 45% A; 35~50 min, 70% A; 50~70 min, 100% A), 检测波长 211 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 见图 1。

2.1.2 标准曲线的绘制 分别精密称取紫丁香苷和齐墩果酸对照品适量,置于同一量瓶中,用甲醇溶解并定容,使其质量浓度分别为 0.136, 0.314 g·mL⁻¹。分别精密量取上述对照品溶液 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 12 μL 进样,以峰面积积分值为纵坐标,进样量为横坐标,得紫丁香苷的回归方程 $Y = 3.3 \times 10^6 X - 582$ ($r = 0.9997$), 线性范围 0.034 1 ~ 1.636 8 μg; 齐墩果酸回归方程 $Y = 3.4 \times 10^6 X + 1005$ ($r = 0.9999$), 线性范围 0.078 6 ~ 3.770 μg。

2.1.3 供试品溶液的制备^[9] 称取红毛五加药材 100 g, 用 12 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液并减压回收乙醇至干, 残渣用热水溶解并放冷定容于 500 mL 量瓶中, 得 0.5 g·mL⁻¹ 的红毛



A. 对照品; B. 纯化分离前溶液; C. 纯化分离后溶液;
1. 紫丁香苷; 2. 齐墩果酸

图 1 红毛五加提取液 HPLC

五加粗总苷样品溶液。精密吸取 25 mL 上述样品溶液, 挥去溶剂, 用少量甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 备用。

2.2 大孔树脂预处理^[10-11] 分别称取 10 种大孔吸附树脂一定量, 用 95% 乙醇浸泡 24 h, 装柱, 用 95% 乙醇反复洗脱, 洗至洗脱液与水(1:5)混合不产生混浊, 用水反复洗脱至澄清, 且洗脱液无醇味, 用 2BV 5% HCl 溶液浸泡 2 h 后洗脱, 反复用水洗脱至洗脱液呈中性, 用 2 BV 2% NaOH 溶液浸泡 2 h 后洗脱, 用水洗脱至中性, 备用。

2.3 大孔树脂型号的筛选

2.3.1 静态吸附和解吸附

2.3.1.1 静态吸附 准确称取处理好的各种型号树脂 10 mL, 各 2 份, 置于具塞磨口锥形瓶中, 分别加入 25 mL 粗总苷样品溶液, 于室温下静置 24 h, 充分吸附后过滤, 按 2.1.1 项下色谱条件测定滤液中总苷浓度, 按式(1)计算吸附率。

2.3.1.2 静态解吸附 向滤去吸附液并达到吸附平衡的树脂中加入 50 mL 70% 乙醇, 室温下静置 12 h, 反复 3 次, 充分解吸附后滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件测定滤液中剩余总苷浓度, 按式(2)计算解吸附率(考虑到齐墩果酸含量规律性不强, 故以紫丁

香苷含量计), 结果见表 1。

$$\text{解吸附率 } E = (C_0 - C_e) / C_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{解吸附率 } J = C_1 V_1 / (C_0 - C_e) V \times 100\% \quad (2)$$

C_0 为吸附前质量浓度; C_e 为吸附后质量浓度; V 为吸附溶液体积; C_1 为解吸附后溶液质量浓度; V_1 为解吸附后溶液体积。

表 1 10 种大孔树脂对红毛五加中总苷类成分
吸附性能的比较 ($n=3$)

树脂类型	干树脂-湿树脂 / $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$E/\%$	$J/\%$
AB-8	0.264	76.76	33.44
D101	0.287	60.22	51.16
DM130	0.346	57.82	39.27
HPD100	0.332	73.37	47.45
D-103	0.222	61.27	50.35
D101-I	0.160	56.12	57.25
D102	0.304	58.16	48.29
H-103	0.218	59.52	25.48
X-5	0.162	65.20	63.28
D140	0.493	58.93	40.51

由表 1 结果可知, AB-8, HPD100 型树脂的吸附率较大, 而 D101-I 吸附率最小; X-5 型树脂解吸附率较大, H-103 解吸附率最小。综合考虑, 选择 AB-8, HPD100, X-5 型大孔树脂进一步筛选。

2.3.2 动态吸附和洗脱^[10-14]

2.3.2.1 动态吸附 选取处理好的 3 种树脂 (AB-8, HPD100, X-5 型大孔树脂) 各 10 mL, 置于玻璃柱内, 加红毛五加粗总苷样品溶液于柱顶, 以 $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行动态吸附, 流出液每 5 mL 收集 1 管, 测定紫丁香苷和齐墩果酸的含量, 结果见图 2。

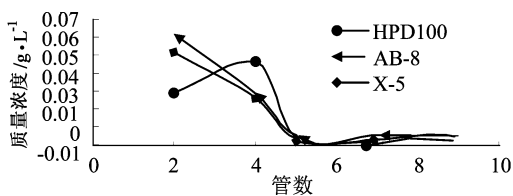


图 2 红毛五加中总苷类成分动态吸附曲线

2.3.2.2 动态洗脱 取处理好的树脂各 10 mL 于柱内, 将红毛五加粗总苷样品溶液加于柱顶, 以 $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行动态吸附, 同等流速下, 用 5 BV 水洗脱, 用 70% 乙醇洗脱, 流出液每 5 mL 收集 1 管, 测定紫丁香苷和齐墩果酸的含量, 结果见图 3。

由以上结果可知, X-5 型大孔树脂的动态吸附量和洗脱均较优于其他 2 种型号树脂, 故选择 X-5

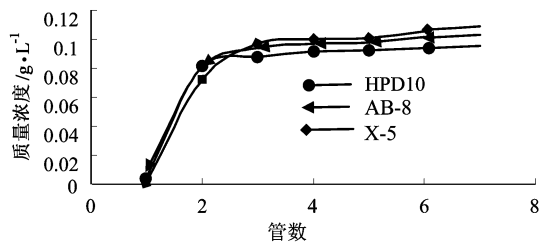


图 3 红毛五加中总苷类成分动态解析曲线

型大孔树脂。

2.4 纯化工艺优选

2.4.1 上样液浓度的考察^[14-16] 依次精密称取红毛五加药材 10, 20, 30, 48, 60, 120 g, 按 2.1.3 项下方法制备 500 mL 红毛五加粗总苷溶液 (生药质量浓度依次为 $0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.5, 1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。分别取 25 mL 溶液上 5 mL 大孔树脂柱, 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速吸附, 用 8 BV 蒸馏水洗脱, 用 10 BV 70% 乙醇冲洗, 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速收集乙醇洗脱液, 测定紫丁香苷和齐墩果酸含量, 结果见表 2。

表 2 红毛五加中总苷类成分大孔树脂纯化
工艺上样液质量浓度考察

上样液 质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	紫丁香苷 / $\times 10^{-3}$ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	紫丁香苷 转移率/ $\%$	齐墩果酸 / $\times 10^{-3}$ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	齐墩果酸 转移率/ $\%$
0.1	10.81	79.24	22.10	70.33
0.2	11.39	83.49	25.34	80.64
0.25	12.20	89.43	26.97	85.83
0.3	12.65	92.73	28.22	89.81
0.5	12.29	90.09	28.26	89.94
1.0	11.90	87.23	27.84	88.60

由表 2 结果可知, 宜采用上样液质量浓度 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.2 泄漏曲线的考察^[11-14] 取 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品溶液, 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样, 每 1 BV 为 1 个流份, 连续收集。检测, 以流出液体积为横坐标, 每份流出液中紫丁香苷和齐墩果酸质量浓度为纵坐标绘制泄露曲线, 结果见图 4。

由图 4 可知, 上样量达 7 BV 时紫丁香苷开始泄漏, 上样量 14 BV 时达到饱和; 上样量 8 BV 时齐墩果酸开始泄漏, 上样量 13 BV 时达到饱和, 综合考虑确定上样量为 1:7 (大孔树脂-生药量)。

2.4.3 上样量的考察 通过泄漏曲线考察确定最大上样量为 1:7, 进一步对上样量进行考察。取 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品溶液, 分别取处理好的 X-5 型大孔树脂 10 mL 装柱, 分别按 1, 3, 5, 7 BV 加入药液进行考

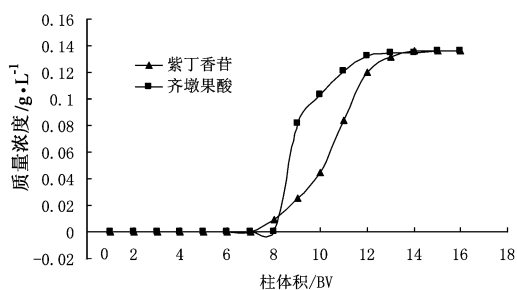


图4 红毛五加中总苷类成分泄露曲线

察,以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上柱,用 8 BV 蒸馏水洗脱,分别用 8,10,12,16 BV 70% 乙醇冲洗, $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速收集乙醇洗脱液,加 70% 乙醇定容至 16 BV,测定含量,结果紫丁香苷转移率分别为 21.11%, 83.27%, 91.25%, 51.94%; 齐墩果酸转移率依次为 56.01%, 88.26%, 92.67%, 59.65%。说明大孔树脂-生药量比例对紫丁香苷和齐墩果酸的影响均较大,上样量为 5 BV 时,紫丁香苷和齐墩果酸的转移率均达最大,故上样量选择 5 BV。

2.4.4 洗脱溶媒的考察^[15-17] 量取 15 mL 红毛五加粗总苷样品溶液于 10 mL 树脂中,依次用蒸馏水及体积分数为 30%, 50%, 70%, 80% 的乙醇各 100 mL 洗脱,分别收集各洗脱液,每 25 mL 收集 1 份,测定各洗脱液中紫丁香苷和齐墩果酸的含量,结果见图 5。

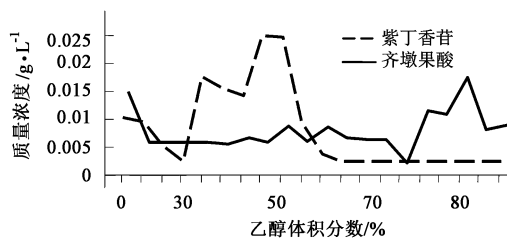


图5 洗脱溶媒浓度的影响曲线

由图 5 可知,50% 乙醇可把紫丁香苷基本洗脱干净;而齐墩果酸在用 80% 乙醇洗脱时仍存在,综合考虑,选择 80% 乙醇。

2.4.5 洗脱溶媒用量的考察^[14,16-18] 量取 30 mL 红毛五加粗总苷样品溶液于处理好的 20 mL 树脂柱上,以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上柱,加 4 BV 水洗,用 80% 乙醇洗脱,洗脱速度 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,洗脱液每 20 mL 收集 1 份,共收集 8 份,测定洗脱液中紫丁香苷和齐墩果酸的量,结果紫丁香苷含量分别为 0.62, 2.40, 0.56, 0.118, 0.042, 0.022, 0.016, 0.004 mg; 齐墩果酸含量依次为 0.078, 3.12, 5.48, 0.314, 0.027, 0.018, 0.001, 最后 1 份未检出。说明当洗脱量为 4 BV 时,95% 以上紫丁香苷和齐墩果酸均可洗脱下来,故选

择洗脱量为 4 BV。

2.4.6 上柱液 pH 考察^[12-15] 取处理好的大孔树脂 10 mL 装柱,用 HCl 和 NaOH 调节粗总苷样品溶液 (30 mL) pH 分别为 2,4,6,8,10,12,以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速重新吸附 2 次,吸附平衡后测定紫丁香苷和齐墩果酸的含量,按式(3)计算其吸附容量,结果紫丁香苷吸附容量分别为 0.45, 0.62, 1.01, 1.83, 2.32, 2.24 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 齐墩果酸吸附容量依次为 1.75, 2.35, 4.80, 5.46, 5.68, 5.71 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明上样液 pH 越大,紫丁香苷和齐墩果酸的吸附容量越大,pH 10 时,吸附容量基本保持不变,故最佳药液 pH 为 10。

$$\text{吸附容量 } Q = (C_0 - C_e) V / W \quad (3)$$

C_0 为吸附前质量浓度; C_e 为吸附后质量浓度; V 为吸附溶液体积; W 为干树脂质量。

2.4.7 树脂使用次数的影响及再生^[11,19-20] 树脂循环使用次数是评价树脂性能的一个重要参数,循环次数越多,成本节省越多。本试验中再生方法是先用 4% NaOH 浸泡 1 d,用蒸馏水冲洗至中性,再用 4% HCl 浸泡 1 d,用蒸馏水冲洗至中性,用(无水)95% 乙醇浸泡 2 d,用蒸馏水冲洗至无醇味。将装有 X-5 型大孔树脂的色谱柱反复进行吸附、洗脱,测定树脂对紫丁香苷和齐墩果酸的重复吸附能力。结果表明在连续使用 3 次后吸附率下降比较明显,故应每使用 3 次进行 1 次再生。

3 讨论

大孔树脂吸附药液中紫丁香苷和齐墩果酸两种指标成分时,药液质量浓度十分重要,在实际生产过程中,为提高生产效率且不造成浪费,上柱液以澄清、泄漏最少为宜。实验环境温度 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右,总苷粗提液温度在实验过程中不断下降,同时产生沉淀。本实验还考察了从 2.1.3 项下“残渣用热水溶解并放冷,定容于 500 mL 量瓶中”,分别于 4, 25 $^\circ\text{C}$ 下静置,使不溶性成分充分沉淀,再测定。发现在 25 $^\circ\text{C}$ 下静置 2 h 后取其上清液或减压滤过,通过树脂柱较适宜,对指标性成分含量无影响,且适合工业化大生产的条件。

从试验结果可知,pH 对大孔树脂的吸附影响较大,原因可能是紫丁香苷中的醇羟基和齐墩果酸中的羧基与碱发生反应,使二者更易进入洗脱液中。故在生产时应注意药液酸碱度的问题。由于时间关系,未对药液流速和大孔树脂中有机溶剂残留量进行考察。如将红毛五加的总苷成分进行新药开发,有机溶剂残留量检查就显得尤为重要。

[参考文献]

- [1] 贾敏如,李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:4.
- [2] 张艺,钟国跃. 羌族医药[M]. 北京:中国文史出版社,2005:247.
- [3] 党月兰,骆勤,李淑玉. 红毛五加总苷的抗炎作用[J]. 中药药理与临床,2000,16(1):14.
- [4] 邓虹珠,孙士勇,李淑玉. 红毛五加镇痛解热作用及毒性的实验观察[J]. 中国中药杂志,1994,19(1):38.
- [5] 党月兰,龚经纬. 红毛五加总苷的镇痛作用[J]. 中国药物依赖性杂志,1998,7(2):88.
- [6] 骆勤,王欣,党月兰. 红毛五加总苷的中枢镇静作用及对吗啡依赖性的影响[J]. 中国药物依赖性杂志,2000,9(2):97.
- [7] 王欣,鞠洋,骆勤,等. 红毛五加总苷对小鼠的抗缺氧作用及其机制[J]. 兰州大学学报:医学版,2008,34(4):41.
- [8] 王欣,鞠洋,焦海胜,等. 红毛五加总苷对脑缺血大鼠学习记忆障碍的影响[J]. 中华中医药杂志,2008,23(10):874.
- [9] 孟庆艳. 藏羌药材红毛五加的药学研究[D]. 成都:西南民族大学,2007.
- [10] 杜茂波,金日显,李军红,等. X-5 型大孔树脂纯化黄连巴布膏中黄连的工艺研究[J]. 中成药,2009,31(1):139.
- [11] 邵佳锋,刘树民,牟洪,等. 刺五加中紫丁香苷-刺五加苷 E 的大孔树脂分离纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):10.
- [12] 夏林波,李博,邓仕任,等. 大孔吸附树脂分离纯化羌花黄酮苷元工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):13.
- [13] Wan J B, Zhang Q W, Ye W C, et al. Quantification and separation of protopanaxatriol and protopanaxadiol type saponins from *Panax notoginseng* with macroporous resins[J]. Sep Purif Technol,2008(60):198.
- [14] Zhang B, Yang R Y, Zhao Y, et al. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins [J]. J Chromatography B, 2008, 867:253.
- [15] 张梅,宋芹,张洪彬. 大孔树脂富集、纯化仙茅总皂苷[J]. 华西药学杂志,2005,20(4):295.
- [16] Jia G T, Lu X Y. Enrichment and purification of madecassoside and asiaticoside from *Centella asiatica* extracts with macroporous resins [J]. J Chromatography A, 2008(1193):136.
- [17] Gao M, Huang W, Liu C Z. Separation of scutellarin from crude extracts of *Erigeron breviscapus* (vant.) Hand. Mazz. by macroporous resins[J]. J Chromatography B, 2007,858:22.
- [18] Fu Y J, Zu Y G, Li S M, et al. Separation of 7-xylosyl-10-deacetyl paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III from the remainder extracts free of paclitaxel using macroporous resins [J]. J Chromatography A, 2008, 1177:77.
- [19] 万里翔,杨小生,侯大斌. 大孔树脂 D-101、X-5、AB-8 对乌头总碱的纯化工艺[J]. 湖北农业科学,2008,47(6):711.
- [20] 李文兰,王艳萍,季宇彬,等. X-5 大孔树脂纯化新乌头碱和乌头总碱[J]. 中国中药杂志,2007,32(5):396.

[责任编辑 全燕]