

正交设计法优选酸枣仁皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺

杨军宣^{1*}, 吴天骄², 尹蓉莉³, 李东芬³

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016; 2. 四川迪康科技药业股份有限公司, 成都 610041;
3. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:**比较不同型号大孔吸附树脂对酸枣仁皂苷的纯化效果,并优选其纯化工艺。**方法:**以酸枣仁皂苷 A 为指标成分, HPLC-ELSD 测定指标成分含量。通过静态吸附法和动态吸附法优选大孔树脂型号, 采用正交试验和单因素试验考察其纯化工艺。**结果:**酸枣仁皂苷 A 在 0.216 ~ 2.16 μg 与峰面积成良好线性关系, 平均加样回收率为 95.77%, RSD 0.71%。ADS-7 型大孔吸附树脂能有效除去色素, 纯化效果最好, 其优化纯化工艺为柱高径比 3:1, 药液质量浓度 1.0 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 吸附速度 1.0 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 树脂生药吸附量 0.4 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 洗脱溶媒 70% 乙醇, 洗脱速度 2 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 洗脱溶媒用量 4 BV。**结论:** ADS-7 型大孔吸附树脂对酸枣仁皂苷 A 纯化效果较好, 工艺稳定可行, 可用于工业化生产。

[关键词] 正交设计; 酸枣仁; 大孔吸附树脂; 纯化工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0063-04

Optimization of Purification Technology for Saponins from *Ziziphus jujube* with Macroporous Adsorption Resin by Orthogonal Test

YANG Jun-xuan^{1*}, WU Tian-jiao², YIN Rong-li³, LI Dong-fen³

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
2. Sichuan Dikang Technology Pharmaceutical Co. Ltd, Chengdu 610041, China;
3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To compare purification effect of saponins from *Ziziphus jujube* with different types of macroporous adsorption resin, and to optimize its purification technology. **Method:** With jujuboside A as index, the content of it was determined by HPLC-ELSD. Types of macroporous resin were optimized by static adsorption and dynamic adsorption method, purification technology of it was investigated by orthogonal test and single factors test. **Result:** For jujuboside A, there was a good linear relationship in the range of 0.216-2.16 μg , average recovery was 95.77%, RSD was 0.71%. ADS-7 macroporous resin could effectively remove pigment with better purification effect of total saponins than other resins, optimum technological parameters were: column height-diameter ratio of 3:1, the concentration of liquid 1.0 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, absorption velocity 1.0 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, resin adsorption quantity 0.4 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, elution solvent 70% ethanol, elution speed 2 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, elution solvent volume 4 BV. **Conclusion:** ADS-7 macroporous resin had a good purification effect on jujuboside A, optimized technology was stable, feasible, it could be used for industrial production.

[Key words] orthogonal design; *Ziziphus jujube*; macroporous adsorption resin; purification technology

大孔吸附树脂是一类新型非离子型高分子化合物,目前已广发应用于天然药物成分的分离和纯化,其影响纯化效果的主要因素有树脂类型、吸附容量、

洗脱溶剂等^[1]。酸枣仁具有养心补肝、宁心安神、敛汗、生津的功效,常用于虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗、津伤口渴等症的治疗^[2]。现代研究表明,酸枣仁主要含有皂苷、黄酮、蛋白质、挥发油等成分,具有镇静、降低体温、抗心肌缺血等作用^[3],其在现代临床中的应用日益广泛。大孔吸附树脂纯化酸枣仁

[收稿日期] 20120108(009)

[通讯作者] * 杨军宣, 博士, 工程师, 从事中药新制剂研究,
Tel:023-65712064, E-mail:yjxhawk@sina.com

总皂苷已见研究报道^[4-5], 笔者通过验证试验表明结果差异较大, 且所得提取物不稳定, 吸湿性较强, 色泽较深, 影响其在制剂中进一步应用。本试验通过比较研究 5 种不同型号大孔吸附树脂对酸枣仁皂苷的提取纯化效果, 为酸枣仁的进一步研究开发及大孔吸附树脂在天然药物纯化工艺中的应用提供参考。

1 材料

P680 型高效液相色谱仪 (TCC-10 型柱温箱, ASI-100 型自动进样器, ZAM4000 型蒸发光散射检测器, 美国戴安), StartoriusBP211D 型电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), Phenomenex luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣), QYC-200 型恒温摇床 (上海珂淮仪器有限公司), D101, AB-8, HPD-100, ADS-7 型大孔吸附树脂 (沧州宝恩吸附材料科技有限公司), SP 700 型大孔吸附树脂 (日本三菱公司), 酸枣仁皂苷 A 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110734-200509, 供含量测定用), 乙腈为色谱纯, 水为双蒸水, 其余试剂均为市售分析纯。

酸枣仁药材, 购于成都市荷花池中药材市场 (大丰), 经成都中医药大学尹蓉莉教授鉴定为酸枣仁 *Ziziphus jujube* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 含量测定 采用 HPLC 测定酸枣仁皂苷 A 含量, 按《中国药典》2010 年版一部酸枣仁药材项下方法操作。

2.1.1 色谱条件 Phenomenex luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-水 (B) 进行梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 20% ~ 40% A; 15 ~ 28 min, 40% A; 28 ~ 30 min, 40% ~ 70% A; 30 ~ 32 min, 70% ~ 100% A), 理论塔板数按酸枣仁皂苷 A 峰计算应不低于 2 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取酸枣仁皂苷 A 对照品适量, 加甲醇制成质量浓度 0.1 g·L⁻¹ 的溶液, 即得。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取酸枣仁皂苷 A 对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μL 进样, 测定峰面积, 以酸枣仁皂苷 A 量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程 $Y = 16.025 1X - 1.401 3$ ($r = 0.999 9$), 表明酸枣仁皂苷 A 在 0.216 ~ 2.16 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.4 供试品溶液制备 精密称定药材粉末 (过

四号筛) 约 1 g, 置索氏提取器中, 加石油醚 (60 ~ 90 °C) 适量, 加热回流 4 h, 弃去石油醚液, 药渣挥干溶剂, 置锥形瓶中, 加入 70% 乙醇 20 mL, 加热回流 2 h, 滤过, 滤渣用 70% 乙醇 5 mL 洗涤, 合并洗液与滤液, 挥干, 残渣加甲醇溶解, 定容至 5 mL, 即得。

2.1.5 回收率试验 精密称取药材粉末 5 份, 每份 0.5 g, 分别加入酸枣仁皂苷 A 对照品溶液 (0.108 g·L⁻¹) 2 mL, 按 2.1.4 项下方法制备供试品溶液, 测定, 结果见表 1。计算平均加样回收率为 95.77%, RSD 0.71%。

表 1 酸枣仁皂苷 A 加样回收率试验

No.	药材中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.277 8	0.216	0.483 3	95.13		
2	0.280 3	0.216	0.487 9	96.11		
3	0.275 9	0.216	0.481 9	95.37	95.77	0.71
4	0.281 1	0.216	0.490 7	97.04		
5	0.279 3	0.216	0.484 9	95.19		

2.1.6 药材含量测定 取药材适量, 粉碎, 分别称取 3 份, 每份 1 g, 精密称定, 按 2.1.4 项下方法制备供试品溶液, 测定, 计算药材质量分数, 得平均值为 0.056%, RSD 1.13%。

2.2 上柱样品药液的制备 取酸枣仁药材 3 kg, 加 8 倍量水煎煮提取 2 次, 每次 1.5 h, 合并水提液, 80 °C 浓缩至生药质量浓度 0.5 g·mL⁻¹, 滤过, 加乙醇至含醇体积分数为 60%, 放置过夜, 滤过, 回收乙醇, 得 3 000 mL 药液, 备用 (酸枣仁皂苷 A 含量 0.43 g·L⁻¹)。

2.3 大孔吸附树脂型号选择 根据酸枣仁皂苷 A 的理化性质, 参考文献 [4-5], 选用 D101, AB-8, HPD-100, ADS-7, SP 700 等 5 种型号大孔吸附树脂进行试验。取不能通过 65 目药典筛的大孔吸附树脂, 按树脂说明书方法预处理, 备用。

2.3.1 比吸附量考察 取上柱药液 5 份, 每份 200 mL, 分别加入大孔吸附树脂 10 g, 25 °C 振荡 24 h (频率 60 次/min), 滤过, 测定滤液中酸枣仁皂苷 A 含量, 按下列公式计算比吸附量。结果分别为 6.64, 5.21, 6.83, 6.77, 6.19 mg·g⁻¹。

$$\text{比吸附量} = \frac{\text{吸附前药液中的量} - \text{吸附后药液中的量}}{\text{树脂量}}$$

由结果可知, D101, HPD-100, ADS-7 型大孔吸附树脂对酸枣仁皂苷 A 的比吸附量均高于 AB-8, SP 700 型树脂, 有待于进一步筛选。

2.3.2 比上柱量和洗脱率考察 取上柱药液 3 份,每份 200 mL,分别加入含 D101,HPD-100,ADS-7 型大孔吸附树脂各 10 g 的树脂床中(流速 1.0 BV·h⁻¹),待吸附完毕,水洗至近无色,用 50% 乙醇洗脱(流速 2 BV·h⁻¹),至流出液近无色(约 9 BV),测定流出液(含水洗液)和乙醇洗脱液中酸枣仁皂苷 A 的含量,分别按下列公式计算比上柱量和洗脱率。

$$\text{比上柱量} = \frac{\text{吸附前药液中的量} - \text{吸附流出液中的量}}{\text{树脂量}}$$

$$\text{洗脱率} = \frac{\text{洗脱量}}{\text{吸附量}} \times 100\%$$

结果 3 种大孔吸附树脂对酸枣仁皂苷 A 的比上柱量分别为 5.94,5.73,5.81 mg·g⁻¹,洗脱率分别为 87.15%,85.42%,85.56%。结果表明三者之间无显著性差异。水浴挥干 3 种树脂的乙醇洗脱部位,减压干燥。结果 D101 型大孔树脂所得提取物干燥时间较长(约 16 h),干浸膏棕褐色,呈块状黏附于蒸发皿底部,不易取出,室温放置过夜,明显吸潮;ADS-7 型大孔树脂所得提取物干燥时间最短(约 9 h),干浸膏色呈浅黄色,薄片状黏附于蒸发皿底部,易取出,室温放置过夜,无明显吸潮现象。综合考虑,选择 ADS-7 型大孔吸附树脂纯化酸枣仁皂苷。

2.4 纯化工艺优选

2.4.1 比体积测定 取 ADS-7 型大孔吸附树脂 3 份,每份 10 g,分别湿法装入 100 mL 量筒中,测定体积,计算平均比体积为 1.62 mL·g⁻¹,RSD 0.55%。

2.4.2 柱高径比、药液质量浓度及吸附速度的优选 按 L₉(3⁴) 正交设计表进行试验,以酸枣仁皂苷 A 保留率为评价指标,因素水平设计及试验结果见表 2~4。

$$\text{保留率} = \frac{\text{洗脱液中酸枣仁皂苷 A 质量浓度}}{\text{上柱样品溶液中酸枣仁皂苷 A 质量浓度}} \times \text{体积} \times 100\%$$

表 2 ADS-7 型树脂柱高径比、药液质量浓度及吸附速度优选正交试验因素水平

水平	A 柱高径比	B 药液质量浓度 /g·mL ⁻¹	C 吸附速度 /BV·h ⁻¹
1	3:1	0.25	1.0
2	6:1	0.5	2.0
3	9:1	1.0	3.0

由直观分析结果可知,各因素影响大小顺序为 C>A>B。方差分析结果表明,C 为主要影响因素,具有显著性差异,A,B 因素无显著性差异。结合大生产实际情况,确定最优方案为 A₁B₃C₁,即柱高径

表 3 ADS-7 型树脂柱高径比、药液质量浓度及吸附速度优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	保留率/%
1	1	1	1	1	83.12
2	1	2	2	2	80.63
3	1	3	3	3	63.54
4	2	1	2	3	81.05
5	2	2	3	1	69.36
6	2	3	1	2	85.75
7	3	1	3	2	71.59
8	3	2	1	3	89.02
9	3	3	2	1	82.23
K ₁	227.29	235.76	257.89	234.71	
K ₂	236.16	239.01	243.91	237.97	
K ₃	242.84	231.52	204.49	233.61	
R	5.18	2.50	17.80	1.45	

表 4 保留率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	40.57	2	20.29	11.83	
B	9.41	2	4.70	2.74	
C	511.22	2	255.61	74.52	<0.05
D(误差)	3.43	2	1.72	1.0	

注:F_{0.05}(2,2)=19.0;F_{0.01}(2,2)=99.0。

比 3:1,药液质量浓度为 1.0 g·mL⁻¹,吸附速度为 1.0 BV·h⁻¹。

2.4.3 生药吸附量考察 按上述优化条件,取上柱药液 200 mL,加入含 ADS-7 型树脂 50 g 的树脂床中,分段收集吸附流出液(2 mL/段),测定流出液中的酸枣仁皂苷 A 的含量。以流份编号为横坐标,酸枣仁皂苷 A 的质量浓度为纵坐标,绘制泄漏曲线,结果见图 1。

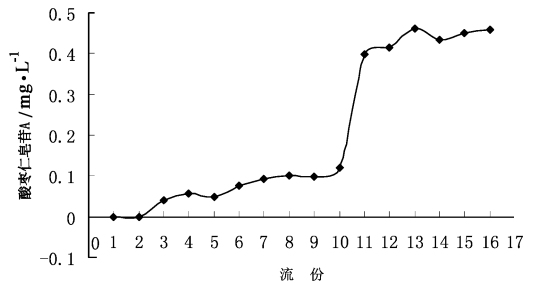


图 1 酸枣仁皂苷 A 在 ADS-7 大孔吸附树脂上的泄漏曲线

由图 1 可知,流份 1~10 中,酸枣仁皂苷 A 含量变化不明显,流份 11 中酸枣仁皂苷 A 含量骤增,明显表现出泄漏现象。故 ADS-7 型大孔吸附树脂的

最佳生药吸附量为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.4.4 洗脱溶媒考察 按上述优化条件,取上柱药液 20 mL 进行试验,待吸附完毕,依次用水,10% 乙醇,30% 乙醇,50% 乙醇,70% 乙醇,90% 乙醇洗脱(流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$),收集各洗脱液 5 BV,测定酸枣仁皂苷 A 的洗脱量,计算累积洗脱率分别为 14.2%, 20.1%, 38.0%, 84.0%, 91.4%, 93.1。结果表明,70% 乙醇可洗脱 90% 以上酸枣仁皂苷 A,故确定洗脱溶媒为 70% 乙醇。

2.4.5 洗脱速度考察 取上柱药液 3 份,每份 20 mL,按上述优化条件进行试验。吸附完毕后,用 70% 乙醇洗脱,洗脱流速分别为 0.5, 1, 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$,洗脱完全(洗脱液蒸发光散射检测无明显色谱峰)。结果 70% 乙醇用量分别为 2.8(耗时约 6 h), 3.6(耗时约 3.5 h), 4.2 BV(耗时约 2 h)。从节约生产成本,提高生产效率考虑,将洗脱速度确定为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.4.6 洗脱溶媒用量考察 取上柱药液 20 mL,按上述优化条件进行试验。待吸附完毕后,用 70% 乙醇洗脱,洗脱速度为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,分段收集洗脱液(20 mL/段),共计 30 份。测定洗脱液中酸枣仁皂苷 A 含量,以流份编号为横坐标,洗脱液中酸枣仁皂苷 A 的质量为纵坐标,绘制洗脱曲线(图 2)。

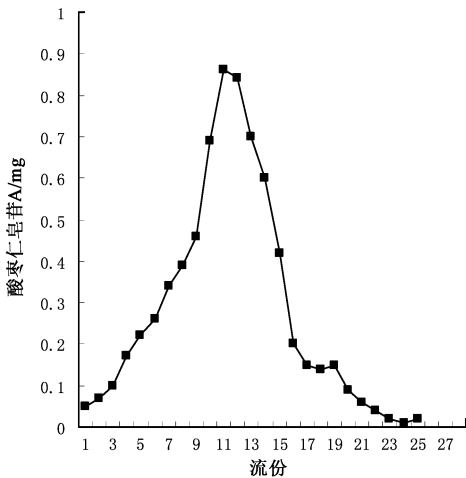


图 2 酸枣仁皂苷 A 在 ADS-7 大孔吸附树脂上的洗脱曲线

由图 2 可知,第 23 流份后的洗脱液中含酸枣仁皂苷 A 极少,前 23 个流份已基本将酸枣仁皂苷 A 洗脱完全。按每段流份 20 mL 计算,溶媒用量为 460 mL,约 3.3 BV。故确定洗脱溶媒用量为 4 BV 即可。

综上所述,ADS-7 型大孔吸附树脂纯化酸枣仁皂苷的优化条件为柱高径比 3:1,药液质量浓度 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,吸附速度为 $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,树脂生药处理量(饱和吸附量)为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,洗脱溶媒为 70% 乙醇,洗脱速度为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,洗脱溶媒用量 4 BV。

2.5 验证试验 按优选纯化工工艺条件进行 3 次验证试验,结果酸枣仁皂苷 A 平均得量为 7.21 mg (RSD 2.20%),平均洗脱率为 92.37%,平均保留率为 89.65%。结果表明工艺稳定可靠。本方法操作简便、提取率高,可用于酸枣仁皂苷的工业化生产,有利于酸枣仁药材的进一步开发利用。

3 讨论

酸枣仁所含化学成分较复杂,药材水提液中含有大量杂质,若直接上树脂,易堵塞树脂,影响纯化效果,缩短树脂寿命。故样品必须先通过预处理。研究表明,60% 乙醇沉淀处理即可除去大部分杂质,满足大孔吸附树脂的要求。若在提取之前,进行压榨除去油脂后再提取处理,效果会更好。

目前,纯化酸枣仁皂苷多采用乙醚脱脂、正丁醇萃取等传统方法,存在安全及环保问题;采用 D101 型大孔吸附树脂纯化酸枣仁总皂苷,所得提取物不稳定,吸湿性较强,色泽较深,影响其在制剂中的进一步应用^[6]。ADS-7 型大孔吸附树脂具有吸附及脱色双重功能,用于纯化酸枣仁总皂苷,能有效除去色素,增强提取物的抗吸湿性。

采用紫外检测器测定酸枣仁总皂苷 A 含量,吸收波长为末端吸收(205 nm),通过预试,结果表明方法分离度及重复性较差^[7]。本文采用参考文献[8]及《中国药典》2010 版一部方法建立的酸枣仁总皂苷 A 含量测定法。

[参考文献]

- [1] 董珂. 大孔树脂技术在中药研究中的应用概述[J]. 药学实践杂志, 2006, 24(1): 13.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010: 343.
- [3] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 4585.
- [4] 李果, 王静, 李祖伦. 大孔吸附树脂纯化酸枣仁皂苷工艺研究[J]. 中国药房, 2006, 17(15): 1191.
- [5] 丁轲, 崔莹, 陆晶晶, 等. SP700 大孔树脂纯化酸枣仁中三萜总皂苷的研究[J]. 离子交换与吸附, 2011, 27(1): 33.
- [6] 王锋, 刘雪松, 陈勇, 等. 酸枣仁皂苷大孔树脂纯化工艺及 HPLC-ELCD 测定方法研究[J]. 中药材, 2010, 33(8): 1343.
- [7] 高家荣, 周丽, 韩燕全, 等. HPLC 法测定酸枣仁与五味子配伍前后酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 38.
- [8] 王燕, 柴程芝, 朱丹妮. HPLC-ELSD 测定 GSSM 颗粒中酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 76.

[责任编辑 全燕]