

土贝母总皂苷大孔树脂分离纯化工艺优选

王常灵¹, 朱翔¹, 傅延龄^{2*}, 胡凯文³, 安超³, 倪胜楼², 韩立炜^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学国际学院, 北京 100029;
3. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

[摘要] 目的: 优选大孔树脂分离纯化土贝母总皂苷的工艺条件。方法: 以吸附量和解吸率为考察指标, 通过静态和动态试验比较不同型号大孔树脂对土贝母总皂苷的分离纯化性能, 选出最佳树脂并对其纯化工艺进行优选。结果: HPD-750型树脂对土贝母总皂苷有较好的吸附分离性能, 最佳工艺条件为树脂径高比为1:5, 上样液质量浓度 $1.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最大上样量为13 mL, 1 BV水洗除杂, 8 BV 95%乙醇洗脱, 吸附和洗脱流速均为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 收集洗脱液, 回收乙醇至干, 采用紫外分光光度法检测总皂苷质量分数为63.53%。结论: 该优选工艺简单易行, 能较好地分离纯化土贝母总皂苷。

[关键词] 土贝母; 总皂苷; 大孔树脂; 分离纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0028-04

Optimization of Separation and Purification Process for Total Saponins from *Bolbostemma paniculatum* with Macroporous Resin

WANG Chang-ling¹, ZHU Xiang¹, FU Yan-ling^{2*}, HU Kai-wen³, AN Chao³, NI Sheng-lou², HAN Li-wei^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. International School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Orient Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification process parameters of total saponins from *Bolbostemma paniculatum* by macroporous resin. **Method:** With absorption and desorption rate of total saponins as indexes, separation and purification performance of macroporous resin on total saponins from *B. paniculatum* was compared by static and dynamic test, optimum resin was selected and its purification technology was optimized. **Result:** HPD-750 macroporous resin showed the best property for purification of total saponins. its optimal process conditions were: diameter-height ratio 1:5, the concentration of sample solution $1.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, maximum sample volume 13 mL, eluted by 1 BV water and 8 BV 95% ethanol, flow rate of adsorption and elution $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, eluent were collected, ethanol was recovered, under these conditions, the content of total saponins was 63.53% by UV. **Conclusion:** This optimized process was simple and feasible to separate and purify total saponins from *B. paniculatum* effectively.

[Key words] *Bolbostemma paniculatum*; total saponins; macroporous resin; separation and purification

土贝母性味苦、微寒, 具有清热解毒、消肿散结之功效, 主治乳痈、瘰疬痰核、疮疡肿毒等。土贝母中主要含有三萜皂苷、甾醇、生物碱^[1-4]等成分, 其中

三萜皂苷是其主要活性成分^[5]。现代有研究表明土贝母在抗癌^[6]、抗病毒^[7]、抗炎^[8]、免疫抑制^[9]等方面有显著药理活性, 且土贝母总皂苷是其抗癌的

[收稿日期] 20120127(001)

[基金项目] 国际科技合作项目(2009DFA31490); 国际科技合作项目(2009DFA31490); 北京中医药大学复方中药制药研究创新团队(2011-CXTD-13)

[第一作者] 王常灵, 硕士, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-84739451, E-mail: changling19870317@163.com

[通讯作者] * 傅延龄, 博士, 教授, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738616, E-mail: bjhlw@126.com;

* 韩立炜, 博士, 教授, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738616, E-mail: bjhlw@126.com

主要活性部位。本实验对大孔树脂分离纯化土贝母总皂苷的工艺进行了优选。

1 材料

岛津 Prominence LC-20A 型高效液相色谱仪(四元泵, SIL-20A 自动进样器, SPD-20A 型 UV-VIS 检测器, 日本岛津仪器公司), SP-752 型紫外-可见分光光度计(上海光谱), BBT224S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), PF206 型电热鼓风干燥箱(北京医疗设备二厂)。

土贝母药材购于河北省安国市, 经北京中医药大学王文全教授鉴定为葫芦科植物土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet, 土贝母苷甲对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111536-200304), 葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110833-200503), D101, NKA, HPD-722, HPD-750, NKA-9, HPD-600 型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司), 甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 上柱液的制备 根据前期研究结果^[10], 取土贝母药材, 加 4 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 回收乙醇, 用水溶解过滤即得。

2.2 土贝母苷甲含量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(63:37), 检测波长 214 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。

2.2.2 标准曲线制备 精密称取 2.6 mg 土贝母苷甲对照品, 置 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 摇匀,

备用。分别精密量取质量浓度为 0.180 4 g·L⁻¹ 土贝母苷甲对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL, 按 2.2.1 项下方法进样, 以土贝母苷甲峰面积(Y)对进样质量(X)进行线性回归, 回归方程 $Y = 131\ 859X - 560.54$ ($r = 1.000$), 表明在 0.360 8 ~ 5.412 μg 线性关系良好。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密称取土贝母(过 60 目)0.3 g 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 称定质量, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤 25 mL, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解并定容至 50 mL, 摇匀。即得。

2.2.4 精密度试验 精密量取土贝母苷甲对照品溶液 10 μL, 按 2.2.1 项下方法重复进样 6 次, 测得峰面积 RSD 1.36%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密量取按 2.2.3 项下方法新配制的供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按 2.2.1 项下方法测定, 结果峰面积 RSD 2.03%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 取同一批土贝母 6 份, 每份约 0.3 g, 精密称定。按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 并按 2.2.1 项下方法测定, 计算土贝母苷甲平均含量为 2.57%, RSD 1.20%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已知土贝母苷甲含量的土贝母 6 份, 精密加入一定量的土贝母苷甲对照品溶液。按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下方法测定。计算土贝母苷甲的平均回收率。结果见表 1。

表 1 土贝母苷甲加样回收率试验($n = 6$)

No.	称样量/mg	已知量/mg	加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	150.3	3.863	4.096	8.033	101.81		
2	150.2	3.860	4.096	7.969	100.32		
3	150.6	3.870	4.096	7.981	100.37		
4	150.3	3.863	4.096	7.953	99.85	101.16	1.68
5	150.7	3.873	4.096	8.147	104.35		
6	150.5	3.868	4.096	7.974	100.24		

2.3 土贝母总皂苷含量测定 按文献[11]建立的土贝母总皂苷含量测定方法, 在 531 nm 下进行测定。

2.4 不同型号树脂筛选

2.4.1 树脂预处理 取 D101, NKA, HPD-722, HPD-750, NKA-9, HPD-600 等型号的大孔树脂用 95% 乙醇浸泡 48 h, 使其充分溶胀。用适量 95% 乙醇加热回流, 至乙醇经全波长扫描吸收为零, 用水洗净树脂中的乙醇, 湿态下贮存, 备用。

2.4.2 含水量测定 由于湿态下保存的各种树脂含水量不同, 为保证试验精确性, 对 6 种湿态树脂进行含水量测定。分别精密称取处理好的 6 种型号湿态树脂, 按照 2010 年版《中国药典》一部附录 IX H 水分测定法第一法(烘干法)进行测定。结果含水量分别为 68.23%, 65.64%, 70.36%, 72.81%, 70.29%, 72.67%。

2.4.3 静态试验 精密称取预处理过的大孔吸附树脂各 1 g, 置具塞锥形瓶中, 每份加入 0.1 g·mL⁻¹

样品溶液 100 mL, 25 °C 振荡 24 h。充分吸附后, 吸取上清液, 经 UV 及 HPLC 分析树脂饱和和吸附后的吸余液。按下列公式计算各型号树脂的饱和吸附量。

$$\text{饱和吸附量} = (\text{初始质量浓度} - \text{吸附后质量浓度}) \times \text{吸附液体积} / \text{树脂干重}$$

$$\text{初始样品量} = \text{初始质量浓度} \times \text{吸附液体积}$$

将上述已吸附好的树脂滤去吸余液, 加适量水洗, 加 80% 乙醇溶液 100 mL, 25 °C 振荡解析 24 h, 吸取上清液 10 mL, 蒸干后加甲醇定容于 10 mL 量瓶。经 UV 及 HPLC 测定分析解析液, 按下式计算解吸率。结果见表 2。

$$\text{解吸率} = [\text{解吸液质量浓度} \times \text{解吸液体积}] / \text{饱和吸附量} \times 100\%$$

表 2 6 种型号大孔树脂静态吸附-解析试验 (n = 2)

树脂型号	土贝母苷甲		土贝母总皂苷	
	饱和吸附量 /mg·g ⁻¹	解吸率 /%	饱和吸附量 /mg·g ⁻¹	解吸率 /%
DI01	126.71	97.20	282.78	92.13
NKA	116.36	95.25	252.23	88.23
HPD-722	145.78	97.02	352.71	82.56
HPD-750	160.37	97.10	360.81	83.56
NKA-9	106.56	98.05	234.71	89.85
HPD-600	122.30	96.19	236.95	101.31

表 2 结果表明, HPD-722, HPD-750 型树脂对土贝母苷甲和总皂苷的静态饱和吸附量及解吸率较大, 其余树脂吸附解吸能力较小, 故进一步对 HPD-722, HPD-750 两种大孔吸附树脂进行动态吸附解析考察。

2.4.4 动态试验 精密称取 3 g 处理好的 HPD-750, HPD-722 型树脂装柱 (1.5 cm × 20 cm, 1 BV = 5 mL), 用水洗脱, 取 100 mL 一定质量浓度的样品溶液, 以 0.5 mL·min⁻¹ 的流速过柱, 收集流出液。经 UV 及 HPLC 测定流出液中总皂苷及苷甲含量, 计算树脂对土贝母总皂苷的动态吸附量分别为 323.60, 268.45 mg·g⁻¹; 苷甲吸附量分别为 131.76, 122.78 mg·g⁻¹。

将上述已吸附好的树脂, 加适量水洗, 用 80% 乙醇溶液 70 mL, 以流速 1 mL·min⁻¹ 洗脱, 收集洗脱液。经 UV 及 HPLC 测定解析液中总皂苷和苷甲含量, 计算总皂苷动态解吸率分别为 93.45%, 90.52%; 苷甲动态解吸率分别为 96.56%, 87.98%。结果表明, HPD-750 型树脂对苷甲及总皂苷的吸附、解析能力都要优于 HPD-722 型树脂, 且 HPD-750 型树脂前处理耗时少, 故选取 HPD-750 型树脂进行土贝母总皂苷的分离与纯化优选。

2.5 分离纯化工艺考察

2.5.1 上样液质量浓度考察 取处理好的 HPD-750 型树脂 18 mL, 湿法装柱 (1.5 cm × 30 cm), 将质量浓度分别为 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 g·mL⁻¹ 的土贝母药液以 1 mL·min⁻¹ 的速度上样, 计算的总皂苷比吸附量依次为 50.99, 67.49, 86.51, 91.40 g·L⁻¹; 苷甲比吸附量依次为 14.28, 14.38, 13.73, 14.74 g·L⁻¹。由结果可知, 上样液质量浓度对苷甲比吸附量无显著影响, 而总皂苷比吸附量随上样液质量浓度的增加而增加, 当升高到 1.6 g·mL⁻¹ 时增加缓慢。故选择 1.6 g·mL⁻¹ 为上样液质量浓度。

2.5.2 吸附流速考察 取处理好 HPD-750 型树脂 18 mL, 湿法装柱, 将质量浓度为 1.6 g·mL⁻¹ 的土贝母药液分别以 0.5, 1, 2 mL·min⁻¹ 速度上样, 结果苷甲比吸附量依次为 14.32, 14.74, 12.30 g·L⁻¹; 总皂苷比吸附量分别为 82.28, 91.40, 83.63 g·L⁻¹。故选择吸附流速为 1 mL·min⁻¹。

2.5.3 径高比考察 取处理好 HPD-750 型树脂, 装于同一型号的 3 根树脂柱上 (1.5 cm × 30 cm), 使其径高比分别为 1:5, 1:7, 1:9, 将质量浓度为 1.6 g·mL⁻¹ 土贝母药液以 1 mL·min⁻¹ 速度上样, 计算总皂苷比吸附量依次为 94.97, 87.88, 77.46 g·L⁻¹; 苷甲比吸附量依次为 15.72, 13.68, 10.97 g·L⁻¹。用 80% 乙醇以 1 mL·min⁻¹ 速度洗脱, 收集洗脱液, 计算苷甲洗脱率依次为 95.99%, 96.29%, 98.20%; 总皂苷洗脱率依次为 49.46%, 53.45%, 55.36%。故选取 1:5 为最佳径高比。

2.5.4 泄漏曲线考察 取处理好 HPD-750 型树脂湿法装柱 (1.5 cm × 30 cm), 径高比为 1:5。将质量浓度 1.6 g·mL⁻¹ 土贝母药液以 1 mL·min⁻¹ 速度上样。分段收集流出液, 每 0.5 BV 为 1 份, 测定其中苷甲质量浓度分别为 0, 0.41, 1.34, 2.05, 3.03 g·L⁻¹, 总皂苷质量浓度分别 0, 9.5, 31.8, 44.1, 48.9 g·L⁻¹。由结果可知, 质量浓度为 1.6 g·mL⁻¹ 的上样液随着上样体积逐渐增大, 泄漏量逐渐增多。故确定最佳上样体积为 1 BV, 即 1.6 g·mL⁻¹ 树脂。

2.5.5 洗脱剂浓度考察 取处理好 HPD-750 型树脂按上述最佳条件装柱、上样, 加适量水洗脱, 分别用 5 BV 体积分数分别为 60%, 80%, 95% 的乙醇以 1 mL·min⁻¹ 速度洗脱, 收集洗脱液, 测定其苷甲质量分数分别为 23.42%, 23.14%, 21.33%; 总皂苷质量分数分别为 64.83%, 63.59%, 68.65%。苷甲洗脱率依次为 73.19%, 77.53%, 72.10%; 总皂苷洗脱率依次为 24.11%, 25.15%, 27.81%。综合考

虑,选择95%乙醇为洗脱剂。

2.5.6 水洗倍数考察

2.5.6.1 水洗倍数对多糖洗脱量影响考察 按上述优选方法上样,以 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度水洗除杂质。每1 BV 收集1次,测定其中多糖含量,以葡萄糖为对照品,采用苯酚硫酸法测定^[12]。结果见表3。

表3 水洗倍数对多糖洗脱量影响考察($n=2$)

水洗倍数/BV	多糖质量/mg	累计洗脱率/%
1	677.35	87.54
2	81.20	98.02
3	6.63	98.87
4	2.69	99.22
5	1.75	99.44
6	1.24	99.61
7	0.99	99.73
8	0.80	99.84
9	0.69	99.92
10	0.59	100.00

由表2结果可知,1 BV 可洗下87%多糖,2 BV 可洗下来98%的多糖。

2.5.6.2 水洗倍数对皂苷洗脱量影响考察 按上述方法上样,分别用0.5,1,2 BV 水洗除杂,用5 BV 95%乙醇以 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度洗脱,收集洗脱液,测定其中苷甲质量分数分别为9.88%,16.31%,21.33%;总皂苷质量分数依次为53.91%,60.03%,68.65%。由结果可知,水洗倍数应选择1 BV。

2.5.7 洗脱流速考察 上样方法同前,加1 BV 水洗除杂,用5 BV 95%乙醇分别以1,2,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度洗脱,收集洗脱液,测定其中苷甲质量依次为74.67,71.16,62.87 mg;总皂苷质量依次为283.42,265.97,272.21 mg。故选取 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度洗脱。

2.5.8 洗脱曲线考察 上样方法同前,用1 BV 水洗除杂,用10 BV 95%乙醇以 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度洗脱,收集洗脱液,每1 BV 收集1次,测定其中苷甲和总皂苷浓度。结果见图1。

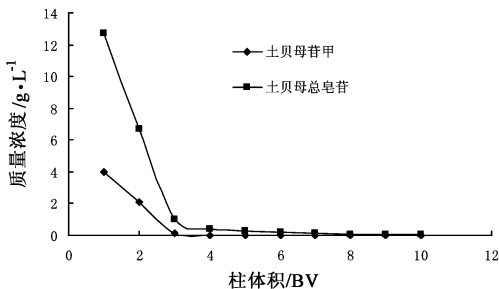


图1 土贝母总皂苷及苷甲洗脱曲线

由图1可知,4 BV 即可将苷甲解析完全,8 BV 可将总皂苷解析完全。综合考虑乙醇洗脱用量应选择8 BV。

2.5.9 验证试验 按上述优选的工艺条件,即选取径高比1:5的HPD-750型树脂,上样液质量浓度为 $1.6\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,吸附流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,1 BV 水洗,8 BV 95%乙醇以 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速洗脱,平行操作2份,回收乙醇,真空干燥,计算出膏率分别为2.24%,2.08%;土贝母总皂苷质量分数依次为64.02%,63.04%;苷甲质量分数依次为17.42%,17.21%。说明该工艺分离纯化土贝母总皂苷稳定可行。

3 讨论

试验证明中等极性HPD-750型树脂对土贝母总皂苷有较好的吸附解析性能,达到了良好分离纯化效果,且纯化工艺简单、稳定可行,适合工业生产。试验过程中,水洗除杂时土贝母总皂苷有一定的损失,提示土贝母总皂苷类物质中存在极易溶于水的成分,故有必要对土贝母总皂苷的组成成分做进一步研究。

[参考文献]

- [1] 金鹏飞,郑春辉,裴月湖. 中药土贝母研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2003,20(2):152.
- [2] 刘文庸,张伟光,张卫东,等. 土贝母化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(10):953.
- [3] 郑春辉,付红伟,裴月湖. 土贝母化学成分的分与鉴定[J]. 中国药物化学杂志,2005,15(5):291.
- [4] LIU Wen yong, ZHANG Wei dong, CHEN Hai sheng, et al. Pyrrole alkaloids from *Bolbostemma paniculatum*[J]. J Asian Nat Prod Res,2003,3(5):159.
- [5] 王梅,范亚刚,高文分. RP-HPLC 梯度洗脱法同时测定三七总皂苷及血塞通注射液中3种皂苷的含量[J]. 药物分析杂志,2000,20(6):410.
- [6] 李石兰,陆应麟,蔡朱勇. 土贝母注射液的毒性初步试验[J]. 陕西中医学院学报,1981(1):16.
- [7] 周艳萌,吴中明,向晓波. 土贝母皂苷体外抗乙型肝炎病毒的药效研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(11):2134.
- [8] 马润娣,于立坚,王永清. 土贝母苷甲抗肿瘤活性的研究[J]. 中国肿瘤临床,1994,21(6):46.
- [9] 李萍. 土贝母对宫颈癌的实验研究[J]. 山东中医学院学报,1983(1):96.
- [10] 王常灵,朱翔,傅延龄,等. 正交试验法优选土贝母总皂苷提取工艺[G]. 北京:中华中医药学会制剂分会学术年会,2011:105.
- [11] 魏有良,陈志兴,党世创. 土贝母皂苷原料及其注射液中土贝母总皂苷的含量测定[J]. 中国现代应用药学杂志,1999,16(1):41.
- [12] 徐丽媛,李志猛,杨蕾,等. 菟丝子多糖含量测定方法的研究[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(8):548.

[责任编辑 全燕]