

大孔树脂纯化盾叶薯蓣总皂苷的工艺研究

王光忠*, 张 明, 葛如斌, 刘伟伟

(湖北中医学院“中药资源与中药复方”省部共建教育部重点实验室, 湖北 武汉 430065)

[摘要] 目的: 研究盾叶薯蓣总皂苷的大孔树脂分离纯化工艺, 为盾叶薯蓣总皂苷的工业化生产提供参考。方法: 采用 AB-8 树脂对盾叶薯蓣总皂苷进行吸附纯化, 以总皂苷的收率、质量分数为考察指标综合评价。结果: 优选纯化工艺为, 上样液的浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吸附流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 树脂径高比 1: 8; 洗脱剂为 80% 乙醇, 用量 6 BV, 洗脱流速 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结论: 盾叶薯蓣提取物通过 AB-8 树脂柱, 水洗脱后以 80% 乙醇洗脱盾叶薯蓣总皂苷部位, 可使总皂苷的收率和质量分数达到较满意效果。

[关键词] 盾叶薯蓣; 总皂苷; 大孔树脂; 纯化

[中图分类号] R286.3 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)05-0025-03

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 为薯蓣科多年生缠绕性草本植物, 又名黄姜, 为我国特有种, 资源丰富。盾叶薯蓣的主要活性部位为薯蓣皂苷, 具有多种的生物活性, 特别是在抗肿瘤、免疫调节、抗炎、抗血脂等方面引起了人们的广泛重视^[1]。本研究在提取工艺研究^[2]的基础上, 对盾叶薯蓣总皂苷的纯化工艺进行了较系统研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 日本岛津 UV-2401 紫外分光光度计; 超声波清洗机(中国华南超声波设备厂) BP-211D 型十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司); 薯蓣皂苷对照品购于中国药品生物制品检定所, 批号: 111707-200501; 盾叶薯蓣购自湖北十堰市, 经湖北中医学院张秀桥副教授鉴定为薯蓣科植物盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 的根茎; D-101 树脂购于天津海光化工有限公司, SP-825、HP-20、SP-70 购于北京慧德易科技责任有限公司, AB-8 购于南开大学化工厂, ADS-7 购于天津南开和成科技有限公司; 乙醇为化学纯, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总皂苷含量测定^[3]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取薯蓣皂苷对照品 5.22 mg 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇

匀, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 取盾叶薯蓣醇提物的水溶液适量, 经大孔树脂纯化、乙醇洗脱得到洗脱液, 置 100 mL 量瓶中, 加 80% 乙醇至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.1.3 标准曲线制备 精密吸取上述对照品溶液 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mL 于 10 mL 具塞试管中, 挥尽溶剂, 分别精密加入 5 mL 高氯酸, 于 70 °C 水浴 15 min, 冰水冷却后, 在 407 nm 波长处测定吸光度, 以薯蓣皂苷对照品的浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明, 薯蓣皂苷在 $5.22 \sim 41.76 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸光度(A)呈良好的线性关系。回归方程为: $A = 0.0222C + 0.0006$, $r = 0.9996$ 。

2.1.4 样品的测定 分别精密吸取对照品溶液 0.2 mL、供试品溶液 0.3 mL 置 10 mL 具塞试管中, 按“2.1.3”项下方法测定吸光度, 并计算总皂苷含量。

2.2 大孔树脂的筛选

2.2.1 树脂的预处理 将 D-101、SP-825、HP-20、SP-70、AB-8、ADS-7 大孔树脂, 用 95% 的乙醇浸泡 24 h, 湿法装柱。用乙醇洗至洗出液加水不显浑浊为止, 改用水洗, 直至无醇味, 用水浸泡备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取盾叶薯蓣 2 kg, 粉成粗粒, 以 8 倍药材质量的 80% 乙醇回流提取 2 次(2 h, 1 h), 合并提取液, 减压回收乙醇至无醇味, 补充适量水至 4 000 mL, 使每 mL 相当于 0.5 g 生药, 即得供试品溶液。

2.2.3 大孔树脂的静态筛选 分别称取已处理 D-

[收稿日期] 2008-07-28

[基金项目] 湖北省教育厅重点项目(D200516012)

[通讯作者] * 王光忠, Tel: (027) 88920834, E-mail: wgzhong4067@sina.com

101 SP-825 HP-20 SP-70 AB-8 ADS-7 各 10 g, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 盾叶薯蓣提取液 60 mL, 密塞。于震荡器中震荡 24 h (震荡频率为 $140\sim 150 \text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$), 滤出大孔树脂, 测定滤液中总皂苷浓度, 用 60 mL 蒸馏水分次洗涤, 抽滤至不滴水为止, 加入 95% 乙醇 60 mL, 密塞, 同上述条件震荡 24 h, 滤出大孔树脂, 测定 95% 醇洗液中总皂苷含量, 计算各种树脂的吸附量、解吸附量以及解吸附率。结果见表 1。

表 1 6 种树脂静态饱和吸附量测定结果

| 树脂种类 | 极性 | 吸附量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) | 解吸附量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) | 解吸附率 (%) |
|--------|-----|---------------------------------------|----------------------------------------|----------|
| D-101 | 非极性 | 52.16 | 42.08 | 80.67 |
| SP-825 | 非极性 | 65.69 | 58.86 | 89.60 |
| HP-20 | 非极性 | 59.96 | 46.78 | 78.02 |
| SP-70 | 非极性 | 44.05 | 39.36 | 89.36 |
| AB-8 | 弱极性 | 71.36 | 64.59 | 90.51 |
| ADS-7 | 强极性 | 58.66 | 52.32 | 89.19 |

2.2.4 大孔树脂的动态筛选 分别称取已处理树脂 D-101 SP-825 HP-20 SP-70 AB-8 ADS-7 各 10 g, 湿法装柱, 精密加入浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 盾叶薯蓣提取液 60 mL, 进行动态吸附。先用蒸馏水 60 mL 洗脱, 再用 95% 乙醇 60 mL 洗脱, 计算比上柱量、比吸附量、比洗脱量。结果见表 2。

表 2 6 种大孔树脂动态筛选结果表

| 树脂种类 | 比上柱量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) | 比吸附量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) | 比洗脱量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) | 醇洗物中总皂苷含量 (%) |
|--------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|---------------|
| D-101 | 52.34 | 43.59 | 42.68 | 58.24 |
| SP-825 | 62.16 | 56.16 | 48.93 | 60.21 |
| HP-20 | 58.98 | 51.04 | 44.68 | 50.55 |
| SP-70 | 43.16 | 39.11 | 33.07 | 53.54 |
| AB-8 | 68.15 | 62.38 | 58.26 | 66.23 |
| ADS-7 | 51.91 | 48.06 | 44.16 | 59.38 |

注: 比上柱量 = $(M_{\text{上}} - M_{\text{残}})/M$, 比吸附量 = $(M_{\text{上}} - M_{\text{残}} - M_{\text{水洗}})/M$, 比洗脱量 = $M_{\text{醇洗}}/M$, M 为上柱树脂质量, $M_{\text{上}}$ 为上样液中总皂苷的质量, $M_{\text{残}}$ 为上柱后流出液中总皂苷的质量, $M_{\text{水洗}}$ 为水洗脱下来总皂苷的质量。

大孔树脂的静态和动态筛选结果表明, AB-8 树脂对薯蓣总皂苷具有较好吸附和解吸附性能, 而且得到的提取物中含量也较高, 所以最终选用 AB-8 树脂。

2.3 AB-8 大孔树脂纯化工艺研究

2.3.1 上样浓度的考察 精密量取浓度为 $1.0 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 盾叶薯蓣提取液 25 mL, 共 5 份, 分别用蒸馏水

稀释至浓度为 $0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液后上大孔树脂柱, 以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速吸附, 继用 6 BV 蒸馏水以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速冲脱, 弃去, 再用 6 BV 80% 乙醇以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 洗脱, 收集洗脱液, 定容至 100 mL, 测吸光度, 计算总皂苷的含量, 分别为 $5.1784, 5.8194, 5.8197, 5.6694, 5.5780 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果表明, 当上样浓度为 $0.25\sim 0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 得到总皂苷含量基本一致, 综合考虑, 采用 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的上样浓度。

2.3.2 吸附流速的考察 精密量取浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 盾叶薯蓣提取液 50 mL, 共 5 份, 上大孔树脂柱, 分别以 $1, 2, 3, 4, 5 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速吸附, 继用 6 BV 蒸馏水以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速冲脱, 弃去, 再用 6 BV 80% 乙醇以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 洗脱, 收集洗脱液, 定容至 100 mL, 测吸光度, 计算总皂苷的含量, 分别为 $5.4829, 5.6273, 5.2314, 5.0392, 4.8932 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果表明, 当吸附流速为 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 时, 醇洗液中总皂苷含量最高, 故采用的吸附流速为 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.3.3 径高比考察 取 10 g AB-8 树脂分别填充于 3 根 Φ 不同的柱中, 径高比分别为 $1:4, 1:8, 1:12$ 。精密量取浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 盾叶薯蓣提取液 50 mL, 共 3 份, 分别通过上述大孔树脂柱, 以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速吸附, 先用 6 BV 蒸馏水以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速冲脱, 弃去, 继用 6 BV 80% 乙醇以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 洗脱, 收集洗脱液, 定容至 100 mL, 测吸光度, 计算总皂苷的含量, 分别为 $5.3064, 5.8460, 5.3921 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果表明, 较理想的径高比为 $1:8$ 。

2.3.4 泄漏曲线考察 取浓度 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液, 以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速上样, 以每 10 mL 为一个流分, 连续接取。对流分进行检测, 以流出液体积为横坐标, 以每份流出液中的总皂苷浓度为纵坐标绘制泄漏曲线, 结果见图 1。

根据泄漏曲线可知上药液到 40 mL 时, 上样液开始泄漏; 上样药液到 110 mL 时树脂达到饱和。最终确定上样量为 $1:2.5$ (大孔树脂/生药)。

2.3.5 水洗量的考察 取浓度 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液 50 mL, 以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂柱, 进行动态吸附, 然后用水洗, 按每 10 mL 为 1 份收集水洗流出液, 用 Molish 反应检测, 测定水洗液中干膏重量, 并结合 Liebermann 反应以指示洗脱终点, 结果表明, 当用水量为 60 mL, 水溶性杂质已基本全部洗出, 故确定 60 mL 即 6 BV 水为洗脱终点。

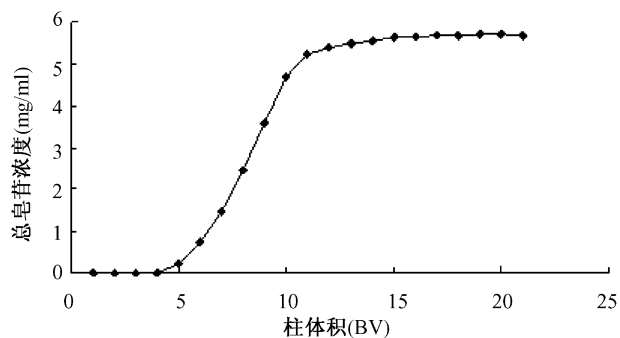


图 1 泄漏曲线

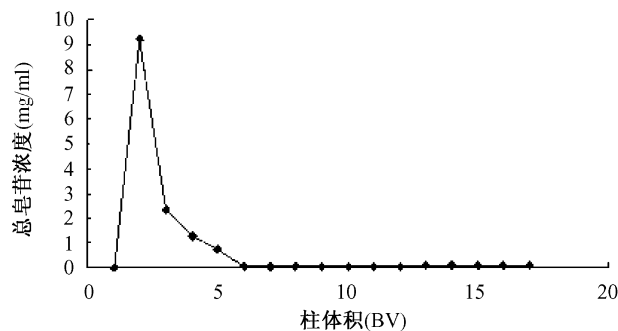


图 2 洗脱曲线

2.3.6 洗脱剂浓度的考察 按上述所确定的吸附条件,取上样液分别通过 5 根 AB-8 树脂柱,进行动态吸附,分别用 20%、40%、60%、80%、95% 的乙醇 60 mL 进行洗脱,收集洗脱液,测定总皂苷含量和提取物重量,计算提取物中总皂苷含量。结果见表 3。

表 3 洗脱剂考察结果

| 乙醇浓度(%) | 总皂苷量(mg) | 提取物中总皂苷含量(%) |
|---------|----------|--------------|
| 20 | 209.5 | 58.26 |
| 40 | 331.8 | 60.26 |
| 60 | 538.0 | 63.46 |
| 80 | 570.2 | 68.94 |
| 95 | 523.0 | 61.93 |

从表 3 可以看出,以 80% 的乙醇作为洗脱剂较为合适。

2.3.7 洗脱流速的考察 按上述所确定的吸附条件,取上样液分别通过 3 根 AB-8 树脂柱,进行动态吸附,分别 2, 3, 4 $BV \cdot h^{-1}$ 的洗脱流速进行洗脱,收集洗脱液,测定总皂苷含量和提取物重量,计算提取物中总皂苷含量。结果见表 4。

表 4 洗脱流速考察结果

| 流速($BV \cdot h^{-1}$) | 总皂苷量(mg) | 提取物中总皂苷含量(%) |
|-------------------------|----------|--------------|
| 2 | 546.8 | 68.34 |
| 3 | 558.2 | 70.65 |
| 4 | 536.4 | 67.39 |

从表 4 可以看出,以 3 $BV \cdot h^{-1}$ 的洗脱流速洗脱较为合适。

2.3.8 洗脱曲线的考察 将盾叶薯蓣提取液按照上述所确定的吸附和洗脱条件,进行上柱、吸附和洗脱,以每 10 mL 为一个流分,连续接取。对流分进行检测,以流出液体积为横坐标,以每份流出液中的总皂苷浓度为纵坐标绘制泄漏曲线,结果见图 2。

从洗脱曲线可知,用 60 mL 乙醇即可将总皂苷基本上解吸下来。

2.4 验证实验 按上述实验得出的优选纯化工艺条件进行 3 次验证实验,结果重复性较好,表明优选

纯化工艺稳定可行。结果见表 5。

表 5 验证实验结果

| 实验号 | 总皂苷量(mg) | 提取物中总皂苷含量(%) | 收率(%) |
|-----|----------|--------------|-------|
| 1 | 591.4 | 68.61 | 3.45 |
| 2 | 588.7 | 70.08 | 3.36 |
| 3 | 576.4 | 69.32 | 3.33 |

3 讨论

AB-8 树脂是一种弱极性聚合吸附剂,该树脂对皂苷类成分有特殊的选择性,适合从水溶液中提取纯化皂苷类成分。本研究通过对不同树脂的静态和动态筛选,进一步证明了 AB-8 树脂对盾叶薯蓣皂苷具有较好吸附和解吸附性能。

采用单因素实验法得到总皂苷最终纯化工艺为:上样液的浓度为 $0.5 g \cdot mL^{-1}$,药材:树脂为 2.5:1,树脂径高比 1:8,吸附流速 $2 BV \cdot h^{-1}$,吸附后先用 6 BV 水以 $3 BV \cdot h^{-1}$ 的流速洗去水溶性杂质,继用 80% 乙醇以 $3 BV \cdot h^{-1}$ 的流速洗脱,收集 6 BV 80% 乙醇洗脱液,回收乙醇,浓缩物 $60^{\circ}C$ 真空干燥,得盾叶薯蓣总皂苷提取物,含量可达 68% 以上。

采用盾叶薯蓣总皂苷水解提取皂素,可以大量减少酸的用量,产生的污染少。同时,盾叶薯蓣经提取总皂苷后,其他成分还可以综合利用,以免造成资源浪费。

[参考文献]

[1] 王晓鹏,陆 羨. 薯蓣皂苷生物活性研究新进展[J]. 国外医学中医中药分册, 2004, 26(3): 138-140.
 [2] 王光忠,张 明,夏 兵,等. 正交设计法优选盾叶薯蓣总皂苷的提取工艺[J]. 中国药师, 2007, 10(10): 998-999.
 [3] 王光忠,刘伟伟,葛如斌,等. 分光光度法测定盾叶薯蓣总皂苷的含量[J]. 湖北中医学院学报, 2008, 10(2): 47-48.