

大孔吸附树脂纯化远志总皂苷工艺研究

刘友平, 万德光, 鄢 丹, 彭 成
(成都中医药大学, 四川 成都 611730)

摘要: 目的: 研究大孔吸附树脂纯化远志总皂苷的工艺条件及参数。方法: 以远志总皂苷的洗脱率、精制度为指标, 考察大孔吸附树脂对远志总皂苷的吸附性能和洗脱参数。结果: 12mL 远志总皂苷样品液(生药 0.25g/mL) 上大孔吸附树脂柱(Φ15mm × H90mm, 干重 2.5g), 用蒸馏水、30% 乙醇、70% 乙醇各 3BV 依次洗脱, 远志总皂苷富集于 70% 乙醇洗脱液部位。结论: 通过大孔吸附树脂富集与纯化, 远志总皂苷洗脱率为 89.8%, 精制度为 239.6%。该法可较好地纯化远志总皂苷。

关键词: 大孔吸附树脂; 纯化; 远志; 总皂苷

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)06-0003-04

Studies on Purification of Saponins from Radix Polygalae with Macroporous Resin

LIU You-ping, WAN De-Guang, YAN Dan, PENG Cheng
(Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

Abstract: Objectives: To study the technological parameters of purifying saponin with macroporous resin. Method: With the elution rate and purity as indexes, the absorption characteristics and elution parameters were studied. Result: 12 mL of the extractive of Radix Polygalae (crude drugs 0.25g/mL) was added on a column of macroporous resin (Φ15mm × H 90mm, dry weight 2.5g) and was washed with 3BV of distilled water, 30% ethanol and 70% ethanol, successively. Saponin was enriched in the 70% ethanol elution. Conclusion: Enriched and purified by macroporous resin, the elution rate of saponin was 89.8% and the purity reached 239.6%. So, the established method is feasible.

Key words: Macroporous resin; Purification; Radix Polygalae; Saponins

远志为常用中药, 始载于《神农本草经》, 列为上品。具有安神益智、祛痰、消肿之功, 常用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘、惊悸、咳痰不爽、疮痈肿毒、乳房肿痛等^[1]。远志主要含有远志总皂苷、口山酮、生物碱、糖及低聚糖酯、脂肪油等, 其中远志总皂苷为镇静、祛痰的有效部位^[2]。本文对大孔吸附树脂纯化远志总皂苷的工艺条件进行了研究。

大孔吸附树脂是一类新型非离子型高分子化合物, 近年来在药学领域(特别是天然药物精制)中应用日益广泛, 成为纯化中药有效成分的一种有效方法。已有利用大孔吸附树脂对中药黄芪、三七等皂苷类成分纯化的报道^[3,4], 但未见对远志皂苷类成分纯化的相关报道。影响其纯化效果的主要因素如树脂类型、吸附容量、洗脱溶剂等常因纯化物质的理化性质不同而有所不同^[5]。本实验以吸附容量、洗脱率、固形物量、精制度为评价指标, 研究大孔吸附树

脂纯化远志总皂苷的工艺条件与参数。

1 仪器与材料

6010 紫外-可见分光光度计(安捷伦科技上海有限公司), BP211D 电子天平(德国赛多利斯股份有限公司); 远志药材为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根(2002 年 10 月购于陕西省合阳县, 经成都中医药大学中药鉴定教研室万德光教授鉴定), 去羟基远志皂苷元对照品(自制), 纯度 > 98%; D₁₀₁、D₂₀₁、D₃₀₁ 大孔吸附树脂(天津农药厂), D₁₄₀、D_{141A} 大孔吸附树脂(晨光化工研究院); 所用试剂均为分析纯(成都化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 远志总皂苷含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取去羟基远志皂苷元对照品 5.78mg, 置 10mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1mL 含去羟基远志皂苷元对照品 0.578mg)。

2.1.2 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液 20、40、60、80、100μL 于 5 支具塞磨口试管中, 水浴加热挥去溶剂, 于每支试管中分别精密加入加 1.0mL 5% 香兰素试剂 4.0mL 高氯酸, 密塞, 摇匀, 于 60℃ 水浴恒温加热 15min, 取出后立即用冰水浴冷却 2~3min, 于 560nm 波长处测定吸收度, 随行试剂作空白参比, 以吸收度 A 为纵坐标, 去羟基远志皂苷元的质量(μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 并经回归处理, 得回归方程为 $Y = 0.0172X - 0.0073$ ($r = 0.9994$), 说明吸收度 A 与去羟基皂苷元质量在 11.56~57.80 μg 范围内有良好的线性关系(5% 香兰素试剂配制: 称取 500 mg 香兰素溶于 10.0mL 冰醋酸中, 即得, 需新鲜配制)。

2.1.3 供试品溶液的制备及总皂苷含量测定 称取远志粉末(过三号筛)约 62.5g[同时另取本品粉末测定水分(《中国药典》二〇〇〇年版一部附录 IX H 第一法)], 精密称定, 加 4 倍量 85% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 小时, 得远志总皂苷乙醇提取液, 回收乙醇至无醇味, 加 150mL 水溶解, 水饱和的醋酸乙酯萃取 3 次, 每次 80mL, 弃去醋酸乙酯层, 合并水层, 并转移置 250mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液(每 1mL 相当于含原生药量 0.25g)。精密吸取供试品溶液 10μL 于具塞磨口试管内, 水浴加热挥去溶剂, 按“2.1.2 标准曲线的制备”项下操作, 并以标准曲线法计算, 远志总皂苷浓度以去羟基远志皂苷元计为 4.38mg/mL ($n = 3$, RSD = 1.76%)。

2.2 工艺参数考察与优化

2.2.1 大孔吸附树脂预处理与再生 分别称取 D₁₀₁、D₂₀₁、D₃₀₁、D₁₄₀、D_{141A} 大孔吸附树脂各 2.5g(干重), 以乙醇湿法装柱(Φ15mm × H90mm), 用乙醇洗脱, 检测流出的乙醇液, 当流出的乙醇液与水(2:1)混合不呈白色混浊时即可, 蒸馏水洗至无醇味; 再生时可先用 10% 氢氧化钠溶液或 10% 盐酸洗脱后, 再按预处理的方法进行处理。

2.2.2 大孔吸附树脂类型的选择 大孔吸附树脂常因类型不同, 比表面积、孔径、极性差异较大, 由此决定的吸附容量也有较大的差异。本实验以吸附容量为指标, 对 D₁₀₁、D₂₀₁、D₃₀₁、D₁₄₀、D_{141A} 大孔吸附树脂吸附进行考察, 以确定纯化远志总皂苷的大孔吸附树脂类型。各类大孔吸附树脂物理性能见表 1。

精密吸取供试品溶液各 20mL 分别上样于经预处理的不同类型树脂柱内, 预吸附 2h, 流速 1BV/h (BV 为柱床体积), 过柱流出液重吸附 1 次, 收集流份。测定流份中远志总皂苷含量, 计算吸附容量, 结果见表 2。

表 1 各类大孔吸附树脂物理性能

树脂型号	厂名	极性	比表面(m ² /g)	平均孔径(nm)
D ₁₀₁	天津农药厂	非极性	400	30
D ₂₀₁	天津农药厂	弱极性	150	30
D ₃₀₁	天津农药厂	中极性	330	19
D ₁₄₀	晨光化工研究院	弱极性	500~600	95
D _{141A}	晨光化工研究院	非极性	500~600	80

表 2 各类大孔吸附树脂吸附容量

树脂型号	上注液中总皂甙量(mg)	过柱液中总皂甙量(mg)	树脂吸附量(mg)	吸附容量(mg)
D ₁₀₁	87.60	35.04	52.56	21.02
D ₂₀₁	87.60	50.37	37.23	14.89
D ₃₀₁	87.60	63.51	24.09	9.64
D ₁₄₀	87.60	43.80	43.80	17.18
D _{141A}	87.60	54.75	32.85	13.14

注: 吸附容量 = (上柱液中总皂苷量 - 过柱液中总皂苷量) / 干树脂量

由表 2 可知, D₁₀₁ 大孔吸附树脂吸附容量较大, 2.5g(干重) D₁₀₁ 大孔吸附树脂可吸附远志总皂苷 52.56mg, 相当于供试品溶液 12mL, 故选择 D₁₀₁ 大孔吸附树脂纯化远志总皂苷。

2.2.3 洗脱溶媒的确定 精密吸取供试品溶液(生药 0.25g/mL) 12mL 依法上柱, 依次用蒸馏水 3BV, 30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇各 4BV 洗脱, 洗脱速度 1BV/h, 按以 1BV/份收集流份。测定

各流份中远志总皂苷含量, 计算洗脱率并测定固形物量(见表 3)。以收集流份数为横坐标, 洗脱率为纵坐标绘制洗脱曲线(见图 1)。

结果表明, 50% 乙醇和 70% 乙醇洗脱部位为总皂苷类成分的主要存在部位, 且 70% 乙醇洗脱能力强于 50% 乙醇, 故确定以 70% 乙醇作为远志总皂苷类成分的洗脱溶媒; 蒸馏水 30% 乙醇洗脱时均有一定量的固形物存在, 说明蒸馏水 30% 乙醇洗脱达到了除杂的目的, 同时蒸馏水洗脱流份 Molish 反应呈

阳性, 进一步证实蒸馏水洗脱可除去糖类成分, 从而纯化了总皂苷类成分。

2.2.4 洗脱溶媒用量的确定 精密吸取供试品溶液(生药 0.25g/mL) 12 mL 依法上柱, 依次用蒸馏水 3BV, 30% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇各 4BV 洗脱, 洗脱速度 1BV/h, 以 1BV/份收集流份。测定各流份中远志总皂苷含量, 计算洗脱率并测定固形物量(见表 4)。以收集流份数为横坐标, 洗脱率为纵坐标绘制洗脱曲线(见图 2)。

表 3 不同浓度乙醇洗脱试验数据

洗脱溶媒	1BV			2BV			3BV			4BV		
	固形物量(mg)	洗脱液中总皂甙量(mg)	洗脱率(%)	固形物量(mg)	洗脱液中总皂甙量(mg)	洗脱率(%)	固形物量(mg)	洗脱液中总皂甙量(mg)	洗脱率(%)	固形物量(mg)	洗脱液中总皂甙量(mg)	洗脱率(%)
蒸馏水洗脱	48.5	4.36	8.3	12.3	1.47	2.8	2.1	—	—	—	—	—
30% 乙醇洗脱	52.0	—	—	50.1	—	—	50.2	—	—	62.9	1.00	1.9
50% 乙醇洗脱	56.9	4.99	9.5	72.6	9.04	17.2	34.8	4.94	9.4	27.6	3.84	7.3
70% 乙醇洗脱	32.3	8.51	16.2	31.5	10.67	20.3	6.3	2.79	5.3	—	—	—
95% 乙醇洗脱	5.9	—	—	1.1	—	—	—	—	—	—	—	—

注: (1)“—”表示未检出; (2) 洗脱率 = [洗脱液中总皂苷量(mg) / 树脂吸附总皂苷量(mg)] × 100%

表 4 洗脱溶媒用量试验数据

洗脱溶媒	1BV			2BV			3BV			4BV		
	固形物量(mg)	洗脱液中总皂甙量(mg)	洗脱率(%)	固形物量(mg)	洗脱液中总皂甙量(mg)	洗脱率(%)	固形物量(mg)	洗脱液中总皂甙量(mg)	洗脱率(%)	固形物量(mg)	洗脱液中总皂甙量(mg)	洗脱率(%)
蒸馏水洗脱	49.3	4.26	8.1	11.9	1.37	2.6	2.3	—	—	—	—	—
30% 乙醇洗脱	51.5	—	—	50.9	—	—	51.0	—	—	61.5	1.10	2.1
70% 乙醇洗脱	145.8	9.74	18.5	126.2	24.76	47.1	42.3	10.46	19.9	12.9	—	—
95% 乙醇洗脱	5.9	—	—	1.1	—	—	—	—	—	—	—	—

注: (1)“—”表示未检出; (2) 洗脱率 = [洗脱液中总皂苷量(mg) / 树脂吸附总皂苷量(mg)] × 100% (以下同)

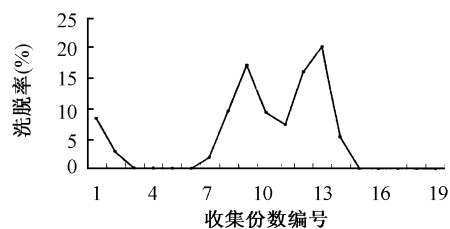


图 1 洗脱率-收集份数曲线图

1~3 号蒸馏水洗脱液, 4~7 号 30% 乙醇洗脱液, 8~11 号 50% 乙醇洗脱液, 12~15 号 70% 乙醇洗脱液, 16~19 号 95% 乙醇洗脱液

结果表明, 蒸馏水洗脱用量至 3BV 时, 流出液中几乎无固形物, 说明糖类等水溶性杂质已除去; 30% 乙醇洗脱用量至 3BV 时, 在流份中未检出远志总皂苷, 而固形物量较高, 说明 30% 乙醇洗脱可达到除杂质的目的, 当 30% 乙醇用量至 4BV 时, 远志总皂

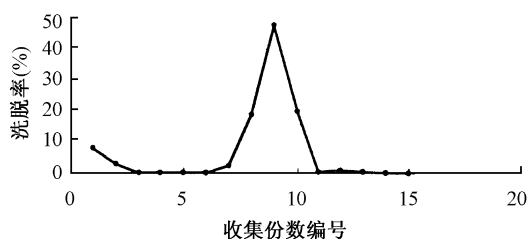


图 2 洗脱率-收集份数曲线图

1~3 号蒸馏水洗脱液, 4~7 号 30% 乙醇洗脱液, 8~11 号 70% 乙醇洗脱液, 12~15 号 95% 乙醇洗脱液

苷洗脱率为 2.1%, 说明总皂苷随 30% 乙醇用量的增加已有部分被解吸附, 故确定 30% 乙醇用量为 3BV; 70% 乙醇洗脱用量至 3BV 时, 总皂苷已基本被解吸附完全, 当 70% 乙醇用量至 4BV 时, 流出液中未检出皂苷类成分; 95% 乙醇洗脱液中有少量杂质,

无总皂苷存在。故确定洗脱溶媒用量为蒸馏水 3BV、30% 乙醇、70% 乙醇各 3BV，收集 70% 乙醇洗脱部位。

综上所述，初步确定最佳工艺为 D₁₀₁ 大孔吸附树脂纯化远志总皂苷，蒸馏水、30% 乙醇、70% 乙醇各 3BV 以 1BV/h 速度依次洗脱，收集 70% 乙醇洗脱部位。

2.2.5 验证试验 精密吸取供试品溶液(生药 0.25g/mL) 12mL 依法上柱，平行 3 份，分别用蒸馏水、30% 乙醇、70% 乙醇各 3BV 洗脱，洗脱速度 1BV/h，以 1BV 份收集流份。测定各流份中远志总皂苷含量、固形物量，计算洗脱率及精制度(见表 5)。

结果表明，蒸馏水、30% 乙醇洗脱部位均未检出远志总皂苷，但有固形物存在，表明达到了除杂、纯化的目的；70% 乙醇洗脱部位总皂苷洗脱率 89.8%，为其主要富集部位，且精制度达 239.6%，纯化效果较好，表明所选工艺条件适宜远志总皂苷的富集、纯化且重现性良好。

表 5 工艺参数验证性试验结果

评价指标	试验 1	试验 2	试验 3	平均结果
上柱液中总皂苷量(mg)	52.56	52.56	52.56	52.56
上柱液中总固形物中总皂苷含量(%)	6.3	6.3	6.3	6.3
水洗脱部位总皂苷量(mg)	—	—	—	—
水洗脱部位总固形物量(mg)	62.9	57.8	59.2	60.0
30% 乙醇洗脱部位总皂苷量(mg)	—	—	—	—
30% 乙醇洗脱部位总固形物量(mg)	152.3	147.1	157.2	152.2
70% 乙醇洗脱部位总皂苷量(mg)	47.40	45.89	48.31	47.20
70% 乙醇洗脱部位总固形物量(mg)	314.3	309.5	320.1	314.6
70% 乙醇洗脱部位总固形物中总皂苷含量(%)	15.1	14.7	15.1	15.0
70% 乙醇洗脱部位洗脱率(%)	90.2	87.3	91.9	89.8
远志总皂苷精制度(%)	240.7	236.9	241.1	239.6
RSD(%)				0.97

注：远志总皂苷精制度 = (70% 乙醇洗脱液固形物中总皂苷含量 / 远志上柱液固形物中总皂苷含量) × 100%。

3 结论与讨论

3.1 中药远志所含化学成分复杂，有远志总皂苷、口山酮、生物碱、糖及低聚糖酯、脂肪油等多种成分，远志总皂苷富集、纯化存在一定的困难。本实验采用大孔树脂吸附法富集、纯化远志总皂苷，得出最佳工艺条件为 D₁₀₁ 大孔吸附树脂纯化远志总皂苷，蒸馏水、30% 乙醇、70% 乙醇各 3BV 以 1BV/h 速度依次洗脱，收集 70% 乙醇洗脱部位。以此工艺条件纯化远志总皂苷，可达到较好的纯化效果。纯化前固形物中远志总皂苷含量为 6.3%，纯化后固形物中远志总皂苷含量为 15.0%，精制度达 239.6%，且洗脱率为 89.8%。由此，从精制程度、解吸度方面分析，大孔吸附树脂适宜于远志总皂苷的分离、纯化。

3.2 大孔吸附树脂类型多样，不同类型的树脂，含水量差异较大。故在吸附容量评价时，以树脂干重计客观的反映了树脂吸附能力的强弱。

3.3 大孔吸附树脂是一类新型非离子型高分子化合物，在生产过程中加入了致孔剂等，形成了有机物残留问题。故应对纯化后的远志总皂苷进行有机物残留限量研究，制订药用级大孔吸附树脂标准，以规范大孔吸附树脂在药学中的应用标准。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 一部, 123-124.
- [2] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用(I)[M]. 学苑出版社, 1993. 336-339.
- [3] 吴巧凤, 严支良, 来平凡. 归芪补血冲剂中黄芪甲甙的含量测定[J]. 时珍国药研究, 1997, 8(2): 130-132.
- [4] 唐第光. 大孔吸附树脂法提取三七总皂甙工艺探讨[J]. 中成药, 1990, 12(8): 5-7.
- [5] 侯世祥, 田恒康. 大孔吸附树脂在中药复方分离纯化工艺中的应用[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(3): 131-133.