

大孔吸附树脂富集纯化三七总皂苷工艺研究

刘中秋, 蔡 雄, 赖小平, 祝晨蓀, 刘 良
(广州中医药大学, 广州 510405)

摘要: 以三七总皂苷的洗脱率和精制度为考察指标, 研究大孔树脂吸附法富集、纯化三七总皂苷的工艺条件及参数。结果表明: 通过大孔树脂富集与纯化后三七总皂苷洗脱率达 80% 以上, 50% 乙醇洗脱液干燥后总固体中三七总皂苷纯度可达 71.1%。采用此法可较好的纯化三七总皂苷。

关键词: 大孔树脂; 三七总皂苷; 纯化

中图分类号: R283.6 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2001)03-0004-03

Studies on Purification of *Panax Notoginseng* Saponins (PNS) with Macroporous Resin

LIU Zhong-qiu, CAI Xiong, LAI Xiao-ping, ZHU Chen-chen, LIU Liang

(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, 510405)

Abstract: The technical parameters of PNS's purification with macroporous resin were studied by monitoring the eluted ratio and purity of PNS. Over 80% of PNS was eluted from macroporous resin. The purity of PNS was up to 71.1% in the dried part of 50% ethanolic elution. This technique was a good method to purify PNS.

Key words: Macroporous resin; PNS; purification

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* Burk. F. H. Chen 的干燥根, 功能散瘀止痛, 消肿定痛, 中医临床多用于冠心病心绞痛的治疗, 其中三七总皂苷 (total Saponins of *Panax notoginseng*, PNS) 为其主要有效成分。我们正研究三七抗冠心病心绞痛的主要有效成分, 文献报道及实验结果均表明三七总皂苷为三七抗冠心病心绞痛的主要成分, 且三七总皂苷的分离、富集、纯化可以采用大孔树脂吸附法^[1], 但缺乏较系统地研究, 工艺条件与参数不确切, 对其整个工艺优化过程和建立内在质量控制指标的研究尚未见文献报道。大孔吸附树脂为一种有机高聚吸附剂, 具有选择性吸附有机化合物的能力, 应用于皂苷类成分的富集纯化有较好的效果, 但其吸附性能及解吸、纯化条件参数因化合物的理化性质不同而不

同。本实验旨在通过对 D₁₀₁ 型大孔树脂富集、纯化三七总皂苷工艺条件与参数的研究, 探索其工艺流程, 建立质量控制体系, 从而确立富集、纯化三七总皂苷可行的方法。

1 仪器、材料和试剂

1.1 仪器 HEWLETT PACKARD-6010 紫外-可见分光光度计(惠普上海分公司)

1.2 材料 所用药材三七经赖小平副教授鉴定系五加科植物三七 *Panax notoginseng* Burk. F. H. Chen 的干燥根, 人参皂苷 Re 对照品(中国药品生物制品检定所), 大孔吸附树脂(D₁₀₁型, 天津制胶厂)。

1.3 试剂 香草醛、高氯酸、冰醋酸、甲醇, 均为 AR 级。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 三七总皂苷测定方法 吸取三七样品液一定量, 挥干, 加入 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.2ml, 高氯

收稿日期: 2000-09-28

基金项目: 1999 年度广东省科委重点攻关课题

酸 0.8ml, 于 60℃水浴加热 15min, 冰水浴冷却 2~3min, 加冰醋酸 5ml 摇匀, 随行试剂做空白, 于 560nm 处测定吸收值^[2]。

2.1.2 三七样品液制备与三七总皂苷含量测定
三七根粉碎以 70% EtOH 回流提取, 提取液过滤澄清后, 回收乙醇适量, 水浴蒸发至无醇味, 加蒸馏水适量, 冰箱放置 24h 后抽滤得三七样品液(0.2g 生药/ml)^[3]。精密吸取 10ml 于分液漏斗中, 水饱和正丁醇萃取 3 次, 每次 10ml。合并萃取液, 水浴挥干, 甲醇定容, 按上述方法测定总皂苷浓度为 19.67 ± 0.31mg/ml (n = 3), RSD = 1.58%。

2.2 工艺参数考察与优化

2.2.1 大孔吸附树脂的预处理、装柱和再生 以甲醇湿法装柱(R15×H90mm, 干重 2.52 ± 0.02g), 继而用甲醇洗脱, 不时检测流出的甲醇, 当流出的甲醇与水混合不呈白色混浊时即可, 然后用大量的蒸馏水洗至无醇味^[4]。

2.2.2 洗脱溶媒的选择 吸取三七提取液 5ml (0.33g 生药/ml) 上柱, 依次用蒸馏水 200ml, 30% 乙醇 50% 乙醇、70% 乙醇各 100ml 梯度洗脱, 洗脱液流速 1.5ml/min, 蒸馏水洗脱液先收集 50ml 2 份, 再收集 25ml 4 份; 30% 乙醇 50% 乙醇、70% 乙醇洗脱液分别收集 25ml 14 份。测定三七总皂苷含量, 以容量瓶编号(X)和总皂苷含量(Y)为坐标绘制洗脱曲线, 见图 1。

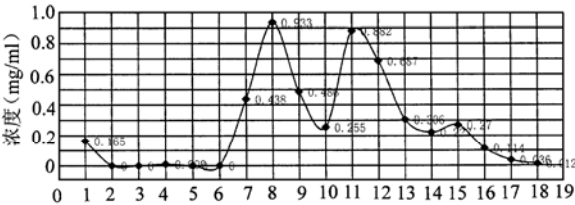


图 1 三七总皂苷大孔树脂吸附梯度洗脱曲线图
1—6 号蒸馏水洗脱液 7—10 号 30% 乙醇洗脱液
11—14 号 50% 乙醇洗脱液 15—18 号 70% 乙醇洗脱液

洗脱曲线显示: 三七总皂苷主要集中在 30% 和 50% 乙醇洗脱液中, 占全部醇洗脱液中三七总皂苷的 90.7%, 二者所占百分比比例无显著差异。而 50% 乙醇洗脱的解吸速度比 30% 乙醇快, 且 50% 乙醇洗脱的总皂苷纯度高, 故确定洗脱条件为先用蒸馏水洗去水溶性杂质, 再用 50% 乙醇洗脱三七总皂苷, 收集 50% 乙醇洗脱部分。

2.2.3 吸附容量的确定 吸取三七样品液 25ml 上柱, 预吸附 1hr, 过柱流出液重吸附 1 次, 收集 25ml 1 份, 流速 1.5ml/min, 平行 3 份。样品液按三七样品液总皂苷测定方法测定总皂苷含量, 计算吸附容量, 结果见表 1。

表 1 吸附容量的确定*

上柱液中总皂苷含量(mg)	过柱液总皂苷含量(mg)	$\bar{x} \pm s$ (mg)	RSD (%)	树脂吸附 总量(mg)	吸附容量 (mg/g 干树脂)
	51.9				
491.8	53.1	52.1 ± 0.9	1.73	439.7	174.5
	51.3				

* : 吸附容量 = (上柱液中总皂苷含量 - 过柱液中总皂苷含量) / 干树脂含量

2.2.4 洗脱溶媒用量 根据上述结果确定的吸附容量和洗脱溶媒, 吸取三七样品液 22.3ml 3 份上柱, 蒸馏水用量分别为 200ml(条件 1)、150ml(条件 2)、100ml(条件 3), 50% 乙醇 200ml, 依次洗脱, 分段收集, 测定总皂苷含量。50% 乙醇 100ml 样品液水浴挥干, 烘箱恒重, 计算总固物重量和总皂苷含量, 结果见表 2。

表 2 结果分析, 3 种洗脱条件所得总固物及总皂苷含量无显著差异, 而总皂苷含量均在 65% 以上, 故确定洗去杂质蒸馏水用量 100ml。前 100ml 50% 乙醇洗脱率近 90%, 而后 100ml 洗脱率不到 2%。且各洗脱体积的总固物和总皂苷无显著差异, 由此故确定解吸洗脱溶媒 50% 乙醇用量为 100ml。

表 2 三七总皂苷不同条件洗脱参数考察

	条件 1		条件 2		条件 3	
	洗脱量(mg)	洗脱率(%)	洗脱量(mg)	洗脱率(%)	洗脱量(mg)	洗脱率(%)
蒸馏水洗脱液	49.35	11.25	39.38	8.98	48.60	11.08
(10ml)	348.00	79.30	360.00	82.07	354.00	80.70
乙醇洗脱液	3.00	0.68	3.11	0.71	3.60	0.82
(50ml)	1.47	0.34	1.66	0.38	1.38	0.31
总固物(mg)	516.8		520.1		522.5	
总固物中总皂苷含量(%)	67.3		69.2		67.8	

2.2.5 重复验证实验 根据上述结果,按最佳条件,平行3份,分别吸取三七样品液22.3ml上柱,依次用100ml蒸馏水洗去水溶性杂质,100ml 50%乙醇洗脱三七总皂苷,收集50%乙醇洗脱液,平行3份。测定100ml 50%乙醇洗脱液中总皂苷含量,三七上柱样品液、蒸馏水洗脱液及50%乙醇洗脱液水浴挥干,烘箱恒重,计算总固物,结果见表3。

表3 大孔树脂吸附法富集、纯化三七总皂苷工艺参数
考察实验数据^{*}

测定指标	试验1	试验2	试验3	$\bar{x} \pm s$
上柱样品液总固物(mg)	—	—	—	1154 ± 18
上柱液总固物中总皂苷含量(%)	—	—	—	38.0
蒸馏水洗脱液总固物(mg)	629.5	610.8	612.3	617.5 ± 10.4
50%乙醇洗脱液总固物(mg)	524.6	524.2	519.6	522.8 ± 2.8
50%乙醇洗脱液中总皂苷含量(mg)	381.0	375.0	360.0	372.0 ± 10.8
50%乙醇洗脱液总固物中总皂苷含量(%)	72.6	71.5	69.3	71.1 ± 1.7
三七总皂苷精制度(%)	—	—	—	187.0

* : 50%乙醇洗脱液总固物中总皂苷含量 = (洗脱液中总皂苷含量/总固物重量) × 100%

总皂苷精制度 = (50%乙醇洗脱液总固物中总皂苷含量/上柱液总固物中总皂苷含量) × 100%

3 讨论

三七所含化学成分复杂,除三萜皂苷外,还含有挥发油、蛋白质、糖、维生素及微量黄酮苷等,而其有效成分三七皂苷含量约为10%,所以三七总皂苷的分离、富集、纯化存在一定的难度。本实验尝试了采用大孔树脂吸附法,纯化前总固物中三七总皂苷含量为38.0%,纯化后总固物中三七总皂苷含量为71.1%,精制后达87.0%,且洗脱率达80%以上。从结果分析,大孔树脂吸附法基本适宜于三七总皂苷的分离、富集与纯化。而且该D101型大孔树脂具有吸附快、解吸率高、吸附容量大、洗脱率高、再生简便特点,在分离、富集、纯化中药材中主要成分方面有一定的推广价值,也是克服中药新药开发研究中制备工艺低水平重复可尝试的技术。

参考文献:

- [1] 唐第光. 大孔吸附树脂提取三七总皂苷工艺探讨[J]. 中成药, 1990(3): 5-6.
- [2] 中国医学科学院药物研究所编著. 中草药现代研究[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医院大学联合出版社, 1996. 193-194.
- [3] 曾宪明. 无机盐对大孔吸附树脂人参总皂苷的影响[J]. 中国医药工业杂志, 1992, 23(8): 339-342.
- [4] 中国医学科学院药物研究所植化室. 大孔吸附树脂在中草药化学成分提取分离中的一些应用[J]. 中草药, 1980, 11(3): 138-141.