

大孔吸附树脂纯化荔枝核总皂苷的工艺研究

王妍^{*}, 梁志强

(中国人民解放军第四五八医院, 广东 广州 510602)

[摘要] 目的: 研究 SA-1 型大孔吸附树脂吸附提取荔枝核总皂苷的工艺条件及参数。方法: 以荔枝核总皂苷为考察指标, 研究树脂吸附容量、洗脱溶媒及其用量等工艺条件。结果: 通过 SA-1 型大孔树脂吸附后, 先经 4 倍量柱体积水洗, 再以 80% 乙醇为洗脱溶媒, 3 倍量柱体积洗脱效果最佳, 总皂苷的纯度可达 68.10%。结论: 此法能较好地分离纯化荔枝核总皂苷, 是简便、可行的提取方法。

[关键词] 大孔吸附树脂; 荔枝核
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 08-0022-03

荔枝核为无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的种子, 功效行气散结、祛寒止痛。其主要成分包括黄酮类、皂苷类、挥发油、鞣质、糖类、蛋白质等。现代药理研究证明, 荔枝核的总皂苷类在降血糖、调血脂^[1-3]、抗乙肝病毒^[4]等方面有显著活性。如何寻找一种高效、实用的提取纯化工工艺是荔枝核总皂苷作为有效部位进一步开发研究的主要环节。大孔吸附树脂为一种有机高聚吸附剂, 具有选择性好、吸附容量大、解吸容易、再生简便等优点, 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^[5]。本实验旨在通过对 SA-1 大孔吸附树脂富集、纯化荔枝核总皂苷工艺条件与参数的研究, 探索富集、纯化荔枝核总皂苷的可行方法。

1 材料

721B 型分光光度计(上海第三分析仪器厂); BP211D 电子天平(德国赛多利斯公司); 所用荔枝核购于广东广弘中药材公司, 经鉴定为无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的种子。熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110742-200516, 供含量测定用); SA-1 型大孔树脂(天津欧瑞生物科技有限公司); 乙醇等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 荔枝核总皂苷含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取熊果酸对照

品 10 mg 置于 25 mL 的量瓶中, 加无水乙醇溶解至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 含熊果酸 400 μg)。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取荔枝核粗粉 15 g 置于圆底烧瓶中, 加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 两次滤液合并, 回收乙醇至无醇味, 约 75 mL, 静置, 滤过即得(每 1 mL 相当于含生药量 0.2 g)。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取熊果酸对照品溶液(400 μg·mL⁻¹) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 于具塞试管中, 水浴挥干, 于每支试管中加入 5% 的香草醛-冰乙酸 0.4 mL, 再分别加入高氯酸 1.0 mL, 密塞, 摇匀, 置于 60 °C 水浴 12 min, 冰浴冷却, 加冰乙酸 5.0 mL 摇匀, 在 548 nm 处测定吸光度。以熊果酸的微克数为横坐标, 吸光度为纵坐标, 作图得到标准曲线, 其回归方程 $Y = 0.0018X - 0.0063 (r = 0.9995)$ 。结果表明熊果酸在 40 ~ 320 μg 呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液 0.5 mL, 置于具塞磨口试管中, 按制作标准曲线操作测定吸光度, 重复测定 5 次, RSD 0.63%。

2.1.5 稳定性考察 精密吸取对照品溶液 0.5 mL, 置于具塞磨口试管中, 按制作标准曲线操作测定吸光度, 在第 1 次测定后每隔 1 h 测定一次, 直至 5 h, 结果表明, 吸光度在 5 h 内稳定, RSD 0.82%。

2.1.6 加样回收率试验 精密称取荔枝核粗粉 15 g 置于圆底烧瓶中, 加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 两次滤液合并, 回收乙醇至无醇味, 静置, 滤过, 水浴挥干至浸膏(约 2.5 g)。精密称取浸膏 50 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解至

[收稿日期] 2008-07-21
[通讯作者] 王妍, Tel: (020) 61639894, E-mail: mypost168@163.com

刻度, 摇匀得浸膏样品溶液。精密吸取 0.1 mL, 按标准曲线制作过程, 测定浸膏总皂苷质量分数为 18.52%。

取上述已知含量的浸膏样品粉末 5 份, 每份约 20 mg, 精密称定, 再分别精密称取一定量的熊果酸对照品, 置于 25 mL 量瓶中加入无水乙醇溶解至刻度, 摇匀, 精密吸取 0.1 mL, 按“2.1.3”项下方法, 测定吸收度并计算回收率, 结果见表 1。

表 1 荔枝核中熊果酸加样回收率实验

称取量 /mg	样品中含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均 回收率/%	RSD /%
20.000 9	37.041 7	40	76.685 7	99.11		
20.001 2	37.042 2	40	77.410 2	100.92		
20.000 6	37.041 1	40	76.665 1	99.06	99.07	1.85
19.999 7	37.039 4	40	75.927 4	97.22		
20.000 4	37.040 7	40	76.656 7	99.04		

2.1.7 样品含量测定 分别称取 3 批荔枝核粗粉各约 10 g, 精密称定, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 0.05 mL, 按标准曲线的制作方法操作、测定, 并以工作曲线法计算总皂苷。结果, 3 批荔枝核总皂苷浓度以熊果酸计, 分别为 14.28, 14.40, 14.32, 平均值为 14.35 mg·mL⁻¹。

2.2 工艺条件及参数的考察优化

2.2.1 树脂的预处理 称取 SA-1 型树脂一定量, 使用前用 2~3 床体积的氢氧化钠浸泡处理后装柱, 然后用蒸馏水反复洗脱, 洗至中性后, 浸泡备用。

2.2.2 吸附容量的确定 取已经预处理好的 10 g 树脂湿法装柱, 精密吸取按 2.1.2 项下所制备荔枝核供试品溶液 30 mL 上柱, 预吸附 2 h, 流速 1 BV/h (BV 为树脂柱体积), 过柱流出液重吸附 1 次, 平行 3 份。将所收集的 30 mL 溶液水浴挥干, 无水乙醇定容至 25 mL 量瓶中, 精密吸取 1 mL 于具塞试管中水浴挥干, 按标准曲线做法, 以比色法测定总皂苷含量, 计算吸附容量(上柱液中总皂苷量 - 过柱液中总皂苷量) / 干树脂量, 结果 10 g SA-1 大孔吸附树脂可以吸附荔枝核总皂苷 372.16 mg, 吸附率可达到 86.44%, 吸附容量为 37.22 mg·g⁻¹ (n=3)。

2.2.3 洗脱溶媒的确定 取已经预处理好的 10 g 树脂湿法装柱, 精密吸取荔枝核供试品溶液 30 mL 上柱, 预吸附后用蒸馏水洗至流出液不呈 Molish 反应, 弃去水洗液。水洗量为柱床体积的 4 倍时, 就可

洗至无色, 而且水洗液 Molish 反应阴性, 证明不含大分子的糖类。

然后依次用 30%, 60%, 80%, 95% 乙醇各 4 BV 洗脱, 控制流速 1 BV/h, 每个柱体积收集 1 次洗脱液, 共收集 16 份, 每份洗脱液水浴挥干得浸膏并测定浸膏中皂苷的含量, 绘制洗脱曲线, 见表 2。

表 2 不同浓度醇洗脱效率的比较(n=3)

乙醇/%	总皂苷量/mg	占总皂苷量/%
30	8.5	4.33
60	27.46	14.01
80	152.47	77.77
95	7.6	3.88

由表 2 可以看出, 荔枝核总皂苷主要集中在 80% 醇洗脱液中, 低浓度的乙醇也能洗脱出一定量, 并随浓度的增大而增大, 故选择蒸馏水为洗去水溶性杂质的溶媒, 80% 乙醇为洗脱溶媒。

2.2.4 洗脱溶媒用量的确定 根据上述结果确定的吸附容量和洗脱溶媒吸取荔枝核供试品液 30 mL 上柱, 先蒸馏水 3 BV 洗脱, 弃去水洗液, 再用 5 BV 的 80% 醇洗脱, 洗脱速度为 1 BV·h⁻¹, 每个柱体积收集 1 次, 测定洗脱液中的总皂苷含量, 计算洗脱率, 结果见表 3。

由表 3 可以看出 80% 乙醇洗脱液前 4 个柱体积洗脱皂苷占 95.72%, 故确定 80% 的乙醇洗脱液用量为 4 BV。

表 3 洗脱溶媒用量数据(n=3)

80% 乙醇用量/BV	皂苷洗脱量/mg	皂苷洗脱率/%
1	67.45	24.78
2	141.32	51.92
3	33.27	12.22
4	18.52	6.80
5	11.64	4.28

2.2.5 验证性试验 根据上述条件取供试液平行进行 3 次试验, 测定洗脱液内总皂苷含量分别为 68.12%, 68.06% 及 67.17%。

3 讨论

SA-1 是一种高交联大孔聚苯乙烯基质的双功能基吸附剂, 具有较高的比表面积和适合一定分子量物质扩散的孔结构。该树脂对中药中的皂苷类成分具有很高的吸附选择性, 能选择性地吸附中药提

取液中的皂苷类成分,同时去除中药中杂质成分如鞣质、色素、蛋白、油脂等,通过“吸附-脱附”一步法简单工艺即可制得较高纯度的皂苷类产品,同时 SA-1 树脂是一类带有较强极性功能基的树脂,能和大分子杂质产生多位点作用,因此在再生的过程中需要使用 4% 的 NaOH 处理。在使用 10 ~15 个周期后,用 10% 的 NaOH 乙醇溶液进行彻底清洗,以免影响使用效果。

荔枝核总皂苷为荔枝核中的重要活性物质,本实验考察了 SA-1 大孔吸附树脂纯化荔枝核总皂苷的工艺条件。荔枝核醇提液经 SA-1 大孔树脂吸附纯化后,所得浸膏中总皂苷含量可达 68.10%。确定了以蒸馏水 4 BV 为去杂的溶媒,80% 的乙醇 4 BV 为洗脱溶媒的方法。本文初步确定了大孔吸附树脂富集荔枝核总皂苷的提取工艺,为荔枝核的开发研究提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 杨燕军,梁北梅.荔枝核抗糖尿病有效部位总皂苷的含量测定[J].广东药学,2004,14(6):13.

[2] 郭洁文,潘竞锵,廖惠芳,等.荔枝核皂苷对高脂血症-脂肪肝大鼠的降血糖调血脂作用[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(12):1403.

[3] 郭洁文,廖惠芳,潘竞锵,等.荔枝核皂苷改善高脂血症-脂肪肝-大鼠胰岛素抵抗作用机制研究[J].中国药房,2005,16(10):732.

[4] 蒋蔚峰,陈建宗,张娟,等.荔枝核总皂苷体外抗乙型肝炎病毒的作用[J].第四军医大学学报,2008,29(2):100.

[5] 侯世样,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.

[责任编辑 全燕]

《中国中药杂志》2010 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1995 年 7 月,是创早最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、科研院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2010 年定价每期 15 元,全年 24 期定价为 360 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjcmm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。