

# 葫芦巴总皂苷的提取纯化工艺考察

黑晶<sup>1</sup>, 陈挚<sup>1</sup>, 雷亚亚<sup>1</sup>, 王文革<sup>1,2</sup>, 隋宏<sup>1,2\*</sup>

(1. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 2. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 银川 750004)

**[摘要]** 目的: 制备高纯度的葫芦巴总皂苷。方法: 采用乙醇回流法提取葫芦巴总皂苷, 依次加正己烷、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇进行系统溶剂萃取, 三氯甲烷有效部位经 HPD-400 型大孔吸附树脂富集纯化。采用显色反应和 TLC 鉴别总皂苷, 运用 UV 测定葫芦巴总皂苷含量。结果: 三氯甲烷萃取部位中总皂苷纯度 40%, 得率 6.28%; 水洗脱液中葫芦巴总皂苷纯度 80.5%, 得率 0.32%。结论: 优选的提取纯化工艺快速简便, 为葫芦巴总皂苷的药效学评价奠定基础。

**[关键词]** 葫芦巴; 总皂苷; 回流提取法; 系统溶剂萃取法; 大孔吸附树脂; 纯化工艺

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0011-03

**[doi]** 10.11653/syfy2014050011

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1409.008.html>

**[网络出版时间]** 2013-12-18 14:09

## Investigation of Extraction and Purification Process for Total Saponins in Trigonellae Semen

HEI Jing<sup>1</sup>, CHEN Zhi<sup>1</sup>, LEI Ya-ya<sup>1</sup>, WANG Wen-ping<sup>1,2</sup>, SUI Hong<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Ningxia Engineering & Technology Research Center For Modernization of Hui Medicine, Yinchuan 750004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare total saponins of Trigonellae Semen with high purity. **Method:** Total saponins of Trigonellae Semen was extracted by ethanol refluxing method, then extract was dealt with different solvents systematically, including *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol. Chloroform effective part was purified through HPD-400 macroporous resin. Total saponins in each steps and fractions was identified by chromogenic reaction and TLC, contents of total saponins were determined by ultraviolet spectroscopy. **Result:** Purity of total saponins in chloroform solvent extraction was 40% with yield of 6.28%; Purity of total saponins in water eluent was 80.5% with yield of 0.32%. **Conclusion:** This optimized process was convenient and efficient, it could lay foundation for pharmacodynamic study.

**[Key words]** Trigonellae Semen; total saponins; reflux extraction; systematic solvent extraction; macroporous resin; purification process

葫芦巴味苦, 性温, 具有温肾、祛寒、止痛等功效, 主要用于治疗肾脏虚冷、小腹冷痛、小肠病气、寒

湿脚气等症<sup>[1]</sup>, 其主要成分包括甾体皂苷、黄酮、生物碱、香豆素、氨基酸、多糖等化合物<sup>[2]</sup>。总皂苷为葫芦巴主要活性部位之一, 具有明显的降糖降脂效果<sup>[3]</sup>。杜海胜等<sup>[4]</sup>采用不同大孔吸附树脂富集纯化葫芦巴总皂苷, 使总皂苷纯度达 42.76%。为便于后期药理学和制剂学研究的开展, 本实验采用乙醇回流法提取葫芦巴总皂苷, 通过系统溶剂分离和 HPD-400 型大孔吸附树脂富集纯化, 以期获得纯度 >80% 的葫芦巴总皂苷提取物, 为葫芦巴总皂苷活性部位的开发利用提供参考。

**[收稿日期]** 20131022(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160548); 宁夏科技攻关项目(宁科计字[2010]170号)

**[第一作者]** 黑晶, 在读硕士, 从事中药药效作用机制研究, Tel: 0951-6880580, E-mail: 759339948@qq.com

**[通讯作者]** \*隋宏, 博士, 教授, 从事中药药效作用机制和新药开发研究, Tel: 0951-6880580, E-mail: suihong0951@163.com

## 1 材料

WS70-1 型远红外快速干燥器(上海锦凯科学仪器有限公司),UV-2550 型紫外-可见分光光度计和 AEU-210 型电子分析天平(日本岛津)。胡芦巴(由宁夏古方医院大药房提供,经宁夏医科大学药学院生药教研室王建寰副教授鉴定为豆科植物胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 的成熟干燥种子),HPD-400 型大孔吸附树脂(安徽三星树脂科技有限公司),薯蓣皂苷元对照品(中国食品药品检定研究院,批号 MUST-12120110),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 胡芦巴总皂苷浸膏的制备** 准确称取胡芦巴粗粉(过 80 目筛)60 g,置于 1 L 圆底烧瓶中,加入 12 倍量 75% 乙醇浸泡 30 min,于 75 °C 加热回流提取 3 次,提取时间依次为 1.5,1,0.5 h,抽滤,合并滤液,减压回收乙醇,真空干燥,计算浸膏得率 13.30%,总皂苷质量分数 8.60%。

### 2.2 胡芦巴总皂苷的含量测定

**2.2.1 供试品溶液的制备** 精密称取总皂苷浸膏 0.13 g 至锥形瓶中,加入无水乙醇 20 mL 和 3 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 20 mL 使溶解,80 °C 水浴加热回流水解 3 h,用与水解液等体积的三氯甲烷萃取 3 次,取三氯甲烷层蒸干,用甲醇溶解至 25 mL 量瓶中,即得。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称定薯蓣皂苷元对照品 5.42 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得。

**2.2.3 检测波长的选择** 精密量取薯蓣皂苷元对照品溶液与供试品溶液各 0.2 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,水浴挥干,加入新制 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,摇匀,65 °C 水浴加热 20 min,取出置冰水浴中冷却 20 min,加冰醋酸 4.0 mL,摇匀,静置 10 min。以溶剂加显色剂作为空白,于 200~800 nm 进行紫外扫描,结果显示二者均在 454 nm 处有最大吸收。

**2.2.4 标准曲线的制备** 精密吸取对照品溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,按 2.2.3 项下方法操作,于 454 nm 处测定吸光度(A),以质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程  $Y = 27.923X - 0.0193$  ( $r = 0.9993$ ),表明薯蓣皂苷元质量浓度在 0.0043~0.0259 g·L<sup>-1</sup> 与 A 呈良好线性关系。

**2.2.5 精密度试验** 准确吸取薯蓣皂苷元对照品溶液 0.3 mL,置于 10 mL 量瓶中,按 2.2.3 项下方法重复测定 6 次,结果 A 的 RSD 0.75%,表明仪器

精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 准确吸取供试品溶液 0.3 mL,按 2.2.3 项下方法每隔 15 min 测定 1 次,结果 A 的 RSD 1.32%,表明供试品溶液显色后在 60 min 内稳定性良好。

**2.2.7 重复性试验** 取同一批号供试品溶液 6 份,每份 0.3 mL,按 2.2.3 项下方法测定 A,结果 RSD 1.21%,表明该方法重复性良好。

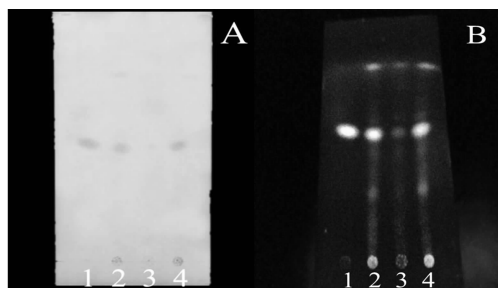
**2.2.8 加样回收率试验** 精密称取同一批已知含量的样品 6 份,每份约 0.04 g,精密加入薯蓣皂苷元对照品溶液(质量 2.60 mg),按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.3 项下方法测定,结果薯蓣皂苷元的平均加样回收率 99.25%,RSD 0.84%,表明该方法回收率良好。

**2.3 系统溶剂萃取法分离胡芦巴总皂苷** 称取胡芦巴总皂苷浸膏 60 g,加水 300 mL 溶解,置于 1 L 分液漏斗中,精密加入正己烷 300 mL,振摇 5 min,室温静置 1 h,重复上述步骤直至正己烷层呈澄清无色,收集上清液作为正己烷提取部位;依照上述方法在剩余的下层部分加入三氯甲烷 300 mL,收集下层液作为三氯甲烷提取部位(为防止乳化现象可加入少量 NaCl);同法加入乙酸乙酯 300 mL,收集上清液作为乙酸乙酯提取部位;剩余部分加入正丁醇 300 mL,收集上清液作为正丁醇提取部位;各提取部位分别减压回收溶剂,真空干燥,称定质量,计算各萃取部位得率。

**2.3.1 显色反应** 根据 Salkowski 反应,取少量各层萃取样品溶于三氯甲烷中,加入适量浓硫酸,结果显示三氯甲烷层呈红色或蓝色,硫酸层显绿色荧光,表明三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇层萃取物中均含有皂苷类成分。

**2.3.2 TLC 鉴别** 称取各萃取层样品,按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,吸附剂为硅胶 G,点样量 5 μL,展距 17~18 cm,展开方式为双步梯度展开,在展开槽中加入展开剂环己烷-乙酸乙酯(10:1)预平衡后,上行展开至展距的一半时取出,吹干后在展开槽中加入环己烷-乙酸乙酯(2:1)预平衡后再次展开至终点。喷显色剂硫酸-乙醇(1:10),晾干后于 110 °C 烘 5 min,于紫外光灯下(365 nm)检视。结果发现薯蓣皂苷元对照品溶液斑点呈桃红色,紫外检视呈蓝色荧光,该斑点放置一段时间后逐渐变为暗绿色,紫外检视显绿色荧光;三氯甲烷层、乙酸乙酯层、正丁醇层萃取样品溶液在与对照品溶液相同的位置显同样斑点,而其他萃取层样品在相应位置无

斑点出现,见图1。



1. 薯蓣皂苷元对照品;2. 三氯甲烷层样品;3. 乙酸乙酯层样品;  
4. 正丁醇层样品;A. 可见光;B. 紫外检视

图1 薯蓣皂苷元 TLC

**2.3.3 样品测定** 取各层萃取物样品,按2.2.1项下方法分别制备供试品溶液,按2.2.3项下方法测定A,结果见表1,表明三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇各层萃取物中均含有一定量皂苷类化合物,确定选择三氯甲烷层萃取物进行富集纯化。

表1 各层萃取物中胡芦巴总皂苷的含量测定

萃取物样品	得率/%	纯度/%
正己烷层	1.26	-
三氯甲烷层	6.28	40.00
乙酸乙酯层	2.70	10.00
正丁醇层	28.74	7.86
剩余层	61.02	-

**2.4 大孔吸附树脂纯化工艺优选** 参照文献[5]对HPD-400型大孔吸附树脂进行预处理。称取三氯甲烷层萃取物干燥粉末3g,加水10mL溶解,加水至30mL,于70℃水浴加热使溶解,作为上柱液,以2BV·h<sup>-1</sup>的流速通过处理好的大孔树脂柱,吸附0.5h,将洗出液反复上样3次使吸附完全,用水4BV以2BV·h<sup>-1</sup>流速淋洗,分别加水及30%,50%,70%,90%的乙醇溶液以2BV·h<sup>-1</sup>流速进行洗脱,分段收集洗脱液,每100mL为1份,洗至洗脱液颜色变浅后换下一个梯度继续洗脱,将各段洗脱液减压浓缩至约10mL,水浴加热挥干溶剂,所得干膏研粉备用,计算各洗脱液中总皂苷质量分数依次为80.4%,56.8%,59.2%,6.7%,5.9%,表明随乙醇体积分数的增大,洗脱液中总皂苷含量逐渐降低,当乙醇体积分数>70%时,几乎无皂苷类成分被洗出。

按优选的工艺提取纯化胡芦巴总皂苷,结果见表2,表明随着总皂苷含量的增加,总皂苷得率和转移率逐渐下降,水层洗脱液中总皂苷得率和转移率最低,但含量最高。

### 3 讨论

目前皂苷类成分定量分析的常用方法包括高氯酸法、香草醛-冰醋酸-高氯酸法、茴香醛-浓硫酸法,

表2 各提取纯化步骤中胡芦巴总皂苷得率、含量及转移率

样品	得率/%	质量分数/%	转移率/%
原药材	-	4.03	-
胡芦巴醇浸膏	16.67	8.60	35.57
三氯甲烷层萃取物	1.05	40.00	10.42
水层洗脱液	0.32	80.50	6.39

其中香草醛-冰醋酸-高氯酸法最大检测波长明显,反应相对稳定<sup>[6]</sup>,故本文采用该法测定总皂苷含量。张新<sup>[7]</sup>研究发现胡芦巴中含有丰富的甾体皂苷类成分,薯蓣皂苷元和雅莫皂苷元质量分数均在0.16%~1%,二者在此属其他植物中仅含0.15%~0.32%。测定总皂苷含量时需将其水解为薯蓣皂苷元,若水解不完全会出现皂苷类成分和皂苷元共2个吸收峰,会对总皂苷的检测产生影响。预试验曾对水解过程中盐酸浓度、水解时间和温度等参数进行了考察,以确保含量测定方法的准确性。

选用HPD-400型大孔吸附树脂对胡芦巴中三氯甲烷层总皂苷进行富集纯化,洗脱过程中溶液不仅明显澄清,大量的水溶性胶体、色素可被除去,而且该树脂对胡芦巴总皂苷具有较大的吸附量和较高的洗脱率,总皂苷纯度提高了一倍<sup>[4]</sup>。

胡芦巴总皂苷在整个纯化工艺中得率较低,但纯度较高。因为在回流提取过程中损失了部分皂苷类成分,同时在系统溶剂萃取过程中只针对纯度较高的三氯甲烷层进行了富集纯化,而乙酸乙酯层和正丁醇层亦含有部分皂苷类成分,在洗脱过程中只收集了总皂苷含量最高的水层洗脱液,故导致总皂苷的综合得率较低。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:225.
- [2] 杨卫星,黄红雨,王永江,等. 胡芦巴总皂苷的化学成分[J]. 中国中药杂志,2005,30(18):1428.
- [3] 万明,毛新民,李琳琳,等. 复方胡芦巴预防脂肪肝的实验研究[J]. 山东医药,2010,50(7):42.
- [4] 杜海胜,李稳宏,唐璇,等. 大孔吸附树脂分离纯化胡芦巴中总皂苷工艺[J]. 化学工程,2009,37(10):5.
- [5] 隋宏,容春娟,王文苹. 胡芦巴降脂有效部位的研究[J]. 时珍国医国药,2020,21(6):1394.
- [6] 沈晖,赵丛丛,刘曾,等. 紫外分光光度法测定薯蓣皂苷元含量的研究[J]. 食品研究与开发,2013,34(7):107.
- [7] 张新. 胡芦巴化学成分的研究进展[J]. 中国实用医药,2009,4(6):235.

[责任编辑 仝燕]