

重楼总皂苷的纯化工艺研究

孙治国^{1,2},张琳¹,田景奎¹,钟延强²,鲁莹² (1. 浙江大学,浙江 杭州 310058; 2. 第二军医大学药学院,上海 200433)

摘要 目的:优选重楼总皂苷的纯化工艺。方法:综合运用醇溶液调节 pH、醇提和大孔吸附树脂技术,以总皂苷含量、总皂苷收率为指标,优选重楼总皂苷的纯化工艺。结果:优化后的重楼总皂苷的纯化工艺条件为:70%乙醇提取液调节 pH 值至 9,抽滤,将滤液调 pH 值至中性,浓缩至 0.5 g 生药/mL,调 pH 值至 8,离心(4 000 r/min, 30 min),上清液部分上 D101 大孔树脂柱纯化(上样量为 70%饱和吸附量,径高比为 1:5,上样流速为 4.5 BV/h,纯化溶剂为 20%乙醇,用量为 6 BV,洗脱溶剂为 70%乙醇,用量为 8 BV,流速为 7 BV/h)。采用本工艺制备的中间体中总皂苷含量达 71.6%,总皂苷收率为 85.71%。结论:验证试验结果表明,优选出的工艺稳定、合理、可行。

关键词 重楼;总皂苷;纯化工艺

中图分类号:R943 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)06-0455-05

Studies on purification process of steroidal saponins from *Paris polyphylla*

SUN Zhi-guo^{1,2}, ZHANG Li¹, TAN Jing-ku¹, ZHONG yan-qiang², LU Ying² (1. Zhejiang University, Hangzhou 310028, China; 2. College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the purification process of saponins from *Paris polyphylla* Smith. **Methods:** According to the purity and gaining rate of total saponins, the optimum purifying process was obtained by a combination of adjusted the pH in alcohol solution, alcohol extracting-water precipitating and macroporous resin techniques. **Results:** The optimum purification conditions were obtained as follows: 70% alcohol solution, the pH of which was adjusted to 9, was suckingly filtrated. After the pH to 7, the filtrate was concentrated to 0.5 g/mL and then centrifuged (4 000 r/min, 30 min). The clear supernatant liquid was purified by D101 macroporous resin (loading sample volume: 70% adsorption capacity, column diameter vs height 1:5, loading flow rate: 4.5 BV/h, purification solvent: 20% alcohol, volume: 6 BV, eluting solvent: 70% alcohol, volume: 8 BV, eluting flow rate: 8 BV/h). The purity and gaining rate of total saponins prepared by the optimum process were 71.6% and 85.71% respectively. **Conclusion:** The purification process of saponins obtained by this experiment is steady, reasonable and feasible.

KEY WORDS *Paris polyphylla*; total saponins; purification process

重楼具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效,用于治疗臃肿、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌打伤痛、惊风抽搐等症^[1],甾体皂苷是其主要有效成分,具有止血、祛痰和抑菌、镇痛镇静、抗早孕杀灭精子、抗细胞毒等作用,现已从重楼中分离鉴定了 44 种甾体皂苷,此外,尚含 C21 孕甾烷苷、脂肪酸酯、甾醇及其苷、黄酮苷、蜕皮激素及多糖^[2,3];重楼中含有大量淀粉、蛋白质、果胶及脂溶性成分,很难分离精制^[4]。

重楼总皂苷的纯化工艺研究已有研究报道,采用大孔树脂进行纯化^[4],也有报道中采用乙醇提取、膜过滤、吸附树脂、脱色树脂和活性炭组合脱色、丙酮脱脂等单元操作组合进行纯化^[5]。由于重楼

总皂苷水溶性差,大量重楼总皂苷在提取液浓缩时沉淀析出,单纯采用大孔树脂纯化重楼总皂苷回收率较低。膜过滤结合大孔树脂吸附法克服了有效成分回收率低的缺点,但是工艺步骤繁琐,乙醇用量多,并且在脱色时,使用丙酮等有机溶剂,增加了生产的成本和危险性。

本工艺综合运用醇溶液调 pH 值法、醇提和大孔吸附树脂技术,以总皂苷的含量、总皂苷收率为指标,对重楼总皂苷的纯化工艺进行优选,确定了一种新的重楼总皂苷纯化工艺。

1 仪器与材料

752PC 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),CP225D 型电子天平(十万分之一,北京赛多利斯仪器系统有限公司);Anke TDL-5 离心机(上海安亭科学仪器厂);SH MADZU LC-10AVP 高

效液相色谱仪(日本岛津);所用试剂均为分析纯。

重楼皂苷、重楼皂苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为:111591-200402,111590-200402,纯度>98%)。药材购自杭州中药饮片厂,经浙江大学现代中药研究所田景奎副教授鉴定,重楼为百合科(Liliaceae)重楼属(Paris)植物 *Paris polyphylla* var *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz 的干燥根茎,药材中总皂苷含量为 4.51%,重楼皂苷 I 重楼皂苷 总量为 1.9%,符合《中国药典》2005 年版一部的规定。

2 方法与结果

2.1 评价指标及测定方法 以重楼皂苷为对照品,按文献^[6],采用高氯酸显色法,测定重楼总皂苷;按《中国药典》2005 版一部附录 X A 浸出物测定法测定重楼总皂苷中间体重量。以中间体的总皂苷含量和收率为评价指标,其中:

$$\text{皂苷含量}(\%) = \frac{\text{总皂苷质量}}{\text{中间体质量}} \times 100\%$$

$$\text{皂苷收率}(\%) = \frac{\text{处理后样品中皂苷量}}{\text{处理前样品中皂苷量}} \times 100\%$$

2.2 重楼提取液的制备 取重楼饮片,用 70%乙醇提取 2 次,第一次用 10 BV 提取 2 h,第二次用 8 BV 提取 1.5 h,合并提取液,滤过,定容至 0.05 g 药材/mL。

2.3 纯化工艺研究

2.3.1 提取液的澄清处理^[6]

2.3.1.1 pH 调节剂优选 精密吸取提取液两份,分别逐渐加入 Ca(OH)₂ 饱和水溶液和 5% NaOH 水溶液调 pH 至 8。结果见表 1。

表 1 pH 调节剂优选结果

pH 调节剂 (调 pH 至 8)	沉淀析出情况	溶液澄清 情况	皂苷收率 (%)
Ca(OH) ₂ 饱和水溶液	有较多量絮状沉淀析出	澄清透明	71.2
5% NaOH 水溶液	有较多量沉淀析出	澄清透明	99.6

由表 1 结果可知,用 Ca(OH)₂ 饱和水溶液作为澄清剂会导致大量皂苷损失,用 5% NaOH 水溶液作为澄清剂能达到较好的澄清效果,并且不会引起皂苷的损失,因此 pH 调节剂应选用 5% NaOH 水溶液。

2.3.1.2 pH 值优选 取提取液适量,先调 pH 值至 7,观察沉淀析出情况,静置 2 h,离心(4 000 r/min, 30 min),再同法依次调 pH 值至 11,观察沉淀析出情况,结果调 pH 值至 7、8、9 均有沉淀析出,调 pH 值至 10、

11 时已无沉淀析出。表明,调 pH 至 9 时,沉淀已经基本析出完全。因此,将 pH 值确定为 9。

2.3.2 水沉工艺条件优选 采用单因素试验法,以重楼总皂苷的含量和收率为指标,对浓缩程度、浓缩液 pH 值、洗涤水用量等因素进行考察。

2.3.2.1 浓缩程度的影响 取 2.2 项下提取液 3 份,每份 250 mL,分别浓缩至 0.25、0.5、1 g 生药/mL,于 4℃ 冰箱中,静置过夜,离心(4 000 r/min, 30 min),倾出上清液,沉淀物用乙醇溶解,定容至 100 mL,测定总皂苷浓度和提取物重量,并计算总皂苷含量和收率。结果见表 2。

表 2 浓缩程度对重楼皂苷纯度的影响

浓缩程度(g生药/mL)	皂苷含量(%)	皂苷收率(%)
1	57.2	53.0
0.5	62.8	47.0
0.25	63.1	39.5

由表 2 可知,沉淀物中总皂苷的含量随药液浓度减小而增加,但收率相应降低,药液浓缩至 0.5 g 生药/mL 时,沉淀物中总皂苷的含量和收率均较高,因此,提取液以浓缩至 0.5 g 生药/mL 为宜。

2.3.2.2 浓缩液 pH 值的影响 取 2.2 项下重楼提取液 4 份,每份 250 mL,均浓缩至 0.5 g 生药/mL,第一份不调 pH 值,其余 3 份分别调 pH 值至 8、9、10,静置过夜,离心(4 000 r/min, 30 min),倾出上清液,沉淀物用乙醇溶解,定容至 100 mL,测定总皂苷浓度和提取物重量,并计算总皂苷含量和收率。结果见表 3。

表 3 pH 值对重楼浓缩液总皂苷收率的影响

pH 值	皂苷含量(%)	皂苷收率(%)
8	67.3	46.7
9	68.0	46.4
10	67.8	46.5
6(不调)	62.5	47.1

由表 3 可知,浓缩液的 pH 值增加,对总皂苷收率的影响较小,但总皂苷含量均有提高,由于调 pH 值至 8、9、10 总皂苷含量变化不大,因此,浓缩液以调 pH 值至 8 为宜。

2.3.2.3 洗涤水用量的影响 取 2.2 项下重楼提取液 3 份,每份 250 mL,均浓缩至 0.5 g 生药/mL,调 pH 值至 8,静置,离心(4 000 r/min, 30 min),倾出上清液后分别用相当于生药量(mL/g) 0.5、1、2 倍量水洗涤沉淀,离心(4 000 r/min, 30 min),倾出水液,与上清液合并后,用大孔树脂纯化;沉淀物用乙醇溶解,定容至 100 mL,测定总皂

苷浓度和提取物重量,并计算总皂苷含量和收率,结果见表 4。

表 4 洗涤水用量对重楼总皂苷纯化结果的影响

洗涤水用量 (V/g)	皂苷含量 (%)	皂苷收率 (%)
0.5倍	74.9	46.0
1倍	81.7	44.3
2倍	82.8	43.5

由表 4可知,随着洗涤水用量的增加,总皂苷含量亦随之增加,但是 1倍量与 2倍量差别不大。由于洗涤水用量增加会导致上清液体积增加,给上清液的大孔树脂纯化带来困难,因此,将洗涤水用量确定为 1倍量。

2.3.3 上清液的大孔树脂纯化工艺优选 上清液中尚含约 50%的重楼总皂苷,因此,在采用单因素

试验法对影响大孔树脂纯化的因素进行考察的基础上,采用正交试验,优选上清液的大孔树脂纯化工艺条件。

2.3.3.1 树脂种类的优选 以总皂苷比吸附量 (mg/g干树脂)为指标,对树脂进行优选。取经预处理的 8种大孔树脂各 10 mL,分别置于已恒重并称定重量的称量瓶中,水浴挥干后,转至 105 烘箱中干燥 4 h,放冷,称重,测干树脂重。另取经预处理的 8种大孔树脂各 10 mL,分别装入 8根内径 1 cm的玻璃柱中,分别取上清液 50 mL (0.392 g生药/mL),反复上样 5次;用 5 BV的水洗树脂柱,然后用 3 BV的 70%乙醇洗脱,再用 3 BV的 95%乙醇洗脱,乙醇洗脱液减压浓缩,干燥,测定洗脱物皂苷含量和重量,计算皂苷比吸附量,结果见表 5。

表 5 不同型号树脂对重楼总皂苷吸附性能的比较

树脂型号	D101	D201	D301	AB-8	HPD600	HPD700	HPD750
皂苷比吸附量 (mg/g)	126.90	96.30	108.00	92.40	94.10	124.90	81.00

由表 5结果可知,D101树脂对重楼皂苷的吸附性能优于其它型号树脂,因此,选择 D101树脂对上清液进行纯化。

2.3.3.2 动态饱和吸附量的测定 取上清液 450 mL (0.392 g生药/mL)全部流过树脂柱后,先用水 200 mL冲洗树脂,然后分别用 70%乙醇 100 mL和 90%乙醇 50 mL洗脱,收集洗脱液,乙醇洗脱液减压浓缩,干燥,测定洗脱物皂苷含量和重量,经计算,D101大孔树脂的总皂苷饱和吸附量为 182.96 mg/g干树脂。

2.3.3.3 上柱吸附工艺条件优选 用正交试验,以总皂苷收率为指标,以上样量、径高比、流速为考察因素,各分设 3水平,因素水平见表 6。取上清液 (0.392 g生药/mL),按表 7安排流过树脂柱后,先用 12.5 BV柱的去离子水冲洗树脂,然后用 12.5 BV柱的 70%乙醇对树脂进行洗脱,收集洗脱液,测定并计算总皂苷收率,结果见表 7、表 8。

方差分析结果表明,A、B两因素具有显著性影响,C因素无显著性影响,极差分析表明,最佳工艺为 A₁B₃C₁,但 B₂、B₃差别较小,减小径高比有利于实际生产,可选 B₂,因此,优选出的上样工艺条件为 A₂B₂C₃,即上样量为 70%饱和上样量,树脂柱径高比为 1:5,流速为 4.5 BV/h⁻¹。

表 6 因素水平表

水平	因素		
	上样量 A (mg/g干树脂)	径高比 B	上样流速 C (BV)
1	50%饱和吸附量	1:3	1.5
2	70%饱和吸附量	1:5	3.0
3	90%饱和吸附量	1:7	4.5

表 7 正交试验结果 (n=2)

试验号	A	B	C	D	总皂苷收率 (%)
1	1	1	1	1	78.83
2	1	2	2	2	85.77
3	1	3	3	3	83.60
4	2	1	2	3	72.57
5	2	2	3	1	80.42
6	2	3	1	2	85.97
7	3	1	3	2	69.04
8	3	2	1	3	80.80
9	3	3	2	1	80.14
K ₁	82.733	73.480	81.867	79.797	
K ₂	79.653	82.33	79.493	80.260	
K ₃	76.660	83.237	77.687	78.99	
R	6.073	9.757	4.180	1.270	

表 8 方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F比	显著性
A	55.332	2	22.329	*
B	174.337	2	70.354	*
C	26.369	2	10.641	
误差	2.48	2		

F_{0.05(2,2)} = 19.00, * P < 0.05

2.3.3.4 洗脱工艺条件优选^[7] 用正交试验,以总皂苷含量和收率为指标,以乙醇浓度、溶剂用量、流速为考察因素,各分设 3 水平,因素水平见表 9。取大孔树脂 31 mL 装柱(柱子内径 2 cm),取上清液(0.392 g 生药/mL) 84 mL 上柱吸附后,用水洗至无色,然后按表 10 安排进行洗脱,收集洗脱液,测定并计算总皂苷含量和收率,结果见表

10、表 11、表 12。

表 9 因素水平表

	乙醇浓度 A (%)	溶剂用量 B (BV)	流速 C (BV/h)
1	50	4	3
2	70	8	5
3	90	12	7

表 10 正交试验结果表 ($n=2$)

试验号	因素				评价指标	
	A	B	C	D	总皂苷含量 (%)	总皂苷收率 (%)
1	1	1	1	1	45.94	40.64
2	1	2	2	2	48.36	54.04
3	1	3	3	3	48.46	55.71
4	2	1	2	3	51.46	59.90
5	2	2	3	1	52.73	75.98
6	2	3	1	2	52.95	75.81
7	3	1	3	2	52.74	73.30
8	3	2	1	3	51.60	73.30
9	3	3	2	1	51.97	75.81
总皂苷含量	K ₁	47.587	50.047	50.163	50.213	
	K ₂	52.380	50.897	50.597	51.350	
	K ₃	52.103	51.127	51.310	50.507	
	R	4.793	1.080	1.147	1.137	
总皂苷得率	K ₁	50.130	57.947	63.250	63.810	
	K ₂	70.230	67.440	63.250	67.717	
	K ₃	74.137	69.110	67.997	62.970	
	R	24.007	11.163	4.747	4.747	

表 11 总皂苷含量方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
A	43.453	2	20.801	*
B	1.942	2	0.930	
C	2.011	2	0.963	
误差	2.09	2		

$F_{0.05(2,2)} = 19.00$, * $P < 0.05$

表 12 总皂苷收率方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
A	995.592	2	25.861	*
B	217.532	2	5.650	
C	45.062	2	1.171	
误差	38.50	2		

$F_{0.05(2,2)} = 19.00$, * $P < 0.05$

方差分析结果表明, A 因素具有显著性影响,由于 A₂ 与最佳水平 A₃ 差别较小,为节约成本,可选 A₂; B 因素虽无显著性影响,但总皂苷收率的极差较大,宜选 B₂; C 因素无显著性影响,且极差较小,宜选 C₃。因此,优选出的洗脱工艺条件为 A₂B₂C₃,即洗脱溶剂为 70%乙醇,用量为 8 BV,流速为 7 BV/h。

2.3.4 验证试验 取重楼饮片 3 份,每份 400 g,按

优选的工艺条件,进行 3 批试验。3 批中间体的总皂苷的含量为 71.6%、73.1%、70.1%,平均含量为 71.6%, RSD 为 2.1%;总皂苷收率 85.65%、85.75%、85.73%,平均收率为 85.71%, RSD 为 2.37%;按文献^[1]方法测定,3 批中间体的重楼皂苷 I 重楼皂苷 含量之和为 39.07%、40.09%、40.71%,平均含量为 40.29%, RSD 为 3.3%。结果表明,该工艺稳定可行,重现性好。

3 讨论

3.1 优化后的重楼总皂苷的纯化工艺为:调节 70%乙醇提取液 pH 值至 9,抽滤,将滤液调 pH 值至中性,浓缩至 0.5 g 生药/mL,调 pH 值至 8,离心(4 000 r/min),用相当于一倍生药量的去离子水洗涤沉淀,再离心,合并上清液,上 D101 大孔树脂柱纯化,上样量为 70%饱和吸附量,径高比为 1:5,上样流速为 4.5 BV/h,纯化溶剂为 20%乙醇,用量为 6 BV,洗脱溶剂为 70%乙醇,用量为 8 BV,流速为 7 BV/h,合并沉淀和大孔树脂纯化部分即得重楼总皂
(下转第 469 页)

规定,设计了门诊病历和处方,单独安排一个帐篷做为药房,并安排 1 名药师、1 名护士 24 h 值班,严格药材出入库登统计,伤病员必须凭医师处方或队领导签字拿药,杜绝不合理用药。

2.5 友邻互助,联合保障 灾后大量医疗队赶赴灾区,但我们始终牢记使命,坚持只要有利于当地群众和部队官兵的事情我们就办的原则,不管是乡卫生院、部队卫生队还是其他医疗队缺少药品,我们都全力保障,这样,他们通过自己的运输渠道把药品运往汶川救灾一线的同时也相应的减轻了我驻汶川三江、映秀等几个分队药品保障压力。

3 体会

3.1 要重视和加强药材储备工作 医院应根据各种应急保障方案建立相应的药材保障方案,储备一定数量的药品、耗材^[4],并建立信息网络体系,紧急条件下提供寻找短缺应急药材的途径,确保应急处理所需的应急药材的及时供应。

3.2 要注重做好药材后续保障工作 执行保障任务时,携带的保障药品有限,药材补充工作应该在执行任务开始就着手准备,在远离后方医院的情况下,药材补给应实行两条腿走路^[5],与驻地部队和地方药材供应站都建立联系,提高将医疗队需求与之沟

通,避免药品断供。

3.3 要加强药材管理发挥保障效能 对药材请领、保管、出库、使用实行全面监控,严把质量关,保证用药安全;按照储存条件储存药品,严格使用管理,做到对症用药,避免浪费。

3.4 要注重携带装备成系统配套化 执行这次救灾任务,有的医疗队携带了手术设备,却没有携带检验设备,许多大手术仍无法进行;有的携带了便携式 X 线但却因帐篷没有屏蔽措施仍无法应用;有的携带大量装备却没有足够的发电设备,装备不能发挥作用,无形中造成了浪费。

参考文献:

- [1] 唐海英,马传新.中俄联合军事演习药材保障的做法和体会[J].药实践杂志,2007,25(1):51.
- [2] 吴志成,赵斌,周传华.抗雪救灾药材保障的几点思考[J].东南国防医药,2008,10(2):145.
- [3] 王海青.老山地区战转平后的药材保障初探[J].西南国防医药,2003,13(1):96.
- [4] 高乃武,周金生,杨韶明.提高野战药材保障能力的探讨[J].华南国防医学杂志,2002,16(1):39.
- [5] 陈星伟,李树南,朱贤光.驻湘抗洪抢险部队卫生防疫药材保障思路[J].解放军预防医学杂志,1998,10:374.

收稿日期:2009-01-04

(上接第 458 页)

苷有效部位。

3.2 重楼提取液中有胶状物存在,影响溶液的澄明度,并且影响成品的溶解性。采用醇溶液调 pH 值法使胶状物沉淀析出^[8],同时除去了一部分鞣质等酚酸性成分,有利于总皂苷的进一步纯化。

3.3 重楼皂苷为甾体皂苷,在水中溶解度较小,在回收乙醇及浓缩过程中会析出大量沉淀,且沉淀中皂苷含量较高。本工艺将醇提水沉法和大孔树脂技术相结合,将总皂苷分成沉淀和上清液两部分,分别进行纯化。通过采用醇提水沉法处理,可使沉淀中总皂苷含量达 80% 以上,总皂苷收率达 40% 以上;而且浓缩液中分离出部分皂苷后,上清液中澄清透明,既避免了浓缩液直接上柱导致大孔树脂柱堵塞的缺点,又减少了树脂的用量,提高了树脂的使用效率。

3.4 在上清液部分的纯化研究中,首先采用单因素试验法,对上样量、洗涤水用量、洗脱溶媒及用量进行初步考察,然后根据单因素试验结果,确定正交试验的因素与水平,优选出最佳纯化工艺。

3.5 采用本工艺制备的中间体中,总皂苷含量达

71.6%,总皂苷收率为 85.71%,重楼皂苷 I 重楼皂苷 II 含量之和为 40.29%。验证试验结果表明,该工艺设计合理,工艺稳定性好,适于工业化生产,具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] 中国药典 2005 年版.一部[S].2005:183.
- [2] 武珊珊,高文远,段宏泉,等.重楼化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2004,35(3):345.
- [3] 国家中医药管理局.《中华本草》[M].上海:上海科学技术出版社,1999:132.
- [4] 张文英,万近福,王真.重楼乙醇提取液的微滤过程[J].中国医药工业杂志,2004,35(5):275.
- [5] 年四辉,王扣,罗燕.树脂技术用于重楼总皂苷纯化工艺的研究[J].云南中医中药杂志,2006,27(1):44.
- [6] 徐学民,钟炽昌,熊治乐,等.重楼皂苷成分的含量测定研究[J].中草药,1986,17(11):13.
- [7] 魏英勤,房海燕,袁久荣.正交设计法优化黄连提取液大孔树脂洗脱条件[J].中国药业,2003,12(6):46.
- [8] 曹春林,施顺清.《中药制剂注解》[M].上海:上海科学技术出版社,1995:268.

收稿日期:2009-07-08