

瓜子金总皂苷的含量测定及其纯化工艺研究^Δ

王洪兰^{1*}, 张亚楠², 陈丽红¹, 李祥^{1#} (1.南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2.第二军医大学航海与潜水医学教研室, 上海 200433)

中图分类号 R284.2; R282.17 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3670-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.08

摘要 目的:建立瓜子金总皂苷含量测定的方法学,研究瓜子金中总皂苷的纯化工艺。方法:采用紫外分光光度法测定瓜子金中总皂苷含量,考察大孔树脂吸附、富集、纯化瓜子金总皂苷工艺。结果:瓜子金总皂苷在测定范围内均显示较好的线性关系($r=0.9997$);精密性、重复性、稳定性试验中RSD值均小于3.00%;加样回收率平均值为99.51%。大孔树脂纯化试验结果表明,70%乙醇洗脱部位总皂苷含量达71.53%。结论:本研究所建立的方法快速、准确,可测定瓜子金总皂苷的含量;大孔树脂可有效富集、纯化总皂苷,为远志属药用植物瓜子金资源的综合利用提供理论支撑。

关键词 瓜子金;总皂苷;含量测定;大孔吸附树脂

Content Determination and Purification Technology of Total Saponins from *Polygala japonica*

WANG Hong-lan¹, ZHANG Ya-nan², CHEN Li-hong¹, LI Xiang¹ (1.School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210046, China; 2.Dept. of Sailing and Diving Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination and purification technology of total saponins from *Polygala japonica*. METHODS: The content of total saponins from *P. japonica* was determined by UV visible spectrophotometry. The enrichment and purification of total saponins from *P. japonica* was determined by macro-porous resin adsorption chromatography. RESULTS: The amount of total saponins from *P. japonica* showed good linear relationship in the range of determination ($r=0.9997$). RSDs of precision, repeatability and stability tests were all less than 3.00%. The average recovery rate was 99.51%. The content of total saponins in 70% ethanol elution fraction was 71.53% in macro-porous resin purification test. CONCLUSIONS: The established method is rapid, accurate and can be applied for the content determination of total saponins from *P. japonica*. The enrichment and purification of total saponins can be determined by macro-porous resin, which provide theoretical support for comprehensive utilization of the resource of *P. japonica*.

KEYWORDS *Polygala japonica*; Total saponins; Content determination; Macro-porous resin

瓜子金始载于《植物名实图考》,又名小远志、地藤草、银不换,是远志科远志属植物瓜子金(*Polygala japonica* Houtt.)的全草,主要分布于我国南方各省^[1]。瓜子金味苦、微辛,性平,能镇咳祛痰、益智安神、活血散瘀,民间应用十分普遍且疗效显著。瓜子金中的化学成分包括三萜皂苷、黄酮、寡糖酯等,已有研究表明,瓜子金中的三萜皂苷类化合物具有显著的生理活性^[2-6]。大孔吸附树脂是一类非离子型高分子化合物,具有吸附性和筛选性相结合的分选、纯化等功能,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^[7-10]。本研究以吸附容量、洗脱率、精制度为评价指标,考察大孔吸附树脂纯化瓜子金总皂苷的工艺条件,进一步探索纯化瓜子金总皂苷的工艺流程。

1 材料

1.1 仪器

752型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);

^Δ基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目(No.2011 ZYX6-004);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(No.20103237 120011)

*副教授,博士。研究方向:中药及复方药效物质基础。电话:025-85811512。E-mail: honglanwang2004@163.com

#通信作者:教授,博士研究生导师,博士。研究方向:中药及复方药效物质基础。电话:025-85811512。E-mail: lixiang_8182@163.com

420型三用恒温水箱(江苏国盛实验仪器厂);RE52CS型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器设备厂);EK-182A型电子分析天平(河南兄弟仪器设备有限公司)。

1.2 药材

瓜子金购于江苏省药材有限公司,经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为真品,凭证标本(GZJ-PJ-2010-09)存放于南京中医药大学中药化学教研室。

1.3 试剂

瓜子金总皂苷对照品(南京中医药大学药学院中药化学实验室自制,纯度: $>95\%$);D101, AB-8大孔树脂(南开大学化工厂);石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇、高氯酸、冰醋酸、香草醛均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 瓜子金醇提物的制备

取瓜子金药材饮片9 kg,乙醇回流提取3次,浓缩得总浸膏约1 500 g。

2.2 总皂苷含量的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取瓜子金总皂苷对照品50.0 mg,置10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得对照品溶液(每1 ml中含瓜子金总皂苷对照品5 mg)。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取瓜子金醇提物浸膏2.0

g,加水 50 ml 溶解后,用水饱和的乙酸乙酯萃取 3 次,每次 25 ml,合并水层,转移至量瓶并定容至 100 ml,即得供试品溶液。

2.2.3 测定波长的选择 精密量取供试品溶液 0.25 ml 和对照品溶液 0.2 ml,分别置 10 ml 具塞试管中,水浴挥干溶剂,分别加入 0.2 ml 的 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 ml 高氯酸,摇匀,置于 60 ℃ 水浴中加热 15 min,冷却后分别加入冰醋酸 5 ml,摇匀,放置 10 min,于紫外分光光度计下进行全波长扫描,随行试剂作空白。扫描结果发现,两者在 580 nm 波长处均有较大吸收,故确定最适检测波长为 580 nm。

2.2.4 标准曲线的制备 精密量取 5.00 mg/ml 对照品溶液 0.10、0.20、0.30、0.35、0.40 ml,置于 5 支具塞刻度试管中,随行试剂作空白,按“2.2.3”项下方法显色并进行紫外测定。以吸光度(y)为纵坐标,对照品进样量(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=0.3694x+0.1018$ ($r=0.9997$)。结果表明,对照品进样量在 0.5~2.0 mg 范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.2.5 精密密度试验 精密量取对照品溶液 0.2 ml,按“2.2.3”项下方法显色并进行紫外测定,在 580 nm 波长处测定吸光度,平行测定 6 次。结果, $RSD=0.41%$,表明仪器精密密度良好。

2.2.6 稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备 1 份供试品溶液,精密量取 0.25 ml,按“2.2.3”项下方法显色并进行紫外测定,每隔 10 min 测定吸光度,连续测定 1 h。结果,30 min 内的 $RSD=2.37%$,表明供试品溶液在 30 min 内稳定,故测定时间最好控制在 30 min 以内。

2.2.7 重复性试验 按照“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,精密量取 0.25 ml,按“2.2.3”项下方法显色并进行紫外测定。结果, $RSD=1.52%$,表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取 6 份样品粉末各 1.0 g,分别加入一定量的对照品,按照“2.2.2”项下方法制备成 6 份供试品溶液,精密量取 0.25 ml,按照“2.2.3”项下方法显色并进行紫外测定,计算加样回收率。结果表明,平均加样回收率为 99.51%, $RSD=2.92%$ 。

2.2.9 样品含量测定 分别精密称取 3 份瓜子金醇提取物浸膏 2.0 g,按照“2.2.2”项下方法制备得 3 份供试品溶液,分别精密量取 0.25 ml,按照“2.2.3”项下方法显色并进行紫外测定,计算总皂苷含量。结果表明,瓜子金总皂苷的平均含量为 20.88%, $RSD=0.89%$ 。

2.3 瓜子金总皂苷的纯化工艺研究

2.3.1 大孔树脂的预处理、装柱与再生 将 D-101、AB-8 两种型号树脂均用 95% 乙醇浸泡 24 h 后,湿法装柱,用 5 倍柱体积 95% 乙醇洗脱,水洗至无醇味,然后依次用 5% 盐酸(浸泡 6 h,洗脱 3 倍柱体积,水洗至中性)和 5% 氢氧化钠(浸泡 6 h,洗脱 3 倍柱体积,水洗至中性)处理,之后用 95% 乙醇洗脱,至乙醇洗脱液与水 1:5(V/V)混合不呈白色混浊为止,最后水洗至无醇味,取部分湿树脂备用。将剩余树脂置真空干燥器中于热力学温度(T) 333 K 干燥至恒质量得干树脂,备用。

2.3.2 大孔树脂类型与选择 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^[11-12]。本研究以吸附容量为指标,对 D101、AB-8 大孔吸附树脂的吸附能力进行考察,以确定富集、纯化瓜子金总皂苷的大孔吸附树脂类型。分别取上述处理得到的大孔树脂 D101、AB-8 各 10 g(干质量),以蒸馏水湿法装柱(一柱床约 100 ml),精密量取瓜子金醇提取物溶液各 10 ml,分别上样于上述两种树脂柱内,预吸附 2 h,流速 1 BV/h(BV 为柱床体积),过柱流出液重吸附 2 次,收集流份。测定流份中瓜子金总皂苷含量,比较树脂吸附量。结果表明,D101 大孔吸附树脂吸附量较大,故选择 D101 大孔吸附树脂纯化、富集瓜子金总皂苷。D101、AB-8 两种树脂吸附能力比较见表 1。

表 1 D101、AB-8 两种树脂吸附能力比较(mg)

Tab 1 Comparison of adsorption ability between D101 and AB-8(mg)

树脂型号	上柱液中总皂苷量	过柱液中总皂苷量	树脂吸附总皂苷量
D101	41.76	5.78	35.98
AB-8	41.76	16.65	25.11

2.3.3 洗脱溶媒的确定 精密量取瓜子金醇提取物供试品溶液 10 ml,依次用蒸馏水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇各 4 BV 洗脱,洗脱速度 1 BV/h,按 1 BV/份(100 ml)收集流份。测定各流份中瓜子金总皂苷含量,计算洗脱率。结果表明,50% 乙醇和 70% 乙醇洗脱部位为瓜子金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% 乙醇作为瓜子金总皂苷类成分的洗脱溶媒。蒸馏水、30% 乙醇洗脱时均有一定的固形物存在(但是因为含量比较少,无法每份流液均测得固形物具体含量,仅目测发现)。表明蒸馏水、30% 乙醇洗脱可达到除杂的目的。不同浓度乙醇洗脱试验数据见表 2[洗脱率=洗脱液中总皂苷量/树脂吸附总皂苷量×100%]。

2.3.4 洗脱溶媒用量的确定 精密量取瓜子金醇提取物供试品

表 2 不同浓度乙醇洗脱试验数据

Tab 2 Elution test of ethanol with different concentrations

洗脱溶媒	1 BV		2 BV		3 BV		4 BV	
	洗脱液中总皂苷量,mg	洗脱率,%	洗脱液中总皂苷量,mg	洗脱率,%	洗脱液中总皂苷量,mg	洗脱率,%	洗脱液中总皂苷量,mg	洗脱率,%
蒸馏水	2.35	6.53	-	-	-	-	-	-
30% 乙醇	-	-	-	-	-	-	-	-
50% 乙醇	4.71	13.09	7.69	21.37	2.77	7.70	2.35	6.53
70% 乙醇	9.16	25.46	-	-	-	-	-	-
95% 乙醇	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示未检出

note:“-” means no detected

溶液 10 ml,依法上柱,依次用蒸馏水 3 BV,30% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇各 4 BV 洗脱,洗脱速度 1 BV/h,以 1 BV/份收集流份。测定各流份中瓜子金总皂苷含量,计算洗脱率并测定固形物量。结果表明,蒸馏水洗脱用量至 1 BV 时,极少部分

瓜子金总皂苷析出;30% 乙醇洗脱用量至 4 BV 时,在流份中未检出瓜子金总皂苷;但 30% 乙醇洗脱至 3 BV 时有明显的固形物存在;而洗脱用至 4 BV 时未发现固形物。表明 30% 乙醇洗脱可达到除杂质的目的,并且可以初步确定 30% 乙醇用量为

3 BV。70%乙醇洗脱用量至2 BV时,瓜子金总皂苷已基本被解吸附完全;当70%乙醇用量至3 BV时,流出液中未检出皂苷类成分,但为了保证洗脱完全,故将乙醇用量加至3 BV。进一步

确定了洗脱溶媒用量为蒸馏水3BV、30%乙醇、70%乙醇各3 BV,收集70%乙醇洗脱部位。洗脱溶媒用量的确定见表3。

综上所述,初步确定最佳工艺为D101大孔吸附树脂纯化

表3 洗脱溶媒用量的确定

Tab 3 The amount of elution solvent

洗脱溶媒	1 BV		2 BV		3 BV		4 BV		固体量,mg
	洗脱液中总皂苷量,mg	洗脱率,%	洗脱液中总皂苷量,mg	洗脱率,%	洗脱液中总皂苷量,mg	洗脱率,%	洗脱液中总皂苷量,mg	洗脱率,%	
蒸馏水	2.12	5.89	-	-	-	-	-	-	49.79
30%乙醇	-	-	-	-	-	-	-	-	40.89
70%乙醇	24.46	67.98	2.46	6.84	-	-	-	-	33.25
95%乙醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示未检出

note:“-” means non detected

瓜子金总皂苷,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。

2.3.5 工艺验证试验 精密量取瓜子金醇提物溶液10 ml,依法上柱,平行2份,分别用蒸馏水、30%乙醇、70%乙醇各3 BV洗脱,洗脱速度1 BV/h,以1 BV/份收集流份。测定各流份中瓜子金总皂苷含量、固形物量,计算洗脱率及精制度。蒸馏水仅能够洗脱出少量的总皂苷,30%乙醇洗脱部位未检出瓜子金总皂苷,但30%乙醇洗脱部位有固形物存在,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71.53%,为其主要富集部位,且精制度达343.30%,纯化效果较好,表明所选工艺条件适宜瓜子金总皂苷的富集、纯化且重现性良好。工艺参数验证性试验结果见表4[瓜子金总皂苷精制度=(70%乙醇洗脱液固形物中总皂苷含量/瓜子金上柱液固形物中总皂苷含量)×100%]。

表4 工艺参数验证性试验结果

Tab 4 Results of technique parameter validation test

评价指标	试验1	试验2	平均结果
树脂吸附总皂苷量,mg	35.98	35.98	35.98
上柱液中总固形物中总皂苷含量,%	20.88	20.88	20.88
水洗脱部位总皂苷量,mg	2.36	2.62	2.49
水洗脱部位总固形物量,mg	50.13	49.70	49.92
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	42.75	43.66	43.21
70%乙醇洗脱部位总皂苷量,mg	26.35	25.12	25.24
70%乙醇洗脱部位总固形物量,mg	34.23	32.91	33.57
70%乙醇洗脱部位总固形物中总皂苷含量,%	71.26	72.10	71.68
70%乙醇洗脱部位洗脱率,%	73.24	69.82	71.53
瓜子金总皂苷精制度,%	341.28	345.31	343.30

3 讨论

皂苷类成分大多无色,在近紫外区无明显吸收峰,但与某些试剂反应后能产生颜色,利用这一性质可进行比色测定^[12]。本次紫外分光光度法测定瓜子金总皂苷含量发现,瓜子金总皂苷在一定范围内均显示较好的线性关系($r=0.9997$),精密性、重复性、稳定性试验测定结果显示,其RSD值均小于3.00%,回收率平均值为99.51%。使用紫外分光光度法测定瓜子金中总皂苷含量快速、准确。紫外分光光度法测定瓜子金总皂苷虽然反应比较灵敏、方法简单易行,但反应所产生的颜色受试剂的浓度、反应温度、反应时间等影响较大,因此试验过程中必须注意反应条件的控制。

大孔树脂吸附法是一种工艺简单、操作安全、节省成本且分离效果较好的分离方法。大孔吸附树脂是利用大孔树脂的多孔结构和树脂的选择性吸附功能,从中药提取液中分离精

制有效成分或有效部位的技术,它既有物理吸附作用,又因多孔状结构而能选择性筛析,所以在中药的总皂苷纯化富集工艺中有良好的发展前景。结果显示,大孔树脂70%醇洗部位总皂苷含量为71.68%,洗脱率可达71.53%。本研究得出纯化瓜子金总皂苷的工艺条件为D101大孔树脂纯化瓜子金总皂苷,蒸馏水、30%乙醇、70%乙醇3 BV,以1 BV/h速度依次洗脱,收集70%乙醇洗脱部位。

参考文献

- [1] 刘贤铭,王铁僧,姚淦.江浙闽台地区远志类药用植物资源整理及鉴定[J].时珍国医国药,2006,17(2):243.
- [2] Li TZ, Zhang WD, Yang GJ, et al. Saponins from Polygala japonica and their effects on a forced swimming test in mice[J]. *J Nat Pro*, 2006, 69(4):591.
- [3] Wang HL, Gao J, Zhu DN. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from Polygala japonica [J]. *Phyto-medicine*, 2008, 15(5):321.
- [4] 赵清超,黄显章,胡久略,等.瓜子金有效部位群抗炎作用机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):131.
- [5] 吴苗苗,苑玉和,胡金凤,等.瓜子金皂苷对MPP⁺诱导PC12细胞凋亡的保护作用[J].中国药理学通报,2012,28(4):473.
- [6] Sun F, Sun JD, Han N, et al. Polygalasaponin F induces long-term potentiation in adult rat hippocampus via NMDA receptor activation[J]. *Acta Pharm Sin*, 2012, 33(4):431.
- [7] 侯杰荣,谷勇,柯发敏,等.大孔吸附树脂技术在中药有效成分分离中的应用[J].实用中医药杂志,2011,27(5):344.
- [8] 欧阳丽娜,吴雪,李兰林,等.大孔吸附树脂富集纯化竹节参总皂苷工艺条件优选[J].中成药,2011,33(7):1163.
- [9] 张旭,王锦玉,全燕,等.大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):286.
- [10] 贺红军,邱宗荫.正交试验优选茅莓总皂苷的提取工艺[J].中国药房,2012,23(7):611.
- [11] 李崇明,熊富良,黄志军,等.新药研究中大孔吸附树脂型号与规格的选择应用[J].中成药,2008,30(8):1208.
- [12] 蔡宝昌.中药分析学[M].北京:人民卫生出版社,2012:190.

(收稿日期:2013-12-03 修回日期:2014-04-30)