

探讨 NKA-9 树脂分离七叶皂苷的效果

王绪英 赵永芳^{*}
(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要: 介绍了一种筛选七叶皂苷的树脂分离的简便程序, 即: 先用静态批量吸附法比较, 后用动态柱层析法确认。按此程序对所试的 5 种树脂 D4020, D101, NKA-9, H103, 201×4 和 1 种硅胶 G 分离七叶皂苷的效果进行了检测, 数据表明, 树脂 NKA-9 对七叶皂苷的吸附和解吸附性能均较好, 专一性也较强, 在实践中有一定的开发和应用价值。文中还对相关问题进行了讨论。
关键词: 七叶皂苷; 树脂; 纯化

中图分类号: R 284. 2; Q 503 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X(2002) 03-0225-04

The Effective Separation of Aescin with NKA-9 Resin

WANG Xu-Ying, ZHAO Yong-Fang^{*}
(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The authors introduced a simple and convenient procedure of sifting and separating aescin with resins: Firstly we used static state and batch adsorption method to compare. Secondly we affirmed it with dynamic state column chromatography. The effect of separation aescin with five resins (D101, D4020, H103 NKA-9 201×4) and silica Gel G was checked. The result indicated that NKA-9 resin has capacity of good adsorption, separative adsorption and specificity to aescin.
Key words: Aescin; Resin; Purification

七叶皂苷是中药娑罗子[(*Aesculi*), 欧洲七叶树(*Aesculus hippocastanum*), 日本七叶树(*Aesculus turbinata* Blume) 和中国天师栗(*Aesculus wilsonii* Rehd) 的果实或种子]^[1]提取物的主要活性成分。它具有消炎、抗渗出, 恢复毛细血管通透性, 提高静张力, 改善血液循环, 促进脑功能恢复等作用^[2]。七叶皂苷属于三萜皂苷类化合物, 其有效成分分为七叶皂苷 A、B、C 和 D^[3]。这类化合物极性大, 水溶性强, 据此特性, 近年来从娑罗子提取物中分离纯化七叶皂苷广泛采用 D101 大孔树脂法进行^[4]。而在国内尚未见到这方面的报道。本研究以 5 种树脂为分离材料进行比较试验, 结果表明 NKA-9 树脂对七叶皂苷选择性好, 吸附量大, 解吸附容易, 这为有效

开发利用中药娑罗子资源提供有实用价值的分离方法。

1 实验仪器及材料

DS200 高速度组织捣碎机, 6511 型电动搅拌机, H. H. S 恒温水浴锅, T21 型分光光度计, HQ 45 恒温摇床, G328B 光学读数天平, BS-100A 自动部分收集器, BECKMAN 高速冷冻离心机(日本), 硅胶 GF-254 薄板(上海), DGB/20-002 干燥箱, 层析柱(1 cm×12 cm), 抽滤装置, 真空干燥箱, HL-2 恒流泵。

娑罗子购于皖亳州市沙土供销社, 七叶皂苷由

收稿日期: 2001-11-21, 修回日期: 2002-03-04。
作者简介: 王绪英(1971-), 女, 讲师, 现为武汉大学在读研究生, 从事生物化学研究。
^{*} 通讯作者。

湖北省药检所提供。树脂 NKA-9, H103, D4020 购于南开大学化工厂; 树脂 D101 购于天津友昌工贸公司。所用试剂(除特殊指明外)均为分析纯。

2 方法

2.1 粗皂苷的制备^[5]

称取 100 g 娑罗子, 用 3 倍量 60% 的乙醇提取 3 次, 合并提取液浓缩至无醇味, 分别用 3 倍量的乙酸乙酯及水饱和正丁醇各萃取 3 次, 合并正丁醇萃取液, 浓缩, 加少量甲醇溶解后, 倾入 14 倍于该溶液的丙酮中, 置冰箱中过夜, 离心(0 ~ 8 000 r/min, 15 min), 取沉淀, 加水溶解, 作为粗皂苷溶液。

2.2 树脂的处理^[6]及其与粗皂苷的吸附和解吸附

称取一定量的树脂, 先用蒸馏水浸泡 4 h, 接着用 1 mol/L 的 HCl 浸泡 1.5 h, 水洗至中性, 抽滤后改用 1 mol/L NaOH 浸泡 1.5 h, 水洗至中性, 再用酒精浸泡过夜, 水洗至无醇味, 将处理毕的树脂与粗皂苷溶液充分混合 1 h 后, 水洗 10 min, 随之用不同浓度酒精(60%, 80%, 100%)依次分别洗脱 20 min, 收集的洗脱液为纯化的七叶皂苷溶液。

2.3 七叶皂苷的含量测定

基本按张新的方法^[7]。取适量七叶皂苷成品, 制成浓度为 4.7 mg/mL 的水溶液即为七叶皂苷标准溶液。称取 FeCl₃ 45 mg, 加入冰醋酸 20 mL 使之溶解, 在冷却条件下缓缓加入浓 H₂SO₄ 10 mL, 充分

混匀, 即为显色液。

标准曲线的制作: 取标准品 10 μ L, 20 μ L, 60 μ L, 80 μ L, 100 μ L 分别置不同试管中, 用蒸馏水补足总体积至 100 μ L, 各试管中加入显色液 3 mL, 并以显色液作为空白对照, 60 $^{\circ}$ C 水浴加热 30 min, 立即冷却至室温, 置可见分光光度计测 535 nm 波长下的消光值($A_{535\text{ nm}}$), 以 $A_{535\text{ nm}}$ 为纵坐标, 以七叶皂苷浓度为横坐标, 即可绘制出标准曲线。

七叶皂苷样品含量测定: 精确取供试品溶液 100 μ L, 置试管中, 按上述方法测定其消光值, 按此值大小即可在标准曲线上查出其浓度的高低。

2.4 薄层层析

按国家药品监督管理局药品标准进行^[8]。以甲醇为溶剂配制 2 mg/mL 的样品溶液与对照溶液, 取这些溶液分别点于同一硅胶 G 薄层析基线的不同位置上, 以正丁醇·冰醋酸·水= 6·1·3 (V/V) 为展层剂, 展层 1.5 h, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 置 105 $^{\circ}$ C 10 min, 阳性结果呈现紫色斑点。

3 结果与讨论

3.1 5 种树脂吸附七叶皂苷的能力比较

取 5 种树脂各 1 g 置不同试管中, 加入 4.7 mg/mL 粗皂苷溶液 2 mL, 混匀后, 作用 30 min, 倾去剩余液体, 用蒸馏水 2 mL 洗涤, 并收集洗涤液测定其 $A_{535\text{ nm}}$ 数值, 经换算其七叶皂苷含量见表 1。

表 1 不同树脂对样品吸附量的比较
Table 1 The comparison of adsorption with different resins

项 目 Item	树脂(1 g)			Resin		
	H103	NKA-9	D101	D4020	201 \times 4	硅胶 G
吸附后的上清液(mg) Supernate after adsorption	0.767	0.283	0.248	0.118	1.18	1.77
水洗液(mg) Flushed solution	0.118	0.142	0.118	0.118	0.118	0.236
未吸附量的百分比(%) Percent of unadsorbed solution	9.41	4.52	3.89	2.51	13.8	21.3
已吸附量的百分比(%) Percent of adsorbed solution	90.59	95.48	96.11	97.49	86.2	78.7

从表 1 可以看出, 七叶皂苷已绝大部分被树脂吸附, 而未吸附部分, 有些残留在上清液, 有些吸附在树脂表面, 很易被蒸馏水洗掉。按七叶皂苷吸附量大小性能排序是 D4020> D101> NKA-9> H103> 201 \times 4> 硅胶 G, 这说明所试 5 种树脂对七叶皂苷的吸附性能均好于硅胶 G。

上述 D4020、D101 和 NKA-9 3 种树脂对七叶皂苷吸附性能均很好, 为了检测它们解吸附的能力, 取上述 3 种树脂各 1 g 置试管中, 按上述步骤进行,

先用蒸馏水 2 mL 洗涤, 再用不同浓度的酒精(60%、80%)、水饱和正丁醇以及正丁醇的饱和水洗脱七叶皂苷, 其结果见表 2。

由表 2 可知, 3 种树脂所吸附的七叶皂苷, 可被醇溶液洗脱, 其洗脱出的含量依次为 NKA-9> D101> D4020。D4020 虽然吸附七叶皂苷量较大, 但因其不易被酒精洗脱下来或该洗脱量较低。为此, 通过降低洗脱剂的极性来改变, 实践发现 D4020 洗脱量有所增加, 但不如 D101 增加多, 看来 D4020 与

D101 均不宜选用。

我们采用 5 种树脂为分离材料,对七叶皂苷吸附和解吸附性能的方法进行了比较。从 5 种树脂筛选出 3 种树脂,又从 3 种树脂筛选出 1 种树脂(NKA-9)具有较好的应用价值。为确定这种树脂的最大上样量,我们称取 5 份 NKA-9 树脂,每份 1 g,各置 1 支试管中,其上样量分别为 5, 10, 15, 20, 25 mg(用水补足总体积 2.0 mL),接着依次用蒸馏水(2 mL)洗涤,不同浓度的酒精(60%、80%、100%)洗脱,结果见表 3。由表 3 可知,5 个不同的上样量,醇洗脱液中的七叶皂苷含量管 最高,但因其上样量较少,不宜采用;管 、 的水洗液中七叶皂苷含量较高,七叶皂苷丧失太多;相比之下,管 、

表 2 3 种树脂吸附七叶皂苷后的解吸性能

Table 2 The desorption ability of three resins adsorbating aescin

项 目 Item	树脂(1 g) Resin		
	D101	D4020	NKA-9
未被吸附(mg) Unadsorbed solution	0.78	0.54	2.14
60% 酒精洗脱(mg) Eluted solution by 60% alcohol	0.49	0.62	0.42
80% 酒精洗脱(mg) Eluted solution by 80% alcohol	1.2	0.95	3.02
水饱和正丁醇洗脱(mg) Eluted solution by saturated n-butanol with water	2.16	2.08	1.38
正丁醇饱和水洗脱(mg) Eluted solution by saturated water with n-butanol	1.13	1.16	0.43
总洗脱量(%) Gross eluted content	52.9	51.3	55.9
酒精洗脱量占总洗脱量(%) Percent of alcohol solution	34.0	32.7	65.5

表 3 NKA-9 树脂上样量的试验

Table 3 The experiment of simple content with NKA-9 resins

项 目 Item	管号 Tube number				
	5	10	15	20	25
样品(mg) Sample					
水洗(mg) Flushed solution	0.26	0.59	0.68	0.97	1.65
60% 酒精洗脱(mg) Eluted solution by 60% alcohol	2.34	4.48	5.78	6.49	6.84
80% 酒精洗脱(mg) Eluted solution by 80% alcohol	1.63	2.60	4.84	7.34	5.95
100% 酒精洗脱(mg) Eluted solution by 100% alcohol	0.35	0.63	0.71	0.71	0.83
总洗脱量(mg) Gross eluted content	4.32	7.71	11.33	14.54	13.62
总洗脱量所占百分比(%) Percent of gross eluted content	86.40	77.12	75.52	72.60	54.50

较为合适,管 、 样品含量相近,但管 的上样量较多,采用管 的上样量较为合适。

由以上试验可初步认为 NKA-9 树脂可用于分离粗皂苷样品,当树脂量为 1 g 时,上样量以 15 mg 为宜。

3.2 NKA-9 树脂装柱分离七叶皂苷的试验

在批量试验的基础上,将预处理好的树脂 NKA-9、D101 各 4 g 分别装入两根层析柱(1 cm × 12 cm)进行上述试验,确定了上样量为 60 mg,流速控制在 14.4 mL/h,水洗 16 mL,不同浓度的酒精(60%、80%、100%)各 8 mL,用部分收集器收集,得到的洗脱曲线如图 1 所示:

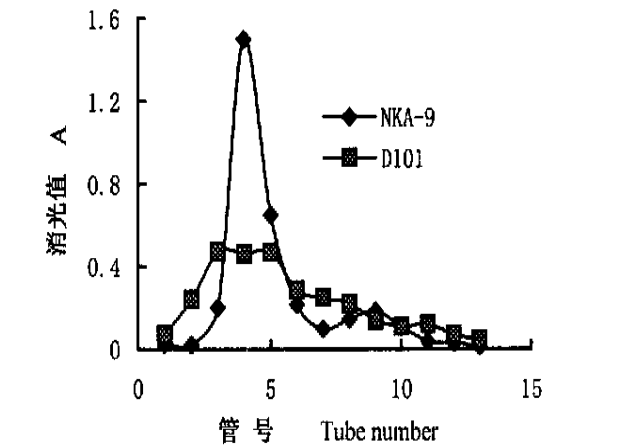


图 1 NKA-9、D101树脂层析柱分离七叶皂苷的洗脱图谱
Fig.1 The eluted atlas of separating aescin with NKA-9、D101 chromatographic column

由图 1 可知,NKA-9 洗脱时,样品比较集中,且无拖尾现象,明显看出有 2 个峰,且第 1 峰的峰值 $A_{535}=1.5$,第 2 峰 $A_{535}=0.185$,2 峰之间分得较开,而 D101 洗脱时,峰与峰之间区别不明显,且拖尾现象较明显。故 NKA-9 树脂对样品的纯化结果较好。

3.3 薄层层析检测

为验证图 1 中 2 个洗脱峰所含物质是否不同,取 2 个峰的收集液进行分析,其 R_f 值如下:

标准品 $R_f=0.372$ 第 1 峰 $R_f=0.389$
第 2 峰 $R_f=0.364$

标准品与第 2 个洗脱峰的位置相似,与第 1 峰的位置相差较大,第 2 峰与标准品是否为同一物质,有待于进一步认定。

综上所述,不难看出:①笔者所选用的几种树脂如 D4020、D101、NKA-9 能较好地吸附七叶皂苷,这除与它们具有较大孔径和比表面有关外,其表现出的极性也会影响吸附性能(表 4)。因为七叶皂苷是由五环三萜结构(非极性)和糖苷链结构(极性)组成的化合物,它具有一定的亲水性和疏水性,既可与

表 4 吸附树脂的物理性能
Table 4 The physical property of adsorbate resins

树脂 Resin	极性 Polarity	外观 Appearance	平均孔径(nm) Average aperture	孔 容(mL/g) Pore volume	比表面积(m ² /g) Specific surface
D4020	非极性	乳白色不透明	100 ~ 105	2.88 ~ 2.92	540 ~ 580
H103	非极性	深棕色	85 ~ 95	1.08 ~ 1.12	1000 ~ 1100
NKA-9	极性	乳白色至淡黄色	130 ~ 140		250 ~ 290
D101	非极性	乳白色	155 ~ 165	0.73 ~ 0.77	480 ~ 520

非极性树脂吸附, 又可与极性树脂相互作用。在某些情况下, 吸附作用强对解吸附是不利的, 比如 D4020 树脂就是如此, 故不适宜用于此分离过程, 而 D101 与 NKA-9 树脂虽然都易于吸附七叶皂苷物质, 但从两者的洗脱图分析, NKA-9 的 2 个洗脱峰之间分离较好, 且无拖尾现象, 而 D101 树脂却不尽人意, 因此 NKA-9 树脂自然可作为分离七叶皂苷的合适材料。②采用本文介绍的用于分离七叶皂苷的筛选树脂程序(既先用静态批量吸附后改动态柱层析), 既可以缩短筛选时间, 又可得到满意结果。

参考文献:

[1] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 1544.

[2] 王川平, 孙莉, 谢卫红. β -七叶皂苷钠的临床应用. 医药导报, 2001, 20(3) : 195.
[3] 李菁. 叶文才. HPLC-ELSD 法在注射用七叶皂苷钠质量控制中的应用[J]. 中草药, 2000, 31(8) : 582.
[4] 叶文才, 王明时, 赵永训. 皂苷分离和鉴定技术新进展[J]. 国外医药·植物药分册, 1993, 8(3) : 99.
[5] 赵静, 杨秀伟. 日本七叶树化学成分的研究[J]. 中草药, 1999, 30(5) : 329.
[6] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994.
[7] 张新. 娑罗子总皂苷的比色测定[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 12(5) : 28.
[8] 中华人民共和国国家药品监督管理局. 国家药品标准. 北京: WS₁XG-004-99, 1999.