

大孔吸附树脂分离纯化罗汉果皂甙的新方法

戚向阳¹, 张俐勤¹, 陈维军¹, 宋云飞², 潘思轶¹

(1. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070; 2. 桂林莱茵生物制品有限公司, 桂林 541300)

摘要: 该文对大孔树脂分离纯化高含量罗汉果皂甙提取物的新方法进行了研究。结果表明: 大孔树脂D101对罗汉果皂甙的分离效果较好, 最佳柱分离条件为: 上样液pH值9.0, 在40℃下依次用pH值9.0的碱水溶液、蒸馏水、30%乙醇及60%乙醇进行洗脱, 将60%乙醇洗脱液浓缩, 冷冻干燥即得高含量罗汉果皂甙提取物。高效液相分析表明, 罗汉果皂甙中几种主要成分的含量均高于分离前的罗汉果皂甙水提物, 其中罗汉果皂甙V的含量为69.24%, 提高了41.12%。

关键词: 罗汉果皂甙; 分离; 大孔树脂

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2005)09-0163-04

戚向阳, 张俐勤, 陈维军, 等. 大孔吸附树脂分离纯化罗汉果皂甙的新方法[J]. 农业工程学报, 2005, 21(9): 163-166

Qi Xiangyang, Zhang Liqin, Chen Weijun, et al. Method for isolation and purification of mogrosides with macroporous resin[J]. Transactions of the CSAE, 2005, 21(9): 163-166 (in Chinese with English abstract)

0 引言

罗汉果是广西特产中药, 具有清热润肺、滑肠通便、促进肠胃功能, 用于治疗急慢性支气管炎、急慢性扁桃体炎、大便秘结等^[1, 2]。近年的研究表明, 强甜味的非糖物质三萜类成分罗汉果皂甙(mogroside)是其主要的有效成分, 具有多种生物活性^[3-7]。国内外尤其是日本对于罗汉果皂甙提取物的研究较多, 并申请了数项专利^[3, 8], 但所用的分离纯化方法多是采用无机吸附剂和无机脱色剂, 如活性炭、氧化镁、硅酸镁等, 操作工艺复杂, 难以工业化生产。此外, 由于皂甙的极性大, 与色素不易分离, 目前国内使用的树脂分离法仅能获得皂甙含量较低的提取物, 所采用的分离工艺未能有效去除杂质^[4, 9, 10]。因此, 本文旨在根据罗汉果皂甙的结构及特性, 通过改进和优化大孔吸附树脂分离纯化罗汉果皂甙的工艺条件, 探讨高纯度罗汉果皂甙提取物制备的新方法, 为进一步规模制备高纯度罗汉果皂甙及深入研究罗汉果皂甙的生物活性提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

罗汉果水提物(MGC, 水分含量小于5%), 罗汉果皂甙V对照品(纯度大于99%), 均由桂林莱茵生物制品有限公司提供; 11-O-罗汉果皂甙V, 罗汉果皂甙M对照品为本实验室制备。

1.2 试剂

氢氧化钠、盐酸、硫酸、95%乙醇、乙腈、甲醇、香兰素均为分析纯。

大孔吸附树脂D101, D3520, D2400, NK-9(南开大学)。

1.3 仪器

高效液相色谱仪(SPD-6AV检测器)(LC-6A型, Shimadzu Co., Japan); 紫外分光光度计(752型, 上海分析仪器总厂)。

1.4 试验方法

1.4.1 罗汉果皂甙含量的测定

采用香草醛-硫酸比色法。取0.5 mL一定浓度的样品溶液(空白取0.5 mL蒸馏水), 加10%香草醛乙醇溶液0.5 mL, 摇匀, 在冰浴下加75%硫酸溶液5 mL, 摇匀, 于50℃水浴中加热20 min后取出, 立即放在冰浴中冷却10 min后, 在600 nm波长处测定其吸光度, 然后按下式计算罗汉果皂甙的含量^[5, 9]。

$$A = KC$$

式中 A——吸光度; C——罗汉果皂甙的浓度, mg/mL; K——经验系数, 即1.0635。

1.4.2 大孔树脂的预处理

将新大孔树脂于95%乙醇溶液中浸洗8 h后, 用蒸馏水清洗至无醇味, 再用5%氢氧化钠浸泡4 h, 用蒸馏水洗至pH值中性后, 接着用5%盐酸浸泡4 h, 再用蒸馏水洗至pH中性。湿法装柱, 一次完成, 自然沉降。

1.4.3 大孔树脂堆积密度的测定

取一标准玻璃层析柱(26 mm × 500 mm)将湿大孔树脂堆至100 mL, 取出, 称重。按下式计算大孔树脂的堆积密度:

$$\rho = \frac{m}{v}$$

式中 m——湿树脂质量, g; v——树脂体积, mL; ρ ——堆积密度, g/mL。

1.4.4 饱和吸附量的测定

称取1.000 g湿树脂于锥形瓶中, 加入50 mL 0.8 mg/mL的罗汉果皂甙水提取物, 封口, 于室温下震荡吸附24 h。分别于吸附前后测定溶液中罗汉果皂甙的浓度, 按下式计算饱和吸附量:

$$Q_0 = (C_0 - C_1) \times V / W$$

收稿日期: 2005-03-14 修订日期: 2005-05-16

作者简介: 戚向阳(1968-), 女, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学与保健功能方面的研究。武汉华中农业大学食品科技学院, 430070。Email: qxiangyang@mail.hzau.edu.cn

式中 Q_0 ——饱和吸附量,mg/g; C_0 ——吸附前浓度,mg/mL; C_1 ——吸附后浓度,mg/mL; V ——溶液体积,mL; W ——大孔树脂湿重,g

1.4.5 罗汉果皂甙静态吸附试验

称取 1.000 g 湿大孔树脂置于锥形瓶中,加入 50 mL 0.8 mg/mL 的罗汉果皂甙水提取物,封口,每隔 20 min 从上清液中取样 0.5 mL,测定其吸光度,然后按下式计算吸附量:

$$Q = (C_0 - C_1) \times V / W$$

以吸附量为纵坐标,作用时间为横坐标绘制静态吸附曲线。

1.4.6 罗汉果皂甙静态解吸试验

称取 0.500 g 湿大孔树脂 3 份,各加入 15 mL 0.8 mg/mL 的罗汉果皂甙水溶液,于室温下吸附 24 h 后,将充分吸附了罗汉果皂甙水溶液的树脂进行过滤,去除水液,再将其置于锥形瓶中,各加入 15 mL 95% 乙醇溶液,封口,分别于 20, 40, 60 下进行解吸,每隔 3 min 测定解吸液中罗汉果皂甙的浓度,并绘制解吸曲线,同时根据吸附量计算解吸率。

1.4.7 罗汉果皂甙的动态吸附试验

准确吸取 20 mL (约 17.93 g) D101 大孔树脂装柱,以浓度为 4 mg/mL 的罗汉果皂甙水提取物溶液上柱,流速 2 mL/min,分部收集流出液,定时测定流出液中的罗汉果皂甙浓度,然后以洗脱液体积为横坐标,流出液中罗汉果皂甙含量为纵坐标绘制动态吸附曲线。吸附达到饱和后,计算饱和和动态吸附量。

1.4.8 洗脱剂及其浓度的选择

取一定量的罗汉果皂甙水溶液,上柱,先用蒸馏水洗脱至无色后,依次用 50 mL 10%~80% 浓度的乙醇溶液进行洗脱,收集不同浓度的乙醇洗脱液并定容至 50 mL,取其中 3 mL 洗脱液稀释至 10 mL 后测定其罗汉果皂甙的浓度,以确定最佳的洗脱剂浓度。

1.4.9 上样液最适 pH 值的选择

将罗汉果皂甙水提取物溶液 (pH 值 6.0) 用氢氧化钠溶液调至不同的 pH 值,上柱,依次用 50 mL 同样 pH 值的水溶液,蒸馏水及 60% 的乙醇水溶液进行洗脱,收集 60% 的乙醇洗脱液 (pH 值 6.0),定容至 50 mL,取 3 mL 洗脱液稀释至 10 mL,测定罗汉果皂甙的浓度,确定其最佳 pH 值。

1.4.10 罗汉果皂甙 V, 11-O-罗汉果皂甙 V 及罗汉果皂甙 IV 的高效液相分析

对照品溶液的配制:准确称取罗汉果皂甙 V, 11-O-罗汉果皂甙 V 及罗汉果皂甙 IV 对照品 0.005 g,用 23% 乙腈水溶液溶解并定容至 10 mL,配制成混合对照品溶液。

样品溶液的配制:准确称取各样品 0.010 g,用 23% 乙腈溶解并定容至 10 mL,配制成 1.0 mg/mL 的样品溶液。

色谱条件: Hypersil ODS C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 大连伊利特科学仪器公司); 流动相: 乙腈:水 = 23:77 (v/v); 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30; 检测

波长: 210 nm; 进样量: 10.0 μL。

以保留时间定性,根据峰面积计算样品的含量。

2 结果与分析

2.1 树脂的吸附特性

通过对大孔树脂 D 101, D 3520, D 2400, NK-9 的初步筛选发现,大孔树脂 D 101 对罗汉果皂甙的吸附、解吸效果较好,因此本实验以大孔树脂 D 101 为柱材料,研究其对罗汉果皂甙的分离纯化效果。结果表明,大孔树脂 D 101 的堆积密度为 0.8965 g/mL。对罗汉果皂甙的饱和吸附量为 25.45 mg/g,饱和吸附率为 82.23%,40 时的平衡解吸率为 87.73%。

2.2 罗汉果皂甙的静态吸附曲线

由图 1 可知,随着时间的递增,大孔树脂 D 101 对罗汉果皂甙的吸附量也相应提高,且在 120 min 内吸附基本达到饱和,说明大孔树脂 D 101 可对罗汉果皂甙进行富集与纯化。

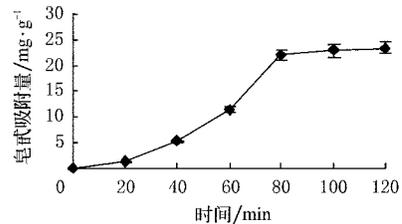


图 1 大孔树脂 D 101 对罗汉果皂甙的静态吸附曲线

Fig 1 Static adsorption curve of macroporous resin D 101 on mogrosides

2.3 罗汉果皂甙的静态解吸曲线

大孔树脂 D 101 对罗汉果皂甙的静态解吸作用见图 2。结果表明,温度影响罗汉果皂甙的解吸平衡,温度越高,解吸平衡所需时间越短,解吸越快。但当温度较高时,不易进行工艺操作,综合有关因素,选用 40 时进行洗脱,利于工业化大规模制备。

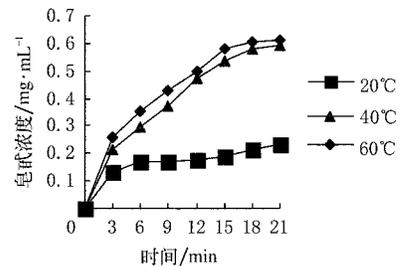


图 2 不同温度下大孔树脂 D 101 对罗汉果皂甙的静态解吸曲线

Fig 2 Static elution curve of macroporous resin D 101 on mogrosides

2.4 罗汉果皂甙的动态吸附曲线

由图 3 可知, D 101 大孔树脂对罗汉果皂甙有良好的动态吸附性能,在较长时间内保持低浓度泄漏,直到洗脱液到 30 mL 时,流出液中罗汉果皂甙的浓度才达 0.036 mg/mL 左右。但是,此时泄漏速度开始快速增

加,当洗脱液体积到达105 mL时,已达到吸附平衡,此时大孔树脂的饱和动态吸附量为21 mg/mL。

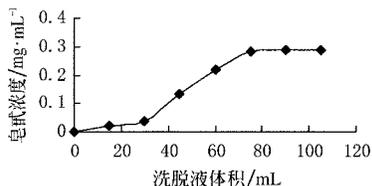
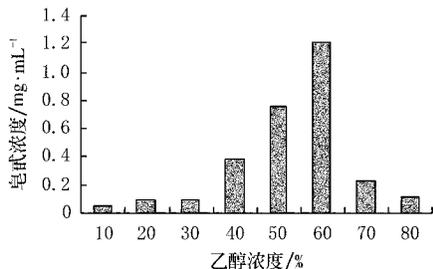


图3 大孔树脂D 101对罗汉果皂甙的动态吸附曲线

Fig 3 Dynamic adsorption curve of macroporous resin D 101 on mogrosides

2.5 洗脱剂浓度的选择

树脂吸附罗汉果皂甙后,可选用对罗汉果皂甙溶解度较高的溶剂如甲醇、乙醇作洗脱剂。考虑到工业生产时,甲醇的毒性较大,因此选用乙醇作为解吸剂。图4即为依次采用不同浓度乙醇溶液对罗汉果皂甙的洗脱效果图。结果表明,10%~30%的乙醇水溶液对罗汉果皂甙的洗脱能力较差,洗脱液中皂甙的含量很少;当乙醇浓度增至为40%时,随乙醇浓度的升高,洗脱液中皂甙的含量逐渐增大,以60%乙醇洗脱液中皂甙的含量最高。随后,再用70%及80%的乙醇溶液进行洗脱,洗脱液中皂甙含量较少,表明采用60%的乙醇洗脱液便可将大部分的罗汉果皂甙解吸。因此,优选的洗脱条件为:在洗脱过程中,先用蒸馏水及30%乙醇水溶液进行洗脱以去除杂质,再用对罗汉果皂甙洗脱能力最佳的60%乙醇水溶液进行洗脱,收集60%乙醇洗脱液。



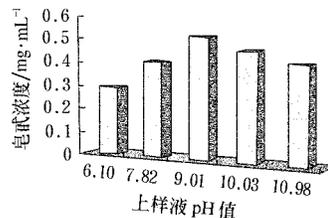
上样量0.0505 g,流速2 mL/min,上样液pH值6.0

图4 不同浓度乙醇对罗汉果皂甙的洗脱效果

Fig 4 Elution effect of different concentrations of ethanol on mogrosides

2.6 上样液pH值对柱分离效果的影响

在罗汉果皂甙的分离纯化中,最难去除的是色素类杂质^[5]。图5表明,pH值呈碱性时,大孔树脂对罗汉果皂甙的分离纯化效果较好,且色素吸附少,有明显的脱色效果,其中以pH值9.0时的分离效果最佳。这是由于在一定碱性条件下,罗汉果皂甙比较稳定^[5],以分子形式存在,而色素类等杂质以离子形式存在,同时由于大孔吸附树脂只对分子态物质有吸附,对离子态的物质无吸附,从而使罗汉果皂甙得以富集、纯化。



上样量: 1.0043 g; 流速: 2 mL/min

图5 上样液pH值对柱分离罗汉果皂甙效果的影响

Fig 5 Influence of pH value on the isolation effect of mogrosides by macroporous resin D 101

2.7 高含量罗汉果皂甙提取物的制备及分析

综上所述,罗汉果皂甙分离的最佳条件为:上样液的pH值为9.0,依次用pH值9.0的氢氧化钠水溶液、蒸馏水、30%的乙醇溶液及60%的乙醇溶液进行洗脱,收集60%乙醇洗脱液,浓缩并冷冻干燥,可得高含量罗汉果皂甙提取物(MGD)。其主要成分的分析结果见表1。

表1 罗汉果皂甙提取物中主要皂甙成分的含量

Table 1 Contents of main mogrosides of the extracts		
含量/%	MGC	MGI
罗汉果皂甙V	28.12	69.24
11-O-罗汉果皂甙V	6.78	8.59
罗汉果皂甙N	3.12	7.87

罗汉果皂甙V, 11-O-罗汉果皂甙V及罗汉果皂甙N为罗汉果中主要的皂甙成分^[5,11],HPLC的分析结果表明,经柱层析分离制备的罗汉果皂甙提取物(MGD)中这三种皂甙成分的含量均高于分离前的罗汉果皂甙水提物(MGC),三种皂甙成分的总含量达85.70%,尤其是罗汉果皂甙V的含量达到69.24%,比分离前罗汉果皂甙V的含量提高了41.12%,表明此方法可有效的分离纯化罗汉果皂甙,显著提高提取物中罗汉果皂甙的含量。

3 结论

本研究表明,大孔树脂D101对罗汉果皂甙具有吸附快、解吸率高及洗脱率高等特点,且再生简便,可较好的分离、纯化罗汉果中的罗汉果皂甙。最佳分离条件为:上样液pH值9.0,在40℃条件下依次采用pH值9.0的氢氧化钠水溶液、蒸馏水、30%乙醇及60%乙醇进行洗脱,收集60%乙醇洗脱液,浓缩并冷冻干燥。与目前常用的树脂分离方法相比,本文建立的工艺通过改变上样液的pH值及乙醇的洗脱浓度和条件,便可显著提高提取物中罗汉果皂甙V等主要皂甙成分的含量。同时,为工业化生产提供了一种简单、快速的分离纯化方法。

[参 考 文 献]

- [1] 王 勤 罗汉果的药理作用研究[J] 中国中药杂志, 1999, 24(7): 425- 427.
- [2] 陈迪华, 斯建勇, 常 琪 天然甜味剂罗汉果的研究与药用[J] 天然产物研究与开发, 1992, (1): 72- 77.
- [3] 本常松 罗汉果成分的研究[J] 药学杂志, 1983, 103(11): 1155- 1166
- [4] 李雁群 罗汉果皂甙的提取工艺研究[J] 天然产物研究与开发, 1995, 7(4): 87- 90
- [5] 李雁群, 王文生 罗汉果中皂苷的分离与测定[J] 食品科学, 1993, 161(5): 66- 69
- [6] Motohiko U, Toshihiro A, Harukuni T, et al Inhibitory effects of cucurbitane glycosides and other triterpenoids from the fruit of momordica grosvenori on Epstein-Barr Virus early antigen induced by tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate[J] J Agric Food Chem, 2002, 50: 6710- 6715
- [7] ShiHonglian, Hiramatsu M. Antioxidant property of fructus momordicae extract[J] Biochem Mol Biol Int, 1996, 40(6): 1111- 1121.
- [8] Yoshida H, Kanda H. The glycoside of momordica grosvenori as sweetening and antioxidant compositions [J] Jpn Kokai Tokkyo Koho JP, 2001, 322, 934
- [9] 常 琪, 陈迪华 罗汉果中总皂甙的含量测定[J] 中国中药杂志, 1995, 20(9): 554- 556
- [10] 黎海彬, 李 琳, 杨晓泉 大孔树脂提取罗汉果皂甙的研究[J] 食品工业科技, 2003(2): 19- 21.
- [11] 斯建勇, 陈迪华, 常 琪, 等 罗汉果中三萜甙的分离和结构测定[J] 植物学报, 1996, 38(6): 489- 494

Method for isolation and purification of mogrosides with macroporous resin

Qi Xiangyang¹, Zhang Liqin¹, Chen Weijun¹, Song Yunfei², Pan Siyi¹

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2 Guilin Laiyin Natural Ingredients Inc., Guilin 541300, China)

Abstracts: A new method for isolation and purification of mogrosides with macroporous resin was studied. The results showed that the optimum column isolation condition was as follows: the aqueous solution of crude extract of momordica grosvenori (MGC) at pH 9.0 was loaded onto an D101 resin column, and then washed with pH 9.0 aqueous solution, distilled water, 30% ethanol and 60% ethanol in proper order at 40 °C. The eluent of 60% ethanol was collected, concentrated and freeze-dried, the mogroside extract (MGD) was obtained and the contents of its main mogrosides were all more than that of MGC, especially the content of its mogroside V was 69.24% (HPLC), increasing by 41.12% over MGC.

Key words: mogroside extract; isolation; macroporous resin