

栀子环烯醚萜苷的大孔吸附树脂纯化工艺研究

杨军宣¹, 赵成城², 刘 昊², 张海燕², 陈晓燕², 杨 明^{2*}

1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016

2. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘 要: **目的** 研究大孔吸附树脂纯化栀子环烯醚萜苷类成分的工艺条件及参数。**方法** 采用 UV 法和 HPLC 法分别测定栀子总环烯醚萜苷和栀子苷的量; 采用静态吸附和动态吸附考察大孔吸附树脂的吸附、解吸性能和纯化效果。**结果** 综合考虑生产成本及纯化效果, D-101 大孔吸附树脂纯化效果较好, 最佳工艺条件: 柱高径比 3:1, 上样液质量浓度为 1.0 g/mL、吸附体积流量为 0.5 BV/h、树脂吸附量为生药 2.5 g/g、洗脱溶媒为 50%乙醇、洗脱体积流量为 2 BV/h, 洗脱溶媒用量 2 BV。**结论** D-101 大孔吸附树脂对栀子环烯醚萜苷纯化效果较好, 工艺稳定可行, 可用于工业化生产。

关键词: 栀子; 大孔吸附树脂; 环烯醚萜苷; 栀子苷; 纯化

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)09-1756-04

Purification of iridoid glycosides from *Gardeniae Fructus* with macroporous resin

YANG Jun-xuan¹, ZHAO Cheng-cheng², LIU Hao², ZHANG Hai-yan², CHEN Xiao-yan², YANG Ming²

1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Key words: *Gardeniae Fructus*; macroporous resin; iridoid glycosides; geniposide; purification

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功效。用于热病心烦、黄疸尿赤、血淋涩痛、血热吐衄、目赤肿痛、火毒疮疡, 外治扭挫伤痛^[1]。其化学成分主要有环烯醚萜苷类、有机酸类、色素、挥发性成分、多糖及其他成分^[2]。栀子在肝脏、胰腺细胞具有保护作用, 可修复骨科软组织损伤; 有降压、解热、镇静、抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗过敏等作用^[3]; 对脑损伤亦有保护作用^[4]。环烯醚萜苷类(如栀子苷等)为其主要活性成分。

中药传统精制除杂方法为水提醇沉法, 但有效成分损失多, 成本高。随着大孔吸附树脂分离纯化中药的基础研究不断深入^[5-6], 其在中药制剂中的应用也越来越广泛。本实验研究大孔吸附树脂纯化栀子环烯醚萜苷类成分的工艺条件及参数, 为其进一步应用和新产品开发等提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1200 液相色谱仪、Agilent 色谱数据工作站(美国 Agilent 公司), Startorius BP211D 电子天平(德国 Startorius 公司), Phenomenex luna C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, SZ—93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂), QYC—2000 恒温摇床(上海上海福玛恒温摇床), KQ250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

大孔吸附树脂: D-101 型、X-5 型, 蚌埠市辽源新材料有限责任公司; AB-8 型, 天津南开大学化工厂; HPD-100、HPD-450、HPD-600, 上海摩速科学器材有限公司; LSA-21, 西安蓝深特种树脂有限公司。乙腈、甲醇为 HPLC 色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂为分析纯。

栀子药材购于四川省成都市荷花池中药材市场(大丰), 经重庆医科大学中医药学院何先元副教授

收稿日期: 2012-03-08

基金项目: 国家“十一五”支撑计划重大新药创制(NO.2009ZX09103-393)

作者简介: 杨军宣(1974—), 男, 博士, 主要从事中药新制剂研究。Tel: (023)65712064 E-mail: yjxhawk@sina.com

*通讯作者 杨 明 E-mail: yangming16@126.com

网络出版时间: 2012-08-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120817.1137.001.html>

鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。

栀子苷对照品(批号 110749-200613)购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 环烯醚萜苷的测定^[7]

2.1.1 对照品溶液制备 取栀子苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成 15 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液制备 精密取供试品适量,置锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密吸取续滤液 1.5 mL,置 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,以甲醇为空白溶剂,在 238 nm 测定吸光度(A)值。以栀子苷质量浓度为横坐标(X), A 值为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程为 $Y=0.026X-0.015$, $r=0.999\ 0$,结果表明栀子苷在 6~30 $\mu\text{g/mL}$ 与 A 值有良好的线性关系。

2.2 栀子苷的测定^[1]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex luna C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(15:85),体积流量 1 mL/min,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 238 nm。理论塔板数以栀子苷峰计不低于 3 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取栀子苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成 30 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液制备 精密取供试品适量,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取栀子苷对照品溶液适量,进样,测定峰面积。结果表明,栀子苷在 2.376 8~60.476 9 μg 与峰面积呈良好线性关系,回归方程为 $Y=48.004X-1.473$, $r=0.999\ 9$ 。

2.3 药材中环烯醚萜苷和栀子苷的测定

按“2.1”、“2.2”项方法分别测定栀子药材中环烯醚萜苷和栀子苷的量,结果分别为 8.43%、3.31%。

2.4 上样液的制备

取栀子药材 3 kg,水煎煮提取 3 次,水提液浓缩至 1:3(药材质量与提取液体积之比),加乙醇至其体积分数达到 40%,放置过夜,滤过,滤液回

收乙醇,浓缩至 3 000 mL,即得。按“2.1”、“2.2”项下方法测定上样液中环烯醚萜苷和栀子苷的量,结果分别为 75.1、28.7 mg/mL。

2.5 大孔吸附树脂型号选择

根据栀子环烯醚萜苷的理化性质和大孔吸附树脂的吸附性能,选用 D-101、X-5、AB-8、HPD-100、HPD-450、HPD-600、LSA-21 7 种型号的大孔吸附树脂进行试验。临用前,取不能过 65 目药典筛的大孔吸附树脂,按说明书方法预处理,备用。

2.5.1 比吸附量考察 取上样液 7 份(100 mL/份),分别加入大孔吸附树脂 10 g/份,25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 24 h(60 次/min),滤过,测定滤液中栀子环烯醚萜苷和栀子苷的质量浓度,计算比吸附量。

比吸附量=(吸附前药液质量浓度-吸附后药液质量浓度) $\times$ 100/树脂量

结果表明,D-101、HPD-450 大孔吸附树脂对上样液中栀子环烯醚萜苷和栀子苷的比吸附量分别为 246.33、253.11 mg/g 和 79.25、82.31 mg/g,均高于其他型号树脂。

2.5.2 比上柱量和洗脱率考察 取上样液 2 份(100 mL/份),分别缓缓加入含 10 g 大孔吸附树脂(D-101、HPD-450)的树脂床中(体积流量为 0.5 BV/h),吸附完毕后收集吸附流出液备用。树脂床用 70%乙醇洗脱(体积流量为 2 BV/h),至流出液在 238 nm 无明显吸收为止,测定吸附流出液和乙醇洗脱液中栀子环烯醚萜苷和栀子苷的量,分别计算比上柱量。

比上柱量=(吸附前总量-吸附后总量)/树脂用量

洗脱率=洗脱量/吸附量

结果表明,D-101、HPD-450 大孔吸附树脂对上样液中栀子环烯醚萜苷和栀子苷的比上柱量和洗脱率相当,栀子环烯醚萜苷比上柱量约为 235 mg/g,栀子苷比上柱量约为 77 mg/g,洗脱率分别为 91.30%、87.22%。由于 HPD-450 大孔吸附树脂价格明显高于 D-101 大孔吸附树脂,考虑到生产成本,确定选用 D-101 大孔吸附树脂。

2.6 D-101 大孔吸附树脂纯化栀子环烯醚萜苷的影响因素研究

2.6.1 比体积测定 取 D-101 大孔吸附树脂 3 份(10 g/份),分别湿法装入 100 mL 量筒中,测定体积,计算平均比体积为 3.5 mL/g(RSD 为 0.16%)。

2.6.2 柱高径比(A)、上样液质量浓度(B)及吸附体积流量(C)的优选 按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表的条件进行试验,以栀子环烯醚萜苷保留率为评

价指标, 试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。

直观分析表明, 在所选因素水平范围内, 吸附体积流量的影响最大, 柱高径比影响较小, 上样液质量浓度影响最小。方差分析表明, C (吸附体积流量) 为主要影响因素, 具有显著差异 ($P < 0.05$), A (柱高径比) 和 B (上样液质量浓度) 无显著差异, 但上样液浓缩至 1.5 g/mL 时易糊化。考虑到生产操作可行性及生产效率等, 故确定最佳方案: 柱高径比 3 : 1、上样液质量浓度为 1.0 g/mL、吸附体积流量为 0.5 BV/h。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果
Table 1 Result of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B / (g·mL ⁻¹)	C / (BV·h ⁻¹)	D (误差)	保留率 / %
1	3 : 1 (1)	0.5 (1)	0.5 (1)	(1)	84.33
2	3 : 1 (1)	1.0 (2)	1.0 (2)	(2)	71.01
3	3 : 1 (1)	1.5 (3)	2.0 (3)	(3)	67.30
4	6 : 1 (2)	0.5 (1)	1.0 (2)	(3)	77.43
5	6 : 1 (2)	1.0 (2)	2.0 (3)	(1)	73.20
6	6 : 1 (2)	1.5 (3)	0.5 (1)	(2)	88.12
7	9 : 1 (3)	0.5 (1)	2.0 (3)	(2)	70.27
8	9 : 1 (3)	1.0 (2)	0.5 (1)	(3)	89.02
9	9 : 1 (3)	1.5 (3)	1.0 (2)	(1)	68.15
K_1	222.64	232.03	261.47	225.68	
K_2	238.75	233.23	216.59	229.40	
K_3	227.44	223.57	210.77	233.75	
R	16.11	9.66	50.70	8.07	

表 2 方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	45.610	2	4.194	
B	18.481	2	1.699	
C	513.175	2	47.184	$P < 0.05$
D (误差)	10.876	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.0$$

2.6.3 最佳生药吸附量考察 按上述优化条件, 取上样液 100 mL, 加入树脂床 (含 10 g D-101 大孔吸附树脂) 中, 分段收集吸附流出液 (5 mL/段), 共计 20 份。测定流份 1~20 中的栀子环烯醚萜苷质量浓度, 以流份编号为横坐标, 栀子环烯醚萜苷质量浓度为纵坐标, 绘制吸附泄漏曲线 (图 1)。结果表明, 流份 6 的栀子环烯醚萜苷质量浓度为流份 5 的

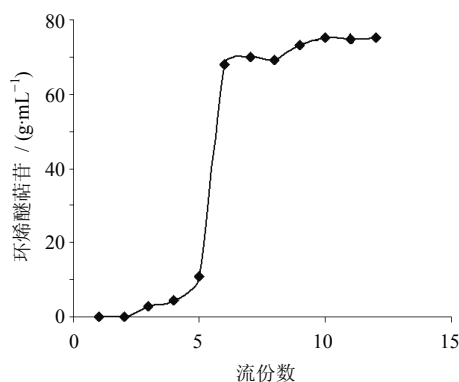


图 1 栀子环烯醚萜苷在 D-101 大孔吸附树脂上吸附泄漏曲线

Fig. 1 Adsorption-leakage curve of iridoid glycosides in *Gardeniae Fructus* on D-101 macroporous resin

6.18 倍, 明显表现出泄漏现象, 按每段流份 5 mL 计算, 总上样体积为 25 mL, 相当于 25 g 生药。表明 1 g D-101 大孔吸附树脂的最佳吸附量为 2.5 g 生药。

2.6.4 最佳洗脱溶媒考察 按上述优化条件, 取上柱样品溶液 25 mL 进行试验。吸附完毕后, 依次用水, 10%、30%、50%、70%乙醇洗脱 (体积流量为 2 BV/h), 收集各洗脱液 6 BV, 测定栀子环烯醚萜苷的累积洗脱量, 计算累积洗脱率, 结果见表 3。结果表明, 50%乙醇可以将绝大部分栀子环烯醚萜苷从 D-101 大孔吸附树脂上洗脱下来, 故确定洗脱溶媒为 50%乙醇。

表 3 不同溶媒洗脱结果

Table 3 Elution results of different solvents

洗脱溶媒	累积洗脱量 / mg	累积洗脱率 / %
水	105.85	5.64
10%乙醇	316.73	16.87
30%乙醇	775.84	41.32
50%乙醇	1 789.72	95.33
70%乙醇	1 831.55	97.55

2.6.5 洗脱体积流量考察 取上样液 3 份 (25 mL/份), 按上述优化条件进行试验。吸附完毕后, 用 50%乙醇洗脱, 体积流量分别为 1、2、4 BV/h, 至洗脱完全 (洗脱液在 238 nm 无明显吸收) 为止。结果洗脱体积流量 1、2、4 BV/h 时对应的溶媒用量分别为 6.4 BV (耗时 6.5 h)、8.5 BV (耗时 4 h)、9.7 BV (耗时 2.5 h)。从节约生产成本, 提高生产效率的角度考虑, 将洗脱体积流量确定为 2 BV/h。

2.6.6 洗脱溶媒用量考察 取上样液 25 mL, 按上述优化条件进行试验。吸附完毕后, 用 50%乙醇洗

脱,洗脱体积流量为 2 BV/h,分段收集洗脱液(10 mL/段),共计 30 份。测定洗脱液中梔子环烯醚萜苷的量,以流份编号为横坐标,洗脱液中梔子环烯醚萜苷的量为纵坐标,绘制洗脱曲线(图 2)。结果表明,流份 7 后面的洗脱液中含梔子环烯醚萜苷极少,前 7 个流份已基本将梔子环烯醚萜苷洗脱完全。按每段流份 10 mL 计算,溶媒用量为 70 mL,约相当于 2 BV。故确定洗脱溶媒用量为 2 BV。

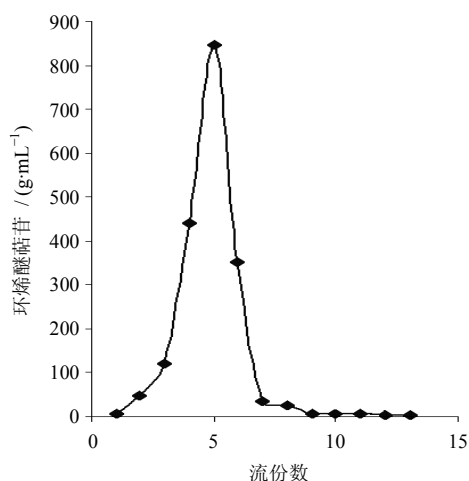


图 2 梔子环烯醚萜苷在 D-101 大孔吸附树脂上的洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of iridoid glycosides in *Gardeniae Fructus* on D-101 macroporous resin

综上所述, D-101 大孔吸附树脂纯化梔子环烯醚萜苷的最佳工艺条件: 柱高径比 3:1, 上样液质量浓度 1.0 g/mL、吸附体积流量为 0.5 BV/h、上样量为生药 2.5 g/g 大孔吸附树脂、洗脱溶媒为 50%乙醇、洗脱体积流量为 2 BV/h, 洗脱溶媒用量为 2 BV。

2.7 验证试验

按优化的条件进行 3 次重复性试验, 分别测定梔子环烯醚萜苷和梔子苷的量。结果表明, 上样液经大孔吸附树脂吸附后, 干膏平均得率为 5.9%(RSD 为 2.33%); 梔子环烯醚萜苷平均得量为 1 671.26 mg (RSD 为 1.37%)、平均洗脱率为 89.02%; 梔子苷平均得量为 605.30 mg (RSD 为 3.85%)、平均洗脱率为 84.36%。

3 讨论

药材水提液中含有大量杂质, 若直接上大孔吸

附树脂, 易堵塞树脂, 影响纯化效果, 增加树脂再生困难, 缩短树脂寿命。所以上样液必须通过预处理后才能上大孔吸附树脂。预试验结果表明, 药材水提液经 40%乙醇沉淀处理即可除去大部分杂质, 满足大孔吸附树脂的要求。供试样品制备过程中的药材提取工艺是经正交试验优选所得, 在此工艺条件下药材中的梔子环烯醚萜苷转移率达 90.0%以上。证明 D-101 大孔吸附树脂对梔子环烯醚萜苷有较好的分离纯化作用, 且工艺简便, 成本较低廉, 易于工业化生产。

对树脂吸附处理前后的干浸膏粉末进行比较研究, 结果表明, 未经树脂处理的干浸膏粉末吸湿性极强, 在室温条件下放置 10 min 左右即吸湿结块, 不能重新分散; 经树脂处理后的干浸膏粉末, 在室温条件下放置 48 h 亦呈粉末状, 有较好的流动性(休止角 41°)。表明大孔吸附树脂能有效除去其吸湿成分, 有效提高药物的稳定性。

本实验暂未对不同厂家同一型号的 D-101 大孔吸附树脂对梔子环烯醚萜苷的纯化效果进行比较研究, 亦未按国家药监局《关于“大孔吸附树脂分离纯化中药提取液的技术要求”的补充说明》的有关规定及技术要求对所得样品进行有机残留物的测定, 亦未对 D-101 大孔吸附树脂的使用次数、再生条件及次数等进行考察, 这有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1998.
- [3] 田智勇, 于培明, 许启泰. 中药梔子的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(11): 782-783.
- [4] 朱晓磊, 张娜, 李澎涛, 等. 梔子苷抑制脑缺血损伤级联反应的作用环节探讨 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(11): 1065-1068.
- [5] 孙晓博, 张凯, 李兰林, 等. 大孔吸附树脂分离纯化单叶铁线莲总皂苷的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1977-1981.
- [6] 张新龙, 郭立玮, 周学平, 等. 清络通痹汤药效物质“组合筛选”库的制备 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 60-64.
- [7] 周婷婷, 闻俊, 佟典承, 等. 梔子总环烯醚萜苷含量的紫外分光光度法测定 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 273-275.