

# 大孔树脂分离纯化栀子提取液中栀子苷的工艺优选

彭柳<sup>1</sup>, 范开静<sup>1</sup>, 熊清平<sup>2\*</sup>

(1. 宜昌市食品药品检验所, 湖北 宜昌 443003;

2. 淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏 淮安 223003)

**[摘要]** **目的:**研究大孔树脂分离纯化栀子提取液中栀子苷的最佳工艺条件。**方法:**以吸附-洗脱量、吸附-洗脱率为指标,利用静态吸附-洗脱试验对 8 种大孔树脂进行优选,通过静态-动态吸附-洗脱的单因素试验筛选树脂分离纯化栀子苷的最佳工艺条件。**结果:**X-5 型大孔树脂的分离纯化效果最好,其最佳纯化条件为样品质量浓度为 20.00 g·L<sup>-1</sup>,温度 25 ℃,pH 5.0,洗脱剂为 60% 乙醇,动态吸附流速 2.0 BV·h<sup>-1</sup>,样品溶液上样量 3.0 BV,动态洗脱流速 3.0 BV·h<sup>-1</sup>,洗脱剂用量 7.5 BV。**结论:**优选的方法稳定可行,值得推广应用。

**[关键词]** 大孔树脂; 栀子苷; 分离纯化工艺; 栀子

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0020-05

## Optimization of Separation and Purification Technology for Gardenoside from Extraction Liquid of *Gardenia jasminoides* by Macroporous Resin

PENG Liu<sup>1</sup>, FAN Kai-jing<sup>1</sup>, XIONG Qing-ping<sup>2\*</sup>

(1. Yichang Institute for Food and Drug Control, Yichang 443003, China;

2. School of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on optimum separation and purification technology conditions of gardenoside from extraction liquid of *Gardenia jasminoides* by macroporous resin. **Method:** With adsorption-elution volume, adsorption-elution rate as indexes, eight kinds of macroporous resins were selected by adsorption and desorption test, optimum separation and purification technology conditions of gardenoside was investigated by single factor test of static-dynamic adsorption and desorption. **Result:** X-5 type macroporous resin had the best effect of separation and purification, its optimum separation and purification technology conditions were: the concentration of sample liquid 20.00 g·L<sup>-1</sup>, temperature 25 ℃, pH 5.0, eluent of 60% ethanol, flow rate of dynamic adsorption 2.0 BV·h<sup>-1</sup>, sample solution volume 3.0 BV, flow rate of dynamic desorption 3.0 BV·h<sup>-1</sup>, eluent volume 7.5 BV. **Conclusion:** This optimized method was feasible and reliable, it should be widely applied.

**[Key words]** macroporous resin; gardenoside; separation and purification technology; *Gardenia jasminoides*

栀子具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功效,用于热病虚烦不眠、血痢疫病、扭伤肿痛等症<sup>[1]</sup>。栀子苷为环烯醚萜苷类化合物,异名“京尼

平苷、都梅子素葡萄糖苷、去羟栀子苷”等,是栀子的主要活性成分之一,除具有解热镇痛、镇静催眠、抗脑缺血损伤等作用<sup>[2-4]</sup>外,还可通过不同条件发

**[收稿日期]** 20120707(004)

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金项目(SBK 200930185);淮安市工业支撑项目(HAG 07066)

**[第一作者]** 彭柳,本科,主管药师,从事仪器分析与中药活性成分分离的研究,Tel:0717-6445894,E-mail:pengliu888@163.com

**[通讯作者]** \*熊清平,硕士,讲师,从事天然药物活性成分提取纯化的研究,Tel:0517-83591165,E-mail:xqp666@163.com

醇制备成天然食用着色剂栀子蓝、栀子红及栀子紫等<sup>[5]</sup>,在食品、医药和保健品等行业具有广阔的应用前景。

目前,栀子苷纯化方法的报道主要有铅盐沉淀法、活性炭除杂法、硅胶吸附法等<sup>[6]</sup>,存在工艺复杂、物耗大、收得率低、不环保等不足<sup>[7]</sup>。而采用大孔树脂吸附法,由于大孔树脂具有良好的网状结构和很高的比表面积,可通过物理吸附从溶液中有选择地吸附目标化合物,其可在不使用有毒有害试剂前提下,达到快速、高效、方便的分离纯化目的<sup>[8]</sup>,已成为中药活性成分工业化常用的方法之一。本试验对大孔树脂分离纯化栀子提取液中栀子苷的工艺进行研究,以期为其工业化生产提供理论依据。

### 1 材料

HL-2 型恒流泵(上海沪西分析仪器厂),Waters-2695 型高效液相色谱仪(Waters 公司),Z 型色谱柱(15 mm × 500 mm,上海捷瑞生物工程有限公司),DKZ-2 型恒温振荡器(上海精宏试验设备有限公司),BS-100A 型自动部分收集器(上海金鹏分析仪器有限公司),WKY III-200 型微量移液器(上海川翔生物科技有限公司)。

栀子苷对照品(中国药品生物制品研究所,批号 110479-2011057),栀子购于宜昌济荣堂中药饮片有限公司(批号 201101011,产地浙江),经淮阴工学院熊清平老师鉴定为茜草科常绿灌木栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,ADS-7, ADS-17, X-5, ADS-5 型大孔树脂(天津南开和成科技有限公司);AB-8, D101 型大孔树脂(山东鲁抗树脂厂);NKA-9, HPD-750 型大孔树脂(上海业力生物科技有限公司)。上述各树脂的理化性质见表 1。

表 1 不同型号大孔树脂的理化性质

型号	极性	比表面积 /m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	平均孔径 /nm	粒径 /mm
ADS-7	强极性	≥100	25.0~30.0	0.3~1.25
NKA-9	极性	250~290	15.5~16.5	0.3~1.25
HPD-600	极性	550~600	8.0~10.0	0.3~1.20
ADS-17	中极性	90~150	25.0~30.0	0.3~1.25
AB-8	弱极性	480~520	13.0~14.0	0.3~1.25
ADS-5	非极性	500~600	20.0~30.0	0.3~1.25
X-5	非极性	500~600	29.0~30.0	0.3~1.25
D101	非极性	400~600	10.0~12.0	0.2~0.6

## 2 方法与结果

### 2.1 样品溶液的制备

将栀子粉碎至 20~40 目,

称取 30 g 栀子粉末,置于 500 mL 三口烧瓶中,加入 300 mL 去离子水<sup>[9]</sup>,加热煎煮 2 h,过滤,滤渣重复提取 1 次,合并滤液,滤液浓缩至 1 g·mL<sup>-1</sup>,加入 5 倍量 95% 乙醇,搅拌 20~30 min,静置 8~10 h,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>,20 min),收集上清液,浓缩,用去离子水调整栀子苷质量浓度为 1.00~30.00 g·L<sup>-1</sup>,即得。

**2.2 栀子苷的含量测定** 按文献<sup>[10-11]</sup>中方法进行测定。

**2.3 树脂预处理** 将 ADS-7, ADS-17, X-5, ADS-5, AB-8, D101, NKA-9, HPD-750 型大孔树脂用去离子水浸泡 12 h,倾去去离子水,加 2 BV 95% 乙醇浸泡 2 h,充分溶胀后湿法装柱。用 95% 乙醇洗脱至流出液与水混合不呈白色浑浊,控制流速 2 BV·h<sup>-1</sup>,依次用 2% HCl 酸处理 2~3 h,去离子水洗至中性,5% NaOH 碱处理 2~3 h,去离子水洗至中性,备用。

**2.4 静态吸附和洗脱试验** 准确称取一定量(相当于干树脂 1.0 g)经预处理的树脂于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 40 mL 栀子样品溶液,在适宜温度下,恒温振荡吸附 24 h,静置 30 min,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min),过滤,滤液按 2.2 项下方法测定栀子苷含量,并分别按式 1,2 计算吸附量和吸附率。将吸附栀子苷的树脂置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入一定量洗脱剂,振荡洗脱 10 h,离心(转速 3 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min),过滤,得洗脱液,将洗脱液等分为 2 份,取其中 1 份测定洗脱液中栀子苷含量,并按式 3,4 计算洗脱量和洗脱率;另一份浓缩回收洗脱剂至半浸膏,干燥,得栀子苷纯化样品,按 2.2 项下方法测定栀子苷含量。

$$\text{吸附量 } Q_a = (C_0 - C_1) \times V_1 / W \quad (1)$$

$$\text{吸附率 } E/\% = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100 \quad (2)$$

$$\text{解析量 } Q_d = C_2 \times V_2 / W \quad (3)$$

$$\text{解析率 } D/\% = C_2 \times V_2 \times 100 / (C_0 - C_1) \times V_1 \quad (4)$$

式中  $Q_a$  为吸附量; $Q_d$  为洗脱量; $E$  为吸附率; $D$  为洗脱率; $C_0$  为样品中栀子苷初始质量浓度; $C_1$  为吸附平衡时栀子苷的质量浓度; $C_2$  为洗脱液中栀子苷质量浓度; $V_1$  为样品溶液体积; $V_2$  为洗脱液体积; $W$  为树脂质量。

**2.4.1 树脂型号筛选** 按静态吸附试验方法,于吸附温度 35 ℃,pH 5.0,栀子苷起始质量浓度 30.00 g·L<sup>-1</sup>的条件下,用 8 种大孔树脂对样品溶液中的栀子苷进行吸附,吸附完成后用 50% 乙醇进行静态洗脱,分别测定 8 种大孔树脂对样品溶液中栀子苷的吸附量、洗脱量、洗脱率,结果见图 1。

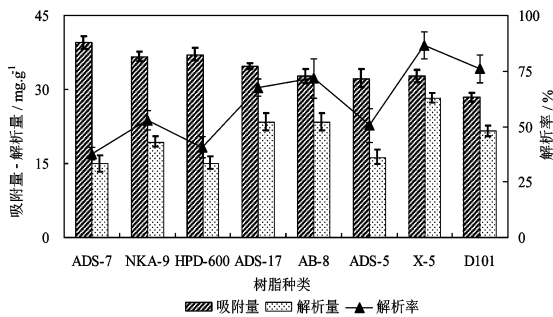


图 1 不同型号大孔树脂对栀子苷的吸附-洗脱效果影响

由图 1 可知,所选取的 8 种树脂对栀子样品溶液中的栀子苷均有一定的分离纯化功能,各类树脂对栀子苷的吸附量随树脂极性的增加而不断增强,但其差异不具有统计意义,而随树脂极性的增加,栀子苷的洗脱量和洗脱率却逐渐下降,最大洗脱率(86.65%)为非极性树脂 X-5 型树脂,其洗脱率为强极性树脂 ADS-7 型树脂的 2.29 倍,可能因为栀子苷分子中拥有糖苷键和羟基,使其具有较强的极性,较易与极性大孔树脂形成牢固吸附,从而出现吸附量大,而洗脱难的现象,故综合考虑栀子苷的吸附和洗脱效果,确定选用 X-5 型树脂作进一步的分离纯化研究。

#### 2.4.2 样品起始质量浓度和温度对吸附的影响

按静态吸附试验方法,在吸附温度分别为 25, 35, 45, 55 °C, pH 5.0 的条件下,用 X-5 型树脂分别对栀子苷起始质量浓度为 1.00, 3.00, 5.00, 7.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00 g·L<sup>-1</sup> 的栀子样品溶液进行吸附,以考察样品起始浓度和温度对树脂吸附效果的影响,结果见图 2。

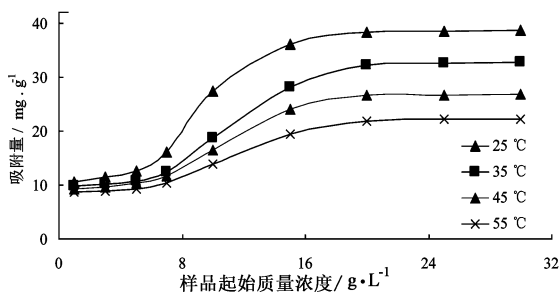


图 2 样品起始质量浓度和温度对栀子苷吸附的影响

由图 2 可知,随样品中栀子苷起始质量浓度的增加,X-5 型树脂在不同温度条件下对栀子苷的吸附量均逐渐增加,当样品初始质量浓度 < 20.00 g·L<sup>-1</sup> 时,树脂的吸附量随质量浓度的增加显著 ( $P < 0.05$ ),当质量浓度达 20.00 g·L<sup>-1</sup> 时,树脂的吸附趋于平衡,之后继续增加质量浓度其吸附量增加不明显。随温度升高,X-5 型树脂对不同起始质量浓度

样品溶液中栀子苷的吸附量均降低,说明 X-5 型树脂对样品溶液中栀子苷的吸附为放热反应,低温有利于吸附反应的进行。故确定栀子苷的初始质量浓度 20 g·L<sup>-1</sup>,吸附温度 25 °C。

2.4.3 样品溶液 pH 考察 按静态吸附试验方法,在确定栀子苷初始质量浓度 20.00 g·L<sup>-1</sup>,吸附温度 25 °C 的条件下,用 X-5 型树脂分别对 pH 分别为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 的栀子样品溶液进行吸附,考察样品 pH 对树脂吸附效果的影响,结果见图 3。

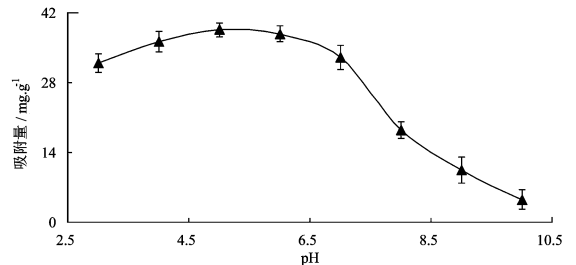


图 3 样品溶液 pH 对栀子苷吸附的影响

由图 3 可知,随 pH 增大,树脂对栀子苷的吸附量出现了先增后降的变化趋势,当 pH < 5 时,吸附量随 pH 增大而逐渐增加,pH 5 时吸附量达最大值(38.56 mg·g<sup>-1</sup>),之后继续增大 pH,其吸附量开始逐渐下降,当 pH > 8.0 时,吸附量急剧下降,说明酸性体系更有利于 X-5 型树脂对栀子苷的吸附。可能因为栀子苷拥有多个羟基,酸性环境更利于其与树脂形成氢键而发生吸附作用,故选择样品溶液 pH 5.0。

#### 2.4.4 乙醇体积分数考察 按静态洗脱试验方法,

对 X-5 型树脂上吸附的栀子苷用体积分数分别为 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95% 的乙醇溶液进行洗脱,计算并比较不同体积分数乙醇溶液的洗脱率和纯化样品中栀子苷含量,结果见图 4。

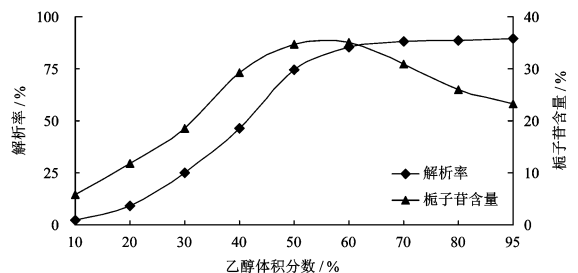


图 4 不同体积分数乙醇溶液对栀子苷洗脱的影响

由图 4 可知,随乙醇体积分数升高,栀子苷的洗脱率不断增加,而纯化样品中栀子苷含量却出现先

增后减的趋势。乙醇体积分数越高,栀子苷越易从 X-5 型树脂上洗脱,洗脱率越高,而当乙醇体积分数过高时,大量低极性的杂质被同时洗脱,导致纯化样品中栀子苷质量分数急剧下降,当乙醇体积分数 > 60% 时,其洗脱率增加不明显,而此时纯化样品中栀子苷质量分数拥有极值 35.05%,故选择 60% 乙醇为洗脱剂。

**2.5 动态吸附和洗脱试验** 准确称取一定量(相当于干树脂 5.0 g)经预处理的 X-5 型树脂,采用湿法装入 15 mm × 500 mm 玻璃柱中,树脂床高度 155 mm,体积 20 mL。用与样品溶液 pH 相等的缓冲溶液平衡分离柱,用恒流泵将一定体积样品溶液以适宜流速上样吸附,流出液用自动部分收集器收集,每 10 mL 流出液为 1 份,流出液按 2.2 项下方法测定栀子苷含量,上样结束后,用去离子水洗至流出液呈无色,用一定体积的洗脱剂以适宜流速洗脱吸附于树脂上的栀子苷,洗脱液用自动部分收集器收集,每 10 mL 洗脱液为 1 份,每份洗脱液按 2.2 项下方法测定栀子苷含量。

**2.5.1 上样液流速和用量对吸附的影响** 树脂对栀子苷的吸附分离纯化过程,实质是树脂和溶剂对栀子苷的竞争吸附作用所致,当吸附达到穿透点时,其树脂对栀子苷吸附作用将会大大减弱,甚至消失。按动态吸附试验方法,分别以 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 BV·h<sup>-1</sup> 的流速,于 25 °C 将 pH 5.0, 初始质量浓度 20.00 g·L<sup>-1</sup> 的样品溶液上样吸附,绘制不同流速下的渗漏曲线(图 5)。

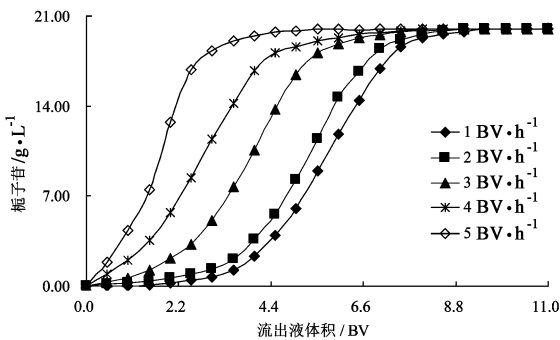


图 5 X-5 型树脂对栀子苷吸附的渗漏曲线

由图 5 可知,随上样流速的增加,X-5 型树脂对栀子苷的吸附效果逐渐变差,说明较低的上样流速更利于 X-5 树脂对栀子苷的吸附,1.0 BV·h<sup>-1</sup> 时吸附效果最好。可能原因是当流速过快时,栀子苷与 X-5 型树脂接触的时间较短,无法与 X-5 树脂上的活性位点发生作用,导致栀子苷在 X-5 树脂上出现不完全吸附。而统计分析表明,当上样流速为 1.0,

2.0 BV·h<sup>-1</sup> 时,X-5 型树脂对栀子苷吸附效果无明显差异。综合考虑操作时间和吸附效果,确定动态吸附的上样流速选择 2.0 BV·h<sup>-1</sup>。在该流速条件下,当样品溶液体积 ≤ 3.0 BV 时,X-5 型树脂对样品溶液中的栀子苷能产生有效吸附。

**2.5.2 洗脱剂流速和用量的考察** 按动态洗脱试验方法,以洗脱液中栀子苷含量对洗脱液体积作图,分别绘制洗脱剂流速 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 BV·h<sup>-1</sup> 的动态洗脱曲线(图 6)。

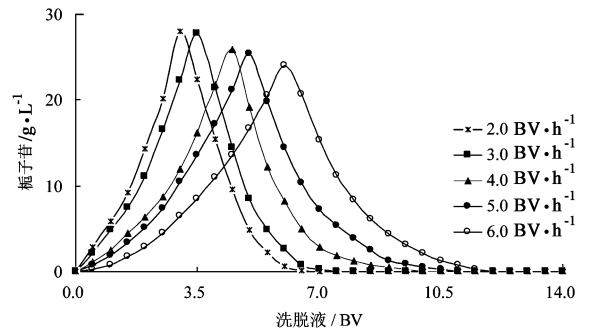


图 6 X-5 型树脂上栀子苷的动态洗脱曲线

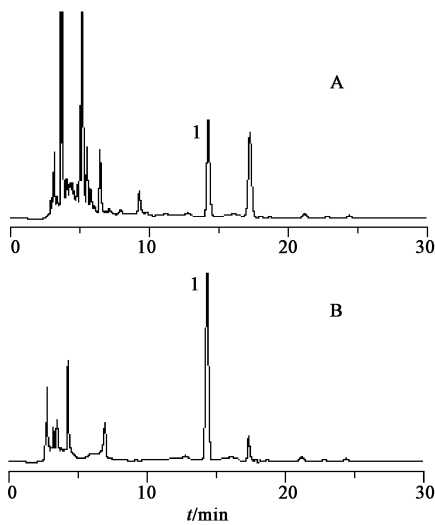
由图 6 可知,栀子苷洗脱量(曲线下面积)和洗脱率随流速的增加而逐渐减少,但差异不显著;洗脱剂用量随流速的增加而呈现显著性增大( $P < 0.01$ )。当流速为 2.0 BV·h<sup>-1</sup> 时,其洗脱效果最好,同时洗脱液用量最少。而统计分析表明,当流速为 2.0, 3.0 BV·h<sup>-1</sup> 时,其洗脱量和洗脱剂用量的差异不明显。故综合考虑洗脱效果和生产成本,确定选择洗脱流速 3.0 BV·h<sup>-1</sup>。该流速下,用 7.5 BV 洗脱剂可将 X-5 型树脂上吸附的栀子苷洗脱完全。

**2.6 验证试验** 准确称取一定量(相当于干树脂 5.0 g)经预处理的 X-5 型树脂,按上述试验优化的工艺条件进行 3 次验证试验,同时对比栀子提取液纯化前后进行 HPLC 分析(图 7)。结果表明栀子提取物经 X-5 型树脂分离纯化后,栀子苷纯度由 1.91% 变为 36.78%,提高了 19.26 倍。

由图 7 可知,栀子样品溶液通过 X-5 型树脂纯化后,色谱图上大部分杂质吸收色谱峰消失,栀子苷的峰高及峰面积增加明显,表明利用 X-5 型树脂来分离纯化栀子提取物中栀子苷的方法可行。

### 3 讨论

采用大孔吸附树脂分离纯化栀子提取液中栀子苷,省去了传统溶剂萃取法的繁琐工艺,可得到高纯度的栀子苷,具有收率高、成本低、操作简便等优点,更易于推广于工业化生产。用洗脱剂洗脱树脂上吸附的栀子苷,有等度洗脱和梯度洗脱 2 种方式。通



A. 纯化前; B. 纯化后; 1. 栀子苷

图 7 X-5 型树脂纯化前后栀子苷的 HPLC

过比较,发现梯度洗脱栀子苷含量较高,但其差异不显著,且梯度洗脱的操作繁琐、劳动强度大,故本研究采用等度洗脱方式。树脂使用后,会有一些强吸附性杂质成分保留于树脂床中,从而影响下一次使用过程中对目标化合物的吸附。因此,必须对树脂进行再生处理,将一些强吸附的杂质成分去除。通过对比 95% 乙醇和酸碱再生的效果,发现利用 X-5 型大孔树脂纯化栀子苷时,用酸碱再生工艺的效果较好。

### [参考文献]

- [1] 那莎,郭国田,王宗殿,等. 栀子及其有效成分药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2005,12(1):90.
- [2] 孙旭群,赵新民,杨旭. 栀子苷利胆作用实验研究[J]. 安徽中医学院学报,2004,23(5):33.
- [3] 朱晓磊,张娜,李澎涛,等. 栀子苷阻抑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.
- [4] 程合理,赵新民. 栀子苷的抗炎作用实验研究[J]. 安徽医药,2004,8(3):167.
- [5] 汤兴俊,卢林海. 栀子色素研究进展[J]. 食品科学,2005,26(12):254.
- [6] 张丽茹,于治国,范岩,等. 栀子中京尼平苷的分离及其含量测定[J]. 中草药,2005,25(11):1253.
- [7] 任治军,张立明,何开泽. 栀子主要成分的提取工艺及药理研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,17(6):831.
- [8] 何伟,李伟. 大孔树脂在中药成分分离中的应用[J]. 南京中医药大学学报,2005,21(2):134.
- [9] 李其兰,陈红专,张跃军,等. 中药栀子提取方法的比较和工艺条件优化[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(6):327.
- [10] 尹美芝,张瑞华,崔雅慧,等. 心神宁片中栀子苷含量影响因素的考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):52.
- [11] 谢秀娟,郭洛宏,姚佳,等. 反相高效液相法测定茵黄口服液液中栀子苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(4):12.

[责任编辑 全燕]

## 欢迎订阅 2013 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,320 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfxjx\_2010@188.com,网址:www.syfxjzz.com。