

· 药学基础 ·

## 栀子总环烯醚萜和总西红花苷的提取纯化工艺考察

张冰冰<sup>1</sup>, 欧则民<sup>1</sup>, 严林<sup>1,2</sup>, 张瑶<sup>1,3</sup>, 王艳静<sup>1,3</sup>, 程怡<sup>1</sup>,  
仝燕<sup>1</sup>, 梁爱华<sup>1</sup>, 刘德文<sup>1\*</sup>, 王锦玉<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;  
2. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 3. 天津中医药大学药学院, 天津 301617)

**[摘要]** 目的: 优化可用于工业化生产的栀子提取纯化工艺, 得到总环烯醚萜和总西红花苷提取物。方法: 采用正交试验, 以京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异栀子苷、西红花苷-1 和西红花苷-2 含量为评价指标, 考察煎煮时间、煎煮次数和加水量, 优选栀子水提取工艺; 采用单因素试验优选栀子水提物的纯化工艺, 筛选 4 种不同类型的大孔吸附树脂, 主要考察树脂型号、最大上样量、水洗用量、乙醇体积分数、洗脱剂用量、上样流速等工艺条件; 此外, 对提取物的干燥方式(真空干燥和喷雾干燥)进行考察, 并进行中试放大验证试验。结果: 栀子的最佳水提取工艺为分别加 15、10 倍量水煎煮 2 次, 每次 1 h; 最佳纯化工艺为水提取液滤过后通过 SP825L 型大孔树脂柱, 生药量-树脂量 (1:1.5), 药液上样流速 3 BV·h<sup>-1</sup>, 加水 2 BV 除杂, 加 30% 乙醇 4 BV 洗脱得环烯醚萜部位, 继续加 70% 乙醇 3 BV 洗脱得西红花苷部位, 收集醇洗液, 70 °C 减压干燥。在该条件下, 总环烯醚萜提取量 590.75 mg·g<sup>-1</sup>, 转移率 70.48%, 干膏得率 8.89%; 总西红花苷提取量 83.37 mg·g<sup>-1</sup>, 转移率 22.20%, 干膏得率 2.60%。结论: 优选的提取纯化工艺稳定可行, 有效成分提取率高, 适合栀子有效部位的工业化提取纯化。

**[关键词]** 栀子; 大孔树脂; 环烯醚萜; 西红花苷; 正交试验; 超高效液相色谱法(UPLC); 纯化工艺

**[中图分类号]** R22; R28; R943; R914 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)11-0156-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220153

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211228.1216.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-12-28 19:15

### Optimization of Extraction and Purification Process of Total Iridoids and Total Crocins in Gardeniae Fructus

ZHANG Bing-bing<sup>1</sup>, OU Ze-min<sup>1</sup>, YAN Lin<sup>1,2</sup>, ZHANG Yao<sup>1,3</sup>, WANG Yan-jing<sup>1,3</sup>, CHENG Yi<sup>1</sup>,  
TONG Yan<sup>1</sup>, LIANG Ai-hua<sup>1</sup>, LIU De-wen<sup>1\*</sup>, WANG Jin-yu<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;  
3. School of Pharmacy, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the extraction and purification process of Gardeniae Fructus for industrial production, and to obtain the total iridoid and total crocin extracts. **Method:** Orthogonal test was used to optimize the water extraction process by taking contents of geniposide, genipin gentiobioside, gardenoside, crocin-1 and crocin-2 as indicators and the decocting time, decocting times and water amount as factors. The purification process was optimized by single factor test, and four different types of macroporous adsorption resins were screened. The process conditions such as resin type, maximum loading amount, water washing

**[收稿日期]** 2021-10-25

**[基金项目]** 中国中医科学院基金项目(CI2021A04801, ZZ-13-035-10); 中国中医科学院中药研究所团队建设基金项目(ZXKT19014)

**[第一作者]** 张冰冰, 在读硕士, 从事中药制剂研究, E-mail: zhangzhang.rita@foxmail.com

**[通信作者]** \* 刘德文, 博士, 副研究员, 从事中药制剂研究, E-mail: dwliu@icmm.ac.cn;

\* 王锦玉, 研究员, 硕士生导师, 从事中药制剂研究, E-mail: jinyu024@163.com

amount, ethanol concentration, ethanol dosage, and flow rate of sample loading were mainly investigated. In addition, the drying methods (vacuum drying and spray drying) of the extract were investigated, and a pilot scale-up verification test was carried out. **Result:** The optimal water extraction process of *Gardeniae Fructus* was to add 15, 10 times the amount of water for decocting twice, 1 h each time. The optimal purification process was as follows: the water extract through SP825L macroporous resin column, the amount of crude drug-the amount of resin (1:1.5), the sample loading flow rate of 3 BV h<sup>-1</sup>, adding 2 BV of water to remove impurities, adding 4 BV of 30% ethanol to obtain the iridoid part, then adding 3 BV of 70% ethanol to obtain the crocin part, collecting the ethanol lotion, and drying at 70 °C. Under these conditions, the extraction amount of total iridoids was 590.75 mg·g<sup>-1</sup> with the transfer rate of 70.48%, and the yield of dry extract was 8.89%. The extraction amount of total crocins was 83.37 mg·g<sup>-1</sup> with the transfer rate of 22.20%, and the dry extract yield was 2.60%. **Conclusion:** The optimized extraction and purification process is stable and feasible with high extraction rate of active components, which is suitable for the industrial extraction and purification of active parts of *Gardeniae Fructus*.

**[Keywords]** *Gardeniae Fructus*; macroporous resin; iridoid; crocin; orthogonal test; ultra-high performance liquid chromatography (UPLC); purification process

栀子属茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实,主产于江西、浙江、湖南、四川等地<sup>[1]</sup>,具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒等功效,主要用于治疗热病烦闷、湿热黄疸等<sup>[2]</sup>。其主要化学成分有环烯醚萜类、西红花苷类、有机酸等<sup>[3]</sup>,其中京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷和羟异栀子苷属环烯醚萜类成分,为栀子的主要成分也是其活性成分,具有保肝利胆、抗菌消炎、抗血栓、降血糖、保护脑和神经系统等作用<sup>[4]</sup>;而西红花苷-1和西红花苷-2属西红花苷成分,是自然界存在的唯一水溶性类胡萝卜素,具有抗动脉粥样硬化、抑制血小板聚集、降压等作用<sup>[5]</sup>。提取工艺是中药制剂的关键环节,结合前期药效学筛选实验及栀子临床常入汤剂应用实际,确定栀子提取工艺采用水提取。

有效成分是中药发挥药效作用的物质基础,通过分离纯化技术,提取和纯化中药有效成分或有效部位,以保证中药临床应用的确切疗效,是现代中药研究的关键与前提<sup>[6]</sup>。目前应用于中药化学成分纯化的手段主要有大孔吸附树脂<sup>[7-11]</sup>、水提醇沉<sup>[12-13]</sup>、离心、萃取、膜分离等,其中大孔树脂纯化因具有操作简单、选择性好、生产成本低等优点而被广泛应用<sup>[14-15]</sup>。目前,大孔树脂分离纯化栀子中有效成分的研究较多<sup>[16-19]</sup>,但多停留在实验室研究阶段,可同时得到环烯醚萜和西红花苷并能用于工业化生产的研究尚未见报道。基于此,本研究拟采用正交试验,以京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异栀子苷、西红花苷-1和西红花苷-2含量为考察指标,优选栀子水提取工艺;同时,采用大孔树脂分离纯化

栀子中总环烯醚萜和西红花苷2个有效部位,优化纯化工艺参数;另外,对干燥方式进行考察,确定干燥条件,并进行工艺放大验证试验,以期对栀子药材资源的开发与利用提供参考。

## 1 材料

BT125D型1/10万电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱仪(美国Waters公司),FW100型高速万能粉碎机(天津市泰斯特科学仪器有限公司),YAMATO GB-21型喷雾干燥机(日本大和科学株式会社),ZD79-B型真空干燥箱(北京兴争仪器设备厂)。

京尼平苷、羟异栀子苷、京尼平龙胆双糖苷对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为Z-003-170222、S-133-190926、J-075-190925,纯度均>98%),西红花苷-1和西红花苷-2对照品(上海诗丹德生物技术有限公司,批号分别为42553-65-1、55750-84-0,纯度均≥98%),SP825L型大孔吸附树脂(日本三菱公司),NKA型大孔吸附树脂(天津南开化工厂),HPD100和HPD600型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司);栀子饮片购自北京仟草中药饮片有限公司,批号190807009、191212001,产地江西,经中国中医科学院中药研究所王锦玉研究员鉴定为茜草科植物栀子 *G. jasminoides* 的干燥成熟果实,符合2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)(一部)的相关规定;水为去离子水,甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

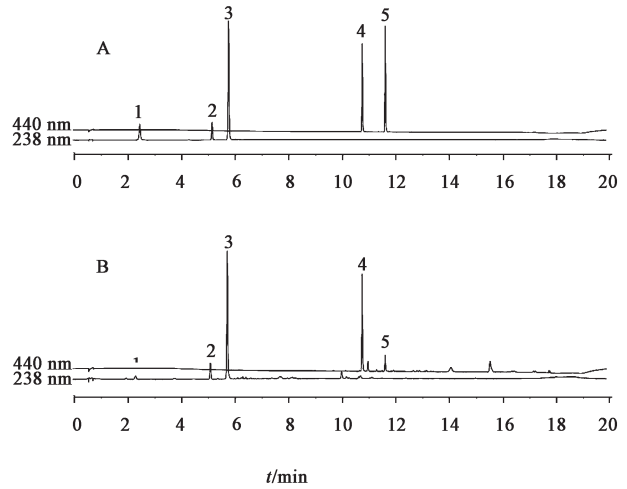
## 2 方法与结果

### 2.1 栀子水提液中指标成分含量的超高效液相色谱法(UPLC)测定

**2.1.1 色谱条件** 采用 Welch Xtimate C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~2.3 min, 6%A; 2.3~4.2 min, 6%~12%A; 4.2~5.8 min, 12%~17%A; 5.8~8.1 min, 17%~20%A; 8.1~10.4 min, 20%~27%A; 10.4~15 min, 27%~32%A; 15~16.2 min, 32%~36%A; 16.2~16.7 min, 36%~55%A; 16.7~17.8 min, 55%~70%A; 17.8~18 min, 70%~6%A; 18~20 min, 6%A), 进样量 1 μL, 检测波长 238、440 nm, 柱温 30 °C。见图 1。

**2.1.2 对照品溶液制备** 取京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异栀子苷、西红花苷-1 和西红花苷-2 对照品适量, 精密称定, 置于量瓶中, 加甲醇使溶解, 制成各对照品储备液。分别量取各对照品储备液适量, 制成上述成分质量浓度分别为 392.0、62.3、18.9、84.8、64.6 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密移取栀子水提液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇



注: A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 羟异栀子苷; 2. 京尼平龙胆双糖苷; 3. 京尼平苷; 4. 西红花苷-1; 5. 西红花苷-2

图 1 栀子水提液的 UPLC

Fig. 1 UPLC of Gardeniae Fructus water extract

匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.1.4 方法学考察** 取各对照品储备溶液适量, 加甲醇稀释, 得系列质量浓度的各对照品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得线性回归方程, 见表 1。

表 1 栀子水提液中指标成分含量测定的线性关系考察

Table 1 Investigation on linear relationship of determination of index components in Gardeniae Fructus water extract

成分	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/g·L <sup>-1</sup>
京尼平苷	Y=3 711 369.207 4X-47 157.912 4	0.999 7	0.004 2~1.686 0
京尼平龙胆双糖苷	Y=2 466 356.053 4X-31 387.618 6	0.999 7	0.004 2~0.846 0
羟异栀子苷	Y=2 999 022.420 7X-17 427.131 0	0.999 7	0.003 9~0.778 0
西红花苷-1	Y=12 257 792.593 8X-47 612.429 3	0.999 8	0.002 5~0.202 4
西红花苷-2	Y=17 036 421.737 1X-64 743.275 5	0.999 6	0.002 3~0.180 8

精密吸取上述混合对照品溶液, 按 2.1.1 项下条件连续进样 6 次, 计算京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异栀子苷、西红花苷-1 和西红花苷-2 峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.1%、0.2%、0.3%、1.6%、0.5%, 表明仪器精密度高。取供试品溶液适量, 分别在制备后 1、2、3、4、8、12 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异栀子苷、西红花苷-1 和西红花苷-2 峰面积的 RSD 分别为 1.0%、2.4%、1.4%、0.8%、1.5%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。制备同一批供试品溶液 6 份, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异栀子苷、西红花苷-1 和西红花苷-2 的平均质量浓度分别为 1.961 6、0.434 2、0.087 4、0.222 7、0.036 5 g·L<sup>-1</sup>, RSD 分别为 1.2%、

1.7%、2.0%、3.9%、2.9%, 表明该方法重复性良好。取已知指标成分含量的栀子水提液 0.5 mL, 按 1:1 比例精密加入等量的混合对照品储备液, 按 2.1.3 项下方法平行制备 6 批供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异栀子苷、西红花苷-1 和西红花苷-2 的平均加样回收率分别为 104.8%、100.7%、107.7%、104.0%、82.9%, RSD 依次为 1.0%、2.2%、3.6%、4.5%、2.2%, 表明该方法准确可靠。

**2.2 综合评分的计算** 利用 SPSSAU 软件进行归一化处理, 得到归一值(d)。对于总环烯醚萜有效部位, 京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷和羟异栀子苷具有相同的化学母核, 同属一类成分, 不同成分之间没有主次之分; 总西红花苷成分同理, 故数据经

归一化后分别分析,  $d_{\text{总环烯醚萜}} = d_{\text{京尼平苷}} + d_{\text{京尼平龙胆双糖苷}} + d_{\text{羟异梔子苷}} + d_{\text{总西红花苷}} = d_{\text{西红花苷-1}} + d_{\text{西红花苷-2}}$

### 2.3 提取工艺优选

**2.3.1 正交试验** 根据前期单因素试验结果, 确定煎煮时间、煎煮次数、溶剂用量为考察因素, 其中提取时间的极值确定为1 h和2.0 h, 煎煮数为1~3次, 鉴于药材吸水较多, 料液比范围确定为1:15~1:10。

表2 梔子水提取工艺优选的正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis on water extraction process of Gardeniae Fructus

No.	A 煎煮时间/h	B 煎煮数/次	C 溶剂用量/倍	D (空白)	质量分数/mg·g <sup>-1</sup>					$d_{\text{总环烯醚萜}}$	$d_{\text{总西红花苷}}$
					京尼平苷	京尼平龙胆双糖苷	羟异梔子苷	西红花苷-1	西红花苷-2		
1	1.0	1	10.0	1	2 022.27	364.74	147.62	185.52	25.33	0.06	0.91
2	1.0	2	12.5	2	2 509.42	541.14	200.03	231.29	29.69	2.23	2.00
3	1.0	3	15.0	3	2 562.19	607.77	213.84	215.48	27.56	2.74	1.56
4	1.5	1	12.5	3	2 092.01	425.34	170.65	195.34	25.22	0.71	1.04
5	1.5	2	15.0	1	2 533.18	606.32	185.29	189.88	23.02	2.28	0.76
6	1.5	3	10.0	2	2 604.90	661.26	180.09	192.69	24.73	2.51	0.96
7	2.0	1	15.0	2	2 195.16	519.68	143.13	168.46	19.72	0.81	0.13
8	2.0	2	10.0	3	2 401.21	571.07	163.58	171.57	19.38	1.63	0.15
9	2.0	3	12.5	1	2 572.77	665.33	167.61	165.34	18.81	2.29	0.00

表3 梔子水提取工艺优选的综合评分方差分析

Table 3 Variance analysis for comprehensive score of water extraction process of Gardeniae Fructus

指标	因素	MS	F	SS	P
$d_{\text{总环烯醚萜}}$	A	0.100	0.709	0.200	<0.05
	B	6.475	45.922	12.950	
	C	0.453	3.213	0.906	
	D(误差)	0.141	1.000	0.282	
$d_{\text{总西红花苷}}$	A	2.959	8.085	5.918	>0.05
	B	0.115	0.314	0.230	
	C	0.175	0.478	0.350	
	D(误差)	0.366	1.000	0.732	

注:  $F_{0.05}(2,2)=19, F_{0.01}(2,2)=99$

由表2和表3可知, 各因素对总环烯醚萜含量影响的排序为  $B > C > A$ , 且因素B影响具有统计学意义, 结合直观分析结果和成本考虑, 故选择煎煮数为2次; 3个因素对总西红花苷含量均无明显影响, 但其中以煎煮时间影响最大, 且随着煎煮时间的延长含量逐渐降低, 表明在高温加热过程中, 西红花苷被破坏, 这与付小梅等<sup>[20]</sup>报道相一致。综合正交试验结果、梔子药材吸水量较大(5倍量)及生产成本考虑, 选择梔子的最佳水提取工艺为  $A_1B_2C_1$ , 即分

以京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异梔子苷、西红花苷-1和西红花苷-2含量为指标进行正交试验。取梔子药材9份, 每份50 g(药材中上述5个成分的质量分数分别为52.40、14.38、5.19、8.64、1.19 mg·g<sup>-1</sup>), 按相应方法回流提取, 合并水煎液, 按2.1.1项下色谱条件测定, 试验安排及结果见表2, 方差分析结果见表3。

别加15、10倍量水提取煎煮2次, 每次1 h。

**2.3.2 验证试验** 取梔子药材(京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异梔子苷、西红花苷-1、西红花苷-2)质量分数分别为54.47、15.92、2.96、8.68、1.12 mg·g<sup>-1</sup>)3份, 每份200 g, 按优化的工艺平行提取3次, 测定水提液中各成分的含量, 计算平均转移率及总提出量, 见表4。结果总环烯醚萜平均提出量11.86 g, 转移率80.86%, 提取率高, 工艺稳定可行; 总西红花苷平均提出量1.12 g, 提取率57.35%, 提取率略低, 应该与西红花苷加热不稳定有关。

### 2.4 大孔树脂分离纯化工艺优选

**2.4.1 大孔树脂的预处理** 取NKA、HPD100、HPD600和SP825L共4种不同极性大孔树脂适量, 用去离子水水洗3次, 加95%乙醇浸泡24 h后湿法装柱, 用大量去离子水洗至流出液无醇味, 备用。

**2.4.2 大孔树脂型号的筛选** 采用静态吸附试验筛选树脂型号。取预处理好的大孔树脂(NKA、HPD100、HPD600和SP825L)各5 g(干质量)置具塞锥形瓶中, 加入上样液(质量浓度49.02 g·L<sup>-1</sup>, 以生药量计, 下同)300 mL, 置于恒温(23℃)摇床中振荡(100 r·min<sup>-1</sup>)过夜, 精密移取上清液1 mL, 加甲醇定容至25 mL, 采用UPLC测定5种指标成分的含量,

表4 栀子水提取工艺的验证试验

Table 4 Verification test of water extraction process of Gardeniae Fructus

No.	提出量/mg						
	京尼平苷	京尼平龙胆双糖苷	羟异栀子苷	西红花苷-1	西红花苷-2	总环烯醚萜	总西红花苷
1	9 271.96	2 167.79	569.93	1 071.97	133.70	12 009.67	1 205.67
2	8 846.81	2 077.20	574.01	1 055.06	129.92	11 498.02	1 184.98
3	9 405.91	2 199.38	474.23	876.74	104.53	12 079.52	981.27

计算总环烯醚萜和总西红花苷吸附量,计算公式为吸附量 $= (C_0 - C_1) \times 300 / M$ ,式中 $C_0$ 为吸附前质量浓度, $C_1$ 为吸附后质量浓度, $M$ 为树脂质量,见表5。结果表明不同极性大孔树脂对这5种成分均有一定程度的吸附能力,综合有效成分吸附量结果,确定选择SP825L型大孔树脂进行后续实验。

表5 不同型号大孔树脂对栀子有效成分的静态吸附量

Table 5 Static adsorption capacity of active components in Gardeniae Fructus by different macroporous resins

树脂型号	吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	
	总环烯醚萜	总西红花苷
HPD100	32.25	18.96
HPD600	15.37	12.92
SP825L	69.09	13.24
NKA	18.52	13.18

**2.4.3 最大上样量考察** 取已处理好的SP825L型大孔树脂100 mL置于色谱柱中,加入 $47.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 栀子水提液,控制流速 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,每隔100 mL收集流出液1份,采用UPLC测定,计算总环烯醚萜、总西红花苷的实时泄漏率和累积泄漏率,以流出液体积为横坐标,泄漏率(实时泄漏率=每份流出液质量浓度/上样液质量浓度 $\times 100\%$ ,累积泄漏率=流出量/总上样量 $\times 100\%$ )为纵坐标,绘制泄漏曲线,见图2和图3。在大孔树脂吸附过程中,一般认为泄漏点是流出液质量浓度达到上样液质量浓度的10%<sup>[6]</sup>。由图2可知,上样量为1.40 L即为泄漏点,此时累积泄漏率0.86%,上样量 $>1.4 \text{ L}$ 后流出液中泄漏率急剧增加,泄漏严重。由图3可知,上样2.0 L时,总西红花苷仍未到达泄漏点,说明树脂对总西红花苷吸附性能极好,大量水提液上样不会造成泄漏。计算泄漏点对应的栀子生药量与树脂量之比为1:1.5。

**2.4.4 水洗用量考察** 鉴于西红花苷类成分极性小,不易被水洗脱,故只考察京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷和羟异栀子苷的泄漏情况;而环烯醚萜苷水溶性极好,为防止泄漏率过大,取已处理好的3份等体积SP825L型大孔树脂(1 BV=75 mL,下同),湿法

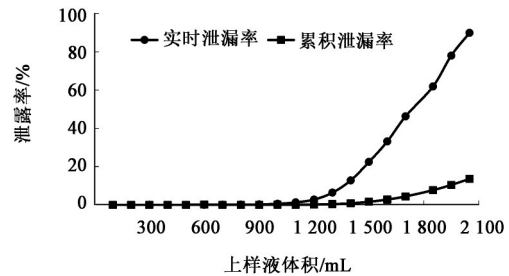


图2 SP825L型大孔树脂对栀子总环烯醚萜的泄漏曲线

Fig. 2 Leakage curves of total iridoids in Gardeniae Fructus by SP825L macroporous resin

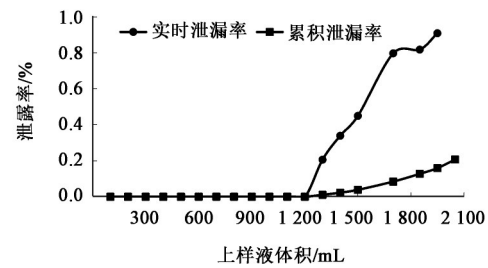


图3 SP825L型大孔树脂对栀子总西红花苷的泄漏曲线

Fig. 3 Leakage curves of total crocins in Gardeniae Fructus by SP825L macroporous resin

装柱,以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样,分别进行不加水洗和加入1、2 BV的水洗脱3种方式,收集水洗液,测定京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷和羟异栀子苷含量,计算总环烯醚萜泄漏率分别为0、0.73%、1.98%;继续加30%乙醇4 BV洗脱,收集醇洗液,测定含量,结果总环烯醚萜质量浓度分别为6.386 9、8.449 4、9.465 4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。说明随着加水量的增加,指标成分泄漏率及其在醇洗液中的含量均增加,综合除杂效果和泄漏情况考虑,确定水洗用量2 BV。

**2.4.5 乙醇体积分数考察** 取已处理好的SP825L型大孔树脂75 mL湿法装柱,以 $7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 加入 $42.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 栀子水提液1 165 mL,加去离子水2 BV水洗除杂,加体积分数分别为10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%的乙醇各4 BV进行洗脱,每1 BV收集1份洗脱液,以乙醇体积分数为横坐标,累积洗脱量为纵坐标,绘制洗脱曲线,见图4。结果发现环烯醚萜苷累积量随着乙醇体积分数增加呈

现先上升后趋于平稳的趋势,当乙醇体积分数为30%时最先达到高点,继续增加并无明显升高。西红花苷累积量随着乙醇体积分数的增加也呈现先上升后归于平稳的趋势。乙醇体积分数为30%时,西红花苷累积量少,环烯醚萜累积量高,说明30%乙醇可以将环烯醚萜成分基本洗脱下来,同时不将西红花苷成分洗脱下来。故采用30%乙醇洗脱得到环烯醚萜类成分,继续采用70%乙醇洗脱得到西红花苷成分。

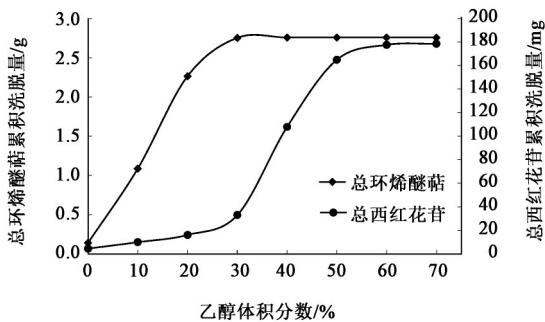


图4 乙醇体积分数对栀子中指标成分的洗脱曲线  
Fig. 4 Elution curves of index components in Gardeniae Fructus by volume fraction of ethanol

**2.4.6 洗脱剂用量考察** 取已处理好的SP825L型大孔吸附树脂75 mL湿法装柱(1 BV=75 mL),加入49.39 g·L<sup>-1</sup>栀子水提液1 012 mL,上样流速设定为5 mL·min<sup>-1</sup>,用去离子水2 BV水洗除杂,加30%乙醇6 BV洗脱,收集洗脱液,每0.5 BV为1份。继续使用70%乙醇6 BV洗脱,收集洗脱液,每0.5 BV为1份,测定各指标成分含量,计算总环烯醚萜、总西红花苷的累积洗脱量。以洗脱剂用量为横坐标,累积洗脱量为纵坐标,绘制洗脱曲线,见图5和图6。结果发现随着30%乙醇用量增加,总环烯醚萜累积洗脱量呈先急剧增加后缓慢上升的趋势,当洗脱液体积达到4 BV时基本不再变化,而总西红花苷累积洗脱量则较低;同时,随着70%乙醇用量的增加,总

表6 栀子大孔树脂纯化工艺的上样流速考察

Table 6 Investigation on flow rate of sample loading in purification process of Gardeniae Fructus

流速/BV·h <sup>-1</sup>	累积洗脱量/mg				
	京尼平苷	京尼平龙胆双糖苷	羟异栀子苷	西红花苷-1	西红花苷-2
1	13 192.36	3 502.73	1 087.63	1 036.52	182.45
2	13 302.54	3 532.77	781.92	1 018.23	179.43
3	13 188.28	3 517.04	774.11	990.44	177.76

**2.4.8 验证试验** 综上所述,大孔树脂纯化栀子总环烯醚萜和总西红花苷的最佳工艺为SP825L型树脂按生药量-树脂量(1:1.5)湿法装柱,栀子水提液

西红花苷累积洗脱量呈先增加后趋于平稳的趋势,3 BV时稳定不变,故确定总环烯醚萜、总西红花苷的洗脱剂用量分别为4、3 BV。

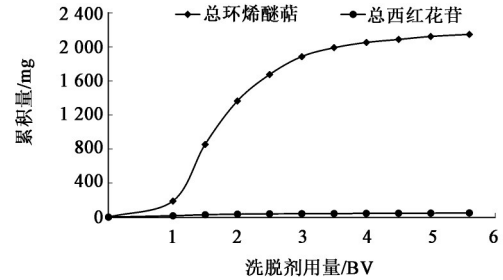


图5 栀子纯化工艺中30%乙醇洗脱用量考察  
Fig. 5 Investigation on amount of 30% ethanol in purification process of Gardeniae Fructus

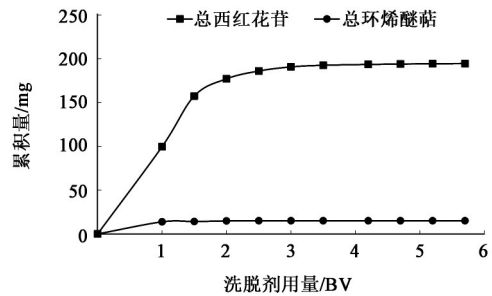


图6 栀子纯化工艺中70%乙醇洗脱用量考察  
Fig. 6 Investigation on amount of 70% ethanol in purification process of Gardeniae Fructus

**2.4.7 上样流速考察** 取栀子药材900 g,按优选的工艺制备水提液,放冷,滤过,均分为3份,备用。取预处理好的3份SP825L型大孔树脂,每份450 mL,湿法装柱,分别以1、2、3 BV·h<sup>-1</sup>的流速上样,用去离子水2 BV水洗除杂,30%乙醇4 BV洗脱得醇洗液,测定京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷和羟异栀子苷含量;继续用70%乙醇3 BV洗脱,收集醇洗液,测定西红花苷-1、西红花苷-2含量,计算累积洗脱量,结果见表6,综合考虑,选择上样流速3 BV·h<sup>-1</sup>。

以流速3 BV·h<sup>-1</sup>上样,弃去流出液,加水2 BV水洗除杂,弃去水洗液,加30%乙醇4 BV洗脱,得总环烯醚萜醇洗液,继续用70%乙醇3 BV洗脱,得总西

红花苷醇洗液。取栀子药材 300 g,按优选的提取工艺和纯化工艺平行操作 3 次,真空干燥得黄色(总环烯醚萜)和红色(总西红花苷)提取物,计算干膏得率(干膏得率=提取物质量/300×100%),测定指标成

分含量并计算转移率,见表 7。结果发现 3 批黄色提取物中总环烯醚萜质量分数均>610 mg·g<sup>-1</sup>,转移率均>73%;而 3 批红色提取物中总西红花苷质量分数均>73 mg·g<sup>-1</sup>,转移率均>37%。

表 7 栀子大孔树脂纯化工艺的验证试验

Table 7 Validation test of purification process of *Gardeniae Fructus* by macroporous resin

No.	质量分数/mg·g <sup>-1</sup>					干膏得率/%		转移率/%	
	京尼平苷	京尼平龙胆双糖苷	羟异栀子苷	西红花苷-1	西红花苷-2	总环烯醚萜	总西红花苷	总环烯醚萜	总西红花苷
1	483.57	146.56	15.94	65.64	8.04	8.58	4.87	75.57	37.17
2	470.17	146.40	13.40	67.99	8.39	9.04	4.99	77.64	38.53
3	456.10	148.82	11.15	68.61	8.81	8.77	4.94	73.63	39.05

2.5 干燥工艺 取醇洗液适量,均等分为 2 份。其中,1 份 30% 醇洗液和 70% 醇洗液分别浓缩成相对密度 1.41(60 °C)、1.12(50 °C)的稠膏,70 °C 真空干燥;另外 1 份喷雾干燥,进口温度 185~190 °C,出口

温度 75~100 °C。计算干膏得率并指标成分含量,见表 8。结果发现 2 种干燥方式所得样品中各成分含量差异无统计学意义,但喷雾干燥所得细粉粘壁,损失严重,故选择 70 °C 真空干燥。

表 8 栀子提取物的不同干燥方式考察

Table 8 Investigation on different drying methods of *Gardeniae Fructus* extract

干燥方式	质量分数/mg·g <sup>-1</sup>					干膏得率/%	
	京尼平苷	京尼平龙胆双糖苷	羟异栀子苷	西红花苷-1	西红花苷-2	总环烯醚萜	总西红花苷
真空	437.52	112.69	17.88	65.64	8.04	9.19	5.18
喷雾	449.81	116.17	23.89	67.99	8.39	4.89	2.71

2.6 中试放大工艺 取栀子药材 25 kg,SP825L 型大孔吸附树脂 37.5 L,按优选的工艺条件进行提取和纯化,得黄色提取物 2.22 kg、红色提取物 0.65 kg,与验证试验平均值比较,总环烯醚萜中试提取量 590.75 mg·g<sup>-1</sup> 稍低于小试的 630.71 mg·g<sup>-1</sup>,转移率 70.48% 稍低于小试的 75.62%,干膏得率 8.89% 与小试的 8.80% 基本一致。总西红花苷中试提取量 83.37 mg·g<sup>-1</sup> 高于小试的 75.83 mg·g<sup>-1</sup>,转移率 22.20% 低于小试的 38.22%,中试干膏得率 2.60% 低于小试的 4.93%。说明优选的工艺条件稳定可行。

### 3 讨论

栀子属于清热泻火药,活性成分主要为环烯醚萜类和西红花苷类,分别以京尼平苷、西红花苷-1 为主,但中药化学成分众多,通过多成分、多靶点协同发挥药效,因此多指标综合评分是优化中药提取纯化工艺的重要方法。因此,本文选择栀子中药效确切、研究较多的京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、羟异栀子苷、西红花苷-1 和西红花苷-2 作为综合考察指标。栀子水提液中含有大量杂质,若直接通过大孔树脂,易堵塞树脂,降低纯化效果,缩短树脂使用寿命。笔者在实验过程中发现,水提液离心后上样

易在树脂柱上残留灰色泥状沉淀(可能是栀子中富含油脂类成分,离心后不易分层而析出),这会影响树脂的吸附,大大降低纯化效果。抽滤能去除杂质但效率太低,经过探索,最终采用无纺布过滤,该方法可有效滤除杂质且操作简便,适合工业化生产。

在药材提取过程中,发现药材到水提液的值传递过程中京尼平苷转移率>100%,推测是加热过程中其他成分转化为京尼平苷或者药材提取不完全。基于此,笔者对此进行了研究,发现按 2020 年版《中国药典》(一部)“栀子”项下的供试品溶液制备方法并不能提取完全,而在提取方法、提取溶剂、超声时间等因素中,提取溶剂影响最大,分别对水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇进行考察,结果发现提取效果排序为含水乙醇>含水甲醇>水>纯甲醇,可能是京尼平苷易溶于水和乙醇,含水乙醇能最大限度地将其提取出来。但是否同时存在加热过程中成分转化问题尚有待进一步研究。

大孔树脂是将吸附性、筛选性相结合的分选材料,其吸附能力由孔径、比表面积、表面极性等因素所决定,作用主要包括范德华力和氢键<sup>[21]</sup>。本文选

用了 SP825L、HPD100、NKA 和 HPD600 型大孔树脂,初步考察了不同类型树脂对总环烯醚萜和总西红花苷的富集效应。目前,多采用静态吸附试验考察大孔树脂型号,其中树脂和水提液的比例极为重要。水提液加入量过少,树脂呈不饱和状态,则不同树脂吸附量基本一致,无法筛选树脂。而加入大量水提液,树脂达到过饱和,则不同型号树脂吸附量不同,可以筛选出最佳树脂。大孔树脂中最大上样量考察是纯化过程中非常重要的一个因素,关系着树脂用量、洗脱剂用量,进而直接影响实验成本。最大上样量考察多采用泄漏点的确定来计算,一般认为泄漏点是流出液的质量浓度达到上样液质量浓度的 10%<sup>[6,22]</sup>。值得注意的是,这里的流出液质量浓度指的是实时流出液,也就是实时流出液的质量浓度达到上样液质量浓度的 10%,实际泄漏量远低于 10%。通过本文实验数据计算可知,当实时流出液质量浓度达到上样液质量浓度的 10%时,累积泄露率不足 1%。

本文优选的提取纯化工艺可以同时得到栀子的 2 种提取物。对比树脂吸附前后得到的干膏粉,从得率为 30.32% 的黑色提取物降低至 10% 以下的黄色和红色提取物,有效成分纯度提高、吸湿性降低。总环烯醚萜提取物质量分数 >59%,转移率 >70%,表明该工艺稳定可靠。总西红花苷提取物含量略低、转移率较差。因此如何进一步提高工业化生产中总西红花苷的含量和转移率,是后续研究的重点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 李木子. 栀子、白术及牛膝等饮片的质量评价与标准研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.

[2] 张丽茹. 栀子及其复方制剂中京尼平苷的药物动力学行为比较研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2004.

[3] 徐鑫,戚华文,高德嵩,等. 基于化学模式识别的栀子 UPLC 定量指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2020,45(18):4416-4422.

[4] 马金凤. 中药栀子主要化学成分研究[D]. 广州:暨南大学,2019.

[5] 朱安运,邓亮,孙琳,等. 西红花苷保护心血管疾病预防研究进展[J]. 中华中医药学刊,2018,36(2):336-340.

[6] 胡锦涛,吴瑾瑾,王群星,等. 大孔吸附树脂纯化延胡索总生物碱工艺研究[J]. 中草药,2018,49(18):4302-4310.

[7] HUA J, JUN L, LIANG C, et al. Adsorption and desorption of chlorogenic acid by macroporous adsorbent resins during extraction of *Eucommia ulmoides* leaves[J]. Ind Crop Prod,2020,149:112336.

[8] 额尔敦巴雅尔,王琦铭,云雪艳,等. 棉籽中黄酮的提取、纯化及主要成分分析[J]. 中国油脂,2021,46(6):108-113,145.

[9] 郭婕,王欢,张祁,等. 竹柏叶中黄酮类成分的分离与鉴定[J]. 林产化学与工业,2021,41(3):85-94.

[10] 杨茹,刘聪燕,许婷,等. 5种大孔吸附树脂对淫羊藿总黄酮的吸附特性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(6):113-120.

[11] HOU M Y, HU W Z, XIU Z L, et al. Efficient enrichment of total flavonoids from *Pteris ensiformis* Burm. extracts by macroporous adsorption resins and *in vitro* evaluation of antioxidant and antiproliferative activities[J]. J Chromatogr B,2019,1138:121960.

[12] 董嘉琪,张晓松,彭晓婷,等. 响应面法优化红芪多糖的提取工艺[J]. 动物医学进展,2021,42(4):64-71.

[13] 马伟,张美琦,刘振鹏,等. 正交试验对人参多糖水提醇沉工艺的优化[J]. 东北林业大学学报,2019,47(12):90-94.

[14] 张旭,王锦玉,全燕,等. 中药水煎液前处理方法对大孔吸附树脂分离效果的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):1-3.

[15] 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):286-290.

[16] 曹亚楠,刘常金,韩世明,等. 栀子黄色素富集纯化对其抑制 LDL 氧化修饰的影响[J]. 精细化工,2020,37(4):741-751.

[17] 商锋,尹胜,肖潇,等. 大孔吸附树脂纯化制备京尼平苷酸的研究[J]. 食品工业科技,2016,37(1):93-97.

[18] 刘育容,丁克毅,刘军. 川栀子中京尼平苷的提取吸附工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(11):1806,1864-1867.

[19] 伍法杰,孙琳,赵媚,等. 阴离子交换树脂对人参皂苷的吸附/洗脱特性考察及 LC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(13):127-136.

[20] 付小梅,王峥涛. 西红花苷-1 的稳定性研究[J]. 食品科学,2012,33(5):71-73.

[21] 吕苗凯,霍志鹏,刘元雪,等. 地榆成分在 D101 型大孔树脂和聚酰胺树脂上保留行为的 LCMS-IT-TOF 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(14):152-163.

[22] 任莉莉,杨凌鉴,彭勇,等. 7 种大孔吸附树脂用于苦参碱分离性质研究[J]. 特产研究,2021,43(6):26-30,40.

[责任编辑 刘晔]