

素馨花总环烯醚萜苷的大孔树脂富集纯化工艺优选

罗赛赛,郝婷,赵桂琴*

(承德医学院中药研究所,河北省中药研究与开发重点实验室,河北承德 067000)

[摘要] 目的:优选大孔树脂富集纯化素馨花总环烯醚萜苷的工艺条件。方法:采用 HPLC 测定橄榄苦苷含量。以橄榄苦苷为指标成分,通过静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号,通过单因素试验和正交试验考察大孔树脂富集纯化工艺。结果:XDA-16 型大孔树脂吸附洗脱性能最好,最佳纯化工艺条件为上样液生药质量浓度 $0.08 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,上样量 $0.7 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$,树脂柱径高比 1:3,吸附流速 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,加 8 BV 水洗除杂,用 70% 乙醇 4 BV 于 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱,收集洗脱液。结论:该工艺条件稳定可行,XDA-16 型大孔树脂可有效地富集纯化素馨花总环烯醚萜苷。

[关键词] 素馨花;总环烯醚萜苷;大孔树脂;正交试验;橄榄苦苷

[中图分类号] R283.6,R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0013-04

[doi] 10.11653/syfy2013150013

Optimization of Enrichment and Purification Technology for Total Iridoid Glycosides from *Jasminum officinale* by Macroporous Resin

LUO Sai-sai, HAO Ting, ZHAO Gui-qin*

(Institute of Chinese Traditional Medicine, Chengde Medical University, Hebei Provincial Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Chengde 067000, China)

[收稿日期] 20130110(011)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2010001354)

[第一作者] 罗赛赛,硕士,从事中草药有效成分提取分离研究,Tel:13398671073,E-mail:515277424@qq.com

[通讯作者] *赵桂琴,博士,副教授,从事天然抗病毒活性产物研究与开发,Tel:0314-2291908,E-mail:zhaoguiqin1971@sina.com.cn

[参考文献]

- [1] 李宏,姜怀春,邹国林.贯叶连翘活性成分研究新进展[J].中草药,2001,32(7):657.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:215.
- [3] 张博.HPLC法测定贯叶连翘中贯叶金丝桃素含量[J].中草药,2001,32(4):35.
- [4] 王晓利,张俊松,罗谦,等.HPLC法测定贯叶连翘药材及提取物中贯叶金丝桃素的含量[J].中药材,2006,29(10):1047.
- [5] 郝鹏飞,卫冰,刘富岗,等.优化酶提取贯叶连翘药材活性成分工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):39.
- [6] 刘文,蒋世云.中药指纹图谱研究与应用进展[J].中国药房,2011,22(19):1819.
- [7] 关洪月,李林,刘晓,等.中药指纹图谱相似度计算方法探析[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282.
- [8] 宋小妹,杨新杰,王薇,等.珠子参的 HPLC 指纹图谱及模式识别[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):59.
- [9] 李治建,周露,古力娜·达吾提,等.地锦草洗脱部位指纹图谱特征与其抗真菌作用的灰关联度分析[J].中国中药杂志,2012,37(5):580.
- [10] 赵萍萍,霍仕霞,高莉,等.驱虫斑鸠菊提取物指纹图谱与其对人 A375 黑素瘤细胞增殖作用的灰关联度分析[J].中国中药杂志,2012,37(5):585.
- [11] 王冬梅,刘朝,杨得坡.指纹图谱技术对贯叶连翘提取物制备工艺过程的评价[J].中国中药杂志,2006,31(10):800.
- [12] 王启帅,杨云,肖功胜,等.北柴胡 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立及色谱数据的分析[J].中成药,2011,33(3):373.

[责任编辑 仝燕]

[Abstract] Objective: To optimize enrichment and purification technology of total iridoid glycosides from *Jasminum officinale* by macroporous resin. **Method:** With oleuropein as index, its content was determined by HPLC. Types of macroporous resin were optimized by static adsorption-elution test, enrichment and purification technology was investigated by orthogonal test and single-factor tests. **Result:** XDA-16 macroporous resin showed better effect than others, optimum purification technology was as following: the concentration of sample liquid $0.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, height-diameter ratio of 1:3, absorption velocity $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, dosage of sample liquid of $0.7 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, washed impurity with 8 BV water, then eluted with 4 BV 70% ethanol at $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, collected eluent. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible. XDA-16 macroporous resin had a good enrichment and purification effect on total iridoid glycosides from *J. officinale*.

[Key words] *Jasminum officinale*; total iridoid glycosides; macroporous resin; orthogonal test; oleuropein

素馨花又名素馨针、耶悉茗花,具有疏肝解郁、行气止痛之功效,民间用于治疗消化不良、十二指肠球部溃疡及慢性肝炎、肝硬化等症^[1]。赵桂琴等^[2]研究表明素馨花中环烯醚萜苷类及三萜皂苷类成分为其抗 HBV 活性的主要物质基础。郝婷等^[3]对素馨花中总环烯醚萜苷提取工艺进行研究,结果表明乙醇冷浸提取法可使总环烯醚萜苷纯度 >40%。为进一步提高醇冷浸提取物中总环烯醚萜苷纯度,本实验采用大孔吸附树脂技术对其进行富集纯化,以橄榄苦苷含量为跟踪指标,通过比较 8 种大孔树脂的吸附与解吸附性能,筛选最佳大孔树脂型号,并优选其富集纯化工艺,为素馨花中环烯醚萜苷类成分的深入研究提供依据。

1 材料

LC-10AS 型高效液相色谱仪 (CTO-10A 型柱温箱, DGU-3A 型脱气机, SPD-10A 型紫外检测器, LC-10AS 型二元泵, TL9900 色谱工作站, 日本岛津), Hp-8453 型紫外分光光度计 (美国安捷伦公司), AG245 型分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司), RZ-6 型冷冻干燥机 (德国 MARTIN CHRIST 公司)。

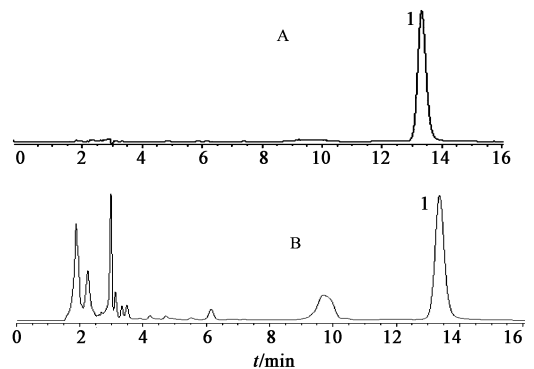
D-101, AB-8 型大孔树脂 (天津兴南允能高分子技术有限公司), XDA-1, XDA-16 型大孔树脂 (西安蓝晓科技新材料股份有限公司), HPD-100, HPD-400 型大孔树脂 (沧州宝恩吸附材料科技有限公司), ME-1, ME-2 型大孔树脂 (天津欧瑞生物科技有限公司), 素馨花 (购自亳州药材交易中心, 经军事医学科学院放射与辐射医学研究所李彬博士鉴定为木犀科茉莉属植物素馨花 *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* 的干燥花蕾), 橄榄苦苷对照品 (实验室自制, 纯度 99.5%), 乙腈为色谱纯, 其余试剂为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 橄榄苦苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取橄榄苦苷对照品 20.2 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 25 °C, 检测波长 232 nm, 流动相乙腈-水 (22:78), 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 橄榄苦苷

图 1 素馨花 HPLC

2.1.3 线性关系考察 精密吸取橄榄苦苷对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 6 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 按上述色谱条件进样, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 4.868 \times 10^5 X - 3.578 \times 10^6$ ($r = 0.9999$), 表明橄榄苦苷在 $20.2 \sim 242.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性。

2.1.4 乙醇提取物的制备^[3] 称取素馨花药材 1 kg, 加 12 倍量 60% 乙醇冷浸提取 3 次, 每次 48 h, 合并提取液, 高速离心 ($9000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 回收乙醇, 冷冻干燥得浅黄色粉末 400 g, 备用。

2.1.5 上样液的制备 取乙醇提取物适量, 加水制

成 $0.04 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液,高速离心,取离心液,即得(橄榄苦苷质量浓度 $2.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.2 大孔树脂筛选

2.2.1 大孔树脂的预处理 称取不同型号的大孔吸附树脂适量,用 95% 乙醇浸泡 24 h,湿法装柱,加 95% 乙醇洗脱,至流出液与水混合不呈白色浑浊,用水洗至无醇味,备用。

2.2.2 树脂型号的选择 将预处理好的 8 种(D-101, AB-8, XDA-1, XDA-16, HPD-100, HPD-400, ME-1, ME-2) 大孔树脂各 2 g 分别置于具塞锥形瓶中,分别加入上样液 50 mL 静态吸附,室温放置 18 h,每 2 h 振摇 1 次。取上清液,测定橄榄苦苷质量浓度,计算树脂的比吸附量分别为 $44.52, 20.08, 53.00, 57.35, 53.30, 47.32, 50.37, 50.75 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。将吸附饱和的不同树脂置于具塞锥形瓶中,各加入 95% 乙醇 50 mL 静态洗脱,室温放置 18 h,每 2 h 振摇 1 次,测定洗脱液中橄榄苦苷质量浓度,计算洗脱率依次为 85.72%, 85.06%, 87.59%, 91.10%, 88.60%, 84.58%, 86.39%, 88.07%, 说明 XDA-16 型大孔树脂的吸附和洗脱能力最好。

比吸附量 = (吸附前上样液中橄榄苦苷质量 - 吸附后样品液中橄榄苦苷质量) / 树脂量;

洗脱率 = 洗脱液中橄榄苦苷质量 / 吸附量。

2.3 XDA-16 型大孔树脂富集纯化工艺优选

2.3.1 正交试验考察^[4-6] 选取上样液质量浓度、树脂柱径高比、吸附流速为考察因素,树脂用量 17 g (柱床体积 30 mL),上样液 250 mL (生药质量浓度 $0.04 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$),加 10 BV 水洗除杂,用 5 BV 75% 乙醇洗脱,测定洗脱液中橄榄苦苷含量,以回收率为指标,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

回收率 = (洗脱液中橄榄苦苷质量 / 上样液中橄榄苦苷质量) $\times 100\%$

表 1 素馨花总环烯醚萜苷的大孔树脂富集纯化工艺优选正交试验因素水平

水平	A 上样液质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	B 径高比	C 吸附流速/ $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$	D(空白)
1	0.04	1:3	1	1
2	0.06	1:6	2	2
3	0.08	1:10	3	3

由直观分析可知,各因素对纯化工艺的影响顺序为 $C > A > B$ 。方差分析表明,A, B, C 因素均无显著性差异。结合工业生产实际,确定优化方案为

表 2 素馨花总环烯醚萜苷的大孔树脂富集纯化工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	总环烯醚萜苷提出率/%
1	1	1	1	1	94.12
2	1	2	2	2	88.66
3	1	3	3	3	87.47
4	2	1	2	3	94.32
5	2	2	3	1	88.39
6	2	3	1	2	94.38
7	3	1	3	2	89.29
8	3	2	1	3	95.47
9	3	3	2	1	90.80
K_1	270.25	277.73	283.97	273.31	
K_2	277.03	272.52	273.78	272.33	
K_3	275.56	272.65	265.15	277.26	
R	5.31	5.08	18.82	4.93	

表 3 提出率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	8.591	2	4.293	1.892	>0.05
B	5.885	2	2.943	1.296	>0.05
C	59.167	2	29.584	13.03	>0.05
D(误差)	4.541	2	2.27	1.0	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$; $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ 。

$A_3B_1C_2$, 即上样液生药质量浓度 $0.08 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 径高比 1:3, 吸附流速 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.3.2 上样量考察 称取经预处理后的 XDA-16 型大孔树脂 17 g (径高比 1:3, 柱床体积 30 mL), 上样液 350 mL (橄榄苦苷质量浓度 $5.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 生药质量浓度 $0.08 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速上柱, 每 10 mL 收集 1 份, 测定流出液中橄榄苦苷质量浓度。以流份编号为横坐标, 橄榄苦苷质量浓度为纵坐标, 绘制泄露曲线, 结果见图 2。结果显示流份 1~15 未检测到橄榄苦苷, 流份 16 开始橄榄苦苷有少量泄露, 为保证药液吸附完全, 确定上样液 150 mL 时为最佳上样量, 即 XDA-16 型大孔树脂的最佳吸附量 $0.7 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.3.3 水洗体积考察 量取上样液 150 mL, 按优化的工艺条件上样, 加水以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速除杂, 每 1 BV (30 mL) 收集 1 份, 共 8 份, 测得每份中橄榄苦苷含量极少, 固含物累计质量分别为 0.348, 0.434, 0.484, 0.521, 0.549, 0.574, 0.593, 0.598 g, 故选取

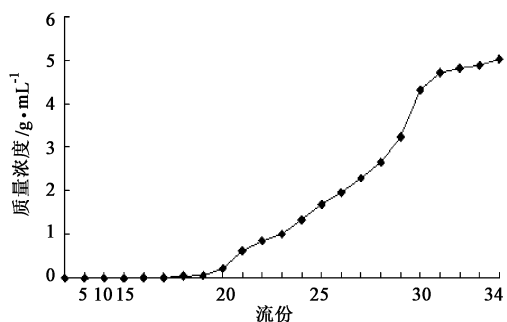


图 2 橄榄苦苷泄露曲线

加水用量 8 BV。

2.3.4 洗脱剂考察 量取上样液 150 mL,按优化工艺条件上样,加 8 BV 水冲洗,依次用体积分数 10%、30%、50%、70%、95% 的乙醇洗脱,洗脱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,每 5 BV 收集 1 份,共 5 份,测得每份洗脱液中橄榄苦苷质量分别为 31.16, 279.5, 369.07, 40.74, 0 mg, 计算累计回收率分别为 3.99%, 39.83%, 87.14%, 92.37%, 92.37%, 故选取洗脱溶剂为 70% 乙醇。

2.3.5 洗脱剂用量考察 量取上样液 150 mL,按优化工艺上样,加 8 BV 水冲洗,用 70% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱,每 1 BV 收集 1 份,共 6 份,结果每份洗脱液中橄榄苦苷质量分别为 461, 264, 15.6, 0.55, 0.36, 0 mg, 故洗脱剂用量 4 BV。

2.3.6 洗脱流速考察 分别取 3 份上样液,每份 150 mL,按优化条件分别上样,加 8 BV 水冲洗,用 70% 乙醇 4 BV 洗脱,洗脱流速分别为 2, 4, $6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,测定洗脱液中橄榄苦苷质量浓度,计算每份中橄榄苦苷回收率分别为 92.2%, 85.0%, 83.1%, 故确定洗脱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

综上所述,XDA-16 型大孔树脂富集纯化素馨花总环烯醚萜苷的最佳工艺条件为上样液生药质量浓度 $0.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,径高比 1:3,吸附流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,上样量 $0.7 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,加 8 BV 水洗除杂,用 70% 乙醇 4 BV 于 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱,收集洗脱液。

2.4 验证试验 量取上柱液 150 mL,按优化的工艺条件进行 3 次验证试验,结果橄榄苦苷回收率分别为 89.29%, 90.80%, 92.23%, 洗脱所得冷冻干

燥粉末中橄榄苦苷纯度分别为 31.97%, 32.80%, 33.7%。采用 UV 测得醇冷浸提取物中总环烯醚萜苷纯度分别为 47.11%, 47.33%, 48.78% (RSD 1.90%), 而冷冻干燥粉末中则分别为 78.80%, 81.10%, 81.32%, 表明 XDA-16 型大孔树脂对素馨花中总环烯醚萜苷富集纯化效果良好,且该工艺稳定可靠。

3 讨论

橄榄苦苷在素馨花总环烯醚萜苷中所占比重较大,且结构与素馨花中其他环烯醚萜苷类成分的基本结构相似,故选择橄榄苦苷为指标成分。大孔吸附树脂是一类新型非离子型具有大孔结构的高分子化合物,用于萜类纯化,能有效除去水溶性色素、多糖和无机盐等水溶性杂质^[7]。采用大孔吸附树脂法对素馨花总环烯醚萜苷进行富集纯化,上柱前后,总环烯醚萜苷纯度提高了 1.68 倍,且优选的纯化工工艺稳定可行。

[参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2006:2476.
- [2] ZHAO G Q, YIN Z F, DONG J X. Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jaminum officinale* L. var. *grandiflorum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125(2): 265.
- [3] 郝婷,赵桂琴,张树峰. 素馨花中总环烯醚萜苷提取工艺的研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(6): 1353.
- [4] 冯波,朱鹤云,关皎,等. 龙胆中环烯醚萜苷的大孔吸附树脂纯化工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(7): 20.
- [5] 李茂星,贾正平,胡之德,等. 大孔树脂富集纯化藏药独一味总环烯醚萜苷[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(17): 1743.
- [6] 杨军宣,吴天骄,尹蓉莉,等. 正交设计法优选酸枣仁皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(17): 63.
- [7] 周剑,丁玉峰. 大孔吸附树脂分离中草药有效成分的应用[J]. *中国医院药学杂志*, 2006, 26(1): 69.

[责任编辑 全燕]