

大孔树脂同步分离栀子中栀子苷和栀子黄色素工艺研究

朱琦, 余琪, 周丹英(浙江省中药研究所有限公司, 杭州 310023)

摘要: 目的 研究大孔树脂同步分离纯化栀子药材中的栀子苷和栀子黄色素。方法 通过比较不同大孔吸附树脂静态吸附栀子黄色素的能力, 并对最佳大孔吸附树脂纯化工艺进行筛选。结果 HPD-100 型树脂综合性能最佳, 其纯化工艺为: 上样液浓度 A440 在 60 左右, 以流样速度 $1 \sim 3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 上样; 水洗 $8 \sim 10 \text{ BV}$; 25% 乙醇冲洗 $3 \sim 5 \text{ BV}$ 体积; 70% 乙醇冲洗至洗脱液无色。结论 栀子苷得率 70%、栀子黄色素(色价 $100 \sim 500$ 、OD 小于 0.8 甚至达到 0.3)得率 80%(折算至栀子药材含量), 说明此工艺可行。

关键词: 分离纯化; 大孔吸附树脂; 栀子黄色素; 栀子苷

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)10-0823-04

Study of Separation and Purification for Geniposide and Gardenia Yellow from Gardenia Simultaneously with Macroporous Absorption Resin

ZHU Qi, YU Qi, ZHOU Danying(Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine Co.Ltd, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the separation and purification for geniposide and gardenia yellow from gardenia simultaneously with macroporous resin. **METHODS** Comparing the the static adsorption capacity of gardenia yellow was used to investigate different macroporous resin, and get the optimum purified process with the best macroporous resin. **RESULTS** The best macroporous resin: HPD-100 macroporous resin; and the purify process: the extracted solution(absorbency at 440nm was about 60) was passed through HPD-100 resin chromatographic column with flow rate of $1\text{-}3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, after which, eluted it with distilled water (8-10 times volum), 25% ethanol (double volum) and 70% ethanol to be almost colorless. **CONCLUSION** The percent of yield of geniposide was 70%, and that of gardenia yellow (color price between 100 to 500, the OD less than 0.8 or even 0.3) was 80% (equivalent to the content of medica gardenia), all proves that the technique condition is reasonable.

KEY WORDS: separation and purification; macroporous resin; gardenia yellow; geniposide

栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)为茜草科植物, 其成熟干燥果实具有护肝、利胆、降压、镇静、止血、消肿等作用。在我国临床应用有 1600 年的历史, 在中医临床常用于治疗黄疸型肝炎、扭挫伤、高血压、糖尿病等症。

栀子标志性成分为栀子苷, 同时富含的栀子黄色素可作为一种天然色素制备与使用。本试验就制备高色价、低 OD 的栀子黄色素同时分离获得较高纯度的栀子苷进行研究, 寻找一种高效、实用的生产工艺。本试验对不同型号大孔树脂纯化分离、并

基金项目: 浙江省科技厅重大科技专项(2006C12050)

作者简介: 朱琦, 男, 技术员 Tel: (0571)85229698

E-mail: zhuqiqi1985@yahoo.com.cn

对栀子黄色素和栀子苷有效分离、纯化工艺条件进行研究,以确立可行的分离纯化工艺。

1 仪器与材料

Lambda 20 紫外分光光度计(美国 PERKIN ELMER 公司), Agilent 1100 series 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司), Senco R-501 旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司), KQ-100DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱(嘉兴市电热仪器厂), AB 204-S 电子天平(瑞士商梅特勒托利多股份有限公司), LPB-8 喷雾干燥机(常州奥凯干燥设备有限公司), 玻璃树脂柱 30 cm×1.6 cm (春江自动化研究所); 栀子苷标准品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 110749-200613), 无水乙醇(分析纯), 95%乙醇(分析纯), D-101、X-5、HPD-80、HPD-100、HPD-400 型树脂(河北宝恩生物科技有限公司), 栀子黄色素(青岛鹏远天然色素研究所, 批号: 20070509、色价: $440\text{nm E}_{1\text{cm}}^{1\%} \geq 400$)。

实验用的栀子干燥成熟果实采于浙江省淳安县枫树岭镇, 经浙江省中药研究所俞旭平教授鉴定为中药材栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)。

2 方法与结果

2.1 上柱液的准备

称取栀子 100 g, 切成 3~5 mm 薄片后, 经药材 8~10 倍体积的 60%乙醇(以体积计)煎煮 3 次、每次 2 h, 合并提取液; 经离心过滤(可以将大部分水溶性物质包括微量的栀子苷和栀子黄色素去除, 如肉眼可见絮状物、鞣质等, 提取液中除栀子苷及色素外物质大部分被除去)后, 减压浓缩至相对密度 1.05 备用。

2.2 栀子苷的含量测定

依据中国药典 2005 版一部^[1]测定。

2.3 栀子黄色素的测定

2.3.1 供试品溶液的制备 精密量取分离所得栀子黄色素药液 1 mL、稀释至 100 mL 制成供试品溶液。

2.3.2 测定方法 比色法测定栀子黄色素浓度, 检测波长为 440 nm, 仪器预热 10~30 min, 以甲醇为空白溶液, 测定 440 nm 处吸光度。

2.3.3 线性关系考察 精密称取栀子黄色素对照品, 加甲醇溶解得 $1.091\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液, 分别量取对照品储备液稀释成 0.109 1, 0.218 2,

0.436 4, 0.654 6, 0.872 8, 1.091, 1.309 2, 1.527 4, 1.745 6, $1.963\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。测定各浓度吸光度, 以浓度为纵坐标, 以吸光度为横坐标, 得回归方程: $C=0.289\ 5\ A-0.011\ 3$ ($r=0.999\ 1$), 在 0.109 1~ $1.963\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系。

2.3.4 仪器精密度试验 取栀子黄色素供试液样品 1 份重复测定 5 次, 进行色谱、比色分析。测得峰面积的 RSD 为 0.83%。

2.3.5 稳定性试验 栀子黄色素供试液样品 1 份, 室温放置, 在 0, 2, 4, 6, 8 h 分别进行色谱、比色分析。得浓度 RSD 为 1.73%。

2.3.6 重复性试验 取栀子黄色素样品, 按“2.3.1”项下方法平行制备 6 份, 进行分析。浓度的 RSD 为 1.48%。

2.3.7 加样回收率 取已知含量的栀子黄色素样品, 加入栀子黄色素对照品适量, 进行测定。回收率为 100.01%, RSD 为 1.98% ($n=6$)。

2.4 不同型号树脂筛选研究

2.4.1 大孔吸附树脂预处理 为除去大孔吸附树脂中未聚合单体、致孔剂、分散剂、防腐剂等有机残留物, 需对树脂进行预处理。大孔树脂经 95%乙醇回流洗脱, 至洗脱液蒸干后无残留, 洗净树脂以 95%乙醇湿法装柱, 用去离子水冲洗至流出液不呈白色混浊且无醇味, 备用^[2]。

2.4.2 大孔吸附树脂的选择比较 各取 10 g 经预处理的大孔吸附树脂置于 100 mL 烧杯中, 加入药液 ($A_{238}=178.3$ 、 $A_{440}=50.9$ 、 $OD=3.5$) 80 mL, 静止吸附。3 h 后检测药液参数 A_{238} 、 A_{440} 。由表 1 分析得, 本实验所选取的树脂对栀子黄色素的吸附力都较强, 而对栀子苷的吸附力有一定的差别。X-5 型树脂选择性不强, 分离栀子黄色素和栀子苷效果不明显, 所以选取对栀子黄色素吸附力较强, 而对栀子苷吸附较小的 HPD-100、HPD-400 型树脂比较适宜(大孔吸附树脂吸附存在饱和, 栀子黄色素吸附越多, 栀子苷则越少, 越容易分离)。比较两者发现 HPD-100 型树脂吸附栀子黄色素能力较强, 而吸附栀子苷能力较弱, 故选取 HPD-100 型树脂进行后续实验^[3]。

2.5 纯化工艺考察

2.5.1 上样浓度的考察 大孔吸附树脂的吸附是一个选择吸附的过程, 过高的上样浓度必然影响色素的吸附, 而上样浓度过低必然会使吸附时间延

表 1 树脂吸附能力的比较

Tab 1 Comparison of adsorption capacity of resin

	HPD-80	HPD-100	HPD-400	D-101	X-5
吸附后 A238	53.1±5	70.0±5	74.7±5	89.1±5	45.2±5
吸附后 A440	16.4±5	18.0±5	19.8±5	21.0±5	14.7±5
栀子苷吸附率/%	70.0±2	61.0±2	58.0±2	50.0±2	75.0±2
黄色素吸附率/%	67.0±2	65.0±2	60.0±2	58.0±2	70.0±2

注：栀子苷、栀子黄色素吸附率的计算均参考文献^[4]

Note: The calculation of adsorption rate of Geniposide and Gardenia Yellow from Geniposide is dependent on reference^[4]

长，从而降低效率。本试验通过流动上样的方法，使用不同浓度的药液上柱(20 mL 树脂装入 30 cm×1.6 cm 柱)。通过检测，以流出上样后药液 A440=2 为上样终点(A440 大于 2 以后栀子黄色素损失量增大)。考察 A440 在 40~80(经实验摸索发现 A440 小于 40 则太稀，上样时间过长不利栀子苷及栀子黄色素分离，A440 大于 80 则过浓，树脂吸附不均匀，同样不利于栀子苷及栀子黄色素分离)浓度内的吸附变化。结果发现上样液浓度 A440 应选择在 50~70 之间(在 50~70 之间上样量较少，而色素吸附量相比其它浓度毫不逊色)。综合各项实验结果可见，选择药液稀释至 A440=60 时上柱，药液中栀子黄色素吸附量相对较大而上样量却相对较少，缩短了上样时间，有利于前期水及 25%浓度乙醇分离洗脱栀子苷。

2.5.2 上样流速的考察 流速慢，大孔吸附树脂与药液接触的时间长，有利吸附，但是总的上样速度过慢导致栀子苷亦被大量吸附，不利与前期栀子苷有效分离；流速快，栀子黄色素吸附不充分，色素泄露早，也不可取。本实验以稀释至 A440 为 60 的栀子提取液采用不同流速上柱 (20 mL 树脂装入 30 cm×1.6 cm 柱)，以上样后药液 A440 为 2 时为上样终点。研究流速对栀子黄色素及栀子苷的吸附的影响(大孔吸附树脂吸附存在饱和，栀子黄色素吸附量越大则栀子苷被吸附量就越小)。结果发现流速在 1~3 mL·min⁻¹ 时栀子黄色素的吸附较充分。

2.5.3 洗脱液的选择

2.5.3.1 乙醇浓度的选择 以稀释至 A440 为 60 的栀子提取药液上柱(20 mL 树脂装柱 30 cm×1.6 cm)，各上样 250 mL，色素量 404.4 mg，OD=2.58，计算总上样色素量，分别以 500 mL 不同浓度的乙醇冲洗。计算洗脱液的色素含量及 OD。结果发现在去离子水和低浓度的 10%、20%乙醇冲洗下，栀子苷被洗脱而栀子黄色素几乎无损失，但栀子苷冲洗相对完全则需增加醇用量。增加乙醇浓度，栀子黄色素、栀子苷的洗脱量增大。在以 25%乙醇冲洗

时，洗脱液的 OD 相对达到最大(即栀子苷冲洗量相对达到最大)。而高浓度的醇溶液对两者的洗脱几乎无选择性。所以选择先以水冲洗大孔树脂孔隙间部分的栀子苷，再以 25%乙醇冲洗被大孔吸附树脂吸附的栀子苷，最后以 70%的乙醇冲洗栀子黄色素及最后微量的栀子苷，达到分离精制的目的。

2.5.3.2 去离子水洗用量的考察 以 A440 为 60 的栀子提取液上 HPD-100 型大孔树脂柱 (20 mL 树脂装柱 30 cm×1.6 cm)，以上样速度为 1~3 mL·min⁻¹ 各上样 250 mL，结果发现冲洗去离子水 8~10 BV 后再经 25%乙醇冲洗可使栀子苷冲洗较完全。

2.5.4 冲洗流程的研究 以 A440 为 60 的栀子黄色素水溶液上柱(20 mL 树脂装柱 30 cm×1.6 cm)，采用两种冲洗方法对精制效果进行比较。表 2 结果显示两种方法都可以达到精制栀子黄色素的目的。方法一冲洗过程精确，需要大量溶剂，由于冲洗速度的限制，使冲洗时间较长，虽然最后可以得到色素精制品，但试剂及色素浪费较多，使色价降低。方法二虽然栀子苷的冲洗没有方法一完全，但由于色素浪费少，最后冲洗可以得到色素精制品，且冲洗过程容易操作，利于生产。

表 2 冲洗流程比较

Tab 2 Comparison of eluting process

	冲洗终点判断	冲洗结果
方法一	低浓度醇冲洗至流出液 OD 接近 1.0	得到 OD=0.54 色价 290 的栀子黄色素，色素得率 50%左右
方法二	洗脱液用量达到 5~10 倍树脂体积	得到 OD=0.57 色价 327 的栀子黄色素，色素得率 90%左右

2.6 产品纯度的验证

根据上述结果，按最佳条件，称取经预处理的 HPD-100 大孔树脂 20 mL(湿法装柱 30 cm×1.6 cm 柱)，上 A440 在 60 左右栀子提取液，以流样速度 1~3 mL·min⁻¹ 上样至上样后药液 A440>2；水洗 8~10 BV；25%乙醇冲洗 3~5 BV 体积；70%乙醇冲洗至洗脱液无色，分别收集上样后药液、水冲洗液、25%

乙醇冲洗液(栀子苷药液);分段收集 70%乙醇冲洗液(栀子黄色素药液);分别经喷雾干燥后得到有效成分。所收集栀子苷药液和栀子黄色素药液分别经栀子苷和栀子黄色素含量测定方法测定含量,计算得率。

结果所得栀子苷成品纯度在 80%左右,得率在 75%以上。栀子黄色素平均色价在 320 左右,OD 值低于 0.8(最高色价可达到 500,OD 低于 0.3 而 OD 值在 0.4 左右有效避免了栀子黄色素的绿变^[5]),得率 88%上下(折算至药材含量)。

2.7 树脂再生方法

酸碱处理法常用于树脂再生,原理是利用稀酸和稀碱,与树脂中残留的成分反应成盐,经过冲洗达到再生的目的。此方法需经酸碱的浸泡和冲洗,溶剂使用量大,且酸碱的使用,存在一定的危险性,对环境也有影响。HPD-100 树脂用于精制栀子黄色素,是基于分子筛的原理,对栀子苷和栀子黄色素进行吸附,然后通过不同浓度的乙醇溶液冲洗,达到分离精制的目的。栀子苷和栀子黄色素在水和乙醇中溶解性好,在实践中发现随着冲洗量的增加栀子苷和栀子黄色素的洗脱率也升高。因此采用常压回流的方法进行再生树脂。经实验常压法再生树脂,能有效地节省溶剂,提高树脂的使用效率,精制后的树脂能够满足精制的要求,完全可以替代传统的酸碱法。

3 讨论

为了降低工业化生产成本,尽可能重复利用大孔树脂,需要对使用过的大孔树脂进行再生利用。在实验过程中,利用大孔树脂生产企业提供简单再

生大孔树脂方法,再生率可达到 85%以上,且可循环再生效果明显。

本试验对多种大孔树脂分离栀子黄色素和栀子苷的效果考察比较,并对综合性能较优的 HPD-100 型大孔树脂分离纯化工艺进行了系统研究。研究结果表明,该工艺简单、安全、适合工业化生产、环保(不产生任何工业废水,所用试剂均可回收循环再利用)、栀子苷得率(折算到药材)可达到 70%(栀子苷分离液体还可在经另外型号大孔树脂精制分离,制得纯度 95%以上的栀子苷成品),栀子黄色素(高色价、OD 低于 0.8 甚至达到 0.3 的色素可有效降低乃至避免色素绿变,是一种安全的、市场前景广阔的纯天然食用色素)得率(折算到药材)可达到 80%,为栀子中药的深加工奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Ch.P (2005)Vol I (中国药典 2005 年版.一部)[S]. 2005: 173.
- [2] ZHANG S Q, HOU J J, LI Q S. Separation and purification process of total flavones and total tannins from Apocynum venetum leaves with macroreticular resin [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(10): 1141-1144.
- [3] ZHOU Z S, PAN J X, CHEN YK. Technical investigation on refining of high colority gardenia yellow pigment [J]. Fine Chem(精细化工), 2007, 24(6): 581-583.
- [4] ZHANG D Q, LV F J, TAI J X, et al. Purification of gardenia yellow pigment with macroporous resin [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(农业工程学报), 2004, 20(4):165-167.
- [5] GAO Y X, LI Y Y. Research progress on extraction and purification of gardenia yellow pigment [J]. China Food Additives(中国食品添加剂), 2005, (3): 14-17.

收稿日期: 2008-12-24