

# 大孔树脂吸附分离栀子浸提液中的三萜酸 及结构鉴定

廖晓峰<sup>1,2</sup>, 陈正行<sup>1</sup>, 姚惠源<sup>1</sup>, 于 荣<sup>2</sup>

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 东华理工学院, 江西 抚州 314000)

**摘 要:** 本文对药食两用的传统中药栀子 (*Gardenia jasminodes Ellis*) 中的主要药用功能成分三萜酸采用了非极性的 NKA 大孔树脂进行了吸附分离纯化研究, 最终产品纯度达 90.2%。对产品通过 DSC、IR、EI-MS、<sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C NMR 等分析手段进行了结构鉴定, 证实其是熊果酸。

**关键词:** 栀子; 大孔吸附树脂; 三萜酸; 结构鉴定

Study on Isolation and Identification of Tri-terpene Acids from *Gardenia jasminodes Ellis*  
by Macroporous Resin

LIAO Xiao-feng<sup>1,2</sup>, CHEN Zheng-xing<sup>1</sup>, YAO Hui-yuan<sup>1</sup>, YU Rong<sup>2</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;  
2. East China Institute of Technology, Fuzhou 314000, China)

**Abstract:** The article studied in isolation and purification of tri-terpene acids from *Gardenia jasminodes Ellis* by macroporous resin. The purity of final product reached to 90.2% and the structure identification by DSC, IR, EI-MS, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, HPLC, etc, the results showed that the tri-terpene acids is ursolic acids.

**Key words:** *Gardenia jasminodes Ellis*; macroporous resin; tri-terpene acids; structure identification

中图分类号: 0658

文献标识码: A

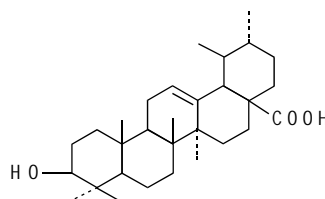
文章编号: 1002-6630(2006)08-0114-06

大孔吸附树脂 (Macroporous Resin) 是六十年代末发展起来的一类有机高分子吸附剂, 它具有多孔网状结构和较好的吸附性能, 在实际应用中对一些与其骨架结构相近的分子如芳香族环状化合物尤其具有很强的吸附能力。目前已广泛应用于废水处理、医药工业、临床鉴定和食品等领域, 在我国, 采用大孔吸附树脂分离纯化中药提取液已越来越受到人们的重视。非极性吸附树脂是由偶极矩很小的单体聚合制得的不带任何功能基的吸附树脂, 典型的例子就是苯乙烯-二乙烯苯体系的吸附树脂。这类树脂表面的疏水性较强, 可通过与小分子内的疏水部分的相互作用吸附溶液中的有机物, 因此适用于由极性溶剂中吸附非极性物质。

栀子 (*Gardenia jasminodes Ellis*) 为茜草科植物, 亦称山栀子、黄栀子, 我国大部分地区都有出产, 主要产于我国南部和中南部地区, 如浙江、江苏、江西等地。栀子属卫生部颁布的首批食药两用资源, 是传统中药。明朝李时珍的《本草纲目》中已有详细记载:

栀子具有护肝、利胆、降压、镇静、止血、消肿等作用, 有清热泻火、凉血散瘀之功效, 主治热病心烦、目赤、黄疸、吐血、热毒疮疡等症, 在中医处方中应用甚广。中医临床上用于治疗黄疸型肝炎、扭挫伤、高血压、糖尿病等症, 具有利胆保肝、镇痛、降压和抗菌消炎等作用。栀子作为传统的利胆保肝中药, 应用于临床已有 1600 多年历史<sup>[1]</sup>。

熊果酸 (ursolic acid) 是一种三萜酸, 又名乌索酸、乌苏酸, 与齐墩果酸是差向异构体, 属非极性的五环三萜类化合物, 相对分子量为 456.68, 其分子式为: C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>。其结构式如下图。



收稿日期: 2005-08-27

作者简介: 廖晓峰 (1965-), 男, 教授, 在读博士, 主要从事天然产物分析及应用研究。

熊果酸具有镇静、抗炎、抗菌、抗糖尿病、抗溃疡、降低血糖等多种生物学效应。近年来发现它具有抗致癌、抗促癌、诱导F9畸胎瘤细胞分化和抗血管生成作用,极有可能成为低毒高效的新型抗癌药物。另外,熊果酸具有明显的抗氧化功能,因而被广泛地用作食品医药和化妆品原料<sup>[2]</sup>。

栀子中的主要药用功能成分是三萜酸类,栀子中三萜酸的大孔树脂提取工艺研究及结构鉴定,目前文献还未见报道。

## 1 材料与方法

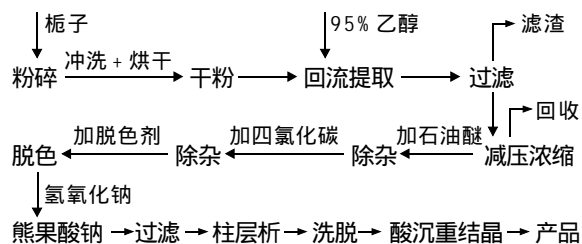
### 1.1 仪器与材料

RE52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 753BI 微机型紫外可见分光光度计 上海光学仪器厂; HH-4 数显恒温水浴锅 江苏金坛荣华仪器厂; ZK82B 型真空干燥箱 上海实验仪器总厂; FL1604S 电子天平 上海亚荣生化仪器厂; Nicolet IMPACT-400 型付立叶变换红外光谱仪 美国; INOVA-500 型  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  核磁共振光谱仪 美国; Autospec-Ultima ET OF EI 及 Magnet BPI 型质谱仪 美国; PKIN ELMER DSC-7 差示热扫描分析仪 英国; 高效液相色谱仪(含 Waters 600 泵; 2487 紫外检测器) 美国 Waters 公司。

生栀子 国家栀子农业产业化基地江西天顺公司; 熊果酸(95%)标准品 Sigma 公司; 大孔吸附树脂 南开大学化工厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 工艺流程图



准确称取 5.0kg 栀子粉末, 粒度为 40 目, 按 8:1 的液固比加入 95% 乙醇, 85℃ 水浴加热回流, 回流三次, 每次回流时间为 2.5h, 合并浸提液, 过滤, 旋转蒸发回收乙醇。浸膏分别加适量石油醚(30~60℃)和四氯化碳, 充分振荡 3 次除去脂溶性杂质。然后以活性炭脱色, 脱色后残渣用 20% 氢氧化钠溶解, 过滤, 滤液上 NKA 大孔树脂柱吸附, 去离子水 - 30% 乙醇 - 50% 乙醇 - 70% 乙醇 - 90% 乙醇(pH 为 11)梯度洗脱, 洗脱流速 1ml/min。将收集的 90% 乙醇(pH 11)洗脱流出液减压浓缩, 回收乙醇, 余液用 5% 的硫酸酸沉, 控制 pH 值为 3, 析出沉淀, 过滤, 水洗至中性, 得白色粉末, 再甲醇重结晶三次, 得白色熊果酸针状结晶, 得三萜酸样

品 4.225g, 得率 0.0844%。准确称取 0.5000mg 熊果酸粗产品, 5ml 甲醇定容, HPLC 法测定, 计算产品的纯度达 90.2%。产品进行结构鉴定。

#### 1.2.2 熊果酸定量测定<sup>[3~5]</sup>

色谱条件: Waters Symmetry™ C<sub>18</sub> 色谱柱(250mm × 4.6mm, 5μm); 流动相为甲醇 - 水(90:10, V:V), 磷酸调 pH3.0, 0.45μm 微孔滤膜滤过, 临用前脱气处理; 进样量 10μl; 检测波长 210nm; 柱温为室温; 流速 1.0ml/min; 检测灵敏度为 1.0。在此色谱条件下所得熊果酸对照品谱图见图 1。

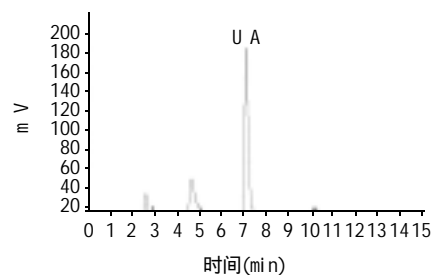


图1 熊果酸对照品色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of standard of ursolic acid

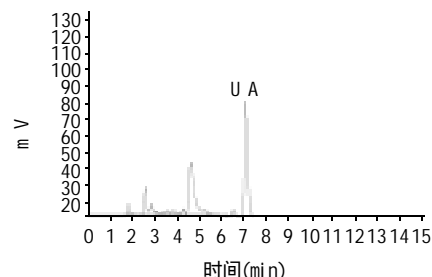


图2 栀子提取液色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of extract of *Gardenia jasminoides* Ellis

分别吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml 熊果酸标准储备液(1mg/ml)至 10ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 按上述色谱条件进样测定, 以峰高为纵坐标, 样品浓度为横坐标作图(图 7), 回归方程为  $Y=1.34+15.762X$ ,  $r=0.9997$ , 说明熊果酸在 1.9~11.68μg/ml 范围内, 峰高与样品浓度呈良好线性关系。

对样品溶液进行精密密度试验, 结果表明: 精密密度良好。样品熊果酸的平均含量为 0.4451%,  $RSD=2.2\%$ ; 对样品溶液进行稳定性试验, 结果表明: 在 24h 内样品溶液的熊果酸含量稳定, 样品熊果酸的平均含量为 0.4445%,  $RSD=2.0\%$ ;

对样品溶液进行回收率试验, 其平均回收率为 97.69%,  $RSD$  为 2.1%, 能满足分析的要求。

#### 1.2.3 大孔吸附树脂的预处理

(1) 用 95% 乙醇在室温条件下浸泡 24h, 其间每隔

表 1 使用的大孔吸附树脂的性能指标  
Table 1 Capability of macroporous resins

| 指标/树脂                   | D3520 (1)  | NKA (2)    | AB-8 (3)   | X-5 (4)    | D4020 (5)  |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 比表面积(m <sup>2</sup> /g) | 480 ~ 520  | 570 ~ 590  | 480 ~ 520  | 500 ~ 600  | 540 ~ 580  |
| 极性                      | 非极性        | 非极性        | 弱极性        | 非极性        | 非极性        |
| 平均孔径                    | 85 ~ 90    | 200 ~ 220  | 130 ~ 140  | 170 ~ 190  | 100 ~ 105  |
| 外观                      | 乳白色不透明球状颗粒 | 乳白色不透明球状颗粒 | 乳白色不透明球状颗粒 | 乳白色不透明球状颗粒 | 乳白色不透明球状颗粒 |

15 min 搅拌一次, 每次浸泡 2 h 后滤出乙醇, 加入新乙醇, 最后用去离子水洗净;

(2) 用 5% 盐酸室温浸泡 4 h, 再用去离子水洗净;

(3) 用 5% NaOH 室温浸泡 4 h, 再用去离子水洗净;

(4) 用去离子水室温浸泡 24 h, 使树脂充分溶胀备用。

## 2 结果与分析

### 2.1 树脂选择

熊果酸为弱极性分子, 应当采用极性较小或非极性的大孔吸附树脂作为吸附剂。本文选择了 5 种非极性大孔吸附树脂进行了吸附对比试验, 从中选择出分离效果好, 吸附容量大, 容易洗脱和再生的树脂作为纯化熊果酸的层析柱填料。

静态吸附量的测定<sup>[6]</sup>:

取过量的 10 mg/ml 的熊果酸标准溶液 5 份, 分别加入 5 种预处理后的树脂 1 g, 摇匀, 室温下放置 3 d, 充分吸附后, HPLC 法分别测定吸附前后溶液中熊果酸的浓度, 然后按照下列公式进行吸附量的计算。

吸附量的计算公式:  $Q = (C_1 - C_2)V/w$  (1)

式中:  $Q$  — 吸附量 (mg/g);

$C_1$  — 吸附前熊果酸溶液浓度 (mg/ml);

$C_2$  — 吸附后熊果酸溶液浓度 (mg/ml);

$V$  — 溶液体积 (ml);

$w$  — 树脂重量 (g)。

不同树脂的吸附量见图 3。

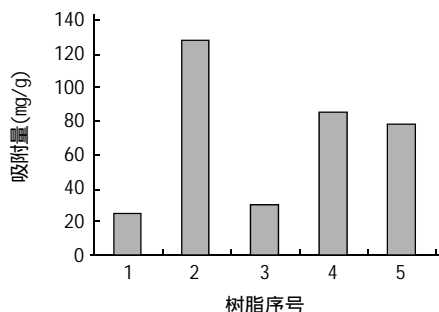


图 3 不同树脂对熊果酸的吸附量

Fig. 3 Adsorbing capacity of ursolic acid by different macroporous resins

实验结果表明: 2 号树脂 (NKA) 的吸附量最大, 1 号树脂 (D3520) 的吸附量最小, 这与 2 号树脂 (NKA) 的比

表面积与孔径最大相对应, 因此以下实验选择 2 号吸附树脂 (NKA) 作为分离纯化熊果酸的实验树脂。

### 2.2 溶剂梯度洗脱杂质

样品溶液经过石油醚, 四氯化碳洗涤后, 酯溶性杂质基本去除, 主要杂质是水溶性的槲皮素及槲皮甙。实验结果表明, 上柱时有部分色素及槲皮甙也被柱吸附, 图 4 是洗脱前样品液的 HPLC 图。

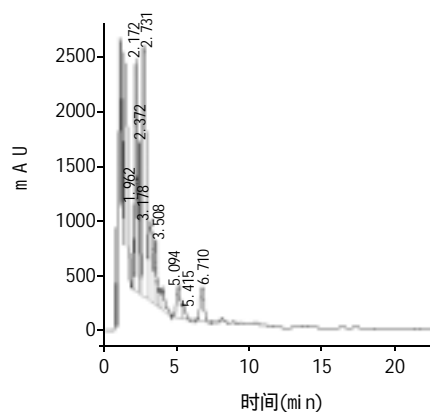


图 4 洗脱前样品液的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of sample before elution

从图 4 看到, 样品液含的杂质较多 (保留时间 5.415 min 的是熊果酸的峰), 洗脱熊果酸前必需先用合适溶剂, 梯度洗脱除去杂质。

由于水溶性的槲皮素及槲皮甙可以被极性大的低浓度的乙醇 - 去离子水 (乙醇浓度 < 50%) 洗脱, 而此洗脱条件下熊果酸不被洗脱, 从而可洗脱被柱吸附的槲皮素及槲皮甙。

梯度洗脱过程中洗脱剂组合的优化:

吸附定量样品溶液的 NKA 树脂柱, 以不同洗脱剂组合的洗脱剂分步洗脱, 流速为 1 ml/min, 每种洗脱剂体积为 100 ml, 洗脱流出液用 HPLC 法检测熊果酸含量, 考察不同洗脱剂组合除杂效果及熊果酸回收率。通过实验选定的洗脱剂组合为: 去离子水 - 30% 乙醇 - 50% 乙醇 - 70% 乙醇 - 90% 乙醇 (pH 为 11), 洗脱后流出液的 HPLC 图见图 5 (保留时间 5.400 min 的是熊果酸的峰)。从图中看出, 熊果酸峰值达到最高, 杂质峰很少, 除杂效果最优, 回收率最高。

### 2.3 洗脱流出液的后处理

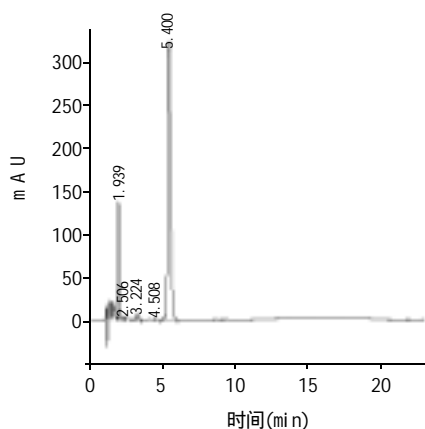


图5 洗脱剂洗脱后流出液的HPLC图

Fig. 5 HPLC of effluent of eluent

用选定的洗脱剂组合为洗脱剂体系洗脱吸附样品的柱,将收集的90%乙醇(pH11)洗脱流出液减压浓缩,回收乙醇,余液用5%的硫酸酸沉,控制pH值为3,析出沉淀,过滤,水洗至中性,得白色粉末,再甲醇重结晶三次,得白色熊果酸针状结晶,准确称取0.5000mg熊果酸粗产品,5ml甲醇定容,用HPLC法测定,计算产品的纯度达90.2%。

#### 2.4 产品DSC熔点测定

扫描温度为230~300,样品量为25mg。

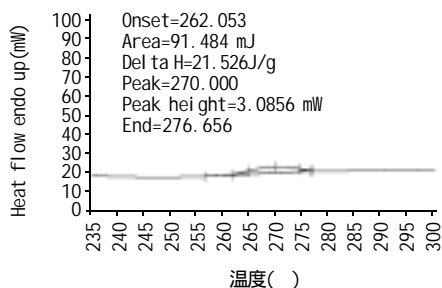


图6 熊果酸标准品的DSC熔点曲线

Fig. 6 DSC curve of standard ursolic acid

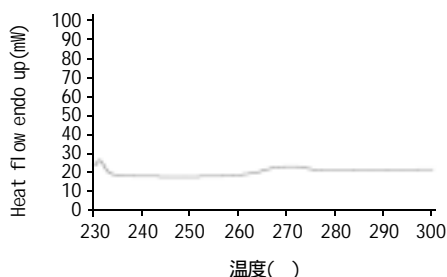


图7 样品的DSC熔点曲线

Fig. 7 DSC curve of sample

从熊果酸的标准品和样品的DSC熔点曲线图可以看出:它们熔点峰值基本相同,而且熔程几乎相等。

#### 2.5 产品红外鉴定

用红外光谱测定三萜类化合物的结构,主要是根据区域A(1355~1392 $\text{cm}^{-1}$ )和区域B(1245~1330 $\text{cm}^{-1}$ )的碳氢吸收来区别齐墩果酸、乌苏烷和四环三萜的基本骨架。乌苏烷型的A区有3个峰(1392~1386、1383~1370、1364~1359 $\text{cm}^{-1}$ );B区也有3个峰(1312~1308、1276~1270、1250~1245 $\text{cm}^{-1}$ )<sup>[7,8]</sup>。

取1mg产品与溴化钾约130mg一起研磨压片,在红外分光光度计波数4000~400 $\text{cm}^{-1}$ 范围内扫描,扫描红外光谱图3和图4。

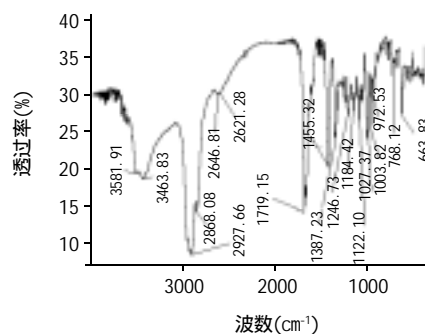


图8 熊果酸标准品的红外光谱图

Fig. 8 IR spectra of standard ursolic acid

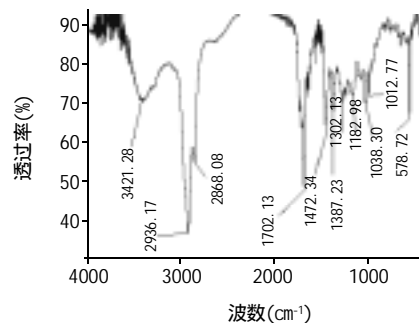


图9 产品的红外光谱图

Fig. 9 IR spectra of sample

由图8、9可知,产品红外光谱中有羟基强峰3463.83、3421.26 $\text{cm}^{-1}$ ;羧酸羰基1719.15、1702.13 $\text{cm}^{-1}$ ;并且具有熊果酸型化合物的特征吸收峰,它反映了熊果酸的两个基本骨架特征,即熊果酸A区:都是1387.23 $\text{cm}^{-1}$ ,熊果酸B区:1246.73、1302.13 $\text{cm}^{-1}$ ,说明产品中含的三萜酸是熊果酸。

#### 2.6 样品的EI-MS(M/Z)

图11中,480(M+Na),456(M<sup>+</sup>)、441(M-CH<sub>3</sub>)、438(M-H<sub>2</sub>O)、423(M-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O)、411(M-COOH)、410(M-HCOOH);D、E环离子a:248(a.100)、203(a-COOH)、A、B环离子b:208(b)、207(b-H)、190(b-H<sub>2</sub>O)和189(b-H<sub>2</sub>O-H)与熊果酸标准品特征谱图10数据一致。

#### 2.7 样品的<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C核磁共振光谱

图13 产品的<sup>1</sup>H-NMR显示5个季碳甲基(0.65、

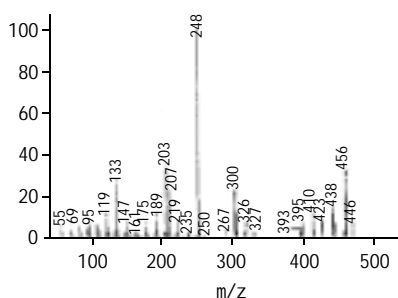


图 10 熊果酸标准品的 EI-MS

Fig. 10 EI-MS of standard ursolic acid

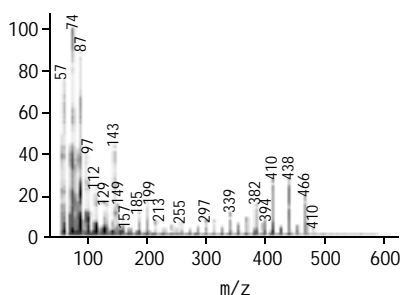
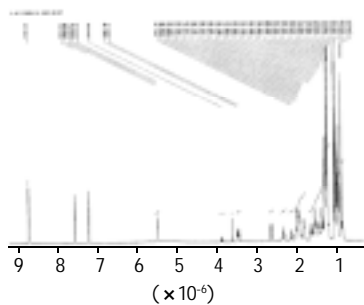
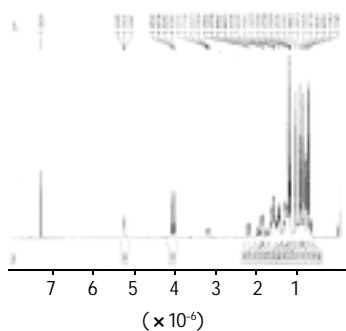


图 11 产品的 EI-MS

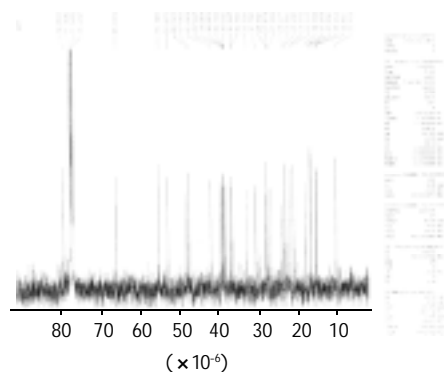
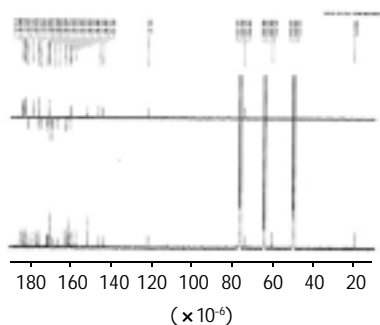
Fig. 11 EI-MS of sample

图 12 熊果酸标准品的  $^1\text{H}$ NMRFig. 12  $^1\text{H}$ NMR of standard ursolic acid图 13 熊果酸产品的  $^1\text{H}$ NMRFig. 13  $^1\text{H}$ NMR of sample

0.70、0.81、0.86、0.98, 各 3H), 单峰; 2 个叔碳甲基( 0.74、0.83, 各 3H), 双峰;  $\text{C}_{18}$ 、 $\text{C}_{19}$ -H( 2.05), 双峰;  $\text{C}_3$ -H( 3.08); 单峰;  $\text{C}_{12}$ -H( 5.11, 1H, brs), 单峰;  $\text{C}_{18}$ -H( 2.05, 1H,  $J=11\text{Hz}$ );  $\text{C}_{29}$ -H( 0.83, 3H, d,  $J=6\text{Hz}$ ), 双峰;  $\text{C}_{30}$ -H( 0.74, 3H, d,  $J=6\text{Hz}$ ).

这都是熊果酸的特征峰, 与图 1 2 熊果酸标准品的  $^1\text{H}$ NMR 数据基本一致。

产品的  $^{13}\text{C}$ -NMR(图 14)显示 7 个伯碳: 15.65( $\text{C}_{24}$ )、15.86( $\text{C}_{25}$ )、27.16( $\text{C}_{26}$ )、21.34( $\text{C}_{30}$ )、23.79( $\text{C}_{29}$ )、23.61( $\text{C}_{27}$ )、28.26( $\text{C}_{23}$ ); 9 个仲碳: 17.24( $\text{C}_{11}$ )、18.67( $\text{C}_6$ )、24.56( $\text{C}_{16}$ )、27.06( $\text{C}_2$ )、28.36( $\text{C}_{15}$ )、31.01( $\text{C}_{21}$ )、33.42( $\text{C}_7$ )、37.10( $\text{C}_{22}$ )、39.04( $\text{C}_1$ ); 7 个叔碳: 39.08( $\text{C}_{20}$ )、39.47( $\text{C}_{19}$ )、47.95( $\text{C}_9$ )、53.24( $\text{C}_{18}$ )、55.19( $\text{C}_5$ )、79.06( $\text{C}_3$ )、125.79( $\text{C}_{12}$ ); 6 个季碳: 7.28( $\text{C}_{10}$ )、39.08( $\text{C}_4$ )、39.83( $\text{C}_8$ )、42.42( $\text{C}_{14}$ )、48.16( $\text{C}_{17}$ )、138.50( $\text{C}_{13}$ )。与熊果酸标准品的图谱(图 15)数据基本一致。

图 14 产品的  $^{13}\text{C}$  NMR 图Fig. 14  $^{13}\text{C}$  NMR of sample图 15 熊果酸标准品的  $^{13}\text{C}$  NMR 图Fig. 15  $^{13}\text{C}$  NMR of standard ursolic acid

### 3 结 论

3.1 采用大孔吸附树脂对栀子浸提液中熊果酸进行吸附分离纯化是可行的, 较之传统的醇提酸沉工艺, 大孔吸附树脂具有工艺操作简单, 产品纯度高, 树脂可再生等优点。

3.2 产品通过 DSC、IR、EI-MS、 $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 等现代分析手段进行了结构鉴定, 证实其是熊果酸。

### 参考文献:

- [1] 李开泉, 陈武, 熊筱娟, 等. 乌索酸的化学、药理及临床应用进展[J]. 中成药, 2002, 24(9): 709-711.

# 肇实淀粉理化特性的研究

刘 永, 严子军

(肇庆学院轻工化学系, 广东 肇庆 526061)

**摘 要:** 对肇实淀粉的颗粒形貌、X-射线衍射谱图、直链与支链淀粉含量、糊化温度、溶解度与膨胀度以及糊的透明度、冻融稳定性、凝沉性进行了研究, 并与玉米淀粉进行了比较, 为肇实淀粉的应用提供了一定的理论基础。

**关键词:** 肇实; 淀粉; 特性

## Study on Physico-chemical Properties of *Euryale ferox* Salisb Starch

LIU Yong, YAN Zi-jun

(Department of Light Industry and Chemistry, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

**Abstract:** Some physicochemical properties of *Euryale ferox* Salisb starch were studied, including granule microphotograph, X-ray diffraction pattern, content of amylose and amylopectin starch, gelatinization temperature, swelling power and solubility, paste transparency, freeze-thawing stability, sediment. The comparisons were made with corn starch in order to offer theoretical guidance to production of *Euryale ferox* Salisb starch.

**Key words:** *Euryale ferox* Salisb; starch; properties

中图分类号: TS231

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)08-0119-04

肇实即芡实(*Euryale ferox* Salisb) 别名叫鸡头米, 是肇庆的特产。肇实为睡莲科芡属一年生大型水生植物, 含有多种氨基酸、脂肪, 蛋白质、树脂、抗坏血酸、钙、磷、维生素以及少量核黄素、胡萝卜素等, 具有益肾固精, 健胃补脾止泄功效, 滋养强壮, 收敛镇痛等保健作用<sup>[1,2]</sup>。

肇实资源丰富, 含有较高的淀粉, 而肇实淀粉的组成、结构和性质直接关系到其加工特性和应用情况, 对肇实淀粉理化特性的研究报道很少。因此, 本文着重研究肇实淀粉的理化特性, 希望为肇实淀粉的开发和应用提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

肇实淀粉 自制; 玉米淀粉 广东奥顺淀粉厂; NaCl、蔗糖(食用级)。

### 1.2 仪器

日立 H-450 型扫描电子显微镜、日本理学电机 3014 型 X-射线衍射仪、722S 可见光分光光度计、超级恒温水浴锅、离心沉降机。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 肇实淀粉颗粒形状观察

收稿日期: 2005-08-18

作者简介: 刘永(1977-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事食品化学方面的研究。

- [2] 王 鹏, 张忠义. 熊果酸在药用植物中的分布及药理作用[J]. 中药材, 2000, 23(11): 717-722.
- [3] 梁迎. 高效液相色谱法测定栀子及其炮制品中熊果酸的含量[J]. 广东药学, 2003, 13(3): 2-4.
- [4] 颜春华, 周仁燕, 于霞. HPLC法测定六味地黄丸中熊果酸的含量[J]. 丹东医药, 2002, (2): 72-73.
- [5] 邹盛勤, 邓庭亭, 杨利萍. HPLC法测定陆英中乌索酸和齐墩果酸[J]. 林产化工通讯, 2003, 37(6): 12-14.

- [6] 周春山, 汤小胜, 钟世安, 等. 以苦丁茶为原料提取熊果酸工艺的研究[J]. 辽宁化工, 2004, 33(1): 12-14.
- [7] Pierre-Olivier Harmand, Raphael Duval, Christiane Delage, et al. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells[J]. Int J Cancer, 2005, 114: 1-11.
- [8] Liu J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid[J]. J Ethnopharmacology, 1995, 49: 57-68.