

## 秦艽环烯醚萜苷类成分分离纯化工艺及抑菌活性研究

郝彩琴, 冷晓红\*, 李军, 郭超, 陈海燕

宁夏职业技术学院, 银川 750002

**摘要:** 研究优化 XDA-1 大孔吸附树脂分离纯化秦艽环烯醚萜苷的最佳工艺, 并测试其纯化产物的抑菌活性。以龙胆苦苷的含量为指标, 利用动态吸附分离方法, 确定秦艽环烯醚萜苷的最佳分离纯化工艺。结果表明 XDA-1 大孔吸附树脂分离纯化秦艽环烯醚萜苷类化学成分的最佳工艺条件为: 上样液浓度 0.07 g 原药材/mL, pH 值为 5.0, 吸附流速 4 BV/h, 上样液体积 32 BV, 洗脱剂浓度 50% 乙醇溶液, pH 值 7.0, 解吸流速 3 BV/h, 洗脱剂用量为 8 BV, 纯化后环烯醚萜苷含量可达 62.97%, 并证明了所选的大孔树脂纯化工艺稳定、可靠, 值得在生产中推广应用。通过对 3 种细菌抑菌圈和最小抑菌浓度测定, 初步评判该纯化产物的抑菌活性, 结果表明, 该纯化后产物具有一定的抑菌活性。

**关键词:** 大孔吸附树脂; 秦艽; 环烯醚萜苷; 分离纯化; 抑菌

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.018

## Separation, Purification and Antibacterial Activity of Iridoid glycosides from *Gentiana macrophylla* Pall.

HAO Cai-qin, LENG Xiao-hong\*, LI Jun, GUO Chao, CHEN Hai-yan

Ningxia Professional Technology Institute, Yinchuan 750002, China

**Abstract:** The aim of this study was to optimize the separation and purification technology of iridoid glycosides from *Gentiana macrophylla* Pall. with XDA-1 macroporous adsorption resin. The antibacterial activity of the purified iridoid glycosides were studied *in vitro*. With the content of gentiopicroside as index, dynamic adsorption-separation was used to determine the optimal separation and purification conditions of iridoid glycoside from *G. macrophylla*. The optimal conditions of XDA-1 macroporous adsorption resin were finally determined as follows: sample injection concentration was 0.07 g original/mL, pH was 5.0, sample flow rate was 4 BV/h, quantity of adsorption was 32 BV, desorption rate was 3 BV/h, the pH was 7.0 and elution volume was 10 BV of 50% ethanol. The purity of obtained iridoid glycosides was 62.97%. Moreover, the antibacterial activity of the extract was evaluated by 3 bacteria inhibition zone and minimum inhibitory concentration. The results showed that the obtained iridoid glycosides had good antibacterial activity.

**Key words:** macroporous adsorption resin; *Gentiana macrophylla* Pall.; iridoid glycosides; separation and purification; antibacterial activity

秦艽为龙胆科 (*Gentianaceae*) 龙胆属多年生草本植物, 秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、麻花艽 *Gentiana straminea* Maxim.、粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.、或小秦艽 *Gentiana dahurica* Fisch. 的干燥根<sup>[1,2]</sup>。秦艽始载于《神农本草经》, 作为中药应用已有 2000 多年的历史, 具有祛风湿、止痹痛、清湿热的功效, 临床上用于风湿痹痛、筋脉拘挛、骨蒸潮热、湿热黄疸、小便不利等病症<sup>[3]</sup>。秦艽

药材中所含的主要化学成分类型为环烯醚萜苷类, 其中主要成分是龙胆苦苷<sup>[4]</sup>。近年来的研究表明, 该类成分具有保肝、益肝、抗炎镇痛等活性<sup>[5]</sup>。关于秦艽抑菌活性的研究主要集中在粗提物的抑菌活性方面, 且研究报道表明秦艽粗提物对细菌、真菌都有一定的抑制活性<sup>[6-10]</sup>。

大孔吸附树脂现在已经广泛的应用于中药的研究中, 它具有物理化学稳定性高、比表面积大、吸附容量大、选择性好、吸附速度快、解吸条件温和、再生处理方便、使用周期长、宜于构成闭路循环、节省费用等诸多优点<sup>[11]</sup>。对于秦艽的抑菌活性虽然已有报道, 但都是以不同提取物为原料, 而关于秦艽的提

收稿日期: 2017-05-17 接受日期: 2017-07-21

基金项目: 宁夏回族自治区教育厅项目 (NGY2015215)

\* 通信作者 Tel: 86-951-2135415; E-mail: lkh-zss@163.com

取分离虽然已有报道,但对于宁夏栽培秦艽的分离纯化未见专门报道,由于药材化学成分会受产地、气候等因素的影响,因此,本实验以宁夏栽培秦艽为原料,以龙胆苦苷含量为指标,用高效液相色谱法进行含量测定,对选定的 XDA-1 大孔吸附树脂分离纯化秦艽环烯醚萜苷类成分的动态工艺进行研究,同时,对纯化后的环烯醚萜苷类成分进行抑菌活性研究,为充分利用该药材资源提供参考依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

秦艽(四年生)购自宁夏六盘山药材种植有限公司,经宁夏六盘山药材种植有限公司总农艺师张守宗老师鉴定为龙胆科植物秦艽(*Gentiana macrophylla* Pall),自然晾干,取根粉碎并过中国药典二号筛备用。

大孔吸附树脂 XDA-1(购自郑州和成新材料科技有限公司)。

### 1.2 试药与试剂

龙胆苦苷对照品(购自中国药品生物制品检定研究所,批号为:110770-201515),含量以 99.1% 计。氨苄青霉素钠阳性实验对照品(Amresco 公司)。

供试菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC25923(*Staphylococcus aureus*)、粪肠球菌 ATCC29212(*Enterococcus faecium*)、表皮葡萄球菌 ATCC12228(*Staphylococcus*) (均由宁夏医科大学临床医学院检验中心杨秀琴老师馈赠)。

试剂:食用酒精;甲酸(分析纯,西安化学试剂厂);甲醇(色谱纯,进口);乙腈(色谱纯,进口),所用水为蒸馏水和高纯水;牛肉膏、蛋白胨、琼脂(北京奥博星生物技术有限公司)。

### 1.3 仪器

日立 L-2000 高效液相色谱仪(日本);FW135 型中药材粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);AB20N 型万分之一电子天平(Mettler Toledo 设备有限公司分析天平);RE-52A 真空旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SIB-III 型循环式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);增力电动搅拌器(天津市大港区红杉实验设备厂);DHP-9162 智能型电热恒温培养箱(上海琅轩实验设备有限公司),DHG-9123A 电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司),SHY-2A 水浴恒温振荡器(常州国宇制造有限公司),YJ-875 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限

公司),YXQ-LS-50S 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱: $C_{18}$ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈:0.01% 甲酸[10:90 (0~10 min);6:94 (10~25 min);25:75 (25~36 min)];紫外检测波长:247 nm;流动相流速 1.0 mL/min,进样量 20  $\mu\text{L}$ ;柱温:室温。

### 2.2 标准品及样品溶液的制备

#### 2.2.1 标准品溶液的制备

精密称取龙胆苦苷对照品 19.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加适量甲醇使之溶解,并定容至刻度,摇匀,得浓度为 1.90 mg/mL 的标准品母液,放冰箱,备用。

#### 2.2.2 样品溶液的制备<sup>[12]</sup>

取粉碎的秦艽药材适量,用药材 10 倍量的 65% 乙醇动态热回流提取 30 min,过滤并在 60  $^{\circ}\text{C}$  下减压回收乙醇,然后用蒸馏水定容至所需浓度(开始使每毫升药液相当于生药 0.05 g,选出浓度后变为每毫升药液相当于生药 0.07 g),作为上样原药液备用。

### 2.3 标准曲线的制备

精密移取 1.90 mg/mL 的龙胆苦苷标准品母液,0.2、0.5、0.7、1.0、1.2 mL 分别置于 5 容量瓶中,用甲醇定容配置成浓度为 0.076、0.190、0.266、0.380、0.456 mg/mL 的溶液,然后分别在“2.1”项色谱条件下依次进样,以样品浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得回归方程: $Y = 14766X + 23911$ , $r = 0.9994$ ,结果表明龙胆苦苷在 0.076 ~ 0.456 mg/mL 范围内成良好的线性关系。

### 2.4 精密度试验

精密吸取对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,以色谱峰面积计算,得 RSD = 1.63%,表明仪器的精密度良好。

### 2.5 稳定性实验

精密吸取样品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,在 0、2、4、6、8、10 h 内分别进样,以色谱峰面积计算,得 RSD = 1.003%,表明样品在 10 h 内稳定性良好。

### 2.6 加样回收率实验

分别称取已知龙胆苦苷含量的供试样品共 6 份,照样品溶液制备,分别加入龙胆苦苷对照品溶液

1 mL,测定结果平均回收率为 100.25%,RSD 为 1.5% ( $n=6$ )。

## 2.7 重复性实验

取已粉碎的秦艽原药材粗粉,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按相同方法稀释配制样品液共 6 份,并在上述色谱条件下分别进行测定,根据峰面积计算 RSD,其 RSD 值为 1.7%,结果表明方法重复性良好。

## 2.8 样品测定

样品溶液稀释至一定浓度,过直径为 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜,精密吸取 20  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项色谱条件测定,以外标法计算样品中环烯醚萜苷的含量。

## 2.9 大孔树脂的预处理<sup>[13]</sup>

称取 XDA-1 树脂适量,放入具塞的 500 mL 三角瓶中,加入 95% 的乙醇在室温条件下浸泡 24 h,然后装入色谱柱用 95% 以上的乙醇以 2 BV/h 的流速过柱,使流出液与水按 1:5 混合不浑浊,然后用蒸馏水洗至洗出液无乙醇味,备用。

## 2.10 XDA-1 大孔吸附树脂分离纯化工艺过程

XDA-1 大孔树脂经预处理后,精密量取 10 mL 处理好的树脂,湿法装柱于玻璃柱(15 mm  $\times$  150 mm),1 BV = 10 mL,供下列动态工艺用。

### 2.10.1 样品浓度对吸附和解吸的影响

湿法装柱 5 根,将“2.2.2”制备的样品溶液稀释配置成浓度分别为 0.01、0.03、0.05、0.07、0.09 g 原药材/mL 的溶液,在相同条件下分别以 4 BV/h 的流速上样于 5 根柱中,使树脂达到饱和(饱和量的判断:TLC 检测(用 HSGF254 薄板,展开剂:乙酸乙酯-甲醇-水 20:2:1;显色方法:紫外 254 nm)当上样流出液中龙胆苦苷的含量与上样原液相当即说明树脂柱已达到吸附饱和。下同),然后用蒸馏水以 2 BV/h 的流速洗涤至  $\alpha$ -萘酚浓硫酸反应无紫色环即说明水溶性杂质已被洗完,每柱用水 3 BV,再用 30% 的乙醇以 3 BV/h 的流速进行解吸附,至最后的流出液中用 TLC 检测无龙胆苦苷,分别收集上样流出液、水洗液和解吸液,合并上样流出液和水洗液,分别精密吸取合并液和解吸液少量,用甲醇稀释定容至一定体积,按照“2.8”项方法,进行总苷含量测定,剩余合并液和解吸液分别在 60  $^{\circ}\text{C}$  以下减压浓缩成干浸膏,称重,计算吸附容量、解吸率及总苷含量。计算公式:

$$\text{吸附容量} = [\text{吸附前样品总量} - (\text{上样流出} + \text{水洗量})] / 10 \quad [2-1]$$

$$\text{解吸率} = \text{解吸附量} / \text{被吸附总量} \times 100\% \quad [2-2]$$

$$\text{总苷含量} = \text{解析总苷量} / \text{解吸液干浸膏量} \times 100\% \quad [2-3]$$

结果见图 2。

### 2.10.2 上样流速对吸附量的影响

按“2.10.1”项筛选出的最佳样品浓度为上样浓度,分别以 2、4、6、8、10 BV/h 的流速在相同的大孔吸附树脂柱上进行吸附,使树脂达到饱和,然后用水以 2 BV/h 的流速洗涤至  $\alpha$ -萘酚浓硫酸反应无紫色环即说明水溶性杂质已被洗完,共用水 3 BV,再用 30% 的乙醇以 3 BV/h 的流速进行解吸附,至最后的流出液中用 TLC 检测无龙胆苦苷,分别收集上样流出液、水洗液和解吸液,合并上样流出液和水洗液,分别精密吸取合并液和解吸液少量,用甲醇稀释定容至一定体积,按照“2.8”项方法,进行总苷含量测定,剩余合并液和解吸液分别在 60  $^{\circ}\text{C}$  以下减压浓缩成干浸膏,称重,计算吸附容量。结果见图 3。

### 2.10.3 上样 pH 对吸附量的影响

按“2.10.1”和“2.10.2”项筛选出的最佳样品浓度和上样流速为上样浓度和流速,将上样液用稀酸或稀碱调 pH 分别为 5、6、7、8、9 分别在相同的大孔吸附树脂柱上进行吸附,使树脂达到饱和,然后用水以 2 BV/h 的流速洗涤至  $\alpha$ -萘酚浓硫酸反应无紫色环即说明水溶性杂质已被洗完,共用水 3 BV,再用 30% 的乙醇以 3 BV/h 的流速进行解吸附,至最后的流出液中用 TLC 检测无龙胆苦苷,分别收集上样流出液、水洗液和解吸液,合并上样流出液和水洗液,分别精密吸取合并液和解吸液少量,用甲醇稀释定容至一定体积,按照“2.8”项方法,进行总苷含量测定,剩余合并液和解吸液分别在 60  $^{\circ}\text{C}$  以下减压浓缩成干浸膏,称重,计算吸附容量。结果见图 4。

### 2.10.4 上样量考察

按“2.10.1 ~ 2.10.3”项筛选出的最佳样品浓度、上样流速及上样液 pH 为上样条件进行上柱吸附,按树脂床体积数收集流出液,分别按照“2.8”项方法,进行总苷含量测定,计算吸附容量。结果见图 5。

### 2.10.5 解吸液浓度考察

湿法装柱 4 根,按“2.10.1 ~ 2.10.4”项筛选出的最佳样品浓度、上样流速、上样液 pH 及上样量为上样条件进行上柱吸附,然后用水以 2 BV/h 的流速洗涤至  $\alpha$ -萘酚浓硫酸反应无紫色环即说明水溶性杂质已被洗完,共用水 3 BV,再分别用 10%、

30%、50%、70%的乙醇以3 BV/h的流速进行解吸附,至最后的流出液中用TLC检测无龙胆苦苷,分别收集上样流出液、水洗液和解吸液,合并上样流出液和水洗液,分别精密吸取合并液和解吸液少量,用甲醇稀释定容至一定体积,按照“2.8”项方法,进行总苷含量测定,剩余合并液和解吸液分别在60℃以下减压浓缩成干浸膏,称重,计算解吸率及总苷含量,结果见表1。

#### 2.10.6 解吸附流速对洗脱率影响的考察

湿法装柱5根,按“2.10.1~2.10.4”项筛选出的最佳样品浓度、上样流速、上样液pH及上样量为上样条件进行上柱吸附,然后用水以2 BV/h的流速洗涤至 $\alpha$ -萘酚浓硫酸反应无紫色环即说明水溶性杂质已被洗完,共用水3 BV,再用“2.10.5”项筛选出的流动相分别以1、3、5、7、9 BV/h的流速进行解吸附,至最后的流出液中用TLC检测无龙胆苦苷,分别收集上样流出液、水洗液和解吸液,合并上样流出液和水洗液,分别精密吸取合并液和解吸液少量,用甲醇稀释定容至一定体积,按照“2.8”项方法,进行总苷含量测定,剩余合并液和解吸液分别在60℃以下减压浓缩成干浸膏,称重,计算解吸率及环烯醚萜苷含量,结果见图6。

#### 2.10.7 流动相pH值对洗脱率影响的考察

湿法装柱5根,按“2.10.1~2.10.4”项筛选出的最佳样品浓度、上样流速、上样液pH及上样量为上样条件进行上柱吸附,然后用水以2 BV/h的流速洗涤至 $\alpha$ -萘酚浓硫酸反应无紫色环即说明水溶性杂质已被洗完,共用水3 BV,再将“2.10.5”项筛选出的流动相用稀酸或稀碱调pH值分别为5、6、7、8、9为流动相,以“2.10.6”项筛选出的最佳洗脱流速分别进行解吸附,至最后的流出液中用TLC检测无龙胆苦苷,分别收集上样流出液、水洗液和解吸液,合并上样流出液和水洗液,分别精密吸取合并液和解吸液少量,用甲醇稀释定容至一定体积,按照“2.8”项方法,进行总苷含量测定,剩余合并液和解吸液分别在60℃以下减压浓缩成干浸膏,称重,计算解吸率及环烯醚萜苷含量,结果见图7。

#### 2.10.8 洗脱终点的考察

湿法装柱,按“2.10.1~2.10.4”项筛选出的最佳样品浓度、上样流速、上样液pH及上样量为上样条件进行上柱吸附,然后用水以2 BV/h的流速洗涤至 $\alpha$ -萘酚浓硫酸反应无紫色环即说明水溶性杂质已被洗完,共用水3 BV,再以“2.10.5~2.10.7”

项筛选出的最佳洗脱条件进行解吸附,按树脂床体积收集解吸液,精密吸取一定量,再用甲醇稀释定容至一定体积,按照“2.8”项方法,进行各流出液含量测定,计算流出液浓度,结果见图8。

#### 2.11 最佳工艺放大验证

湿法装柱3根,按“2.10.1~2.10.4”项筛选出的最佳样品浓度、上样流速、上样液pH及上样量为上样条件进行上柱吸附,然后用水以2 BV/h的流速洗涤至 $\alpha$ -萘酚浓硫酸反应无紫色环即说明水溶性杂质已被洗完,每柱用水3 BV,再以“2.10.5~2.10.8”项筛选出的最佳洗脱条件进行解吸附,分别收集上样流出液、水洗液和解吸液,合并上样流出液和水洗液,分别精密吸取合并液和解吸液少量,用甲醇稀释定容至一定体积,按照“2.8”项方法,进行总苷含量测定,剩余合并液和解吸液分别在60℃以下减压浓缩成干浸膏,称重,计算解吸率及环烯醚萜苷含量,结果见表2。

#### 2.12 抑菌活性测定

##### 2.12.1 抑菌圈测定

参见文献<sup>[14]</sup>,采用牛津杯法,以倾注法倒皿即培养基在灭菌前分装20 mL一管每管只倒一个皿,灭菌后在无菌操作台下待培养基凉至近室温时,加入已用无菌水稀释至 $10^7$  CFU/mL的菌悬液200  $\mu$ L,迅速混匀并倾入培养皿,待培养基凝固后,每皿放3只牛津杯,一只加200  $\mu$ L无菌水作阴性对照,一只加200  $\mu$ L浓度为50 mg/L的氨苄青霉素钠作阳性对照,另一只加200  $\mu$ L浓度为0.5 g/mL的样品溶液,然后正置37℃恒温培养箱中培养16~18 h,检查结果并用游标卡尺测定抑菌圈,取其平均值,每样重复做四个,其中对照品和样品在加入前都过0.22  $\mu$ m无菌滤膜,所做样品为大孔吸附树脂纯化后产物,结果见表3。

##### 2.12.2 最小抑菌浓度(MIC)测定

参见文献<sup>[15]</sup>,采用试管二倍稀释法,用营养肉汤液体培养基(0.5 mL/管)将以0.5 g/mL为初始浓度的药物对倍稀释成系列浓度即250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91、1.95、0.98、0.00 mg/mL,然后各管加入0.5 mL浓度为 $1 \times 10^6$  CFU/mL菌液,使每管最终菌液浓度约为 $5 \times 10^5$  CFU/mL,另设药物对照(药物+营养肉汤)、培养基对照(营养肉汤),在37℃恒温水浴振荡器中培养18~24 h,以混浊度为指标检查该管中是否有细菌生长,眼观选出不显示混浊试管,分别取其液体200  $\mu$ L涂布

于琼脂平板培养基上,于恒温培养箱培养 24 h,观察结果。琼脂平板上无细菌生长而含药液浓度最低者,即为该种药物对该菌株的最低抑菌浓度。氨苄青霉素钠阳性对照的做法同样品,但初始浓度为 50 mg/L。结果见表 4。

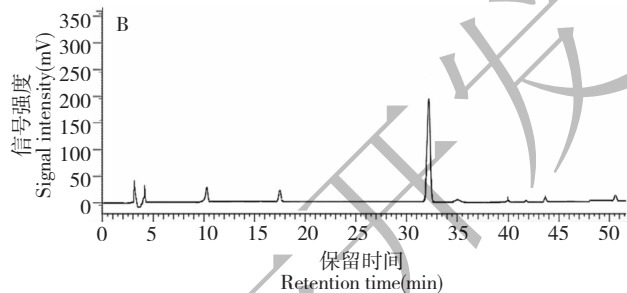
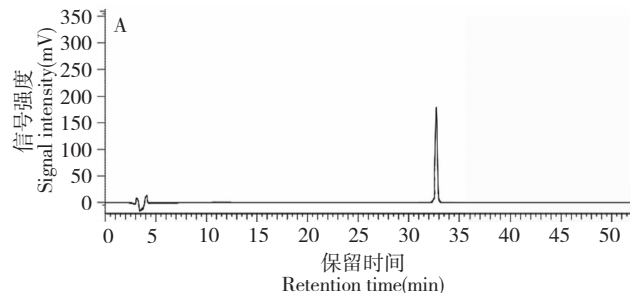


图 1 对照品(A)及样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

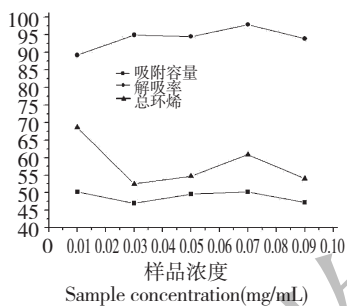


图 2 XDA-1 在不同上样浓度下的吸附容量、解析率及总环烯醚萜苷含量

Fig. 2 Adsorption capacity, resolution and total iridoid glycoside content of XDA-1 with different loading concentrations

### 3.2 样品浓度对吸附和解吸影响的考察结果

由图 2 知, XDA-1 大孔吸附树脂对秦艽总苷的吸附与样品上样浓度之间的关系比较复杂, 当样品浓度为 0.01 g/mL 时, 吸附容量略高一些, 而当样品浓度为 0.03 时, 吸附容量又降低, 此后, 随样品浓度升高吸附容量又升高, 当浓度为 0.07 时, 吸附容量最高, 随后又降低, 这可能与样品和杂质之间的竞争性吸附有关。综合考虑, 当浓度为 0.07 g 原药/mL 时, 吸附容量、总苷含量、解吸率相对较高, 故选择上样浓度为 0.07 g 原药/mL。

### 3.3 上样流速对吸附量影响的考察结果

由图 3 可知, 当吸附流速增加时, 秦艽总苷的吸附容量降低。这可能是因为流速增加时吸附质分子

## 3 结果与分析

### 3.1 色谱条件结果

多次实验证明, 在“2.1”项选定的流动相和波长下出现的峰最明显。因此, 按“2.1”项色谱条件进行检测, 色谱图见图 1。

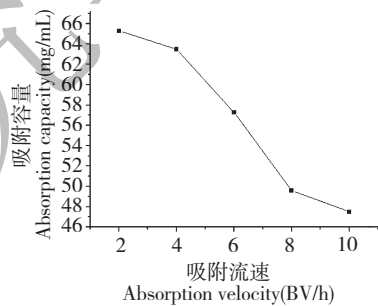


图 3 XDA-1 在不同吸附流速下的吸附容量

Fig. 3 Adsorption capacity of XDA-1 with different adsorption velocities

没有足够的时间与大孔吸附树脂表面的活性位点进行相互作用, 因此, 增加流速对提高大孔吸附树脂的吸附容量是不利的。故当吸附流速增加时, 秦艽总苷分子和 XDA-1 之间的接触时间变短, 从而导致秦艽总苷在 XDA-1 上不能完全被吸附。由图 3 可以

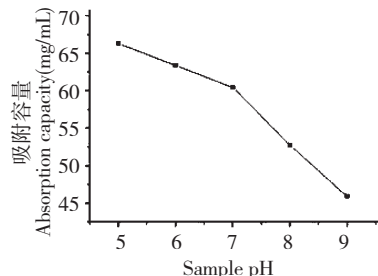


图 4 XDA-1 在不同上样 pH 下的吸附容量

Fig. 4 Adsorption capacity of XDA-1 with different loading pH

看出,以流速 4 BV/h 上样时的吸附容量与以 2 BV/h 的结果差异不大。综合考虑,选择上样吸附流速为 4 BV/h 作为最佳的吸附流速。

### 3.4 上样 pH 对吸附量影响的考察结果

由图 4 知,样品 pH 为 5 时吸附率最高,而随 pH 升高吸附率却逐渐降低,这可能是由于环烯醚萜苷在弱酸下较稳定以分子形式存在,主要以范德华力被树脂物理吸附,而在碱性条件下会发生结构上的变化或在用氨水调 pH 时,可能发生了结构转换,不易被大孔吸附树脂吸附,从而吸附率降低,因此,选择适宜的秦艽粗提液 pH 值为 5。

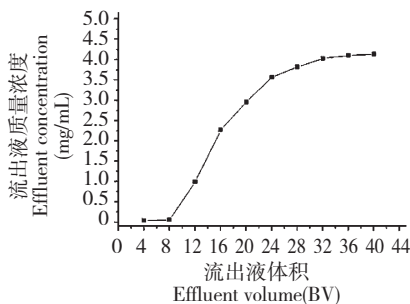


图 5 XDA-1 吸附秦艽总环烯醚萜苷泄漏曲线

Fig. 5 XDA-1 leakage curve of adsorption of total iridoid glycoside from *G. macrophylla*

### 3.5 上样量的考察结果

由图 5 知,上样量为 8 BV 时开始泄漏,36 BV 时达到吸附饱和,而 32 BV 的流出液质量浓度与 36 BV 时流出液质量浓度基本相当,故选择上样量 32 BV 作为最佳上样量。

### 3.6 解吸液浓度的考察结果

表 1 不同浓度乙醇的解吸附率和总环烯醚萜苷含量

Table 1 Desorption rate and total iridoid glycosides content with different concentrations of ethanol

乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	解吸附率 Desorption rate (%)	总环烯醚萜苷含量 Total iridoid glycoside content (%)
10%	56.95	46.85
30%	68.66	56.96
50%	97.34	65.72
70%	83.25	34.57

由表 1 可知,当乙醇浓度为 50% 时,解吸附率和总环烯醚萜苷最大,分别为 97.34% 和 65.72%。因此,最佳的洗脱剂浓度为 50% 的乙醇。

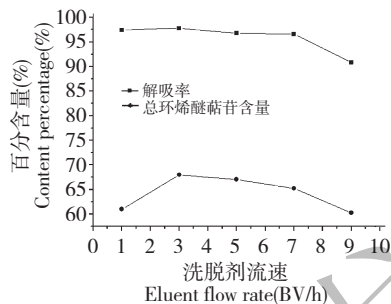


图 6 XDA-1 在不同解吸流速下的解吸附率、总环烯醚萜苷含量

Fig. 1 XDA-1 desorption rate and total iridoid glycosides content at different desorption velocities

### 3.7 解吸流速对洗脱率影响的考察结果

由图 6 可知,当解吸流速为 1.0 BV/h 时,解析率较低,这可能是由于流速太低,样品在树脂柱上停留的时间过长,而环烯醚萜苷的结构又不稳定,所以可能长时间留在树脂柱上结构发生了变化,故洗脱率较低;而从洗脱流速为 3 BV/h 开始时,随洗脱剂洗脱流速的增加,解吸附率和总环烯醚萜苷含量基本成下降趋势,这可能是由于环烯醚萜苷被吸附在树脂大孔内,当洗脱速率太快时,很难达到吸附和解吸平衡从而解吸附传质速率较慢,故洗脱率和含量会降低。综合来看,当解析速率为 3 BV/h 时,解析率最高,同时解吸干浸膏中总环烯醚萜苷含量也较高,因此,选取最佳解吸附速率为 3 BV/h。

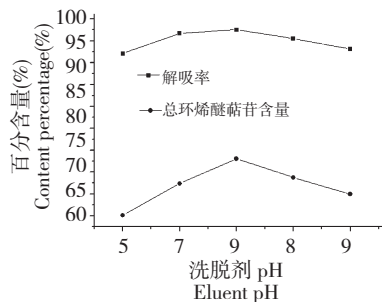


图 7 XDA-1 在洗脱剂不同 pH 值下的解吸附率、总环烯醚萜苷含量

Fig. 7 XDA-1 desorption rate and total iridoid glycoside content at different pH values of eluent

### 3.8 洗脱剂 pH 值对洗脱率影响的考察结果

由图 7 知,样品 pH 为 7 时解吸附率最高,这与吸附时 pH 为 5 相适应,而再随 pH 值降低或升高解吸附率却逐渐降低,同时,当洗脱剂 pH 值为 7 时,解吸液总干浸膏中的环烯醚萜苷类成分的含量也比

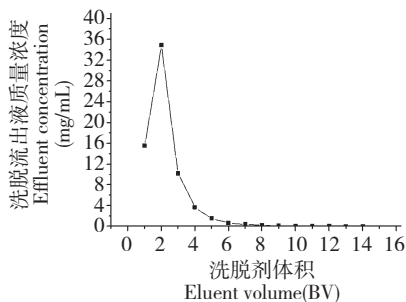


图8 解吸附终点时洗脱剂用量

Fig. 8 The amount of eluent used to desorb the end point

较高,因此,选择洗脱剂的 pH 值为 7。

### 3.9 洗脱终点的考察结果

由图 8 可知,当 50% 乙醇用量为 8 BV 时,基本已达到洗脱终点。因此,最佳的洗脱剂体积用量为 8 BV。

### 3.10 最佳工艺放大验证结果

最佳工艺放大验证实验结果如表 2 所示。

### 3.11 抑菌活性测定结果

#### 3.11.1 抑菌圈测定结果

表 2 最佳工艺放大验证结果

Table 2 Optimal process enlarge verification results

色谱柱 Column	吸附容量 Adsorption capacity (mg/mL)	解吸附率 Desorption rate (%)	总环烯醚萜苷含量 Total iridoid glycoside content (%)
柱 1 Column-1	63.86	96.02	63.51
柱 2 Column-2	65.36	94.05	62.41
柱 3 Column-3	64.89	95.37	62.98
平均值 Average	64.70	95.15	62.97

表 3 大孔树脂纯化后产物对 3 种细菌的抑菌活性 (mm)

Table 3 Antimicrobial activity of the purified products against 3 bacteria (mm)

样品 Sample	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>
秦艽纯化后产物 Purified product	13.73 ± 0.25	22.10 ± 0.26	17.25 ± 0.31
氨苄青霉素钠 Ampicillin sodium	27.50 ± 0.32	28.75 ± 0.21	17.00 ± 0.28
无菌水 Sterile water	-	-	-

注:“-”为无菌生长。

Note:“-” indicated no bacteria grow.

由表 3 可知,秦艽环烯醚萜苷类对 3 种供试细菌都有一定的抑菌活性,其中对粪肠球菌的抑菌活性最强,其抑菌圈达 (22.10 ± 0.26) mm,对表皮葡

萄球菌的抑菌圈略优于对照品。

#### 3.11.2 最小抑菌浓度 (MIC) 测定结果

表 4 大孔树脂纯化后产物对 3 种细菌的最小抑菌浓度 (MIC)

Table 4 The minimum inhibitory concentration of the purified products on 3 bacteria (MIC)

供试菌株 Tested strain	最小抑菌浓度 Minimum inhibitory concentration (mg/mL)		
	秦艽纯化后产物 Purified product	阳性对照 Positive control	阴性对照 Negative control
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	31.25	$0.3916 \times 10^{-3}$	+
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	7.813	$0.3916 \times 10^{-3}$	+
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	15.63	$3.125 \times 10^{-3}$	+

注:“+”为有菌生长。

Note:“+” indicated had bacteria grow.

由表 4 可知,秦艽环烯醚萜苷类,对 3 种供试细

菌都有一定的抑菌活性,且对粪肠球菌的抑菌活性

最强,其 MIC 为 7.813 mg/mL。

## 4 讨论与结论

本实验所用的 XDA-1 大孔吸附树脂是前期实验通过选取 10 种(即 XDA-1、NKA-9、D301、HPD-100、D1400、D101、D101-1、AB-8、DA-201、DM130)不同极性的大孔吸附树脂,进行静态吸附与解吸、动态吸附与解吸方法,以龙胆苦苷和獐牙菜苦苷含量为指标,在与本实验同样的色谱条件下,最终优选而得。由于獐牙菜苦苷与龙胆苦苷相比,其在秦艽中含量很低,而且根据前期实验知 XDA-1 大孔吸附树脂对獐牙菜苦苷的吸附能力也较低,因此本研究只以龙胆苦苷含量为指标进行工艺条件探索。

本实验结果表明,XDA-1 大孔吸附树脂对秦艽环烯醚萜苷类成分有较好的吸附和解吸效果,其最佳动态吸附条件为:样品浓度 0.07 g 原药材/mL, pH 值为 5.0,吸附速率为 4 BV/h,上样液体积 32 BV,吸附容量可达 64.70 mg/mL 以上;最佳动态解吸条件为:洗脱剂浓度 50% 乙醇溶液, pH 值 7.0,解吸附流速 3 BV/h,最佳解吸剂用量为 8 BV,解吸附率可达 95% 以上。

本实验通过系统大孔吸附树脂分离纯化秦艽总环烯醚萜苷类成分,参数的研究,在优化的条件下,工艺放大研究表明,XDA-1 大孔吸附树脂对秦艽环烯醚萜苷的吸附容量 64.70 mg/mL、解吸附率 95.15%、洗脱液干浸膏中环烯醚萜苷含量达 62.97%,其纯化倍数是粗提液的 12 倍多,且已达到化合物分离纯化的要求,因此该分离纯化工艺为秦艽总环烯醚萜苷类化合物分离纯化的工业化生产提供了可靠的条件。

本实验过程虽然没有对水洗终点进行确定,但总体表明,上样完成后,用 3 BV 的水以 2 BV/h 的流速就可以将残留在树脂表面的杂质清洗干净。

本实验过程中发现,秦艽提取液回收乙醇定容后,其原液 pH 即为 5.0,洗脱剂 50% 乙醇的 pH 值基本为 7.0,故在具体的工艺过程中,可不考虑 pH 值对吸附和洗脱的影响。

本实验选择了氨苄青霉素钠作为阳性对照药物,其为广谱抗生素对革兰阳性菌和革兰阴性菌均有很好的抑菌效果。实验中所有药物的质量浓度由笔者通过预试验结果归纳整理后设定。根据现有文献知,对秦艽的生物活性主要集中在抗炎、保肝等方面<sup>[16]</sup>,而本实验通过对秦艽纯化后环烯醚萜苷抑菌

活性的研究表明,环烯醚萜苷对细菌有一定的抑菌活性,同时,与粗提物抑菌活性(发表中)相比其最小抑菌浓度没太大变化,说明秦艽的抑菌活性成分比较复杂,不单纯是环烯醚萜苷类,因此,对秦艽的抑菌活性有必要进一步扩大研究,以便为寻求新的抑菌、抗菌药物奠定基础。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 1270.
- 2 Northwest Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (中科院西北植物研究所编). Flora of Qinling Mountains 1<sup>st</sup> Seed Plants, 4<sup>th</sup> (秦岭植物志, 第 1 卷, 种子植物, 第 4 册). Beijing: Beijing Science Press, 1983. 112.
- 3 Huang SJ (黄爽辑). Shennong Materia Medica (神农本草经). Beijing: Traditional Chinese Medicine Classics Press, 1982.
- 4 Yu XH (余晓晖), Zhao L (赵磊), Wang JH (王谨慧), et al. Purification of total cracked iridoid terpenes from *Gentiana macrophylla* in macroporous. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21: 3179-3180.
- 5 Zhang XW (张兴旺), Niu YF (牛迎风), Tao YD (陶燕铎), et al. Study on extraction technology of gentiopicroside from *Gentiana macrophylla*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2009, 32: 625-627.
- 6 Liu ZC (刘志春), Wang XL (王小丽), Lin P (林鹏), et al. *J Gannan Med Coll* (赣南医学学报), 2005, 24: 509-512.
- 7 Li CY (李成叶), Yuan SF (袁硕峰), Lin Y (林奕), et al. Study on antibacterial effect of 22 traditional Chinese medicine on two bacterial strains *in vitro*. *Progr Veterin Med* (动物医学进展), 2010, 31(11): 43-46.
- 8 Tan RX, Wolfender JL, Zhang LX, et al. Acyl secoiridoids and antifungal constituents from *Gentiana macrophylla*. *Phytochemistry*, 1996, 42: 1305-1313.
- 9 Zhang YG (张永贵), Yang FQ (杨凤琴), Yuan BX (袁本香). Experimental study of *in vitro* antibacterial gentiana extraction. *J Baotou Med* (包头医学), 2011, 35(2): 85-86.
- 10 Li Y (李娅), Zhao XL (赵锡兰), Yang FQ (杨凤琴), et al. Antimicrobial effect *in vitro* of the ethanol extracts of *Radix Gentianae Macrophyllae* on eight kinds of bacteria. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2011, 31: 1490-1492.