

大孔吸附树脂对白花泡桐叶中熊果酸的富集研究

余晓晖¹, 赵 磊¹, 陈旅翼¹, 吴定慧¹, 陈宇红²

(1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 西北第二民族大学, 宁夏 银川 750001)

关键词: 白花泡桐叶; 熊果酸; 大孔吸附树脂

摘要: 目的: 筛选富集白花泡桐叶中熊果酸的最佳树脂及条件, 使分离工艺达到最优化。方法: 采用静态吸附-解吸方法, 从 5 种大孔吸附树脂筛选出最佳树脂, 用 HPLC 法测定熊果酸的含量, 对熊果酸富集工艺进行评价。同时考察了熊果酸的吸附动力学。结果: 用 AB-8 大孔吸附树脂以 60% 乙醇为吸附溶剂, 95% 乙醇为解吸溶剂, 得到纯度为 83.02% 的熊果酸。结论: 该法简单可行, 分离效果好, 对大生产有一定参考作用。

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2010)05-0773-03

玄参科泡桐属植物是我国独有属, 该属植物共七种, 白花泡桐叶为玄参科 (*Scrophulariaceae*) 泡桐属 (*Paulownia Siebel Suck*) 植物白花泡桐的叶, 是一种常用中草药, 其花、叶、皮、根、果古代就有药用记载, 如《本草纲目》记述“桐叶……主恶蚀疮著阴, 皮主五痔, 杀三虫。花主傅猪疮, 消肿生发。”^[1] 近年来研究发现具有消炎、止咳、利尿、降压等作用^[2]。李晓强等对白花泡桐叶化学成分研究分离得到包括熊果酸在内的 8 个化合物^[3]; 陈旅翼等对白花泡桐不同部位的熊果酸含量进行测定, 其叶中含量可达 11.71 mg/g。^[4] 熊果酸 (ursolic acid) 又名乌苏酸、乌索酸, 是广泛存在于天然植物中的一种五环三萜类化合物, 有研究表明熊果酸具有镇静、抗炎、抗菌、降血糖等多种生物学效应^[5]。

大孔吸附树脂是 20 世纪 60 年代发展起来的一类有机高聚物吸附剂, 具有物理化学稳定性高, 吸附选择性强, 解吸条件温和, 不受无机物存在的影响; 它再生简便, 使用周期长, 宜于循环使用, 节省费用等诸多优点^[6], 近十余年来逐渐应用于中草药化学成分的提取分离和中药新药的开发研制。作为一项提取分离纯化的新技术, 有利于解决中药提取分离中长期以来存在的诸多问题。大孔吸附树脂用于白花泡桐叶提取分离方面的研究还未见报道, 本文优选了 5 种不同型号大孔吸附树脂对白花泡桐叶中熊果酸进行富集分离研究, 为熊果酸富集分离开辟新路。

1 材料与仪器

收稿日期: 2009-03-15

基金项目: 国家民委粉体材料与特种陶瓷重点开放实验室项目 (0504)

作者简介: 余晓晖 (1964 -), 女, 高级实验师。研究方向: 中药有效成分及质量标准。Tel: (0931) 8765394

1.1 材料 甲醇为色谱纯, 水为二次重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。熊果酸对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号 742-8902。白花泡桐叶植物样品 2005 年采自兰州大学医学院校区内, 经兰州大学药学院生药教研室马志刚教授鉴定为玄参科泡桐属的白花泡桐 (*Panlownia Fortunei* (seem.))。大孔树脂购于天津市海光化工有限公司。参数见表 1。

表 1 大孔吸附树脂的技术参数

树脂型号	比表面积	孔容 /(mL/g)	粒径范围 /nm	极性
DM301	> 330	140-170	0.3 ~ 1.25 > 90%	中极性
D101	> 400	90-110	0.3 ~ 1.25 > 90%	非极性
AB-8	> 480	130-140	0.3 ~ 1.25 > 90%	弱极性
DA201	> 150	100-130	0.3 ~ 1.25 > 90%	极性
D1400	> 330		0.3 ~ 1.25 > 90%	非极性

1.2 仪器 高效液相色谱仪 (Agilent), Agilent 1100 series 泵及检测器 (Agilent 1100 化学工作站), KQ-250TD 高频数控超声波清洗器 (昆明超声仪器有限公司), 水浴锅 (金坛市正基仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 熊果酸的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精确称取熊果酸对照品 5.18 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 制成含熊果酸 0.518 mg/mL 的溶液, 摇匀即得。

2.1.2 色谱条件的选择 色谱柱: Hypersil-ODS₂ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水 (88 : 12), 流速 0.8 mL/min, 检测波长 220 nm, 柱温 25

℃,进样量 10 μL,灵敏度:0.05 AUFS。

2.1.3 标准曲线及线性范围 精密吸取对照品溶液 1、3、5、7、9 μL 分别进样,以对照品的峰面积为纵坐标(Y),以对照品溶液的进样量为横坐标(X)绘制标准曲线,回归方程为: $Y = 169.19X - 8.7353$, $r = 0.9999$ 。结果表明:熊果酸在 0.518 ~ 4.662 μg 范围内线性良好。

2.2 大孔吸附树脂富集熊果酸的工艺考察

2.2.1 上样液的制备 称取白花泡桐叶细粉 200 g,以浓度 95% 乙醇,白花泡桐叶粒径 0.46 mm,液固比 11:1,温度 85 ℃,提取次数 2 次,2.5 h/次,合并提取液,减压回收,50 ℃ 真空干燥,得熊果酸粗品。精密称取熊果酸粗品 2 g,加甲醇 40 mL 溶解,用 10% NaOH 调 pH = 11,抽滤,滤液用 10% HCl 调 pH = 4,再加入等体积的 pH = 4 的酸性水溶液稀释,静置 20 min,抽滤得沉淀,用甲醇溶解并定容,在 2.1.2 项色谱条件下测定,根据回归方程得到样品中熊果酸的浓度为 2.322 mg/mL。

2.2.2 大孔吸附树脂的预处理^[6] 用 95% 乙醇在室温条件下浸泡 24 h,其间每隔 15 min 搅拌 1 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;用 4% 盐酸室温浸泡 3 h,再用去离子水洗净;用 5% NaOH 室温浸泡 3 h,再用去离子水洗净;用去离子水室温浸泡 24 h,使树脂充分溶胀备用。

2.2.3 静态吸附的测定 取 2.2.1 项的上样液 5 份,50 mL/份,平行 3 份,分别加入 5 种预处理后的树脂 5 g,室温下放置 24 h,适当振摇,滤过药液,蒸馏水洗涤至洗脱液 100 mL,按 2.1.2 项色谱条件测定吸附后溶液中熊果酸的浓度,计算静态饱和和吸附量,见表 2。

表 2 不同树脂对熊果酸的吸附量比较($n = 3$)

树脂型号	DM301	D101	AB-8	DA201	D1400
吸附量/(mg/g)	10.21	10.94	11.22	9.12	11.17
RSD/%	0.65	0.74	0.98	1.01	0.43

从表 1 可以计算出它们的平均孔径大小次序 AB-8 > D1400 > D101 > DM301 > DA201,该次序与其静态吸附量的大小次序一致,表明宜用孔径较大的树脂吸附熊果酸。

2.2.4 静态解吸的测定 将 2.2.3 项静态吸附饱和的树脂精密加入 50 mL 90% 乙醇,放置 24 h,适当振摇,过滤,蒸馏水洗涤至洗脱液 100 mL,定容,按 2.1.2 项色谱条件测定并计算洗脱液浓度。见表 3。

表 3 不同树脂解吸所得熊果酸浓度比较(mg/mL)

树脂型号	DM301	D101	AB-8	DA201	D1400
洗脱液浓度	0.500 1	0.455 6	0.550 0	0.455 0	0.460 0
RSD	0.35	0.61	0.55	0.81	0.82

结果表明 AB-8 型大孔树脂对熊果酸具有较好的吸附作用且易被解吸,故选用 AB-8 型大孔树脂进一步的研究。

2.2.5 静态吸附与解吸溶剂的选择 取 2.2.1 项下熊果酸粗品,按 2.2.1 项下的方法,用 60%、70%、80%、90% 乙醇、甲醇配制,用 AB-8 树脂按 2.2.3 的方法静态吸附并计算静态吸附率;再用 60%、70%、80%、90% 乙醇、甲醇按 2.2.4 的方法解吸并计算静态解吸率;见表 4。

表 4 不同溶剂对熊果酸静态吸附量与解吸率

溶剂	吸附量/(mg/g)	解析率/%
60% 乙醇	11.32	7.67
70% 乙醇	8.22	37.17
80% 乙醇	3.12	45.88
95% 乙醇	3.55	90.78
甲醇	3.10	78.68

由表可知:AB-8 树脂在 60% 乙醇中对熊果酸的吸附率最大,而在 90% 乙醇中的吸附率最小。AB-8 树脂在 90% 乙醇中对熊果酸的解吸率最大,而在 60% 乙醇中的解吸率最小。

2.2.6 AB-8 树脂吸附动力学过程 取 5 g AB-8 树脂加入 60 mL 2.2.1 项的上样液,于 25 ℃ 下恒温振荡,每隔一段时间取样,按 2.1.2 项色谱条件测定熊果酸的浓度。以吸附量对吸附时间作图,见图 1。

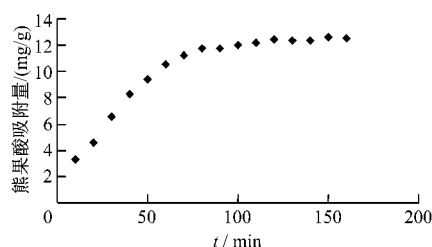


图 1 不同时间熊果酸吸附量图

结果表明,树脂对熊果酸的吸附量随时间而变化,吸附时间延长,吸附量增加,吸附 1 h 后,吸附量趋势减缓,树脂逐渐达到饱和吸附量。同时计算出相应时间间隔内树脂对熊果酸的吸附速率,再以吸附速率与时间作图见图 2。树脂对熊果酸的吸附速率随时间而变化,0 ~ 40 min 吸附速率较快,40 min 以后吸附速率减缓,50 min 以后吸附速率几乎没有变化,吸附饱和。

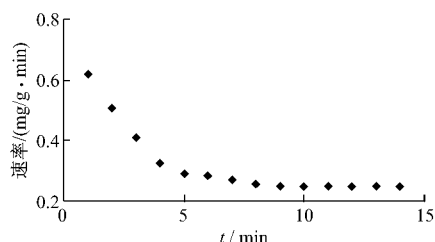


图 2 AB-8 树脂吸附速率曲线

2.2.7 验证实验 根据上述实验结果,按最优化条件:4.1 项条件提取,AB-8 型树脂用 60% 乙醇为吸附溶剂,90% 乙醇为解吸溶剂,重复 3 批实验,结果熊果酸含量分别为 82.30%、84.20%、82.57%,RSD 为 0.83%。熊果酸回收率分别为 86.97%、87.89%、90.22%,RSD 为 1.37%。

2.2.8 富集程度的考察 白花泡桐叶药材按 4.1 项条件提取、回收溶剂、干燥恒重,得样品(1);样品(1)经 AB-8 大孔吸附树脂吸附、解析、回收溶剂、干燥恒重,得样品(2);4.1 项条件提取液经 4.2 项方法处理后,经 AB-8 大孔吸附树脂吸附、解析、回收溶剂、干燥恒重,得样品(3)。按 2.1.2 项色谱条件测定,计算熊果酸经上述 3 种方法处理后的纯度和回收率,结果熊果酸纯度含量分别为 10.11%、35.68%、83.02%,熊果酸回收率分别为 96.51%、90.50%、88.36%。

4 小结与讨论

4.1 上样液提取工艺筛选 经单因素筛选及正交试验,得到上样液的提取的条件为:以 95% 乙醇为

提取液,泡桐叶粒径为 0.46 mm,液固比 11:1,温度 85 ℃,提取次数 2 次,2.5 h/次,熊果酸的浸出率达 99.28%。

4.2 前期预实验中直接以 4.1 项下乙醇提取液上大孔吸附树脂,富集熊果酸的吸附较好,但在解吸熊果酸时,杂质也随着解析出来;后经单因素考察得到粗品先用 10% NaOH 调 pH 为 11,抽滤,滤液用 10% HCl 调 pH 为 4,再加入等体积的 pH=4 的酸性水溶液稀释,静置 20 min,抽滤,沉淀,重新溶解上 AB-8 大孔吸附树脂,得到了纯度较高的熊果酸。

4.3 本实验选择了 5 种性能不同的树脂进行研究,以 AB-8 大孔吸附树脂富集熊果酸的纯度达 83.02%,对分离熊果酸有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 中国科学院,中国植物志编辑委员会,中国植物志 [M]. 北京:科学出版社,1976,67(2):281.
- [2] 江苏新医学院,中药大辞典 [M]. 上海:上海人民出版社,1977:1778.
- [3] 李晓强,武静莲,曹斐华,等. 白花泡桐叶的化学成分研究 [J]. 中药材,2008,31(6):850-852.
- [4] 陈旅翼,赵磊,余晓晖,等. 白花泡桐不同部位的熊果酸含量测定 [J]. 中药材,2007,30(8):914-915.
- [5] 肖坤福,郑云法,刘成左,等. 熊果酸的研究进展 [J]. 时珍国医国药,2005,16(12):.
- [6] 刘斌,石任兵,余超. 影响大孔吸附树脂吸附分离中草药化学成分的因素 [J]. 中草药,2002,33(5):475-476.

响应面分析法优化加速溶剂萃取当归中阿魏酸的工艺参数

周桂芬¹, 吕圭源^{1*}, 陈素红²

(1. 浙江中医药大学,浙江 杭州 310053; 2. 温州医学院,浙江 温州 325035)

关键词:加速溶剂萃取;当归;阿魏酸;响应面法

摘要:目的:优化加速溶剂萃取(ASE)当归中阿魏酸的最佳工艺参数。方法:选取当归阿魏酸的加速溶剂萃取条件:萃取温度、静态萃取时间和静态循环次数 3 个因素进行 Box-Behnken 中心组合设计,利用响应面分析法对其提取工艺参数进行优化,并与回流提取法和超声提取法进行比较。结果:通过优化并经实验验证,得出加速溶剂提取法提取当归中阿魏酸的最佳试验参数为:加热温度 94 ℃、静态萃取时间 13 min 和静态循环次数为 2 次。结论:与传统方法相比,ASE 提取法具有方便、省时、提取效率高等优点。

中图分类号:R283.2

文献标识码:A

文章编号:1001-4528(2010)05-0775-04

收稿日期:2009-09-15

作者简介:周桂芬(1976-),女,讲师,博士,从事中药活性成分与质量控制,Tel:(0571)86613657 E-mail:heb1998@126.com

* 通讯作者:吕圭源(1954-),男,教授,博士生导师,浙江中医药大学药物研究所所长。