

黑翅土白蚁及菌圃中熊果酸的提取分离和定量分析研究

梁娴¹ 张会明² 薛德钧²

(1. 蚌埠市药检所 蚌埠 233000; 2. 江西中医药大学 南昌 330000)

摘要 目的:提取分离并测定黑翅土白蚁和菌圃中熊果酸的含量。方法:大孔树脂吸附法、高效液相色谱法。结果:测得熊果酸在 0.009 ~ 0.015 mg 范围内峰面积与浓度线性关系良好,平均回收率为 97.1%。所测样品中熊果酸平均含量为 0.634 mg · g⁻¹。结论:方法简便,可靠,精密度高,稳定性好。

关键词: 提取分离; 含量测定; 熊果酸; 高效液相色谱法; 黑翅土白蚁; 菌圃; 蚁巢

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:0254 - 1793(2011)08 - 1609 - 03

Study on the technology for extraction and determination of ursolic acid in Fungus Garden of odontotermes formosanus Shiraki and odontotermes formosanus Shiraki

LIANG Xian¹ ZHANG Hui - ming² XUE De - jun²

(1. Bengbu Institute for Drug Control ,Bengbu 233000 ,China; 2. JiangXi University of Traditional Chinese Medicine ,Nanchang 330000 ,China)

Abstract Objectives: To Study the Technology for Extraction and establish the method for content determination of ursolic acid in *Odontotermes formosanus Shiraki* Fungus Garden. **Methods:** Macropumus resin - absorption ,HPLC. **Result:** It showed that a good linear relationship existed in the range of 0.009 ~ 0.015 mg of ursolic acid. The average content of ursolic acid was 0.634 mg · g⁻¹. **Conclusion:** These methods are simple, reliable, accurate and stable.

Key words: extraction; quantitative determination; ursolic acid; HPLC; odontotermes formosanus Shiraki; fungus garden; formicary

黑翅土白蚁(*Odontotermes formosanus Shiraki*)是最常见的一种白蚁。白蚁蚁巢(生物学上称菌圃)是由白蚁唾液等分泌物与植物碎屑粘结构而成,其主要药理作用是免疫、抗炎和镇痛作用^[1,2]。熊果酸是一种五环三萜类化合物,广泛存在于天然植物中,具有抗炎抑菌和较强的免疫增强作用^[3]。薛德钧老师课题组先前已经研究了黑翅土白蚁(包括菌圃)的化学成分^[4],本文主要研究熊果酸的提取分离和定量测定。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪 赛多利斯万分之一电子分析天平 熔点测定仪。

熊果酸对照品(批号:110742 - 200516,由中国

药品生物制品检定所提供),甲醇、磷酸为色谱纯,三乙胺、乙醇、氢氧化钠、硫酸等试剂为分析纯,水为液相用水,D - 101型大孔树脂(青岛海洋化工生产)。

黑翅土白蚁及菌圃产自江西鹰潭,由鹰潭市白蚁研究所熊小生工程师鉴定,真空 50 °C 烘干,然后粉碎备用。

2 方法和结果

2.1 熊果酸的提取分离 称取黑翅土白蚁及菌圃粉末 50 g,置 1 L 圆底烧瓶中,加入 500 mL 乙醇,回流提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并提取液冷却后用乙醇补足重量。取 100 mL 的提取液用 5% 的 NaOH 溶液碱化至 pH 为 11.04,沉淀后过滤去除杂质;滤

第一作者 Tel: 13855231539; E - mail: xiaohecailoujjj@sohu.com

液先用 5% 的硫酸溶液酸化至 pH 为 2.00 ,再用相同体积的 pH 为 2.00 的酸性水溶液稀释 ,得到熊果酸沉淀粗产品; 粗产品用甲醇溶解后 ,用极性调节剂 1:1 稀释并调节溶液 pH 为中性(6.0 ~ 7.0) 后 ,上柱(D - 101 型大孔树脂柱) 吸附 ,分步洗脱 ,收集体积分数为 90% 乙醇溶液的洗脱液^[5~7]。

2.2 样品鉴定

2.2.1 熔点测定 取洗脱液浓缩后固体粉状物 A 与熊果酸对照品混合熔点不下降。mp 284 ~ 288 ℃ ,易溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯有机溶液。

2.2.2 Liebermann - Burchard 反应 取熊果酸洗脱液浓缩后固体粉状物 A 5 mg 用 95% 乙醇 1 mL 溶解 ,取熊果酸乙醇溶液 1 滴置试管中加醋酐 1 mL ,摇匀 ,沿试管壁缓缓加浓硫酸 1 mL ,在液界面上呈现紫红色圆环。

2.2.3 薄层层析鉴定 取已活化 CMC - Na 薄层板备用 ,取供试品溶液与对照品溶液点样 ,以环己烷:丙酮(3:1) 为展开剂 ,展开 15 cm 后晾干 ,喷以 10% 硫酸乙醇溶液 ,于 110 ℃ 加热 8 min ,样品与对照品在相同位置上显同样紫红色斑点 ,365 nm 紫外光下显同样金黄色荧光斑点。

2.3 HPLC 定量测定法的建立

2.3.1 对照品溶液的制备 精取熊果酸对照品适量用甲醇配制成 0.3 mg · mL⁻¹ 的溶液作为对照品储备液。精密量取上述储备液适量 ,用甲醇稀释成每 1 mL 含 0.03 mg 熊果酸对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取 5 份样品按“2.1”提取收集最后洗脱液减压浓缩至干的产物 A ,用甲醇溶解后转移至 100 mL 量瓶中定容 ,作为测试样品 微孔滤膜(0.45 μm) 滤过 ,取续滤液作为供试品溶液。

2.3.3 色谱条件 色谱柱: 依利特 ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm ,10 μm) ; 流动相: 甲醇 - 0.1% 磷酸溶液 - 三乙胺(85:15:0.1) ,检测波长: 210 nm ,流速 0.8 mL · min⁻¹; 进样量: 20 μL ,柱温: 30 ℃ 。

2.3.4 专属性试验

取空白溶液和熊果酸对照品溶液 按色谱条件

进样 ,记录色谱图 ,结果表明 28.5 min 处的峰为熊果酸峰。

取供试品溶液按色谱条件进样 ,记录色谱图 ,在与对照品熊果酸相同时间处出峰 ,理论塔板数均大于 5000 ,熊果酸与齐墩果酸达基线分离 ,R = 1.53 。

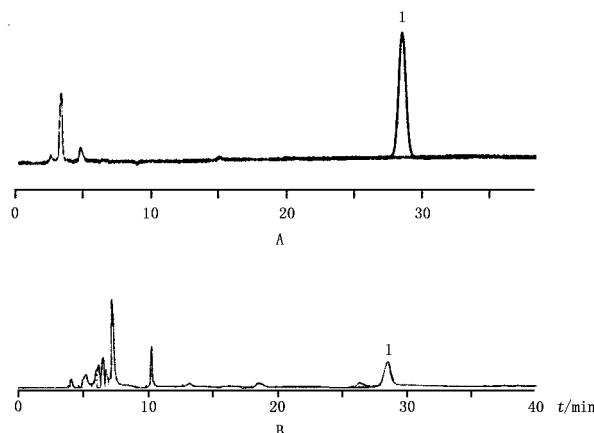


图 1 对照品(A) 和样品(B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substance(A) and sample(B)
1. 熊果酸(ursolic acid)

2.3.5 精密度试验 取对照品溶液 按色谱条件连续进样 5 次 ,RSD 为 1.4% (n = 5) 精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取供试品溶液 按色谱条件于 1 2 4 6 ,12 h 进样测定 ,RSD 分别为 1.9% (n = 6) 。供试品溶液于 12 h 内稳定。

2.3.7 线性关系考察 “2.3.1”项下对照品储备溶液(0.3 mg · mL⁻¹) 0.1 0.3 0.5 ,1 2 3 ,5 mL 分别置于 10 mL 量瓶中 ,用甲醇定容后 ,按上述色谱条件注入液相色谱仪 ,记录峰面积 ,以峰面积 Y 为纵坐标 ,浓度 X(mg · mL⁻¹) 为横坐标 ,进行线性回归 ,熊果酸的回归方程分别为:

$$Y = 1.498 \times 10^5 X + 81.79 \quad r = 0.9996$$

结果表明熊果酸在 0.009 ~ 0.015 mg 范围内峰面积与浓度成良好的线性关系。

2.3.8 加样回收率 取供试品溶液 6 份分别准确加入适量经 4 倍、5 倍、10 倍稀释后的熊果酸对照品储备液 ,按色谱条件进样 ,熊果酸的平均回收率为 97.1% ,RSD 为 1.1% 。

表 1 熊果酸回收率试验(*n*=6)
Tab 1 The recovery of ursolic acid

| 成分 (component) | 样品量 (background) /mg | 加入对照品量 (added) /mg | 理论值 (theoretical value) /mg | 实际测得量 (found) /mg | 回收率 (recovery) /mg | RSD /% |
|--------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------|
| 熊果酸(ursolic acid) | 0.0638 | 0.075 | 0.1388 | 0.1366 | 98.4 | |
| | 0.0638 | 0.075 | 0.1388 | 0.1358 | 97.8 | |
| | 0.0634 | 0.06 | 0.1234 | 0.1206 | 97.7 | 1.1% |
| | 0.0634 | 0.06 | 0.1234 | 0.1197 | 97.0 | |
| | 0.0632 | 0.03 | 0.0932 | 0.0892 | 95.7 | |
| | 0.0632 | 0.03 | 0.0932 | 0.0895 | 96.0 | |

2.3.9 样品的测定 将“2.3.2”项下方法制得的供试品溶液和对照品溶液按色谱条件测定,用外标法以峰面积计算出样品中熊果酸的平均含量为 $0.634 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD为 $0.35\% (n=10)$ 。

3 结论与讨论

3.1 本文建立并优化了黑翅土白蚁菌圃中熊果酸的提取分离方法,该方法科学、有效。

3.2 本文建立高效液相色谱法测定黑翅土白蚁菌圃中熊果酸的含量,使结构性质极为相似的熊果酸与齐墩果酸达到了基线分离。该法针对2种成分测定,数据稳定,结果可靠。

3.3 有文献报道用HPD-100型药用大孔吸附树脂进行吸附分离效果会更好。

3.4 薛德钧等多位老师已用波谱方法鉴定出黑翅土白蚁(含菌圃)中含化合物熊果酸^[3,4],因仪器限制本文未作熊果酸光谱结构鉴定。

参考文献

- CAO Juan(曹娟), SUN Tao(孙涛), ZHANG Min(张敏), et al. Study on anti-inflammation action about Fungus gardens of Formosanu(白蚁菌圃的抗炎作用研究). *J Chin Med Mater*(中药材), 2006 29(10):1011.
- WANG Tong(汪桐), PAN Qun-wan(潘群皖), LIU Chao(刘潮).

Preliminary Study on Pharmaceutical Value of Termitarium(白蚁菌圃药用价值的初步研究). *J Wannan Med Coll*(皖南医学院学报), 1994 13(2):95

- XUE De-jun(薛德钧), LI Yun-qiu(李云秋), XU Peng(徐彭), et al. Pilot Study on Chemical Constituents of Odontotermes Formosanus Shiraki(黑翅土白蚁化学成分的初步研究). *J Jiangxi Coll Trad Chin Med*(江西中医药学院学报) 2003 15(3):43
- XUE De-jun(薛德钧), WANG Xiu-li(王秀丽). Study on Chemical Constituents of Odontotermes Formosanus Shiraki(黑翅土白蚁的化学成分研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006 37(7):989
- REN Xiu-lian(任秀莲), WEI Qi-feng(魏琦峰), ZHOU Chun-shan(周春山), et al. Separation and purification of ursolic acid from Ilex Kudingcha by precipitation and adsorption(沉淀吸附法提取苦丁茶中的熊果酸). *J Cent South Univ(Sci Technol)*(中南大学学报自然科学版) 2004 35(4):599
- REN Xiu-lian(任秀莲), WEI Qi-feng(魏琦峰), ZHOU Chun-shan(周春山), et al. study on the Separation and purification of ursolic acid from Ilex Kudingcha(苦丁茶中熊果酸的分离纯化研究). *Chin Pharm J*(中国药学杂志) 2004 39(8):571
- YANG Xin-he(杨新河), LIU Zhong-hua(刘仲华), HUANG Jian-an(黄建安), et al. HPLC determination of oleanolic acid and ursolic acid in Ilex Kudingcha C. J. Tseng(HPLC 法测定苦丁茶中的熊果酸和齐墩果酸的含量). *Chin J Pharm*(药物分析杂志) 2007 27(10):1627

(本文于2011年3月21日修改回)