

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. 江西中医学院, 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:** Macroporous 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筑而成,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 仪器与试剂

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℃ 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

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 °C ,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 °C 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 °C。

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。

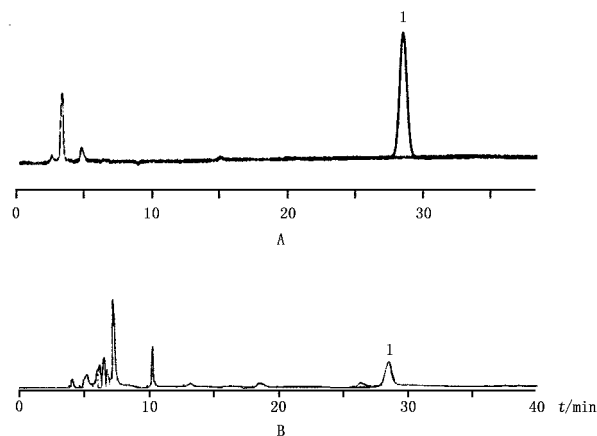


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 色谱图

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 8 ,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	1.1%
	0.0638	0.075	0.1388	0.1358	97.8	
	0.0634	0.06	0.1234	0.1206	97.7	
	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

- 1 CAO Juan(曹娟), SUN Tao(孙涛), ZHANG Min(张敏), *et al.* Study on anti-inflammatory action about Fungus gardens of Formosan(白蚁菌圃的抗炎作用研究). *J Chin Med Mater*(中草药), 2006 29(10): 1011
- 2 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 Medl Coll*(皖南医学院学报), 1994 13(2): 95
- 3 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初步研究). *J Jiangxi Coll Trad Chin Med*(江西中医学院学报) 2003 15(3): 43
 - 4 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
 - 5 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
 - 6 REN Xiu-lian(任秀莲), ZHOU Chun-shan(周春山), WEI Qi-feng(魏琦峰) *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
 - 7 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)