

大孔吸附树脂纯化女贞子中齐墩果酸和熊果酸的研究

姚 干, 何宗玉, 闫光凡, 梁亦龙, 谢婷婷, 陶 建

(重庆邮电大学生物信息学院, 重庆 400065)

摘 要:目的 研究大孔吸附树脂纯化女贞子中齐墩果酸和熊果酸的动态吸附与解吸工艺, 为工业化生产提供参考。方法 采用高效液相色谱法测定齐墩果酸和熊果酸的量, 运用静态吸附与解吸试验对树脂型号进行筛选, 结合单因素试验优选女贞子齐墩果酸和熊果酸的纯化操作条件。结果 HPD-100 树脂对齐墩果酸和熊果酸的吸附与解吸性能较好, 吸附的优化条件为树脂床径高比 1:6, 料液质量浓度 0.20 g(生药)/mL, 体积流量 2 BV/h 和吸附容量 2.4 mL/g(树脂); 最佳解吸条件为乙醇体积分数 80%, 体积流量 2 BV/h 和溶剂用量 4 BV, 产品中齐墩果酸、熊果酸的质量分数分别为 25.21%、15.65%, 转移率分别达 98.64%、98.58%。结论 HPD-100 可有效地富集、纯化女贞子中齐墩果酸和熊果酸。

关键词:女贞子; 齐墩果酸; 熊果酸; 大孔吸附树脂

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2007)10-1498-04

Purification of aleanolic acid and ursolic acid from *Fructus Ligustri Lucidi*
by macroporous resins

YAO Gan, HE Zong-yu, YAN Guang-fan, LIANG Yi-long, XIE Ting-ting, TAO Jian

(College of Bioinformation, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China)

Key words: *Fructus Ligustri Lucidi*; aleanolic acid; ursolic acid; macroporous resin

女贞子系木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实, 为常用的补益肝肾中药, 齐墩果酸和熊果酸是其主要有效成分。以往女贞子皂苷类成分的提取纯化工艺研究仅以单一成分齐墩果酸作为定量指标^[1]。本实验采用高效液相色谱法同时测定齐墩果酸和熊果酸^[2], 以二者的比吸附量或解吸率之和作为评价指标^[3], 优选大孔吸附树脂纯化女贞子中齐墩果酸和熊果酸的工艺条件。

1 仪器与材料

Waters 1525 型高效液相色谱仪; AG285 分析天平(瑞士 Mettler Toledo); SHQT-8 自动液相色谱分离色谱仪(上海); R502-B 旋转蒸发仪; ZPD-150 型振荡培养器; L-550 型台式低速大容量离心机; KQ-3200B 超声波清洗器。FL-1、FL-2、SA-1 大孔吸附树脂, 天津欧瑞生物科技有限公司; ADS-7、ADS-8 大孔吸附树脂, 天津南开和成科技有限公司; HPD-100、HPD-450、HPD-600 大孔吸附树脂, 沧州宝恩化工有限公司。甲醇为 HPLC 色谱纯, 其余试剂均为市售分析纯。齐墩果酸(批号 110709-200304)和熊果酸对照品(批号 110742-200304)均购自中国药品生物制品检定所。女贞子购自重庆康

济医药有限公司, 由重庆邮电大学生物信息学院闫光凡副教授鉴定为木犀科植物女贞 *L. lucidum* Ait. 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 齐墩果酸和熊果酸的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-水-乙酸胺(70:16.5:13.5:0.5); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 215 nm; 进样量: 10 μL。

2.1.2 标准曲线的绘制: 精密吸取齐墩果酸和熊果酸混合对照品甲醇溶液(质量浓度均为 1 mg/mL) 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL, 定容至 5 mL, 进行 HPLC 分析。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程。齐墩果酸 $Y = 4387.91X - 22.09$, $r = 0.99994$, 线性范围: 0.08~0.40 mg/mL; 熊果酸 $Y = 2964.38X - 20.84$, $r = 0.99991$, 线性范围: 0.08~0.40 mg/mL。

2.2 吸附原液的制备: 采用 HPLC 法测得女贞子药材中齐墩果酸和熊果酸的质量分数分别为 0.765%、0.475%。取女贞子药材适量, 粉碎成 20 目, 加 8 倍量

收稿日期: 2007-01-11

基金项目: 重庆邮电大学博士启动基金(2005A-51); 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2006BB5429)

作者简介: 姚 干(1970—), 男, 四川阆中人, 副研究员, 博士, 主要从事中药药效物质基础、作用机制及中药新药研究。

Tel: (023)62471286 E-mail: cdyagao@sina.com

80%乙醇回流提取3次,每次1.5 h,合并提取液,回收乙醇,剩余物用蒸馏水充分溶解,离心,取上清液作为吸附原液(质量浓度以生药计为0.4 g/mL)。以下各项试验根据具体情况调整药液质量浓度。

2.3 大孔吸附树脂型号的选择

2.3.1 静态吸附性能比较:根据齐墩果酸和熊果酸的理化性质和树脂的吸附性能,选用FL-1、FL-2、SA-1、ADS-7、ADS-8、HPD-100、HPD-450、HPD-6008种型号树脂进行试验。临用前,取不能过65目药典筛的树脂,按说明书方法预处理后使用。精确称取树脂5 g,置100 mL碘量瓶中,加入质量浓度为0.2 g/mL药液50 mL,120 r/min振摇(30℃),每隔1 h从上清液中取样,进行HPLC法分析,计算比吸附量[比吸附量=(吸附前药液质量浓度-吸附后药液质量浓度)×药液体积/大孔吸附树脂质量]。以比吸附量为纵坐标,时间为横坐标,绘制静态吸附曲线。从图1可以看出,在前3 h内,树脂吸附速率随时间的延长而快速升高,而后渐趋饱和,5 h后基本达到吸附平衡。在静态吸附饱和状态下,HPD-100的比吸附量最大,SA-1、ADS-7次之,均明显高于其他5种树脂。

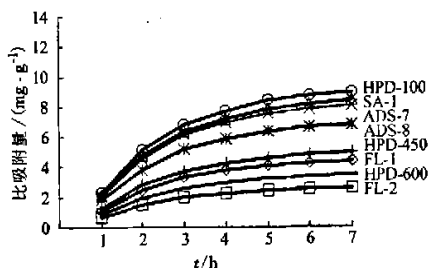


图1 静态吸附曲线

Fig.1 Static adsorption curve

2.3.2 静态解吸性能比较:将已吸附了齐墩果酸和熊果酸的SA-1、ADS-7和HPD-100树脂滤过,除去水液,置碘量瓶中,加入60%乙醇50 mL,120 r/min振摇(30℃),每隔1 h从上清液中取样,进行HPLC法分析,计算解吸率[解吸率=(洗脱液质量浓度×洗脱液总体积)/吸附总量×100%]。以解吸率为纵坐标,时间为横坐标,绘制静态解吸曲线。由图2可知,60%乙醇均可不同程度地将齐墩果酸和熊果酸从3种树脂上解吸下来。其中,HPD-100的解吸率最大,解吸能力最强,优于其余2种树脂。

综合比吸附量和解吸率两项指标,选用HPD-100富集、纯化女贞子中齐墩果酸和熊果酸。

2.4 HPD-100吸附女贞子中齐墩果酸和熊果酸的影响因素研究:将适量HPD-100湿法装柱(柱规格:

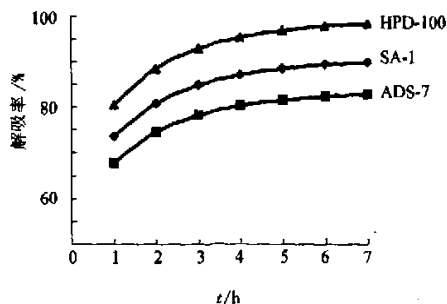


图2 静态解吸曲线

Fig.2 Static desorption curve

50 cm×2 cm),取300 mL药液按径高比、质量浓度、体积流量和pH值的不同水平进行动态吸附,吸附完毕后,加2 BV蒸馏水洗脱,收集流出液,进行HPLC法分析,计算比吸附量。

2.4.1 径高比对吸附效果的影响:固定质量浓度0.2 g/mL、体积流量2 BV/h,考察树脂床径高比为1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9的比吸附量。从图3可以发现,HPD-100富集齐墩果酸和熊果酸的能力随径高比的降低而提高。当径高比为1:6时,比吸附量达到最大,此后随着径高比的降低,比吸附量逐渐下降。原因可能是随着径高比的降低,药液流动的阻力增加,影响了齐墩果酸和熊果酸在树脂床内部的扩散,故径高比宜控制在1:6左右。

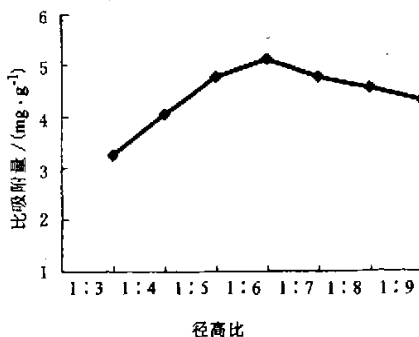


图3 径高比与比吸附量的关系

Fig.3 Relationship between ratio of height via diameter and comparative mass of adsorption

2.4.2 质量浓度对吸附效果的影响:固定体积流量2 BV/h、径高比1:6,考察药液质量浓度为0.08、0.12、0.16、0.20、0.24、0.28、0.32 g/mL的比吸附量。从图4可以看出,HPD-100富集齐墩果酸和熊果酸的能力随着质量浓度的增加而提高。当质量浓度为0.20 g/mL时,比吸附量达到最大,此后随着质量浓度的增加,比吸附量逐渐下降。原因可能是随着质量浓度的增加,与齐墩果酸和熊果酸竞争吸附的杂质质量也随之增加,比吸附量相应减少,故质量浓

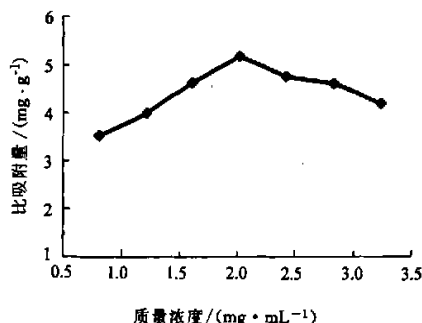


图4 齐墩果酸和熊果酸的质量浓度与比吸附量的关系

Fig. 4 Relationship between concentration of oleanolic acid and ursolic acid and comparative mass of adsorption

度宜控制在 0.20 g/mL 左右。

2.4.3 体积流量对吸附效果的影响:固定质量浓度 0.20 g/mL、径高比 1:6,考察体积流量为 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 BV/h 7 个水平的比吸附量。由图 5 可知,HPD-100 富集齐墩果酸和熊果酸的能力随体积流量的增加而降低。原因可能是如果体积流量过大,一部分齐墩果酸和熊果酸来不及被树脂吸附便流出树脂床。当体积流量为 2 BV/h 时,齐墩果酸和熊果酸的比吸附量较大,低于该值时,比吸附量未见明显增加。虽然较低的体积流量对吸附有利,但会延长操作周期,对生产不利,故体积流量宜控制在 2 BV/h 左右。

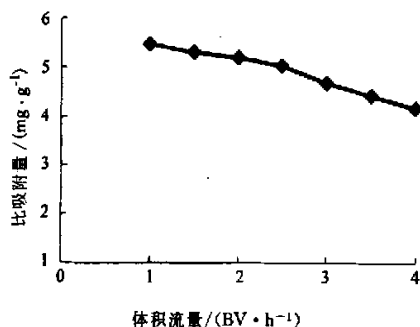


图5 体积流量与比吸附量的关系

Fig. 5 Relationship between eluent volume and comparative mass of adsorption

2.4.4 pH 值对吸附效果的影响:固定质量浓度 0.20 g/mL、树脂床径高比 1:6 和体积流量 2 BV/h,考察 pH 值为 3.31、4.33、5.32、6.35、7.34、8.36 的比吸附量。从图 6 可以看出,HPD-100 富集齐墩果酸和熊果酸的能力随着 pH 值的增加而提高。当 pH 值为 6.35 时,比吸附量达到最大,此后随着 pH 值的增加,齐墩果酸和熊果酸的比吸附量逐渐下降,故药液 pH 值宜控制在 6.35 左右。

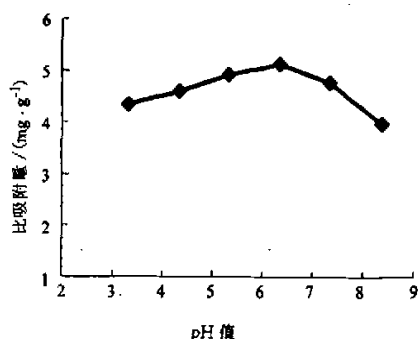


图6 pH 与比吸附量的关系

Fig. 6 Relationship between pH value and comparative mass of adsorption

根据上述各项单因素实验结果,确定 HPD-100 吸附女贞子中齐墩果酸和熊果酸的优化条件:径高比 1:6、质量浓度 0.20 g/mL、pH 6.35、体积流量 2 BV/h。按该条件进行 3 次重复性试验,结果齐墩果酸、熊果酸的比吸附量分别为 3.75 mg/g (RSD 为 0.77%)、2.33 mg/g (RSD 为 0.65%)。

2.5 吸附容量的考察:按上述优化条件,取 300 mL 药液加入树脂床(含 50 g HPD-100 树脂)中,收集 30 份流出液(5 mL/份),进行 HPLC 法分析,分别计算流出液中齐墩果酸和熊果酸的质量浓度(C)。以洗脱体积为横坐标,齐墩果酸和熊果酸之和的 C/C₀ 为纵坐标,绘制吸附泄漏曲线。图 7 表明,流份 25 中齐墩果酸和熊果酸之和 C/C₀ 为流份 24 的 8.51 倍,明显表现出泄漏现象,按每段流份 5 mL 计算,总上样体积为 120 mL,即 1 g HPD-100 的最佳吸附容量为 2.4 mL,相当于 0.6 g 生药。

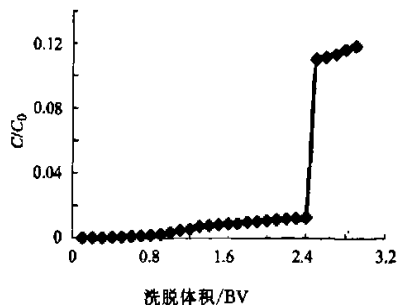


图7 吸附泄漏曲线

Fig. 7 Adsorption-leakage curve

2.6 洗脱液乙醇体积分数的考察:按上述优化条件,将 120 mL 药液加入树脂床中,吸附完毕后,依次用 0、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇进行洗脱(体积流量 2 BV/h),溶媒用量以相应的终点洗脱液颜色变浅(在 560 nm 处无紫外吸收)为度。分别收集洗脱液,进行 HPLC 法

分析,计算齐墩果酸和熊果酸的累积解吸量。从图8可以看出,齐墩果酸和熊果酸主要集中在30%~80%乙醇洗脱液中,蒸馏水和90%乙醇洗脱液中很少。因此确定洗脱工艺为上样后先以蒸馏水2 BV洗脱杂质后,继以80%乙醇洗脱树脂床中的齐墩果酸和熊果酸。

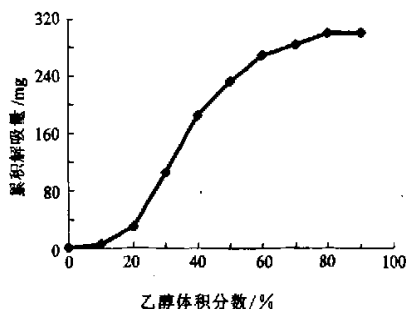


图8 乙醇体积分数对齐墩果酸和熊果酸解吸效果影响
Fig. 8 Eluting efficiency of different concentration of ethanol to oleanolic acid and ursolic acid

2.7 解吸曲线的绘制:按上述优化条件,将120 mL药液加入树脂床中,吸附完毕后,先用2 BV蒸馏水洗脱,继以80%乙醇进行洗脱,收集30份乙醇洗脱液(10 mL/份),进行HPLC法分析,计算洗脱液质量浓度。以洗脱体积为横坐标,质量浓度为纵坐标,绘制解吸曲线。图9表明,流份21的质量浓度为流份20的1/30倍,表明此时树脂床中的齐墩果酸和熊果酸基本解吸完全。按每段流份10 mL计算,溶媒用量为200 mL,相当于4倍树脂床容积。提示解吸溶媒最佳用量为4 BV。

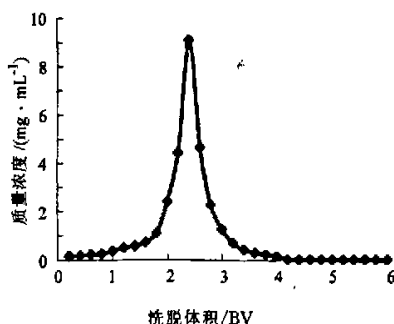


图9 乙醇用量对齐墩果酸和熊果酸解吸效果的影响
Fig. 9 Effect of ethanol volume on oleanolic acid and ursolic acid

2.8 精制度、保留率考察:取药液2份(120 mL/份),1份按上述优化条件进行试验,将洗脱液和另1份药液减压浓缩、真空干燥,制备干浸膏,称重,进行HPLC法分析,计算精制度[精制度=处理前干膏收率/处理后干膏收率×100%]和保留率[保留率=处

理后总量/处理前总量×100%],采用相同方法进行3次重复试验。结果,过柱前、后干膏平均收率分别为13.60%(RSD为0.88%)、2.44%(RSD为0.82%),平均精制度为5.57(RSD为0.72%);齐墩果酸、熊果酸过柱前质量分数分别为4.59%(RSD为1.31%)、2.85%(RSD为1.05%),过柱后分别为25.21%(RSD为1.31%)、15.65%(RSD为1.28%);其平均回收率分别为98.64%(RSD为0.55%)、98.58%(RSD为0.59%)。

3 讨论

不同产地来源的女贞子药材中,皂苷类有效成分以齐墩果酸为主,但熊果酸也占1/5以上^[4]。因此,对女贞子进行质量评价时,有必要将齐墩果酸与熊果酸分离测定,工艺研究也应同时兼顾两种成分。

女贞子皂苷类有效成分的定量控制在《中国药典》采用薄层扫描法,规定了齐墩果酸的下限,但操作繁琐,精密度和重现性较差。齐墩果酸和熊果酸的结构与性质类似,在HPLC法检测时,若以甲醇-水为流动相,齐墩果酸和熊果酸分离度仅为1.1,分离效果不理想,一般需分别测定,工作量和试验误差均会增加。实验以乙腈-甲醇-水-乙酸胺(70:16.5:13.5:0.5)作为流动相^[5],图谱基线平稳,分离度大于1.5,二成分基线分离,操作简化、方法可靠,定量准确、快速。

关于女贞子皂苷类有效成分的制备,目前国内主要有3种生产工艺^[5]:醇提-酸水解法、醇提-酸碱反复处理法和醇提-酸碱处理法,存在或收率不高、或耗时较长、或操作复杂等缺点,而且仅以齐墩果酸作为评价的指标成分。这样,女贞子中的另一有效成分熊果酸就有可能提取不充分,造成资源浪费,故有必要在工艺中同时考虑熊果酸的收率及质量分数。

References:

- [1] Shi L F, Yuan Y F, Yuan H J. TLC Studies on the active constituents of *Fructus Ligustri Lucidi* and derivatives of the constituents [J]. *Pharm Care Res* (药学服务与研究), 2006, 1(6): 48-50.
- [2] Shi X H, Guo D N, Di D H. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait. by HPLC [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2005, 17(4): 41-43.
- [3] Yao G, He Z Y, Fang J N. Purification of total iridoid glycosides and geniposide in *Gardenia jasminoides* with HPD450 macroporous resin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(1): 57-61.
- [4] Zhou J, Liu Y S. Determination of content of oleanolic acid and ursolic acid in *Fructus Ligustri Lucidi* by gas chromatography [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2003, 22(10): 596-598.
- [5] Lian G X, Liu Y F, Li Y. Draw of effective constituent-oleanolic acid in *Ligustrum lucidum* [J]. *J Qiqihar Univ* (齐齐哈尔大学学报), 2005, 21(4): 24-25.