

图 2 洗脱剂体积分数的选择曲线

Fig 2 Curve of different concentration of eluting agent

需要较大用量才能将吸附的黄芩总黄酮洗脱出来,因此选择 70%乙醇作为洗脱剂。

2.5.4 洗脱剂用量的选择:按所确定的吸附条件饱和 AB-8 型大孔吸附树脂,用蒸馏水洗至无色,然后用 70%乙醇洗脱,体积流量为 1 mL/min,每份收集 15 mL (1 个柱体积),共收集 10 份,以总黄酮质量浓度为考察指标,绘制曲线,结果见图 3。结果表明,7 BV 的 70%乙醇能将 98%以上树脂所吸附的黄芩总黄酮类成分洗脱下来,因此确定洗脱黄芩总黄酮的洗脱剂的用量为 7 BV。

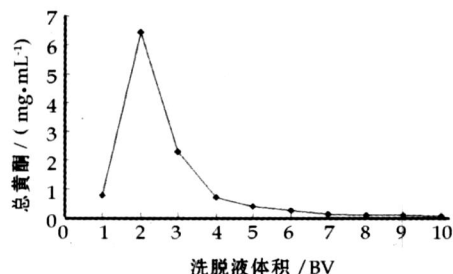


图 3 洗脱剂用量的选择曲线

Fig 3 Curve of volume of eluting agent

2.5.5 树脂重复使用次数的考察:按照上述所确定的吸附和洗脱条件,取样品液进行上柱、吸附、洗脱,在同一根树脂柱上重复操作 4 次,分别计算 4 次总

黄酮吸附量,结果第 4 次使用时黄芩总黄酮吸附量已明显下降,说明 AB-8 型大孔吸附树脂重复使用 3 次后,需要再生才可继续使用。

2.5.6 验证试验:按照上述所确定的纯化黄芩总黄酮吸附和洗脱条件,取样品液进行上柱、吸附、洗脱,黄芩总黄酮的得率为 18.69%,总黄酮的质量分数 93.89%,回收率为 81.11%。可以看出,经 AB-8 型大孔吸附树脂纯化后,黄芩总黄酮的出膏率明显降低,除杂效果好,质量分数达到 90%以上。

3 讨论

AB-8 型大孔吸附树脂对黄芩总黄酮有较大的静态吸附量,其静态吸附黄芩总黄酮量高达 130.43 mg/g (湿质量) 树脂,也较容易解吸附 (解吸率 58.52%),表现出良好的分离纯化能力;同时其动态吸附-洗脱性能也比较稳定,即动态吸附黄芩总黄酮量高达 55.13 mg/g (湿质量) 树脂,解吸率 84.46%。AB-8 型大孔吸附树脂对黄芩总黄酮有很好的吸附和解吸作用。

用 70%乙醇洗脱后,能将 98%以上树脂所吸附的黄芩总黄酮类成分洗脱下来;且黄芩总黄酮的质量分数较高,达 90%以上,因此,此工艺可用于生产黄芩总黄酮,而且树脂可以再生,成本较低,无污染,生产周期短,适合大规模生产。

参考文献:

- [1] 李伯庭. 大孔吸附树脂在天然产物分离中的应用[J]. 中草药, 1990, 21(8): 42-44.
- [2] 邹节明, 陆浩, 何斌, 等. 苦玄参、黄芩与黄柏的大孔树脂提取研究[J]. 中草药, 2003, 34(3): 222-226.
- [3] 马振山. 大孔吸附树脂在药学领域中的应用[J]. 中成药, 1997, 19(12): 40.
- [4] 刘颖, 魏元锋, 蒋伟, 等. 大孔树脂对黄芩黄酮吸附的初步研究[J]. 湖北中医学院学报, 2005, 7(2): 28-29.

加纳籽中 5-羟基色氨酸的树脂纯化研究

刘岱琳^{1,2}, 董晋泉¹, 孙华庚¹, 刘丹¹, 於洪建¹

(1. 天津尖峰天然产物研究开发有限公司, 天津 300457; 2. 中国人民武装警察部队医学院 生药教研室, 天津 300162)

摘要:目的 研究不同树脂对加纳籽中 5-羟基色氨酸的吸附性能, 筛选出对 5-羟基色氨酸具有较高选择性的树脂。方法 考察了 6 种树脂对 5-羟基色氨酸的静态吸附性能, 选出最优吸附树脂 G6104, 考察温度、不同 pH 值对 G6104 的吸附性能的影响以及 G6104 对 5-羟基色氨酸静态和动态的吸附性能, 并采用 HPLC 法分析 5-羟基色氨酸。结果 G6104 型树脂对 5-羟基色氨酸的吸附能力最强, 树脂的处理量为 0.9 g/g, 其在 30℃、pH 2~3 时对 5-羟基色氨酸吸附效果较好; 动态洗脱时, 氨水的浓度对洗脱影响很大, 30%氨水为最佳洗脱液。结论 G6104 型树脂对 5-羟基色氨酸具有较强的吸附选择性, 是一种较为理想的 5-羟基色氨酸分离纯化的介质, 有望利用其进行高

收稿日期: 2009-04-06

作者简介: 刘岱琳 (1973—), 女, 博士, 主要从事天然产物活性成分的分离及其产业化工艺研究。

Tel: (022) 66237090-8026 E-mail: dailinlch@163.com

纯度 5-羟基色氨酸的工业化生产。

关键词:加纳籽;5-羟基色氨酸;G6104 树脂

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)01-0060-04

加纳籽是豆科植物加纳谷物 *Griffonia simplicifolia* (Vahl ex DC.) Baill. 的干燥种子,野生于非洲加纳、象牙海岸和多哥等西非国家。西非地区的人们自古就有利用加纳谷物治疗疾病的历史,其叶子以及叶汁可用来治疗伤口和肾病,也可用作灌肠剂和壮阳药;捣碎的树皮可做成药膏治疗软下疳等^[1]。加纳谷物的主要活性物质是 5-羟基色氨酸,其在种子中的量最高,可达到 10%。5-羟基色氨酸是由人体必需的色氨酸在体内被色氨酸羟化酶催化而成的,是一类重要的神经类药物,具有影响睡眠、抗衰老、抗抑郁、调节免疫功能等多方面的作用^[1]。目前仅有利用加热回流提取、超声波提取等方法考察从加纳籽中提取 5-羟基色氨酸的报道^[2,3]。因此本实验以非洲加纳国特产的加纳籽为原料,考察了多种树脂对 5-羟基色氨酸的吸附情况,寻找吸附和分离 5-羟基色氨酸较好的树脂,并研究其对 5-羟基色氨酸的吸附和洗脱条件,旨在改进 5-羟基色氨酸的提取纯化工艺,获得高含量的产品,为工业化生产提供重要依据。

1 仪器与材料

日本岛津 LC-10AT 单元泵;岛津 SPD-10A 检测器;岛津 UV-2401PC 紫外可见分光光度计。CSC-1、G6104 树脂购自上海华震科技有限公司,AB-8 树脂购自沧州宝恩化工有限公司,D-101 树脂购自天津农药厂,YWD-03、YWD-06 树脂购自沧州远威化工有限公司。甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂均为分析纯。

加纳籽原料直接由非洲加纳国进口,由沈阳药科大学孙启时教授鉴定为豆科植物加纳谷物 *G. simplicifolia* (Vahl ex DC.) Baill. 的干燥种子;5-羟基色氨酸对照品(自制,HPLC 紫外检测单一组分,高分辨质谱、核磁共振鉴定,质量分数 99%以上)。

2 方法与结果

2.1 树脂的预处理:各种树脂湿法装柱,用乙醇洗至加水不混浊,然后用蒸馏水洗至无醇,备用。

2.2 5-羟基色氨酸的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件:YMC-Pack ODS-A 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(15:85);体积流量为 1.0 mL/min;检测波长为 270 nm;柱温:室温;进样体积:10 μL。

2.2.2 标准曲线的绘制:精密称取 5-羟基色氨酸对照品适量,加入水配制成 0.503 mg/mL 的对照品溶液,摇匀。精密吸取对照品溶液 1、2、3、4、5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中并用水定容至刻度,依次注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 3\,511\,400 X - 14\,748$, $r = 1$ 。结果表明 5-羟基色氨酸在 0.5 ~ 2.5 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.3 加纳籽中 5-羟基色氨酸的测定:取加纳籽原料 10 g,以 1 000 mL、800 mL 水加热回流提取各 1 次,第 1 次 2 h、第 2 次 1 h,滤过,合并两次滤液并浓缩至 100 mL,为供试品原液。精密吸取以上溶液 10 mL 至 500 mL 量瓶中,加水定容,摇匀即得。按色谱条件测得 5-羟基色氨酸的质量浓度为 203.8 μg/mL,换算得加纳籽原料中 5-羟基色氨酸的质量分数为 10.2%。

2.3 树脂的筛选

2.3.1 静态吸附试验:取经过预处理 CSC-1、G6104、AB-8、D101、YWD-03、YWD-06 树脂各 1 g,加入含 5-羟基色氨酸 203.8 μg/mL 的加纳籽提取液 30 mL,室温下置摇床中,于 120 r/min 下振摇 12 h,使之充分吸附。根据吸附前后溶液中 5-羟基色氨酸质量浓度的差值,计算吸附率,结果不同型号树脂吸附 5-羟基色氨酸的吸附率分别为 16.1%、93.0%、23.0%、23.7%、31.2%、42.0%。结果显示,筛选的 6 种树脂中 G6104 树脂对 5-羟基色氨酸的吸附性能最好。

2.3.2 静态解吸率试验:取经过预处理达到吸附饱和的 6 种树脂 CSC-1、G6104、AB-8、D101、YWD-03、YWD-06 各 1 g,置于具塞的锥形瓶中,加入 30 mL 30%氨水溶液,室温下置摇床中,于 120 r/min 下振摇 12 h,使之充分解吸,滤过,根据解吸前后溶液中 5-羟基色氨酸质量浓度的差值,并结合吸附率计算解吸率,结果不同型号树脂对 5-羟基色氨酸的解吸率分别为 55.4%、93.7%、78.3%、91.6%、96.9%、83.6%。结果显示碱性溶液对大多数的大孔吸附树脂均具有很好的解吸效果,其中树脂 G6104 的解吸率为 93.7%,并结合其对 5-羟基色氨酸具有很高的吸附率,因此选用 G6104 树脂分离纯

化加纳籽中的 5-羟基色氨酸。

2.4 不同温度对吸附的影响:准确称取 4 份预处理后的 G6104 树脂,每份 1 g,分别加入供试品溶液 30 mL,在 20、30、40、50、120 r/min 下于恒温摇床内振摇 6 h,每隔 30 min 精确吸取具塞锥形瓶中溶液 10 μ L,按上述色谱条件测定峰面积。以树脂的吸附率为纵坐标,时间为横坐标作图,结果见图 1。可见 G6104 树脂在 30 min 时可以在较短的时间内达到对 5-羟基色氨酸的吸附饱和值;温度的不同,树脂对于 5-羟基色氨酸吸附达到饱和的时间不同,但是并不影响 G6104 树脂对 5-羟基色氨酸的最终吸附率。

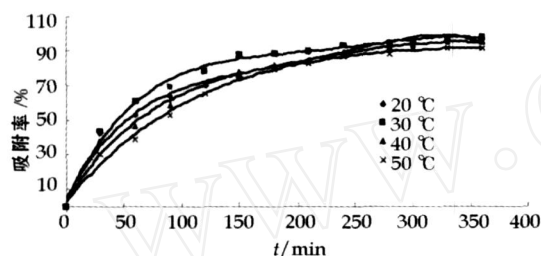


图 1 不同温度下 G6104 树脂对 5-羟基色氨酸的吸附曲线

Fig. 1 Adsorption curves of G6104 resin for 5-HTP at different temperature

2.5 不同 pH 值对吸附的影响:精密吸取供试品原液 1 mL 置于 50 mL 量瓶中,分别加入 pH 值为 2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液进行定容。精确称取 7 份已处理好的 G6104 树脂,每份 1 g,置于具塞锥形瓶中,分别加入相应的供试品溶液。室温下置摇床中,于 120 r/min 下振摇 12 h,使之充分吸附,根据吸附前后溶液中 5-羟基色氨酸质量浓度的差值,计算吸附率,结果分别为 95.5%、93.4%、85.9%、71.9%、44.6%、11.8%、4.42%。结果表明 pH 值对 G6104 的吸附性能影响很大,在 pH 值越小的条件下吸附性能越好。

2.6 洗脱剂的选择:G6104 是一种大孔型的强酸阳离子交换树脂,为了便于将来的工业化生产,首选氨水作为洗脱溶剂,因此对于氨水的解吸浓度进行筛选。取已经饱和吸附的 G6104 树脂 7 份,每份 1 g,分别加入体积分数为 2%、5%、10%、20%、30%、40%、50% 的氨水溶液各 30 mL,在室温 120 r/min 的条件下振摇 12 h, HPLC 测定溶液中 5-羟基色氨酸的质量浓度,计算洗脱率,结果分别为 7.03%、22.43%、35.72%、62.33%、81.77%、93.21%、94.68%。结果显示,随着氨水体积分数的提高,解吸的能力不断增强。为了便于将来工业化生产,选择洗脱能力较强的 30% 氨水溶液作为洗脱溶剂。

2.7 G6104 树脂的动态吸附考察和洗脱试验:精密称取已处理后的 G6104 树脂 50 g,湿法装入内径 2.0 cm 的交换柱,供试品原液中加入少许冰醋酸调节 pH 值至 3,以 3 mL/min 的速度上柱,进样量为 1 000 mL (约为 12.5 BV),吸附结束后先用 2 BV 的水洗柱,再用 30% 氨水作为洗脱溶剂,体积流量为 2 mL/min 进行洗脱,流出液分步收集,同时对流份进行 HPLC 法测定,结果见图 2、3。

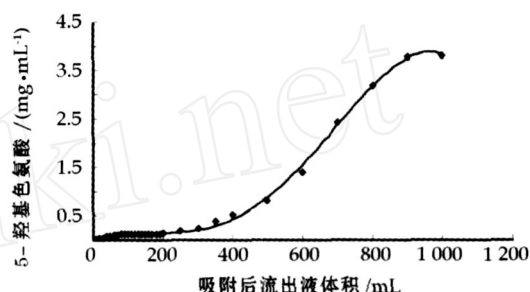


图 2 G6104 树脂的动态吸附曲线

Fig. 2 Dynamic adsorption curve of G6104 resin

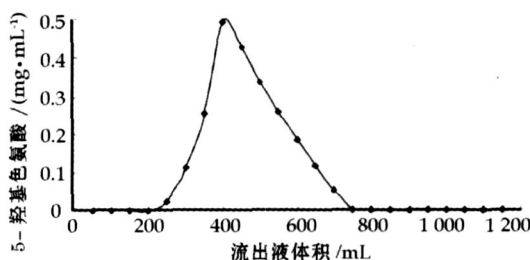


图 3 G6104 树脂的动态洗脱曲线

Fig. 3 Dynamic elution curve of G6104 resin

结果显示 50 g 树脂可吸附 200 mL (约为 2.5 BV) 的供试品原液而基本不泄漏,而饱和吸附可处理约 6 个柱床体积 (450 mL) 的原液, G6104 树脂对 5-羟基色氨酸的吸附量为 0.9 g/g。利用 30% 氨水进行洗脱时,10 个柱床体积 (800 mL) 就可以将 5-羟基色氨酸基本完全洗脱,洗脱率达到 99.2%,洗脱高峰后的 5 个柱床体积 (400 mL) 共洗脱了占总量 0.8% 的 5-羟基色氨酸,说明采用 30% 氨水进行洗脱 5-羟基色氨酸,可以使 5-羟基色氨酸较为集中,洗脱效率很高,几乎没有拖尾现象。数据说明 G6104 树脂非常适合 5-羟基色氨酸的分离纯化,便于大规模的工业生产。

2.8 G6104 树脂分离后的样品的测定:对 G6104 树脂纯化、动态吸附洗脱产物进行 HPLC 分析测定,结果 5-羟基色氨酸的质量分数达到 69.1%。HPLC 图谱见图 4。

3 讨论

吸附容量、吸附选择性、洗脱性能是衡量一种树

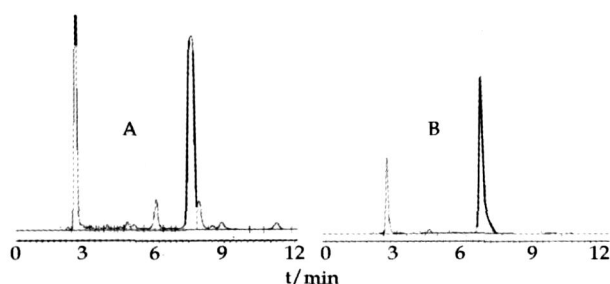


图 4 加纳籽提取液(A)和 G6104 树脂处理产物(B)的 HPLC 图谱

Fig 4 HPLC Chromatograms of Ghana seeds extract solution (A) and purification of 5-HIP by G6104 resin (B)

脂吸附性能的主要指标,本实验对具有不同极性的大孔吸附树脂(AB-8、D-101、YWD-03、YWD-06)和大孔离子交换树脂(CSC-1、G6104)进行静态吸附筛选,发现大孔离子交换树脂 G6104 对加纳籽中的 5-

羟基色氨酸具有较强的吸附性能,并对其进行了吸附温度、pH 值、洗脱溶剂的选择、动态吸附解吸等多项指标的考察。实验结果表明 G6104 型树脂在 30 下进行吸附效率最高,树脂的处理量为 0.9 g/g。在 pH 2~3 的条件下,体积流量 3 mL/min 上柱,吸附效果最佳。树脂吸附饱和后以 30% 氨水溶剂洗脱,洗脱率达到 99.2%。利用 G6104 型树脂分离纯化后得到的 5-羟基色氨酸样品质量分数由原料中的 10.2% 提升到 69.1%。而且生产成本较低,生产周期短,适合大规模工业化生产。

参考文献:

- [1] 聂利芳,李多伟. 加纳籽中 5-羟基色氨酸的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2008,30(1):47-49.
- [2] 欧艳,肖方青,肖艳萍. 5-羟基色氨酸的提取和测定方法研究[J]. 湖南中医杂志,2005,21(4):82-83.
- [3] 许慧,李多伟,任静,等. 正交试验法优选 5-羟基色氨酸的提取工艺[J]. 西北药学杂志,2006,21(2):61-63.

RP-HPLC 法测定竹叶提取物中黄酮类和酚酸类成分

龚金炎,吴晓琴,夏道宗,张英

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院,浙江 杭州 310029)

摘要:目的 建立一种 RP-HPLC 法同步测定竹叶提取物中特征性的 4 个黄酮碳苷和 4 个酚酸的方法。方法 采用 RP-HPLC 法。Luna C₁₈ ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-1% 乙酸水溶液(B);体积流量:1.0 mL/min;进样量:10 μL;柱温:40 °C;检测波长:330 nm。结果 异荭草苷、荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷、对香豆酸、绿原酸、咖啡酸和阿魏酸在 1.875~290.0 μg/mL 线性关系良好,回收率在 96.13%~102.81%,RSD 在 1.10%~1.66%。结论 本方法简便、灵敏、准确,可普遍应用于竹叶提取物的质量研究和品质控制。

关键词:竹叶提取物;异荭草苷;荭草苷;牡荆苷;异牡荆苷;对香豆酸;绿原酸;咖啡酸;阿魏酸;高效液相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2010)01-0063-03

竹叶提取物又称竹叶黄酮,是我国近年来研究和开发的一种新型植物黄酮制剂,其有效成分包括黄酮和酚酸两大部分。其中,黄酮类化合物主要是以荭草苷、异荭草苷、牡荆苷和异牡荆苷为代表的黄酮碳苷,酚酸类化合物主要是肉桂酸的衍生物,包括对香豆酸、绿原酸、咖啡酸和阿魏酸等。竹叶提取物具有抗自由基、抗氧化、抗衰老、抗菌、抗病毒及保护心脑血管、防治老年退行性疾病等生物学功效^[1~5]。通常认为,黄酮类化合物是竹叶提取物发挥抗氧化作用的关键组分,总黄酮的量越高,其抗氧化性能就越强。但随着研究的深入,越来越多的数据表明竹叶提取物的抗氧化能

力并不与其总黄酮的量呈严格对应的正相关关系,其中伴随的酚酸类化合物起到了不容忽视的独特贡献^[6]。为了建立科学、合理、全面的竹叶提取物质量评价体系,本实验建立了采用 RP-HPLC 法同步测定竹叶提取物中 8 个特征性成分的检测方法,并对目前市场上流通的两种不同规格的产品进行了验证,以期对竹叶提取物的研究、生产和消费提供科学依据。

1 材料与方法

高效液相色谱仪:美国 Waters 2695,配置 Waters PDA 2996 检测器。

异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷对照品购

收稿日期:2009-04-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972486);浙江大学曹光彪高科技发展基金资助项目(2008ZD005)

作者简介:龚金炎(1982—),男,博士研究生,研究方向为天然产物和功能性食品的研究与开发。E-mail:gongjinyan1982@163.com

*通讯作者 张英 Tel:(0571)86049803 E-mail:yizhang@zju.edu.cn