

大孔吸附树脂纯化女贞子中齐墩果酸的研究

韦国锋,程金生,黄祖良,何有成(右江民族医学院应用化学研究室,广西 百色 533000)

摘要:目的 建立应用大孔吸附树脂纯化齐墩果酸的方法。方法 以齐墩果酸的吸附量,齐墩果酸的含量和齐墩果酸的提取率为考察指标,确定大孔吸附树脂提取齐墩果酸的工艺条件。结果 AB-8型树脂对女贞子中齐墩果酸有良好的吸附分离性能,可用于提取女贞子中齐墩果酸的工业化生产,其工艺条件为:齐墩果酸最大吸附量为 $108 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,吸附流速为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,洗脱剂为 95%乙醇,解吸流速为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。洗脱液经浓缩,乙醇溶解,活性炭脱色,重结晶得到结晶性粉末齐墩果酸,熔点为 $306 \sim 308 \text{ }^\circ\text{C}$,产品纯度大于 98%,提取率平均达 89.58%。用 IR 表征了产物结构。结论 该工艺简单易行,提取率高,可用于女贞子中齐墩果酸的提取。

关键词:女贞子;齐墩果酸;大孔吸附树脂;提取;表征

中图分类号:R931.6 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)02-0090-03

A Study on the Purification for Oleanolic Acid in Herbal *Ligustrum lucidum* by Macroreticular Resin

WEI Guo-feng, CHENG Jin-sheng, HUANG Zu-liang, HE You-cheng (Research Institute of Applied Chemistry, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE This study aimed to develop a purification method of oleanolic acid with macroreticular absorption resin. **METHODS** The absorption efficiency, the contents and the extraction yields of oleanolic acid were studied to confirm the optimum purification conditions with macroreticular resin. **RESULTS** Experiments showed that AB-8 resin had a obvious better absorption and a separation efficiency for oleanolic acid in herbal *Ligustrum lucidum* and could be used in the industrialization. The optimum extraction conditions were listed as follows: the maximum absorption content of oleanolic acid was $108 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, the absorption and desorption flow rate were both controlled at $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 95% ethanol was used for eluent. After the concentrated solution was further concentrated, dissolved in ethanol, decolorized by activated charcoal and recrystallized, a final product, crystalline powder of oleanolic acid was obtained with melting point for $306^\circ\text{C} \sim 308^\circ\text{C}$, and the purity quotient for the product was $>98\%$. In these processes, the optimum extraction efficiency of 89.58% was obtained, which have potential industrial application prospect. An IR spectrum was used to characterize the product. **CONCLUSION** We have developed a simple and convenient purification method of oleanolic acid in herbal *Ligustrum lucidum* with macroreticular resin with excellent extraction efficiency.

KEY WORDS: *Ligustrum lucidum*; oleanolic acid; macroreticular absorption resin; extraction; feature

齐墩果酸 (oleanolic acid) 属于五环三萜类化合物,存在于自然界多种植物中,研究表明,齐墩果酸具有降低转氨酶

作用,对四氯化碳引起的大鼠急性肝损伤有保护作用,临床上已用于治疗急性黄疸型肝炎,对慢性肝炎也有一定疗

作者简介:韦国锋,男,教授 Tel: (0776) 2856479 E-mail: wgf25263@yahoo.com.cn

效^[1]。近年来,不少学者对齐墩果酸在中草药的提取方法和测定方法的研究有了较多的报道^[2-4],但应用大孔吸附树脂法从植物中提取齐墩果酸尚未见报道。女贞子是木犀科植物女贞(*Ligustrum lucidum* Ait)的果实,为常用中药,其药理作用明显,具有开发利用价值。为了探讨从植物中提取齐墩果酸的方法,笔者以女贞子为研究对象,采用大孔吸附树脂分离技术,经过渗漉、吸附、洗脱、浓缩、重结晶得到了齐墩果酸晶体,并对其进行了表征。工艺简单易行,为齐墩果酸的工业化生产提供一定的理论依据。

1 主要仪器和试剂

数显恒温水浴锅 HH - Sy21 型:北京长源实验设备厂;旋转蒸发器 R - 201 型:上海申生科技有限公司;XT - 4 显微熔点测定仪:北京市科仪光电仪器厂;高效液相色谱仪:日本岛津公司;MAGNA - IR550 型傅里叶红外光谱仪:美国尼高力公司;AB-8, ADS-7, ADS-17, D201 树脂:天津南开大学化工厂;层析柱。

甲醇:色谱纯;乙醇,环己烷,丙酮,乙酸乙酯,硫酸,硅胶:青岛海洋化工厂;活性炭;齐墩果酸对照品:中国药品生物制品检定所。女贞子药材购自百色市场,经本院中草药教研室鉴定为木犀科植物女贞(*Ligustrum lucidum* Ait)成熟果实女贞子。

齐墩果酸标准溶液(0.100 mg·mL⁻¹):精密称取齐墩果酸对照品 10 mg,用甲醇溶解并稀释于 100 mL 的量瓶中。

齐墩果酸样品溶液:取女贞子粗粉约 1 g,精密称取,置于具有导管的锥形瓶中,加 50 mL 80%乙醇,水浴回流 30 min,过滤,药渣加 50 mL 80%乙醇,重复回流 2 次,合并滤液,用旋转蒸发器蒸干,残渣加甲醇定容于 25 mL 的量瓶中。

2 方法与结果

2.1 树脂的预处理

树脂先用 2 mol·L⁻¹ NaOH 浸泡 5 h,用蒸馏水洗至中性;再用 3 mol·L⁻¹ HCl 浸泡 7 h,用蒸馏水洗至中性,最后用乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,用乙醇洗至流出液加适量水无白色浑浊现象,再用蒸馏水反复清洗至无醇味,用蒸馏水浸泡待用。

2.2 齐墩果酸提取液的制备

称取女贞子粗粉,用 78%乙醇浸泡 3 h 后,开始渗漉,用硅胶薄层析检测,以醇提取液中未检出齐墩果酸为提取终点。

2.3 树脂的筛选

实验选用 4 种吸附树脂(ADS-7, ADS-17, AB-8, D201)测定静态吸附容量以筛选树脂。静态吸附容量的测定:准确称取经预处理的湿树脂 2 g,置于 100 mL 具塞磨口三角烧瓶中,加入一定量的提取液,盖紧瓶塞,在室温下振荡 12 h。充分吸附后,过滤,对滤液进行 HPLC 测定,与提取液的测定结果比较,按下式计算吸附量:

$$\text{吸附量} = \frac{\text{溶液体积} \times (\text{提取液浓度} - \text{吸附液浓度})}{\text{干树脂质量}}$$

称取一定量的湿树脂于 120 °C 烘箱中烘至恒重,计算出每克湿树脂的干重。

4 种吸附树脂(ADS-7, ADS-17, AB-8, D201)进行静态吸附实验测定其吸附量,结果见表 1。由表 1 可见,树脂 AB-8 的吸附量高于其他 3 种树脂,同时 AB-8 还具有容易洗脱且不拖尾的特点,故选择 AB-8 树脂进行后面的实验研究。

表 1 不同树脂对齐墩果酸的吸附量

Table 1 Absorption amount of oleanolic acid with different macroporous absorption resin

型号	吸附量 /mg·g ⁻¹
ADS-7	87.46
ADS-17	95.37
AB-8	108.72
D201	84.67

2.4 上样浓度的确定

将不同浓度的女贞子样品液分别通过 AB-8 树脂柱,进行动态吸附,用硅胶 G 薄层板检查流出液呈现紫红色斑点时,停止上样,记录上样量,计算齐墩果酸吸附量,结果见表 2。由表 2 可见,上样浓度以 15 mg·mL⁻¹ 为宜。

表 2 上样浓度的确定

Table 2 Determination of sample concentration

上样浓度 /mg·mL ⁻¹	齐墩果酸吸附量 /mg·g ⁻¹
5	7.20
10	9.43
15	13.26
22	11.47
25	10.31

2.5 计算不同吸附流速下的泄漏率

将预处理好的湿树脂 AB-8 装柱,加入提取液进行吸附,控制一定的流速,收集流出液,测定其齐墩果酸含量,计算泄漏率,分别取流速为 1, 3, 5, 7 mL·min⁻¹ 作比较。

$$\text{泄漏率} = \frac{\text{流出液浓度} \times \text{流出液体积}}{\text{提取液浓度} \times \text{提取液体积}} \times 100\%$$

实验采用流速分别 1, 3, 5, 7 mL·min⁻¹ 作比较,结果见表 3。由表 3 可见,随着吸附流速的加快齐墩果酸的泄漏越来越严重,但流速太慢会延长生产周期,提高成本,经综合考虑,选择吸附流速为 3 mL·min⁻¹ 较为合适。吸附流速是影响被吸附物质向树脂内表面扩散的速度,从而决定了吸附效果。如果流速过快,被吸附物质分子来不及扩散到树脂内表面,就会发生早漏,造成样品流失,因此,控制吸附流速是很有必要的。

表 3 不同吸附流速的比较

Table 3 Comparison of different absorption flow rates

流速 /mL·min ⁻¹	泄漏率 /%
1	9.21
3	11.45
5	16.76
7	24.58

2.6 测定不同浓度洗脱剂的洗脱流出液的齐墩果酸含量

取适量树脂 AB-8 装柱,加入提取液进行吸附,待吸附完毕,80%, 90%, 95% 乙醇洗脱剂将齐墩果酸洗脱下来,洗脱速度

控制在 $7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 收集与 Lieberman-Burchar 反应呈阳性的洗脱液, 洗脱液经减压浓缩和处理后, 用 HPLC 检测齐墩果酸含量, 用以比较不同浓度乙醇洗脱剂的洗脱效果。结果见表 4。由表 4 可见, 用 95% 乙醇作洗脱剂洗脱效果较好, 洗脱液经过浓缩, 放置, 析出粗品, 取粗品用 95% 乙醇加热使其溶解, 加适量活性炭脱色, 过滤, 放置过夜, 析出结晶, 分段收取结晶, 从粗品经精制得到纯品的收率约为 57%。

表 4 洗脱剂浓度对齐墩果酸含量的影响

Table 4 Influence of eluent concentration on the content of oleanolic acid

乙醇浓度 / %	产物中齐墩果酸含量 / %	得率 / %
80	96.25	0.78
90	98.12	0.82
95	98.87	0.86

2.7 不同浓度洗脱剂对齐墩果酸转移率的影响

取 5.0 g 干树脂湿法装柱, 精密吸取 10.0 mL 的提取液以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的体积流量上树脂柱吸附, 分别用 80%, 90%, 95% 乙醇溶液以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流量进行解吸, 收集洗脱液, 测定齐墩果酸的质量浓度, 计算齐墩果酸的转移率, 结果见表 5。从表 5 可知, 当乙醇浓度为 95% 时, 齐墩果酸有较高的转移率, 故选用 95% 乙醇作为洗脱剂为宜。

表 5 不同乙醇浓度对齐墩果酸转移率的影响

Table 5 Influence of ethanol concentration on the diversion rate of oleanolic acid

乙醇洗脱液 / %	齐墩果酸转移率 / %
80	91.2
90	93.4
95	95.8

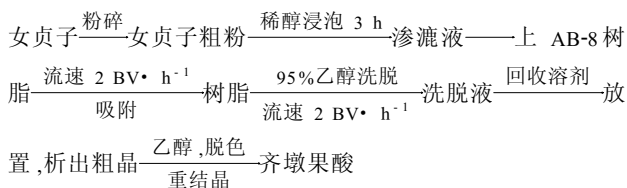
2.8 检测方法

2.8.1 薄层色谱法 制板: 将 70 mL 2.5% 的羧甲基纤维素钠溶液与 30 g 硅胶 GF254 混匀, 搅拌至无气泡, 均匀铺板, 室温下自然晾干, $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中活化 2 h , 冷却后干燥器中保存。分析: 用毛细管取少量待测液点板, 用环己烷-丙酮-乙酸乙酯 (5:2:1) 展开后, 取出晾干, 喷以 $10\% \text{ H}_2\text{SO}_4\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 溶液, 在 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热显紫红色斑点。

2.8.2 HPLC 色谱条件 色谱柱: SPhe risorb C_{18} $10 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 390 \text{ mm}$; 流动相: 甲醇-水 (87:13); 流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 220 nm ; 灵敏度: 0.05 AUFS ; 进样量: $10 \mu\text{L}$ 。

2.9 提取工艺流程

根据上述实验结果, 拟定了一个从女贞子植物中提取齐墩果酸工艺流程。



用此工艺流程, 对齐墩果酸含量为 0.96% 的女贞子药材进行小规模提取实验, 结果见表 6。由表 6 可见, 按此工艺进行提取, 可得到较满意的收率和提取率, 产品纯度大于 98%, 符合部颁标准。说明用大孔吸附树脂从女贞子中提取分离齐墩果酸是可行的。

表 6 AB-8 树脂提取分离齐墩果酸

Table 6 Purification of oleanolic acid with AB-8 resin

实验序号	女贞子粗粉 / kg	齐墩果酸产品质量 / g	纯度 / %	收率 / %	提取率 / %
1	3	26.12	98.87	90.63	0.87
2	5	42.45	98.83	88.54	0.85
3	7	59.86	98.81	89.58	0.86

2.10 齐墩果酸的表征

2.10.1 熔点测定 在熔点仪上测定提取物齐墩果酸的熔点为 $306 \sim 308 \text{ }^\circ\text{C}$, 与对照品混合, 其熔点不下降。

2.10.2 红外光谱法 经红外光谱分析, 提取得到的白色结晶性粉末物质, liebman-Burchar 反应阳性, $\text{IR} (\text{KBr}) \text{Cm}^{-1}$: $3450 (\text{OH})$, $2930, 2860, 1695 (\text{C}=\text{O})$ 提示有 $-\text{COOH}$, $1465, 1390$ 为三萜骨架上甲基与亚甲基的吸收峰。与齐墩果酸标准品对照红外光谱一致。薄层色谱 R_f 值与齐墩果酸标准品一致。故证明提取产物为齐墩果酸。

3 讨论

本实验以女贞子为原料, 研究了应用大孔吸附树脂提取分离齐墩果酸的方法, 并对产品进行了表征。最佳工艺条件为: 女贞子粗粉用稀醇浸泡 3h 后, 开始渗漉, 上柱, 吸附、解吸流速均为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 洗脱液经浓缩, 重结晶得到白色结晶性粉末齐墩果酸, 熔点为 $306 \sim 308 \text{ }^\circ\text{C}$, 由该提取工艺得到的女贞子中齐墩果酸含量平均为 0.86%, 产品纯度大于 98%。采用大孔吸附树脂提取分离齐墩果酸, 工艺简单, 操作简便, 成本低, 产率高, 为中草药中齐墩果酸的提取分离提供了理论依据, 具有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] TIAN L T, LONG M, DU S N. Survey of Pharmacology of Oleanolic Acid [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2002, 27(12): 884-886.
- [2] MA Z G, PU J Z, SUN Z Y. The Experimental Methods for Extraction of Oleanolic Acid in Herbal Ligustrum Lucidum [J]. Acta Acad Med Zunyi (遵义医学院学报), 2003, 26(5): 474-475.
- [3] LIN S, LU Y Z. Purification Investigation of Oleanolic Acid in Herbal Ligustrum Lucidum with Macroporous adsorption resin [J]. J Fujian Coll TCM (福建中医学院学报), 2002, 12(4): 47-48.
- [4] ZHAO S J, ZHANG H, XIA C L. Extraction Process Investigation of Oleanolic Acid in Herbal Ligustrum Lucidum [J]. Xijiang J Tradit Chin Med Pharm (新疆中医药), 2006, 24(2): 42-43.

收稿日期: 2007-03-09