

大孔树脂吸附纯化女贞子三萜类化合物的研究*

Study on Purification of *Ligustrum lucidum* Triterpenes with Macroreticular Resin

凌庆枝^{1,2},高莉莉¹,袁怀波²,魏兆军²

LING Qing-zhi^{1,2}, GAO Li-li¹, YUAN Huai-bo², WEI Zhao-jun²

(1. 浙江医药高等专科学校,浙江宁波 315100; 2. 合肥工业大学生物与食品工程学院,安徽合肥 230009)

(1. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo, Zhejiang, 315100, China; 2. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui, 230009, China)

摘要:对比研究 4种商品化大孔树脂 (HPD500, HPD600, D101, AB-8)吸附纯化女贞子三萜类化合物的性能。结果 AB-8树脂最适合女贞子三萜类化合物的纯化。洗脱剂乙醇的体积分数为 95%,上样液 pH值为 6时,采用 AB-8大孔吸附树脂对女贞子三萜进行纯化效果最优,产品的洗脱率达 78.86%,纯度达 34.41%。

关键词:三萜类化合物 大孔树脂 女贞子

中图分类号: O629.61 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2009)04-0428-04

Abstract The purification *Ligustrum lucidum* total triterpenes with four commercial macroreticular resins was studied. The results showed that AB-8 was the most appropriate resin for the purification of *Ligustrum lucidum* total triterpenes, with a ethanol desorption agent concentration of 95%, work solution pH value 6. Desorption ratio and product purity reached 78.86% and 34.41% separately.

Key words triterpenes, macroporous resins, *Ligustrum lucidum*

女贞子又名冬青子,系木樨科常绿乔木女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.)的干燥成熟果实,性凉,味甘、微苦,归肝、肾经,具有滋补肝肾、明目乌发的功能。女贞子主效成份为齐墩果酸、熊果酸及其相关衍生物等三萜类化合物,三萜类化合物有抗氧化、提高免疫力、抗致癌、诱导癌细胞凋亡等许多功效^[1-4]。大孔树脂吸附纯化法具有工艺简单、再生方便、成本低廉等优点。用大孔树脂纯化三萜类化合物已有文献报道^[5-7]。但是大孔树脂对女贞子三萜类化合物的分离纯化研究尚未见报道。本文对 4种商品化大孔树脂吸附纯化女贞子三萜类化合物性能进行对比研究,为女贞子三萜类化合物树脂纯化工艺提供了理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

女贞子购自合肥和义堂中药饮片有限责任公司(产地安徽),50℃烘干,粉碎备用。齐墩果酸标准品购自中国药品生物制品检定所。HPD500和 HPD600大孔树脂为河北沧州宝恩生化制剂厂产品, D101和 AB-8大孔树脂为南开大学化工厂产品; HPD500,极性,比表面积 500~550m²/g,平均孔径 55~75 Å; HPD600,极性,比表面积 500~600m²/g,平均孔径 80 Å; D101,非极性,比表面积 500~550m²/g,平均孔径 90~100 Å; AB-8,弱极性,比表面积 480~520m²/g,平均孔径 130~140 Å。其它化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器

鼓风干燥箱 (YT106型,吴江亚泰烘箱制造厂产品);电动粉碎机 (JFSD-100型,台州市新恩精密粮油仪器有限公司产品);高速离心机 (LG10-2.4A型,北京医用离心机厂产品);旋转蒸发仪 (R205B型,上海

收稿日期: 2009-02-03

修回日期: 2009-04-17

作者简介: 凌庆枝 (1963-),男,博士,副教授,主要从事生物技术制药研究。

* 合肥工业大学博士基金项目资助。

申生科技有限公司产品);循环式真空泵(SH2-D(III)型,巩义市英峪子华仪器厂产品);气浴恒温振荡器(THZ-92A型,上海浦东物理光学仪器厂产品);紫外-可见分光光度计(UV-9100型,北京瑞利分析仪器公司产品)。

1.3 实验方法

1.3.1 女贞子三萜类化合物提取

女贞子粉碎经70%乙醇50℃恒温浸提24h,滤液经活性炭脱色,真空浓缩,用蒸馏水稀释至一定浓度,此样品用于静态吸附及解吸性能试验。

1.3.2 标准曲线绘制

精密称取齐墩果酸10mg置容量瓶中,用无水乙醇溶解并稀释到50ml,浓度为0.2mg/ml。精密吸取齐墩果酸对照样品溶液0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml和0.5ml分别置于具塞试管中,加热挥去溶剂,加入新制的5%香草醛冰醋酸0.2ml和高氯酸0.8ml,在70℃恒温水浴加热15min,流水冷却至室温,精密加入乙酸乙酯4ml,摇匀,于548nm处测定,以蒸馏水为参比溶液^[8,9]。三萜类化合物浓度与吸光度值之间的回归方程为: $y = 0.5628x - 0.0578, R^2 = 0.9986$

1.3.3 大孔树脂静态吸附率及解吸率测定

准确称取已预处理的大孔树脂2.50g^[10],置于100ml具塞三角瓶中,加入20ml三萜类化合物溶液,置于室温振荡吸附24h后,测定三萜类化合物溶液的浓度。用蒸馏水洗去溶液中残余三萜类化合物后吸干水分。然后用95%的乙醇20ml溶液洗脱树脂,分别测定洗脱液中三萜类化合物的浓度,计算各树脂的吸附率及解吸率。

1.3.4 大孔树脂吸附等温线测定

准确称取已筛选出适宜女贞子三萜类化合物分离的大孔树脂5份,每份质量为2.50g,置于100ml具塞三角瓶中,加入不同浓度的三萜类化合物水溶液20ml,于室温振荡12h后,测定溶液中三萜类化合物含量,计算树脂的吸附量。根据吸附平衡后吸附量与水溶液中三萜类化合物浓度之间的关系,得到树脂吸附女贞子三萜类化合物的等温曲线。

1.3.5 大孔树脂的动态吸附试验

将一定量大孔树脂装柱,以浓度为0.99mg/ml的女贞子三萜类化合物提取原液上柱,流速2BV/h,分步收集流出液,定时测定流出液中的三萜类化合物浓度,然后以洗脱液体积为横坐标,流出液中三萜类化合物含量为纵坐标绘制动态吸附曲线。

1.3.6 上样液最适pH值选择

将三萜类化合物浓缩液用NaOH或HCl溶液调至不同的pH值,上柱,依次用50ml同样pH值的蒸

馏水及95%的乙醇水溶液依次洗脱,收集乙醇洗脱液,测定三萜类化合物的浓度,确定其最佳pH值。

1.3.7 洗脱剂及其浓度的选择

取一定量的三萜类化合物浓缩液上柱,先用蒸馏水洗脱至无色后,分别用50ml、50%~95%浓度的乙醇溶液洗脱,收集不同浓度的乙醇洗脱液测定其三萜类化合物的浓度,以确定最佳的洗脱剂浓度。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂对女贞子三萜类化合物的静态吸附效果比较

由表1可知,AB-8型树脂的吸附量和解吸率显著高于其它3种树脂。选定AB-8为分离纯化女贞子三萜类化合物的树脂。

表1 大孔树脂对女贞子三萜类化合物的静态吸附与解吸性能

树脂 Resin model	吸附量 Adsorption volume (mg · g ⁻¹)	解吸量 Remove adsorption volume (mg · g ⁻¹)	解吸率 Ratio of remove adsorption (%)
AB-8	56.62	50.01	88.32
HPD-500	55.27	29.34	53.09
HPD-600	41.87	31.66	75.62
D-101	42.70	35.65	83.49

2.2 AB-8树脂的静态吸附等温曲线

将已选择的AB-8进行静态吸附能力考查,其吸附等温线如图1所示。

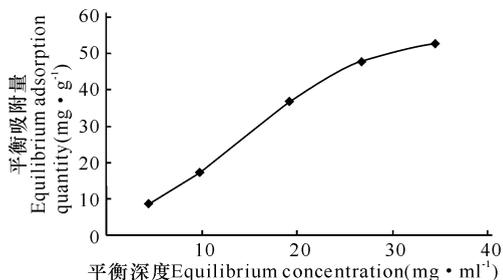


图1 AB-8树脂对女贞子三萜类化合物的吸附等温线

Fig. 1 Adsorption isotherm of macroreticular resins to *Ligustrum lucidum* triterpenes

在试验研究范围内,随三萜类化合物溶液浓度增加,AB-8树脂达到平衡的吸附量增加(图1)。在本研究设定的提取液浓度范围内,AB-8树脂对女贞子三萜类化合物的吸附被认为是单分子层吸附。树脂吸附等温曲线可用Langmuir单层吸附方程来表示:

$$Q_e = aQ_{\max}C_e / (1 + aC_e),$$

$$C_e / Q_e = C_e / Q_{\max} + 1 / aQ_{\max},$$

式中 Q_{max} 是每克树脂的最大吸附量, $mg \cdot g^{-1}$; Q_t 是每克树脂在一定三萜类化合物浓度下的吸附量, $mg \cdot g^{-1}$; a 是常数; C_e 是吸附平衡后的三萜类化合物浓度, $mg \cdot mL^{-1}$ 。

经数据模拟得出 AB-8 树脂 $Q_{max} = 40.16 mg \cdot g^{-1}$, $a = 81.36$, 其中 $R^2 = 0.951$

2.3 AB-8树脂的动态吸附与解吸附研究

2.3.1 AB-8树脂的动态吸附能力

选用 $\phi 20mm \times 300mm$ 的层析柱, 湿法装柱, 树脂床体积为 120 mL, 共处理 7 BV 料液, 每处理 1BV 料液的流出液单独收集, 测定流出液中三萜类化合物的浓度如图 2 所示。

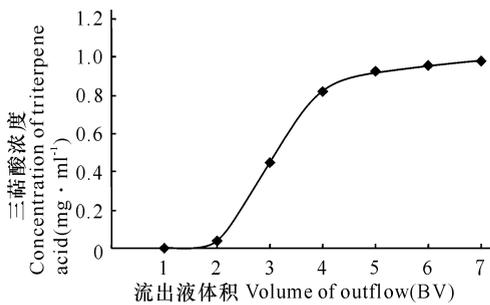


图 2 AB-8树脂对女贞子三萜类化合物的动态吸附能力

Fig. 2 Dynamic absorption ability of AB-8 macroreticular resins to *Ligustrum lucidum* triterpenes

从图 2 中可以看出, AB-8 树脂吸附浓度为 0.99 mg/ml 三萜类化合物料液时, 从第 3 树脂床体积三萜类化合物出现较大的泄漏, 但是树脂床饱和和吸附可达 6BV。在生产中可考虑采用树脂柱串联以充分发挥树脂的吸附性能。

2.3.2 原液 pH 值对 AB-8 树脂吸附性能的影响

三萜类化合物属弱酸性类化合物, pH 值影响三萜类化合物在水中的溶解性从而影响树脂对其吸附性能。试验中发现三萜类化合物原液在较低 pH 值时, 溶液呈褐色浑浊状态, 而随着 pH 值增加, 原液逐渐澄清, 并且不同 pH 值原液在树脂柱中的扩散转移速度也有明显差异, pH 值越低, 其扩散转移速度越慢。由表 2 可以看出, 其纯度和洗脱率随 pH 值变化而变化。pH 值为 6 时, 产物的洗脱率和产物纯度最高, 同时洗脱速率较快, 树脂床污染少, 因此认为适宜 pH 值为 6。

2.3.3 AB-8 树脂解吸附能力

使用 pH 值 6 原液下, 以乙醇作为洗脱剂进行解吸附的结果 (表 3) 显示, 95% 乙醇的洗脱率和产物纯度都相对最高, 因此选择 95% 乙醇为适宜的洗脱剂。

表 2 pH 值对树脂洗脱效果的影响

Table 2 Effect of pH value on desorption of macroreticular resins

pH 值 pH value	洗脱率 Ratio of elution (%)	产物纯度 Product purity (%)
3	49.71	20.28
4	52.93	23.07
5	64.04	23.85
6	78.86	34.27
7	45.63	18.54
8	31.66	15.50

表 3 不同体积分数乙醇对树脂洗脱效果的影响

Table 3 Effect of ethanol concentrations on desorption quantities of macroreticular resins

乙醇体积分数 Volume fraction of alcohol (%)	三萜类化合物洗脱率 Ratio of elution triterpenoid (%)	产物纯度 Product purity (%)
50	46.73	12.12
60	56.37	12.23
70	65.08	14.08
80	72.32	33.40
95	78.86	34.41

3 结论

女贞子中三萜类化合物可以用大孔树脂吸附进行分离纯化。通过对 4 种树脂吸附性能对比筛选, 认为 AB-8 树脂适合女贞子三萜类化合物的纯化。实验结果表明, 洗脱剂乙醇体积分数为 95%, 浸提浓缩液 pH 值为 6 时, 采用 AB-8 大孔吸附树脂柱纯化女贞子三萜类化合物, 其洗脱率达 78.86%, 产物纯度达 34.41%。

参考文献:

- [1] Chenchugari Sridhar, Karumanchi V Rao, Gottumukkala V. Flavonoids, triterpenoids and a lignan from *Vitex altissima* [J]. Subbaraju Phytochemistry, 2005, 66 (44): 1707-1712.
- [2] Shigeru Murakami, Hajime Takashima, Mariko Sato-Watanabe, et al. Ursolic acid, an antagonist for transforming growth factor (TGF) β_1 [J]. FEBS Letters, 2004, 566 55-59.
- [3] Reiko Tanaka, Toshifumi Minami, Yohei Ishikawa, et al. Cancer chemopreventive activity of serratane-type triterpenoids on two-stage mouse skin carcinogenesis [J]. Cancer Letters, 2003, 196 121-126.
- [4] Casimiro Cardenas, Ana R Quesada, Miguel Angel Medina. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 320(2): 402-408.

- [5] 林舒,陈玉枝.大孔吸附树脂对女贞子中齐墩果酸吸附纯化的研究 [J].福建中医学院学报, 2002, 12(4): 47-48.
- [6] 纵伟,夏文水,崔宝良.大孔树脂吸附纯化大叶紫薇叶中总三萜类化合物的研究 [J].食品工业科技, 2005, 26(9): 49-52.
- [7] 王亚红,周端文.大孔吸附树脂吸附纯化甘草酸的工艺研究 [J].中成药, 2006, 28(9): 1268-1271.
- [8] 唐春红,项昭保.木瓜中齐墩果酸的提取分离及含量测定 [J].中国野生植物资源, 2001, 20(2): 48-50.
- [9] 周巧霞,张经硕,顾明,等.测定山楂及提取物总三萜酸的含量 [J].中国野生植物资源, 2004, 23(5): 43-44.
- [10] 孙希云,张琦,孟宪军.大孔吸附树脂分离纯化马齿苋中黄酮类化合物的研究 [J].食品与发酵工业, 2006, 32(2): 124-127.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 427页 Continue from page 427)

- [9] 刘长久,尚伟.非晶态氢氧化镍材料电极理论放电容量估算 [J].稀有金属材料与工程, 2007, 36(1): 75-77.
- [10] Liu C J, Wang H J, Wu H B, et al. Study on physical speciality and electrochemical characteristics of electrode material of amorphous nano-Ni(OH)₂ [J]. Rare Metal Materials and Engineering, 2007, 36(9): 1545-1548.
- [11] 刘长久,姜吉琼,钟胜奎,等. Al(OH)₃ 掺杂非晶态氢氧化镍的制备及其电化学性能 [J].桂林工学院学报, 2005, 25(2): 191-194.
- [12] 周勤俭,袁庆文,覃事彪,等.正极材料 α-Ni(OH)₂ 的研究进展 [J].电池, 2003, 33(2): 93-95.
- [13] 王超群,王宁,任小华,等. Ni(OH)₂ 电极材料微结构特征的分析方法 [J].有色金属, 1999, 51(3): 79-82.
- [14] 刘长久,齐美荣,吴华斌,等. Fe(III)和 Al(III)复合掺杂非晶态 Ni(OH)₂ 的电极材料及性能 [J].化工学报, 2009, 60(3): 788-794.
- [15] Zhu W H, Ke J J, Yu H M, et al. A study of the electrochemistry of nickel hydroxide electrodes with various additives [J]. J Power Sources, 1995, 56: 75-79.
- [16] 杨书廷,陈改荣,尹艳红,等.掺杂稀土元素对 Ni(OH)₂ 晶格的影响 [J].电源技术, 2002, 26(4): 278-280.
- [17] 原鲜霞,王荫东,詹锋.钴的添加形式对氢氧化镍电极性能的影响 [J].电化学, 2000, 6(1): 65-71.
- [18] Armstrong R D, Charles E. Some aspects of the A C impedance behavior of nickel hydroxide and nickel/cobalt hydroxide electrodes in alkaline solution [J]. Journal of Power Sources, 1989, 27: 15-20.

(责任编辑: 邓大玉)