

酸碱处理法纯化白花泡桐叶中熊果酸的工艺研究

李阳^{1,2}, 陈旅翼³, 余晓晖^{1,2*}, 赵磊^{1,2} (1. 甘肃中医学院, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃兰州 730000; 3. 中南民族大学, 湖北武汉 430074)

摘要 [目的]研究通过酸碱处理的方法初步纯化白花泡桐叶提取液中熊果酸的工艺。[方法]采用 HPLC 测定熊果酸含量, 利用单因素试验及正交试验考察碱化 pH 值、酸化 pH 值、稀释倍数对熊果酸转移率和纯度的影响。[结果]白花泡桐叶中熊果酸的初步纯化最佳工艺为: 碱化 pH = 10、酸化 pH = 4、稀释倍数为 1.5 倍; 在此工艺条件下, 转移率达到了 90.23%, 纯度也达到了 26.48%。[结论]该工艺简单易行, 为泡桐叶中熊果酸的纯化找到了一条适合大工业生产的路线。

关键词 酸碱处理; 白花泡桐叶; 熊果酸; 纯化

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)08-03371-03

Experimental Study on Purifying Ursolic Acid in Leaves of *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl. by Acid-alkali Method

LI Yang et al (Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract [Objective] The study aimed to explore the technique of purifying ursolic acid in the extract of *Paulownia fortunei* leaves by acid-alkali method. [Method] HPLC was adopted to measure the content of ursolic. The effect of pH value of basification and acidification, dilution factor on the transfer ratio and purity of ursolic acid were tested by the single factor exploration and orthogonal design. [Result] The optimum condition to purify ursolic acid in *P. fortunei* leaves is under the pH 10 of basification and pH 4 of acidification and 1.5 of dilution factor, the transfer rate and purity are up to 90.23%, 26.48%, respectively. [Conclusion] Purifying by this technique is simple and feasible, which enables mass industrial production to purify ursolic acid in *P. fortunei* leaves.

Key words Acid-alkali method; Leaves of *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.; Ursolic acid; Purification

白花泡桐 (*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.) 系玄参科泡桐属 (*Paulownia*) 植物, 在我国分布广泛, 资源丰富^[1-2]。其不仅在工农业方面有广泛用途, 花、叶、皮、根和果均可药用, 如《本草纲目》记述: “桐叶主恶蚀疮著阴, 皮主五痔, 杀三虫。花主傅猪疮, 消肿生发。”《药性论》也言: “治五淋, 沐发去头风, 生发滋润”。近年来医学研究发现, 其主要作用有抗菌消炎、利尿和止血等作用, 同时还具有杀虫、治手足癣与烧伤、消肿等功效作用^[3-4]。白花泡桐叶中含有丰富的熊果酸和齐墩果酸。陈旅翼等对白花泡桐的不同部位熊果酸含量进行了测定, 其叶中含量可达 11.71 mg/g^[5]。现代研究已证实, 齐墩果酸与熊果酸具有非常广泛的生理和药理活性, 白花泡桐叶原料易得, 且两者含量较高, 可成为熊果酸和齐墩果酸的新药源, 具有极高的开发利用价值。笔者采用酸碱处理的方法针对白花泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的初步纯化进行了探索与研究, 以期对白花泡桐叶资源的研究与开发提供依据和科学方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。白花泡桐叶植物样品, 采自兰州大学医学院校区内, 经兰州大学药学院生药教研室马志刚教授鉴定为玄参科泡桐属白花泡桐 (*Paulownia Fortunei* (seem.) Hemsl.) 的叶。

1.1.2 主要仪器。Agilent 1100 series 高效液相色谱仪和 KQ-250TD 高频数控超声波清洗器, 购自昆明超声仪器有限公司; BP210S 电子分析天平, 购自德国赛多利斯有限公司; PHS-25 精密 pH 计, 购自上海雷磁仪器厂。

作者简介 李阳 (1977-), 女, 山东泰安人, 讲师, 硕士, 从事中药化学及中药制剂分析的教学和科研工作, E-mail: liyang78@sina.com。* 通讯作者, E-mail: yaohua@gszy.edu.cn。

收稿日期 2013-03-28

1.1.3 主要试剂。熊果酸对照品, 购自中国药品生物制品检定所, 批号 742-8902, 供含量测定用; 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯, 市售。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件^[5-6]。Hypersil-ODS₂ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为无水甲醇 - 浓度 1% 醋酸水溶液 (88:12, V/V); 流速为 0.8 ml/min; 柱温为 25 °C; 检测波长为 220 nm, 进样量为 10 μl; 灵敏度为 0.05 AUFS。

1.2.2 对照品溶液的制备。精确称取熊果酸对照品 5.18 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 用无水甲醇溶解并定容, 制成浓度为 0.518 mg/ml 的对照品溶液, 摇匀, 即得。

1.2.3 样品溶液的制备。称取 25.00 g 泡桐叶于圆底烧瓶中, 加 275 ml 浓度 95% 的乙醇, 在 85 °C 回流提取 2 次, 每次 3 h, 过滤即得。

1.2.4 单因素考察熊果酸的富集。(1) 碱化 pH 值对熊果酸转移率和纯度的影响。取 5 份“1.2.3”项下醇提取液各 50 ml, 以浓度 5% 的 NaOH 调溶液 pH 分别为 8.02、9.12、10.06、11.12 和 12.25, 于 60 °C 水浴上加热 10 min, 滤去不溶物; 滤液先用浓度 5% 的 H₂SO₄ 酸化至 pH = 4.00, 再用 pH = 4.00 的酸性水溶液稀释 1 倍, 于 60 °C 加热 10 min, 冷藏 2 h, 过滤, 用大量热水冲洗, 干燥, 得熊果酸粗品。准确称取 1.0 mg 粗品, 用 15 ml 无水甲醇溶解, 定容, 采用 HPLC 测定, 计算熊果酸的回收率和纯度。(2) 酸化 pH 值对熊果酸纯度和转移率的影响。取“1.2.3”项下醇提取液 250 ml, 调 pH = 10.06, 过滤, 滤液平均分成 5 份, 以浓度 5% 的 H₂SO₄ 分别调 pH 为 2.02、3.05、4.04、5.16 和 6.01, 再用等体积的各自 pH 条件下的酸水溶液稀释, 于 60 °C 加热 10 min, 冷藏 2 h, 过滤, 其后操作同“(1)”, 考察酸化 pH 值对熊果酸纯度和转移率的影响。(3) 稀释倍数对熊果酸纯度和回收率的影响。取“1.2.3”项

下醇提取液 250 ml,调 pH 为 10,过滤,滤液以浓度 5% 的 H_2SO_4 调 pH=4 左右,滤液平均分成 5 份,用 pH=4 的 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 倍体积酸水溶液分别稀释,于 60 ℃ 加热 10 min,冷藏 2 h,过滤,其后操作同“(1)”,考察稀释倍数对熊果酸纯度和回收率的影响。

1.2.5 正交试验。根据单因素试验结果,对 3 个因素设立 3 个水平进行正交设计,具体因素水平的设计详见表 1。用 $L_9(3)^4$ 设定具体工作安排表进行试验,试验结果用极差法进行分析。

表 1 熊果酸纯化正交因素水平设计

水平	因素		
	A 碱 pH	B 酸 pH	C 稀释倍数
1	9	4.5	2.0
2	10	4.0	1.5
3	11	3.5	1.0

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 碱化 pH 值对熊果酸转移率和纯度的影响。图 1~2 表明,在 pH=10.06 时,熊果酸的转移率最高,达到了 92.43%,纯度为 23.45%;在 pH=11.12 时,熊果酸的纯度最高,达到了 26.24%,转移率为 80.24%。

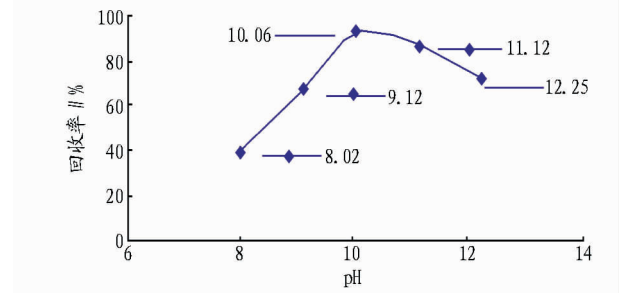


图 1 碱化 pH 值对熊果酸回收率的影响

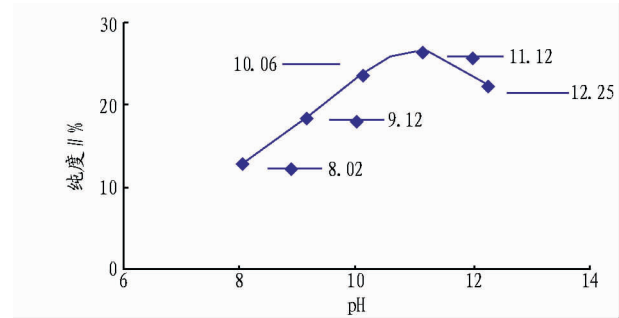


图 2 碱化 pH 值对熊果酸纯度的影响

2.1.2 酸化 pH 值对熊果酸纯度和转移率的影响。图 3~4 表明,在酸化过程中,当 pH 值在 4.04 左右时,产品的回收率和纯度都达到了最大值,分别为 90.08% 和 32.21%。

2.1.3 稀释倍数对熊果酸纯度和回收率的影响。图 5~6 表明,以 0.5 倍体积稀释时,产品纯度最高,但回收率很低,当稀释 1.0~1.5 倍左右时,回收率和纯度都达到了较大值,分别为 89.42% 和 32.02%。

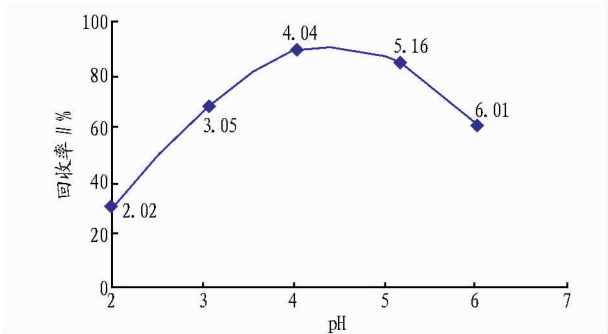


图 3 酸化 pH 对熊果酸回收率的影响

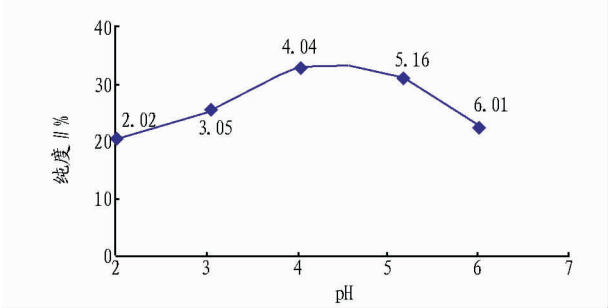


图 4 酸化 pH 对熊果酸纯度的影响

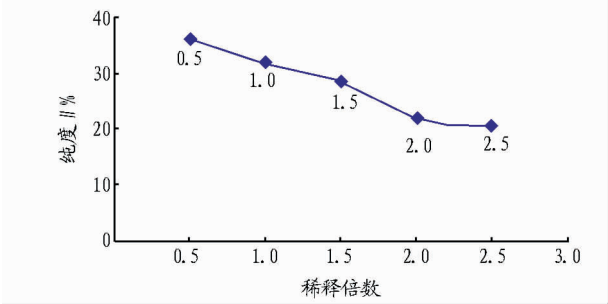


图 5 稀释倍数对熊果酸纯度的影响

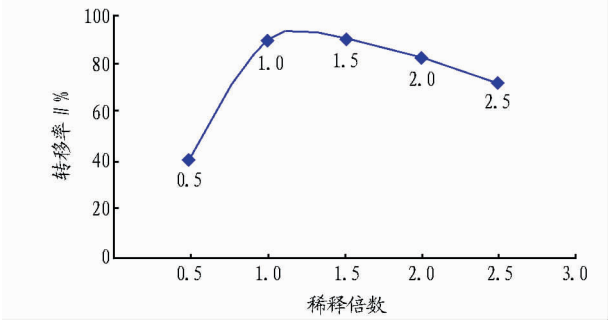


图 6 稀释倍数对熊果酸回收率的影响

表 2 熊果酸纯化的正交试验结果

编号	因素				试验考察指标	
	A	B	C	D	转移率/%	纯度/%
1	9	4.5	2.0		59.79	15.45
2	9	4.0	1.5		48.30	23.39
3	9	3.5	1.0		61.27	11.21
4	10	4.5	1.5		89.29	22.92
5	10	4.0	1.0		76.90	24.58
6	10	3.5	2.0		67.20	21.32
7	11	4.5	1.0		38.61	20.50
8	11	4.0	2.0		29.95	25.44
9	11	3.5	1.5		41.82	22.81
K_1	169.36	187.69	156.94	178.51		
K_2	233.39	155.15	179.41	154.11		
K_3	110.38	170.29	176.78	180.51		
R	41.00	10.85	7.49	8.80		

