

HPLC 法对黑翅土白蚁菌圃中抗炎活性成分的研究^{*}

★ 张会明 薛德钧^{**} (江西中医学院 南昌 330004)

摘要:目的:研究黑翅土白蚁菌圃(*Odontotermes formosanus* Shiraki)中抗炎活性成分的分离纯化。方法:采用大孔树脂富集, HPLC 分析检测。结果:熊果酸的纯度达到 87.63%。结论:该法能显著提高抗炎活性成分的纯度和收率。

关键词:黑翅土白蚁菌圃;HPLC 法;抗炎活性成分;熊果酸

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A

Study on the Separation and Purification of Ursolic Acid from Fungus Garden of *Odontotermes Formosanus* Shiraki

ZHANG Hui-ming, XUE De-jun

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: The separation and purification of ursolic acid from fungus garden of *Odontotermes formosanus* shiraki. Methods: Ursolic acid was obtained by extraction, precipitation and macroporous resin adsorption. The samples were analyzed by HPLC. Results: The purity of ursolic acid was up to 87.63% separately. Conclusion: The product was obtained with high purity and high recovery.

Key words: Fungus garden of *Odontotermes formosanus* Shiraki; HPLC; Anti-inflammation active compounds; Ursolic acid

白蚁这种古老的昆虫已在地球上存活了 2.5 亿年,是世界上公认的五大害虫之一,它常在桥梁、堤坝、树林和房舍中筑巢,主食木材和含纤维的物质,对人类危害极大。自古以来,人们也将白蚁药用,其主要功效是滋补强壮作用。白蚁的蚁巢生物学上称为菌圃,菌圃是白蚁用特殊方式培养真菌等微生物所形成的,是一种纯生物物质。民间用其治疗各种炎症,其在抗炎、抗风湿、护肝、抑制肿瘤等方面具有较好疗效^[1~6]。综合文献报道,白蚁菌圃的主要药理作用是免疫、抗炎和镇痛作用。

我们对黑翅土白蚁菌圃进行了系统的化学成分及生物活性研究^[7~9]。菌圃中所含的熊果酸是其抗炎活性成分之一,为此,我们申请了发明专利(申请号 200610079745.7;发明人:薛德钧)。

本文采用大孔树脂富集、HPLC 分析检测研究白蚁菌圃中的抗炎活性成分。

1 材料

黑翅土白蚁菌圃,产自江西鹰潭,由鹰潭市白蚁研究所熊小生工程师鉴定为 *Fungus garden of Odontotermes formosanus* Shiraki,真空 50℃ 烘干,然后粉碎备用;乙醇、甲醇、氢氧化钠、硫酸等为分析纯;熊果酸对照品由中国药品生物制品检定所提供;D 型大孔吸附树脂,南开大学化学试剂厂生产。

HP1100 型高效液相色谱仪(单元泵,紫外检测器,HP 化学工作站),天津奥特塞斯 AT-130 型柱温箱。

2 分析方法

2.1 色谱条件

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(20362006)

^{**} 通讯作者:薛德钧,江西南昌市湾里区云湾路 18 号江西中医学院图书馆;E-mail:xdj4908@21cn.com

色谱柱:Waters C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,10 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15);检测波长:210 nm;流速:1.0 ml·min⁻¹;进样量:20 μl;柱温:30 ℃。

2.2 线性关系的确定

精密称取熊果酸对照品适量,用甲醇制成每 1 ml 含 0.01 mg 的溶液,即得。

取甲醇配制的熊果酸溶液(0.26 mg/ml),用甲醇稀释 0、2、4、10、40、80 倍,吸取稀释后的溶液,按上述色谱条件注入液相色谱仪,记录峰面积,以峰面积 y 为纵坐标,浓度 x 为横坐标,进行线性回归,得到熊果酸的回归方程: $y = 123\,545x - 107.83$, $r = 0.999\,9$ ($n = 6$)。结果表明熊果酸在 0.003 25~0.26 mg/ml 范围内峰面积与浓度成良好的线性关系。

2.3 样品的测定

样品在与标准曲线相同的色谱条件下测定,根据回归方程得到样品中熊果酸的浓度。

2.4 检测样品的制备

将分步洗脱得到的洗脱液减压浓缩至干,甲醇溶解,稀释定容至 10 ml,按“2.3”项下检测,外标法定量。

2.5 大孔树脂的预处理

用乙醇充分浸泡溶胀大孔树脂后,湿法装柱,以乙醇洗至洗液与水 1:2 混合不产生白色混浊,再用蒸馏水洗至洗液无醇味,最后用 4% HCl 浸泡,蒸馏水洗至洗液无 CL⁻ 和 pH 近中性为止,真空 40 ℃干燥 2 天,备用。

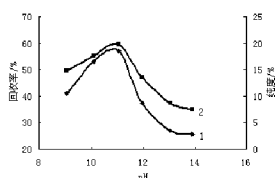
3 结果

3.1 熊果酸的提取

称取黑翅土白蚁菌圃粉末 500 g 置 10 L 圆底烧瓶中,加入 5.0 L 95% 乙醇水溶液,在 90 ℃ 水浴上回流提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并提取液。准确移取 5.00 mL 提取液,用甲醇定容至 10 mL,作为测试样品。经测定,得到黑翅土白蚁菌圃中熊果酸的质量分数为 0.06%,提取率为 95.97%。

3.2 熊果酸沉淀分离条件的优化

3.2.1 碱化 pH 值对熊果酸纯度和回收率的影响 取白蚁菌圃提取液 100 mL,以质量分数为 10% 的 NaOH 调节溶液的 pH 值分别为 9.05、10.09、11.04、11.98、13.05、13.90。然后将溶液在 50 ℃ 水浴中加热 25 min,滤去不溶物。滤液先用体积分数为 5% 的 H₂SO₄ 酸化溶液至 pH 值为 2,再用 pH 值为 2.00 的酸性水溶液稀释,然后在 50 ℃ 水浴中加热 30 min,室温静置 4 h 后倾去上清液,过滤。沉淀经水洗、真空干燥后得到熊果酸粗产品。准确称取 1.000 0 g 熊果酸产品,用 10 mL 甲醇定容后测定,计算产品的回收率和纯度,结果如图 1 所示。

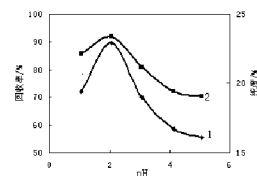


1—回收率;2—纯度

图1 碱化 pH 值对熊果酸回收率和纯度的影响

由图 1 可知,当 pH 值为 11.04 时,熊果酸的纯度和回收率都最高,分别为 19.81% 和 58.65%;当 pH 值为 11.04 时,熊果酸酸根离子的浓度达到最高;当继续升高溶液的 pH 值时,蒽醌类化合物的电离趋势增强,使得产品的回收率和纯度逐渐降低。白蚁菌圃中除含有熊果酸等三萜类化合物外还有多酚类、鞣质、蒽醌类等。将提取液碱化时,多酚类化合物形成的酚钠盐不易溶于高浓度的乙醇溶液中而沉淀出来。熊果酸和蒽醌类化合物为酸性有机化合物,当 pH 值在碱性范围时,电离平衡向解离方向移动,酸根离子的浓度升高。因此,将提取液碱化时,多酚类物质进入沉淀,熊果酸和蒽醌类物质则留在碱性溶液中。

3.2.2 酸化 pH 值对熊果酸纯度和回收率的影响 为了研究酸化 pH 值对熊果酸纯度和收率的影响,将 500 mL 除去多酚类后的滤液平均分成 5 等份,然后以 5% H₂SO₄ 分别调节溶液的 pH 值为 0.98、2.00、3.02、4.06、5.02,再用等体积的 pH 值为 2.00 的酸性水溶液稀释,酸化 pH 值对熊果酸纯度和回收率的影响如图 2 所示。

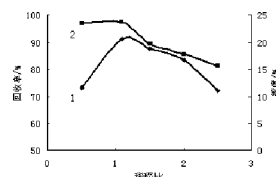


1—回收率;2—纯度

图2 酸化 pH 值对熊果酸纯度和回收率的影响

由图 2 可知,在酸化过程中,当 pH 值从 0.98 升高到 2.00 时,产品的回收率从 71.85% 升高到 89.36%,纯度从 18.81% 升高到 23.31%,表明当 pH 值为 0.98~2.00 时,升高 pH 值有利于熊果酸析出;当 pH 值为 2.00 时,产品的纯度和回收率都达到最高。对于 pH 值低于 5.0 的酚酸性物质,大部分以非解离形式(HA)存在,易进入有机溶剂中^[7]。

3.2.3 稀释比对熊果酸纯度和回收率的影响 将 500 mL 白蚁菌圃提取液碱化,除去多酚类等杂质后,将滤液平均分成 5 等份,然后用 5% H₂SO₄ 调节溶液 pH 值为 2.00,再分别用 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 倍溶液体积(即稀释比)pH 值为 4.00 的酸性水溶液稀释,使熊果酸析出并沉淀出来,结果如图 3 所示。



1—回收率;2—纯度

图3 稀释比对熊果酸纯度和回收率的影响

由图 3 可知,在用酸性水溶液稀释滤液过程中,酸性水溶液体积是影响产品纯度和收率的重要因素。当稀释比为 0.5 时,产品的纯度较高,但收率很低,表明熊果酸没有完全沉淀析出;当稀释比为 1 时,产品的纯度和收率最高;当稀释

比为 2.5 时,产品的纯度和回收率都迅速下降。表明在稀释比为 1 的酸性水溶液中,熊果酸的沉淀较为完全,且具有较高的纯度。

3.3 熊果酸吸附分离条件的优化

3.3.1 样品溶液 pH 值的选择 将熊果酸粗产品用甲醇溶解,以极性调节剂 1:1 稀释后,分别调节溶液的 pH 值为 2.96、4.98、7.02、9.04、11.02。用 D 型树脂柱吸附 1h,水洗至无色后,依次用 30% 乙醇、90% 乙醇各 200 mL 洗脱,收集 90% 乙醇洗脱液,将洗脱液减压浓缩至干,按“2.4”及“2.3”项下的方法制备样品与测定,结果如图 4 所示。

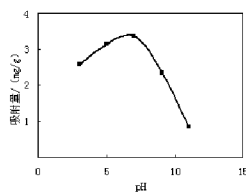


图 4 样品 pH 值对熊果酸吸附量的影响

从图 4 可以看出,当样品溶液的 pH 值为 7.02 时,树脂对熊果酸的吸附量最大,流出液中熊果酸的含量最低。因此当样品溶液 pH 值为 6.00~7.00 时有利于熊果酸的吸附。当样品溶液 pH 值高于 7.02 时,熊果酸的吸附量逐渐下降,主要是因为熊果酸的酸根离子浓度增大,致使熊果酸在洗脱液中的溶解度增大,从而降低了熊果酸与大孔吸附树脂间的作用力,使吸附在树脂上的熊果酸的量下降。实验中观察到,当样品溶液的 pH 值为 2.96、4.98 时,水洗脱液中有二萜酸沉淀析出。因此,样品溶液的 pH 过低也不利于熊果酸的吸附。

3.3.2 洗脱液浓度的选择 取 D-101 型树脂 10g,以甲醇溶解熊果酸富集物,浓度为 $1.21 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,取 10 mL,用等体积的极性调节剂稀释后,调节 pH 值为 6.82,静态吸附 1h 后,依次用水、10% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇和 90% 乙醇各 200 mL 分步洗脱,收集洗脱液,按“2.4”及“2.3”项下的方法制备样品与测定,结果见表 1。

表 1 不同浓度洗脱剂中熊果酸的含量

洗脱溶液	熊果酸浓度 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	洗脱溶液	熊果酸浓度 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
水	0	50% 乙醇	0.0026
10% 乙醇	0	70% 乙醇	0.0807
30% 乙醇	0	90% 乙醇	0.5708

由表 1 可知,水~30% 乙醇不能洗脱熊果酸。随着洗脱剂中乙醇体积分数的增大,洗脱能力也随之增强,70% 乙醇对熊果酸有一定的洗脱能力,90% 乙醇对熊果酸的洗脱能力最强,为 70% 乙醇洗脱剂的 7 倍。

3.3.3 洗脱液 pH 的选择 平行装 6 根 D-101 型树脂柱,按“3.3.2”项下方法吸附后,分别用水洗至无色,30% 乙醇 200 mL 洗脱后,再分别用 pH 值为 7、8、9、10、11、12、13 的 90% 乙醇洗脱液 200 mL 洗脱至无三萜反应,控制洗脱液的流速为 $1 \sim 2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,将 90% 乙醇洗脱液酸化至 $\text{pH}=2.0$,过滤,所得沉淀用水洗至中性后,甲醇溶解定容至 10.00 mL,按

“2.3”项下的方法测定,结果如图 5 所示。

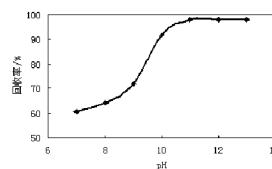


图 5 洗脱液 pH 值对熊果酸回收率的影响

从图 5 可知,洗脱液的 pH 值对洗脱能力有显著的影响^[8]。随着洗脱液碱性的增强,洗脱能力也逐渐增强,当洗脱液的 pH 值大于 11 时,洗脱能力达到最强。因此选择洗脱液的 $\text{pH}=11$ 适宜。这是因为通过改变洗脱液的 pH 值,使熊果酸以离子型存在,较易被洗脱下来,从而提高了洗脱率。当洗脱液 pH 值高于 11 时,熊果酸的回收率高达 96.36%,熊果酸产品经 HPLC 外标法定量测定,纯度达 88.52% (见图 6)。

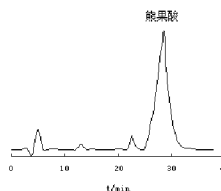


图 6 熊果酸产品的高效液相色谱图

4 结论

大孔吸附树脂应用于黑翅土白蚁菌圃中熊果酸的分离和富集,不仅能够提高熊果酸的收率和纯度,而且采用乙醇-水为洗脱液避免了传统工艺中使用有毒有机溶剂带来的二次污染,使分离纯化的工艺安全和高。pH 对熊果酸在大孔吸附树脂上的吸附与洗脱有明显的影,通过调节 $\text{pH}=6 \sim 7$,可以使熊果酸吸附完全;调节 $\text{pH} \geq 11$,可以使熊果酸洗脱完全。

参考文献

- [1]姜凤梧. 中国药用动物志[M]. 第二卷. 天津:天津科学技术出版社,1983.
- [2]张国琛. 黑翅土白蚁菌圃的药用初探[J]. 白蚁研究,1984,(8): 28.
- [3]赵一. 白蚁的药用价值,广西中医药[J]. 1996,19(5):45.
- [4]贾作成. 土白蚁菌圃药用的初步研究[J]. 白蚁科技,1992,9(1): 21.
- [5]陈力力. 土垄大白蚁菌圃的抗炎镇痛作用[J]. 广西中医药, 1997,20(5):48.
- [6]贝伟剑. 土垄大白蚁菌圃的药理作用[J]. 中草药,1995,26(9): 476.
- [7]薛德钧. 白蚁菌圃的脂溶性化学成分研究[J]. 中草药,2005,36 (增刊):76.
- [8]薛德钧. 白蚁菌圃的水溶性化学成分研究[J]. 中药材,2005,28 (10):873-875.
- [9]曹娟. 白蚁菌圃的抗炎作用研究[J]. 中药材,2006,29(10):1011-1013.

(收稿日期:2007-10-16)