

山楂三萜酸类有效部位提取纯化工艺比较

陈宝龙^{1*}, 冯坤¹, 郑朝华², 陈玉英²

(1. 河南省正骨研究院, 河南 洛阳 471002; 2. 中国药科大学分析化学教研室, 南京 210009)

[摘要] **目的:**初步确定山楂中三萜酸类有效部位提取纯化工艺。**方法:**比较三萜酸类有效部位的 4 种提取方法和 3 种纯化方法,以三萜酸类成分含量为考察指标进行提取纯化工艺试验研究。**结果:**采用碱醇水浸提法时三萜酸类成分提取效率高,基本提取完全。活性炭吸附结晶纯化法产物中三萜酸类成分纯度 > 70%。**结论:**优选的碱醇水浸提法和活性炭吸附结晶纯化法高效、简便,易于规模化,适宜作为山楂中三萜酸类有效部位提取纯化工艺。

[关键词] 山楂; 三萜酸; 有效部位; 提取; 纯化; 工艺研究

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0060-03

Comparison of Extraction and Purification Technology for Triterpenoid Acids Effective Part from *Crataegus pinnatifida*

CHEN Bao-long^{1*}, FENG Kun¹, ZHENG Zhao-hua², CHEN Yu-ying²

(1. Henan Institute of Orthopedics and Traumatology, Luoyang 471002, China;

2 Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To preliminary determine extraction and purification process of triterpenoid acids effective part from *Crataegus pinnatifida*. **Method:** Four extraction methods and three purification methods of triterpenoid acids effective part were compared, extraction and purification technology test was investigated with the content of triterpenoid acids as index. **Result:** Extraction efficiency of triterpenoid acids was optimum by alkaline alcohol water extraction method, triterpenoid acids were basic extracted completely. Purity of triterpenoid acids was more than 70% by activated carbon adsorption crystallization purification method. **Conclusion:** Optimized extraction and purification method was efficient, simple, easy to large scale, they were suitable for extraction and purification process of triterpenoid acids effective part from *C. pinnatifida*.

[Key words] *Crataegus pinnatifida*; triterpenoid acids; effective part; extraction; purification; process study

山楂三萜酸类是山楂活性部位之一,具有明显的降血脂、保肝作用,上世纪国外已有山楂三萜酸类成分制剂的临床使用^[1-3]。为探索山楂三萜酸类有效部位的开发应用,本研究对其提取、纯化方法进行考察并初步确定可行性工艺。

1 材料

LC-10AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),

HP8452A 型紫外分光光度计(美国惠普公司),山楂药材产自山东济南,经药物室李军研究员鉴定为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br 的干燥成熟果实。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取方法比较

2.1.1 95% 乙醇热回流提取 山楂粉用 10 倍量 95% 乙醇热回流提取 2 次,过滤,残渣用 10 倍量 95% 乙醇热回流提取 2 次,过滤,合并滤液。

2.1.2 60% 乙醇热回流提取 山楂粉用 10 倍量 60% 乙醇热回流提取 2 次,过滤,残渣用 10 倍量

[收稿日期] 20111209(013)

[通讯作者] * 陈宝龙, 硕士, 助理研究员, 从事新药研究与开发, Tel: 0379-63546653, E-mail: CBL0002@126.com

95%乙醇热回流提取2次,过滤,合并滤液。

2.1.3 碱水超声提取 山楂粉用10倍量1% NaOH水溶液超声提取2次,过滤,残渣加酸中和,烘箱烘干,用10倍量95%乙醇热回流提取2次,过滤,滤液加酸中和后旋转蒸发至干,95%乙醇热回流提取2次,过滤,合并滤液。

2.1.4 碱醇水浸提 山楂粉用10倍量含1% NaOH的30%乙醇溶液碱醇水超声提取2次,过滤,残渣加酸中和,烘箱烘干,用10倍量95%乙醇热回流提取2次,过滤,滤液加酸中和,旋转蒸发至干,95%乙醇热回流提取2次,过滤,合并滤液。

上述各提取液定容至一定体积,按已建立的山楂三萜酸类成分HPLC测定法进行分析测定^[4-6]。结果显示,三萜酸类成分采用95%乙醇热回流提取法基本已提取完全,提取剩余残渣中未检测到主要成分齐墩果酸和熊果酸;采用60%乙醇热回流提取法提取较为完全,提取剩余残渣中检测到少量齐墩果酸和熊果酸;采用碱水超声提取法提取不完全,提取剩余残渣中检测到的齐墩果酸和熊果酸的量达到平均值的50%;采用碱醇水浸提法基本提取完全,提取剩余残渣中未检测到齐墩果酸和熊果酸。结合实际生产情况,4种方法中碱醇水浸提方法提取效率高,成本低,安全,易于规模化,故选取碱醇水溶液提取法为最终方案。

2.2 纯化方法比较

2.2.1 大孔树脂纯化法 将上述山楂碱醇水溶液提取物加酸水进行酸化($\text{pH} \leq 3$),静置12 h,过滤,沉淀用水洗至近中性,将沉淀物置于装填好的大孔树脂柱顶部,分别用体积分数40%,50%,60%,70%,80%,95%的乙醇依次洗脱,收集各洗脱液进行减压浓缩。

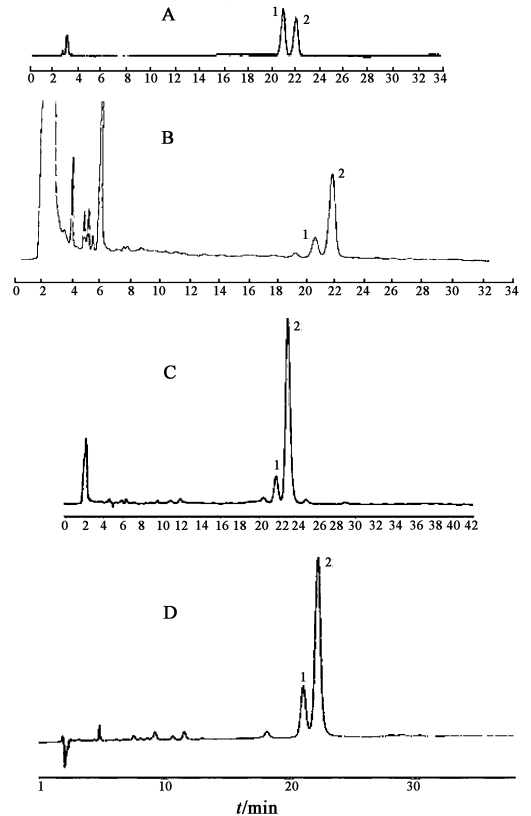
试验中发现,体积分数为40%~70%的乙醇洗脱液在浓缩过程中有黄白色沉淀析出;80%乙醇洗脱液在浓缩过程中有白色沉淀析出,95%乙醇洗脱液只得到少量固体物质。HPLC定量结果分析显示40%~60%乙醇洗脱物中齐墩果酸和熊果酸的含量很少;70%乙醇洗脱物中二者含量为47.1%;80%乙醇洗脱物中二者含量为14.8%;95%乙醇洗脱物中二者含量甚少。表明三萜酸类成分主要存在于70%乙醇和80%乙醇洗脱物中,且使用大孔树脂一次性除杂纯化难以使三萜酸的含量达到50%以上。

2.2.2 活性炭吸附纯化法 取2.2.1项下碱醇水提取、酸水处理的沉淀物用95%乙醇溶解,加入3%活性炭,热回流30 min,过滤,HPLC测定三萜酸量,

滤液回收乙醇至干,测定质量并计算纯化产物中含量,结果处理前三萜酸平均含量为33.18%,处理后则为59.04%。结果表明,采用活性炭吸附纯化法可明显提高提取物中三萜酸类成分的含量。

2.2.3 活性炭吸附结晶纯化法 取2.2.2项下经活性炭-乙醇回流后的滤液,回收乙醇,加乙醇碱水溶液溶解,静置,滤取结晶,减压干燥。经纯化得白色针状结晶,采用比色法和HPLC测定三萜酸成分的含量^[7],结果三萜酸类成分平均含量分别为74.7%,76.2%。图谱见图1,2。

结果表明,采用活性炭吸附结晶纯化法可显著提高提取物中三萜酸类成分的含量。故最终确定采用此纯化工艺。



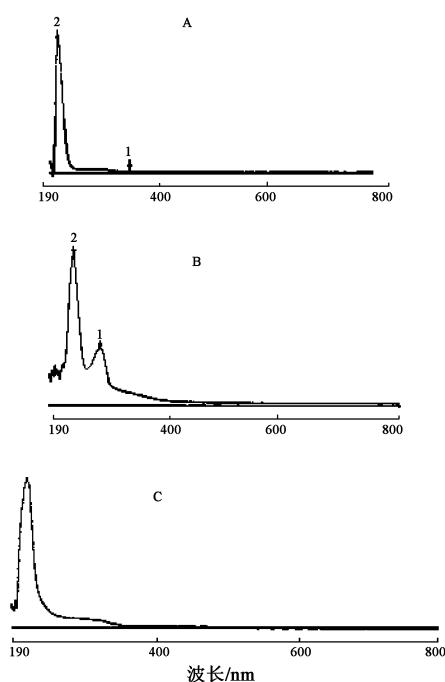
A. 对照品; B. 山楂提取液; C. 活性炭纯化物;
D. 结晶法纯化物; 1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

图1 山楂中三萜酸类有效部位HPLC

3 讨论

山楂三萜类主要成分熊果酸和齐墩果酸极性弱,难溶于水,可溶于乙醇,由于带有羧基在碱水中有一定的溶解度。在此理化性质的基础上并参考不同植物中山楂酸、熊果酸和齐墩果酸的提取方法,前期初步拟定提取方法为95%乙醇提取,60%乙醇提取和碱水提取。

大孔树脂法是常用的除杂纯化方法,结果表明



A. 熊果酸和齐墩果酸; B. 醇水溶液提取物;
C. 结晶法纯化产物; 1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

图 2 山楂中三萜酸类有效部位 UV-Vis

使用大孔树脂一次性除杂纯化难以使三萜酸的含量达到 50% 以上, 可能与 D101 大孔树脂的分离效能有关。同时, 使用大孔树脂除杂纯化存在溶剂耗用量大的问题。吸附法是一种简便、易行的纯化方法, 常用的脱色吸附剂是活性炭。本研究对利用活性炭进行山楂三萜酸提取物除杂纯化的效果进行考察, 结果显示采用活性炭吸附纯化法可明显提高提取物中三萜酸类成分的纯度, 但要进一步提高纯度须增加活性炭用量, 同时三萜酸的损失率随着增加, 提示

仅通过采用活性炭除杂纯化来获取高含量的三萜酸提取物的可行性存在不足, 需考虑新的纯化方法。

为进一步提高三萜酸类有效部位的含量, 解决活性炭吸附法纯化中存在的不足, 本研究对结晶法在山楂三萜酸类提取物纯化中应用的可行性进行试验研究。结果证实结晶法可进一步提高山楂三萜酸有效部位的纯度, 且活性炭前处理步骤必不可少。根据规定, 有效部位药的主成分群含量不能低于 50%, 采用本研究方法可达到要求, 从而为有效部位制剂的进一步研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] 方正规, 葛传吉(译). 国外对山楂制剂的研究[J]. 山东中医学院学报, 1982(增刊): 6.
- [2] 高光跃, 冯毓秀. 云南山楂的生药研究及资源利用[J]. 中国药学杂志, 1994, 29(6): 329.
- [3] 李贵海, 孙敬勇, 等. 山楂降血脂有效成分的实验研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 50.
- [4] 邹盛勤, 陈武. 高效液相色谱-光电二极管阵列检测器法测定野山楂中两组分的含量[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 438.
- [5] 陈宝龙, 冯坤, 郑朝华, 等. 山楂中熊果酸和齐墩果酸的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 73.
- [6] 查孝柱, 谢晓梅, 吕美红, 等. 含齐墩果酸和熊果酸的 10 种果实类中药 HPLC 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 60.
- [7] 王文祥, 顾振纶. 比色法测定山楂总三萜酸的含量[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(5): 47.

[责任编辑 全燕]