

D101 大孔吸附树脂法富集补骨脂中补骨脂酚的研究*

刘二伟,王家龙,韩立峰

摘要 [目的] 开发可工业化生产的补骨脂中补骨脂酚的富集方法。[方法] 实验采用大孔吸附树脂技术有针对性地富集补骨脂提取液中的补骨脂酚,并尽可能去除补骨脂素和异补骨脂素等香豆素类化合物。[结果] 经过大孔吸附树脂处理,可以有效去除补骨脂素和异补骨脂素,补骨脂酚含量达到 45.6%。[结论] 大孔吸附树脂方法用于补骨脂中补骨脂酚的富集,可以避免现有技术使用大量有机溶剂的缺点,该方法有效成分转移率高,成本低。

关键词 补骨脂;大孔吸附树脂;补骨脂酚;补骨脂素;异补骨脂素

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

文章编号 1673-9043(2012)02-0095-03

补骨脂为豆科植物补骨脂(*Psoralea corylifolia* L.) 的干燥成熟果实,性温,味辛,为常用中药。已从补骨脂中分离出的化学成分 50 余种,包括呋喃香豆素类补骨脂素和异补骨脂素、单萜酚类补骨脂酚、黄酮类新补骨脂异黄酮、Corylifol A、补骨脂二氢黄酮甲醚等成分。补骨脂具有植物雌激素样作用,雌激素的效应主要由两种受体雌激素受体 α (ER α)和雌激素受体 β (ER β)介导。研究表明激活 ER α 可促进乳腺癌细胞增殖,而 ER β 的激活则对肿瘤细胞生长起抑制作用,因此对 ER β 选择性激活的药物被认为是长期使用雌激素的更安全的替代品。本课题组前期研究结果表明,补骨脂酚选择性的激活 ER β ,而补骨脂素和异补骨脂素选择性的激活 ER α 。在提取物制备工艺中需要去除补骨脂素和异补骨脂素而富集补骨脂酚,这对于补骨脂的安全应用具有重要意义^[1-6]。

1 仪器和试剂

Waters 2695 液相色谱系统;乙腈(色谱醇,TE-DIA);补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚(实验室自制,经结构确证,质量分数 $\geq 98\%$)。补骨脂药材(购自河北安国祁新中药颗粒饮片有限公司,经天津中医药大学中医药研究院郭俊华副研究员鉴定)。

* 基金项目 科技部国际合作项目(2008DFB30070);天津市高教科技发展基金一般项目(0090209)。

作者单位 300193 天津中医药大学中医药研究院,天津市中药化学与分析重点实验室

作者简介 刘二伟(1976-),男,硕士,助理研究员,主要从事中药化学与分析和中药新药开发研究。

D101 大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司,净品级)。

2 分析方法

2.1 色谱条件 Diamonsil-C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),流动相为乙腈-0.2%醋酸水溶液,梯度洗脱,见表 1,体积流量 1.0 mL/min,检测波长 260 nm,柱温 20 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。

表 1 梯度洗脱流动相比例

梯度	时间(min)	乙腈(%)	0.2%醋酸(CH ₃ COOH)(%)
1	0.01	11	89
2	30.00	50	50
3	45.00	60	40
4	55.00	70	30
5	60.00	80	20
6	62.00	80	20

2.2 线性关系 精密称取补骨脂酚 5.79 mg、补骨脂素 16.35 mg 和异补骨脂素 10.30 mg,分别置 5 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度制成对照品储备液。分别精密量取各储备液至 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,测定,记录峰面积。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程:补骨脂酚 $\hat{Y}=0.1745X+2.1142$,决定系数 $r^2=0.9994$,线性范围 46.3~231.6 μ g;补骨脂素 $\hat{Y}=7.0253X+0.5407$,决定系数 $r^2=0.9993$,线性范围 0.108~4.860 mg;异补骨脂素 $\hat{Y}=7.4287X+0.5681$,决定系数 $r^2=0.9993$,线性范围 0.105~4.730 mg。

3 制备工艺的研究

3.1 补骨脂药材的提取 取补骨脂药材 1 kg,95%

乙醇回流提取2次,每次10L,2h,回收乙醇至尽后真空干燥,得补骨脂提取浸膏187.0g,备用。

3.2 补骨脂提取物的溶解 取步骤3.1所得补骨脂提取物3份,每份4g。样品1、样品2和样品3分别对应加入1%、2%、3%氢氧化钠水溶液,观察溶解情况,结果见表2。

表2 碱水溶解补骨脂样品结果

样品	碱浓度(%)	溶解情况	碱水用量(mL)
样品1	1	有混浊,不溶	45.0
样品2	2	溶解,澄清	28.0
样品3	3	溶解,过于黏稠	17.0

由表2可见,氢氧化钠浓度直接影响补骨脂提取物的溶解,尽量少的使用和选择低浓度氢氧化钠是优选原则,浓度过小(1%)达不到溶解目的,因此选择使用2%氢氧化钠水溶液溶解补骨脂提取物。

3.3 酸沉淀初步富集补骨脂酚 为了初步富集补骨脂酚可以加酸调节pH值,补骨脂酚会不断析出,同时补骨脂素和异补骨脂素也会重新环合成内酯,因此调节加酸的量并优化加酸的浓度,可以有选择性的沉淀出补骨脂酚而将大部分补骨脂素和异补骨脂素留在碱水溶液中,同时去除大部分其他水溶性成分,实现目标成分初步富集纯化目的。

取步骤3.1所得补骨脂提取物3份,每份4g。分别加入2%氢氧化钠水溶液28.0mL溶解。滴加10%盐酸沉淀,分别调节pH值至10.0、8.0、6.0,静置过夜,固液分离,溶液依次记录为母液1、母液2、母液3。沉淀分别用60mL95%的乙醇溶解,确定体积,依次标记为沉淀1、沉淀2和沉淀3,观察沉淀状态并按2.2色谱条件测定母液和沉淀中补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚的含量,以溶液和沉淀中补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚的分配为指标优化酸沉淀pH值条件,结果见表3。

表3 补骨脂碱水溶液加酸沉淀结果 mg

溶液	补骨脂素	异补骨脂素	补骨脂酚
母液1(pH=10.0)	426.0	183.0	-
母液2(pH=8.0)	226.0	154.0	-
母液3(pH=6.0)	106.0	94.0	-
沉淀1(pH=10.0)	35.5	48.3	485.5
沉淀2(pH=8.0)	43.0	54.5	446.9
沉淀3(pH=6.0)	53.5	66.5	492.8

加酸的量直接影响补骨脂碱溶液中补骨脂酚的沉淀效果,实验过程中发现,加酸调节pH值至10.0时即有大量沉淀产生,并且母液颜色较深,到

8.0时母液颜色变为红棕色,到6.0时变为浅黄色,沉淀量增加。数据显示,调节pH值至10.0时补骨脂酚已经大部分析出,随着加酸量的增加补骨脂素和异补骨脂素却大量增加,因此,选择补骨脂提取物碱溶液加盐酸调节pH值至10.0的工艺。

3.4 大孔吸附树脂纯化工艺条件的确定

3.4.1 大孔吸附树脂富集补骨脂酚动态吸附实验 吸附曲线的绘制有利于确定树脂对补骨脂酚吸附能力的大小,称量提取物28.5g,按步骤3.3碱水溶解后加盐酸沉淀,沉淀加入700mL2%氢氧化钠水溶液溶解,溶液上预处理好的D101大孔吸附树脂柱(直径2.0cm,高45cm,柱体积(BV)=70mL),流速3mL/min。每个柱体积接样1次,顺序接收6份。HPLC测定溶液中补骨脂酚的含量,以流出液柱体积对流出液补骨脂酚浓度(mg/mL)作图,结果见图1。

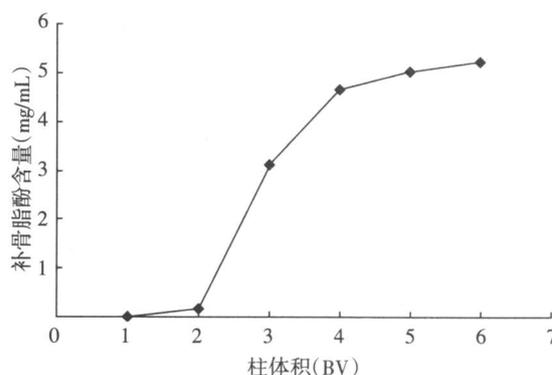


图1 大孔吸附树脂富集补骨脂酚的吸附曲线

由图1可见:补骨脂酚上样量达到2倍柱体积时开始泄露,即达到饱和,折算为补骨脂95%乙醇提取浸膏,上样量低于0.08g/mL树脂。

3.4.2 大孔吸附树脂富集补骨脂酚的动态洗脱实验 称取补骨脂95%乙醇提取物3.5g,按步骤3.3碱水溶解后加盐酸沉淀,静置过夜后固液分离,沉淀加入2%氢氧化钠水溶液溶解,上预处理好的D101大孔吸附树脂柱(直径2.0cm,高45cm,柱体积BV=70mL),流速3mL/min。上柱完毕水冲洗3BV,30%乙醇冲洗3BV,后用95%乙醇洗脱,每0.5柱体积接样1次,共接收8份。HPLC法测定每份样品中补骨脂酚的浓度,以洗脱体积(0.5BV)对补骨脂酚浓度(mg/mL)作图,结果见图2。

由图2可见,95%乙醇可以作为补骨脂酚的洗脱溶剂,洗脱溶液接收到1BV时补骨脂酚开始流出,3BV时大部分补骨脂酚已经洗脱,因此选择加

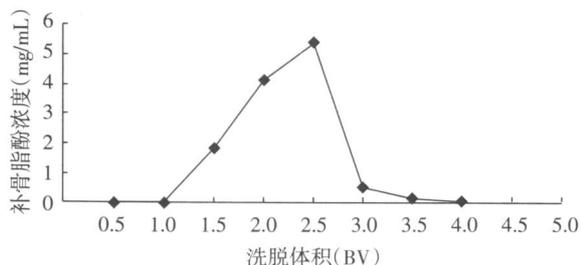


图2 大孔吸附树脂富集补骨脂酚的洗脱曲线

入3 BV的95%乙醇洗脱的工艺。

4 制备工艺的验证

称取补骨脂95%乙醇提取物30.0 g 2份,分别按步骤3.3碱水溶解后加盐酸沉淀,静置过夜后固液分离,沉淀加入210 mL 2%氢氧化钠水溶液溶解,溶液上预处理好的D101大孔吸附树脂柱(直径5 cm,高50 cm,床体积BV=600 mL),流速10 mL/min。上柱完毕水冲洗3 BV,30%乙醇冲洗3 BV后,用95%乙醇洗脱3 BV,减压浓缩至干,得12.2 g样品1、12.9 g样品2。HPLC测定两个样品中补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚的百分含量。结果见表4。

表4 工艺验证试验样品中补骨脂酚含量 %

样品	补骨脂素含量	异补骨脂素含量	补骨脂酚含量
样品1	-	-	46.4
样品2	-	-	44.8

注：“-”为未检出。

验证结果显示本研究确定的工艺可以用于富集补骨脂中的补骨脂酚,所得提取物不含补骨脂素

和异补骨脂素,工艺稳定,重现性好,平均含量达45.6%。

5 讨论

本实验利用补骨脂素和异补骨脂素碱性条件下开环成盐后易溶于水不能被大孔吸附树脂吸附的性质,巧妙的将两者分开,达到富集补骨脂酚的目的。实验证明,本研究确定的工艺可以用于制备不含补骨脂素和异补骨脂素,补骨脂酚含量达到40%以上的补骨脂提取物,为补骨脂的植物雌激素作用的临床应用提供了安全保证。

参考文献:

- [1] 郭江宁,吴候,翁新楚,等.补骨脂活性成分的提取分离与抗癌实验研究[J].中药材,2003,26(3):185-187.
- [2] Yao S, Yang B, Xu Z. Determination of bakuchiol in the fruit of *Psoralea corylifolia* L. [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 1995, 20(11):681-683.
- [3] Bajwa BS, Khanna PL, Seshadri TR. Components of different parts of seeds (fruits) of *Psoralea corylifolia* [J]. Indian Journal of Chemistry, 1974, 12:15.
- [4] Sheng Y, Cheng QF, Wang Y, W, et al. Antibacterial prenyl-flavone derivatives from *Psoralea corylifolia*, and their structure-activity relationship study[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12(16):4387-4392.
- [5] 陈业高,于丽丽,黄荣.补骨脂化学成分分离与鉴定[J].云南化工,2005,32(2):3-5.
- [6] 邓平香,徐敏.补骨脂对去卵巢大鼠骨转换及血脂代谢影响的实验研究[J].新中医,2005,37(7):94-96.

(收稿日期 2012-02-28)

Research on bakuchiol enriching method from *Psoralea corylifolia* L with macroporous adsorptive resin D101

LIU Er-wei, WANG Jia-long, HAN Li-feng

(The TCM Research Institute, Tianjin University of TCM, TCM Chemistry and Analysis Key Laboratory of Tianjin, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To establish an easier purification method for using in industrial manufacture of bakuchiol from *Psoralea corylifolia* L. [Methods] The experiment utilized the macroporous adsorptive resin to enhance bakuchiol content successfully and at the same time decrease the contents of psoralen and isopsoralen as much as possible. [Results] The experiment showed that the content of bakuchiol was 45.6%, while psoralen and isopsoralen were effectively removed by the macroporous adsorption resin. [Conclusion] Resin can be used for enriching the contents of bakuchiol from *Psoralea corylifolia* L successfully. This method has advantage of using less organic solvents and can obtain higher transfer rate.

Key words: *Psoralea corylifolia* L; macroporous adsorptive resin; bakuchiol; psoralen; isopsoralen