

葫芦巴中 4-羟基异亮氨酸的提取分离工艺研究

李玉山

(四川农业大学信息与工程技术学院, 四川 雅安 625014)

摘 要: 优化 4-羟基异亮氨酸提取纯化工艺。以甘肃天水产葫芦巴为原料, 在单因素试验基础上选取料液比、提取时间、提取温度为影响因素, 进行均匀设计优化, 结果显示最佳提取工艺为: 10 倍量水在 90℃ 下提取 2.0h, 共提取 2 次。对提取浓缩液进行了纯化, 最佳工艺为: 5 倍量 90% 乙醇沉淀、732 型树脂吸附、pH9 的氨水在流速为 0.6ml/min 下洗脱, 洗脱液总用量 800ml, 得到的 4-羟基异亮氨酸含量可达 40%。该工艺较先进, 可应用于工业化生产。

关键词: 葫芦巴; 4-羟基异亮氨酸; 提取; 纯化

Study on Extraction and Purification of 4-Hydroxyisoleucine from *Trigonella foenumgraecum*

LI Yu-shan

(College of Information and Engineering Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: the extraction conditions of 4-hydroxyisoleucine from *Trigonella foenumgraecum* planted in Tianshui of Gansu province were optimized by uniform design based on single factor tests of several factors such as ratio of extractant to material, extraction time, temperature and extraction times. The results showed that the optimum ratio of water to material, extraction time, temperature and extraction times are 10:1 (ml/g), 2 h, 90℃ and twice, respectively. After concentration, the water extract of *Trigonella foenumgraecum* was added with 90% ethanol, and then the mixture was centrifugalized to remove *Trigonella foenumgraecum* gum. Subsequently, the supernatant was adsorbed with 732 strong acid styrene cation exchange resin. The desorption conditions of 4-hydroxyisoleucine were investigated. The results showed that the optimal addition amount of 90% ethanol is 5 times of volume of water extract of *Trigonella foenumgraecum*. The optimal desorption conditions are as follows: ammonia water pH 9, its total amount for desorption 800 ml, and its flow rate for desorption 0.6 ml/min. Under the above conditions, the content of 4-hydroxyisoleucine in final product is about 40%. After used repeatedly 5 times, the resin needs regenerating.

Key words: *Trigonella foenumgraecum*; 4-hydroxyisoleucine; extraction; purification

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0128-04

葫芦巴(*Trigonella foenumgraecum* L.)为豆科蝶形花亚科葫芦巴属一年生草本, 含有氨基酸类、甾体皂苷类、黄酮类、生物碱类、三萜类、香豆素及木脂素类, 油脂等。其中 4-羟基异亮氨酸在葫芦巴属植物中含量为 0.28%~0.46%, 主要有降血糖、降血脂、抗胃溃疡、抗肿瘤、治疗慢性肾功能衰竭、对血清中甲状腺激素浓度的影响等作用^[1-2]。1973 年 Fowden 首次从葫芦巴种子中分离出 4-羟基异亮氨酸^[3]。

近年来, 4-羟基异亮氨酸的降血糖作用成为研究热点, 但 4-羟基异亮氨酸的提取纯化工艺少有文献报道。过去的研究重点集中于葫芦巴胶及生物碱类, 很少涉及 4-羟基异亮氨酸的, 国内植物提取企业也很少有提取 4-

羟基异亮氨酸, 鉴于此, 本实验以葫芦巴为原料利用其溶于水的性质, 采用水提取阳离子树脂吸附纯化提取 4-羟基异亮氨酸, 以期对其提取分离工艺进行优选。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

葫芦巴购自西安康复路药材批发市场, 产地甘肃天水, 4-羟基异亮氨酸含量 0.41%。

4-羟基异亮氨酸对照品的 Sigma 公司; 732 强酸性阳离子交换树脂 天津农药股份有限公司; 乙醇、盐酸、氨水均为分析纯。

收稿日期: 2008-07-15

作者简介: 李玉山(1974-), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为天然产物提取分离与合成。E-mail: liyushan0508@sina.com

BS1101 型电子天平 北京赛多利斯公司; R-201 旋转蒸发器 上海申科机械研究所; 101-2-BS 电热鼓风干燥箱 上海跃进医疗仪器厂; Waters 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司。

1.2 检测方法

按文献[4]方法建立。

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Intersil ODS-3 C₁₈ 柱(4.6mm × 150mm, 5 μm); 流动相: 水-乙腈-冰醋酸(90:10:0.1); 柱温: 40; 流速: 1.0ml/min; ELSD 气化室温度: 110; 气体流速: 3.0L/min; 进样量: 20 μl。

1.2.2 对照品溶液制备

精密称取 4-羟基异亮氨酸对照品 5.03mg, 加水定容至 25ml, 摇匀即得 0.21mg/ml 对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液制备

精密称取供试品适量, 转移至 50ml 量瓶中, 加水定容, 摇匀, 即得供试品溶液。

1.3 单因素试验

1.3.1 料液比的影响

取胡芦巴 100g 各 5 份, 水为溶剂, 分别以料液比 1:6、1:8、1:10、1:12、1:15(W/V) 煎煮提取, 其他条件相同, 提取物干燥后称重, 测计算提取率。

$$\text{提取率(\%)} = \frac{\text{提取物质量} \times 4\text{-羟基异亮氨酸含量}}{\text{原料质量}} \times 100$$

1.3.2 提取时间的影响

取胡芦巴 100g 各 5 份, 以料液比 1:10(W/V) 煎煮 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5h, 其他条件相同, 提取物干燥, 称重, 计算提取率。

1.3.3 提取温度的影响

取胡芦巴 100g 各 5 份, 以料液比 1:10(W/V) 提取 1.5h, 提取温度分别为 60、70、80、90、100, 提取液浓缩, 干燥, 称重, 计算提取率。

1.3.4 提取次数的影响

取胡芦巴粗粉 100g 各 3 份, 以料液比 1:10(W/V) 在 90 下提取 1.5h, 分别提取 1、2、3 次, 提取液浓缩、干燥、称量、计算提取率。

1.4 均匀设计法优化提取工艺^[5]

选取料液比, 提取温度和提取时间为影响因素, 采用 U₇(7⁶) 实验设计。

1.5 提取物纯化

1.5.1 水提醇沉

将水提液浓缩后加入 90% 乙醇沉淀, 乙醇液的加入量分别为 1、2、3、4、5、6 倍量(V/V), 离心、收集乙醇液、浓缩、干燥、称重、测含量。

1.5.2 树脂吸附法

醇沉过滤液浓缩回收乙醇直至无醇味后的水液以 732 强酸性阳离子交换树脂吸附, 先以水洗去杂质, 再以 pH10 氨水洗脱, 考查以下几个影响因素。

1.5.2.1 洗脱液用量

取上述浓缩水液 50ml, 以 732 强酸性阳离子树脂吸附, 先以水洗, 再分别以 100、200、300、400、500、600、700、800、900ml pH10 氨水液洗脱, 分段收集, 检测有效成分含量。

1.5.2.2 洗脱液 pH 值

50ml 浓缩液分别以 pH7、8、9、10、11 的氨水洗脱收集不同 pH 值的洗脱液, 检测有效成分含量。

1.5.2.3 洗脱流速对吸附的影响

50ml 浓缩液, 分别以 0.4、0.6、0.8、1.0ml/min 的流速洗脱, 收集不同流速下的洗脱液, 检测含量。

1.5.2.4 树脂使用次数的考查

以树脂使用 1~7 次, 考查其吸附能力。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比的影响

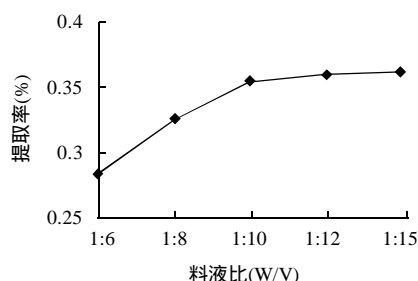


图1 料液比对提取率的影响

Fig.1 Effects of material-water ratio on 4-hydroxyisoleucine yield

由图1可看出, 4-羟基异亮氨酸随水提取剂用量增加, 提取率也增大, 但在 1:10~1:15 范围增加不大, 考虑到水液浓缩困难, 选择 1:10(W/V) 的料液比。

2.1.2 提取时间的影响

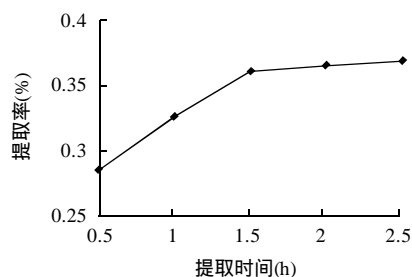


图2 提取时间对提取率的影响

Fig.2 Effects of extraction time on 4-hydroxyisoleucine yield

由图2可知,提取时间越长,有效成分提取率越高,但在1.5~2.5h范围,提取率变化不明显,考虑到提取温度较高,因此提取时间可以稍短一点,选择1.5h为宜。

2.1.3 提取温度的影响

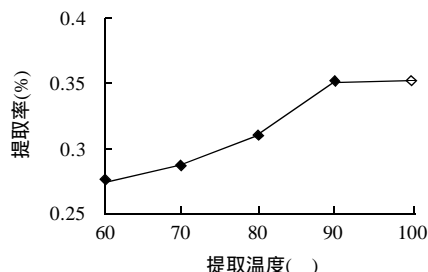


图3 提取温度对提取率的影响

Fig.3 Effects of extraction temperature on 4-hydroxyisoleucine yield

由图3可知,温度在60~90℃提取率明显增加,但在90~100℃无明显变化,因此提取温度选择90℃。

2.1.4 提取次数的影响

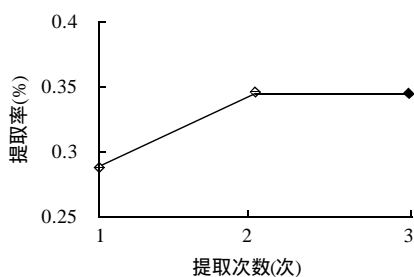


图4 提取次数对提取率的影响

Fig.4 Effects of extraction times on 4-hydroxyisoleucine yield

由图4可知,提取次数越多,提取率越高,由于提取2次与3次变化不大,考虑到水液的浓缩越困难,选择2次为宜。

2.2 均匀设计优化

表1 均匀设计及结果

Table 1 Uniform design for optimizing extraction conditions of 4-hydroxyisoleucine and results

试验号	A 料液比(W/V)	B 提取温度(°C)	C 提取时间(h)	得率(%)
1	1:6	40	0.5	0.24
2	1:8	50	1.0	0.31
3	1:10	60	1.5	0.33
4	1:12	70	2.0	0.40
5	1:13	80	2.5	0.42
6	1:14	90	3.0	0.45
7	1:15	100	3.5	0.41

由表1可看出,第6组实验提取率最高,最佳工艺为料液比1:10,在90℃下提取2.0h,提取2次。

2.3 纯化方法

2.3.1 水提醇沉法

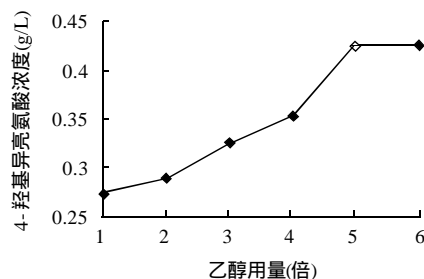


图5 乙醇用量对胡芦巴胶纯度的影响

Fig.5 Effects of addition amount of 90% ethanol on 4-hydroxyisoleucine concentration

由图5可知,5倍量乙醇用量最佳,6倍量时已无变化,因水提液中含大量胡芦巴胶,利用醇沉法将其除去,醇液的用量以不产生沉淀为宜,本实验选择90%乙醇为水提液体积的5倍。

2.3.2 树脂吸附纯化法

2.3.2.1 洗脱液用量对洗脱的影响

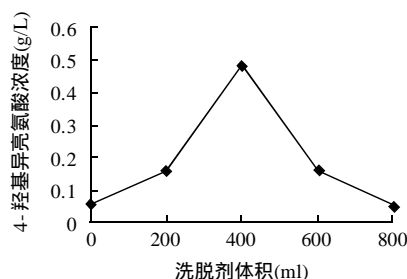


图6 洗脱液体积对洗脱的影响

Fig.6 Effects of ammonia water amount on desorption of 4-hydroxyisoleucine

由图6可知,732强酸性阳离子交换树脂对4-羟基异亮氨酸有良好的动态吸附与解吸能力。故长时间内能保持低浓度泄露,当解析体积为800ml时,4-羟基异亮氨酸基本洗脱完毕,所以洗脱体积为800ml较合适。

2.3.2.2 洗脱液pH值对洗脱的影响

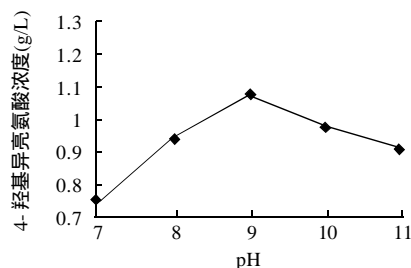


图7 洗脱液pH值对洗脱的影响

Fig.7 Effects of pH value of ammonia water on desorption of 4-hydroxyisoleucine

由图7可知,732强酸性阳离子交换树脂对4-羟基异亮氨酸的分离效果好,且有明显脱色效果,其中以pH9.0时分离效果最好。

2.3.2.3 洗脱液流速对洗脱的影响

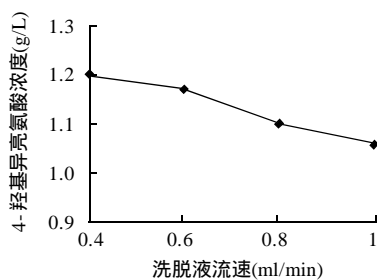


图8 洗脱液流速对洗脱的影响

Fig.8 Effects of flow rate of ammonia on desorption of 4-hydroxyisoleucine

洗脱液的流速对洗脱的影响结果见图8。随流速上升有效成分含量降低,考虑到实验效率和杂质含量,综合分析认为流速为0.6ml/min,洗脱液中有效成分含量高,效率也高。

2.3.2.4 树脂使用次数对洗脱的影响

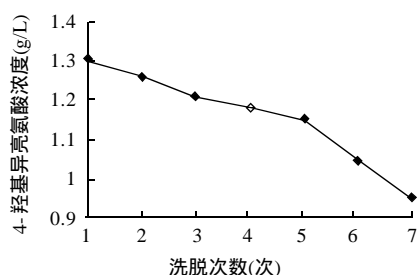


图9 树脂洗脱次数对洗脱的影响

Fig.9 Effects of resin used times on desorption capacity to 4-hydroxyisoleucine

树脂使用次数对洗脱的影响结果见图9。树脂使用一定周期后受污染吸附能力下降,需要再生恢复其吸附性能。由图9可看出,树脂使用次数越多,吸附能力越弱,树脂最多使用5次就需再生。

3 结 论

本实验对葫芦巴中4-羟基异亮氨酸的提取分离做了研究,最佳提取工艺为:料水比1:10(W/V),90℃下提取2.0h,提取2次。最佳纯化工艺为:浓缩液以5倍量90%乙醇沉淀(V/V),滤液回收乙醇后以732强酸性阳离子树脂吸附,先以水洗,再以16倍量(V/V)pH9的氨水在0.6ml/min流速下流脱,4-羟基异亮氨酸含量可达40%,提取率达0.32%,树脂最多可使用5次,该工艺已应用到工业生产中。

参考文献:

- [1] 史江华,李多伟,逢敏杰,等. 葫芦巴研究新进展[J]. 西北药学杂志, 2007, 22(3): 153-155.
- [2] 姜华,赵余庆. 葫芦巴的医药价值和综合利用[J]. 中国现代中药, 2006, 8(8): 34-36.
- [3] 刘玲,丁永良,张国林. 4-羟基异亮氨酸的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 491-496.
- [4] 房杰,刘智宇,熊正涛. HPLC-ELSD测定葫芦巴4-羟基异亮氨酸的含量[J]. 华西药学杂志, 2004, 19(5): 355-356.
- [5] 洪伟,吴承桢. 实验设计与分析——原理·操作·案例[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 123-127.