

# 熊果苷分离纯化研究

贺绍祥, 梁静娟, 庞宗文, 周玉娟

(广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530005)

**摘要:** 研究了由米曲霉生物转化生成  $\alpha$ -熊果苷的吸附特性及其分离纯化。从所用的几种大孔树脂中筛选出了一种分离效果较好的树脂 S-8, 并对 S-8 分离方法进行了优化。结果表明: S-8 分离  $\alpha$ -熊果苷的优化条件为样品 pH=1, 吸附 1 h, 上样量 0.2 mg/g 树脂, 以蒸馏水洗脱, 流速 3 BV/h。在此条件下, 可得到纯度为 99% 的熊果苷。

**关键词:**  $\alpha$ -熊果苷; 纯化; 大孔树脂; 高效液相

**中图分类号:** Q939.99; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)10-0066-03

## Study on the Separation and Purification of $\alpha$ -Arbutin

HE Shao-xiang, LIANG Jing-juan, PANG Zong-wen, ZHOU Yu-juan

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract:** The absorption characteristic of  $\alpha$ -arbutin produced by *Aspergillus oryzae* and its separation and purification were studied. Among the examined absorbent resins, the S-8 resin was found to be the best one. The conditions of separation and purification of  $\alpha$ -arbutin using S-8 resin were optimized and the best pH value of samples, absorption time, loading amount of the samples and the flow rate of water eluent were 1, 1 h, 0.2 mg/g Resin, and 3 BV/h, respectively, under which the purity of  $\alpha$ -arbutin reached 99%.

**Key words:**  $\alpha$ -arbutin; purification; macroporous resin; HPLC

$\alpha$ -熊果苷属于氢醌苷类化合物, 化学名称为 4-羟基苯-D-吡喃葡萄糖苷, 其美白活性是  $\beta$ -熊果苷的十倍。研究者发现熊果苷作为酪氨酸酶的抑制剂, 能阻断多巴以及多巴醌的合成, 从而有效地抑制黑色素的生成, 具有美白作用, 且对皮肤没有刺激性, 毒副作用小, 具有显著抑制酪氨酸酶活性的作用, 是一种新兴的无刺激、无过敏和配伍性强的天然美白活性物质<sup>[1-2]</sup>, 化妆品中熊果苷推荐用量为 1%~5%。

本实验室利用米曲霉生物转化氢醌和麦芽糖得到  $\alpha$ -熊果苷。但由于发酵液中大量多糖的干扰, 近年对熊果苷的分离纯化方法均不适合从发酵液分离熊果苷, 而且各种分离方法成本通常比较高, 不适合工业化, 因此研究出一种合适、价廉的纯化方法势在必行。大孔吸附树脂为一种有机高聚吸附剂, 具有选择性吸附有机化合物的能力, 对多糖基本不予吸附, 各种树脂的吸附能力及其解吸、纯化条件参数因化合物的理化性质的不同而不同, 本文对各种大孔树脂对熊果苷的吸附及解吸特性作了重点考察, 优选出了最适合熊果苷分离的方法。

## 1 试验仪器、材料与试剂

收稿日期: 2007-06-23

通讯作者: 贺绍祥 (1982-), 男, 硕士研究生, 从事微生物药物研究工作

### 1.1 主要仪器

RE-52A 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器); SH B-111 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); Delta320pH 计 (上海第三分析仪器厂); S-8 大孔树脂 (天津市光复精细化工研究所); 高效液相: SPD-10A 检测器、LC-10AT 泵 (SHIMADZU)。

### 1.2 试剂

甲醇 (天津市四友生物技术医药技术有限公司); 95%乙醇 (广东光华化学厂); 乙酸乙酯 (成都市科龙化工试剂厂); 乙酸 (广东汕头市西陇化工厂); 硅胶 G (青岛海洋化工有限公司); CMC (国药集团化学试剂有限公司)。

## 2 试验方法

### 2.1 熊果苷的生物转化

熊果苷由米曲霉转化氢醌和麦芽糖合成, 得到的发酵液中熊果苷含量为 1.3355 g/L。发酵液浓缩 10 倍备用。

### 2.2 树脂的预处理

取大孔树脂 NKA、S-8、X-5、AB-8 用蒸馏水冲洗, 然后以 95%乙醇浸泡不少于 24 h, 装柱, 95%乙醇洗至流出液与水 1:2 混合不出现白色浑浊为止, 再以蒸馏水洗至无醇味, 备用。

2.3 熊果苷的鉴定方法:

(1) 高效液相方法: 色谱柱 C18 柱, 流动相为甲醇: 水=5:95, 柱温 30 °C, 流速 1 mL/min, 检测波长 280 nm<sup>[3]</sup>。

(2) 薄层层析方法: 展开剂为乙酸乙酯:乙酸:水=3.1:1:1, 碘缸中显色。熊果苷 R<sub>f</sub> 值为 0.80, 氢醌 R<sub>f</sub> 值 0.9。

2.4 麦芽糖含量测定的方法: 取 500 μL 待测液, 加入 750 μL DNS, 沸水中精确煮 5 min, 准确定容到 15 mL, 520 nm 下测定 OD 值。

2.5 各种大孔吸附树脂对熊果苷的吸附情况考察

2.5.1 静态吸附率: 取经过预处理的大孔吸附树脂 NKA、S-8、X-5、AB-8 各 15 g 置锥形瓶, 各加入上面所制备的发酵液 50 mL, 恒温 30 度振荡 4 h, 分别从各瓶中取液 0.15 mL 置于 EP 管中, 加入甲醇 0.4 mL, 静置 1 h, 12000 r/min 离心 5 min, 取 10 μL 高效液相检测。

2.5.2 静态洗脱率: 将上述已静态吸附熊果苷的树脂, 吸干表面水分, 分别精确加入 30%乙醇 20 mL, 恒温 30 度振荡 1 h, 分别从各瓶中取液 0.15 mL 置于 EP 管中, 加入甲醇 0.4 mL, 静置 1 h, 12000 r/min 离心 5 min, 取 10 μL 高效液相检测熊果苷含量。

3 结果与讨论

3.1 大孔树脂对熊果苷的吸附率和洗脱率

不同大孔树脂对熊果苷的吸附率和洗脱率不同, 考察了几种不同树脂对其的吸附和洗脱情况, 见表 1。

表 1 大孔树脂静态考察 单位: mg/mL

Table 1 Absorption capacity of resin

	AB-8	X-5	S-8	NKA
发酵液中熊果苷含量	1.34	1.34	1.34	1.34
静态吸附后熊果苷含量	1.19	0.75	0.43	1.19
树脂吸附熊果苷量	0.15	0.59	0.91	0.15
静态洗脱后熊果苷含量	0.13	0.34	0.42	0.13
静态吸附后发酵液颜色	+	++	+	++
静态洗脱后树脂颜色	-	+	+++	-

注: “-” 为无色, “+” 越多颜色越深。

由上表可以看出 S-8 对熊果苷吸附解吸效果最好, 但同时吸附色素的能力亦很强, 而且色素难以被洗脱下来, 不利于 S-8 的活化再生。AB-8 吸附熊果苷的能力弱, 但吸附解吸色素的能力强, 较好的弥补了 S-8 的不足。初步确定发酵液通过 AB-8 大孔树脂吸附色素后, 再经 S-8 极性大孔树脂吸附熊果苷。下面对 S-8 极性大孔树脂对熊果苷的分离纯化工艺条件做进

一步优化。

3.2 S-8 分离纯化工艺条件的优化

3.2.1 发酵液 pH 值对 S-8 树脂吸附的影响

取活化备用的 S-8 大孔树脂 25 g 装柱(越占柱体积 50 mL), 发酵液调 pH 值分别为 1、1.5、3 和原始 pH 值 4.5, 各上样 5 mL, 静止吸附 1 h 后用水洗脱, 洗脱速度为 2 BV/h, 每 10 mL 分瓶收集。并对各瓶收集液用 2.3、2.4 方法检测。结果见表 2。

表 2 样品 pH 值对 S-8 树脂吸附的影响 单位: mL

Table 2 Effect of sample pH values on S-8 resin adsorption

	1	1.5	3	4.5
麦芽糖洗脱峰	0~60	0~60	0~60	0~60
熊果苷洗脱峰	70~150	70~150	70~150	70~150
氢醌洗脱峰	≥90	≥80	≥70	≥70

S-8 树脂吸附的原理是以范德华力为基础的分子间吸附。在高 pH 值下对苯二酚发生解离, 带有氧负离子, 极性增加到与熊果苷接近, 不利于分离; 低 pH 值时, 对苯二酚在溶液中以分子态存在, 在分子状态下对苯二酚极性小于熊果苷, 从而易于树脂吸附分离。实验结果亦是如此, 麦芽糖和熊果苷的洗脱峰都很稳定, 而氢醌的洗脱峰随 pH 的变化而有较大改变。从上表可以看出在 pH 为 1 时熊果苷和氢醌、麦芽糖分离效果最好, 确定调节发酵液 pH 为 1 时上样。

3.2.2 吸附流量对 S-8 树脂吸附的影响

当洗脱流速为 4 BV/h 时, 熊果苷未检出, 而对苯二酚则开始出现不同程度的泄漏, 因此对苯二酚的穿透程度决定了树脂吸附处理量。综合考虑处理效果及处理时间, 确定洗脱流速为 3 BV/h。

3.2.3 洗脱剂对 S-8 树脂吸附熊果苷的影响

取活化备用的 S-8 大孔树脂 25 g 装(约占柱体积 50 mL), 发酵液调 pH 到 1 后上样 5 mL, 静止吸附 1 h 后用不同的洗脱剂(水、30%乙醇、60%乙醇)洗脱, 洗脱速度为 3 BV/h, 每 10 mL 分瓶收集。并对各瓶收集液用 2.3、2.4 方法检测。结果如下表 3。

表 3 洗脱剂对 S-8 树脂吸附的影响 单位: mL

Table 3 Effect of eluent on S-8 resin adsorption

	蒸馏水	30%乙醇	60%乙醇
麦芽糖洗脱峰	0~60	0~60	0~60
熊果苷洗脱峰	70~150	60~150	40~150
氢醌洗脱峰	≥90	≥60	≥40

洗脱剂中乙醇含量越高, 洗脱剂极性越小, 有利于从大孔树脂柱上洗脱下极性相对较小的氢醌。实验验证亦是如此, 氢醌的洗脱峰随乙醇在洗脱剂中含量的增加而前移, 直至与熊果苷的洗脱峰重叠。因此从

分离效果和成本的角度考虑, 选用蒸馏水作为洗脱剂能较好的分开熊果苷和麦芽糖与氢醌, 达到纯化目的。

### 3.2.4 上样量对熊果苷分离的影响

取活化备用的 S-8 大孔树脂 25 g 装柱 (约占柱体积 50 mL), 发酵液调 pH 到 1 后分别上样 1/10 BV、1/5 BV、1/3 BV, 静止吸附 1 h 后洗脱, 洗脱速度为 3 BV/h, 每 10 mL 分瓶收集。并对各瓶收集液用 2.3、2.4 方法检测。结果如下表 4。

表 4 上样量对 S-8 树脂分离的影响 单位: mL

Table 4 Effect of sample volume on S-8 resin separate

	1/10 BV	1/5 BV	1/3 BV
麦芽糖洗脱峰	0~60	0~60	0~60
熊果苷洗脱峰	70~150	70~150	60~150
氢醌洗脱峰	≥90	≥70	≥60

从大孔树脂静态吸附的考察和上样量的考察, 确定上样量为柱体积的 1/10 时分离效果最好。

### 3.3 熊果苷的进一步纯化

经大孔树脂 S-8 分离的发酵液并不能完全分离熊果苷和氢醌, 洗脱液中有大量的熊果苷和氢醌混合的部分, 为提高熊果苷的回收率和氢醌的再利用率, 对同时含熊果苷和氢醌的洗脱液利用硅胶进一步纯化。

将含有熊果苷和氢醌的混合液减压浓缩得白色固体, 用少量 2.3 中的层析用的展开剂溶解, 硅胶拌样上硅胶柱, 再在样品层上覆盖一层硅胶。以乙酸乙酯: 甲醇: 水 = 3.1:1:1 为洗脱液洗脱, 分瓶收集洗脱液, 按 2.3 中的方法检测熊果苷, 得到纯熊果苷。

### 3.4 验证试验

3.4.1 取活化备用的 AB-8 大孔树脂 150 g 装柱 (约占柱体积 350 mL)。发酵液 50 mL (约含熊果苷 66.775 mg) 上柱脱色, 静止吸附 1 h 后, 30%乙醇洗脱 5 BV。浓缩洗脱液, 定容到 50 mL, 取样按 2.3 中的方法检测熊果苷的含量为 1.1589 g/L, 收率为 87%。调浓缩液 pH 到 1。

3.4.2 取活化备用的 S-8 大孔树脂 150 g 装柱 (约占柱体积 350 mL), 第 1 步溶液上柱, 静止吸附 1 h 后,

蒸馏水洗脱, 每 15 mL 分瓶收集洗脱液, 按 2.3 中的方法检测熊果苷洗脱峰所在为第 22~38 瓶, 减压干燥收集到晶体 37.9 mg。

3.4.3 将第 38 瓶以后的混合洗脱液减压浓缩得到固体 230 mg, 按 3.3 的方法得到熊果苷 13.294 mg。本实验熊果苷的回收率为 77%。

3.4.4 将 100 mg 熊果苷晶体溶解定容至 1000 mL, 取 10 μL 按 2.3 中的高效液相方法检测, 推算出熊果苷含量为 99%。

3.4.5 将 30 mg 熊果苷晶体溶解定容至 10 mL, 旋光检测值为 +171 °C。

## 4 结论

(1) 大孔吸附树脂具有吸附量大、选择性好、成本低、效率高等优点, 适合熊果苷和多糖的分离, 但对极性相近的小分子分离效果不好, 而硅胶可以弥补这一不足。

(2) 通过实验得出最适分离熊果苷的大孔树脂 S-8 条件为: 样品 pH 1, 吸附 1 h, 上样量 0.2 mg/g 树脂, 以蒸馏水洗脱, 流速 3 BV/h, 在上述条件下熊果苷的分离效果最好, 分离得到的熊果苷纯度为 99%。

(3) 分离得到的熊果苷通过旋光检测证明为 α-熊果苷; 配合硅胶柱的分离, 熊果苷的回收率为 77%。采用蒸馏水洗脱分离纯化熊果苷大大节约了生产成本, 而熊果苷的高纯度和高回收率为其工业应用提供了可能性。

## 参考文献

- [1] Meada K, Fukuda M. Arbutin: mechanism Of its depigmenting action in human melanocyte culture[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996, 276(2): 765-769
- [2] 周桦, 吴晓芳, 张晓炜, 等. 毛细管气相色谱法测定化妆品中熊果苷. 中国公共卫生, 2002, 18 (5): 584
- [3] 黄少嫦, 黄百芬, 陈青俊, 等. 应用高效液相色谱法测定化妆品中熊果苷的含量. 香料香精化妆品, 2002, 1(2): 13-16

## 白糖宜加热食用

螨虫是一种全身长毛刺而肉眼看不见的小昆虫, 嗜好食糖。白糖在储存、运输、销售的过程中, 如不注意卫生管理, 容易受到螨虫的污染。

当人吃了生白糖, 螨虫就可进入人体内而致病。现代医学研究结果表明, 螨虫侵入人体肠道, 可损害肠黏膜而形成溃疡, 引起腹泻、腹痛、肛门烧灼; 螨虫侵入肺部, 可引起肺部毛细血管破裂而咯血, 并诱发过敏性哮喘; 螨虫侵犯泌尿道, 则可引起泌尿道感染, 发生尿频、尿急、尿痛或尿血等症状。

家庭购买白糖不宜过量, 不可长期存放, 调制饮料或做凉拌菜要用白糖时, 应将白糖先经加热处理, 螨虫在加热到 70 °C 时就会死亡。因此, 人们食用白糖时宜经加热处理, 尤其是对婴幼儿更应注意, 谨防发生螨虫病。