

# 酶法生产 $\alpha$ -熊果苷的纯化工艺

杨祥开 成春燕 欧娜 周志鹏 韦星明 许黎明 周兴

广西科学院生物研究所, 南宁 530007

**摘要** 采用乙醇发酵去除酶法合成 $\alpha$ -熊果苷反应液中大部分糖类杂质,以活性炭纤维吸附分离 $\alpha$ -熊果苷,选择甲醇-乙酸乙酯混合溶剂重结晶精制。结果表明,50%乙醇溶液洗脱部分 $\alpha$ -熊果苷含量最高,此部分经甲醇-乙酸乙酯混合溶剂反复重结晶精制,可制备得到 $\alpha$ -熊果苷无色针状结晶,HPLC检测纯度达到99%以上,收率达到80%。该工艺简单可行,稳定性高、重复性好,适合大规模制备高纯度 $\alpha$ -熊果苷。

**关键词** 酶合成法; $\alpha$ -熊果苷;活性炭;HPLC;重结晶

**中图分类号** TQ 464 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)03-0057-06

熊果苷(arbutin),通常指 $\beta$ -熊果苷(hydroquinone- $\beta$ -D-glucopyranoside),是一种新兴的皮肤美白剂,最初来源于杜鹃花科熊果属的多年生常绿小灌木植物熊果的叶子,后来在杜鹃花科的越桔属、蔷薇花科的梨属、虎耳草科的耳草属的植物中也有发现<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -熊果苷的去色素作用机制是作为酪氨酸酶的抑制剂,主要阻断多巴及多巴醌的合成从而遏制黑色素的形成<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -熊果苷(hydroquinone- $\alpha$ -D-glucopyranoside)是 $\beta$ -熊果苷的同分异构体,研究表明 $\alpha$ -熊果苷和 $\beta$ -熊果苷具有相似的美白作用,也是通过抑制酪氨酸酶遏制黑色素合成,但抑制强度是 $\beta$ -熊果苷的10倍,而且对人体正常细胞没有抑制作用,因此, $\alpha$ -熊果苷比 $\beta$ -熊果苷更安全高效<sup>[3-4]</sup>。 $\alpha$ -熊果苷和 $\beta$ -熊果苷来源不同; $\beta$ -熊果苷可以通过植物提取、植物细胞培养和人工化学合成3种方法制备;而 $\alpha$ -熊果苷一般认为只能通过来自微生物的酶催化糖基转移或逆水解反应来制备<sup>[5-6]</sup>。 $\alpha$ -熊果苷做为高级美白化妆品添加剂,由于无刺激、无过敏、配伍性强,国内外需求量越来越大,因而其合成和纯化技术也日益受到人们的关注。在前期研究<sup>[7]</sup>中,利用大黄欧文氏菌(*Erwinia rhapontici*)蔗糖异构酶(sucrose isomerase)的突变体F185I、F321I和F321W酶蛋白催化蔗糖和对苯二酚合成 $\alpha$ -熊果苷, $\alpha$ -熊果苷含量最高达到25 mg/mL,对苯二酚转化率72%~88%。酶法合成 $\alpha$ -熊果苷反应产物和 $\beta$ -

熊果苷植物抽提物相比有不同的特点,其包含的成分除了反应不彻底的底物蔗糖和对苯二酚外,还含有各种蔗糖的酶促转化产物如异麦芽酮糖、葡萄糖、果糖等,这给 $\alpha$ -熊果苷纯化分离带来不小难度。酵母常用于乙醇发酵,可发酵糖生成乙醇。活性炭具有来源广泛、吸附量大、成本低、再生简单等优点,常用于制药行业产品脱色以及有效成分分离。重结晶技术常用于药物的精制。本研究采用酵母发酵、活性炭吸附分离以及有机溶剂重结晶技术对酶法合成 $\alpha$ -熊果苷进行分离纯化,采用高效液相色谱法进行检测,分析其影响因素,旨在为酶法合成 $\alpha$ -熊果苷分离纯化和高纯度 $\alpha$ -熊果苷规模化生产提供工艺参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

$\alpha$ -熊果苷标准品纯度 $\geq 99\%$ ,帝斯曼(日本)生产;对苯二酚含量 $\geq 99.0\%$ ,分析纯,北京索莱宝科技有限公司生产;标准糖分子样品购自Sigma公司; $\alpha$ -熊果苷合成反应液由笔者所在课题组制备;酿酒高活性干酵母,购自安琪酵母股份有限公司;活性炭粉末(powder activated carbon, PAC),孔径 $< 0.074$  mm,购自江西怀玉山三达活性炭有限公司;活性炭颗粒(granular activated carbon, GAC),孔径 $0.6\sim 2.0$  mm,购自福建元力活性炭股份有限公司;

收稿日期: 2016-11-04

基金项目: 广西科技攻关计划项目(桂科攻 14122005-40); 广西科学院基本科研业务费专项(13YJ22SWS19)

杨祥开,工程师。研究方向:生物技术应用研究与开发。E-mail: 503589830@qq.com

通信作者: 周兴,研究员。研究方向:生物医药技术研究与开发。E-mail: zhoux99@126.com

活性炭纤维(activated carbon fiber,GAC)SY-ACF-1003,购自江苏南通森友碳纤维有限公司。

Waters 600E 高效液相色谱仪,检测器为 Waters2489 紫外检测器、Waters 2414 示差折光检测器;Mettler AE 240 电子天平,德国梅特勒-托利多公司;RE-52A 型旋转蒸发仪,上海亚荣;SHZ-82 恒温振荡器,常州国华电器有限公司;MIKRO 220R 离心机,德国 Hettich 科学仪器有限公司;BT-100N 数显恒流泵,上海沪西分析仪器厂有限公司;BSZ-100 分部收集器,上海青浦沪西仪器厂;DHG-9240A 鼓风干燥箱,上海天呈实验仪器制造有限公司。

## 1.2 酵母发酵处理

将合成反应液 100 mL 加水稀释 3 倍,加入 0.05% 酿酒高活性干酵母(使用前先用 10 倍 35~38℃ 的 2% 蔗糖水活化 30 min),摇匀,塑料膜封口,置 30℃ 恒温振荡器 180 r/min 培养,每隔 12 h 取样,采用 HPLC 法检测各成分含量变化。72 h 终止反应,6 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀,上清液置旋转蒸发仪加热、真空浓缩至原体积 100 mL,冷却备用。

## 1.3 活性炭富集工艺

1)活性炭预处理。将活性炭置于烧杯,加入适量 4% 盐酸溶液,搅匀,浸泡 2 h,纯化水洗至中性,再用等量 4% NaOH 溶液浸泡 2 h,纯化水洗至中性,沥干水分,80℃ 烘箱干燥,备用。

2)活性炭静态吸附量和解吸率测定。参照文献[8]的方法,分别选用粉末、颗粒和纤维 3 种活性炭进行  $\alpha$ -熊果苷吸附分离。准确称取经过预处理的活性炭 1.0 g 置于 100 mL 三角瓶中,平行 3 份,加入 25.0 mL 经本文“1.2”发酵处理的  $\alpha$ -熊果苷合成反应液,150 r/min 摇床振荡 30 min,0.2  $\mu$ m 滤膜抽滤,再用 25.0 mL 纯化水洗涤活性炭,合并滤液定容,稀释 20 倍,采用 HPLC 法进行检测,计算吸附量。

$$\text{吸附量} = 1/m(C_0 - C_1) \times V_1 \quad (1)$$

式(1)中, $C_0$ 为吸附前合成反应液中  $\alpha$ -熊果苷的质量浓度,mg/mL; $C_1$ 为吸附后滤液中剩余的  $\alpha$ -熊果苷质量浓度,mg/mL; $m$  为预处理的活性炭质量,g; $V_1$ 为  $\alpha$ -熊果苷合成反应液体积,mL。

将上述吸附饱和的活性炭分别装入分离柱,用 80% 乙醇洗脱 3 个柱床体积 (bed volume, BV,下同),分别收集洗脱液,取样 HPLC 测定  $\alpha$ -熊果苷含

量,计算 80% 乙醇解吸率。

$$\text{解吸率} = C_2 \times V_2 / \text{吸附量} \times 100\% \quad (2)$$

公式(2)中, $C_2$ 为洗脱液中  $\alpha$ -熊果苷质量浓度,mg/mL, $V_2$ 为洗脱体积,mL。

3)洗脱液乙醇体积分数。以 0.5 BV/h 流速将经发酵处理的  $\alpha$ -熊果苷合成反应液,上样至经过预处理的活性炭纤维分离柱(径高比为 1:5)上,控制加入的  $\alpha$ -熊果苷总量不超过活性炭吸附量上限,平行设置 9 份。先用 5 BV 的水洗涤活性炭柱除杂,再分别用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、95% 乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗脱,收集 3 BV 的乙醇洗脱液,旋转真空干燥,残渣用 20% 甲醇溶液溶解并转移至 25 mL 容量瓶中,HPLC 测定  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的量。

4)50% 乙醇洗脱用量。取经发酵处理的  $\alpha$ -熊果苷合成反应液,分别加于经过预处理的活性炭纤维柱(径高比为 1:5),以 0.5 BV/h 的体积流量上样,控制加入的  $\alpha$ -熊果苷总量不超过活性炭吸附量上限;依次用 5 BV 纯水、3 BV 10% 乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗涤活性炭柱除杂,再用 50% 乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗脱,分别收集每个柱体积的 50% 乙醇洗脱液,共收集 8 BV。洗脱液回收乙醇,真空浓缩干燥,残渣用 20% 甲醇溶液溶解并转移至 25 mL 容量瓶中,HPLC 测定  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的量。重复 3 次。

## 1.4 $\alpha$ -熊果苷精制

经过活性炭柱吸附分离的  $\alpha$ -熊果苷粗品,质量分数可达到 80%~85%,通过溶剂萃取、重结晶操作能使  $\alpha$ -熊果苷质量分数达到 95% 以上。在参考文献[9]的基础上,本研究分别考察乙酸乙酯萃取和甲醇-乙酸乙酯混合溶剂结晶这 2 种精制方法的效果。

取  $\alpha$ -熊果苷粗品 1 g,精密定量,平行 2 份。其中 1 份加 5 mL 水溶解,过滤,加乙酸乙酯 80℃ 水浴振摇抽提 4 次(50、50、30、20 mL),合并乙酸乙酯。乙酸乙酯减压浓缩,使析出无色针状结晶。另一份加甲醇 5 mL 溶解,过滤,加入乙酸乙酯,至析出结晶物;结晶物重新溶于适量甲醇,加入乙酸乙酯,至析出无色针状结晶。分别取结晶物 25 mg,精密定量,加 20% 甲醇溶液配制成 0.5 mg/mL 的溶液,HPLC 法测定  $\alpha$ -熊果苷含量。

## 1.5 工艺验证

综合上述试验结果并优化各项工艺参数,对酶

法合成  $\alpha$ -熊果苷分离纯化整个工艺过程进行验证，考察工艺的稳定性，计算产品收率。

1.6 测试方法

$\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的测定,参照文献[10-11]的方法,并略作修改,以实现 HPLC 同时定量测定样品中的  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚。分别精密称取  $\alpha$ -熊果苷、对苯二酚对照品 40.00 mg 和 20.00 mg,以 20% 甲醇溶液溶解于同一个 25 mL 容量瓶中,定容至刻度,即得混合对照品储备液。精密吸取一定量的对照品储备液,用 20% 甲醇溶液稀释到  $\alpha$ -熊果苷质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 mg/mL,对苯二酚质量浓度分别为 0.025、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/mL 的混合对照品溶液,混匀,离心,分别取上清液按色谱条件进样 20  $\mu$ L 测定。色谱条件: Waters C18 柱(5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm); 柱温 30  $^{\circ}$ C; 检测波长为 282 nm; 流速为 1 mL/min; 流动相为乙腈与甲醇的混合液( $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=10:10:80$ )。以进样量为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y),进行线性回归,得到  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的标准曲线及其回归方程。将待测样品配制成 0.1~0.5 mg/mL 的  $\alpha$ -熊果苷或对苯二酚溶液,混匀,离心后,按同样方法检测,将样品的峰面积积分值代入相应回归方程式,得出待测样品的含量。

蔗糖、葡萄糖、果糖、异麦芽酮糖液相检测条件,参照文献[12]。

1.7 数据处理

采用 Excel 进行数据分析,其中方差分析采用 Anova 过程,显著性分析采用 Duncan's 检验,

$P<0.05$ 表示存在显著性差异。

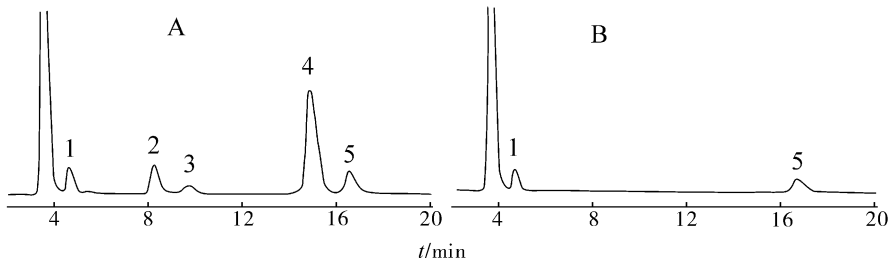
2 结果与分析

2.1 酵母发酵对合成反应液去除糖分杂质的影响

合成反应液经乙醇发酵处理(发酵时间 72 h)前后成分变化结果见表 1,HPLC 示差折光分析图谱见图 1。结果显示:乙醇发酵将可发酵糖(蔗糖、葡萄糖、果糖)转化生成乙醇,而异麦芽酮糖由于不被酵母利用,含量没有变化;酵母对  $\alpha$ -熊果苷不发酵,因此,利用酵母发酵去除  $\alpha$ -熊果苷合成反应液中的可发酵糖杂质成分是可行的。由于合成反应液对苯二酚的质量浓度 $>7.0$  mg/mL,发酵前需要适当稀释,控制对苯二酚质量浓度 $<3.5$  mg/mL,否则过高的对苯二酚质量浓度对酵母生长有一定抑制作用,造成不发酵或发酵过程延长。

表 1 发酵前后合成反应液成分变化

Table 1 Content changes before and after alcoholic fermentation		
成分 Ingredient	发酵前/(mg/mL) Before fermentation	发酵后/(mg/mL) After fermentation
$\alpha$ -熊果苷 $\alpha$ -Arbutin	24.80	24.91
对苯二酚 Hydroquinone	7.76	7.73
蔗糖 Sucrose	198.05	0.00
葡萄糖 Glucose	6.60	0.00
果糖 Fructose	14.27	0.00
异麦芽酮糖 Isomaltulose	17.60	17.71



A. 发酵前; B. 发酵后。1.  $\alpha$ -熊果苷; 2. 果糖; 3. 葡萄糖; 4. 蔗糖; 5. 异麦芽酮糖。A. Before alcoholic fermentation; B. After alcoholic fermentation; 1.  $\alpha$ -Arbutin; 2. Fructose; 3. Glucose; 4. Sucrose; 5. Isomaltulose.

图 1 乙醇发酵前后转化液成分的 HPLC 分析图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of the composition before and after alcoholic fermentation

2.2 活性炭静态吸附量和解吸率

3 种活性炭对  $\alpha$ -熊果苷的吸附量和解吸率如表

2 所示,结果显示,3 种活性炭的 80% 乙醇洗脱率没有显著差异,但相比粉状和颗粒状活性炭,活性炭纤

维对  $\alpha$ -熊果苷的吸附量最大,同时由于活性炭纤维在实际生产上更易于操作,故选择活性炭纤维进行  $\alpha$ -熊果苷的富集分离。

表 2 3 种活性炭对  $\alpha$ -熊果苷的吸附量及解吸率

Table 2 The adsorption capacity and elution rate of three kinds of activated carbon		
种类 Species	吸附量/(mg/g) Adsorption capacity	洗脱率/% Elution rate
粉末活性炭 PAC	28.62	83.8
颗粒活性炭 GAC	17.20	86.0
活性炭纤维 ACF	31.24	85.1

2.3 不同体积分数乙醇洗脱液对  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的洗脱效果

不同体积分数乙醇洗脱液对  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的洗脱效果见图 2。结果显示 10%乙醇洗脱物中未检出  $\alpha$ -熊果苷,20%~30%乙醇洗脱物中  $\alpha$ -熊果苷占上样  $\alpha$ -熊果苷总量的 40%,40%乙醇洗脱物占 80%左右,50%~80%乙醇洗脱物则达到 95%以上。针对主要杂质对苯二酚,50%乙醇洗脱物中对苯二酚占上样对苯二酚总量约 20%,80%乙醇洗脱

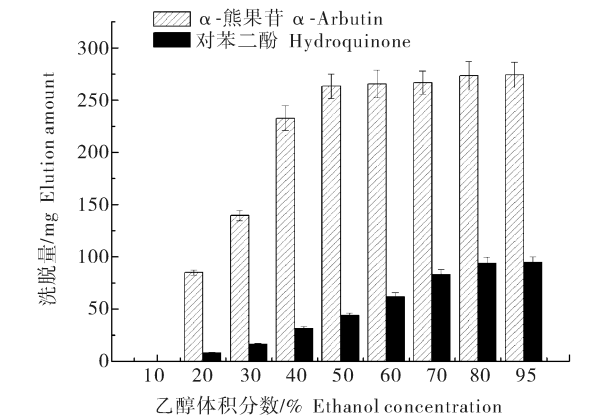


图 2 不同体积分数乙醇洗脱液对  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的洗脱效果

Fig.2 Effects of different concentration of ethanol on contents of  $\alpha$ -arbutin and hydroquinone

物占 98% 以上。据此确定水和 10%乙醇以 1 BV/h 的体积流量洗脱除杂,50%乙醇洗脱收集  $\alpha$ -熊果苷,80%乙醇洗脱回收对苯二酚和活性炭柱再生。

2.4 50%乙醇洗脱用量

50%乙醇洗脱用量对  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的影响见表 3,结果显示,2~4 BV 的 50%乙醇即可洗脱出 90%以上的  $\alpha$ -熊果苷,若洗脱体积达 5 BV 以上,不但加大后续浓缩体积,而且会有更多的对苯二酚杂质被带到洗脱液中。据此确定采用 3 BV 50%乙醇进行洗脱,此用量可以获得较好的洗脱效果。

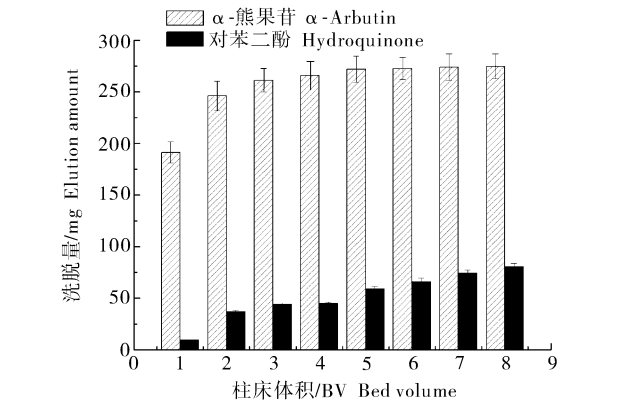


图 3 不同用量 50%乙醇对  $\alpha$ -熊果苷和苯二酚量的影响

Fig.3 Effects of different volumes of 50% ethanol on contents of  $\alpha$ -arbutin and hydroquinone

2.5  $\alpha$ -熊果苷精制方法

采用 2 种不同的  $\alpha$ -熊果苷精制方法获得的结果见表 3。结果显示,通过水饱和乙酸乙酯溶液萃取得到的  $\alpha$ -熊果苷晶体纯度为 99.52%,而通过甲醇-乙酸乙酯混合溶液结晶得到的  $\alpha$ -熊果苷纯度为 99.20%,2 种精制方法所得产品纯度都大于 99%。由于水饱和乙酸乙酯溶液载量偏低,造成  $\alpha$ -熊果苷结晶产量不高,而甲醇-乙酸乙酯混合溶液结晶更利于规模化操作,因此,确定采用这种精制方法用于酶法生产  $\alpha$ -熊果苷纯化分离工艺。

表 3 不同纯化方法对  $\alpha$ -熊果苷量的影响

Table 3 Effects of different methods of purification on contents of $\alpha$ -arbutin			
纯化方法 Methods of purification	称样量/mg Sample mass	$\alpha$ -熊果苷/mg $\alpha$ -Arbutin mass	纯度/% Purity
乙酸乙酯萃取 Ethyl acetate extraction	25.31	25.19	99.52
甲醇-乙酸乙酯结晶 Recrystallization by methanol-ethyl acetate	25.09	24.80	99.20



2.6 工艺验证

综合以上结果,得出酶法合成生产  $\alpha$ -熊果苷的纯化工艺: $\alpha$ -熊果苷合成反应液稀释 3 倍,按体积质量比加入酿酒高活性干酵母 0.05%, 30 ℃ 发酵 72 h;减压浓缩,回收乙醇;浓缩液冷却至室温,以 0.5 BV/h 的体积流量上样至活性炭纤维分离柱,先用 5 BV 水、再用 3 BV 10%乙醇溶液以 1 BV/h 的体积流量通过活性炭分离柱,洗涤除杂,接着用

50%乙醇洗脱,收集 3 BV 洗脱液。洗脱液经蒸馏回收乙醇至无醇味,接着减压浓缩,真空干燥得到  $\alpha$ -熊果苷粗品。粗品加入适量甲醇使其完全溶解,过滤,加入乙酸乙酯,至析出结晶物。结晶物重新溶于适量甲醇,加入乙酸乙酯,至析出无色针状结晶。收集结晶物,真空干燥,粉碎,得到高纯度  $\alpha$ -熊果苷。验证结果见表 4。结果显示: $\alpha$ -熊果苷制备工艺稳定性良好、可重复性强,工艺合理、可行。图 4 为

表 4 验证试验结果

Table 4 Results of verification test					
批号 Batch number	投入量/ L Input	理论产量/g Theoretical total	结晶物/g Crystals	纯度/% Purity	$\alpha$ -熊果苷收率/ % Yield
1	45.6	1 126.32	902.18	99.17	80.1
2	41.0	1 189.00	969.03	99.30	81.5
3	48.3	1 299.27	1 084.89	99.25	83.5



图 4  $\alpha$ -熊果苷结晶

Fig.4 Crystal of  $\alpha$ -arbutin

$\alpha$ -熊果苷结晶产品。

3 讨 论

本研究针对酶法合成  $\alpha$ -熊果苷的产物特点,采用乙醇发酵、活性炭柱吸附分离及重结晶技术相结合对  $\alpha$ -熊果苷纯化分离工艺进行了优化,得到并验证了一种酶法合成  $\alpha$ -熊果苷纯化分离工艺技术方案。该工艺步骤简单、产品含量高、收率稳定,利于规模化生产。

目前涉及  $\alpha$ -熊果苷纯化分离的文献报道不多。贺绍祥等<sup>[13]</sup>采用大孔树脂 S-8 富集分离由米曲霉生物转化的  $\alpha$ -熊果苷,有效去除了糖杂质,得到包

含  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的混合溶液,再经过硅胶柱层析分离,得到纯度 99% 的  $\alpha$ -熊果苷晶体,熊果苷回收率 77%。刘春巧<sup>[14]</sup>采用大孔树脂 AB-8 对由嗜麦芽黄单胞菌 BT-112 菌株发酵法转化得到的  $\alpha$ -熊果苷进行吸附分离,3 BV 30%乙醇洗脱, $\alpha$ -熊果苷纯度和回收率分别为 99% 和 85%。活性炭在食品和制药工业一般只用于脱色处理,而作为分离柱填料用于药物纯化的应用不多,主要原因是其虽然属于广谱性吸附剂,但对多数药物吸附缺少特异性;另一个重要原因是粉末活性炭用于柱层析并不方便,流速慢、易堵塞,需要添加硅藻土等其他填充物以提高分离柱的通过性;而颗粒活性炭吸附率偏低,

一般多用于空气、水的清洁。近年开发的活性炭纤维兼具粉末活性炭和颗粒活性炭的优点,吸附量大、容易操作,在药物纯化分离领域有望得到广泛应用。

参 考 文 献

[1] 刘新民.熊果苷(Arbutin)一种源于绿色植物的皮肤脱色组份[J].北京日化,1996(4):9-15.

[2] MAEDA K,FUKUDA M.Arbutin:mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture[J].J Pharmacol Exp Ther, 1996,276(2):765-769.

[3] FUNAYAMA M,ARAKAWA H,YAMAMOTO R,et al.Effects of alpha and beta arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma[J].Biosci Biotechnol Biochem,1995,59(1): 143.

[4] SUGIMOTO K,NISHIMURA T,NOMURA K,et al.Inhibitory effects of alpha-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model[J].Biol Pharm Bull, 2004,27(4):510-514.

[5] 姚斌,沈晓兰,潘亚菊. $\alpha$ -熊果苷的研究进展[J].中国现代应用药学,2005,22(1):32-33.

[6] KITAO S,SEKINE H. $\alpha$ -D-glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from leuconostoc mesenteroides and production of  $\alpha$ -arbutin[J].Biochem,1994,58(1): 38-42.

[7] ZHOU X,ZHENG Y T,WEI X M,et al.Sucrose isomerase and its mutants from erwinia rhapontici can synthesise alpha-arbutin[J].Protein and peptide letters,2011,18(10):1028-1034.

[8] 张志清,姚艳艳,杨雪飞,等.应用粉末活性炭纯化阿魏酸粗提液的研究[J].食品工业科技,2011,32(12):310-313.

[9] 常开忠.溶剂结晶法分离精制豆甾醇工艺对比[J].贵州化工, 2012,37(3):26-27.

[10] 张海丰,孙健,滕坤.紫景天中熊果苷的含量测定[J].中国药物警戒,2011,8(6):321-323.

[11] 鲁萍,孔黎明,吴俊.高效液相色谱法同时分析水中酚类混合物[J].扬州大学学报(自然科学版),2004,7(4):24-26.

[12] 周兴,韦星明,杨祥开,等.大黄欧文氏菌蔗糖异构酶基因克隆表达及其酶学特性研究[J].工业微生物,2011,41(4):8-15.

[13] 贺绍祥,梁静娟,庞宗文,等.熊果苷分离纯化研究[J].现代食品科技,2007,23(10):66-68.

[14] 刘春巧.发酵法生产  $\alpha$ -熊果苷及其分离纯化[D].北京:北京化工大学,2010.

Technology for separating and purifying  $\alpha$ -arbutin from enzymatic synthesis

YANG Xiangkai CHENG Chunyan OU Na ZHOU Zhipeng  
WEI Xingming XU Liming ZHOU Xing

Biology Institute of Guangxi Academy of Sciences ,Nanning 530007,China

**Abstract** The majority of carbohydrate impurities in the mixture of  $\alpha$ -arbutin enzymatic synthesis reaction were removed with alcoholic fermentation.An activated carbon fiber column was used to enrich  $\alpha$ -arbutin with water and different concentration ethanol elution.The final recrystallization with methanol-ethyl acetate mixed solvent was used to obtain  $\alpha$ -arbutin crystal.The results showed that the 50% ethanol solution elution part had the highest concentration of  $\alpha$ -arbutin.After concentrated by vacuum concentration,this part was recrystallized with methanol-ethyl acetate mixture.Some colorless,needle-like  $\alpha$ -arbutin crystal was obtained.The purity of crystal was over 99%  $\alpha$ -arbutin by HPLC analysis.The established method is useful for industry production with its simplicity,low cost and high purified product.It will provide reliable parameters for the massive industry production.

**Keywords** enzymatic synthesis;  $\alpha$ -arbutin; activated carbon; HPLC; recrystallization

(责任编辑:张志钰)