

吴鸣建, 李国富, 崔 鹏, 等. HP20 大孔树脂分离纯化苦皮藤种素 C 最佳工艺[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 246–248.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.080

HP20 大孔树脂分离纯化苦皮藤种素 C 最佳工艺

吴鸣建¹, 李国富¹, 崔 鹏¹, 张海艳², 沈国鹏¹, 黄 强¹, 赵天增²

(1. 郑州大学化工与能源学院, 河南郑州 450001; 2. 河南省科学院天然产物重点实验室, 河南郑州 450002)

摘要: 对大孔树脂纯化苦皮藤(*Celastrus angulatus*)种素 C 的最佳工艺进行了研究。比较了大孔吸附树脂 HP20、AB-8、SP825、D101 对苦皮藤种素 C 的吸附率、解吸率, 选择性能较好的 HP20 树脂进行研究。以苦皮藤种素 C 的含量、浸膏得率为指标, 考察了上样量、洗脱剂浓度、洗脱剂用量等因素对 HP20 大孔吸附树脂分离纯化苦皮藤种素 C 效果的影响, 确定了较优工艺参数。优化工艺为: 按 HP20 树脂与药材质量比为 1:3.0 上样, 用 40 倍柱体积的 40% 乙醇、90 倍柱体积的 60% 乙醇依次洗脱。纯化后, 样品中苦皮藤种素 C 含量提高 7 倍多。此方法简单可行, 能较好地纯化苦皮藤种素 C。

关键词: 苦皮藤种素 C; HP20 大孔树脂; 纯化; HPLC

中图分类号: O657.7⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0246-02

苦皮藤(*Celastrus angulatus*)为卫矛科南蛇藤属植物, 别称苦树皮、马断肠等, 广泛分布于陕西省、河南省、湖北省等地^[1]。苦皮藤的根、茎、叶、果实、种子是天然的杀虫剂, 同时也是重要的中药资源, 民间用其根皮、茎皮、树叶防治蔬菜及各种作物虫害已有相当长的历史^[2]。研究表明, 苦皮藤种子中所含的主要杀虫活性成分为 4-H- β -二氢沉香呋喃多元醇酯类化合物, 其中苦皮藤种素 C(angulateoid C)是杀虫活性成分之一^[3-4], 其结构如图 1 所示。

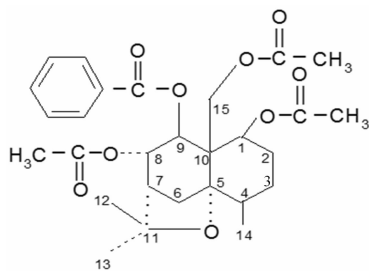


图1 苦皮藤种素C的结构

苦皮藤种油对黄守瓜、菜粉蝶等多种害虫具有拒食作用, 对赤拟谷盗等储粮害虫有较强的忌避作用, 对玉米象有明显的致死、杀卵作用。大孔吸附树脂的比表面积较大, 吸附性能良好, 经不同极性的洗脱剂洗脱可以达到分离纯化化合物的目的, 具有设备简单、操作方便、易于再生、产品纯度高等优点, 特别适合天然产物的分离纯化^[5-8]。本研究采用大孔树脂法分离纯化苦皮藤种素 C, 旨在为开发利用苦皮藤资源提供依据。

1 材料与与方法

收稿日期: 2014-05-05

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究项目(编号: 2011A530007);

河南省科技厅重大科技攻关项目(编号: 112101310600)。

作者简介: 吴鸣建(1957—), 女, 河南郑州人, 博士, 教授, 研究方向为有机与天然产物化学。E-mail: wumj@zzu.edu.cn。

1.1 主要仪器与材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津制作所); Sunfire C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 0.5 μm); CP214 型分析天平(奥豪斯仪器上海有限公司); SHA-C 型水浴恒温振荡器(常州冠军仪器制造有限公司); HP20 型大孔树脂、SP825 型大孔树脂均购自日本三菱化学公司; AB-8 型大孔树脂、D101 型大孔树脂均购自天津市光复精细化工研究所; 甲醇, 色谱纯(天津市四友精细化学品有限公司); 乙醇, 医用纯(新乡市三伟消毒制剂有限公司)。苦皮藤种素 C 标准品(笔者所在实验室自制); 苦皮藤种子采自湖北省恩施土家族苗族自治州, 经河南农业大学朱长山教授鉴定。

1.2 方法

1.2.1 HPLC 色谱条件 采用高效液相色谱法检测苦皮藤种素 C 含量, 色谱流动相: 甲醇-水(80:20); 检测波长: 232 nm; 柱温: 25 °C; 流速: 2.0 mL/min; 进样量: 10 μL。

1.2.2 标准品溶液的制备 精密称取苦皮藤种素 C 标准品 10.0 mg, 用甲醇定容至 50 mL, 摇匀后得苦皮藤种素 C 标准品溶液。

1.2.3 标准曲线绘制 精密量取上述标准品溶液 0.05、0.50、1.00、2.50、5.00 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度。分别取以上溶液及标准品溶液 10 μL 注入液相色谱仪中, 在波长 232 nm 处测定峰面积。以溶液浓度为横坐标(x), 峰面积为纵坐标(y)进行线性回归, 得回归方程: $y = 12\,377x - 5\,305.5$, $r = 0.999\,9$, 线性范围为 1~200 μg/mL, 检出限为 0.5 μg/mL($S/N = 3$), 平均加样回收率为 105.8%, RSD 为 1.31%。

1.2.4 上样液制备 称取苦皮藤种子 2 500 g, 粉碎, 于 80 °C 水浴中以石油醚为溶剂回流提取 3 次, 3 次所加石油醚的体积分别是种子质量的 3、2、2 倍, 抽滤、合并滤液, 60 °C 下减压浓缩, 除去溶剂得苦皮藤种油 834.5 g。

2 结果与分析

以苦皮藤种素 C 的含量、浸膏得率为指标, 对大孔树脂

分离纯化苦皮藤种素 C 的工艺条件进行优化。考察上样量、洗脱剂浓度、洗脱剂用量等因素对 HP20 大孔吸附树脂分离纯化苦皮藤种素 C 效果的影响。

2.1 大孔树脂型号的选择

取 6.0 g 上样液,用甲醇定容至 100 mL,HPLC 分析苦皮藤种素 C 的浓度。取预处理过的 HP20、AB-8、SP825、D101 树脂各 5.0 g 置于锥形瓶中,各加入 6.0 g 上样液,在 20 ℃ 恒温振荡器中充分振荡,吸附平衡后,过滤、减压蒸干,用甲醇定容至 100 mL,HPLC 分析苦皮藤种素 C 浓度。在达到吸附平衡的树脂中加入 50 mL 95% 乙醇,在 20 ℃ 恒温振荡器中充分振荡,进行解吸。达到解吸平衡后,过滤,用 30 mL 95% 乙醇洗涤,合并洗涤液、滤液,减压蒸干,用甲醇定容至 100 mL,HPLC 分析苦皮藤种素 C 浓度,结果见表 1。吸附率(q)及解吸率(E)计算公式如下:

$$q = (C_0 - C_1) / C_0; \tag{1}$$

$$E = C_2 / (C_0 - C_1)。 \tag{2}$$

式中: C_0 、 C_1 、 C_2 分别为吸附前、吸附后、解吸后苦皮藤种素 C 的浓度。

表 1 不同型号大孔树脂吸附率及解吸率

树脂型号	吸附率(%)	解吸率(%)
D101	79.73	64.96
AB-8	85.12	59.23
HP20	92.52	75.67
SP825	90.26	69.88

结果表明,HP20 型大孔吸附树脂对苦皮藤种素 C 具有较好的吸附作用且容易被洗脱,故选用 HP20 型大孔树脂进行研究。

2.2 最佳上样量

取 4 份预处理好的 HP20 型大孔树脂各 50.0 g 装柱,分别按树脂与药材质量比为 1:1.8、1:3.0、1:4.2、1:5.4 比例上样。在洗脱速度相同的条件下,先用 40 倍柱体积 40% 乙醇洗脱,除去部分杂质,再用 90 倍柱体积 60% 乙醇洗脱,并将 60% 乙醇洗脱液减压蒸干,HPLC 分析苦皮藤种素 C 含量。以苦皮藤种素 C 含量、浸膏得率为考察指标,确定最佳上样量,结果见表 2。

表 2 不同上样量对应的浸膏得率、苦皮藤种素 C 的含量

树脂:药材 质量比	浸膏得率 (%)	苦皮藤种素 C 含量(%)	苦皮藤种素 C 回收率(%)
1:1.8	2.86	18.20	0.52
1:3.0	3.79	16.69	0.63
1:4.2	2.81	11.31	0.32
1:5.4	2.51	9.72	0.24

结果表明,随着上样量的增加,浸膏中苦皮藤种素 C 含量逐渐降低。当树脂与药材质量比为 1:3.0 时,浸膏得率最高,故树脂与药材质量比 1:3.0 为最佳上样量。

2.3 洗脱剂浓度选择

取 4 份处理好的 HP20 大孔树脂各 50.0 g 装柱,均按树脂与药材质量比为 1:3.0 上样。在洗脱速度相同的条件下,各柱先用 40 倍柱体积 40% 的乙醇洗脱,除去部分杂质,再分别用 90 倍柱体积 50%、60%、70%、80% 的乙醇洗脱,分别收集上述各浓度的洗脱流份并减压蒸干,HPLC 分析其中苦皮

藤种素 C 的含量。以苦皮藤种素 C 的含量、浸膏得率为考察指标,确定洗脱剂的浓度(表 3)。

表 3 不同浓度洗脱剂对应的浸膏得率、苦皮藤种素 C 的含量

洗脱剂浓度 (%)	浸膏得率 (%)	苦皮藤种素 C 含量(%)	苦皮藤种素 C 回收率(%)
50	2.11	13.45	0.28
60	3.98	15.87	0.63
70	4.81	13.44	0.65
80	5.60	12.85	0.72

结果表明,虽然用 70%、80% 乙醇洗脱浸膏得率比 60% 乙醇高,但采用 60% 的乙醇洗脱时,苦皮藤种素 C 含量较高,综合考虑苦皮藤种素 C 的含量、浸膏得率,选用 60% 乙醇作为洗脱溶剂。

2.4 洗脱剂用量

取 4 份预处理好的 HP20 大孔树脂各 50.0 g 装柱,均按树脂与药材质量比为 1:3.0 上样。在洗脱速度相同的条件下,先用 40 倍柱体积 40% 乙醇洗脱,除去部分杂质。各柱再分别用 70、80、90、100 倍柱体积 60% 乙醇溶液洗脱,分别将各柱 60% 洗脱液减压蒸干,HPLC 分析其中苦皮藤种素 C 含量。以苦皮藤种素 C 的含量、浸膏得率为考察指标,确定洗脱剂的最佳用量(表 4)。

表 4 不同用量洗脱剂对应的浸膏得率、苦皮藤种素 C 含量

洗脱剂用量	浸膏得率 (%)	苦皮藤种素 C 含量(%)	苦皮藤种素 C 回收率(%)
70 倍柱体积	3.50	13.61	0.48
80 倍柱体积	3.71	15.26	0.57
90 倍柱体积	3.90	16.77	0.65
100 倍柱体积	4.49	14.84	0.67

结果表明,当洗脱剂用量为 90 倍柱体积时,浸膏中苦皮藤种素 C 含量最高,因此确定洗脱剂最佳用量为 90 倍柱体积。

2.5 富集纯化程度

上样液按照最佳工艺经过 HP20 大孔树脂柱,并将 60% 的乙醇洗脱液减压蒸干,HPLC 分析上样液及浸膏中苦皮藤种素 C 的含量,结果见表 5。结果表明,上样液经 HP20 大孔树脂柱分离后,苦皮藤种素 C 含量由 2.14% 升高到 16.44%。

表 5 HP20 大孔树脂富集纯化苦皮藤种素 C 程度

样品	苦皮藤种素 C 含量(%)
上样液	2.14
浸膏	16.44

3 结论与讨论

本研究表明,HP20 大孔树脂分离纯化苦皮藤种素 C 的最佳工艺为:按树脂与药材质量比为 1:3.0 上样,先用 40 倍柱体积 40% 的乙醇洗脱,再用 90 倍柱体积 60% 的乙醇洗脱。苦皮藤种素 C 为苦皮藤种子的主要活性成分,因此分离纯化苦皮藤种子中的苦皮藤种素 C 具有重要意义。采用 HP20 大孔树脂分离纯化苦皮藤种素 C 方法简单可行,能较好地纯化苦皮藤种素 C,可作为工业上富集纯化苦皮藤种素 C 的一种方法。

孙成贺,曲正义,张 瑞,等. 西洋参果脱色方法比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):248-250.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.081

西洋参果脱色方法比较

孙成贺,曲正义,张 瑞,姚春林,王英平

(中国农业科学院特产研究所,吉林长春 130112)

摘要:对比研究活性炭、氧化镁、氢氧化钙、大孔树脂 AB-8、D301R、D280、D900、HP-20、脱色一号等脱色剂,以期从中筛选出适合西洋参果的最佳脱色剂。采用高效液相色谱法测定西洋参果中人参皂苷 Re,用紫外-可见分光光度法检测西洋参果溶液的吸光度,检测波长 540 nm,分别计算人参皂苷的保留率、样品脱色率。结果表明,按树脂:西洋参果液质量比 1:4 计算,D301R 型阴离子大孔树脂脱色率为 93.5%,人参皂苷 Re 的保留率为 86.3%,表明脱色效果优于其他脱色剂,具有较高的皂苷保留率,认为 D301R 型阴离子大孔树脂非常适用于西洋参果溶液脱色。

关键词:西洋参果;人参皂苷;色素;脱色;大孔树脂

中图分类号:S567.5+30.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)03-0248-03

西洋参果为西洋参(*Panax quinquefolium* L.)的成熟果实,在 8—9 月果实为鲜红色。人参皂苷是其主要化学成分,西洋参果总皂苷含量为 9.05%,果中皂苷含量远高于主侧根部位含量^[1],具有很高的开发价值。植物色素广泛分布于植物根、茎、叶、花、果实中,根据极性不同可分为脂溶性色素和水溶性色素,脂溶性色素有叶绿素、叶黄素、胡萝卜素等,水溶性色素有花青素^[2]。在植物提取物生产过程中,脱色处理为非常重要的一步,否则将严重影响产品的外观和质量,需要采用物理化学方法去除色素,如蔗糖磷酸钙法脱色等^[3]。目前除色素的方法主要有吸附法、化学方法、大孔树脂吸附法,其中吸附法脱色剂有很多种,如活性白土、凹凸棒土、活性炭、沸石等,其中最常用的是活性炭脱色^[4];化学脱色的原理是利用氧化还原反应,在酸性或碱性介质中通过亲电作用和亲核作用破坏发色基团^[5]。大孔树脂为人工合成的具有多空隙结构的聚合物,广泛应用于植物中皂苷、黄酮、生物碱的提取,以及天然色素提取和植物产品脱色素工艺中,依据其连接基团极性的不同,可以分为离子交换树脂和大孔吸附树脂,离子

交换树脂又可分为阴离子型离子交换树脂、阳离子型离子交换树脂。本试验对几种脱色方法的不同吸附材料进行比较,以期从中筛选出更适合西洋参果脱色处理的吸附剂。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验仪器 液相色谱仪,日本岛津 10AvP;LC-10AtvP 型液相色谱泵;SIL-10AdvP 型自动进样器;CTO-AvP 型色谱柱恒温箱;CLASS-vP 色谱工作站;紫外-可见分光光度计,日本岛津 UV2450;UVprob 工作站;电子天平,上海英展机电有限公司;调速多用振荡器,国华 HY-2;旋转蒸发器,上海申生 R2003KE。

1.1.2 试验试剂 盐酸、氢氧化钠、甲醇、氧化镁、氢氧化钙,分析纯;乙腈,色谱纯;超纯水。

1.1.3 试验材料 西洋参果购于长春市乐山西洋参生产基地,经中国农业科学院特产研究所姚春林老师现场鉴定,为西洋参(*Panax quinquefolium* L.)果实。

人参皂苷 Re,中国药品生物制品检定所(批号:110754-201123);阴离子树脂 D301R,天津市光复精细化工研究所;阴离子树脂 D280,南开大学化学厂;树脂 AB-8、001×7、D900、脱色一号(其中 001×7 为阳离子大孔树脂,D009、脱色一号为阴离子大孔树脂),沧州市宝恩科技有限公司;HP-20,国产;活性炭,天津市天达精细化工厂。

鉴定[J]. 科学通报,1990(15):1156-1158.

[5]徐 耀.不同型号大孔吸附树脂对草珊瑚黄酮的富集作用[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):262-265.

[6]张 旭,王锦玉,仝 燕,等.大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):286-290.

[7]孙 健,岳瑞雪,钮福祥,等.紫甘薯花青素的大孔树脂动态吸附工艺优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):227-229.

[8]李 华,赵振贵,李 丹,等.大孔树脂对大豆异黄酮的吸附性能研究[J]. 郑州大学学报:工学版,2011,32(2):19-22.

收稿日期:2014-04-14

基金项目:吉林省吉林市科技计划(编号:2013222005)。

作者简介:孙成贺(1973—),男,吉林永吉人,硕士,副研究员,主要从事中药材质量评价工作。E-mail:sch1973@126.com。

通信作者:王英平,博士,研究员,主要从事道地中药材资源的开发利用。E-mail:yingpingw@126.com。

参考文献:

[1]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 45 卷第 3 分册[M]. 北京:科学出版社,1999:102.

[2]柯治国,南玉生,卢令娴.植源昆虫拒食剂苦皮藤的研究进展[J]. 武汉植物学研究,1993,11(3):265-271.

[3]Cheng C Q,Wu D G,Liu J K. Angulatueoids A-D, four sesquiterpenes from the seeds of celastus angulatus [J]. Phytochemistry, 1992,31(8):2777-2780.

[4]王国亮,南 蓬,龚复俊,等. 新倍半萜酯——苦皮藤酯 1 的结构