

吴 琴, 丁 杰. 大孔树脂联合硅胶柱纯化核桃枝中胡桃醌的条件[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 200–203.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.048

大孔树脂联合硅胶柱纯化核桃枝中胡桃醌的条件

吴 琴, 丁 杰

(四川理工学院化学工程学院, 四川自贡 643000)

摘要:在单因素试验基础上, 优化核桃枝中胡桃醌的纯化条件, 为核桃枝中胡桃醌的研究和利用提供参考依据。通过静态吸附、解吸试验对 6 种大孔树脂进行筛选, 并优化树脂柱-硅胶柱联合纯化的最佳条件, 采用 HPLC 对胡桃醌的含量进行分析。结果表明, HPD-100 型大孔树脂纯化效果最好, 最佳工艺条件为: 上样浓度 36.07 mg/L, 上样流速 1.5 mL/min, 上样量为 50 mL; 解吸剂浓度 80% 乙醇, 解吸速率 2.5 mL/min, 解吸液体积 150 mL。此方法不仅对胡桃醌的纯化效果较好, 且简单易行。

关键词:核桃枝; 大孔树脂; 硅胶柱; 胡桃醌; 纯化

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0200-04

核桃, 又名胡桃, 胡桃科属, 《本草纲目》中记载到, 核桃除果仁可以食用外, 其青皮、枝皮、壳等部位都可作药用^[1]。胡桃醌, 又名核桃醌, 是一种存在于核桃枝皮、核桃青果皮等部位的活性物质, 具有抗肿瘤^[2]、抗癌^[3]、抑菌^[4]、杀虫^[5]等多种生物活性。近年来, 关于核桃中胡桃醌的研究报道较多, 主要集中在对核桃壳、青果皮等部位的研究。郭瑜等采用超声波辅助提取结合响应面法分析核桃壳中的胡桃醌, 得到最佳提取条件为: 温度 45 ℃, 时间 1.4 h, 超声功率 250 W, 料液比 1 g : 24 mL, 在此条件下核桃壳中胡桃醌的提取率为 8.150 3%^[6]。冯迟等以青果皮为原料, 通过单因素试验优选出胡桃醌的最佳提取工艺, 其提取率可达 1.72 mg/g^[7]。马乐等采用 D101 大孔树脂来纯化核桃青皮中的胡桃醌, 利用 HPLC 鉴定和分析纯度, 结果表明, D101 大孔树脂对胡桃醌具有较好的分离纯化效果^[8]。而许绍慧等通过对核桃枝皮中化学成分的研究, 发现胡桃醌在其中的含量相对较高, 达到 1 g : (2.5~50.4) kg(鲜质量)^[9]。为更好利用核桃枝皮资源, 提高胡桃醌的药用和经济价值, 本研究以核桃枝为原料, 拟采用大孔树脂联合硅胶柱对胡桃醌进行富集纯化, 通过单因素试验优选纯化胡桃醌的工艺条件, 对综合利用和合理开发核桃枝具有指导意义。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

核桃枝采自四川省内江市资中县; 胡桃醌对照品, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; D101、HPD-300、HPD-100、HPD-600、NKA-9、DM301 大孔树脂, 北京英莱克科技发展有限公司; 95% 乙醇、乙酸乙酯、甲醇(分析纯)等试剂均购自

成都市科龙化工试剂厂。

1.2 仪器与设备

玻璃柱(2.6 cm × 30.5 cm、1.7 cm × 30.5 cm), 北京欣维尔; OSB-2100 旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; KQ-300E 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 恒温培养摇床, 武汉瑞华仪器设备有限公司; UV-1800PC 紫外可见分光光度计, 翱艺仪器(上海)有限公司; CP114 电子分析天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司; LC3000 型高效液相色谱仪, 创新通恒科技有限公司; 色谱柱: Welchrom C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

1.3 胡桃醌标准曲线的建立

1.3.1 紫外-可见光度法 精确称取胡桃醌标准品 11.1 mg, 甲醇溶解后, 定容至 25.0 mL 容量瓶中作为母液, 再分别配制 0.177 6、1.776 0、10.660 0、22.200 0、26.640 0、44.400 0 mg/L 的不同浓度标准液, 在 420 nm 波长下测吸光度, 以浓度-吸光度作标准曲线, 得线性回归方程为 $y = 0.0156x - 0.0007$ ($r^2 = 0.9992$)。表明胡桃醌浓度在 0.177 6~44.400 mg/L 范围内具有良好的线性关系, 标准曲线见图 1。

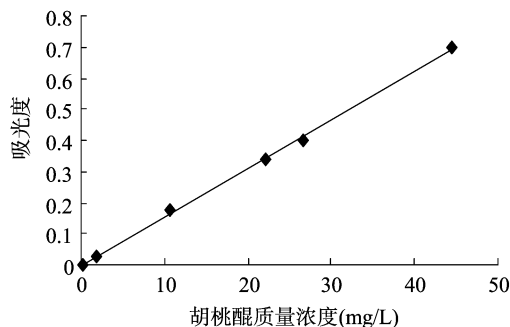


图1 胡桃醌标准曲线

1.3.2 HPLC 法 取“1.3.1”节下母液配制浓度为 9.440、28.320、47.200、61.360、75.520 mg/L 的标准液, 按照流动相: 甲醇: 水 = 70 : 30 (体积比) (色谱柱: Welchrom C₁₈ 柱, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 洗脱速度: 1.0 mL/min; 柱温:

收稿日期: 2017-07-30

基金项目: 四川省教育厅项目(编号: 3ZB0133); 四川省自贡市科技局重点项目(编号: 2011G045)。

作者简介: 吴 琴(1991—), 女, 四川南充人, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学方面的研究。E-mail: 1534116332@qq.com。

通信作者: 丁 杰, 教授, 主要从事催化技术及其应用、天然产物分离及活性方面的研究。E-mail: dingjie@suse.edu.cn。

30 ℃;进样量:10 μL;检测波长:250 nm 进样测定,以测得的峰面积-浓度作标准曲线,得线性回归方程为: $y = 25\,042x + 195\,771$ ($r^2 = 0.999\,2$)。表明胡桃醌浓度在 9.440 ~ 75.520 mg/L 的浓度范围内线性关系良好,标准曲线见图 2。

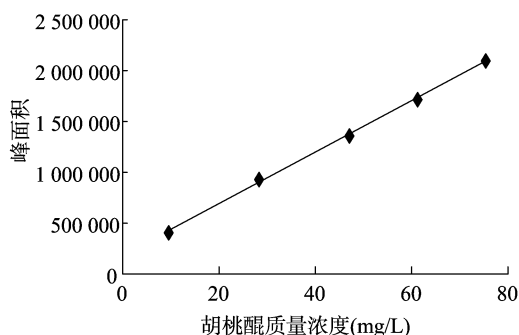


图2 胡桃醌 HPLC 标准曲线

1.4 样品液制备

传统的胡桃醌提取中用到的提取剂主要是乙醇水溶液、甲醇水溶液或纯的乙醇、甲醇、丙酮等单一溶剂,它们的极性都非常接近或很大,因此,作为提取剂时,所得的粗提取物中杂质成分多且与目标物极性相似,使得胡桃醌后期的分离纯化难度增加。故而通过使用混合溶剂来改变提取剂体系的极性,从而得到易于纯化的粗提取物。

选用实验室常用的二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚与 95% 乙醇配比作为提取剂提取胡桃醌,再与单一的 95% 乙醇、甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷做为提取剂进行对比,结果乙酸乙酯-95% 乙醇(体积比 1:1)对胡桃醌的提取效果最佳,因此选择乙酸乙酯-95% 乙醇(体积比 1:1)为制备样品液的提取溶剂。样品液制备步骤如下:

称取 200.0 g 核桃枝粉末,以 5 000 mL 乙酸乙酯-95% 乙醇(体积比 1:1)为溶剂,在 35 ℃ 下超声提取 2 次,每次 45 min,合并滤液,在 35 ℃ 下减压蒸馏除去溶剂,浓缩为浸膏备用。

1.5 大孔树脂预处理

新购买的大孔树脂内孔里面通常会有气泡或残留部分有机物和惰性溶剂,为防止在使用时有害物对树脂造成污染和产生过多的气泡,在使用前必须经过预处理。参照刘宛玲等人的方法^[10],先用 95% 乙醇浸泡大孔树脂 24 h 以除去脂溶性杂质,水洗至无醇味,再以 5% NaOH 溶液和 5% HCl 溶液分别浸泡 3 h 对树脂进行活化,水洗至中性,水封备用。

1.6 大孔树脂选择

1.6.1 静态吸附试验 取处理好的 6 种不同型号的大孔树脂,过滤,分别称取 3.0 g 置于 6 个相同型号的锥形瓶中,同时加入浓度为 29.47 mg/L 的胡桃醌标准品甲醇溶液 20.0 mL,密封,置于摇床(28 ℃,150 r/min)上振摇 3 h,取上清液在紫外分光光度计下测吸光度,计算吸附率^[11]。计算公式如下:

$$E = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%。$$

式中: E 为吸附率(%); C_0 、 C_1 为吸附前后药液中胡桃醌的质量浓度(mg/L)。

1.6.2 静态解吸试验 将吸附后的树脂过滤,并用蒸馏水清

洗 2 遍,再分别放入 6 个相同型号的锥形瓶中,加入 20.0 mL 95% 乙醇在相同条件的摇床上振摇解吸 3 h,取上清液在紫外分光光度计下测吸光度,计算解吸率。

$$D = \frac{C_2 V_2}{(C_0 - C_1) V_1} \times 100\%。$$

式中: D 为解吸率(%); C_2 为解吸后药液中胡桃醌的质量浓度(mg/L); C_0 、 C_1 为吸附前后药液中胡桃醌的质量浓度(mg/L); V_1 为吸附液体积(L); V_2 为解吸液体积(L)。

1.7 HPD-100 大孔树脂纯化胡桃醌的动态吸附与解吸工艺

1.7.1 上样浓度的选择 取适量筛选出的理想树脂,湿法装柱。配制不同质量浓度的上样液(19.21、23.38、27.55、36.07、39.21 mg/L)各 100 mL,以 1.0 mL/min 的流速上柱吸附,收集流出液,浓缩,紫外分光光度计下测吸光度,计算吸附率。

1.7.2 上样流速的选择 取适量筛选出的理想树脂,湿法装柱。配制 500.0 mL 浓度为 36.07 mg/L 的上样液,分别取 100.0 mL 以不同流速(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min)上柱吸附,收集流出液,浓缩,紫外分光光度计下测吸光度,计算吸附率。

1.7.3 上样量的选择 取适量筛选出的理想树脂,湿法装柱。配制浓度为 36.07 mg/L 的上样液,以 1.5 mL/min 的速度上柱吸附,流出液每 10 mL 收集 1 份,浓缩,紫外分光光度计下测吸光度,计算胡桃醌质量浓度,绘制泄露曲线。

1.7.4 洗脱剂的选择 取适量筛选出的理想树脂,湿法装柱。按最佳吸附条件进行上样,以 1 BV 蒸馏水洗脱除杂,取甲醇、95% 乙醇溶液各 100.0 mL,以 1.0 mL/min 的速度进行洗脱,收集洗脱液,浓缩,甲醇定容,紫外分光光度计下测吸光度,计算解吸率。

1.7.5 洗脱剂体积分数的选择 取适量筛选出的理想树脂,湿法装柱。按最佳吸附条件进行上样,以 1 BV 蒸馏水洗脱除杂,分别用 20%、40%、60%、80%、95% 乙醇溶液各 100.0 mL,以 1.0 mL/min 的速度进行洗脱,收集洗脱液,浓缩,甲醇定容,紫外分光光度计下测吸光度,计算解吸率。

1.7.6 洗脱剂流速的选择 取适量筛选出的理想树脂,湿法装柱。按最佳吸附条件进行上样,以 1 BV 蒸馏水洗脱除杂,分别用 80% 乙醇溶液各 100.0 mL 以不同流速(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min)进行洗脱,收集洗脱液,浓缩,甲醇定容,紫外分光光度计下测吸光度,计算解吸率。

1.7.7 洗脱剂用量的选择 取适量筛选出的理想树脂,湿法装柱。按最佳吸附条件进行上样,以 1 BV 蒸馏水洗脱除杂,再用 80% 乙醇溶液以 2.5 mL/min 的速度进行洗脱,每 10 mL 收集 1 份,浓缩,甲醇定容,紫外分光光度计下测吸光度,计算胡桃醌质量浓度,绘制洗脱曲线。

1.8 大孔树脂与硅胶柱联合纯化方法

取样品 150.0 mg 溶解于甲醇中,按最佳吸附条件上样,最佳解吸条件洗脱,收集洗脱液,在 35℃ 条件下减压浓缩。向浓缩液中加入硅胶拌样使样品吸附在硅胶上,并烘干呈粉末状,干法上样,以石油醚和二氯甲烷(体积比 1:0,1 BV;体积比 2:1,3 BV;体积比 1:1,3 BV;体积比 1:2,3 BV;体积比 0:1,3 BV)进行洗脱,每 10 mL 收集 1 份,通过薄层检验,

与标准品进行对照,合并含胡桃醌的组分,旋干称质量。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂选择结果

从表 1 可以看出,6 种大孔树脂对胡桃醌的吸附效果依次为 HPD-300 > HPD-100 > D101 > NKA-9 > DM301 > HPD-600,解吸效果依次为 DM301 > HPD-600 > HPD-100 > D101 > NKA-9 > HPD-300,结果表明,大孔树脂对胡桃醌的吸附和解吸选择性差异较大,综合考虑选择 HPD-100 为此次试验的最佳树脂。

表 1 6 种大孔树脂静态吸附和解吸结果

树脂类型	树脂结构	极性	吸附率 (%)	解吸率 (%)
D101	苯乙烯	非极性	45.46	78.81
HPD-300	聚苯乙烯	非极性	47.60	66.07
HPD-100	苯乙烯	非极性	45.70	79.85
HPD-600	苯乙烯	非极性	29.80	88.83
NKA-9	聚苯乙烯	极性	43.90	74.60
DM301	苯乙烯	中极性	42.00	92.59

2.2 动态吸附与解吸工艺

2.2.1 上样浓度的选择 从图 3 可以看出,胡桃醌吸附率随着上样浓度的增加先升高后降低,可能是因为浓度在低于 36.07 mg/L 时,单位表面积内树脂与胡桃醌接触量小,对胡桃醌的吸附未达到饱和状态,而在超过 36.07 mg/L 浓度后,上样液中杂质较多且树脂达到饱和状态使吸附能力减弱,故选择 36.07 mg/L 为最佳上样浓度。

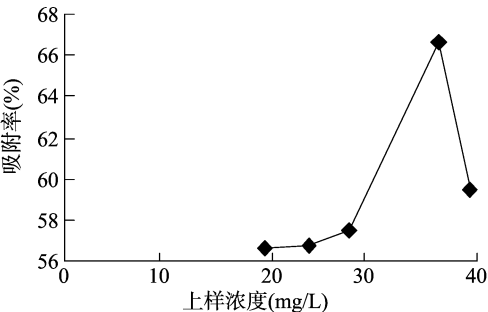


图3 上样浓度对胡桃醌吸附率的影响

2.2.2 上样流速的选择 从图 4 可以看出,吸附率随着上样流速的增加,变化差距不大,在 1.5 mL/min 的流速下吸附率最大,在 2.5 mL/min 后吸附率开始明显降低,可能是因为上样速率过快而使上样液与树脂未充分接触,综合考虑选择 1.5 mL/min 为上样流速。

2.2.3 上样量的选择 从图 5 可以看出,当上样液体积达到 50 mL 时,流出液中胡桃醌的浓度约为初始浓度的 1/10,在 80 mL 时趋于完全泄露的状态,此时树脂已吸附饱和,因而确定最大上样体积为 50 mL。

2.2.4 洗脱剂的选择 从图 6 可以看出,用 95% 乙醇进行洗脱,其解吸效果明显好于甲醇,故而选择 95% 乙醇为最佳洗脱剂。

2.2.5 洗脱剂体积分数选择 胡桃醌是一种易溶于乙醇、甲醇、氯仿等有机溶剂而较难溶于水的萆醌类化合物。从图 7

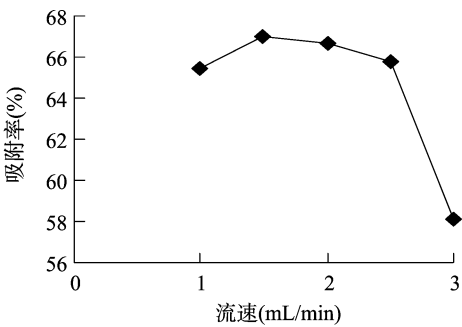


图4 上样流速对胡桃醌吸附率的影响

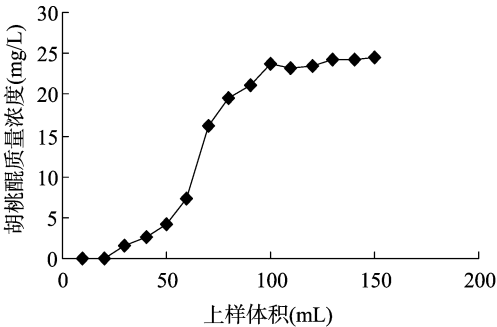


图5 胡桃醌泄露曲线

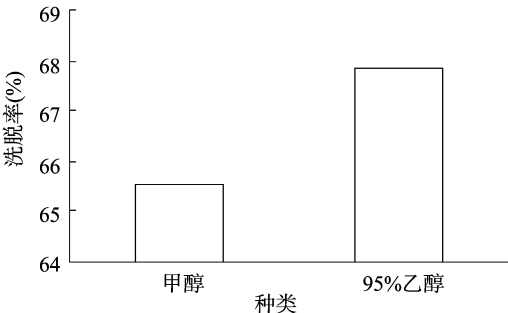


图6 不同洗脱剂对胡桃醌洗脱率的影响

可以看出,当乙醇体积分数越大时,胡桃醌越容易从树脂上解吸下来,而当洗脱剂中乙醇体积分数超过 80% 时其解吸率开始减小,可能是因为 80% 乙醇体积分数适中,与胡桃醌极性相似,在这个体积分数下胡桃醌已大部分被洗脱下来,因而 80% 乙醇洗脱效果最佳。

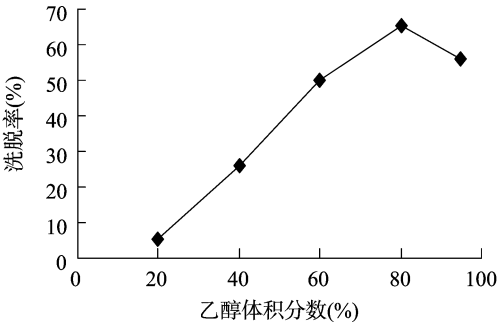


图7 乙醇体积分数对胡桃醌解吸率的影响

2.2.6 洗脱剂流速选择 从图 8 可以看出,以 2.5 mL/min 的洗脱速率进行洗脱效果最佳。因为洗脱速度太慢,可能会

导致洗脱时间较长,而洗脱速度太快,又可能会使洗脱剂与树脂接触时间不够,使胡桃醌洗脱不下来^[12]。

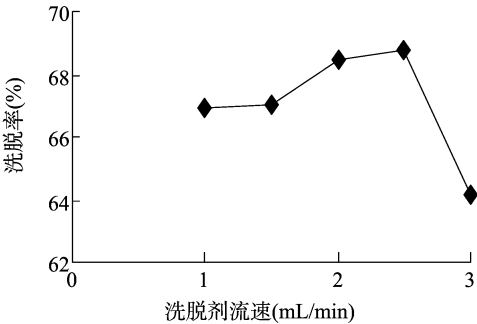


图8 洗脱剂流速对胡桃醌解吸率的影响

2.2.7 洗脱量的选择 从图 9 可以看出,当洗脱剂用量达到 150 mL 时,流出液中胡桃醌的浓度接近 0,故将此点作为洗脱终点。

2.3 纯化后核桃枝中胡桃醌的 HPLC 分析

将纯化前后的胡桃醌及标准品溶解后进行 HPLC 分析,其 HPLC 图谱及纯化前后含量对比见表 2、图 10。

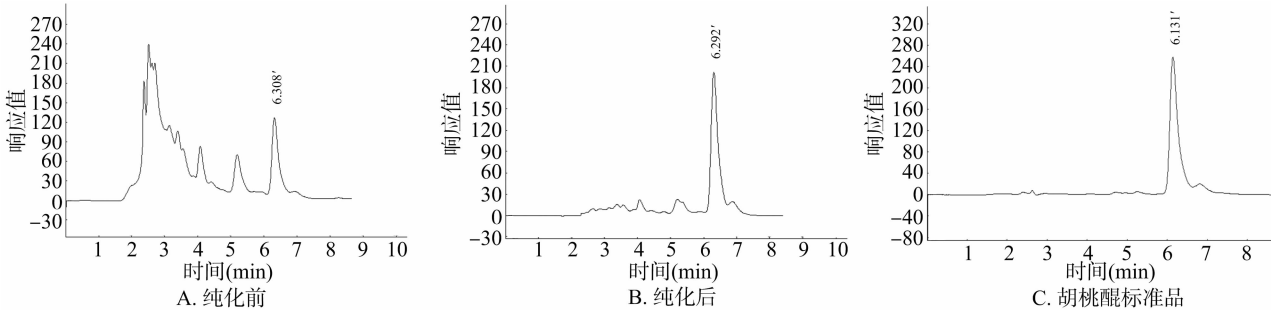


图10 HPD-100 大孔树脂联合硅胶柱纯化前、后的核桃枝提取物及胡桃醌标准品的 HPLC 图谱

3 结论与讨论

大孔树脂是一种选择性好、吸附容量大且相对稳定的聚合物吸附剂,广泛应用于多酚、黄酮、生物碱、醌类等天然产物的分离纯化。本研究结果表明,HPD-100 型大孔树脂纯化胡桃醌的最佳条件参数为:上样浓度 36.07 mg/L,上样流速 1.5 mL/min,上样量为 50 mL;洗脱剂浓度为 80% 乙醇,洗脱速率 2.5 mL/min,洗脱体积 150 mL。联合硅胶柱纯化后,胡桃醌纯度提高了 60%。本试验结果与王炎研究结论^[13]比较,采用联合柱层析法来纯化胡桃醌,同时用 HPLC 来检测胡桃醌纯化前后的含量,客观说明该试验方法的可行性和试验结果的可靠性,且该法成本低廉,可在核桃枝中胡桃醌的纯化研究中进行开发和利用。

参考文献:

[1]侯 栋,高 哲,何童森,等. HPLC 测定核桃青皮中胡桃醌的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):70-72.
[2]曹 军,刘建生. 胡桃醌体外抗胰腺癌细胞机制的初步研究[J]. 中国当代医药,2011,18(10):22.
[3]卢 阳,李 薇,崔久崑,等. 胡桃醌对人结肠癌 HCT-8 细胞黏附及基质金属蛋白酶活性的影响[J]. 吉林大学学报,2012,38

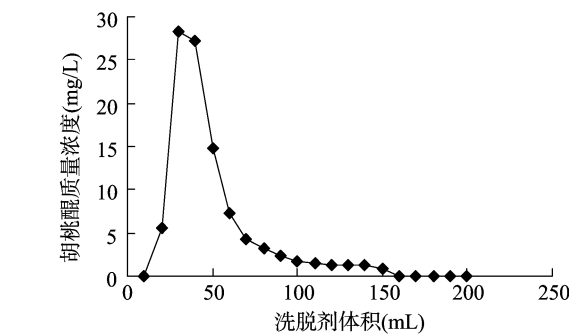


图9 胡桃醌洗脱曲线

从图 10、表 2 可以看出,经过 HPD-100 大孔树脂和硅胶柱联合纯化后的胡桃醌周围杂质峰数目及高度明显减少,纯度提高了 60%,表明此方法对胡桃醌的纯化效果较好。

表 2 胡桃醌纯化前后含量比较

目标物	胡桃醌 (mg/g)
纯化前	3.58
纯化后	218.40

(1):89.
[4]刘 迪. 胡桃醌对大肠杆菌蛋白质表达影响作用的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2016:60.
[5]皮新梅. 青龙衣化学成分及杀虫活性的研究[D]. 北京:北京化工大学,2014:51.
[6]郭 瑜,郝慧娟,王晓闻,等. 核桃壳中胡桃醌提取工艺研究[J]. 食品工业,2014,35(9):58-61.
[7]冯 迟,王舒雅,高 俊,等. 核桃楸青果皮中胡桃醌的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2016,45(5):340-342.
[8]马 乐,张有林,韩军岐,等. 大孔树脂对核桃青皮中胡桃醌的分离纯化[J]. 食品与发酵工业,2016,42(1):108-113.
[9]许绍惠,唐婉屏,韩忠环. 核桃楸毒性成分研究[J]. 沈阳农业大学学报,1986,17(2):34-39.
[10]刘宛玲,肖建辉,黄占旺,等. 大孔树脂分离纯化麦胚黄酮研究[J]. 食品工业科技,2017,38(2):293-296.
[11]刘晓庆,李广林,瞿 亮,等. AB-8 型大孔树脂纯化桦褐孔菌三萜的工艺研究[J]. 食药菌,2017,25(1):40-45.
[12]巫玲丽,张 利. 大孔吸附树脂纯化菜芙蓉黄酮工艺研究[J]. 食品研究与开发,2017,38(2):66-69.
[13]王 炎. 青龙衣胡桃醌类成分富集[J]. 国际药学研究杂志,2017,44(1):60-64.