

大孔树脂纯化核桃隔膜总黄酮的工艺研究

王国军¹, 唐辉^{1*}, 张淑兰^{2*}, 冯荣¹, 王幻¹, 关丽², 刘怡娟¹

1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000

2. 新疆生产建设兵团医院 药剂科, 新疆 乌鲁木齐 830002

摘要: 目的 研究核桃隔膜总黄酮的大孔树脂纯化工艺。方法 通过对12种不同型号大孔树脂进行静态吸附与解吸实验, 优选适宜的大孔树脂, 并优化分离纯化条件。结果 AB-8型大孔树脂对核桃隔膜总黄酮有较好的吸附和洗脱效果, 其最佳分离纯化条件为pH 4.70, 0.713 5 mg/mL的质量浓度上样, 树脂的上样量为4 mL/g, 上样体积流量为1.5 BV/h, 依次用2 BV水洗脱, 2.5 BV 50%乙醇洗脱。经AB-8树脂处理后的总黄酮质量分数达72.25%, 收率为93.94%。结论 AB-8型大孔树脂用于富集核桃隔膜总黄酮效果最佳, 是一种理想的分离纯化介质。

关键词: 核桃隔膜; 总黄酮; 大孔树脂; 纯化工艺; 吸附动力学特性

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)19-2688-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.011

Purification of total flavonoids from diaphragm of *Juglans regia* by macroporous resin

WANG Guo-jun¹, TANG Hui¹, ZHANG Shu-lan², FENG Rong¹, WANG Huan¹, GUAN Li², LIU Yi-juan¹

1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China

2. Department of Pharmacy, Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi 830002, China

Abstract: Objective To investigate the purification technology of total flavonoids from the diaphragm of *Juglans regia* by macroporous resin. **Methods** Twelve macroporous resins were chosen with static and dynamic adsorption and desorption experiments to optimize the purification parameters. **Results** AB-8 macroporous resin was found to have good adsorption and desorption effects. The optimal purification conditions were pH value of 4.70, sample mass concentration of 0.713 5 mg/mL, the loaded amount of 4 mL/g, and loading flow rate of 1.5 BV/h. The sample was eluted by water with 2 BV and 50% ethanol of 2.5 BV, respectively. The purity of total flavonoids increased to 72.25% after the purification, and the yield was 93.94%. **Conclusion** AB-8 is an ideal resin with the best enrichment for separating and purifying the total flavonoids from diaphragm of *J. regia*.

Key words: diaphragm of *Juglans regia*; total flavonoids; macroporous resin; purification technology; adsorption kinetics characteristics

核桃隔膜 (diaphragm of *Juglans regia* L.) 又名分心木, 为胡桃科胡桃属植物核桃内果皮的种隔, 系新疆维吾尔民间用药, 用于治疗肾虚遗精、阳痿早泄等泌尿系统疾病^[1-4]。现代研究表明, 核桃隔膜具有抗氧化、抗菌、抗衰老、调节免疫等多种药理作用^[5-6]。化学成分研究表明, 核桃隔膜中总黄酮的量高于核桃仁、核桃油^[7]。目前对核桃隔膜的研究仅局限于黄酮的提取和定量测定^[8-9], 对黄酮的纯化工艺研究还未见报道。

大孔吸附树脂是一类不溶于酸、碱及各种有机溶剂的有机高聚物吸附剂, 具有选择性好、操作简单、适用范围广等特点, 在很多领域都有广泛的应用^[10]。近年来, 大孔吸附树脂在医药领域 (特别是天然药物纯化) 中广为应用, 是提取分离中药有效成分的一种有效方法^[11]。本实验为首次采用大孔吸附树脂法对核桃隔膜提取物进行纯化富集, 通过对12种树脂的静态、动态吸附和解吸附筛选实验, 优选出对核桃隔膜总黄酮具有高吸附分离性能的树脂,

收稿日期: 2013-05-20

基金项目: 兵团科技项目资助 (2011BA055)

作者简介: 王国军 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然药物分析。Tel: 18139266811 E-mail: 779772056@qq.com

*通信作者 唐辉, 女, 教授, 研究方向为药物分析及新药研究。Tel: (0993)2055002 E-mail: th_pha@shzu.edu.cn

张淑兰, 女, 主任药师, 从事药物成分分析研究。Tel: (0991)2668520 E-mail: btyy2668520@163.com

并研究了该树脂吸附分离的工艺条件,为核桃隔膜总黄酮的提取分离提供了实验方法并为大生产中的应用提供技术参数。

1 仪器与材料

UV-2401 紫外分光光度仪(日本岛津公司),德国 Sartorius BP211D 十万分之一电子分析天平;上海科导 SK5200HP 超声清洗器。日本 EYELA 旋转蒸发仪。玻璃色谱柱(30 cm×2.0 cm,上海青浦沪西公司)。SHA-C 型水浴恒温振荡器(江苏金坛市医疗仪器厂),FW100 型植物粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),PHS-2C 型数字 pH 酸度计(上海精密科学仪器厂)。

大孔树脂 NKA-9(天津南开大学化工厂),大孔树脂 D-101、AB-8、HPD-450、HPD-500、HPD-600、HPD-700、XDA-1(沧州宝恩化工有限公司),大孔树脂 HPD-100、HP-20(安徽三星树脂科技有限公司),大孔树脂 LS-300B(蓝深树脂科技),大孔树脂 D3520(天津市光复精细化工)。核桃隔膜原料购自乌鲁木齐二道桥市场,经石河子大学药学院成玉怀高级实验师鉴定为核桃 *Juglans regia* L. 的荚膜。木犀草苷对照品(批号 111720-201106)由中国药品生物制品检定所提供;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 核桃隔膜总黄酮的测定^[12]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取木犀草苷对照品 9.91 mg,甲醇溶解定容,制成质量浓度为 198.2 μg/mL 的对照品溶液,摇匀、备用。

2.1.2 线性关系考察 精密量取木犀草苷对照品溶液 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,置 25 mL 量瓶中,各加 5% NaNO₂ 0.7 mL,摇匀后放置 5 min,再加 10% Al(NO₃)₃ 1.2 mL 摇匀,放置 12 min,最后加 4% NaOH 12.0 mL,振摇,加水至刻度,摇匀后放置 5 min,在 500 nm 处测定吸光度(A)值。以 A 值(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,得木犀草苷的回归方程为 $Y=0.0132X+0.0156$, $r=0.9995$,结果表明木犀草苷在 15.86~47.57 μg/mL 呈良好的线性关系。

2.1.3 上样液的制备 称取粉碎后的核桃隔膜 100.0 g,用 60%乙醇,料液比 1:15,超声提取 2 次,每次 35 min,合并提取液,减压浓缩后得到粗提物,将其溶于水,滤过,制成吸附所需浓度的原料液,备用。

2.1.4 显色溶液的制备 取木犀草苷对照品溶液或

样品溶液 2.0~6.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加 5% NaNO₂ 0.7 mL,摇匀后放置 5 min,再加 10% Al(NO₃)₃ 1.2 mL 摇匀,放置 12 min,最后加 4% NaOH 12.0 mL,振摇,加水至刻度,摇匀后放置 5 min,即得显色溶液。

2.1.5 测定波长的选择 吸取对照品和样品溶液各 3.0 mL,按“2.1.4”项下方法制得显色溶液,在波长 200~800 nm 处扫描。结果表明,对照品和样品的显色溶液均在 500 nm 处有最大吸收,因此选 500 nm 为测定波长。

2.1.6 总黄酮的测定 称取粗提物 15.36 mg,水定容于 25 mL 量瓶中,从中精密吸取 2 mL,按“2.1.2”项下“加 5% NaNO₂ 0.7 mL 起”依法测定 A 值,测得粗提物中总黄酮质量分数为 31.27%,RSD 为 2.23% ($n=3$)。

2.2 树脂筛选研究^[13-14]

2.2.1 大孔树脂预处理 树脂先用 95%乙醇浸泡 24 h 充分溶胀后,用水洗至无白色浑浊现象,再以蒸馏水洗至无醇味。洗尽醇后用 4% HCl 溶液浸泡 4 h,然后用蒸馏水洗至中性,最后用 4% NaOH 溶液浸泡 4 h,蒸馏水洗至中性,备用。

2.2.2 静态吸附-解吸实验 称取预处理好的 12 种型号大孔树脂(D-101、HPD-100、HPD-700、HP-20、LS-300B、HPD-450、AB-8、HPD-600、HPD-500、XDA-1、NKA-9、D3520)各 2.0 g(湿质量)置 100 mL 具塞锥形瓶中,分别加入 50 mL “2.1.3”项下制得的样品液(1.081 0 mg/mL),于恒温水浴振荡器中振摇 24 h,上层液滤过,测定 A 值,计算总黄酮质量浓度。将滤出的各树脂另置于 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 50 mL,其余操作同上,得解吸后的滤液,测定 A 值,计算解吸液的质量浓度。计算静态吸附量、解吸量、吸附率及解吸率[吸附量=(C_0-C_1) V_1/m ,解吸量= C_2V_2/m ,吸附率=(C_0-C_1)/ C_0 ,解吸率= $C_2/(C_0-C_1)$,式中 C_0 为吸附前样液中总黄酮质量浓度(mg/mL), C_1 为吸附后样液中总黄酮质量浓度(mg/mL), C_2 为解吸后样液中总黄酮质量浓度(mg/mL), V_1 为吸附液体积(mL), V_2 为解吸液体积(mL), m 为湿树脂质量(g)],结果见表 1。可见,HPD-700、HPD-450、AB-8、HPD-500、HPD-600、XDA-1 型大孔型号树脂对核桃隔膜总黄酮的吸附率均超过 72%,但从解吸率考察 HPD-600、XDA-1 型号树脂却不到 80%,而其他 4 种树脂解吸率均超过 80%。

表 1 12 种大孔树脂的静态吸附和解吸性能
Table 1 Adsorption-desorption capacity of 12 types of macroporous resins

树脂类型	极性	吸附量 / (mg·g ⁻¹)	吸附率 / %	解析量 / (mg·g ⁻¹)	解吸率 / %
D-101	非极性	17.23	68.92	14.95	80.27
HPD-100	非极性	16.81	67.25	13.68	75.24
HPD-700	非极性	18.06	72.25	16.30	83.48
HP-20	非极性	16.65	66.60	14.15	78.61
LS-300B	弱极性	17.23	68.92	15.95	85.64
HPD-450	弱极性	19.03	76.13	16.60	80.68
AB-8	弱极性	18.55	74.19	16.95	84.54
HPD-600	极性	19.15	76.60	16.30	78.84
HPD-500	极性	19.45	77.80	17.70	84.19
XDA-1	极性	19.01	76.04	15.50	75.43
NKA-9	极性	17.81	71.23	15.13	78.57
D3520	极性	17.30	69.20	16.05	85.83

综合考虑分析, 选取 HPD-700、HPD-450、AB-8、HPD-500 4 种树脂作进一步的静态吸附动力学考察。

2.2.3 大孔树脂的静态吸附动力学特性 称取预处理好的 HPD-700、HPD-450、AB-8、HPD-500 型号大孔树脂各 2.0 g, 于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精确加入一定质量浓度的供试液 50 mL, 置于恒温振荡器中振荡, 每隔 1 h 取上清液, 测定 A 值并计算吸附率, 绘制各型号树脂静态吸附曲线, 结果见图 1。由图可知 AB-8 树脂对供试液的吸附率在 4 h 内升高最快, 4 h 后吸附率趋于稳定, 基本达到吸附平衡, 而其他 3 种树脂对供试液的吸附率均在 8 h 内上升最快, 8 h 后吸附率趋于稳定, 基本达到吸附平衡, 因此 AB-8 树脂为核桃隔膜总黄酮分离纯化的最佳树脂。

2.3 AB-8 树脂分离纯化总黄酮的工艺

2.3.1 上样液质量浓度对 AB-8 树脂吸附率的影响

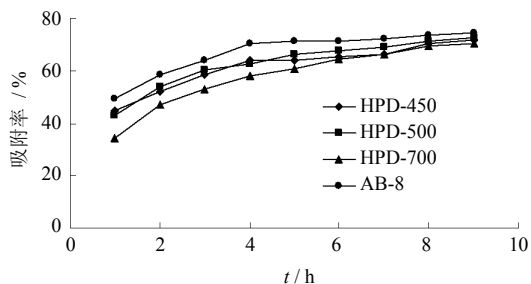


图 1 4 种树脂的静态吸附曲线

Fig. 1 Static adsorption curve of four types of resins

称取 5 份处理好的 AB-8 型树脂各 2.0 g 于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精确加入总黄酮质量浓度分别为 0.271 9、0.516 4、0.713 5、0.969 9、1.192 2 mg/mL 的供试液, 置于恒温振荡器中振荡 4 h 后, 取上清液测定 A 值, 计算吸附率, 结果吸附率分别为 69.40%、71.72%、73.37%、73.23%、73.74%。上样液质量浓度在 0.271 9~0.713 5 mg/mL 时, 吸附率迅速增加, 质量浓度在 0.713 5~1.192 2 mg/mL 时, 吸附率增加速度减慢, 考虑到上样质量浓度过高时, 容易发生絮凝和沉淀, 堵塞树脂柱。故确定 0.713 5 mg/mL 为该树脂的最佳上样质量浓度。

2.3.2 上样液 pH 值对 AB-8 树脂吸附率的影响 称取 5 份处理好的 AB-8 型树脂各 2.0 g, 分别调至 pH 值为 1.70、2.70、3.70、4.70 (原液)、5.70、6.70 的供试液, 振荡吸附 4 h 后, 取上清液测定 A 值, 结果吸附率分别为 77.14%、75.09%、73.38%、73.26%、65.30%、62.81%。当 pH 值低于 4.70 时吸附效果好, 随着供试液 pH 值的升高, 吸附效果下降, 说明总黄酮在酸性条件下容易被吸附。供试液 pH 值在 1.70~4.70 树脂的吸附性能较好。但 pH 值过低时, 可能会导致黄酮苷的水解。故确定为 4.70 为优选 pH 值。

2.3.3 上样体积流量对 AB-8 树脂吸附率的影响 取核桃隔膜提取液 100 mL (0.713 5 mg/mL), 以不同的体积流量 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 BV/h) 上样, 测定吸附后溶液中总黄酮质量浓度, 计算吸附率, 结果吸附率分别为 75.69%、75.64%、74.79%、72.13%、65.17%。吸附率随上样体积流量增大而降低, 体积流量在 1~2 BV/h 时, 下降趋势小, 在 2~2.5 BV/h 时下降趋势明显。其原因可能是体积流量较小时, 提取液与树脂接触的时间较长, 有利于黄酮类物质从液相扩散到树脂内部, 从而提高了吸附率, 综合分析, 选择上样体积流量为 1.5 BV/h。

2.3.4 AB-8 树脂动态吸附试验 取处理好的树脂 60 g (80 mL) 装柱, 将供试品溶液以水调制质量浓度为 0.713 5 mg/mL 时上样, 每 10 mL 收集 1 管, 测定 A 值, 并绘制动态吸附曲线, 结果见图 2。由图可见, 初始阶段, 流出液的 A 值很小, 吸附效率较高, 当上样量增加到 260 mL (约 3 BV) 时, 开始有明显泄漏, 并逐渐接近饱和吸附。故选择树脂的上样量为 4 mL/g。

2.3.5 洗脱溶剂乙醇体积分数对 AB-8 树脂解吸率的影响 称取 6 份处理好的 AB-8 型树脂各 2.0 g,

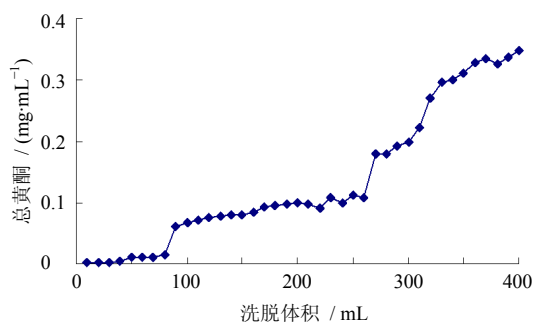


图2 AB-8树脂的动态吸附曲线

Fig. 2 Dynamic adsorption curve of AB-8 resin

用一定质量浓度的供试品溶液使之吸附平衡后,分别加入等体积的40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%乙醇,置于恒温振荡器上解吸附4 h,取上清液测定A值,结果解析率分别为76.46%、83.62%、81.78%、80.95%、76.27%、74.41%、71.89%、74.95%、75.85%、76.41%。当乙醇体积分数小于50%时,解吸率随乙醇体积分数的增加而增大,50%乙醇解吸率最大,当乙醇体积分数大于50%时,解吸率呈下降趋势。可能是由于乙醇体积分数增大,醇溶性的杂质增多,降低了解吸率。因此,选择乙醇体积分数为50%。

2.3.6 AB-8树脂动态解吸试验 上样吸附后,先用2 BV蒸馏水洗去杂质,然后用50%乙醇以1.5 BV/h的体积流量洗脱,每10 mL收集1管洗脱液,测定A值,并绘制动态解吸曲线,结果见图3。由图可知,50%乙醇的洗脱曲线峰型集中,无明显拖尾现象。第7管,即70 mL解吸液中总黄酮的量就已达最大值,第18管,即180 mL解吸液中总黄酮已基本洗脱完全。因此,选取180 mL(约2.5 BV)为洗脱液用量。

2.4 AB-8树脂最佳工艺验证

为验证优选工艺的可行性,按照已优选的最佳工艺条件:pH值为4.70、上样质量浓度为0.713 5 mg/mL,树脂的上样量4 mL/g,上样体积流量1.5

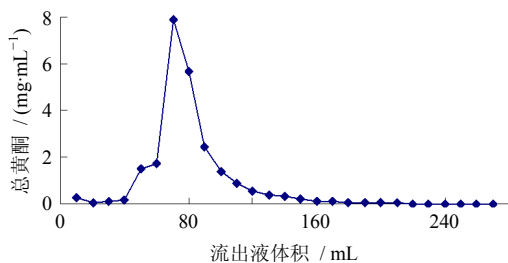


图3 AB-8树脂的动态解吸曲线

Fig. 3 Dynamic desorption curve of AB-8 resin

BV/h,依次用2 BV水洗脱,2.5 BV 50%乙醇洗脱,进行3次平行试验,洗脱液浓缩至干,称质量。经测定计算得总黄酮的质量分数和收率,结果总黄酮质量分数分别为72.66%、72.01%、72.07%,收率分别为94.16%、93.68%、93.99%。结果表明在上述工艺条件下AB-8树脂对核桃隔膜总黄酮的吸附纯化稳定,且总黄酮的质量分数、收率均较高。

$$\text{总黄酮质量分数} = (C_e \times V_e) / Q_e$$

$$\text{总黄酮收率} = P / Q$$

式中 C_e 为洗脱液的质量浓度(mg/mL), V_e 为洗脱液的体积(mL), Q_e 为洗脱液干燥后的质量(g), P 为洗脱液中总黄酮的质量(g), Q 为上样液中总黄酮的质量(g)

2.5 AB-8树脂再生试验研究

AB-8树脂柱先用95%乙醇洗脱至无色后,再用5 BV、4%的NaOH洗脱,体积流量1.5 BV/h,然后用蒸馏水洗至中性,再用5 BV、4% HCl洗脱,最后用蒸馏水洗至中性即可。再生后,质量分数仍可达60.5%以上,收率76.7%以上。经过3次再生后树脂颜色变深,残留在树脂上的杂质较多使吸附能力减弱不可再用。

3 讨论

不同类型的树脂对核桃隔膜总黄酮的吸附性能均为极性(HPD-600、HPD-500、XDA-1) > 弱极性(AB-8、HPD-450) > 非极性树脂(HPD-700),显示极性和弱极性树脂具有较好的吸附性能,但解吸率却显示为弱极性树脂(LS-300B、HPD-450、AB-8) > 极性树脂(HPD-500、D3520) > 非极性树脂(D-101、HPD-700)。综合判断,弱极性大孔树脂更适用于核桃隔膜总黄酮的分离纯化。

实验中考察了吸附率、解析率、吸附液质量浓度及pH值、洗脱剂乙醇体积分数等影响树脂吸附性能的主要因素。同时,用水量和洗脱剂的体积流量对黄酮质量分数也有影响,用水量增大,会对黄酮质量分数有所提高,但是也降低了纯化物的量;解吸体积流量增大,则会造成不同极性的溶质分子洗脱不均匀,从而引起质量分数下降;体积分数过慢则会延长纯化周期。因此,经过预试验及文献报道^[15],采用解吸体积流量为1.5 BV/h,水的洗脱用量为2 BV。

树脂的预处理是除去树脂中残留物,是保证树脂发挥高效分离纯化功能的前提条件;样品的预处理也很关键,上柱前样品的澄清程度和树脂的载样量、纯化效果有直接的关系;样品洗脱前,配好的

乙醇先超声脱气,可以防止乙醇与水混溶放出大量热而产生气泡。

实验中选用了12种常用于分离黄酮的大孔吸附树脂进行筛选。通过静态吸附与解吸、静态动力学特性实验,确定AB-8型树脂对核桃隔膜总黄酮有良好的吸附性能,其工艺条件为pH值4.70、0.713 5 mg/mL的上样质量浓度,上样量4 mL/g树脂,上样体积流量为1.5 BV/h,依次用2 BV水洗脱,2.5 BV 50%乙醇洗脱,树脂可重复使用3次。在此条件下,乙醇洗脱物中核桃隔膜总黄酮质量分数达72%以上,收率93%以上,与纯化前相比总黄酮的质量分数明显提高,富集效果良好。该工艺操作简单、重复性好,可作为核桃隔膜总黄酮的有效富集方法,在核桃隔膜总黄酮工艺中有一定的推广应用价值。

参考文献

- [1] 菇克娅·沙德克. 维吾尔医常药材学(维)(下册) [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 中草药大辞典(上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [3] 徐芳, 金兆祥, 高林善. 清宫寿桃丸抗衰老机制分析 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 1-2.
- [4] 金龙, 巴元明, 李鸣. 分心木及其配伍在肾病临床的应用 [J]. 湖北中医杂志, 2010, 32(4): 60-61.
- [5] 高莉, 王艳梅, 帕提古丽·马合木提. 核桃分心木粗提物抑菌活性的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(11): 69-71.
- [6] 高莉. 新疆核桃隔膜多糖提取分离纯化及抗氧化活性的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2010.
- [7] 余旭亚, 陈朝银, 王洪钟, 等. 核桃仁与核桃油总黄酮含量比较研究 [J]. 食品研究与开发, 2002, 23(6): 25-26.
- [8] 阿布力克木·阿布力孜, 迪丽努尔·塔力甫, 艾沙·努拉洪, 等. 分光光度法测定和田核桃仁内隔膜中总黄酮含量 [J]. 食品科学, 2008, 29(11): 552-554.
- [9] 张淑兰, 吴燕子, 王艳梅, 等. 响应面法优化核桃隔膜总黄酮提取工艺 [J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2519-2521.
- [10] 周剑, 丁玉峰. 大孔吸附树脂分离中草药有效成分的应用 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(1): 69-71.
- [11] 史作清, 施荣富, 范云鸽, 等. 树脂吸附法在中草药有效成分提取中的应用 [J]. 中草药, 2001, 32(7): 660-662.
- [12] 张亚梅, 张小娟, 简晖. 大孔吸附树脂纯化山蜡梅叶中总黄酮的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1226-1229.
- [13] 陈随清, 陈磊磊, 魏雅磊, 等. 大孔吸附树脂纯化山檀总黄酮的工艺研究 [J]. 中成药, 2013, 25(2): 272-277.
- [14] 郭琪, 翟梅枝, 贾彩霞, 等. 大孔树脂分离纯化核桃叶总黄酮的研究 [J]. 西北林学院学报, 2008, 23(3): 168-172.
- [15] 盛萍, 帕丽达·阿不力孜, 刘波, 等. 大孔树脂吸附法富集野菊花总黄酮的工艺研究 [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1170-1173.