

# 核桃楸叶总鞣质的大孔树脂纯化工艺考察

尚作华, 霍金海, 王伟明\*

(黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036)

[摘要] 目的: 优选核桃楸叶总鞣质的大孔树脂纯化工艺。方法: 利用静态吸附-洗脱试验考察 AB-8, D101, NKA-9, Daion HP-20 型大孔树脂的吸附与洗脱能力, 通过单因素试验考察上样量、水洗用量及洗脱溶媒对核桃楸叶总鞣质纯化工艺的影响。采用干酪素法测定核桃楸叶总鞣质含量, 检测波长 760 nm。结果: 选用 AB-8 型大孔吸附树脂, 最佳纯化工艺为上样液质量浓度  $2.672 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 上样量 250 mL, 洗脱流速  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 加水 6 BV 洗脱除杂, 收集 50% 乙醇洗脱液 10 BV; 总鞣质洗脱率、纯度分别为 73.32%, 35.02%。结论: AB-8 型大孔树脂对核桃楸叶总鞣质的分离性能较好, 优选的纯化工艺适用于工业化生产。

[关键词] 核桃楸叶; 大孔吸附树脂; 总鞣质; 干酪素法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)16-0036-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160036

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140627.0947.114.html>

[网络出版时间] 2014-06-26 10:57

## Investigation of Purification Process of Total Tannins from *Juglans mandshurica* Leaf by Macroporous Resin

SHANG Zuo-hua, HUO Jin-hai, WANG Wei-ming\*

(Heilongjiang Academy of Chinese Medicine Sciences, Harbin 150036, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification process of total tannins from *Juglans mandshurica* leaf by macroporous resin. **Method:** Adsorption and elution capacities of AB-8, D101, NKA-9, Daion HP-20 macroporous resin were investigated by static adsorption-elution tests, single factor tests were adopted to optimize purification process of total tannins from *J. mandshurica* leaf with sample volume, water amount, elution solvent as factors. The content of total tannins was measured by casein, detection wavelength was set at 760 nm. **Result:** AB-8 macroporous resin was selected, its optimal purification technology was as follows: the concentration of sample solution  $2.672 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , sample volume of 250 mL, elution rate of  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , washed impurity with 6 BV of water, collected 10 BV of 50% ethanol eluent; elution rate and purity of total tannins were 73.32% and 35.02%, respectively. **Conclusion:** AB-8 macroporous resin had good separation performance for total tannin from *J. mandshurica* leaf, this optimized purification process was suitable for industrial production.

[Key words] *Juglans mandshurica* leaf; macroporous resin; total tannins; casein law

核桃楸别名山核桃、胡桃楸<sup>[1]</sup>, 具有抗菌、消炎、抗癌等药理作用, 其中抗肿瘤作用尤为显著, 其各部位提取物已被广泛用于癌症治疗<sup>[2]</sup>。鞣质类成分具有抗氧化、抗病原微生物、降血糖等活性, 在

抗肿瘤、抗 HIV、抗风湿等方面应用前景很好, 是植物抗炎、抗风湿活性的主要物质基础<sup>[3-5]</sup>。目前关于核桃楸叶总鞣质的研究报道较少。在确定核桃楸叶总鞣质提取工艺的基础上, 本实验采用单因素试

[收稿日期] 20131211(006)

[基金项目] 黑龙江省科技攻关项目(GC12C110); 哈尔滨市科技创新人才研究专项(2012RFQYS042)

[第一作者] 尚作华, 硕士, 从事中药化学成分分析研究, Tel: 0451-55665478, E-mail: 874048661@qq.com

[通讯作者] \* 王伟明, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药及保健食品研发, Tel: 0451-55665478, E-mail: zyyjy@163.com

验优选该成分的大孔树脂纯化工艺,为后期生理活性研究及核桃楸的资源利用提供参考。

## 1 材料

BSA224S-CW 型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),UV-16 型紫外分光光度计(日本岛津)。核桃楸叶于2011年采自黑龙江省哈尔滨市宾县地区,经黑龙江省中医研究院初东君主任药师鉴定为胡桃科植物核桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 的干燥叶;D101, AB-8, NKA-9 型大孔树脂(天津市汇达化工有限公司),Daion HP-20 型大孔树脂(日本三菱),没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110831-200302),磷钼钨酸试液(自制,按2010年版《中国药典》附录中方法配制),水为二次去离子水,试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的配制** 精密称量没食子酸对照品 2.54 mg,置于 50 mL 棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.2 供试品溶液配制** 称取粉碎的核桃楸叶 5 g,置于 250 mL 量瓶中,加水 100 mL 浸泡过夜,低温超声(30 ℃,100 W)提取 3 次,每次 30 min,过滤,合并滤液;重复操作 1 次,合并提取液,即得。

### 2.3 核桃楸叶总鞣质的含量测定

**2.3.1 标准曲线的绘制** 精密量取对照品溶液 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 mL,分别置于 25 mL 棕色量瓶中,各加入磷钼钨酸试液 1 mL 和 20% 碳酸钠溶液 10 mL,加水定容至刻度,摇匀,放置 30 min,以相应试剂为空白,于 760 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程  $A = 4.525C + 0.0603$  ( $r = 0.995$ ),线性范围 1.016 ~ 8.128 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.2 总多酚的含量测定** 精密量取供试品溶液 2 mL 置 25 mL 棕色量瓶中,按 2.3.1 项下方法测定 A,计算总多酚质量浓度。

**2.3.3 未被吸附总多酚的含量测定** 精密量取供试品溶液 25 mL,置于已盛有干酪素 0.6 g 的 100 mL 具塞锥形瓶中,密塞,于 30 ℃ 水浴中保温 1 h,时时振摇,取出,放冷,摇匀,滤过,弃去初滤液。精密量取续滤液 2 mL 至 25 mL 棕色量瓶中,按 2.3.1 项下方法测定 A,计算未被吸附总多酚质量浓度,计算总鞣质含量。

$$C_{\text{总鞣质}} = C_{\text{总多酚}} - C_{\text{未被吸附总多酚}}$$

### 2.4 大孔吸附树脂型号筛选

**2.4.1 大孔吸附树脂的预处理**<sup>[6]</sup> 量取 AB-8, D101, NKA-9, Daion HP-20 型大孔树脂各 50 g,加

95% 乙醇浸泡 24 h 使充分溶胀,湿法装柱,加 95% 乙醇以 2 BV·h<sup>-1</sup> 的流速通过树脂柱,至流出液与少量水以 1:5 混合后无白色浑浊为止,加水以同样流速洗至无醇味,备用。

**2.4.2 静态吸附试验**<sup>[7]</sup> 精确称取预处理好的树脂 4 份,每份 2.0 g,分别置于 125 mL 锥形瓶中,各加入供试品溶液 50 mL,静态吸附 24 h,时时振摇,抽滤,滤液按 2.3.1 项下自“加入磷钼钨酸试液 1 mL”起操作,依法测定 A,计算总鞣质吸附量(Q)分别为 22.28,25.28,22.00,26.48 mg·g<sup>-1</sup>,吸附率依次为 66.70%,75.68%,65.87%,79.28%。

$$Q = (C_1 - C_2) V / W$$

$$\text{吸附率} = (C_1 - C_2) / C_1 \times 100\%$$

式中  $C_1$  为供试品溶液的初始质量浓度, $C_2$  为吸附后供试品溶液的残余质量浓度,V 为加入供试品溶液的体积,W 为树脂质量。

**2.4.3 静态洗脱试验**<sup>[8]</sup> 将上述吸附饱和的 4 种大孔吸附树脂用水冲洗,各加入 40% 乙醇 50 mL,室温静置 24 h,时时振摇,抽滤,滤液按 2.3.1 项下自“加入磷钼钨酸试液 1 mL”起操作,依法测定 A,计算总鞣质洗脱率分别为 56.85%,39.67%,38.48%,46.81%。

$$\text{洗脱率} = C / (C_1 - C_2) \times 100\%$$

式中 C 为洗脱液质量浓度。结果表明 D101 和 Daion HP-20 型大孔树脂对核桃楸叶总鞣质的吸附性能较好,AB-8 和 Daion HP-20 型树脂对核桃楸叶总鞣质的解吸能力较强,提示以吸附率和洗脱率为指标不能准确确定最佳大孔树脂型号,故分别对 4 种型号大孔树脂的分离工艺进行考察。

### 2.5 不同型号大孔树脂的分离工艺考察<sup>[9]</sup>

**2.5.1 泄露曲线绘制** 量取预处理好的 4 种型号大孔吸附树脂各 35 mL,湿法装柱,将稀释至 2.672 g·L<sup>-1</sup> 的供试品溶液过柱,流速 2 BV·h<sup>-1</sup>,每 20 min 接取 1 次样品,按 2.3.1 项下自“加入磷钼钨酸试液 1 mL”起操作,依法测定 A,计算总鞣质质量浓度,绘制泄露曲线见图 1。结果表明 AB-8 型树脂上样量 350 mL 时,泄露率 14.35%;D101 型树脂上样量 350 mL 时,泄露率 35.38%;NKA-9 型树脂上样量 350 mL 时,泄露率 37.06%;Daion HP-20 型树脂上样量 350 mL 时,泄露率 20.79%;确定 AB-8, Daion HP-20, NKA-9, D101 型树脂的最佳上样量分别为 250, 260, 225, 230 mL,提示 4 种大孔树脂的动态吸附能力排序为 Daion HP-20 > AB-8 > D101 > NKA-9。

**2.5.2 水洗用量** 量取经预处理好的 4 种型号大

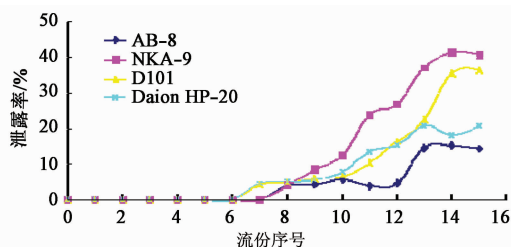


图 1 不同型号大孔树脂对核桃楸叶总鞣质的泄露曲线

孔吸附树脂各 35 mL,分别湿法装柱,将 40 mL 供试品溶液缓缓加入树脂柱中,吸附完全后依次加 1,2,3,4,5,6,7,8 BV 水洗脱,收集洗脱液,每 1 BV 为 1 份,测定 A,计算总鞣质质量。结果表明 AB-8, D101, Daion HP-20 型大孔树脂中极性大的鞣质类成分主要集中在 3~5 BV 水洗脱液中,而 NKA-9 型大孔树脂主要集中于 3~6 BV 水洗脱液中,但水洗脱液中总鞣质含量均较低。分别将水洗部分干燥,得浸出物,称定质量,结果干膏质量均较低,AB-8, D101, Daion HP-20 型大孔树脂水洗用量 > 6 BV, NKA-9 型大孔树脂水洗用量 > 7 BV 后,杂质质量均无明显变化,故确定 AB-8, D101, Daion HP-20, NKA-9 型大孔树脂的最佳水洗用量分别为 5,5,5,6 BV,提示 4 种大孔树脂的洗脱性能排序为 Daion HP-20 ≈ D101 ≈ AB-8 > NKA-9。

**2.5.3 洗脱溶媒** 按 2.5.2 项下方法装柱、上样、吸附,分别加最佳用水量水洗脱,以去除杂质,各树脂依次用 20%,50%,80% 的乙醇溶液 10 BV 洗脱,洗脱流速  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ ,收集各流分(每个洗脱梯度为一 流分),依法测定 A,计算洗脱率。结果表明 AB-8, NKA-9, Daion HP-20, D101 型大孔树脂用 20% 和 50% 的乙醇溶液分别能将 73.32%, 56.81%, 61.81%, 59.50% 的核桃楸叶总鞣质洗脱下来,而 80% 乙醇分别能将 4.49%, 3.09%, 0.19%, 0.13% 的总鞣质洗脱下来,提示在相同洗脱溶媒下,4 种大孔树脂的洗脱能力排序为 AB-8 > Daion HP-20 > D101 > NKA-9。

**2.5.4 洗脱部位纯度测定** 按 2.5.2 项下方法装柱、上样、吸附,加最佳用水量水洗脱,弃去洗脱液,按经验分别用 50% 乙醇 10 BV 洗脱,收集洗脱液,于  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  真空减压浓缩, $60 \text{ }^\circ\text{C}$  真空干燥 4 h,称定质量,计算 AB-8, NKA-9, D101, Daion HP-20 型大孔树脂的 50% 乙醇洗脱液中总鞣质纯度分别为 35.02%, 28.95%, 28.92%, 23.68%,说明 AB-8 型大孔树脂用于核桃楸叶总鞣质纯化时效果较好。

**2.6 验证试验** 精密量取供试品溶液 1 L,缓缓通

过装有已处理好的 AB-8 型大孔树脂 2 L 的树脂柱,吸附 30 min,以  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  流速洗脱,加 6 BV 水洗除杂,加 50% 乙醇 10 BV 洗脱,收集洗脱液,依法测定 A,计算洗脱率 68.62%,总鞣质纯度 30.71%。洗脱率和总鞣质纯度比单因素试验中数据分别低 4.7% 和 4.31%。可能由于样本量扩大,缩合鞣质类成分的水溶液在空气中久置后会进一步缩合,形成不溶于水的红棕色沉淀鞣红,而水解鞣质极不稳定,暴露于空气中易被氧化,长时间低温减压浓缩易发生聚合反应,造成试验结果稍有降低。

### 3 讨论

大孔树脂通过物理吸附从溶液中有选择性地吸附有机物质。Daion HP-20 和 D101 型树脂的比表面积大,故吸附量大;另外树脂吸附遵从“相似相溶”原则,使得二者均对具有非极性苯环结构的鞣质类成分具有较强吸附能力,同时由于二者的孔径相对较大,鞣质类成分与树脂间形成的范德华力大于与洗脱剂形成的引力,故洗脱能力相对减弱。而 NKA-9 型树脂极性较强,比表面积小,对核桃楸叶总鞣质的吸附性能和洗脱性能均较弱。AB-8 型树脂为聚苯乙烯型弱极性树脂,不但能从非水介质中吸附极性物质,也能从极性溶液中吸附非极性物质,同时表面有一定的酯基,使得其可与具有非极性苯环结构和极性羟基基团的鞣质类成分通过范德华力和氢键结合,故而吸附能力和洗脱能力较强。

### [参考文献]

- [1] 常仁龙.核桃楸叶化学成分的研究[D].长春:长春中医药大学,2009.
- [2] 尹胜利,浦益琼,杨骏,等.中药鞣质成分的研究进展[J].中国医药导刊,2010,12(1):165.
- [3] 张朝凤,孙启时,王峥涛,等.乌药茎中鞣质类成分及其抗 HIV-1 整合酶活性研究[J].中国药理学杂志,2003,38(12):911.
- [4] 王坤凤,袁永兵,吴玲芳.缩合鞣质的研究进展[J].中草药,2013,44(12):1687.
- [5] Alasalvar C, Rybarczyk A, Shahidi F, et al. Antioxidant activity of hazelnut skin phenolics [J]. J Agric Food Chem,2009,57(11):4645.
- [6] 陈兴芬.侧柏叶化学成分提取及活性功能研究[D].南京:南京师范大学,2011.
- [7] 闫滨,张秋红,刘秀芳.植物中鞣质类化合物的化学研究进展[J].山东医药工业,2003,22(1):34.
- [8] 周本宏,张琛霞,沈恒,等.大孔吸附树脂对地榆中总鞣质的纯化[J].中国药师,2011,14(5):685.
- [9] 王丽,曹跃,贾天柱,等.狗脊中鞣质类成分的纯化工艺研究[J].中药工艺与制剂,2013,24(3):219.

[责任编辑 刘德文]