

棉酚的大孔吸附树脂纯化工艺优选

吴汉夔¹, 杨伟华^{2*}, 司庆贺¹

(1. 安阳师范学院, 河南 安阳 455000; 2. 中国农业科学院棉花研究所, 河南 安阳 455000)

[摘要] 目的: 优选从棉子中分离棉酚的大孔吸附树脂纯化工艺。方法: 采用静态吸附-洗脱与动态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号, 通过单因素试验优选洗脱流速, 利用正交试验考察上样液质量浓度、洗脱剂乙醇体积分数、上样液 pH 及洗脱液中乙醇体积分数对棉酚纯化工艺的影响。结果: 选用 H103 型大孔吸附树脂, 最佳纯化工艺为上样液中棉酚质量浓度 90 mg·L⁻¹, 上样液 pH 7, 上样液中乙醇体积分数 40%, 洗脱剂为 80% 乙醇; 棉酚纯度由提取液的 6.2% 提高至洗脱液中 83.6%, 转移率 76.7%。结论: 优选的工艺稳定可行, H103 型大孔树脂适用于棉酚的纯化。

[关键词] 大孔吸附树脂; 棉子; 棉酚; 纯化工艺; 正交试验; 单因素试验

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0021-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080021

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000033.html>

[网络出版时间] 2014-02-07 15:16

Optimization of Purification Process for Gossypol from *Gossypium herbaceum* by Macroporous Adsorption Resin

WU Han-kui¹, YANG Wei-hua^{2*}, SI Qing-he¹

[收稿日期] 20131129(020)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAD36B01-02); 国家棉花产业技术体系项目(CARS-18-24)

[第一作者] 吴汉夔, 博士, 副教授, 从事天然药物化学研究, Tel: 15137238927, E-mail: hkwu@aynu.edu.cn

[通讯作者] * 杨伟华, 研究员, 从事棉花品质监督与检验研究, Tel: 0372-2525389, E-mail: cottontest@126.com

3 讨论

无名异煅制的主要目的是使其酥脆, 醋淬的主要目的在于使药物中有效成分易于溶出。按最佳醋制工艺制备的炮制品中 MnO₂ 含量较生品显著性增加, 验证试验结果亦证明了这一点。与生品相比, 无名异经过煅制醋淬后, 晶体数量大大增加, 原因可能是因为经煅制醋淬后, 药材酥脆, 去除尘土后, 使晶体暴露所致。

无名异中主要成分为 MnO₂, 锰的质量分数占 63.1%^[1], 故选择 MnO₂ 含量作为评价指标。该药材来源于矿石, 含有一定的汞、砷等成分, 经煅制醋淬后这些成分的含量变化还有待确认, 但这些变化的综合因素可能会起到“减毒增效”的作用^[7-8]。

[参考文献]

[1] 高小恒, 陈达艳, 薛进. 无名异本草考证[J]. 实用中医

药杂志, 2011, 27(8): 555.

[2] 柴林巧, 孙燕萍, 王科钦, 等. 无名异药理学研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(6): 59.

[3] 冉懋雄, 郭建民. 现代中药炮制手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 901.

[4] 孙文基, 谢世昌. 天然药物成分定量分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 293.

[5] 陈新梅. 无名异的质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 107.

[6] 陈新梅. 矿物药无名异的显微观察[J]. 齐鲁药事, 2012, 31(9): 524.

[7] 张扬. 我国药用矿物学的发展困境及其对策选择[J]. 资源与产业, 2010, 12(S1): 117.

[8] 柴林巧, 孙燕萍, 王科钦, 等. 无名异药理学研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(6): 59.

[责任编辑 全燕]

(1. Anyang Normal University, Anyang 455000, China;

2. Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Anyang 455000, China)

[**Abstract**] **Objective:** To optimize purification process of gossypol from *Gossypium herbaceum* by macroporous adsorption resin. **Method:** Static and dynamic adsorption/desorption tests for gossypol were carried out to select proper macroporous resin, single factor test was adopted to select elution rate, other purification parameters were optimized by orthogonal test, such as pH of sample solution, ethanol concentration and so on. **Result:** H-103 resin was selected as the best one among 13 different resins, optimal process was determined as follows: the concentration of gossypol in loading solution $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with pH of 7, the concentration of ethanol in loading solution 40% and in eluting solution 80%; Purity of gossypol was enhanced from 6.2% in extract to 83.6% in eluant with transfer rate of 76.7%. After evaporation and recycle of solvent, then gossypol was obtained by recrystallization in a mixture solvent of acetone-acetic acid. **Conclusion:** H-103 resin was suitable for purification of gossypol from *G. herbaceum*.

[**Key words**] macroporous resin; *Gossypium herbaceum*; gossypol; purification process; orthogonal test; single factor test

棉酚是一种双倍半萜多元酚类物质^[1-2],最早在中国作为一种男性节育药应用,后期用于治疗女性激素依赖性疾病,包括子宫内膜异位症、子宫肌瘤、功能失调性子宫出血和痛经等。药理试验研究表明棉酚具有抗炎、抗疟、抗病毒及抗氧化等生物活性,诱导肿瘤细胞凋亡的能力显著^[3-4]。2005 年研制成功的 Kagocel 是将棉酚键合于羧甲基纤维素钠高分子材料上制成的干扰素诱导剂,作用机制是通过刺激人体产生免疫功能以治疗甲型流感病毒或 H1N1 病毒引起的疾病。目前棉酚的制备主要依靠从草棉、根棉等植物中提取分离得到,提取方法主要包括单一溶剂浸出法和混合溶剂浸出法^[5],但这些方法普遍存在有机溶剂沸点低、用量大、有毒、易燃等缺点。本实验拟采用大孔吸附树脂纯化棉酚,通过单因素试验和正交试验优选工艺参数,为棉酚的工业生产推广提供参考。

1 材料

600 型高效液相色谱系统(美国 Waters 公司), 721 型紫外-可见分光光度计(上海悦丰仪器仪表有限公司), DHG-9036A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), FA2004B 型电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司)。

棉子购自安徽省淮北市相山区棉花育种示范基地,经中国农业科学院棉花研究所杨伟华研究员鉴定为锦葵科植物草棉 *Gossypium herbaceum* L. 的种子; ADS-5, NKA, D-4020, NKA-9, D-3520 型大孔吸附树脂(天津光复化工研究所), S-8, CAD-40, DM-301, D-101, HPD-100, X-5, H-103 型大孔吸附树脂

(安徽三星树脂科技有限公司), HP20SS 型大孔树脂(三菱化学株式会社), 棉酚对照品(西安开来生物工程有限公司,批号 K130227), 水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 棉酚的含量测定 采用间苯三酚法测定。准确称取醋酸棉酚 0.050 g,加 70% 丙酮溶液溶解并定容至 50 mL。取该溶液 10 mL 于 100 mL 量瓶中,用 70% 丙酮溶液定容至 100 mL,即得棉酚对照品溶液。准确量取浓盐酸 16.6 mL 置于 100 mL 锥形瓶中,加入间苯三酚 1 g,加 95% 乙醇定容至刻度,溶解后置于棕色量瓶中,4 °C 冰箱保存备用。准确吸取棉酚对照品溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL,依次编号为 1 ~ 5 号,分别置于 10 mL 试管中,依次加入 70% 丙酮溶液 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mL,各加入显色剂间苯三酚-浓盐酸 2 mL,摇匀,于 50 ~ 55 °C 恒温水浴箱中加热 5 min,用 1 cm 比色皿,以 70% 丙酮溶液调零,在 550 nm 处测定吸光度值(A)。以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.072 2X + 0.001 5$ ($r = 0.995$),线性范围 20 ~ 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。计算普通白色棉子中棉酚质量分数 0.114% (带绒),彩棉子(带绒)中棉酚质量分数 0.008%,故选择普通棉子为研究对象。

2.2 树脂类型的选择

2.2.1 树脂预处理 称取 ADS-5, NKA, D-4020, NKA-9, D-3520, S-8, CAD-40, DM-301, D-101, HPD-100, X-5, H-103, HP20SS 型大孔吸附树脂各 20 g,加 95% 乙醇连续洗涤数次,直至流液加乙醇不浑浊为

止,水洗至无醇味,置于密闭容器备用。

2.2.2 提取液的制备^[5] 取棉子粉碎,加 15 倍量 80% 乙醇于 60 ℃ 浸泡并搅拌提取 3 h,过滤,加 2 倍量 80% 乙醇洗涤滤渣;滤渣加 7 倍量 80% 乙醇于 60 ℃ 提取 2 h,过滤,加 2 倍量 80% 乙醇洗涤滤渣;合并滤液,加 2 倍量水稀释成乙醇体积分数 40% 的溶液,备用。

2.2.3 静态吸附-洗脱试验 取处理好的大孔树脂各 5 g,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入棉子提取液 30 mL (含棉酚 1.202 mg),于摇瓶柜中以 120 r·min⁻¹ 的速度振摇 12 h 后过滤,分别取滤液,按 2.1 项下方法测定棉酚含量,计算各树脂对棉酚的吸附率。将树脂抽滤干,加 95% 乙醇洗脱,测定洗脱液中棉酚含量,计算洗脱率,结果显示 13 种大孔树脂中对棉酚吸附较好的前 5 种树脂为 HP20SS > H-103 > CAD-40 > X-5 > NKA,洗脱率较好的前 5 种树脂为 D-4020 > HPD-100 > H-103 > NKA-9 > NKA,综合考虑,选择 H-103 型大孔吸附树脂(表 1)。

表 1 不同型号大孔树脂对棉酚的吸附率与洗脱率

树脂型号	吸附量 /mg	吸附率 /%	洗脱量 /mg	洗脱率 /%
D-3520	0.612	51.01	0.444	72.42
D-4020	0.676	56.24	0.628	92.97
D-101	0.830	69.10	0.593	71.38
S-8	0.761	63.33	0.062	8.11
HPD-100	0.687	57.20	0.543	78.94
DM-301	0.887	73.84	0.518	58.38
NKA-9	0.709	59.06	0.550	77.53
CAD-40	0.888	73.96	0.566	63.70
H-103	0.914	76.07	0.714	78.12
HP20SS	1.011	84.18	0.245	24.24
NKA	0.871	72.46	0.639	73.48
X-5	0.876	72.88	0.561	64.10
ADS-5	0.777	64.71	0.528	67.92

2.2.4 动态吸附-洗脱试验 称取预处理好的 H-103 型大孔树脂 20 g 置玻璃色谱柱中,取按 2.1 项下方法测得 $A=0.167$ 的棉子提取液以 2 BV·h⁻¹ 的流速上样,收集流出液,每 1 BV 为 1 份,绘制动态吸附曲线见图 1,结果显示收集 10 BV 后 A 不再增加,说明动态吸附达饱和。树脂吸附饱和后加水洗涤树脂柱至收集液 A 不再增加为止,用量 3 BV,加 80% 乙醇洗脱,弃去流出液,收集流出液,每 1 BV 为 1 份,绘制动态洗脱曲线见图 2,结果发现收集 5 BV

后, A 趋于平缓。

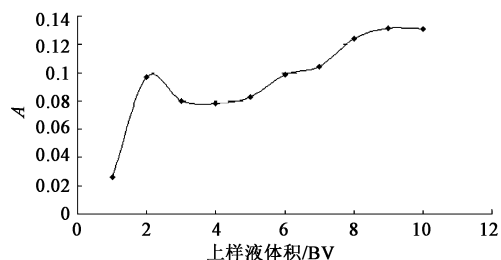


图 1 棉酚 H-103 型大孔树脂的动态吸附曲线

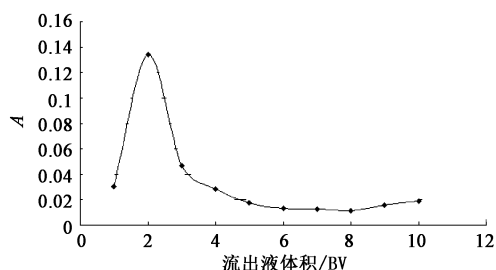


图 2 棉酚 H-103 型大孔树脂的动态洗脱曲线

2.2.5 洗脱速率考察 取已处理好的 H-103 型吸附树脂 5 份,每份 10 g,湿法装柱,各加水 2 BV 洗涤,各加入 2.2.2 项下提取液 30 mL 以 2 BV·h⁻¹ 的流速进行吸附,收集洗脱液并记录体积,各加入 80% 乙醇 50 mL,分别以 1,2,3,4,5 BV·h⁻¹ 的流速进行洗脱,收集洗脱液并记录体积,按 2.1 项下方法测定棉酚含量,计算吸附率分别为 74.15%,76.26%,75.13%,76.25%,74.66%,洗脱率分别为 75.29%,78.34%,77.90%,78.16%,75.58%,说明洗脱速率对工艺有一定影响,但无显著性差异,故确定洗脱速率 2 BV·h⁻¹。

2.3 正交试验 在单因素试验基础上,选择上样液质量浓度、洗脱剂乙醇体积分数、上样液 pH 及上样液中乙醇体积分数为考察因素,以棉酚质量为评价指标,取上样液 9 份,每份 30 mL,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3。

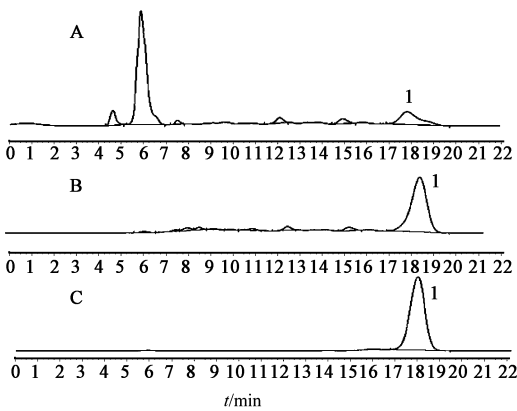
由直观分析可知,各因素对棉酚纯化工艺的影响顺序为 $D > C > A > B$,最佳组合为 $A_3B_3C_3D_2$,结合生产实际考虑,选择纯化工艺条件 $A_3B_2C_3D_2$,即棉酚质量浓度 90 mg·L⁻¹,上样液 pH 7,上样液中乙醇体积分数 40%,洗脱剂乙醇体积分数 80%。洗脱液和提取液的 HPLC 测定见图 3,色谱条件为伊力特 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),检测波长 254 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,流动相甲醇-水(含 0.1% 磷酸,90:10),柱温 25 ℃。结果表明棉酚纯度提高较大(由提取液的 6.2% 提高至洗脱液的 83.6%)。取已处理好的 H-103 型大

表 2 棉酚的 H-103 型大孔树脂纯化工艺正交试验因素水平

水平	A 上样液质量 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	B 洗脱剂乙醇 体积分数/%	C pH	D 上样液中乙醇 体积分数/%
1	30	70	3	30
2	60	80	5	40
3	90	95	7	50

表 3 棉酚的 H-103 型大孔树脂纯化工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	棉酚质量/mg
1	30	70	3	30	42.0
2	30	80	5	40	139.0
3	30	95	7	50	178.0
4	60	70	5	50	62.0
5	60	80	7	30	74.0
6	60	95	3	40	176.0
7	90	70	7	40	237.0
8	90	80	3	50	181.0
9	90	95	5	30	80.0
K_1	119.6	113.6	133.0	68.6	
K_2	104.0	131.3	97.0	184.0	
K_3	169.3	148.0	163.0	140.3	
R	65.3	34.3	66.0	115.3	



A. 提取液; B. 洗脱液; C. 对照品; 1. 棉酚

图 3 棉酚 HPLC

孔树脂 200 g, 湿法装柱, 取棉子提取液 600 mL, 按优选的工艺条件进行吸附-洗脱试验, 收集 80% 乙醇洗脱液, 减压浓缩至干, 加少量丙酮-乙酸(1:1)混合溶剂进行重结晶, 过滤, 所得浅黄色固体于 60 °C 真空干燥至恒重, 得棉酚 497 mg, 纯度 98%。

3 讨论

棉酚的提取溶剂可选用体积分数 > 80% 的丙酮、甲醇、乙醇等, 考虑到乙醇安全性较好且毒性较低^[5], 故选择 80% 乙醇加热提取。样品溶解于不同体积分数乙醇溶液中作为上样液, 若乙醇体积分数过低则棉酚溶解性太差, 且会有大量沉淀生成, 阻碍棉酚和大孔树脂的充分接触; 而当乙醇体积分数太高 (> 50%) 时, 虽然样品溶解性增加, 但树脂对棉酚的吸附力减弱, 会导致吸附量降低。因为棉酚具有弱酸性, 在弱酸溶液中稳定性好, 正交试验中选择了 3 个水平进行考察, 结果表明在 pH 7 时棉酚收率较高, 故可直接将提取液稀释后上柱富集, 不需要调整酸碱性。棉子提取液稀释后得到乙醇体积分数 40% 的提取液, 加 40% 乙醇不会将棉酚从树脂上洗脱下来, 因此在上样达吸附饱和后可直接选用 40% 乙醇洗脱树脂柱, 以便除去强极性杂质, 如糖类、蛋白等。

将洗脱液减压回收溶剂后加入乙酸-丙酮混合液进行重结晶可得到高纯度的棉酚。从图 3A 可知, 提取液中棉酚含量较低, 通过简单的吸附分离及重结晶后, 可大大提高棉酚纯度。从棉子的综合利用考虑, 40% 乙醇洗脱部位可进一步获得棉子糖和大极性的黄酮苷类成分; 洗脱完成后的大孔树脂, 如果增加洗脱剂乙醇的体积分数至 95%, 将获得极性更低的植物甾醇类成分。

[参考文献]

- [1] 张程程, 吴燕民, 唐益雄. 棉酚及其衍生物合成途径的研究进展[J]. 生物技术进展, 2011, 1(3): 165.
- [2] Adams R, Geissman T A. Structure of gossypol. XXIII. Attempts to prepare desapogossypolone tetramethyl ether. Condensation of hexadiene-2, 4 with dibenzoyl ethylene[J]. J Am Chem Soc, 1939, 61(8): 2083.
- [3] 郭忠, 赵晋, 马建秀. 棉酚的药理作用研究[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(1): 93.
- [4] 代有彪, 杨四涛, 唐辉. 左旋棉酚抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国药业, 2009, 18(19): 1.
- [5] 吴媛瑾, 王承明, 吴谋成. 响应面优化棉子饼粕中棉酚的提取条件[J]. 棉花学报, 2009, 21(2): 94.

[责任编辑 仝燕]