

DOI:10.3969/j.issn.1000-1298.2010.09.029

青钱柳叶三萜大孔吸附树脂纯化工艺*

吴彩娥 方升佐 徐琳 杨万霞 李婷婷 贾韶千

(南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

【摘要】 为研究大孔吸附树脂纯化青钱柳三萜的工艺,筛选了适宜的大孔吸附树脂,并通过静态和动态的吸附与解吸试验,确定了纯化工艺参数。结果表明,在供试的3种大孔吸附树脂中,D-101型大孔吸附树脂适合分离青钱柳叶三萜,其吸附量和解吸率分别为57.5 mg/g和96.51%;动态吸附青钱柳叶三萜时的最适宜进料流速与进料质量浓度分别为2 BV/h和1.5 mg/mL;动态解吸时洗脱剂的最适宜体积分数与洗脱速度分别为50%乙醇和2 BV/h。经大孔吸附树脂分离纯化后三萜的纯度是粗提物的4.1倍,得率为74.66%,表明D-101型大孔吸附树脂纯化青钱柳三萜效果更佳。

关键词: 青钱柳 三萜 大孔吸附树脂 纯化

中图分类号: S789.4; R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2010)09-0143-05

Purification of Triterpenes in *Cyclocarya paliurus* Leaves by Macroporous Resins

Wu Caie Fang Shengzuo Xu Lin Yang Wanxia Li Tingting Jia Shaoqian

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract

Purification process of triterpenes in *Cyclocarya paliurus* by macroporous resins was studied. The suitable macroporous resin was screened, the technological conditions of purification were studied, and the optimum purification processing was obtained by the static adsorption and desorption tests as well as dynamic adsorption and desorption tests. The results show that, in three types of the experimented macroporous resins, D-101 macroporous resin presents the best effect of separation with the adsorption capacity and desorption rate of 57.5 mg/g and 96.51%, respectively; through dynamic adsorption experiments, the optimum sampling rate and mass concentration is 2 BV/h and 1.5 mg/mL respectively; through dynamic desorption experiments, the optimum ethanol content is 50%, with eluting velocity of 2 BV/h. By macroporous resin, the purity of *Cyclocarya paliurus* triterpenes is 4.1 times higher than crude extracts, the recovery reaches 74.66%. In conclusion, D-101 resin can be applied to purify triterpenes in *Cyclocarya paliurus*.

Key words *Cyclocarya paliurus*, Triterpene, Macroporous resin, Purification

引言

青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk.)具有较高的医疗价值和保健功能,已引起国内外学

者的关注^[1-4],青钱柳多糖、黄酮等活性功能方面的研究成果也已有报道^[5-6]。青钱柳叶三萜是青钱柳的主要生物活性成分之一^[7]。三萜类化合物具有抗肿瘤、防治心脑血管疾病及提高人体免疫力等多

收稿日期: 2009-11-20 修回日期: 2010-04-01

* 国家林业局公益项目(200904046)和江苏高等学校创新团队科研计划资助项目(苏教科[2009]10号)

作者简介: 吴彩娥,教授,博士生导师,主要从事食品工程技术及食品活性物质分离纯化研究, E-mail: sxwucaie@163.com

种生物活性^[8],因而分离纯化青钱柳叶三萜类化合物具有研究意义。

目前,关于青钱柳三萜类化合物的研究报道较少^[9-13],并且已有研究都是集中在鉴定成分、测定单体结构方面,关于青钱柳三萜的提取、纯化、制备工艺的研究鲜见报道。大孔吸附树脂因其具有吸附容量大、吸附速度快、选择性好、再生处理简单等优点,在天然产物的提取中被广泛使用^[14]。本文考察3种大孔吸附树脂对青钱柳叶三萜粗提物静态吸附与解吸,筛选合适的大孔吸附树脂并进行动态的吸附与解吸试验,旨在为青钱柳三萜的提取与分离纯化提供理论依据和技术参数。

1 试验材料及仪器

1.1 试验材料

青钱柳叶:选自镇江市苗圃基地,安徽种源,三年生青钱柳,取其功能叶,干燥后备用。

试验试剂:无水乙醇、石油醚、冰乙酸、乙酸乙酯、高氯酸,均为分析纯,购自南京化学试剂有限公司。

大孔吸附树脂:AB-8型、D-101型、HPD-100型,购自沧州宝恩化工有限公司。

1.2 试验仪器与设备

TU-1800PC型紫外可见光光度计,QT-58A型紫外智能检测仪,BSZ-100型自动部分收集器,HG101-3(3A/3AD)型电热鼓风干燥箱,HY-4型调速多用振荡器,RE-52型旋转蒸发仪,层析柱。

2 试验方法

2.1 试验材料预处理

原料准备:青钱柳叶干燥后粉碎,过40目筛,贮存备用。称取粉末50g,用石油醚(沸程:60~90℃)400mL,65℃回流提取2次,每次2h,除去脂肪;药渣用91%乙醇400mL回流提取,抽滤,滤液旋转蒸发浓缩,干燥后得到浸膏,称取一定量的浸膏用蒸馏水溶解至一定体积,备用。

大孔吸附树脂预处理:取适量树脂,用95%的乙醇浸泡24h,使其充分溶胀和初步除杂。浸泡24h后,用乙醇洗涤至流出的液体与相同体积的蒸馏水混合不显白色浑浊,再用蒸馏水反复洗涤,直至没有醇味,备用。

2.2 树脂静态吸附量及解吸率的测定

称取预处理后的D-101、AB-8、HPD-1003种型号的大孔吸附树脂(湿)各2g,置磨口锥形瓶中,分别加入三萜粗提液100mL,于25℃下恒温水浴振荡24h,使其充分吸附后,过滤,测定滤液中剩

余的三萜质量浓度。各树脂在25℃下的吸附量计算公式为

$$Q = \frac{(C_0 - C_1)V_1}{M}$$

式中 Q ——吸附量,mg/g

C_0 、 C_1 ——吸附前、后溶液中青钱柳三萜的质量浓度,mg/mL

V_1 ——溶液体积,mL

M ——树脂质量,g

将上述吸附饱和的树脂用水洗至Molish反应呈阴性,再加入70%乙醇100mL,置于25℃恒温水浴振荡24h,过滤,测定滤液中青钱柳三萜质量浓度。各树脂在25℃下的解吸率计算公式为

$$S = \frac{V_2 C_2}{Q} \times 100\%$$

式中 V_2 ——洗脱液的体积,mL

C_2 ——洗脱液的质量浓度,mg/mL

2.3 动态吸附与解吸试验

2.3.1 进样质量浓度

取经过预处理的D-101型大孔吸附树脂,湿法装柱(1.6cm×50cm)。依次用三萜质量浓度为0.5、1.5、2.5mg/mL的样品液过柱,每1BV(BV为树脂床体积,1BV即表示1倍树脂床体积)收集一次馏分,跟踪测定三萜质量浓度,直至泄漏点(流出液的三萜质量浓度达到进样质量浓度的1/10)的出现。

2.3.2 进样流速

取三萜质量浓度为1.5mg/mL的样品液过柱,分别调节流速1、2、3BV/h上样,每1BV收集一次馏分,并跟踪测定每个馏分的三萜质量浓度,直至泄漏点的出现。

2.3.3 洗脱液体积分数

吸附饱和的D-101型大孔吸附树脂柱,先用水洗至Molish反应呈阴性,然后分别用不同体积分数的乙醇(50%、70%、95%)以1BV/h的流速洗脱,每1BV收集一次馏分,并测定三萜的质量浓度,洗脱率的计算公式为

$$W = \frac{C_2 V_2}{(C_0 - C_1)V_0 - C_3 V_3} \times 100\%$$

式中 C_3 ——蒸馏水洗柱后水洗液的质量浓度,mg/mL

V_0 、 V_3 ——上样、水洗液的体积,mL

2.3.4 洗脱速度

吸附饱和的D-101型大孔吸附树脂柱,先用水洗至Molish反应呈阴性,然后用50%乙醇洗脱,设置洗脱速度分别为1、2、3BV/h。每1BV收集一

次馏分,并测定三萜的质量浓度,计算洗脱率。

2.4 测定方法

2.4.1 标准曲线的绘制

对照品溶液的配制:精密称取齐墩果酸粉末 10 mg,加乙酸乙酯定容至 50 mL。

精密吸取齐墩果酸对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,分别加 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.5 mL,高氯酸 1.4 mL,摇匀,60℃ 水浴 15 min,冰浴冷却后,转移至 10 mL 容量瓶中加乙酸乙酯稀释至刻度。摇匀,在 560 nm 波长处测定吸光度 A ,以不加对照品溶液而直接加 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.5 mL、高氯酸 1.4 mL 后用乙酸乙酯稀释至刻度的混合溶液为空白对照,得质量浓度 C 与 A 的回归方程: $A = 41.857C + 0.0016, R^2 = 0.9996$ 。

2.4.2 提取物中三萜纯度的测定

将经大孔吸附树脂纯化前和纯化后的三萜溶液分别减压浓缩,干燥,得到总三萜粉末。准确称取纯化前和纯化后的总三萜粉末各 1 g,分别溶于 50% 乙醇并定容到 100 mL,各精密吸取 20 μ L,用香草醛-冰醋酸法测定吸光度 A (平行测定 3 次求平均值)。提取物中的三萜纯度计算公式为

$$E = \frac{10(A - 0.0016)V}{41.857 \times 0.02M_1} \times 100\%$$

式中 V ——溶液的体积, mL

M_1 ——总三萜粉末的质量, mg

2.4.3 三萜得率的计算

三萜得率的计算公式为

$$F = \frac{M_2}{M_0} \times 100\%$$

式中 M_2 ——50% 乙醇洗脱液中三萜质量, mg

M_0 ——三萜上样质量, mg

3 结果与分析

3.1 大孔吸附树脂对青钱柳三萜的吸附量比较

根据不同型号树脂的不同性质和应用范围,选择 AB-8 型、D-101 型、HPD-100 型 3 种树脂进行静态吸附与解吸试验。

由表 1 可以看出,3 种型号大孔吸附树脂中,D-101 型树脂对青钱柳三萜吸附量最高,达到 57.5 mg/g;HPD-100 型树脂次之,AB-8 型树脂最低。AB-8 型是一种弱极性的大孔吸附树脂,与青钱柳三萜的极性差异较大,所以对其吸附能力较差。而 D-101 型和 HPD-100 型是非极性的大孔吸附树脂,比较适合青钱柳三萜的吸附。由于比表面积等其他性质的差异,D-101 型树脂比 HPD-100 型树脂的吸附量更高。

表 1 大孔吸附树脂对青钱柳三萜的吸附量比较

Tab.1 Comparison of adsorption capacity of three type of macroporous resin on triterpenes in *Cyclocarya paliurus*

参数	大孔吸附树脂型号		
	HPD-100	D-101	AB-8
样液初始质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.75	3.75	3.75
吸附 24 h 后质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.65	2.60	2.73
树脂吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	55.0	57.5	51.9

3.2 大孔吸附树脂对青钱柳三萜的解吸率比较

由表 2 可以看出,D-101 型大孔吸附树脂对青钱柳三萜的解吸率最高,达到 96.51%;HPD-100 型树脂次之,AB-8 型树脂最低。大孔吸附树脂在分离有效成分时是利用吸附的可逆性进行解吸。由于树脂极性、孔径、比表面积不同,对青钱柳三萜的吸附作用力不同,解吸难易也存在差别。通过以上分析可知:D-101 型大孔吸附树脂不仅具有较大的吸附量,而且具有较高的解吸率。所以在动态吸附和洗脱试验时选用 D-101 型大孔吸附树脂。

表 2 大孔吸附树脂对青钱柳三萜的解吸率比较

Tab.2 Comparison of desorption capacity of three type of macroporous resin on triterpenes in *Cyclocarya paliurus*

参数	大孔吸附树脂型号		
	HPD-100	D-101	AB-8
解吸前吸附三萜质量/mg	110.0	115.0	103.8
解吸液质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.98	1.11	0.89
解吸率/%	89.02	96.51	78.43

3.3 进样质量浓度对吸附性能的影响

由图 1 可知,进样质量浓度为 2.5 mg/mL 时,泄漏点出现在 4 BV 附近;进样质量浓度为 0.5 mg/mL 时,泄漏点出现在 12 BV 附近;进样质量浓度为 1.5 mg/mL 时,泄漏点出现在 8 BV 附近。

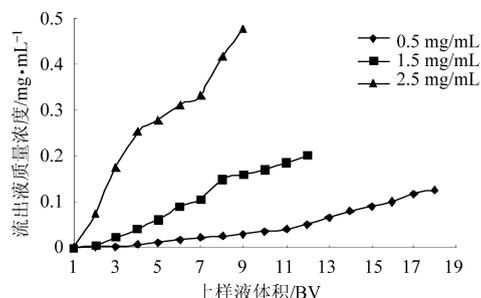


图 1 进样质量浓度对吸附性能的影响曲线

Fig.1 Effect of concentration of the original solution on the adsorption

根据泄漏曲线计算出 3 种不同进样质量浓度所对应的树脂吸附量。进样质量浓度分别为 0.5、1.5、2.5 mg/mL 时,相对应的吸附质量(80 mL 湿树

脂对三萜的吸附质量)为 538.8、1 080.8、899.2 mg。综合泄漏曲线和树脂吸附量的考察,进样质量浓度为 0.5 mg/mL 时,泄漏点虽然出现得最迟,但导致循环周期过长,而且吸附量低;进样质量浓度为 1.5 mg/mL 时,在泄漏点处,大孔吸附树脂吸附青钱柳三萜的吸附量最高,而且在泄漏点出现之前三萜质量浓度的增幅较缓。因此,选择 1.5 mg/mL 为最佳进样质量浓度。

3.4 进样流速对吸附性能的影响

由图 2 所示的泄漏曲线可知,当进样流速为 1 BV/h 时,泄漏点出现在 12 BV 附近;当进样流速为 2 BV/h 时,泄漏点出现在 8 BV。当进样流速为 3 BV/h 时,泄漏点出现在 5 BV 左右。

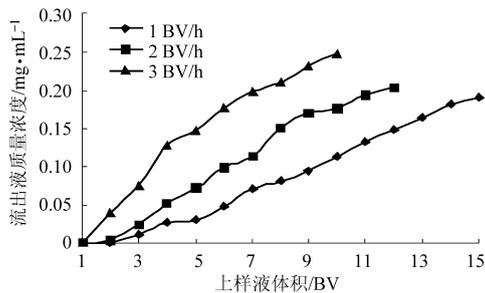


图 2 进样流速对吸附性能的影响曲线

Fig. 2 Effect of the velocity of flow on the adsorption

根据泄漏曲线,计算出 3 种进样流速时, D-101 型大孔吸附树脂对青钱柳三萜的吸附量。进样流速分别为 1、2、3 BV/h 时,相对应的吸附质量分别为 1 321.2、1 078.4、676.5 mg。由此可知,随着上样流速的提高,树脂的吸附量呈下降趋势。综合泄漏曲线和吸附量可以看出,虽然进样流速为 1 BV/h 时,泄漏点出现得最晚,但是会造成时间过度延长,工作效率低下;而进样流速为 2 BV/h 时,虽然吸附量相对稍低,但工作效率高于 1 BV/h;进样流速为 3 BV/h 时,由于流速太快,上样液还未被树脂完全吸附就已通过层析柱,使树脂的吸附效率降低。综合考虑,选择 2 BV/h 为最适宜的进样流速。

3.5 洗脱液体积分数对洗脱性能的影响

根据 2.3.3 节所示方法,依次按 1 BV 收集馏分,并测定各馏分中的三萜质量浓度。图 3 为用 50%、70%、95% 3 种不同体积分数的乙醇溶液对青钱柳叶三萜的洗脱效果图。

经计算,50%、70% 和 95% 的乙醇对青钱柳三萜的洗脱率分别为 93.50%、75.74%、62.96%。可以看出,95% 的乙醇洗脱时,洗脱率最低,而 70% 的乙醇洗脱时,洗脱速度虽然稍快,但洗脱率低于 50% 乙醇,故选择 50% 乙醇为最佳洗脱剂。

3.6 洗脱速度对洗脱性能的影响

由图 4 可知,当洗脱速度为 1 BV/h 时,洗脱率

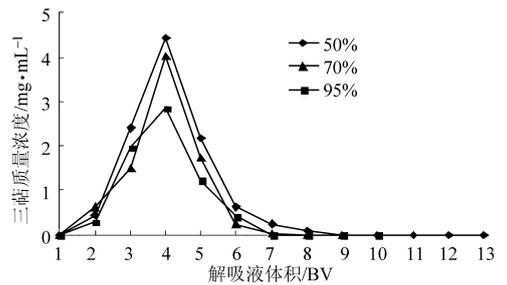


图 3 乙醇体积分数对 D-101 型大孔树脂洗脱性能的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of ethanol on the desorption properties

为 92.50%, 洗脱率高, 但有拖尾现象, 溶剂浪费; 当洗脱速度为 3 BV/h 时, 洗脱率为 67.50%, 洗脱速率快, 出峰早, 但洗脱率低; 当洗脱速度为 2 BV/h 时, 洗脱率为 96.02%, 洗脱率最高, 且没有明显拖尾现象, 洗脱效率高。因此, 选择 2 BV/h 为最佳洗脱速度。

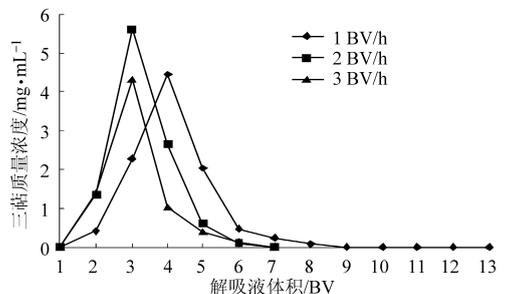


图 4 洗脱速度对 D-101 型大孔树脂洗脱性能的影响

Fig. 4 Effect of the velocity on the desorption properties

3.7 青钱柳三萜纯度比较

按照 2.4.2 节所示方法测得大孔吸附树脂纯化前三萜溶液的吸光度平均值为 0.129, 根据公式求得三萜纯度为 15.2%, 纯化后的三萜溶液 (50% 乙醇洗脱时从出峰开始到峰尾结束, 即图 4 中 1~5 BV 收集的样品) 的吸光度平均值为 0.534, 根据公式求得三萜纯度为 63.7%; 三萜得率为 74.66%。比较可以看出: 经过纯化后, 三萜纯度是纯化前的 4.1 倍。

4 结束语

本文从吸附性能、纯化能力等方面考察了树脂对青钱柳三萜的吸附效果。结果表明 D-101 型树脂对青钱柳总三萜具有良好的吸附性能, 最适宜进样速度与质量浓度分别为 2 BV/h 和 1.5 mg/mL。洗脱时洗脱剂乙醇的最适宜体积分数与洗脱速度分别为 50% 和 2 BV/h。纯化后三萜纯度达到 63.7%, 是粗提物纯度 (15.2%) 的 4.1 倍。

参 考 文 献

- 1 方升佐, 洪香香. 青钱柳资源培育与开发利用的研究进展[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(1): 95 ~ 100.
Fang Shengzuo, Fu Xiangxiang. Progress and prospects on silviculture and utilization of *Cyclocarya paliurus* resources [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2007, 31(1): 95 ~ 100. (in Chinese)
- 2 冯宗帅, 吴彩娥, 方升佐, 等. 青钱柳叶总黄酮超声辅助提取工艺优化[J]. 农业机械学报, 2009, 40(2): 130 ~ 134.
Feng Zongshuai, Wu Caie, Fang Shengzuo, et al. Technology optimization of total flavonoids extraction from *Cyclocarya paliurus* leaves by ultrasonic assistance [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(2): 130 ~ 134. (in Chinese)
- 3 Xie Mingyong, Li Lei, Nie Shaoping, et al. Determination of speciation of elements related to blood sugar in bioactive extracts from *Cyclocarya paliurus* leaves by FIA-ICP-MS [J]. European Food Research and Technology, 2006, 223(2): 202 ~ 209.
- 4 吴彩娥, 方升佐, 冯宗帅, 等. 青钱柳叶总黄酮大孔树脂纯化工艺[J]. 农业机械学报, 2009, 40(6): 133 ~ 137.
Wu Caie, Fang Shengzuo, Feng Zongshuai, et al. Purification process of total flavonoids in *Cyclocarya paliurus* leaves with macroporous resins [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(6): 133 ~ 137. (in Chinese)
- 5 Xie Jianhua, Xie Mingyong, Nie Shaoping, et al. Isolation, chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja [J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1 626 ~ 1 632.
- 6 Zhang Juan, Shen Qiang, Lu Jincai, et al. Phenolic compounds from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja and their inhibitory activity against PTP1B [J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1 491 ~ 1 496.
- 7 陈达炜, 郭素华. 青钱柳化学成分研究进展[J]. 海峡药学, 2008, 20(11): 63 ~ 65.
Chen Dawei, Guo Suhua. Advances in research on chemical constituents of *Cyclocarya paliurus* [J]. Strait Pharmacy, 2008, 20(11): 63 ~ 65. (in Chinese)
- 8 蒙丽丽, 黄初升, 刘红星. 具有生物活性的天然三萜化合物的研究进展[J]. 广西植物, 2008, 28(6): 856 ~ 860.
Meng Lili, Huang Chusheng, Liu Hongxing. Advances in research on natural triterpenoids with bioactivities [J]. Guihaia, 2008, 28(6): 856 ~ 860. (in Chinese)
- 9 钟瑞建, 高幼衡, 徐昌瑞, 等. 青钱柳中五环三萜成分的研究[J]. 中草药, 1996, 27(7): 387 ~ 388.
Zhong Ruijian, Gao Youheng, Xu Changrui, et al. Pentacyclic triterpenoids from roundfruit *Cyclocarya paliurus* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1996, 27(7): 387 ~ 388. (in Chinese)
- 10 钟瑞建, 舒任庚, 倪小兰, 等. 青钱柳酸 A 的结构研究[J]. 药学报, 1996, 31(5): 398 ~ 400.
Zhong R J, Shu R G, Ni X L, et al. Studies on the chemical structure of cyclocaric acid A [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1996, 31(5): 398 ~ 400. (in Chinese)
- 11 Shu R G, Xu C R, Li L N, et al. Cyclocariosides II and III: two secodammarane triterpenoid saponins from *Cyclocarya paliurus* [J]. Planta Medica, 1995, 61(6): 551 ~ 553.
- 12 舒任庚, 徐昌瑞, 黎莲娘. 青钱柳甜味成分研究[J]. 药学报, 1995, 30(10): 757 ~ 761.
Shu R G, Xu C R, Li L N. Studies on the sweet principles from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) iljinsk [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1995, 30(10): 757 ~ 761. (in Chinese)
- 13 舒任庚, 刘玉凤, 陈杰, 等. 青钱柳植物中三萜成分的研究[J]. 中药材, 2005, 28(7): 558 ~ 559.
Shu Rengeng, Liu Yufeng, Chen Jie, et al. Studies on the triterpenoids of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2005, 28(7): 558 ~ 559. (in Chinese)
- 14 关颖丽, 刘建宇, 尹虹, 等. D-101 型大孔吸附树脂在分离纯化三萜皂苷方面的应用[J]. 中国药房, 2008, 19(30): 2 399.
Guan Yinli, Liu Jianyu, Yin Hong, et al. D-101 macroporous resin application on purification of triterpenoid saponin [J]. China Pharmacy, 2008, 19(30): 2 399. (in Chinese)