

应用大孔吸附树脂吸附分离技术制备菊苣酸的研究

吴启林 袁其朋* 陈养文

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 考察了9种大孔吸附树脂对紫锥菊中菊苣酸的吸附分离性能, 确定大孔吸附树脂吸附分离菊苣酸的工艺条件。结果表明 AB-8 树脂对菊苣酸有良好的吸附分离性能, 其吸附分离菊苣酸的工艺条件为: 质量浓度为 3~4 mg/mL, pH 值为 3 的菊苣酸原料液以 2 mL/min 的流速上柱吸附, 再用 6 倍量树脂体积 (6BV) 的 30% 乙醇以 1 mL/min 的流速上柱进行解吸。AB-8 树脂柱饱和吸附量可达 18.0 mg/mL, 解吸率达 90.2%。经 AB-8 树脂吸附分离, 产品纯度达 20.2%, 纯度比紫锥菊初提物提高了近 5 倍。

关键词: 菊苣酸; 紫锥菊; 大孔吸附树脂; 分离

中图分类号: R284.2

紫锥菊 (*Echinacea purpurea*) 是目前国际上受到普遍重视的一种免疫促进剂和免疫调节剂, 它的提取物及制剂销售额居美国医药市场前 5 名, 受到国内外极大关注^[1-2]。菊苣酸 (*cichoric acid*) 为咖啡酸衍生物, 是紫锥菊中极为重要的免疫活性成分之一。近年来美国和欧洲各国的药理研究表明: 菊苣酸具有增强免疫功能、抗炎作用, 并能抑制透明质酸酶, 保护胶原蛋白 免受可导致降解的自由基的影响^[3-4]。最近的研究还表明, 菊苣酸具有抑制 HIV-1 和 HIV-1 整合酶的作用^[5-8]。因此, 无论在该类植物药中还是在保健食品中, 菊苣酸的含量均成为其制剂的重要质量指标。目前, 国内外关于菊苣酸研究的文献报道主要限于药材和制剂中菊苣酸成分的检测、紫锥菊中菊苣酸初提、利用制备高压液相色谱制备菊苣酸标品等方面。初提得到的初提物菊苣酸含量很低, 而利用制备色谱虽然能得到高纯度的菊苣酸, 但设备要求高、不易放大, 目前只能生产标准品。

大孔吸附树脂吸附分离技术^[9]是采用大孔树脂从中药及其复方中有选择地吸附其中的有效成份, 去除无效成份的一种提取精制的新工艺, 它具有选择性好, 吸附容量大, 再生处理方便, 吸附迅速, 解吸容易, 操作简单等优点。本文采用该技术, 通过对

9 种大孔吸附树脂的筛选试验, 寻找对菊苣酸具有良好吸附分离性能的树脂, 进而确定了吸附分离的生产工艺条件, 为工业生产制备纯度较高的菊苣酸提供依据。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

紫锥菊根 自然干燥, 粉碎。购自浙江省庆元方格医药保健品有限公司。标本由中国农科院蔬菜花卉研究所东惠茹副研究员鉴定。

1.2 主要仪器

日本日立 (HITACHI) 高压液相色谱仪, UV-VIS Detector L-7420 紫外检测器; RE-52A 旋转蒸发器, 河南巩义市英峪予华仪器厂; 真空干燥箱 DZ-2BC 型, 天津市泰斯特仪器有限公司; SBSZ100 数控计滴自动部分收集器, 上海沪西分析仪器厂; 玻璃柱, 内径 2 cm, 柱长 15 cm, 树脂填充体积为 30 mL, 自制。

1.3 试剂

菊苣酸对照品 由本实验室分离纯化, 经湖南师范大学分析测试中心陈波教授检测, 纯度为 93%; 乙醇、盐酸均为分析纯; AB-8, S-8, H103, N KA-9, X-5, D4020, D3520, N KA-2, D4006, 南开大学化工厂。

2 方法与结果

2.1 菊苣酸原料液的制备

紫锥菊根粉末与 40% 乙醇以质量比为 1:15, 在

收稿日期: 2003-12-15

第一作者: 男, 1979 年生, 硕士生

*通讯联系人

E-mail: wuqilin2003@sina.com

90 下回流提取 3 次,每次为 2 h。提取液减压浓缩到原液的 1/10,然后用 6 mol/L 盐酸调其 pH 至 3,离心即得菊苷酸原料液。

2.2 菊苷酸含量测定^[10]

高压液相色谱法(HPLC),采用外标法。

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Alltima C18 (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm),流动相为乙腈 - 1.8%冰醋酸(体积比 25 : 75),流速 1.0 mL/min,检测波长 327 nm,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 5 μL 。

2.2.2 对照品溶液制备及线性考察 精密称取菊苷酸对照品 5.05 mg,用质量分数 70%乙醇溶解、定容于 10 mL 容量瓶中。精密吸取对照溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 μL 注入液相色谱仪中,测定峰面积,以对照品质量 X (μg) 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,得方程 $Y = 401\,209X + 23\,809$, $r = 0.9995$,线性范围 0.25 ~ 3.00 μg 。

2.2.3 供试样品溶液制备 精密称取各种供试样品适量,用 70%乙醇溶解,超声提取 10 min,定容于 10 mL 容量瓶中,用 0.45 μm 滤膜过滤,即得供试样品溶液。实验中取样的水溶液样品,适当稀释,用 0.45 μm 滤膜过滤,直接进样检测。

2.3 树脂的预处理

树脂先用 95%乙醇浸泡 24 h,湿法装柱,用 4BV 左右的 95%乙醇在柱上流动洗脱,洗至乙醇液与水混合(体积比为 1 : 5)不呈白色混浊为止,然后用去离子水洗去乙醇,使洗脱液无醇味即可。

2.4 树脂的筛选

预处理好的 9 种大孔吸附树脂(实验所用吸附树脂的物理性能如表 1)去表面水后,各精密称取 1 g,放置于具塞磨口锥形瓶中,分别加入 35 mL 质量浓度为 3.40 mg/mL 的菊苷酸原料液,在摇床中振荡 24 h,过滤,测定滤液中菊苷酸的浓度。吸附饱和的树脂再各用 30 mL 95%乙醇解吸 24 h,测定解吸液菊苷酸的浓度。计算树脂的吸附量和解吸率,其中树脂吸附量以单位质量湿树脂吸附的菊苷酸量表示,结果见表 2。从表 2 可以看出, S-8, H103 虽然吸附量较大,但洗脱率太低,后来所进行的进一步试验也证明 S-8, H103 不适用于分离(数据在本文未给出)。AB-8 树脂对菊苷酸的吸附量和解吸率比剩余的 6 种树脂都高。由于树脂的实际应用是由树脂的极性、孔径、比表面积等综合性能决定, AB-8 树脂为弱极性树脂,且具有较大的比表面积,而菊苷酸具有酚羟基、羧基结构,具有一定的极性,所以选择性

较好,故选择 AB-8 树脂来吸附分离菊苷酸。

表 1 实验所用吸附树脂的物理性能

Table 1 Physical capacity of the resins

树脂型号	粒径/ mm	比表面积/ (m^2/g)	平均孔径/ nm	极性
AB-8	0.3 ~ 1.25	480 ~ 520	13.0 ~ 14.0	弱极性
S-8	0.3 ~ 1.25	100 ~ 120	28.0 ~ 30.0	强极性
H103	0.3 ~ 1.25	1000 ~ 1100	8.5 ~ 9.5	非极性
NKA-9	0.3 ~ 1.25	250 ~ 290	15.5 ~ 16.5	极性
X-5	0.3 ~ 1.25	500 ~ 600	29.0 ~ 30.0	非极性
D4020	0.3 ~ 1.0	540 ~ 580	10.0 ~ 10.5	非极性
D3520	0.3 ~ 1.0	480 ~ 520	8.5 ~ 9.0	非极性
NKA-2	0.3 ~ 1.25	160 ~ 200	14.5 ~ 15.5	极性
D4006	0.3 ~ 1.0	400 ~ 440	6.6 ~ 7.5	非极性

表 2 9 种大孔吸附树脂的吸附量与解吸率

Table 2 Adsorbing capacity and desorbing rate of the resins

树脂型号	吸附量/(mg/g)	解吸率/%
AB-8	24.3	94.2
S-8	66.5	19.8
H103	66.6	41.1
NKA-9	21.6	75.2
X-5	22.0	85.2
D4020	21.5	74.3
D3520	20.5	78.4
NKA-2	20.3	90.1
D4006	23.2	78.8

2.5 吸附条件的选择

2.5.1 原料液 pH 值对吸附的影响 按 2.1 中原料液的制备方法,提取得到 pH 值 5.2 的菊苷酸水溶液,取 8 份,每份 25 mL,用 6 mol/L 盐酸和 10% NaOH 分别调 pH 值为 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.2, 6.0 和 8.0,离心,清液加入到一系列 1 g 的已去表面水的 AB-8 树脂中,进行静态吸附。结果见图 1。从图 1 可看出,当原料液 pH 值为 1 ~ 3 时, AB-8 树脂的吸附量比较大。根据大孔吸附树脂吸附原理,吸附过程中吸附介质以分子状态被吸附剂吸附,因此要达到较好的效果必须使吸附质保持分子状态。一般情况下,酸性化合物在适当酸性溶液中充分吸附。菊苷酸在原料中一般以盐的形式存在,当调 pH = 3 时,菊苷酸将成游离态,有利于树脂的吸附。因此,

原料液在上柱前调 pH 值为 3 左右。

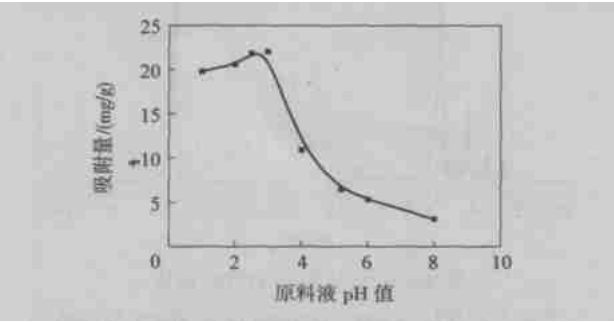


图 1 原料液 pH 对吸附量的影响
Fig. 1 Effects of pH on adsorbing capacity

2.5.2 上柱质量浓度对吸附的影响 pH 值 3,不同质量浓度 (1.5,3.0,4.0 和 5.0 g/L) 的菊苣酸原料液以 1 mL/min 的流量分别通过装柱体积为 30 mL 的 AB-8 树脂柱,进行动态吸附。利用自动部分收集器收集流出液,对其进行检测,结果如表 3。从表 3 可看出,上柱浓度增大,树脂的吸附量增大,但随着浓度的增大,树脂泄漏也加快,反而使树脂吸附量降低。从表 3 可知,上柱质量浓度以 3~4 g/L 为宜。

表 3 上柱浓度对吸附的影响

上柱质量 浓度/ (mg/mL)	穿透时上 柱体积/ mL	穿透时菊 苣酸总吸 附量/mg	饱和和吸 附时上柱体 积/mL	饱和和吸附时 菊苣酸总 吸附量/mg
1.5	150	225	270	405
3.0	96	279	180	540
4.0	78	312	138	552
5.0	54	270	102	510

2.5.3 上柱流速对吸附的影响 pH 值 3,质量浓度为 3.43 g/L 的 100 mL 原料液 4 份,分别按 1, 1.5,2 和 2.5 mL/min 的流量通过装柱体积为 30 mL 的 AB-8 树脂柱,收集流出液,用 HPLC 进行检测,结果如表 4。从表 4 可看出,随着上柱流速的增大,树脂泄漏加快,会使吸附率降低,但如果流速太慢,工作效率会太低,综合考虑树脂的吸附性能及工作效率,确定吸附流速以 2 mL/min 为宜。

2.5.4 穿透曲线的考察 按上述所确定的吸附条件,取 pH=3,质量浓度为 3 mg/mL 的菊苣酸原料液以 2 mL/min 的流速通过装柱体积为 30 mL 的 AB-8 树脂柱,利用自动部分收集器分管收集流出液,对流出液进行检测,结果如图 2。从图2可看出,

表 4 上柱流速对吸附的影响

Table 4 Effects of the flow rate on adsorption

上柱流量/ (mL/min)	流出液菊苣 酸量/mg	吸附率/ %
1	31.9	90.7
1.5	42.2	87.7
2	47.0	86.3
2.5	85.1	75.2

30 mL AB-8 树脂可处理 96 mL (3BV 左右) 的原料液量而基本不发生泄漏。此时树脂床共吸附菊苣酸 288 mg,湿态 AB-8 树脂对菊苣酸的工作吸附量(泄漏前吸附量)可达 9.6 mg/mL,达到饱和时可处理 180 mL (6BV),湿态饱和吸附量可达 18.0 mg/mL。

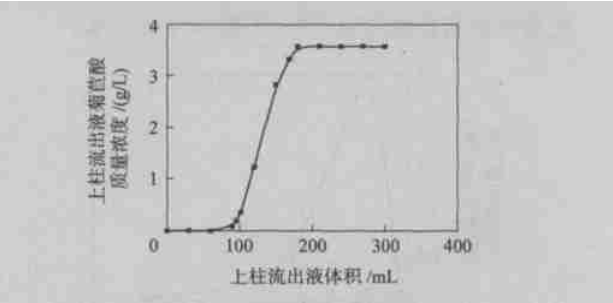


图 2 AB-8 树脂柱的穿透曲线
Fig. 2 Breakthrough curve of AB-8 resin

2.6 解吸条件的选择

2.6.1 解吸剂的选择 大孔吸附树脂吸附后一般用一定浓度的乙醇、甲醇水溶液洗脱,考虑到甲醇的毒性,所以实验选用乙醇水溶液作洗脱剂。50 mL 质量浓度为 2.97 mg/mL 的原料液以 2 mL/min 的流速通过装柱体积为 30 mL 的 AB-8 树脂柱,吸附完,依次用 150 mL 的去离子水及 210 mL 不同质量分数 (10%,30%,50%和 70%) 的乙醇溶液进行梯度洗脱,分别收集各部分洗脱液,用 HPLC 进行检测,计算各种洗脱剂的洗脱率。水洗的洗脱率为 5.1%,醇洗的洗脱率分别为 25.4%,62.6%,5.0%和 0.9%。从结果可以看出,水洗基本不能把菊苣酸洗脱下来,10%乙醇只能把少量的菊苣酸洗下来,30%乙醇洗脱完后,能使总的洗脱率达到 90%以上。菊苣酸主要集中在 10%,30%乙醇洗脱部分,考虑到乙醇浓度越高,带出的杂质也越多,所以选用 30%乙醇作为洗脱剂即可。

2.6.2 洗脱流速的确定 4 份各 150 mL 的质量浓度为 1.71 mg/mL 原料液,以 2 mL/min 的流速通过

4 根 AB-8 树脂柱,吸附后,先用 150 mL 的去离子水洗至流出液无色,再用 180 mL 的 30 %乙醇溶液分别以 0.5, 1, 1.5 和 2 mL/min 的流速进行洗脱,测定洗脱液中菊苣酸含量,计算菊苣酸洗脱率,各自洗脱率分别为 92.3 %, 90.1 %, 86.1 % 和 78.7 %。从结果可知,用相同体积的洗脱剂洗脱,流速越慢,洗脱率越高,但流速过慢,耗时,不经济。综合考虑,洗脱流速选择 1 mL/min 为宜。

2.6.3 洗脱曲线的确定 按上述所确定的吸附、洗脱条件,取菊苣酸原料液进行上柱吸附,然后用水洗至流出液无色,再用 30 %乙醇洗脱。用自动部分收集器收集洗脱液,测定其中的菊苣酸含量,据此绘制洗脱曲线,见图 3。从图 3 可以看出,当洗脱液体积达到 180 mL 左右,即 6 倍量树脂体积时,基本上能把吸附的菊苣酸洗脱下来,洗脱率为 90.2 %。

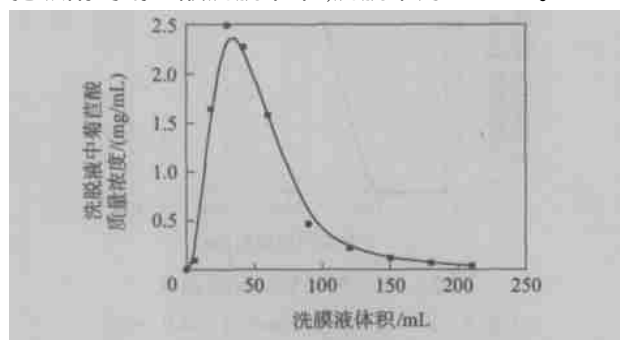


图 3 AB-8 树脂洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of AB-8 resin

2.7 产品纯度及谱图

按上述确定的工艺条件进行 3 次重复试验,洗脱液浓缩蒸干,得到棕黄色产品,经 HPLC 检测,纯度分别为 19.3 %, 19.6 %, 21.7 %, 平均纯度为 20.2 %。上柱前提取液浓缩得到的紫锥菊初提物平均纯度为 4.1 %,经过 AB-8 树脂的吸附分离,纯度提高了近 5 倍。图 4 为所得产品与菊苣酸标品的 HPLC 谱图。

3 讨论

AB-8 树脂对菊苣酸具有良好的吸附性能,经树脂吸附分离,产品纯度达 20.2 %,纯度比初提物提高了近 5 倍。利用 AB-8 树脂吸附分离技术从紫锥菊根中提取纯化菊苣酸是可行的。该工艺操作简单,

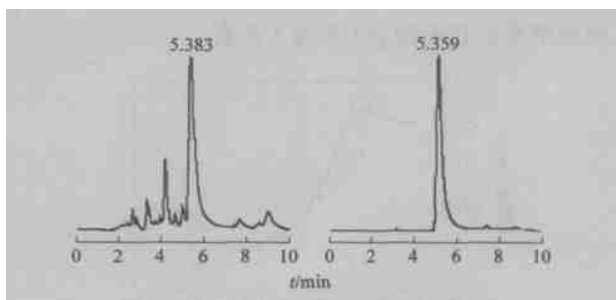


图 4 产品与标品 HPLC 谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of product (A) and reference substance (B)

方便,成本低,适合工业化生产,生产的较高纯度的菊苣酸可作为医药原料或添加到保健食品中。

参 考 文 献

- [1] 肖培根. 国际流行的免疫调节剂——紫锥菊及其制剂[J]. 中草药, 1996, 27(1): 46 - 48
- [2] 刘一兵. 紫锥菊植物制剂的化学、免疫作用与临床[J]. 国外医药-植物药分册, 2001, 16(2): 47
- [3] 张莹, 刘珂, 吴立军. 紫锥菊属药用植物研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(9): 852 - 855
- [4] Soicke H, Al-Hassan G, Gorler K. Weitere kaffeensaure derivat aus echinacea purpurea[J]. Plants Med, 1988, 54: 175
- [5] Robinson W E Jr. L-chicoric acid, a dicaffeoyltaric acid inhibitor of HIV integrase, improves on the in vitro anti-HIV effect of zidovudine and a protease inhibitor (AG1350) [J]. Antiviral Res, 1998, 39: 101 - 111
- [6] Zhaiwei Lin, Nouri Neamati, He Zhao, et al. Chicoric acid analogues HIV-1 intergrase inhibifors [J]. J Med Chem, 1999, 42: 1401 - 1404
- [7] He Zhao, Nouri Neamati, Abhijit Mazumder, et al. Arylamide inhibitors of HIV-in-tergrase [J]. J Med Chem, 1997(10): 1186 - 1194
- [8] Robinson W E, Manered Jr, Renecke G. Inhibitors of HIV-1 repbication that inhibit HIV integrase [J]. Medicae Sciences, 1996, 93: 6326 - 6331
- [9] 钱庭宝. 吸附树脂及其应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1990, 100 - 101
- [10] 罗旭彪, 陈波, 姚守拙, 等. 紫锥菊及其复方制剂中菊苣酸的 HPLC 测定 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 890 - 891

(下转第 52 页)

(2) 对于泡沫密度不小于 0.3 g/cm^3 的梯度密度聚氨酯泡沫塑料,当发泡剂用量约为聚醚的 10 % 时,冲击强度和弯曲强度达到最大值。

(3) 采用夹芯结构得到的梯度密度聚氨酯泡沫塑料,随表层厚度增加(密度梯度减小),冲击强度下降,压缩强度和抗弯强度上升。

参 考 文 献

- [1] Wronski Maciei. A new hypoelastic model of the mechanical behaviour of polyurethane foams[J]. Computational Materials Science, 1996, 5(1 - 3):271 - 276
- [2] Mason G L, Green J G, Hall K G, et al. Rigid

polyurethane foam testing for mine neutralization and vehicle traction performance [J]. J of Terramechanics, 2000, 37(2):87 - 98

- [3] Okuzono S, Kisak H, Tamano Y. Key aspects of novel catalyst systems in air-water blown integral skin foams [J]. Journal of Cellular Plastics, 1995, 31(3):277
- [4] 付步芳. RPUF 手工模塑发泡常见缺陷分析[J]. 材料开发与应用, 2002, 17(1):31 - 33
- [5] 田春蓉,周秋明,邱应明,等. 厚度对半硬质聚氨酯整皮泡沫力学性能的影响[J]. 四川化工与腐蚀控制, 2002, 5(6):6 - 10
- [6] 周秋明,王建华,芦艾,等. 硬质聚氨酯泡沫塑料模塑成型压力研究[J]. 工程塑料应用, 2002, 30(9):19 - 21

Properties of gradient density polyurethane foam

Zhao Chun-yu Jiang Zhi-guo Zhang Wen-zhi Zhou Heng-jin

(College of Materials Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: By changing the contents of blowing agent and the inner size and changing the density distribution of structural polyurethane foam, the influences of the inner structure on the properties of gradient density polyurethane foam were investigated. The results show that the impact and flexural strengthes of this materials reach a maximum when the content of blowing foam is 10 % and the inner structure can improve the impact strength obviously.

Key words: density distribution; gradient; polyurethane foam

(责任编辑 朱晓群)

(上接第 48 页)

Preparation of cichoric acid by adsorption separation of macroporous resin

Wu Qi-lin Yuan Qi-peng Chen Yang-wen

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: In order to set up the technology for adsorbing and separating cichoric acid from *Echinacea purpurea* with macroporous adsorption resin, 9 types of resin were investigated. The results showed that among 9 types of macroporous adsorption resin, the AB-8 resin was the best for adsorbing and separating cichoric acid in the following technological conditions: the concentration of sample of *Echinacea purpurea* extract, $3 \sim 4 \text{ mg/mL}$; pH, 3; the flow rate of fluid, 2 mL/min ; the eluting reagent, 30 % ethanol (6 folds the volume of the resin); eluting rate, 1 mL/min . Under the optimal conditions, the maximum adsorbing capacity of AB-8 resin for cichoric acid was 18.0 mg/mL , with a desorbing rate of 90.2 %. With the adsorption and separation of AB-8 resin, the product was got with a content of 20.2 %, nearly increased 5 times than that of *Echinacea purpurea* extract.

Key words: cichoric acid; *Echinacea purpurea*; macroporous adsorption resin; separation

(责任编辑 云志学)