

紫锥菊中菊苣酸提取纯化工艺研究

吴启林, 袁其朋*, 陈养文*

(北京化工大学化学工程学院 制药工程系, 北京 100029)

紫锥菊属(即松果菊属)植物是原产美洲的一类菊科野生花卉。该属植物共有 8 个种及数个变种, 已开发为药品的主要为紫锥菊 *Echinacea purpurea* (L.) Moench、狭叶紫锥菊 *E. angustifolia* DC. 和淡白紫锥菊 *E. pallida* (Nutt.) Nutt. 其中紫锥菊是目前受到国际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销售排名前 5 名^[1,2]。目前紫锥菊在我国北京、上海和长沙等地已成功引种。菊苣酸(cichoric acid)为咖啡酸衍生物, 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 III 免受可导致降解的自由基的影响^[3,4]。近来的研究还表明, 菊苣酸具有抑制 HIV-1 和 HIV-1 整合酶的作用^[5]。关于菊苣酸研究的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及利用制备高效液相色谱制备菊苣酸对照品。初提得到的初提物中菊苣酸含量很低, 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, 目前只能生产对照品。因此, 本实验对从紫锥菊中提取纯化菊苣酸的工艺进行了研究, 为菊苣酸的工业化生产提供依据。

1 仪器与材料

日本日立 Hitachi 高效液相色谱仪, UV-V IS 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); DZ—2BC 型真空干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

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, 标本由中国农业科学院蔬菜花卉研究所东惠茹副研究员鉴定。菊苣酸对照品购自德国汉堡 Addipharma 公司, 纯度为 94%; AB-8 树脂购自南开大学化工厂, 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定菊苣酸的含量^[6,7]

2.1.1 色谱条件: 色谱柱: Alltima C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-1.8% 冰醋酸 (25:75); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 327 nm; 柱

温: 35 °C; 进样量: 5 μL。

2.1.2 标准曲线的制备: 精密称取菊苣酸对照品 5.05 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇溶解并加至刻度。精密吸取对照品溶液 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。以菊苣酸质量 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 得方程: $Y = 401\,209 X + 23\,809$, $r = 0.999\,5$, 线性范围: 0.25~3.03 μg。

2.1.3 供试品溶液的制备: 精密称取各提取物、纯化物、萃取物样品适量, 置 10 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇溶解, 超声提取 10 min, 加 70% 乙醇至刻度, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.1.4 测定: 采用外标法进行测定。

2.2 紫锥菊中菊苣酸提取

2.2.1 提取溶剂的选择: 从紫锥菊中提取菊苣酸一般采取乙醇、甲醇或它们的水溶液。考虑到试剂价格和工业化生产的可行性, 本实验选择乙醇作为提取溶剂。分别称取 20 g 紫锥菊根 7 份, 以 10 倍质量的 0、20%、40%、55%、70%、85%、100% 乙醇水溶液在 80 °C 加热回流提取 2 h, 所得滤液蒸干, 得提取物, 采用 HPLC 测定菊苣酸的含量, 并计算菊苣酸的得率。结果见图 1。可见, 随着乙醇体积分数的增加, 菊苣酸的得率逐渐升高, 当乙醇溶液的体积分数为 40% 时, 菊苣酸的得率达最大。随后, 菊苣酸的得率随乙醇体积分数的增加而降低。这是因为紫锥菊根

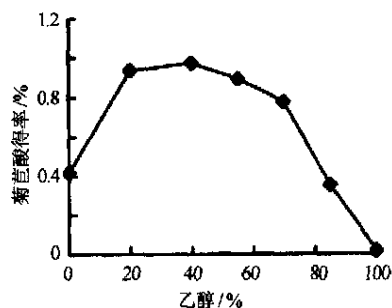


图 1 乙醇体积分数对菊苣酸提取得率的影响

Fig. 1 Effect of alcohol concentration on cichoric acid yield

* 收稿日期: 2003-12-04

* 通讯作者 Tel: (010) 64437507

中含有多酚氧化酶,乙醇能使多酚氧化酶失活,当直接用水提取时,菊苣酸在几分钟之内迅速被氧化,所以用水提菊苣酸得率较低;而乙醇体积分数的增加可阻止菊苣酸被氧化^[8],但乙醇的体积分数过高时,药材组织内的菊苣酸在乙醇溶液中的溶解度降低,导致菊苣酸不能被提取出来。

2.2.2 菊苣酸提取条件的优化:在预试验的基础上,选择提取温度(A)、溶剂用量(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为因素,各取 3 个水平,以菊苣酸得率为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选,结果见表 1、2。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A/	B/倍	C/min	D/次
1	70	5	60	1
2	80	10	120	2
3	90	15	180	3

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	菊苣酸得率/%
1	1	1	1	1	0.475 6
2	1	2	2	2	0.933 5
3	1	3	3	3	1.056 3
4	2	1	2	3	1.004 0
5	2	2	3	1	0.623 6
6	2	3	1	2	0.981 0
7	3	1	3	2	0.796 8
8	3	2	1	3	1.021 0
9	3	3	2	1	0.796 7
K_1	2.465 4	2.276 4	2.477 6	1.895 9	
K_2	2.608 6	2.578 1	2.734 2	2.711 3	
K_3	2.614 5	2.834 0	2.476 7	3.081 3	
R	0.149 1	0.557 6	0.257 5	1.185 4	

可见最佳组合为 $A_3B_3C_2D_3$, 即温度为 90 , 溶剂用量为 15 倍, 提取 3 次, 每次 2 h。按照正交试验得到的最优提取条件, 进行 3 次重复试验, 提取物中菊苣酸的质量分数为 4.1%, 菊苣酸提取得率为 1.12%。

2.3 提取物的树脂法纯化: 提取液浓缩至原来的 1/10, 回收乙醇, 作为大孔吸附树脂的工作液。通过对 AB-8、S-8、H103、NKA-9、X-5、D402Q、D352Q、NKA-2、D4006 大孔吸附树脂进行静态吸附试验, 发现 AB-8 树脂对菊苣酸的饱和和吸附容量最高, 达 56.36 mg/g 湿树脂。在解吸试验中, AB-8 树脂吸附饱和后, 依次用水及 10%、30%、50%、70%、90% 乙醇溶液进行洗脱, 收集各部分洗脱液。HPLC 分析结

果表明, 水及 10% 乙醇洗脱液中没有菊苣酸洗脱下来, 30%、50% 乙醇洗脱液中含有菊苣酸, 而 70%、90% 乙醇溶液中不含菊苣酸。故树脂吸附饱和后, 先用水洗脱至无色, 再用 50% 乙醇洗脱, 即可得菊苣酸粗品。

在静态吸附研究的基础上, 上 AB-8 树脂玻璃柱(自制, 15 cm × 2 cm, 树脂床体积为 30 mL)进行动态穿透试验。上柱液中菊苣酸质量浓度为 3.30 mg/mL, 以 2 BV/h 连续上柱, 自动部分收集流出液, 采用 HPLC 法测定菊苣酸含量, 得到 AB-8 树脂泄漏曲线(图 2)。可见 30 mL AB-8 树脂可处理 6 BV (180 mL) 的物料液量而基本不发生泄漏。此时树脂床共吸附菊苣酸 594 mg ($6 \times 30 \times 3.30$), 湿态 AB-8 树脂对菊苣酸的工作吸附量(泄漏前吸附量)可达 19.8 mg/mL, 达到饱和时可处理 14 BV (420 mL), 饱和和吸附量可达 46.2 mg/mL。

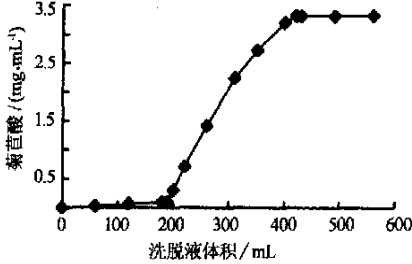


图 2 AB-8 树脂的泄漏曲线

Fig. 2 Leakage curve of AB-8 resin

取 120 mL 含菊苣酸 3.0 mg/mL 水溶液, 上装柱体积为 30 mL 的 AB-8 树脂柱, 上柱完成后, 用去离子水把树脂柱洗至无色。然后用 50% 乙醇溶液洗脱, 自动部分收集器收集洗脱液, 采用 HPLC 法测定菊苣酸含量, 得到 AB-8 树脂的解吸曲线(图 3)。可见用 50% 乙醇溶液洗脱, 当洗脱液体积达到 150 mL 时, 即为床体积的 5 倍时, 基本上能把吸附的菊苣酸洗脱完全。洗脱液用旋转蒸发器浓缩, 得到 1.43 g 黄色粉末, HPLC 测定纯度为 24.22%, 洗脱率为 96.21%。

2.4 醋酸乙酯的萃取纯化: 取 AB-8 树脂处理得到的粉末溶于 10 倍体积水中, 用 6 mol/L HCl 调节至 pH 3, 水溶液分别用醋酸乙酯、正丁醇、异戊醇进行萃取。醋酸乙酯萃取液直接减压浓缩。正丁醇、异戊醇因沸点较高, 回收有一定的困难, 因而萃取液先用 5% NaOH 调节至 pH 6.5, 然后加水反萃, 分取水层, 减压浓缩得粉末。结果所得产品中菊苣酸的质量分数分别为 69.28%、32.52%、46.30%, 因此醋酸乙酯萃取效果最好, 得到的产品纯度最高, 选用醋酸

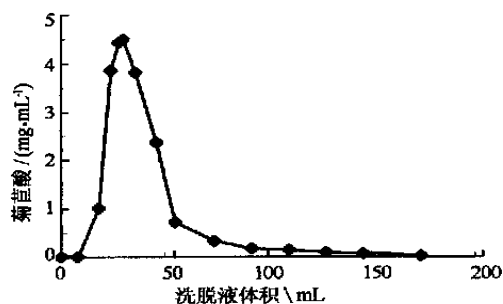


图 3 AB-8 树脂的解吸曲线

Fig. 3 Desorption curve of AB-8 resin

乙酯进行萃取。

溶液的 pH 值对醋酸乙酯萃取的影响的结果见表 3。pH 为 2~3 时, 萃取效果较好, 萃取率高, 产品纯度高。这是由于当 $\text{pH} \leq 3$ 时, 菊苷酸由原来的菊苷酸盐变为游离态, 从而改变了菊苷酸在水相和有机相中的分配率, 因此用醋酸乙酯能很好地把它从水相中萃取出来。

表 3 pH 值对醋酸乙酯萃取效果的影响

Table 3 Effect of pH value on extraction with ethyl acetate as solvent

pH	萃取率/%	萃取物中菊苷酸/%
4.2(原液)	7.45	40.32
2	93.04	65.71
3	96.83	69.28

当溶液的 pH 3 时, 用等体积的醋酸乙酯分别萃取 1~4 次, 菊苷酸的萃取率分别为 41.40%、63.43%、80.51%、96.83%。即醋酸乙酯萃取 4 次可以基本萃取完全。

2.5 产品的检测: 经 40% 乙醇提取、AB-8 树脂吸附、50% 乙醇洗脱、醋酸乙酯萃取最终得到产品为浅黄色粉末, 纯度达 69% 以上。

3 结论

紫锥菊中菊苷酸提取纯化工艺为: 取一定量

的紫锥菊根粉末, 用 15 倍的 40% 乙醇溶液于 90℃ 下加热回流提取 3 次, 每次为 2 h, 合并滤液, 浓缩至原液体积的 1/10, 回收乙醇, 滤过, 得到的水溶液以 2 BV/h 的流速上柱床体积(BV)为 30 mL 的 AB-8 树脂柱, 吸附完成后, 用去离子水洗至流出液无色, 再用 50% 乙醇溶液洗脱, 乙醇洗脱液浓缩蒸干, 可得到菊苷酸粗品。粗品溶于水, 用 6 mol/L 盐酸调 pH 3, 醋酸乙酯萃取 4 次, 萃取液浓缩蒸干即得产品。

利用乙醇水溶液提取、AB-8 树脂吸附、醋酸乙酯萃取的方法从紫锥菊根中提取纯化菊苷酸是可行的。该工艺操作简单, 方便, 成本低, 适合工业化生产, 生产的菊苷酸可作为医药原料或添加到保健食品中。

References

- [1] Xiao P G. International popular immunomodulator — *Echinacea purpurea* and its preparations [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(1): 46-48.
- [2] Liu Y B. Chemical and immune functions and clinic of preparations of *Echinacea purpurea* [J]. *World Phytomed* (国外医药·植物药分册), 2001, 16(2): 47.
- [3] Zhang Y, Liu K, Wu L J. Advance in studies on *Echinacea Moench* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(9): 852-855.
- [4] Soicke H, Al-Hassan G, Gorler K. Weitere Kaffeesaure Derivate aus *Echinacea purpurea* [J]. *Planta Med*, 1988, 54: 175.
- [5] Robinson W E J. 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] Wang H, Liu W Z, Ai T M, et al. Determination of chicoric acid in *Echinacea purpurea* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(6): 418-420.
- [7] Luo X B, Chen B, Zhu X L, et al. Determination of chicoric acid in *Echinacea purpurea* and its preparation by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(10): 890-891.
- [8] Nusslein B, Kurzmann M, Bauer R, et al. Enzymatic degradation of chicoric acid in *Echinacea purpurea* preparations [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1615-1618.

超临界 CO₂ 流体萃取椒目仁油的工艺研究

王捷频¹, 王四旺¹, 蒋永培², 党碧艳^{1*}

(1. 第四军医大学药物研究所, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学西京医院 药剂科, 陕西 西安 710032)

椒目为芸香科植物青椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 或花椒 *Z. bungeanum*

Maxim. 的干燥成熟种子。秋季果实成熟时采收, 晒干, 除去果皮、果柄及杂质。椒目是一种内外含油的

* 收稿日期: 2003-11-31

作者简介: 王捷频(1978—), 女, 江苏扬州人, 药剂学硕士。Tel: (029)83373265