

大孔吸附树脂分离纯化朝鲜蓟叶中洋蓟素的研究

冯建光

深圳职业技术学院 科研处, 广东 深圳 518055

摘要:目的 研究大孔吸附树脂从朝鲜蓟叶中分离纯化洋蓟素的工艺条件。方法 对 7 种不同类型的树脂进行静态吸附和动态吸附试验, 以树脂的吸附量、解吸率、吸附速度作为考察指标, 筛选出最佳的大孔吸附树脂, 并研究所选树脂分离纯化的工艺条件。结果 LSA-21 树脂分离效果最佳, LSA-21 分离纯化的工艺参数为: 以 2 BV/h 的体积流量上样, 以 3 倍树脂床体积的 50%乙醇以 2 BV/h 的体积流量进行洗脱, 以此工艺获得的产品中洋蓟素质量分数为 5.63%, 灰分质量分数为 0.61%, 产品的得率为 5.56%, 产品质量满足市场要求。结论 LSA-21 大孔吸附树脂综合性能最好, 适合于洋蓟素的分离纯化。

关键词: 朝鲜蓟; 洋蓟素; 大孔吸附树脂; 静态吸附; 动态吸附

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1109-05

Separation and purification of cynarin from *Cynara scolymus* leaves by macroporous adsorption resin

Feng Jian-guang

Department of Research & Development, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen 518055, China

Abstract: Objective To optimize the technological parameters of separation and purification of cynarin from *Cynara scolymus* leaves. **Methods** Seven different types of macroporous adsorption resins were evaluated on absorptive capacity, desorption rate, and adsorption rate in order to select the best resin and the conditions of the best resin to separate and purify cynarin were researched. **Results** It was found that LSA-21 resin showed better comprehensive adsorption property, flow rate of sample loading was 2 BV/h, 3 BV/h 50% alcohol aqueous and 2 BV/h velocity was used to elute. In this process to obtain the product with purity of 5.63% cynarin, ash content of 0.61%, product yield 5.56%, the product quality could meet the market demand. **Conclusion** The LSA-21 macroporous adsorption resin shows better comprehensive adsorption property. It could be used to isolate and purify the cynarin.

Key words: *Cynara scolymus* L.; cynarin; macroporous adsorption resin; static adsorption; dynamic adsorption

朝鲜蓟 *Cynara scolymus* L., 别名菊蓟、菜蓟、洋蓟、法国百合、荷花百合, 为菊科菜蓟属多年生草本植物。朝鲜蓟原产地中海沿岸^[1-2], 是由菜蓟 *C. cardunculus* L. 演变而成。朝鲜蓟以意大利栽培最多, 其次为西班牙和阿根廷, 意大利的产量占全球的 50%^[3]。朝鲜蓟具有很高的营养价值, 是一种高档保健蔬菜, 其叶含有洋蓟素 (cynarin, 1, 5-二咖啡酰奎宁酸)、绿原酸等具有保肝、护肝、降低胆固醇作用的天然活性成分。其中, 洋蓟素为朝鲜蓟中最主要的生物活性物质, 在叶部的量最高。目前朝鲜蓟叶大多被当作饲料或肥料使用, 对其所含的天然活性成分的应用开发还很少。邵敏等^[4]

从朝鲜蓟叶中分离出植物多酚, 但不能确定是否获取到了最主要的活性物质洋蓟素。本实验以朝鲜蓟叶为原料, 探讨利用大孔吸附树脂分离纯化技术从特定季节的朝鲜蓟叶中分离提纯洋蓟素的研究, 旨在获得洋蓟素质量分数在 5%以上、灰分在 1%以下的朝鲜蓟叶提取物产品, 为工业化利用朝鲜蓟叶提供重要依据。

1 仪器与材料

Waters 1525 高效液相色谱仪、2487 双波长紫外检测器 (上海魁元科学仪器有限公司), BS110S 电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司), 膜设备 [三达膜科技 (厦门) 有限公司]。

收稿日期: 2010-09-05

基金项目: 科技部“科技型中小企业技术创新基金”项目 (07C26214421829)

作者简介: 冯建光 (1973—), 男, 工程师, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。

Tel: 13682660934 (0755)26731413 E-mail: jianguangfeng@yahoo.com.cn

洋蓟素对照品(香港大学植物系王明福博士提供,质量分数为 95.0%)。D-101、X-5、AB-8 树脂(安徽三星树脂科技有限公司),LSA-21、XDA-8 树脂(西安蓝晓科技有限公司),XAD-16、XAD-7HP 树脂(罗门哈斯公司)。乙腈为 HPLC 级,超纯水,其他试剂均为分析纯。

朝鲜蓟叶样品分别购自云南昆明王国食品有限公司、绍兴乍浦绿叶农业发展有限公司、常德市汇美食品有限公司,经香港大学植物系王明福博士鉴定为菊科植物朝鲜蓟 *Cynara scolymus* L. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 提取液的制备

称取 20 g 已粉碎的朝鲜蓟叶,加入 160 mL 70% 甲醇,回流提取 2 h,滤过得第 1 次提取液,料渣再加入 80 mL 70% 甲醇回流提取 1 h,滤过得第 2 次提取液,合并提取液,浓缩到适当质量浓度后,加水至 100 mL 进行水沉,滤过水沉液得朝鲜蓟叶提取液,备用。

2.2 洋蓟素的 HPLC 法测定^[5]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液(12:88), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 320 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.2.2 线性关系考察 精密称取洋蓟素对照品 100.0 mg 置 500 mL 量瓶中,加甲醇溶解并超声 10 min, 甲醇定容,得 200 μg/mL 洋蓟素对照品储备液。取对照品贮备液配制 38、57、95、114、152、190 μg/mL 洋蓟素系列对照品溶液。0.45 μm 微孔滤膜滤过后,分别吸取 10 μL 进样测定,记录色谱峰。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=46\ 635 X+6\ 249.5$, $r=0.999\ 4$, 表明洋蓟素在 38~190 μg/mL 线性关系良好。

2.2.3 样品测定 取待测样品溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,吸取 10 μL 进样测定,计算样品溶液中洋蓟素的质量浓度。

2.2.4 朝鲜蓟叶原料的选定 按“2.1”项方法制备,吸取提取液 10 mL 置 100 mL 量瓶中,加水定容,摇匀后用微孔滤膜滤过。HPLC 法测定滤液中洋蓟素的质量浓度,并计算原料中洋蓟素的质量分数。

我国朝鲜蓟产地目前主要是云南昆明、浙江绍兴、湖南常德,由于朝鲜蓟收获季节有春秋两季,因此叶的采集时间分别在每年的 3~4 月和 9~10 月,选定上述 3 个产地不同季节的原料,进行洋蓟

素的测定,从而选定合适的生产原料。

经测定昆明产 3~4 月的朝鲜蓟叶中洋蓟素质量分数最高,因此选定昆明产 3~4 月的朝鲜蓟叶作为生产的原料来源(表 1)。

表 1 不同产地朝鲜蓟叶中洋蓟素的质量分数
Table 1 Cynarin content of *C. scolymus* leaves from different habitats

采收季节	种植基地	洋蓟素/%
3~4 月	云南昆明	0.40
9~10 月	云南昆明	0.21
3~4 月	浙江绍兴	0.31
9~10 月	浙江绍兴	0.17
3~4 月	湖南常德	0.26
9~10 月	湖南常德	0.19

2.3 大孔吸附树脂型号的筛选

2.3.1 树脂的预处理 大孔吸附树脂湿法装柱,用 95% 乙醇浸泡 24 h,后用 95% 乙醇洗至流出液加水不混浊,再用蒸馏水洗至流出液无乙醇味,备用。

2.3.2 静态吸附试验 取经过预处理的 D-101、X-5、AB-8、LSA-21、XDA-8、XAD-16、XAD-7HP 树脂各 1 g(用滤纸吸干表面水分)置 150 mL 锥形瓶中,加入 0.72 mg/mL 洋蓟素的朝鲜蓟叶提取液 50 mL,于 25 °C 恒温水浴中,以 135 r/min 振摇 8 h,测定溶液中洋蓟素的质量浓度,计算洋蓟素的吸附量(Q_e)和吸附率(E)^[6]。

$$Q_e = (\rho_0 - \rho_e) \times V/m$$

$$E = (\rho_0 - \rho_e) / \rho_0$$

ρ_0 为溶液中洋蓟素的初始质量浓度(mg/mL), ρ_e 为吸附平衡后溶液中洋蓟素的质量浓度(mg/mL), V 为朝鲜蓟叶提取液体积(mL), m 为树脂湿质量(g)

树脂和朝鲜蓟叶提取液振摇 8 h 后,滤去提取液用蒸馏水洗涤树脂 2 次,再放入 150 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 80% 乙醇溶液,于 25 °C 恒温中以 135 r/min 振摇 8 h,测定解吸液中洋蓟素的质量浓度,计算洋蓟素的解吸率。

解吸率 = 解析液中洋蓟素的质量/树脂中吸附的洋蓟素质量

以吸附树脂与母液接触时为零时刻,每隔一定时间取样测定其中洋蓟素的质量浓度,计算此时树脂的吸附量,结果见表 2。LSA-21、XDA-8、XAD-16、XAD-7HP 4 种树脂具有较高的吸附率,7 种树脂中 XDA-8 解吸率最低,综合考虑吸附量和解吸率,选

用 D-101、LSA-21、XAD-16、XAD-7HP 4 种树脂进行静态吸附动力学考察。以 t 时刻树脂的吸附量 Q_t 对时间 t 作图即得树脂的静态吸附动力学曲线^[7] (图 1)。吸附树脂对洋蓟素的吸附为快速平衡型, 吸附 2 h 基本达到平衡, 吸附平衡最慢的为 XAD-16 树脂, 要 6 h 才接近吸附平衡, 这可能因为 XAD-16 的比表面积大, 吸附难以达到平衡。

表 2 不同大孔吸附树脂对洋蓟素的静态吸附

Table 2 Static adsorption of different macroporous adsorption resins on cynarin

树脂型号	平衡吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%	解吸率/%
D-101	9.7	26.9	91.1
X-5	8.9	24.7	85.9
AB-8	10.1	28.1	86.0
LSA-21	18.4	51.1	90.7
XAD-16	14.8	41.1	87.4
XDA-8	11.8	32.8	63.1
XAD-7HP	14.1	39.2	86.7

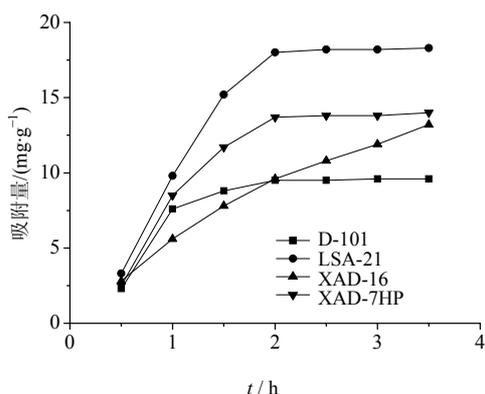


图 1 洋蓟素的静态吸附动力学曲线

Fig. 1 Static adsorption kinetics curves of cynarin

综合考虑吸附量、解吸率、吸附速度, LSA-21 型大孔吸附树脂对洋蓟素吸附较好, 其静态吸附量为 18.4 mg/g, 解吸率为 90.7%。

2.3.3 动态吸附试验

(1) 上样液洋蓟素质量浓度对 LSA-21 树脂吸附效果的影响 将预处理好的 LSA-21 树脂装入 2.2 cm×35 cm 玻璃色谱柱中, 树脂装填体积 100 mL, 将朝鲜蓟叶提取液配制成洋蓟素质量浓度不同的上样液平行 2 份上柱, 当流出液洋蓟素质量浓度达到上样液质量浓度的 1/10 时为洋蓟素的穿透点, 停止上样。考察不同上样质量浓度对大孔吸附树脂吸附效果的影响, 结果见表 3。表明上样液洋蓟素质量

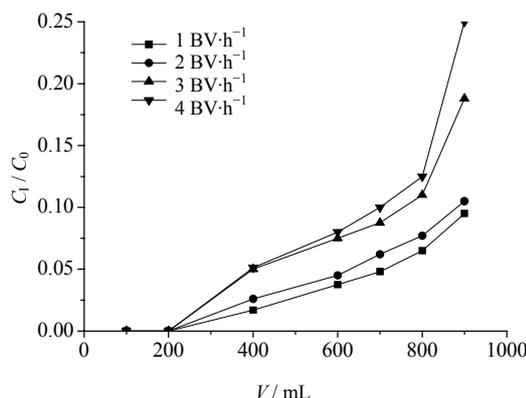
浓度较低时, 随质量浓度的增加, 吸附量增加, 当上样液洋蓟素达到 0.72 mg/mL 时, 能达到该树脂的最佳吸附效果; 随着上样液洋蓟素质量浓度的进一步增加, 吸附率反而降低。因此, 朝鲜蓟叶提取液的上样最佳质量浓度为洋蓟素 0.72 mg/mL。

表 3 不同上样质量浓度对吸附效果的影响

Table 3 Effect of different concentrations of cynarin on adsorption

上样液洋蓟素/(mg·mL ⁻¹)	吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%
0.36	8.7	91.5
0.48	10.3	92.0
0.72	12.1	94.1
1.08	10.6	92.8
1.44	7.4	85.6

(2) 上样体积流量对 LSA-21 树脂吸附效果的影响 将洋蓟素 0.72 mg/mL 的提取液, 以不同体积流量进行动态吸附, 绘制穿透曲线, 比较不同体积流量对穿透曲线的影响, 结果见图 2。表明 3、4 BV/h 的上样体积流量, 洋蓟素的穿透点提前, 其上样量明显减少, 但 1、2 BV/h 的上样体积流量对穿透点的影响不显著, 上样量基本相同, 考虑上样量和生产周期, 选用 2 BV/h 的体积流量上样。



C_1 -流出液中洋蓟素的即时质量浓度 C_0 -上样液中洋蓟素的质量浓度
 V -流出液体积

C_1 -cynarin concentration of effluent solution C_0 -cynarin concentration of sample solution V -effluent volume

图 2 树脂的穿透曲线

Fig. 2 Breakthrough curves of resin

(3) 洗脱剂乙醇体积分数的确定 由于所获得的洋蓟素产品主要用于食品或药品领域, 因此从安全考虑, 选用乙醇作为洗脱剂。同“2.3.3”项操作装柱上样, 上样完毕后, 用 2 BV 的去离子水洗涤

树脂,再用 4 BV 一定体积分数的乙醇进行洗脱,收集洗脱液,洗脱液干燥,测量干燥物中洋蓍素的质量浓度,并计算干燥物中洋蓍素的洗脱率和质量分数。重复上述操作,在其他条件相同的情况下,比较不同体积分数的乙醇获得的洗脱效果,从而确定乙醇的最佳洗脱体积分数,结果见表 4。随着乙醇洗脱体积分数的增加,洋蓍素的洗脱率逐步增加,乙醇洗脱体积分数为 80% 时,洗脱率最高。乙醇洗脱体积分数为 50% 时,产品的质量分数最高,当乙醇洗脱体积分数进一步增加时,洗脱效果会进一步提高,但也会把树脂上其他的吸附成分洗脱下来,降低产品的纯度,因此综合考虑产品的洗脱率和质量分数,选用 50% 乙醇作为 LSA-21 树脂的洗脱剂。

表 4 不同乙醇体积分数的洗脱效果

Table 4 Elution effect of different ethanol volume fractions

乙醇体积分数/%	洋蓍素/%	洋蓍素洗脱率/%
20	2.5	30.4
30	3.1	50.1
40	4.1	70.6
50	5.8	90.6
60	4.0	92.7
80	3.8	95.1

(4) 洗脱体积流量对洗脱曲线的影响 色谱柱型号同“(3)”,树脂上样后,先用 2 BV 去离子水洗涤,再用 50% 乙醇进行解吸,收集洗脱液并测定其中洋蓍素的质量浓度,绘制洗脱曲线,比较不同洗脱体积流量对洗脱曲线的影响,结果见图 3。1、2 BV/h 的洗脱体积流量二者洗脱峰的峰形和峰高基本上没有多大的变化,当洗脱体积流量增加到 3、4 BV/h 时,洗脱峰的峰高变矮,洗脱峰高往后移;同时当洗脱体积流量增加到 3、4 BV/h 时,洗脱液洋蓍素的质量浓度下降比较慢,要完全洗脱吸附的活性物质,需要增加乙醇的洗脱体积,增加溶剂消耗。在考虑缩短生产时间以及 1、2 BV/h 的洗脱体积流量没有显著差异的情况下,选用 2 BV/h 的洗脱体积流量,同时用 3 BV 体积的乙醇基本可以洗净活性物质,实际生产中用 3 BV 的乙醇进行洗脱,洗脱液的收集量为 4 BV。

2.4 最佳工艺的确定及验证试验

通过对 D-101 等 7 种不同极性的大孔吸附树脂的比较,最后确定 LSA-21 型大孔吸附树脂为分离纯化洋蓍素的最好大孔吸附树脂,最佳工艺为:以

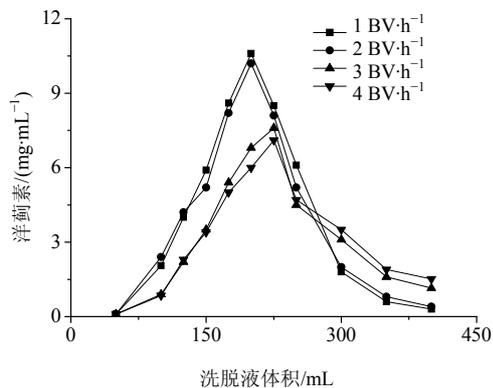


图 3 不同洗脱速度下的洗脱曲线

Fig. 3 Elution curves of different elution flow rates

2 BV/h 的体积流量上样,洗脱溶剂为 50% 乙醇,洗脱体积流量为 2 BV/h,洗脱体积为 3 BV,洗脱液收集体积为 4 BV,上样液中洋蓍素的质量浓度为 0.72 mg/mL。

按照上述所确定的纯化洋蓍素的吸附和洗脱条件,取样品液进行上柱、吸附、洗脱。洗脱液经真空浓缩回收乙醇后,加入一定量的水进行稀释,然后用切割相对分子质量为 1 000 的有机膜进行脱盐处理,截留液喷雾干燥得洋蓍素得率为 5.56% 的产品。产品经分析其洋蓍素质量分数为 5.63%,灰分在 1% 以下,产品质量符合市场要求,为规模化生产提供了依据。

3 讨论

朝鲜蓍叶用乙醇提取浓缩除去乙醇再加水进行水沉时,有时会出现水沉液浑浊的情形,影响树脂的分离纯化效果。因此在后续的工艺改进中,可考虑加入絮凝剂进行水沉,以减少提取液中的杂质,提高树脂的分离纯化效果。

大孔吸附树脂广泛用于中药活性成分的富集^[8-11],本实验中采用的 LSA-21 大孔吸附树脂对洋蓍素有较大的静态吸附量,其静态吸附量为 18.4 mg/g,且容易解吸,同时具有较快的吸附速度,表现出优良的分纯化能力;其动态吸附和解吸能力也比较稳定。

提取液经 LSA-21 树脂分离纯化后,可将分离前洋蓍素质量分数从 1.2% 提高到 5.63%,去除了大部分杂质,纯化效果显著,且活性物质洋蓍素的回收率达到 78.3% (原料中洋蓍素的量以 100% 计)。因此此工艺可用于规模化生产洋蓍素产品,同时大孔吸附树脂可以再生重复使用,有效降低了生产成本,具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Bianco V V. Present situation and future potential of artichoke in the mediterranean basin [J]. *Acta Horticult*, 2005, 681: 39-55.
- [2] 王天轶, 王云志. 洋蓟叶提取物的生物活性研究 [J]. *中草药*, 2006, 37(8): 附5-附7.
- [3] FAO Statistical Database (2005): [Http://faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/)
- [4] 邵敏, 张俊, 程绍南. 大孔吸附树脂对朝鲜蓟茎叶多酚类化合物吸附性能的研究 [J]. *食品科技*, 2007(7): 151-154.
- [5] 杨海英, 杜刚, 杨阳, 等. 高效液相色谱法测定洋蓟叶中黄酮素含量 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(3): 575-576.
- [6] 何炳林, 黄文强. 离子交换与吸附树脂 [M]. 上海: 上海科技教育出版社, 1995.
- [7] Shi Z Q, Xu M C, Lin X, *et al.* Adsorption of dinitrophenols onto polymeric adsorbents and its mechanism [J]. *Chin J React Polym*, 2000, 9(1): 34-41.
- [8] 廖茂梁, 尚海花, 胡静, 等. 树脂分离纯化枳实中辛弗林的工艺研究 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(2): 129-133.
- [9] 胡晨旭, 魏峰, 郭治昕, 等. 大孔吸附树脂分离纯化连翘酯苷A的工艺研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 732-735.
- [10] 刘刚, 费艳, 赵卉, 等. 大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺的研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(1): 58-60.
- [11] 易海燕, 何桂霞, 欧阳文, 等. 大孔吸附树脂分离纯化藤茶总黄酮的研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 74-77.

《药物评价研究》征稿与征订启事

《药物评价研究》(原《中文科技资料目录·中草药》)杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级药学科技学术性期刊, 双月刊, 国内外公开发行人。桑国卫院士为名誉主编, 刘昌孝院士任编委会主任委员, 汤立达研究员为主编。

办刊宗旨: 报道药物评价工作实践, 推动药物评价方法研究, 开展药物评价标准或技术探讨, 促进药物评价与研究水平的提高, 为广大药物研究人员提供交流平台。

内容与栏目: 针对药物及其制剂的评价规范以及药学评价、安全性评价、药效学评价、药物代谢动力学评价、临床评价、上市药物评价等评价研究的内容, 设置论坛、综述、方法学研究、试验研究(论著)、审评规范、国外信息、专题7个栏目。

读者对象: 药品管理、新药研发、药物临床应用、药学教育等相关的高等院校、科研院所、CRO组织、生产企业、药品管理与审评机构的研究人员、管理人员、临床医生和研究生等。

本刊的创办填补了药物评价领域期刊的空白, 将为我国广大药物研究人员提供一个交流的平台, 通过交流药物评价工作的实践经验, 发展和完善评价的方法学, 探讨评价相关的国际标准或指南, 提高我国的总体评价研究水平。

欢迎广大作者积极投稿, 广大读者踊跃订阅! 本刊自办发行, 订阅请直接与编辑部联系! 本刊热忱与中外制药企业合作, 宣传推广、刊登广告(包括处方药品广告)。

本刊已正式开通网上在线投稿、审稿、查询系统, 欢迎广大读者、作者、编委使用!

《药物评价研究》编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道308号(300193)

网址: www.中草药杂志社.中国

电话/传真: 022-23006822

www.tiprpress.com (在线投稿系统)

E-mail: der@tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行

账号: 441140100100081504

户名: 天津中草药杂志社