

多级柱系统吸附分离金银花水提液中绿原酸的研究*

卢定强^{1,2}, 洪声¹, 王俊¹, 凌岫泉¹, 张淑敏¹, 梁明鑫¹

1(南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京, 210009) 2(江苏省药物研究所, 江苏 南京, 210009)

摘要 利用大孔树脂法进行多级系统串联吸附, 洗脱工艺从金银花水提液中高效分离提取绿原酸, 研究了多级柱串联吸附与洗脱、洗杂过程的控制方法。该系统共有 4 个区段: 吸附区、脱附区、洗杂区。多根柱子采用模拟逆流方式分布于四个区段间, 2 个洗杂区起到回收多余溶剂和提高绿原酸的回收率的作用。该方法无吸附流失, 树脂对绿原酸的吸附量达 60 mg/g。单柱操作时, 水洗 0.75BV (1BV=25 mL) 后, 收集 2BV 洗脱液, 串联洗脱总收集液的绿原酸浓度达到 0.62 mg/mL, 收率 98%。

关键词 绿原酸, 大孔树脂, 吸附, 洗脱

绿原酸(chlorogenic acid, 以下简称 CQA)是金银花中含量丰富的重要有效成分, 是透明质酸酶(HAase)和 Gle-6-p 位移酶的天然特异性抑制剂, 也是选择性羟基自由基和过氧自由基的清除剂, 可作为开发新的抗变态反应药物和抗艾滋病毒(HIV)的先导化合物^[1~3]。国内研究大孔树脂法分离提取绿原酸多为单柱操作, 吸附率低, 对绿原酸的吸附量仅 30~40 mg/g, 对洗脱脱尾现象不能很好的解决, 溶剂消耗大, 分离成本较高。本文研究了多级柱系统吸附、洗脱工艺, 从金银花水提液中高效连续分离绿原酸, 实现了洗杂、洗脱过程的精确控制, 减少了洗脱封脱尾带来的不利影响, 适合大规模工业生产。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大孔树脂: NKA、NKA-2、NKA-9(南开化工厂), XDA-1B、XDA-1、D101B、D101、XDA-5(西安电力树脂厂), HPD-400、HPD-200、HPD-722(华震树脂厂); 金银花(经干燥、粉碎、过筛); 绿原酸标准品(中国药品生物制品检验所); HCl(36.38%); 壳聚糖、无水乙醇、冰醋酸、NaOH、去离子水均为分析纯; 乙腈、四氢呋喃为色谱纯。

1.2 实验仪器

高效液相色谱仪(Prevail C₁₈ 色谱柱, 美国 Alltech 公司; SPD-20A 岛津紫外检测器); 数显 pH 计 PHSJ-3F(上海雷磁仪器厂); BS-100A 自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂); BT00-300M 蠕动泵(保定

兰格恒流泵有限公司); 自制带夹套玻璃层析柱×3 (φ15 mm×200 mm); 普通层析柱(φ25 mm×200 mm、φ25 mm×300 mm 各 1 个, 上海锦华层析设备厂); 三通阀若干; FA1104N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); FZ102 型微型植物式样粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂); DSHZ-300 型多用途水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂); 生物传感分析仪(SBA240C, 山东省科学院生物研究所)。

1.3 实验方法

1.3.1 检测方法

绿原酸的浓度采用高效液相色谱检测; 葡萄糖采用生物传感分析仪检测。

1.3.2 树脂与金银花吸附母液的预处理

称取树脂 NKA、NKA-2、NKA-9、XDA-1B、XDA-1、D101B、D101、XDA-5、HPD-400、HPD-200、HPD-722 各 100.0 g, 按照常规方法进行处理^[4]。

称取金银花花蕾 500.0 g, 置于烘箱内 70℃ 烘干 3.0 h, 放入植物粉碎机内粉碎, 过 100 目筛, 放入密封带内并保存于冰箱备用。称取处理后的金银花干燥粉末 200.0 g, 加入 2 000 mL 三口圆底烧瓶内, 于 70℃ 分 3 次, 每次 1 h 加水回流提取, 过滤抽干, 合并滤液 2 500 mL。向上述滤液中加入 1.56 g 壳聚糖粉末和 5.6 mL 乙酸, 于 60℃ 水浴加热搅拌 3 h 后, 置于冰箱内冷藏 24 h 自然絮凝沉降, 抽滤, 得到金银花吸附母液^[5]。

1.4 树脂的静态筛选试验

1.4.1 静态吸附实验^[6]

精密称取 6 种型号的干树脂 1.000 g 于 50 mL 锥形瓶中, 准确量取浓度为 41.25 μg/mL 的绿原酸对照溶液 10 mL (用 HCl 调溶液 pH), 恒温水浴震

* 第一作者: 博士。

* 国家重大基础研究项目(2003CB716000), 国家自然科学基金项目(20876076)

收稿日期: 2008-09-22, 改回日期: 2008-11-06

荡器中静态吸附 24 h, 吸附达到平衡后过滤, 用 HPLC 测定滤液中绿原酸的含量, 计算吸附量(Q , $\mu\text{g/mL}$) 和吸附率(E , %).

$$Q = \frac{C_0V_0 - C_1V_1}{w}$$

$$E/\% = \frac{C_0V_0 - C_1V_1}{C_0V_0} \times 100$$

式中: C_0 , 吸附前金银花母液的浓度(mg/mL); C_1 , 吸附后金银花母液的浓度(mg/mL); V_0 , 吸附前金银花母液的体积(mL); V_1 , 吸附后金银花母液的体积(mL); w , 树脂的干重(g); Q , 吸附量(mg/g).

1.4.2 静态解吸实验

对吸附了绿原酸的 11 种不同型号的树脂依次用体积分数 20%, 50%, 70%, 90% 乙醇 10 mL 在水浴恒温振荡器中振荡 4h, 过滤, 取 2 mL 滤液定容到 5 mL 棕色容量瓶, 用 HPLC 法测定绿原酸的含量, 计算解吸率(%).

$$E_d/\% = \frac{C_1V_1 - C_dV_d}{C_1V_1} \times 100$$

式中: C_d , 解吸后的浓度(mg/mL); C_1 , 吸附后金银花母液的浓度(mg/mL); V_d , 解吸后的体积(mL); V_1 , 吸附后金银花母液的体积(mL).

1.5 单柱分离绿原酸

(1) 将静态筛选出的树脂作为层析柱的吸附剂, 湿法装填柱子, 金银花吸附母液按照一定的流速进吸附其穿透曲线, 本文中 1BV 对应 1 个树脂床层体积(bed volume)。考察床层的高径比(H/D)、吸附母液流速、温度对树脂吸附绿原酸的影响, 确定合适的上样液流速与吸附体积。

(2) 利用静态试验的对洗脱剂筛选的结果, 选择合适的洗脱剂以及洗脱流速对吸附饱和的柱子进行洗脱。

(3) 动态洗脱过程中出现缩写 CQA、Glu 分别代表绿原酸、葡萄糖。

1.6 多级柱系统分离绿原酸

1.6.1 多级柱系统的方法简介

多级柱系统分离方法的原理来源于模拟移动床

(simulated moving bed), 将系统分为 4 个区, 分别为吸附区、脱附区、纯化区、洗脱剂回收区, 采用循环回路操作^[7]。本方法均为液相操作, 分为 3 个区, 分别为吸附区、脱附区、洗杂区, 对模拟移动床进行改进, 其操作单柱吸附相似, 可以根据单柱的操作进行分析。

本文中采用的多级柱系统流程如图 1 所示。

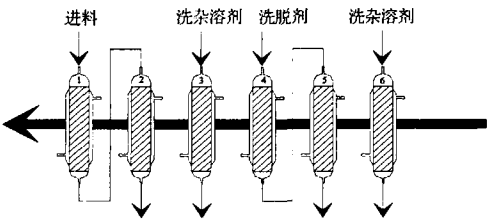


图 1 多级柱系统流程

图 1 所示, 6 根柱子被分为 3 个区, A 区为吸附区(柱 1~柱 2), B 区(柱 3)和 D 区(柱 6)为洗杂区, C 区为脱附区(柱 4~柱 5)。金银花吸附母液从 A 区进料, 洗脱溶剂进入 C 区, 洗杂溶剂进入 B 区和 D 区。每个周期结束后, 切换三通阀, 让柱 1~6 循环左移, A 区柱 1 进入柱 2 位置, 柱 2 进入 B 区, B 区柱 3 进入 C 区, D 区柱 6 进入 A 区。柱 1 位置 A 区的柱 1~柱 2 彼此串联, 这种串联组合比单柱能有效保留更大的传质区^[7]; B 区只有柱 3, 洗杂溶剂进入柱 3 洗出多余杂质而不带走绿原酸; C 区同 A 区相仿, 柱 4~柱 5 首尾串联, 这种结构可以有效利用前柱的洗脱流和减少洗脱溶剂用量。

1.6.2 多级柱系统吸附分离绿原酸

(1) 优化吸附操作条件, 考察多级柱系统对绿原酸分离的影响。

(2) 多级柱系统洗脱试验, 考察洗脱剂浓度、洗脱剂流速、温度、pH 对洗脱的影响。

2 结果与讨论

2.1 树脂的静态筛选

2.1.1 吸附母液 pH 对吸附量的影响

溶液 pH 对树脂吸附有很大影响, 调节吸附母液 pH 值, 考察对吸附量的影响, 结果如表 1 所示。

表 1 吸附母液 pH 值对吸附量的影响

pH	1	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	52.0	54.2	54.6	57.7	58.2	52.8	44.6	35.8

由表 1 可以看出, 当吸附母液 pH 值达到 3 时, 吸附量达到最大, pH>3 后吸附量明显降低, 因此,

选择吸附母液 pH=3 为最适。

2.1.2 树脂吸附量与解吸率的考察

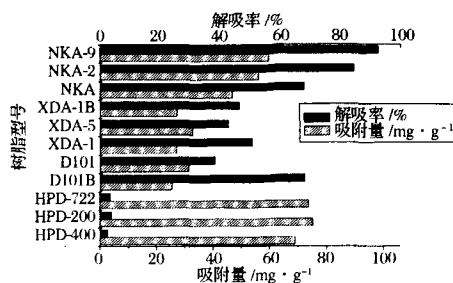


图2 树脂的静态筛选

从图2可见,HPD系类树脂虽然有很大的吸附量75 mg/g,但是解吸率很低,低于5%;而NKA-9树脂吸附量虽然不是最高(60 mg/g),但是解吸率能达到97%,基本能被洗脱下来,综合考虑选择NKA-9作为单柱动态吸附试验的吸附剂。

2.2 NKA-9 树脂单柱操作

2.2.1 床层的高径比(H/D)对绿原酸吸附的影响

取等柱床体积(30 mL)的柱1、柱2、柱3,高径比(H/D)分别为8.0、10.0、12.0,相同上样流速(1.6 mL/min)吸附8BV的金银花吸附母液(绿原酸浓度为1.0 mg/mL),得到绿原酸穿透曲线如图3所示。

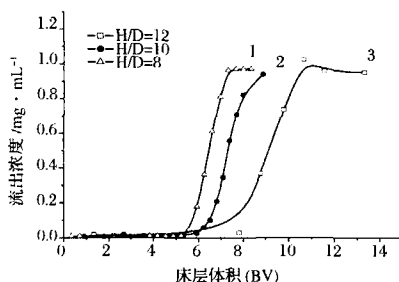


图3 不同高径比绿原酸穿透曲线

由图3可见,柱1和柱2在分别吸附5.2BV和8BV时绿原酸发生穿透,柱3吸附8BV后才发生穿透。在相同床体积的树脂床层下,较高的高径比(H/D)能增加床层的传质段长度,改善柱内树脂填充状况与液流状况^[8]。因此,选择较高的高径比为12的柱3作为单柱动态吸附试验。

2.2.2 流速对绿原酸吸附与洗脱的影响

(1)金银花吸附母液浓度为0.98 mg/mL,选择3种不同的流速0.7、1.6、2.2 min/mL进行吸附,其绿原酸的流出曲线如图4所示。

由图4可见,1.6 min/mL与2.2 min/mL吸附流速对绿原酸穿透时消耗掉基本一样,都是2.0BV,而0.7 min/mL吸附流速下穿透体积为1.0BV,因此,考虑到试验的操作周期与减少成本,本文采用

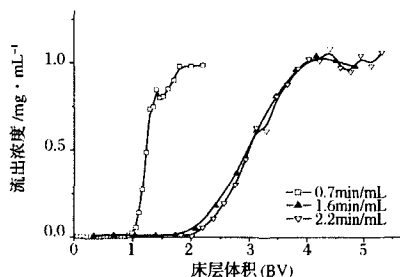


图4 不同吸附流速下绿原酸的穿透曲线

1.6 mg/mL作为吸附流速。

(2)洗脱液采用体积分数20%乙醇水溶液对吸附饱和柱进行洗脱,同样选择3种不同的流速0.7、1.6、2.2 min/mL进行洗脱,其绿原酸的流出曲线如图5所示。

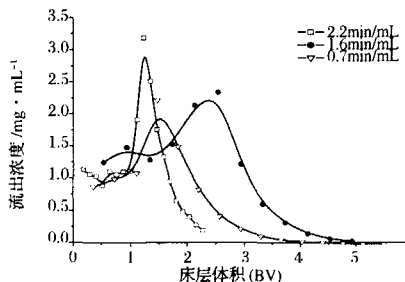


图5 不同洗脱流速下绿原酸的洗脱曲线

从图5可见,0.7 min/mL流速下洗脱,洗脱量大,而1.6 min/mL与2.2 min/mL流速下洗脱量较小,综合考虑,选择0.7 min/mL流速作为洗脱流速。

2.2.3 温度对绿原酸洗脱的影响

本试验分别在10、20、40℃下,体积分数20%乙醇水溶液对吸附饱和柱进行洗脱,其洗脱曲线如图6所示。

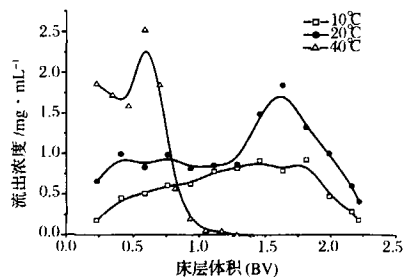


图6 不同温度下绿原酸的洗脱曲线

从图6可见,10℃下绿原酸的洗脱曲线峰面积比较宽,洗脱效果不好;40℃与20℃的绿原酸的洗脱曲线相比,40℃的峰形较集中,绿原酸在0.6BV就被洗脱

出,同时带出大量糖分,而 10℃ 下绿原酸在 1.7BV 才被洗脱出来,糖份较少。可能是由于提高温度对吸附质的扩散是有利的^[9]。从成本考虑,最终选择 20℃ 作为洗脱温度。

2.2.4 不同 pH 对洗脱曲线的影响

本试验分别在 pH=2 和 pH=3 的体积分数 20% 乙醇水溶液对吸附饱和柱进行洗脱,其糖与绿原酸的洗脱曲线如图 7 所示。

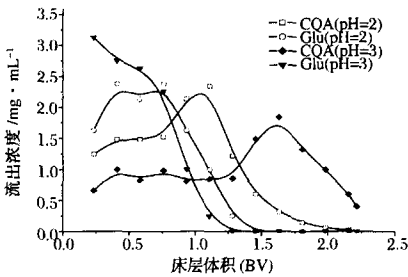


图 7 不同 pH 洗脱曲线

从图 7 可见,pH=3 的体积分数 20% 乙醇水溶液能使糖与绿原酸洗脱峰能完全分开,而 pH=3 的体积分数 20% 乙醇水溶液洗脱后糖与绿原酸洗脱峰部分重叠,所以,本文最终选择 pH=3 的体积分数 20% 乙醇水溶液作为洗脱液。

2.3 多级柱系统连续动态吸附洗脱工艺分离提纯金银花水提液中绿原酸

采用 1.6.1 多级柱系统的流程对金银花吸附母液进行连续动态的吸附与洗杂洗脱操作,洗脱流速 0.7 min/mL、温度 20℃、pH=3 的体积分数 20% 乙醇水溶液为洗脱溶剂进行洗脱,一个周期内分别对柱 3、柱 4、柱 5 出口流出液中绿原酸含量进行 HPLC 检测,并作出对应流出曲线图(见图 8)。

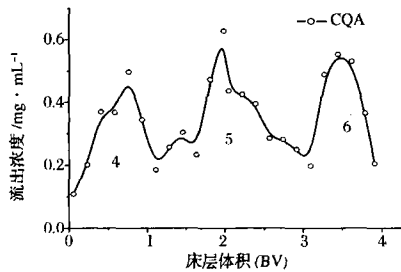


图 8 多柱串联洗脱图

从图 8 可以看出,只有柱 4 峰形有点拖尾,柱 3 与柱 5 洗脱峰形集中对称,洗脱效果良好。表 2 是在以上优化后操作条件下单柱与多柱吸附量、洗脱率的比较。

表 2 单柱与多柱分离效果的比较

	吸附体积/BV	吸附量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	洗脱率 / %
单 柱	2.0	30.5	37.5%
多级柱	3.0	60.0	59%

由表 2 可见,多级柱对绿原酸的平均吸附量达到 60 mg/g,洗脱率 59%,比单柱吸附洗脱效果要好。

3 结 论

采用多级柱系统连续动态吸附分离绿原酸,金银花吸附母液调 pH 为 3.0,在 1.6 min/mL 吸附流速下,单柱可以吸附 2.0BV 金银花吸附母液(绿原酸浓度为 0.98 mg/mL),能充分利用单柱穿透后流出液中绿原酸,而且多级柱串联操作吸附洗脱性能维持稳定,对绿原酸的吸附量能达到 60.0 mg/g。

在 2.2 min/mL 的流速下进行用去离子水洗杂,0.75BV 洗掉柱上吸附水溶性糖类物质。体积分数为 20% 乙醇水溶液是最佳洗脱溶剂,0.7 min/mL 洗脱流速下用体积分数为 20% 乙醇水溶液进行洗脱,收集液中绿原酸浓度为 0.6 mg/mL,经 HPLC 检测绿原酸纯度能达到 92%,绿原酸的洗脱率达 59%,便于连续分离制备,降低生产成本。

参 考 文 献

- 1 Schindler PW, Below P, Hemmerle H, et al. Identification of two new inhibitors of the hepatic glucose-6-phosphatase system. [J]. Drug Development Research. 1998, 44(1): 34~40
- 2 Ohnishi M, Morishita H, Iwahashi H, et al. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and hemolysis. [J]. Phytochemistry. 1994, 36(3): 579~583
- 3 Yagasaki K, Miura Y, Okauchi R, et al. Inhibitory effects of chlorogenic acid and related compounds on the invasion of hepatoma cells in culture. [J]. Cytotechnology. 2000, 33(1~3): 229~235
- 4 马希汉,王冬梅,苏印泉. 大孔吸附树脂对杜仲叶中绿原酸、总黄酮的分离研究[J]. 林产化学与工业,2004, 24 (03): 47~51
- 5 王剑锋,李慧,张业旺. 壳聚糖絮凝法处理刺五加提取液的研究[J]. 中成药,2001, 23(10): 707~710
- 6 李进飞,黄可龙,李春华. Nka-9 型树脂对绿原酸吸附分离性能的研究[J]. 华西药理学杂志,2004, 19(01): 1~4
- 7 Hidetada N, Giorgio C. Lysine adsorption on cation exchange resin. III. multicolumn adsorption/desorption operation[J]. Separation Science and Technology, 2005, 40

(4): 791~809

9 钱庭宝. 吸附树脂及其应用[M]. 北京:化学工业出版社,

8 姜志新. 离子交换分离工程[M]. 天津:天津大学出版社,

1990. 500~515

1992. 561

Study on the Extraction and Isolation of Chlorogenic Acid from Honeysuckle by Multi-column System

Lu Dingqiang^{1,2}, Hong Sheng¹, Wang Jun¹, Ling Xiuquan¹,
Zhang Shumin¹, Liang Mingxin¹

1(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

2(Jiangsu Provincial Institute of Materia Medica, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT Chlorogenic acid was extracted by multi-column systems with macroporous resins. Multiple columns were distributed among four zones. Two washing zones were used in recycling of excess elution solvent and increasing of the chlorogenic acid recovery. The process of dynamic desorption technology efficiently isolated chlorogenic acid from honeysuckles water extraction. This multi system has advantages of no adsorption losses and the adsorption capacity was up to 60 mg/g. In the operation process on single column, 2BV elution was collected after the water elution at 0.75BV; the concentration of chlorogenic acid after series of elute was reached to 0.62 mg/mL, the final yield was 98%.

Key words chlorogenic acid, multi-column, adsorption, desorption

信息窗

甘草细胞可用于化妆品和功能食品开发

天津大学与天津科技大学共同研究的一项新课题获得重大突破——可直接在实验室培养出甘草细胞,并提取有效成分,用于化妆品和功能食品的开发。

甘草作为用量最大的植物资源之一,在中药领域素有“十方九草”之说,除入药外,甘草提取物还是用于保健品、化妆品和药品生产的畅销植物原料。但由于栽培技术尚未成熟,有效成分含量不能替代野生甘草,导致野生甘草过度采挖,造成生态恶化。

天津市科委生物医药与环保科技处介绍说,该科研项目组根据以往人参细胞发酵培养的成功经验,在实验室成功培养出甘草细胞。由实验室发酵培养的甘草细胞,可直接提取甘草酸、甘草次酸、甘草多糖等活性成分,在某些功效上比野生植物产品更胜一筹,可用于护肤、美白类生态化妆品和补益、润肺、提高免疫力等功能食品的开发。

政策法规标准

中国人油盐超标难治 营养立法迫在眉睫

在日前举行的第三届北京健康管理研讨会上,有关专家指出,在日常饮食中,北京市居民食用油量严重超标,人均摄入量为 54.6g,比中国营养学会推荐量的 25g 标准超过 1 倍多。食用盐量也严重超标,城市居民中人均日均盐摄入量为 11g,超过世界卫生组织提出的人日均盐摄入量 6g 标准的近 1 倍;农村居民人均日盐摄入量为 17g,接近国际标准的 3 倍。这些因素直接导致了北京市居民各种慢性病的高发。

对于烹调油摄入量的变化,卫生部组织的《中国居民营养与健康状况调查》显示,我国成人超重率和肥胖率近 20 年间急速上升,增长率分别高达 39% 和 97%。专家预计,如果不采取有效措施,把食用油摄入量降下来,未来 10 年,我国肥胖人口可能达到两个亿。而在这 20 年里,中国居民的食用油量也从每天的 18.2g 提高到了 41.4g。

世界卫生组织已经将肥胖定性为全球最大的慢性疾病,并将此列为世界四大医学社会问题之一。欧美等国食用油摄入量高于我国,肥胖率一直在 50% 以上,因肥胖造成的经济损失,与用在癌症和艾滋病的治疗费用之和相当。而肥胖又是糖尿病,高血压、中风等慢性病的独立危险因素。

食用油的过量摄入不仅影响着国民健康素质的提高,而且影响到劳动生产率和国民经济的发展,2003 年,我国因为慢性疾病的支出就达到 1.2 万亿元,占 GDP 的 10.3%。增长速度已经高于国民生产总值的增长速度。