

大孔树脂分离纯化菊苣中香豆素的工艺研究

朱金芳, 韩海霞, 林聪明, 何万涛(新疆农业大学食品科学与药学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 目的 筛选大孔树脂分离纯化菊苣香豆素的最佳工艺。方法 以香豆素的吸附量为指标, 采用单因素试验法对影响菊苣提取物纯化效率的因素进行优化, 分别采用 UV 和 HPLC 测定纯化后固体物中总香豆素和秦皮乙素的浓度。结果 最佳洗脱程序为, 选定 D101 大孔树脂, 上样浓度为 $0.35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最大上样量为 35 BV(35 倍柱体积), 上样速度为 $0.067 \text{ BV}\cdot\text{min}^{-1}$, 依次用 11 BV 的蒸馏水以 $0.067 \text{ BV}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速洗脱, 9 BV 的 30%乙醇以 $0.033 \text{ BV}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速洗脱, 弃去洗脱液, 再用 9 BV 的 80%乙醇以 $0.033 \text{ BV}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速洗脱, 收集洗脱液。纯化得到的固体物中菊苣香豆素含量为 47.00%, 秦皮乙素含量为 6.38%, 香豆素的转移率为 81.74%。结论 纯化工艺简便、稳定, 能提高菊苣中活性组分的含量。

关键词: 菊苣; 大孔树脂; 纯化; 香豆素; 秦皮乙素

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0136-04

Study on the Purification of Coumarin in *Chicory* with Macroporous Resin

ZHU Jinfang, HAN Haixia, LIN Congming, HE Wantao(College of Food Science and Pharmaceutical Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To select the optimal purification technology of coumarin in *Cichorium glafulosum* Boiss. et Huet with macroporous resin. **METHODS** Mono factor test were employed to investigate the main parameters which may affect the purification procedures with the concentration of coumarin as index. The contents of the total coumarin and esculetin were verified by UV and HPLC separately in purified dried solid. **RESULTS** The optimal procedure was using D101 macroporous resin, the content of coumarin was $0.35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the volume was 35 BV, the flow rate was $0.067 \text{ BV}\cdot\text{min}^{-1}$. To elute with distilled water, the volume was 11 BV, the flow rate was $0.067 \text{ BV}\cdot\text{min}^{-1}$, and with 30% ethanol, the volume was 9 BV, the flow rate was $0.033 \text{ BV}\cdot\text{min}^{-1}$, giving up the eluate. To elute with 80% ethanol, the volume was 9 BV, the flow rate was $0.033 \text{ BV}\cdot\text{min}^{-1}$, gathering the eluate. The content of coumarin and esculetin reached 47.00% and 6.38% separately in purified powders, the transfer rates of coumarin reached 81.74%. **CONCLUSION** The optimized technology is simple, stable, can significantly improve the contents of active constituents in *Cichorium glafulosum* Boiss. et Huet.

KEY WORDS: *Cichorium glafulosum* Boiss. et Huet; macroporous resin; purification; coumarin; esculetin

在我国菊苣属植物有毛菊苣(*Cichorium glafulosum* Boiss. et Huet)和菊苣(*Cichorium intybus* L.) 2 个品种, 为维吾尔习用药材(维吾尔语名: 卡森), 在维吾尔药保肝制剂中被广泛应用^[1-3]。菊苣主要含有香豆素、倍半萜、三萜、糖类等成分^[4], 香豆素中的秦皮甲素、秦皮乙素具有保肝作用^[5]。文献有提取菊苣中总酚^[6]、菊粉^[7]、总黄酮^[8]、总多糖^[9]的报道, 但尚未有提取纯化菊苣中香豆素的相关报道。为得到纯度较高的具有保肝作用的菊苣香豆素, 需对菊苣提取液进行纯化。本实验以具有保肝作用的香豆素的含量为评价指标, 筛选出了菊苣香豆素的最佳纯化工艺, 可获得一种纯度高、服用量少、质量可控并具有保肝作用的单

味中药有效部位。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UV2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司); LC-10A VP 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); ODS-A 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm , 日本 YMC-Pack 公司); HH-S 型电热恒温水浴锅(江苏省金坛市医疗仪器厂); AL 104 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); RE-52B 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 材料

菊苣药材(新疆华康药业有限责任公司提供),

基金项目: 乌鲁木齐市科学技术局人才工程培养计划项目(P09131002)

作者简介: 朱金芳, 女, 博士生 Tel: (0991)8763671 E-mail: zjf7619@126.com

经新疆农业大学食品科学与药学院生药学阿依姑丽副教授鉴定为菊苣属植物毛菊苣(*Cichorium glafulosum boiss.et huet*)的干燥全草;秦皮乙素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110741-200506,纯度:100%);D-101 大孔吸附树脂、AB-8 大孔吸附树脂、NKA-9 大孔吸附树脂均购自南开大学化工厂;水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 香豆素的含量测定方法^[10]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取秦皮乙素对照品适量,加无水乙醇制成每 1 mL 含秦皮乙素 0.25 mg 的溶液,摇匀,即得。

2.1.2 检测波长的选择 取“2.1.1”项下的对照品溶液,在 190~910 nm 内进行波长扫描,确定对照品溶液的最大吸收波长为 350 nm,并以此作为其测定波长。

2.1.3 线性关系的考察 分别精密吸取秦皮乙素对照品溶液 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 mL,置 10 mL 量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,在 350 nm 处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,进行线性回归,得回归方程, $A=0.0384C-0.0343$, $r=0.9994$, 结果表明秦皮乙素在 0.005~0.045 mg·mL⁻¹ 内线性良好。

2.2 大孔树脂纯化菊苣香豆素工艺研究^[11-12]

采用单因素试验法对影响菊苣提取物纯化效率的因素:树脂类型、洗脱液浓度、洗脱液用量、上样速度、上样量进行考察,以香豆素的吸附量为指标综合评价,筛选最佳纯化条件。

2.2.1 实验前预处理

2.2.1.1 上柱药液的预处理 将菊苣药材用 10 倍体积的 70%乙醇提取 3 次,每次 2.5 h,合并提取液,测得从 40 g 菊苣药材中能提取得到 0.23 g 香豆素,过滤,旋转蒸发至干乙醇,用蒸馏水溶解并制成约 0.35 mg·mL⁻¹ 的溶液。

2.2.1.2 树脂的预处理 所用树脂使用前均以水和 95%乙醇交替洗脱至 95%乙醇加等量的蒸馏水不显浑浊,再以大量水洗净乙醇,备用。

2.2.2 树脂型号的筛选 分别取湿重状态下 D-101、AB-8、NKA-9 共 3 种树脂各 2 g,置于 150 mL 锥形瓶中。向 3 只锥形瓶中分别加入 35 mL 上柱药液。置于恒温空气振荡器中,25 ℃ 恒温振荡

24 h。以香豆素的比吸附量和解吸率为评价指标,筛选树脂类型,结果 D-101 树脂对菊苣提取液的纯化过程中比吸附量和解吸率均为最佳,故选择 D-101 树脂为纯化树脂,结果见表 1。

比吸附量/mg·g⁻¹=(上柱药液中香豆素量-流出液中残留香豆素量)/树脂重量

解吸率/%=醇洗脱液中香豆素量/(上柱药液中香豆素量-流出液中残留香豆素量)×100%

表 1 树脂型号筛选结果

Tab 1 The results of selecting types of macroporous resin

树脂类型	香豆素比吸附量/mg·g ⁻¹	解吸率/%
D-101	4.347	85.08
AB-8	4.274	78.34
NKA-9	3.250	80.08

2.2.3 上样速度的考察 以湿法装柱分别向 3 只树脂柱中装填 15 mL 的 D-101 树脂,以香豆素吸附量为指标,通过单因素实验考察上样速度对纯化工艺的影响。上样速度为 1.0 mL·min⁻¹ 时与上样速度为 0.5 mL·min⁻¹ 时的香豆素吸附量无明显差别,为节约时间故选择上样速度为 1.0 mL·min⁻¹,即 0.067 BV·min⁻¹(每分钟 0.067 倍柱体积),结果见表 2。

吸附量/mg=上柱药液中香豆素量-流出液中残留香豆素量

表 2 上样速度考察结果

Tab 2 The results of researching flow rate of the sample

流速/ mL·min ⁻¹	上柱体积/ mL	流出液 吸光度	流出液中残留 香豆素量/mg	吸附量/ mg
0.5	525	0.260	23.125	165.26
1.0	525	0.271	24.093	164.30
1.5	525	0.351	31.173	157.22

2.2.4 最大上样量的考察 将上柱药液通过树脂柱,分段收集流出液,在 350 nm 处测定吸光度,以香豆素泄漏量为指标考察最大上样量。上样量 >525 mL 时流出液中的香豆素含量明显增多,说明此时香豆素开始明显泄漏,故确定菊苣提取液的最大上样量为 525 mL,即 35 BV(35 倍柱体积),结果见图 1。

$$\text{泄露百分数}/\% = \frac{\text{流出液中香豆素量}}{\text{上柱液香豆素量}} \times 100\%$$

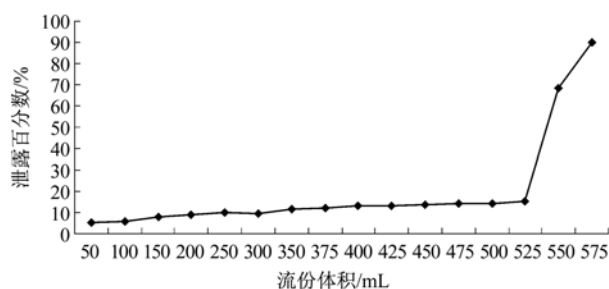


图1 泄漏曲线图

Fig 1 Leakage curve

2.2.5 水洗脱液用量的考察 采用去离子水将保留在树脂柱中的还原糖去除，水洗流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，以 Molish 反应鉴定其洗脱液中的还原糖。当收集到 12 倍柱体积时 Molish 反应为阴性，且 350 nm 处无吸收，说明此时已将还原糖洗净且无香豆素成分流出，故确定水洗脱液用量为 11 倍柱体积。

2.2.6 洗脱剂种类的考察 以不同浓度的乙醇溶液进行洗脱(30%，50%，70%，80%乙醇溶液)，分段收集不同浓度乙醇洗脱液，稀释后测定其吸光度。不同浓度的洗脱剂对洗脱效果有显著影响，80%乙醇的洗脱效果最佳，故选择 80%乙醇为洗脱剂，结果见图 2。

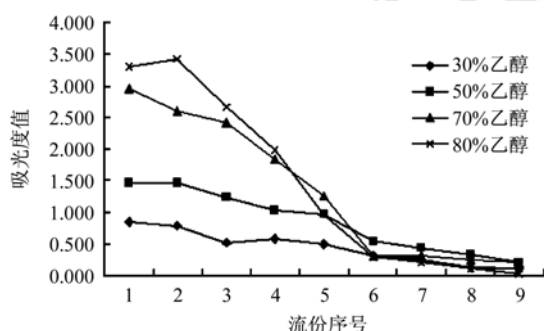


图2 不同洗脱剂的洗脱曲线

Fig 2 Elute curve of the different solvents

2.2.7 洗脱液流速的考察 以洗脱液中香豆素含量为指标考察洗脱流速对纯化工艺的影响。洗脱液流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时洗脱效果最佳，故选择 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 为最佳洗脱条件，即 $0.033 \text{ BV} \cdot \text{min}^{-1}$ ，结果见表 3。

表3 洗脱液流速的考察结果

Tab 3 The results of researching flow rate of the eluate

流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	洗脱液总体积/mL	香豆素量/mg
0.5	135	137.997
1.0	135	131.593
1.5	135	107.930

2.2.8 洗脱液用量的考察 分段收集洗脱液，以香豆素含量为指标考察洗脱液的用量。随着洗脱液体积的增加洗脱液中香豆素含量迅速减少，当洗脱液体积为 135 mL 时香豆素含量迅速降至最低，结果见表 4。故选择洗脱剂用量为 135 mL 即 9 倍柱体积。

表4 洗脱剂用量的考察结果

Tab 4 The results of researching eluate volume

编号	流份体积/mL	吸光度	香豆素含量/mg
1	15	3.290	34.386
2	15	3.414	35.681
3	15	2.670	27.906
4	15	1.974	20.631
5	15	0.963	10.065
6	15	0.298	3.115
7	15	0.204	2.127
8	15	0.102	1.006
9	15	0.028	0.293

2.2.9 最佳工艺的验证 取菊苣药材粉末 40 g ，用 10 倍体积的 70%乙醇提取 3 次，每次 2.5 h ，合并提取液，测得提取液中共含有 0.23 g 香豆素。提取液经过滤、旋转蒸发回收乙醇、加蒸馏水溶解后配制成约 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的上柱液。用已经处理并装填好的 15 mL D-101 大孔树脂吸附，吸附条件为：上样速度 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，上柱体积为 525 mL ，然后依次用 11 倍柱体积的蒸馏水以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速洗脱，9 倍于树脂装填体积的 30%乙醇以 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速洗脱，弃去洗脱液，再用 9 倍柱体积的 80%乙醇以 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速洗脱，收集洗脱液， 60°C 旋转蒸发挥尽乙醇， 60°C 真空干燥得 0.4 g 黄棕色粉末，平行试验 3 份，从中分别称取 0.2 g ，加入 150 mL 乙醇搅拌溶解，精密吸取 1 mL 定容至 25 mL ，测定其中香豆素含量，结果见表 5。由结果可知，菊苣纯化物中香豆素的含量为 47.00% ，计算得到香豆素的转移率为 81.74% (香豆素的转移率/ $\%$ = 纯化物中香豆素的质量 / 上柱液中香豆素的质量 $\times 100 = 0.4 \times 47.00\% / 0.23 \times 100 = 81.74\%$)。按前期试验确定的 HPLC 测定菊苣香豆素类化合物秦皮乙素含量的方法^[13]测定菊苣香豆素纯化物中秦皮乙素的含量，结果见表 6。由结果可知，菊苣纯化物中秦皮乙素的含量为 6.38% 。

表 5 菊苣纯化物中香豆素的含量

Tab 5 The content of coumarin in purified powders

批次	取样量/ mg	香豆素 含量/mg	香豆素百 分含量/%	平均百分 含量/%	RSD/ %
1	200	96.36	48.18		
2	200	91.87	45.93	47.00	2.40
3	200	93.75	46.88		

表 6 菊苣纯化物中秦皮乙素的含量

Tab 6 The content of esculetin in purified powders

批次	取样量/ mg	秦皮乙素 含量/mg	秦皮乙素 百分含量/%	平均百分 含量/%	RSD/ %
1	10	0.657	6.57		
2	10	0.626	6.26	6.38	2.61
3	10	0.631	6.31		

3 讨论

菊苣中主要含有香豆素、倍半萜、三萜、糖类等成分^[4], 香豆素中的秦皮甲素、秦皮乙素具有保肝作用^[5]。菊苣乙醇提取液中含有多种物质, 包括多糖类、有机酸类、香豆素类、萜类等成分, D-101 大孔树脂对上述物质均有吸附能力, 但各种物质受洗脱条件的影响较大。在醇洗脱前先用 11 倍树脂柱体积的蒸馏水洗脱至 Molish 反应至阴性, 可基本除去树脂柱上所吸附的大部分多糖等杂质。30%乙醇虽能洗脱一定量的香豆素, 但由实验数据可知洗脱香豆素的量很低, 故考虑采用 30%乙醇的进一步除去树脂柱上所吸附的部分有机酸和萜类等杂质。这样通过水→30%乙醇→80%乙醇的梯度洗脱, 弃去水洗脱液和 30%乙醇洗脱液, 所收集的 80%乙醇洗脱液为纯度较高的菊苣香豆素有效部位。

通过以上实验筛选出纯化菊苣中具有保肝作用的香豆素最佳工艺为: 用 D101 大孔树脂, 上样浓度为 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最大上样量 35 BV(35 倍柱体积), 上样速度 $0.067 \text{ BV} \cdot \text{min}^{-1}$, 依次用 11 BV 的蒸馏水以 $0.067 \text{ BV} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速洗脱, 9 BV 的 30%乙醇以 $0.033 \text{ BV} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速洗脱, 弃去洗脱液, 再用 9 BV 的 80%乙醇以 $0.033 \text{ BV} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速洗脱, 收集洗脱液, 60°C 旋转蒸发挥尽乙醇, 真空干燥得黄棕色粉末, 该粉末中菊苣香豆素的含量为 47.00%, 香豆素类化合物秦皮乙素的含量

为 6.38%, 香豆素的转移率为 81.74%。该纯化工工艺简便、稳定, 提高了菊苣中保肝活性组分的含量, 可大大降低药物服用量。

REFERENCES

- [1] The Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. The pharmaceutical standards published by Ministry of Health of the People's Republic of China(Uygur medicine volume)(中华人民共和国卫生部药品标准 维吾尔药分册) [S]. 1999: 136, 159, 189.
- [2] MAIMAITIHASIM E. Clinical observation on Qingre Kasen granules therapy in treatment of 41 patients with fatty liver [J]. J Med Pharm Chin Minorities(中国民族医药杂志), 2000, 6(3): 11-12.
- [3] ANWAR T, NURMUH A, YULTUZ. Protective effect of aqua extract and ethanol extract of *Cichorium glandulosum* Boiss against acute liver injury in mice [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2006, 22(5): 34-35.
- [4] LUO Y, LIU S, FANG L Y, et al. Contents determination of effective components in *Cichorium intybus* by HPLC [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2007, 22(6): 671-672.
- [5] GILANI A H, JANBAZ K H, SHAH B H. Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCl_4 [J]. Pharmacol Res, 1998, 37(1): 31-35.
- [6] YANG Y L, HU T M, LIU H Y, et al. Study on process for extracting phenols in *Cichorium intybus* cv. Puna [J]. J Northwest For Univ(西北林学院学报), 2006, 21(5): 156-159.
- [7] WU H X, HU T M, ZHANG C L, et al. Study on the extraction and purification of *Puna chicory* Inulin [J]. J Northwest Sci Tech Univ Agri For(Nat Sci Ed)(西北农林科技大学学报: 自然科学版), 2006, 23(6): 91-95.
- [8] MAO Q L, HAYRAT S, SHARAPET T, et al. Determination of total flavonoids from *Cichorium intybus* L [J]. J Biotech(生物技术), 2009, 19(3): 78-80.
- [9] ERXIDING M, GE L, LIU B, et al. Optimization of extracting procedure of total polysaccharides from chicory by orthogonal experiment [J]. Chin J Spectro Lab(光谱实验室), 2009, 26(4): 963-966.
- [10] LI Y X, LI C N, WEI P. Determination of total coumarin in kernel and seed coat of *Semen Euphorbiae Lathyridis* [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med(陕西中医), 2008, 29(5): 605-606.
- [11] XIN C Y, LIU Y S, ZHANG S S, et al. Purification technology of Gushudan extracts with D101 macroporous adsorption resin [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2012, 29(1): 74-80.
- [12] CHEN L J, DUAN H Y, ZHANG S, et al. Research on adsorption of total paeony glycoside with macroporous resins [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(5): 458-462.
- [13] ZHU J F, LAN W, MA X J, et al. Determination of aesculetin in chicory extraction by RP-HPLC [J]. J Xinjiang Med Univ(新疆医科大学学报), 2010, 33(8): 871-873.

收稿日期: 2012-04-01