

利用大孔树脂提取绿原酸的研究

张默霍清* (北京联合大学生物化学工程学院生物医药系, 北京100023)

摘要 研究利用大孔树脂从金银花中有效提取、分离纯化绿原酸的方法, 从而得到纯度高的绿原酸粗品。利用紫外分光光度计, 对绿原酸标准品进行定性、定量的测定, 即 $\lambda = 329.5 \text{ nm}$, $R = 0.99925$; 线性范围: $0.002 \text{ ng/ml} < C < 0.010 \text{ ng/ml}$ 。选用4种不同型号的大孔树脂, 通过静态吸附试验找出最适合吸附金银花中的绿原酸的大孔树脂, 即HZ-818; 利用HZ-818型树脂进行纯品动态吸附, 得出吸附饱和时间为28 min; 利用含量为40%的乙醇洗脱液进行洗脱, 所用洗脱液体积为1.7 BV, 回收率为62.9%。

关键词 绿原酸; 大孔树脂; 静态吸附; 动态吸附; 洗脱

中图分类号 O656 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)17-08167-02

Study on the Extraction of Chlorogenic Acid with Macroporous Resin

ZHANG Mo et al (Department of Biology of Chinese Medicine, College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023)

Abstract The methods of effective extraction, separation and purification of chlorogenic acid from honeysuckle with macroporous resin were studied. The crude substance of chlorogenic acid with high purity was obtained. Using ultraviolet spectrophotometer, the qualitative and quantitative determinations were made on chlorogenic acid. $\lambda = 329.5 \text{ nm}$, $R = 0.99925$ and the limited range was as $0.002 \text{ ng/ml} < C < 0.010 \text{ ng/ml}$. Four different models of macroporous resins were selected. The optimum macroporous resin for adsorbing chlorogenic acid in honeysuckle was found through static adsorption test, that was HZ-818. HZ-818 resin was used for pure dynamic adsorption and the saturated adsorption time was 28 min. The eluent with 40% ethanol was used for elution and the eluent volume was 1.7 BV and the recovery rate was 62.9%.

Key words Chlorogenic acid; Macroporous resin; Static adsorption; Dynamic adsorption; Elution

绿原酸具有抗菌、抗病毒、解热、保肝、免疫调节等作用, 并且对金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌有显著抑制作用^[1]。研究证明, 绿原酸对各种急性细菌感染疾病及由放疗、化疗所致的白细胞减少症有显著疗效^[2]。大孔吸附树脂是20世纪60年代发展起来的一种新型吸附剂。它是一类不含交换基团且具有大孔结构的离子材料, 具有很好的大孔网状结构和较大的比表面积, 通过物理吸附从水溶液中有选择地吸附有机物^[3]。大孔吸附树脂具有物理化学稳定性高、比表面积大、吸附容量大、选择性好、吸附速度快、解吸条件温和、再生处理方便、使用周期长、宜于构成闭路循环、节省费用等诸多优点^[4]。自问世以来, 大孔树脂已广泛应用于环保、食品、医药等领域, 尤其在中药有效成分分离纯化的应用中发展良好^[3]。笔者研究利用大孔树脂从金银花中有效提取、分离纯化绿原酸的方法, 从而得到纯度高的绿原酸粗品。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 绿原酸纯品。中国药品生物制品检定所, 批号: 110753-200413。

1.1.2 药品。盐酸、氢氧化钠、乙醇, 分析纯, 天津开发区乐泰化工厂有限公司。

1.1.3 大孔树脂。D₁₅₂、HZ-801、NKA-9, 天津欧瑞生物科技有限公司。HZ-818, 华北理工大学上海华震科技有限公司。树脂理化性质见表1。

1.1.4 试验仪器。U1901 双光束紫外分光光度计, 日本岛津, 北京普析通用仪器有限责任公司; 玻璃分离柱: 内径2 cm, 外径2.1 cm, 柱长100 cm; THZ-82 恒温水浴振荡器。

1.2 方法

1.2.1 大孔树脂的预处理。将树脂用蒸馏水清洗几遍, 把

树脂中的杂质洗去。用pH值为1的盐酸洗, 再用蒸馏水洗至pH值为7, 无浑浊、无异味。用pH值为11的NaOH洗, 再用蒸馏水洗至pH值为7, 无浑浊、无异味。用95%的乙醇洗, 再用蒸馏水洗至无浑浊、无异味, 并在紫外下测得没有乙醇为止。将预处理好的大孔树脂用湿法装柱法, 装入洗涤干净的玻璃分离柱中; 将装好柱的大孔树脂再用蒸馏水洗, 并在紫外分光光度计的全波长扫描下无任异物。

表1 树脂理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of resins

树脂型号	分类形式	骨架	含水量 %	范围粒度 mm
Resin types	Classification form	Skeleton	Water content	Particle range
HZ-818	大孔型吸附树脂	苯乙烯类	60~70	0.315~1.25 90%
HZ-801	大孔型吸附树脂	苯乙烯类	60~70	0.315~1.25 90%
NKA-9	大孔型吸附树脂 (极性)	聚苯乙烯	60~70	0.300~1.25
D ₁₅₂	大孔型阳离子树脂 功能基团: -COO ⁻	丙烯酸系	50~65	0.315~1.25 90%

1.2.2 静态吸附。选择等量且不同型号的大孔树脂, 根据静态吸附原理, 先分别取9个100 ml的烧杯, 称量。再分别取9种等量的大孔树脂(刚好没过烧杯底部为止), 放入100 ml烧杯中, 称量。后在烧杯中加入等起始浓度C₀的绿原酸溶液, 后将各个烧杯拿保鲜膜密封好, 置于恒温摇床中振荡30 min, 后取出测定C₁, 应用吸附饱和量公式计算吸附饱和量, 比较各种树脂的吸附能力, 选出吸附最优树脂。

1.2.3 纯品动态吸附与洗脱。称取一定量的绿原酸标准品, 量取一定量的大孔树脂, 将树脂利用湿法装柱, 将绿原酸纯品溶液自玻璃分离柱上端倒入, 当流出液浓度为倒入纯品的浓度时, 表明吸附饱和, 记录吸附饱和时间。配制一定量一定浓度的乙醇洗脱液, 自装有吸附饱和的大孔树脂的玻璃分离柱上端倒入, 当流出液中绿原酸浓度为0时, 证明洗脱完毕, 收集洗脱出来的液体, 测定绿原酸浓度, 计算洗脱出的绿原酸量。

1.3 分析方法 称取一定量的绿原酸纯品, 用85%乙醇稀

作者简介 张默(1987-), 女, 北京人, 本科生, 专业: 制药工程。* 通讯作者, 硕士, 副教授, E-mail: huwq2002@yahoo.com.cn。

释、定容、摇匀,特征峰 $\lambda = 329.5 \text{ nm}$; $C = -0.00021 + 0.02064A$, $R^2 = 0.99925$; 线性范围: $0.002 \text{ ng/ml} < C < 0.010 \text{ ng/ml}$ 。

2 结果与分析

2.1 静态吸附 先分别取4个100 ml的烧杯,称量M(g)。再选择4种不同型号的大孔树脂,分别取等量的大孔树脂(刚好没过烧杯底部为止),放入烧杯中,称量M₁(g)。将各个烧杯中分别加入10 ml绿原酸纯品溶液(称取4.1 ng的绿原酸标准品,加85%乙醇定容于100 ml容量瓶中,配成C₀ = 49.01 μg/ml的绿原酸标准品溶液),将瓶盖盖好后,置于恒温振荡摇床中振荡30 min,取出,利用紫外分光光度计测定各个烧杯中纯品溶液的浓度。静态吸附试验数据见表2,静态吸附分析图见图1。绿原酸起始浓度:C₀ = 49.01 μg/ml。

表2 静态吸附数据

Table 2 The static adsorption data

试验号 Experiment No.	树脂 Resin types	平衡浓度 C ₁ ng/ml Equilibrium concentration	浓度差 μg/ml Concentration difference	吸光度 A Absorbance	树脂质 量 g Resin quality	饱和吸附 量 μg/g Saturated adsor- ption capacity
1	HZ-818	0.041	8	0.2073	2.729	29.31
2	HZ-801	0.038	11	0.1952	4.200	26.19
3	NKA9	0.046	3	0.2314	2.258	13.29
4	D ₁₅₂	0.040	9	0.2043	5.135	17.53

$$\text{饱和吸附量公式: } Q_0 = \frac{(C_0 - C_1) \times V}{W}$$

式中, Q₀ 为饱和吸附量(μg/g); C₀ 为吸附前浓度(μg/ml); C₁ 为吸附后浓度(μg/ml); V 为溶液体积(ml); W 为大孔树脂湿重(g)。

由图1可以看出, HZ-801型树脂明显优于其他类型树脂,但是由于HZ-801在市场上价格很贵,所以笔者选用吸附量差不多且价格便宜的HZ-818树脂。

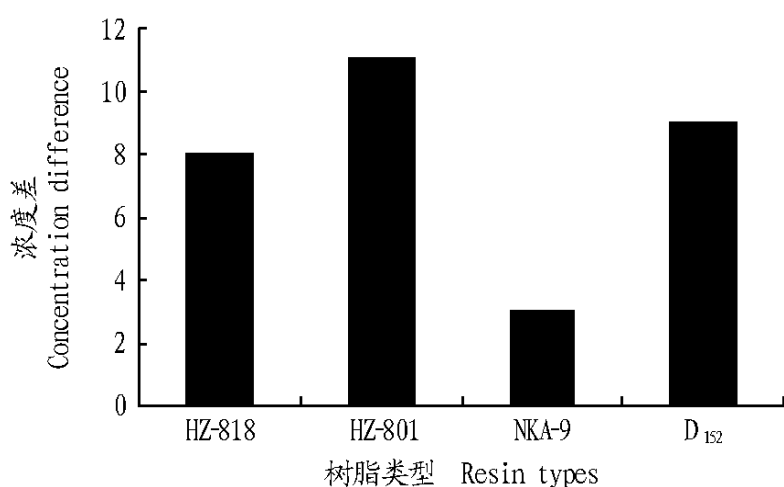


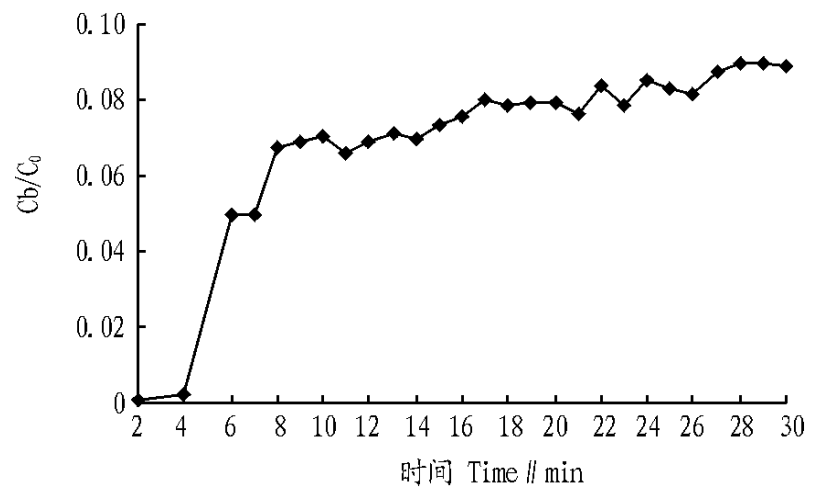
图1 静态吸附分析

Fig. 1 The static adsorption analysis

2.2 纯品动态吸附 称取0.0201 g绿原酸标准品,加85%乙醇定容于100 ml容量瓶中。量取23.5 ml HZ-818树脂,利用湿法装柱,将其装入玻璃分离柱中,将100 ml绿原酸标准品溶液自分离柱上端倒入柱中,进行动态分离,将流速控制在约2 ml/min,利用紫外分光光度计进行浓度监测,动态吸附曲线见图2(C₀ = 0.201 ng/ml)。

根据动态吸附曲线图可知, HZ-818型树脂在吸附28 min之后呈吸附饱和状态,即23.5 ml树脂吸附绿原酸m₀约为4.72 ng。28 min达到吸附饱和。由此可得出,大孔树脂吸附法所用时间少,效率高,适用于工业化生产。

2.3 纯品洗脱 利用HZ-818型树脂吸附绿原酸纯品饱和后,使用含量为40%的乙醇溶液进行洗脱,流速为2 ml/min,洗脱曲线见图3。



注: C_b: 流出液浓度; C₀: 起始浓度。

Note: C_b, Outflow concentration; C₀, Initial concentration.

图2 动态吸附曲线

Fig. 2 The dynamic adsorption curve

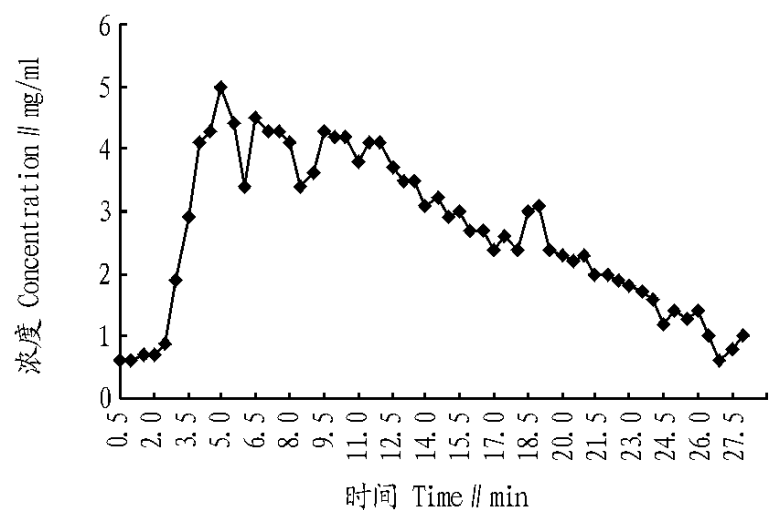


图3 洗脱曲线

Fig. 3 The elution curve

由图3可知,用1.7 BV洗脱液完成洗脱,收集洗脱液56 ml,所收集洗脱液浓度为0.027 ng/ml。即洗脱后回收绿原酸m_e约为2.968 ng。故可得回收率为62.9%。

$$\text{回收率公式: } q = \frac{m_e}{m_0} \times 100\%$$

式中, q 为回收率; m_e 为洗脱后回收绿原酸量(g); m₀ 为吸附绿原酸量(g)。洗脱液选用40%的乙醇溶液,因为绿原酸易溶于乙醇及丙酮,极微溶于醋酸乙酯,所以选用乙醇作为洗脱剂。

2.4 绿原酸粗品的提取 利用5种不同方法,从提煮过的金银花提取液中得到绿原酸粗品。取提煮过的金银花提取液500 ml,缓慢加入20% pH值为7的石灰乳至pH值为10,离心,得到沉淀物,在沉淀物中加入少量乙醇成稀浆,并滴加50%盐酸至pH值为3左右,充分搅拌,离心,得到酸水液,在酸水液中加入浓碱调至pH值为6,回收乙醇,旋转蒸发至膏状物,把膏状物干燥得到绿原酸粗品m₁ = 16.5 g。

将提煮过的金银花提取液经HZ-816型树脂提取,得到洗脱液,取洗脱液550 ml进行旋转蒸发至膏状物,把膏状物干燥,得到绿原酸粗品m₂ = 16.9 g。

将提煮过的金银花提取液经HZ-818型树脂提取,得到洗脱液,取洗脱液550 ml进行旋转蒸发至膏状物,把膏状物干燥,得到绿原酸粗品m₃ = 19.8 g。

4.3 完善培育土地流转市场运行机制 按照“流转形式多样化、运作方式市场化、实施程序合法化、流转合同规范化”的要求,建立健全土地流转机制,培育土地流转市场。建立了县(市)级农村土地流转服务中心,形成农村土地承包经营权流转信息库,指导乡镇政府做好农村土地承包经营权流转工作,为区域内的土地流转供求双方提供信息服务。各乡镇建立农村土地流转市场,收集和发布农村土地流转信息,为土地供求双方提供流转信息、合同鉴定、土地价格评估、法律政策咨询等服务。村级成立土地流转服务站,收集并向乡镇土地流转市场报送土地流转供求信息。通过完善县、乡、村三级土地流转市场^[5],为包括移民在内土地流转供求双方提供区域内外充足、及时的土地流转信息与机会。

4.4 逐步完善农村社会保障机制 尽快把已经放弃经营土地、进入城市就业的农民纳入城镇社会保障体系,实现与城镇社保的对接,避免二次返乡“与民争地”^[6]。加大对农村社会保障的财政投入力度,探索建立农村人口养老保险制度,进一步扩大新型农村合作医疗制度覆盖范围,促进最低生活保障体系向农村延伸,特别要加快解决55岁以上和已经丧失劳动能力人员的社会保障问题,让他们放心的流转土地。对于已经流转土地的农民,要引导他们从土地流转收益中拿

(上接第8168页)

将提煮过的金银花提取液经HZ-816型树脂提取,取得的洗脱液450 ml,缓慢加入20%,pH值为7的石灰乳至pH值为10,离心,得到沉淀物,在沉淀物中加入少量乙醇成稀浆,并滴加50%盐酸至pH值为3左右,充分搅拌,离心,得到酸水液,在酸水液中加入浓碱调至pH值为6,回收乙醇,旋转蒸发至膏状物,把膏状物干燥得到绿原酸粗品 $m_4 = 18.6\text{ g}$ 。

将提煮过的金银花提取液经HZ-818型树脂提取,取得的洗脱液450 ml,缓慢加入20%,pH值为7的石灰乳至pH值为10,离心,得到沉淀物,在沉淀物中加入少量乙醇成稀浆,并滴加50%盐酸至pH值为3左右,充分搅拌,离心,得到酸水液,在酸水液中加入浓碱调至pH值为6,回收乙醇,旋转蒸发至膏状物,把膏状物干燥得到绿原酸粗品 $m_5 = 17.9\text{ g}$ 。

3 结论与讨论

通过本次试验可以得出,通过使用紫外分光光度计定性、定量地分析后,得出特征峰 $\lambda = 329.5\text{ nm}$; $R^2 = 0.999$ 25,线性范围: $0.002\text{ ng/ml} < C < 0.01\text{ ng/ml}$ 。通过静态吸附试验,利用吸附饱和量公式: $Q_0 = \frac{(C_0 - C_1) \times V}{W}$ 得出各种树脂的吸附饱和量,根据静态吸附图表可知,HZ-818型树脂

可以有效地吸附金银花中的绿原酸。通过纯品动态吸附试验,可以得出绿原酸的吸附饱和时间为28 min,从而可以看出此吸附饱和时间并不长,适合工业化生产。通过纯品洗脱可以得出,应用含量为50%的乙醇溶液进行洗脱,洗脱液体积为1.7 BV,根据回收率公式: $q = \frac{m_c}{m_0} \times 100\%$ 可以得出,洗脱后回收率为62.9%。

4.5 加强引导,优化土地流转环境 搞好水库移民置换土地的承包经营权流转工作事关区域人地关系均衡调节和水库移民工作顺利实施。应加强对土地流转的引导,积极创造有利条件和宽松的环境,保证农村土地流转工作合理、有序、健康发展。政府要出台相关政策,扶持安置区二、三产业和个体私营经济发展,创造农民就业机会,加快农业人员的转移。采取切实措施,加快小城镇建设,尽快改变城乡二元结构,实现城乡经济统筹、协调发展,为移民置换土地准备资源。

参考文献

- [1] 冯继康,刘蓉.中国农村土地流转:理论分析与路径选择[J].聊城大学学报:社会科学版,2005(1):111-117.
- [2] 孙右海.土地流转制度研究[D].南京:南京农业大学,2005.
- [3] 农业部.农村土地承包经营权流转管理办法[R].2005.
- [4] 梅福林.我国农村土地流转的现状与对策[J].决策参考,2006(10):46-49.
- [5] 张光宏,杨明杏.中国农村土地制度的创新[J].管理世界,2001(4):90-93.
- [6] 陈万军.探析现阶段农村土地流转现状[J].现代农业科学,2008(8):90-91.

可以有效地吸附金银花中的绿原酸。通过纯品动态吸附试验,可以得出绿原酸的吸附饱和时间为28 min,从而可以看出此吸附饱和时间并不长,适合工业化生产。通过纯品洗脱可以得出,应用含量为50%的乙醇溶液进行洗脱,洗脱液体积为1.7 BV,根据回收率公式: $q = \frac{m_c}{m_0} \times 100\%$ 可以得出,洗脱后回收率为62.9%。

通过试验证明,利用大孔树脂吸附技术可以有效地提取、分离出高浓度的绿原酸。目前从金银花中提取绿原酸的工艺落后,提取物中绿原酸含量低,并且提取成本高。该技术具有工艺简单、成本低、易操作、制取成品绿原酸含量高、并具有显著经济效益等突出优点。适合于工业化生产使用的现代方法,可以降低提取高浓度绿原酸的资金,可以大量应用于工业生产和试验研究。

参考文献

- [1] 刘军海,裘爱泳,任惠兰.绿原酸提取与纯化分离方法研究进展[J].粮食与油脂,2007(7):42-45.
- [2] 尉芹,马希汉.绿原酸及其提取分离方法评述[J].中成药,2001,23(2):135-138.
- [3] 李平华,王兴文.大孔吸附树脂在中药有效成分分离纯化中的研究进展[J].云南中医学院学报,2003,26(3):43-48.
- [4] 白夺龙,杨开华.大孔吸附树脂分离纯化技术及应用[J].海峡药学,2007,19(9):96-99.
- [5] 高锦明,张鞍灵.绿原酸分布、提取与生物活性研究综述[J].西北林学院学报,1999,14(2):73-82.