

多裂翅果菊提取物中菊苣酸等成分的分离纯化

柯小红¹, 陈育如¹, 赵文文¹, 钱媛媛¹, 戴科伟², 唐 超³

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省微生物与基因组学重点实验室, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

(2. 南京师范大学地理科学学院, 江苏 南京 210023)

(3. 滇虹药业集团股份有限公司, 云南 昆明 650106)

[摘要] 采用 CN101 大孔树脂对多裂翅果菊提取物中的菊苣酸、灯盏乙素、单咖啡酰酒石酸、绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎尼酸等 5 种成分进行分离, 分别使用 15% 和 60% 的乙醇作为洗脱剂, 可成功地将菊苣酸与其他成分分离。经聚酰胺二次层析, 可将菊苣酸的纯度提高至 72.0%。本工作将多裂翅果菊提取物中的菊苣酸浓度 (2.53%) 提高 28.5 倍, 回收率达到 91.4%, 同时还可分离单咖啡酰酒石酸、绿原酸、灯盏乙素作为副产品。

[关键词] 多裂翅果菊, 菊苣酸, 大孔树脂, 聚酰胺, 灯盏乙素

[中图分类号] R284.2; R286.02 [文献标志码] A [文章编号] 1672-1292(2015)02-0088-05

Separation and Purification of Cichoric Acid in *Pterocypsela laciniata* (Houtt.) Shih Extracts

Ke Xiaohong¹, Chen Yuru¹, Zhao Wenwen¹, Qian Yuanyuan¹, Dai Kewei², Tang Chao³

(1. School of Life Science, Jiangsu Engineering and Technology Research Centre for Microbiology Resource, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomic, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(3. Dianhong Pharmaceutical Group Co., LTD, Kunming 650106, China)

Abstract: A method is developed to separate five active ingredients: cichoric acid, scutellarin, caftaric acid, chlorogenic acid and 3,5-dicaffeoylquinic acid from the extracts of *Pterocypsela laciniata* (Houtt.) Shih with CN101 macroporous resin, by eluting with 15% ethanol and then 15% ethanol. The purity of cichoric acid is increased to 72% with a second separation by polyamide. Cichoric acid content is 28.5 times more than that 2.53% of the extracts of *Pterocypsela laciniata* and the recovery rate is 91.4%. Caftaric acid, chlorogenic acid and scutellarin can be obtained as by-products.

Key words: *Pterocypsela laciniata*, cichoric acid, macroporous resin, polyamide, scutellarin

多裂翅果菊 (*Pterocypsela laciniata* (Houtt.) Shih) 为菊科翅果菊属植物, 主要分布于东亚及东南亚, 在中国境内均有分布。作为野菜食用营养价值较高, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗心脑血管疾病等多方面的作用^[1,2], 其主要成分有倍半萜内酯类^[1,3]、甾醇类^[4]、挥发油类等^[5]。本课题组的研究表明^[6], 除上述成分外, 多裂翅果菊还含有丰富的菊苣酸和灯盏乙素等物质。

菊苣酸又名二咖啡酰酒石酸, 具有增强免疫, 抑制 HIV-1、HIV-1 整合酶, 抗菌、抗病毒的作用^[7-9], 在欧美受到极大的关注^[10-12]。菊苣酸可采用大孔树脂和聚酰胺分离。大孔树脂是一类具有浓缩、分离作用的高分子聚合物, 依靠与被吸附分子之间的分子间力, 以巨大的比表面进行物理吸附, 使有机化合物根据吸附力及其分子量大小经溶剂洗脱而达到分离、纯化、除杂、浓缩等目的。聚酰胺是结构中含有重复单位酰胺键 (C=O...HN) 的高分子聚合物, 主要依靠对氢键的特殊吸附性来实现物质分离, 特别适合酚类、醌类、黄酮类化合物的分离。本工作利用大孔树脂和聚酰胺对多裂翅果菊中的菊苣酸等成分的分离纯化进行了研究。

收稿日期: 2014-11-28.

通讯联系人: 陈育如, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物与药物. E-mail: chenyruru@njnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

多裂翅果菊,采自江苏南京仙林大学城.聚酰胺,购自浙江台州市路桥四甲生化厂. ADS-7、ADS-17、HPD850、NKA-II、CN101 等树脂,购自郑州勤实公司及西安蓝晓公司. 菊苣酸、灯盏乙素、绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎尼酸等对照品,购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均在 98% 以上. 所使用试剂乙醇、甲酸为分析纯,乙腈为色谱纯.

1.2 方法

1.2.1 高效液相色谱分析

色谱条件为:Ultimate AQ-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm) 色谱柱,流动相:0.1% 甲酸水-乙腈;流速:1.0 mL/min;检测波长:330 nm;柱温:30 ℃.

洗脱条件为:乙腈 10%~35%(0 min~9.0 min),35%~52%(9.0 min~11.0 min),52%(11.0 min~13.5 min),52%~10%(13.5 min~14.0 min).

1.2.2 上样液的制备

将多裂翅果菊自然阴干,研磨粉碎,过 40 目筛备用. 准确称取 3.00 g,按 1:50 固液比加入 70% 乙醇溶剂(pH 3.0),50 ℃ 超声波辅助提取 60 min 后过滤,提取液旋转蒸发至无醇味,离心得到上样液,于 4 ℃ 冰箱保存.

1.2.3 纯化材料筛选

(1)树脂预处理:取聚酰胺、HPD850、CN101、ADS-7、ADS-17、NKA-II 树脂各 1.00 g,放入锥形瓶中,用酒精浸泡 24 h,用去离子水反复洗至无醇味.

(2)样品浓缩:前述方法得到的提取液用旋转蒸发器旋转蒸发.

(3)准确量取 15 mL 提取液,在 30 ℃ 恒温摇床中,以 150 r/min 速率静态吸附 24 h,吸附平衡后过滤,测定滤液中的菊苣酸含量,可计算得到吸附量 Q 和吸附率 E :

$$Q = \frac{C_0 V_0 - C_1 V_1}{W}, \quad (1)$$

$$E = \frac{C_0 V_0 - C_1 V_1}{C_0 V_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中, Q 为吸附量(mg/g); E 为吸附率(%); C_0 为吸附前溶液中菊苣酸浓度(mg/mL); C_1 为吸附后溶液中菊苣酸浓度(mg/mL); V_0 为吸附前溶液体积(mL); V_1 为吸附后溶液体积(mL); W 为树脂湿重(g).

将已过滤溶液的树脂中加入乙醇解吸,测定解吸液中菊苣酸的含量:

$$M = \frac{C_2 V_2}{C_0 V_0 - C_1 V_1} \times 100\%, \quad (3)$$

式中, C_2 为解吸液中菊苣酸浓度(mg/mL), V_2 为解吸液体积(mL).

1.2.4 大孔树脂对提取液的分离纯化

(1)提取液:按前述方法提取样液.

(2)旋转浓缩:用旋转蒸发器对提取液进行浓缩.

(3)预处理:取 6.0 g 的 CN101 树脂放入锥形瓶中,用 95% 酒精浸泡 24 h,用去离子水反复洗至无醇味,湿法装柱.

(4)吸附与洗脱:将处理好的树脂湿法装入玻璃色谱柱(30 cm×1.0 cm),柱床高 18 cm,静置 0.5 h 后上样,常温下静置吸附 1.0 h,调节乙醇洗脱液的 pH 为 3.0,调节吸附流速为 3 s/滴,进行动态吸附. 分别用 15%、60% 乙醇以 4 BV/h 流速进行洗脱,每 1 BV 洗脱液单独洗脱,测定洗脱液中菊苣酸浓度,绘制洗脱曲线.

1.2.5 聚酰胺对提取液的分离纯化

(1)合并 CN101 的 60% 乙醇洗脱液进行蒸发浓缩,作为过聚酰胺树脂的上样液.

(2)称取 5.0 g 的聚酰胺树脂,室温下将干粉浸泡于 95% 酒精中 24 h,用去离子水反复洗至无醇味,

备用.

(3)参照 CN101 大孔树脂吸附与洗脱的方法进行上样液上柱,用 70%乙醇(pH3.0)洗脱,收集 5 BV,检测洗脱液中菊苣酸浓度.

(4)将收集到的洗脱液于 50 ℃下真空浓缩至无有机溶剂,放入-80 ℃低温冰箱预冷过夜,之后进行真空冷干燥,得到干燥成品.

2 结果与讨论

2.1 大孔树脂的筛选

所用吸附材料的性能参数如表 1 所示. 经静态吸附和解吸,各材料对多裂翅果菊提取液中各物质的吸附率和解吸率见表 2.

表 1 吸附材料的性能 Table 1 Adsorption material capability			
树脂种类	极性	比表面积/(m ² /g)	平均孔径/nm
聚酰胺	非极性	750~800	8~10
HPD850	中极性	500~600	9~10
NKA-II	极性	160~200	14.5~15.5
ADS-7	极性	100~150	25~30
ADS-17	中极性	100~120	25~30
CN101	非极性	600~700	8~10

表 2 不同吸附材料对菊苣酸的吸附和解吸 Table 2 Cichoric acid adsorption and desorption of different materials			
树脂型号	吸附量/(mg/g)	吸附率/%	解吸率/%
聚酰胺	3.55	68	39
HPD850	1.28	24	72
NKA-II	0.89	17	78
ADS-7	0.96	18	6
ADS-17	0.89	17	70
CN101	1.98	66	64

吸附材料的极性、比表面积和平均孔径是影响吸附材料吸附效果的重要指标,在孔径适宜的情况下,对具有相同孔隙率的材料,其吸附量随比表面积的增加而增加. 由表 1 可见,表中所有材料中以聚酰胺的比表面积为最大,而 ADS 系列的材料孔径最大.

由表 2 可见,对菊苣酸吸附量较高的是聚酰胺(吸附量为 3.55 mg/g)和 CN101(吸附量为 1.98 mg/g),吸附率分别为 68%和 66%. 从解吸率结果可见,聚酰胺的解吸率为 39%,CN101 树脂的解吸率为 64%,与其他材料的吸附率和解吸率相比,CN101 树脂和聚酰胺具有明显的优势,可作为后续纯化的材料.

2.2 提取液的一级纯化

经 HPLC 分析发现,多裂翅果菊中含有丰富的单咖啡酰酒石酸、绿原酸、灯盏乙素、菊苣酸和 3,5-二咖啡酰奎尼酸等成分^[7],具有重要的提取与分离价值. 用 CN101 树脂对这些成分初步分离的结果表明,大孔树脂能有效地将单咖啡酰酒石酸、绿原酸从混合物中分离出来,相关结果如图 1 所示.

由图 1 可见,所选树脂用 15%的乙醇洗脱液能将单咖啡酰酒石酸、绿原酸与其他成分进行有效的分离. 继续用乙醇进行洗脱,可将菊苣酸、灯盏乙素等进行分离,如图 2 所示.

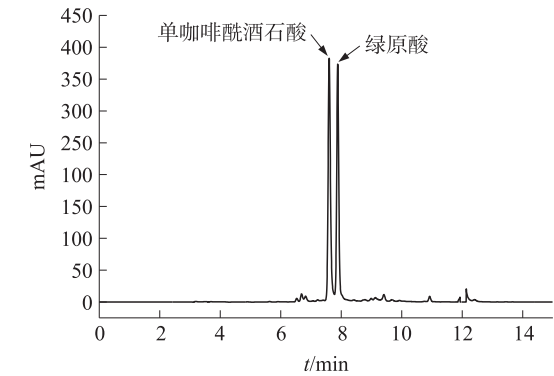


图 1 树脂对单咖啡酰酒石酸、绿原酸的分离(15%乙醇)
Fig. 1 Separation of Caffeoyl tartaric acid and Chlorogenic acid by CN101(15% ethanol)

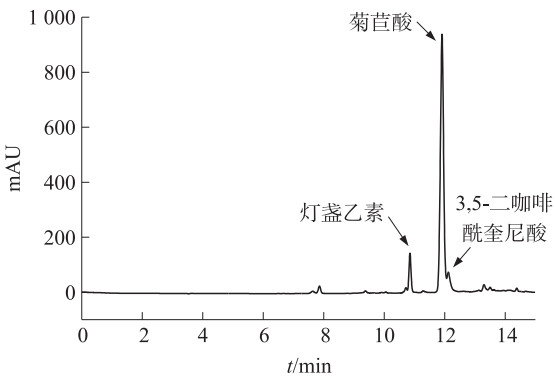


图 2 菊苣酸、灯盏乙素和 3,5-二咖啡酰奎尼酸的分离(60%乙醇)
Fig. 2 Separation between cichoric acid, scutellarin and 3,5-dicaffeoylquinic acid(60% ethanol)

菊苣酸在洗脱过程中的浓度曲线如图3所示,最佳收集段位于60-1BV至60-3BV。上述洗脱液的菊苣酸中还含有灯盏乙素,要分离菊苣酸中的灯盏乙素,可用聚酰胺进一步纯化。

2.3 聚酰胺对菊苣酸的二级纯化

由图4可见,聚酰胺可对菊苣酸与灯盏乙素进行有效分离,菊苣酸纯度为72%,回收率为91.4%。

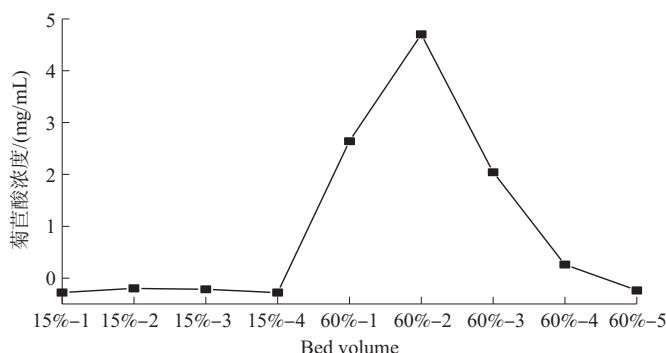


图3 大孔树脂CN101对菊苣酸的动态洗脱曲线

Fig. 3 The desorption curve CN101 of resin on Cichoric acid

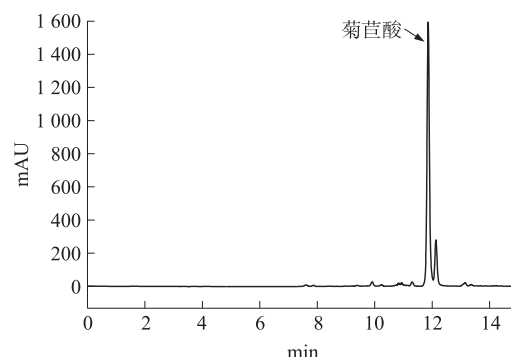


图4 聚酰胺对菊苣酸进一步分离的HPLC分析

Fig. 4 HPLC spectrum of cichoric acid after desorption scutellarin by polyamide

3 结语

多裂翅果菊提取物中有菊苣酸、单咖啡酰酒石酸、绿原酸、灯盏乙素等多种成分,经大孔树脂分离,可使单咖啡酰酒石酸、绿原酸与菊苣酸等成分得到有效分离,继续用聚酰胺材料可对菊苣酸中的灯盏乙素进行分离。与仅用聚酰胺直接分离菊苣酸的纯度(49%)相比^[13],纯度大大提高(72%);与仅用大孔树脂分离菊苣酸的纯度(36%)^[14]相比,效率更是提高了1倍。本工作为以多裂翅果菊为原料生产菊苣酸、单咖啡酰酒石酸、绿原酸和灯盏乙素等天然产物与药物提供了重要的科学依据,对充分利用多裂翅果菊资源有着重要的理论意义与现实意义。

[参考文献](References)

- [1] Bai Yixiao, Tan Jing, Yan Fulin, et al. A new guaianolide from the roots of *Pterocypsela elata* [J]. Chinese Chemical Letters, 2013, 24: 55-56.
- [2] Han Yifeng, Cao Guixiu, Gao Xiaojing, et al. Isolation and characterisation of the sesquiterpene lactones from *Lactuca sativa* L var. *Anagustata* [J]. Food Chemistry, 2010, 120(4): 1 083-1 088.
- [3] Hui W H, Lee W K. Triterpenoid and steroid constituents of some lactuca and ageratum species of Hong Kong [J]. Phytochemistry, 1971, 10(4): 899-901.
- [4] 董丽, 孙祥德, 郭兰青, 等. 多裂翅果菊的挥发油成分 [J]. 广西植物, 2004, 24(1): 61-63.
Dong Li, Sun Xiangde, Guo Lanqing, et al. The constituents of volatile oil from *Pterocypsela laciniata* [J]. Guihaia, 2004, 24(1): 61-63. (in Chinese)
- [5] 侯彩婷, 王瑞华, 邹昀员, 等. UPLC-MS/MS法测定多裂翅果菊中植物甾醇的含量 [J]. 食品科学, 2012, 34(12): 301-305.
Hou Caiting, Wang Ruihua, Zou Yunyuan, et al. Analysis of phytosterol content in *Pterocypsela laciniata* (Houtt.) shih by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. Food Science, 2012, 34(12): 301-305. (in Chinese)
- [6] 陈育如, 柯小红, 闫莽, 等. 以翅果菊为原料同时提取菊苣酸, 单咖啡酰酒石酸, 3,5-二咖啡酰奎尼酸和绿原酸的方法: 中国, CN201310442563.1 [P]. 2013.
Chen Yuru, Ke Xiaohong, Yan Mang, et al. A method about the extract of cichoric acid, caftaric acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid and chlorogenic acid from *Pterocypsela*: China, CN201310442563.1 [P]. 2013. (in Chinese)
- [7] Tsai Yul-Ling, Chiu Chien-Chih, Chen Jeff Yi-Fu, et al. Cytotoxic effects of *Echinacea purpurea* flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012(143): 914-919.
- [8] Line Thygesen, Johanna Thulin, Alan Mortensen. Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*,

- alone and combination[J]. Food Chemistry, 2007(101):74.
- [9] Fusco Dahlene, Liu Xinyan, Savage Caroline, et al. *Echinacea purpurea* aerial extract alters course of influenza infection in mice[J]. Vaccine, 2010(28):3 956–3 962.
- [10] 徐建忠, 史秋梅, 倪耀娣, 等. 紫锥菊药理作用的研究现状[J]. 黑龙江畜牧兽医:科技版, 2010(4):41–42.
Xu Jianzhong, Shi Qiumei, Ni Yaodi, et al. The current research of pharmacological effects of *Echinacea purpurea* [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Science and Technology Edition, 2010(4):41–42. (in Chinese)
- [11] Wang Xiao, Geng Yanling, Li Fuwei, et al. Preparative separation of cichoric acid from *Echinacea Purpurea* by pH-zone-refining counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1 103(1):166–169.
- [12] 谢春燕, 徐新军, 谢鸢生, 等. 快速制备液相色谱分离紫锥菊中咖啡酰基酒石酸、菊苣酸和松果菊苷[J]. 中国新药与临床药理, 2012, 23(1):90–94.
Xie Chunyan, Xu Xinjun, Xie Zhisheng, et al. Isolation of caftaric acid, cichoric acid and echinacoside from *Echinacea purpurea* by flash chromatography[J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2012, 23(1):90–94. (in Chinese)
- [13] 刘轶琛, 曾建国, 陈波, 等. 聚酰胺对紫锥菊提取物中菊苣酸的分离纯化研究[J]. 中草药, 2007, 38(4):510–532.
Liu Yichen, Zeng Jianguo, Chen Bo, et al. Isolation and purification of cichoric acid from extracts of *Echinacea purpurea* by polyamide column chromatography[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(4):510–532. (in Chinese)
- [14] 曾栋, 陈波, 罗旭彪, 等. 大孔吸附树脂对紫锥菊提取物中菊苣酸分离纯化的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(2):160–162.
Zeng Dong, Chen Bo, Luo Xubiao, et al. Study on adsorption and purification of cichoric acid in extracts of *Echinacea purpurea* with macroporous adsorption resin[J]. Natural Product Research and Development, 2004, 16(2):160–162. (in Chinese)

[责任编辑:严海琳]