

## 大孔树脂纯化蒲公英中绿原酸和咖啡酸的工艺研究

李满郁\*, 田再, 吴当当

黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319

**摘要:** 研究大孔树脂对蒲公英中绿原酸和咖啡酸的富集工艺。利用高效液相色谱法建立绿原酸和咖啡酸的含量测定方法, 采用单因素和正交试验优化富集工艺。最佳工艺条件是以 XDA-1B 树脂为载体, 树脂: 药材 (g: g) = 1: 5, 上样液 (pH 为 3) 浓度为 40 g (以药材计) / L, 吸附流速 4 BV/h, 水洗脱 8BV (流速 1 BV/h), 20% 乙醇洗脱 9BV (流速 0.5 BV/h), 富集物中绿原酸和咖啡酸的含量和转移率分别为 50.32 ± 0.74%、91.26 ± 1.06%、37.94 ± 0.67% 和 90.14 ± 0.93% (n = 5), 总含量为 88.18 ± 1.22% (n = 5)。不同质量树脂 (20 ~ 640 g) 的含量和转移率差别无统计学意义。树脂可重复使用 4 次。工艺简便、稳定、线性宽、耐用性强, 能够获得高含量和高转移率的有效部位富集物。

**关键词:** 蒲公英; 绿原酸; 咖啡酸; 大孔树脂;

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.037

## Enrichment Technology of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid from *Taraxacum mongolicum* by Macroporous Resin

LI Man-yu\*, TIAN Zai, WU Dang-dang

Heilongjiang Bayi Agricultural University, College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Daqing 163319, China

**Abstract:** To study enrichment technology of chlorogenic acid and caffeic acid from *Taraxacum mongolicum* by macroporous resin. Determination method of chlorogenic acid and caffeic acid was established by HPLC. Preparation technology was optimized by mono factor test and orthogonal test. The optimal conditions were using XDA-1B macroporous resin, resin: Taraxacum (g: g) = 1: 5, the concentration of sample solution (pH3) was 40 g (Taraxacum) / L, the adsorption flow rate was 4 BV/h, The sample was eluted by water with 8 BV (flow rate was 1 BV/h) and 20% ethanol of 9 BV (flow rate was 0.5 BV/h), respectively. The content and transfer rate of chlorogenic acid and caffeic acid in enrichment were 50.32 ± 0.74%, 91.26 ± 1.06%, 37.94 ± 0.67% and 90.14 ± 0.93% (n = 5), total content was 88.18 ± 1.22% (n = 5). The content and transfer rate was no difference by the resin with different mass (20-640 g). The resin could be repeatedly used for 4 times. The process was simple, stable, linear width, strong durability, to obtain enrichment of effective parts with high content and high transfer rate.

**Key words:** herba taraxaci; chlorogenic acid; caffeic acid; macroporous resin

蒲公英具有清热解毒, 消痈散结, 利湿通尿的功效。现代药理研究表明其有广谱抗菌作用<sup>[1]</sup>; 抗病毒, 治疗糖尿病, 利胆作用, 抗风湿作用, 抗炎作用<sup>[2,3]</sup>; 肝保护作用<sup>[4]</sup>, 利尿作用<sup>[5]</sup>, 肿瘤细胞凋亡诱导作用<sup>[6]</sup>。绿原酸和咖啡酸是蒲公英中两种重要的成分<sup>[7]</sup>。绿原酸的药理活性有治疗乙肝<sup>[8]</sup>, 降低血糖<sup>[9]</sup>, 抗炎、镇痛、解热<sup>[10]</sup>, 调节血脂<sup>[11]</sup>, 抗菌<sup>[12]</sup>, 抑制血小板聚集<sup>[13]</sup>, 降压<sup>[14]</sup>, 对细胞的保护

作用<sup>[15,16]</sup>, 抗氧化、抗纤维化和保护肝脏功能<sup>[17-19]</sup>。咖啡酸的药理活性有抗癌<sup>[20]</sup>, 增加白细胞<sup>[21]</sup>, 保护红细胞<sup>[22]</sup>, 抗炎、镇痛<sup>[23]</sup>, 抗氧化<sup>[24]</sup>和抗菌<sup>[25]</sup>等作用。本研究的目的是利用大孔吸附树脂技术从蒲公英提取液中富集绿原酸和咖啡酸, 制备高含量和高转移率的有效部位富集物。

### 1 仪器与材料

LC-2010A 型高效液相色谱仪 (日本岛津), RE52-AA 旋转蒸发器 (上海青浦沪西仪器厂), SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), H66MC 超声波清洗器 (无锡市超声电子设备

收稿日期: 2014-09-15 接受日期: 2014-12-31

基金项目: 黑龙江省教育厅高校创新团队项目 (SCX20011-03); 黑龙江八一农垦大学博士科研启动基金 (2011YB-11); 黑龙江八一农垦大学大学生创新训练项目 (DC2012-15)

\* 通讯作者 Tel: 86-459-6819198; E-mail: lmy0459@126.com

厂)。蒲公英药材(大庆市福瑞邦药店),绿原酸对照品(110753-200613,含量测定用,中国药品生物制品检定所),咖啡酸对照品(批号:110885-200102,含量测定用,中国药品生物制品检定所),D101、XDA-1B、HPD400型大孔吸附树脂(郑州勤实科技有限公司),AB-8、X-5、S-8、NKA-II、NKA-9型大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂),色谱乙腈(美国迪马试剂公司),娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),盐酸(化学纯)、氢氧化钠(化学纯),95%乙醇(化学纯)。

## 2 实验方法

### 2.1 建立绿原酸和咖啡酸的含量测定方法

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil(钻石)  $C_{18}$  (200 × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 迪马科技; 保护柱: EasyGuard II  $C_{18}$  Kit 保护柱, 迪马科技; 洗脱条件: 乙腈-0.4% 磷酸溶液(0 ~ 10 min, 9:91 ~ 12:88; 10 ~ 30 min, 12:88 ~ 17:83), 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 323 nm; 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 2.1.2 标准曲线的绘制

取绿原酸对照品约 13 mg, 精密称定, 取咖啡酸对照品约 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中。加适量 50% 甲醇, 充分溶解后加至刻度, 绿原酸的质量浓度为 1.306 g/L, 咖啡酸的质量浓度为 1.004 g/L, 即为混合对照品储备液。取混合对照品储备液 0.5、1、2、4、6、8 mL, 分别定容至 10 mL, 即为混合对照品溶液, 取混合对照品溶液滤过(0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜), 进样 20  $\mu\text{L}$  (见图 1-A), 以峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归, 得绿原酸回归方程:  $A = 1.65 \times 10^6 C - 36.7 \times 10^2$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围: 0.065 ~ 1.044 g/L。咖啡酸回归方程:  $A = 1.87 \times 10^6 C - 48.5 \times 10^2$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围: 0.050 ~ 0.803 g/L。

#### 2.1.3 重复性实验

取同一浓度的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 绿原酸峰面积的 RSD 为 0.18%, 咖啡酸峰面积的 RSD 为 0.12%。

#### 2.1.4 稳定性实验

取同一富集物供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定峰面积, 绿原酸峰面积的 RSD 为 1.42%, 咖啡酸峰面积的 RSD 为 1.61%。

#### 2.1.5 回收率实验

取同一富集物供试品 6 份, 精密加入 1 mL 混合对照品溶液, 测定含量, 计算绿原酸和咖啡酸的回收

率和 RSD, 绿原酸的回收率和 RSD 为 99.21% 和 1.36%, 咖啡酸的回收率和 RSD 为 101.13% 和 1.28%。

#### 2.1.6 蒲公英中绿原酸和咖啡酸的含量测定

取蒲公英粗粉约 1 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加 5% 甲酸的甲醇溶液 20 mL, 密塞, 摇匀, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz), 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 5% 甲酸的甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 离心, 取上清液, 用微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ ) 滤过, 进样(见图 1B)。绿原酸的含量为  $0.41 \pm 0.04\%$  ( $n = 5$ ), 咖啡酸的含量为  $0.32 \pm 0.02\%$  ( $n = 5$ )。

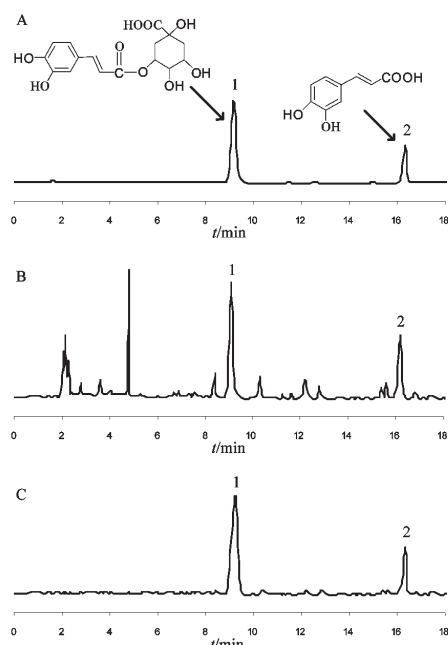


图1 混合对照品溶液(A)、蒲公英提取物溶液(B)及富集物溶液的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standard solution (A), *T. mongolicum* extract (B) and enrichment sample (C)

1-绿原酸 chlorogenic acid; 2-咖啡酸 caffeic acid

## 2.2 大孔树脂富集工艺的优化

### 2.2.1 上样液的制备

取蒲公英适量, 置于烘箱中, 60  $^{\circ}\text{C}$ , 12 h, 粉碎, 取粗粉适量, 精密称定, 加 80% 乙醇提取 2 次, 第 1 次 10 倍量, 2 h; 第 2 次 8 倍量, 1 h。过滤, 合并两次提取液, 减压浓缩, 至无醇, 加蒸馏水稀释至规定浓度, 即为上样液。另取粗粉约 50 g, 精密称定, 按上法操作至“减压浓缩”, 然后真空干燥, 得固形物(醇提物), 称重, 取适量进样分析, 测定绿原酸和咖啡

酸的含量和转移率分别为  $0.21 \pm 0.01\%$ 、 $94.12 \pm 1.41\%$ 、 $0.17 \pm 0.01\%$ 、 $93.41 \pm 1.59\%$  ( $n=5$ )。醇提物中绿原酸的含量 (%) =  $W_{\text{醇提物中绿原酸}}/W_{\text{醇提物}}$ ，醇提物中咖啡酸的含量 (%) =  $W_{\text{醇提物中咖啡酸}}/W_{\text{醇提物}}$ ，醇提物中绿原酸的转移率 (%) =  $W_{\text{醇提物中绿原酸}}/W_{\text{蒲公英中绿原酸}}$ ，醇提物中咖啡酸的转移率 (%) =  $W_{\text{醇提物中咖啡酸}}/W_{\text{蒲公英中咖啡酸}}$

### 2.2.2 树脂的预处理

取树脂适量,放入蒸馏瓶内,加入 95% 乙醇,在水浴上加热,1 h,过滤,装入玻璃柱内,以 95% 乙醇 (流速 0.5 BV/h) 洗脱 5 BV → 蒸馏水 (流速 1 BV/h) 洗脱 10 BV → 4% NaOH 洗脱 3 BV → 蒸馏水洗脱至中性 → 5% HCl 洗脱 3 BV → 蒸馏水洗脱至中性,倾出,放入广口容器内,加入 95% 乙醇,密闭保存,待用。

### 2.2.3 树脂柱的安装

取“2.2.2”项下的树脂,减压过滤后,取约 10 g,精密称量,装入玻璃柱内 (内径 2 cm × 柱高 100 cm),用蒸馏水洗脱,至无醇,继续洗脱,直至柱内树脂液面不再下降为止,待用。记录树脂液面的高度,计算树脂柱的柱体积 (BV)。

### 2.2.4 树脂筛选实验

分别取已处理好的 8 种大孔吸附树脂各 10 g,按“2.2.3”装柱,加入等量上样液 (浓度为 40 g/L, pH3),动态吸附 24 h,收集上样洗脱液 A,用 20 BV 蒸馏水洗脱,收集水洗脱液 B,最后用 50% 乙醇 9 BV 洗脱,收集洗脱液 C,分别测定洗脱液 A、B 和 C 中的绿原酸和咖啡酸的质量。计算绿原酸和咖啡酸的比上样量、比吸附量、吸附率、解吸率和含量。实验重复 3 次。比上样量 (mg/g) =  $(M_{\text{上}} - M_{\text{上流}})/W$ ,比吸附量 (mg/g) =  $(M_{\text{上}} - M_{\text{上流}} - M_{\text{水洗}})/W$ ,吸附率 (%) =  $(M_{\text{上}} - M_{\text{上流}} - M_{\text{水洗}})/M_{\text{上}} \times 100\%$ ,解吸率 (%) =  $M_{\text{醇洗}}/(M_{\text{上}} - M_{\text{上流}} - M_{\text{水洗}}) \times 100\%$ ,含量 (%) =  $M_{\text{醇洗}}/M_{\text{富集物}}$ ,  $M_{\text{上}}$ : 上样液中绿原酸/咖啡酸质量 (mg);  $M_{\text{上流}}$ : 上样流出液中绿原酸/咖啡酸质量 (mg);  $M_{\text{水洗}}$ : 水洗脱液中的绿原酸/咖啡酸质量 (mg);  $M_{\text{醇洗}}$ : 50% 乙醇洗脱液中绿原酸/咖啡酸质量 (mg);  $W$ : 树脂质量 (g),  $M_{\text{富集物}}$ : 50% 乙醇洗脱液固形物的质量 (mg)。

### 2.2.5 上样液浓度实验

按“2.2.3”项下安装 6 个 10 g 树脂柱。取 6 份约 50 g 蒲公英粗粉按“2.2.1”,分别配制成浓度为 10、20、40、80、160、320 g (以药材计)/L 的上样液

(pH3),动态吸附 24 h 后,水洗 10 BV (流速 1 BV/h),最后用 80% 乙醇洗脱 6 BV (流速 0.5 BV/h)。收集醇洗脱液,进样分析,计算绿原酸和咖啡酸的吸附率。实验重复 3 次。

### 2.2.6 吸附流速实验

取 6 份约 50 g 蒲公英粗粉按“2.2.1”配制浓度为 40 g/L 的上样液 (pH3),分别以流速 1、2、4、8、16、32 BV/h 进行动态吸附后,水洗 10 BV (流速 1 BV/h),最后用 80% 乙醇洗脱 6 BV (流速 0.5 BV/h),收集醇洗脱液,进样分析,计算绿原酸和咖啡酸的吸附率。实验重复 3 次。

### 2.2.7 上样液 pH 值实验

取 6 份约 50 g 蒲公英粗粉,将其醇提物配制分别成 pH 为 1、2、3、4、5 和 6 的上样液 (浓度为 40 g/L),以流速 4 BV/h 进行动态吸附后,水洗 10 BV (流速 1 BV/h),最后用 80% 乙醇洗脱 6 BV (流速 0.5 BV/h),收集醇洗脱液,进样分析,计算绿原酸和咖啡酸的吸附率。实验重复 3 次。

### 2.2.8 水洗脱体积实验的确定

由树脂:药材 (g:g) 为 1:2、1:5 和 1:8 的三种比例考察水洗脱体积。取约 20、50 g 和 80 g 蒲公英粗粉按“2.2.1”配制浓度为 40 g/L 的上样液 (pH3),以流速 4 BV/h 进行动态吸附后,分别水洗脱 7、10 和 15 BV (流速 1 BV/h),每柱均按单个柱体积接收,减压回收溶剂,制成固形物,计算除杂率。实验重复 3 次。除杂率 (%) =  $\sum M_i/M_{\text{醇提物}} \times 100\%$ ,  $\sum M_i$ : 1~i 个柱体积合并液所得固形物的质量 (mg),  $M_{\text{醇提物}}$ : 药材醇提液干燥所得固形物的质量 (mg)。

### 2.2.9 脱附流速实验的确定

制备 18 个 10 g 的树脂柱,18 份 50 g 蒲公英上样液 (浓度 40 g/L, pH3),动态吸附后 (流速 4 BV/h),水洗脱 8 BV (流速 1 BV/h),分别以 10% 乙醇、20% 乙醇和 30% 乙醇洗脱 9 BV,每个洗脱剂的脱附流速为 0.125、0.25、0.5、1、2、4 BV/h,测定洗脱液中绿原酸和咖啡酸的解吸率。实验重复 3 次。

### 2.2.10 正交试验优化上样量、洗脱剂及洗脱体积

根据表 3 和表 4 的  $L_9(3^4)$  正交试验设计,制备 9 个 10 g 树脂柱,20、50 g 和 80 g 蒲公英的上样液各 3 份 (浓度 40 g/L, pH3),动态吸附后 (流速 4 BV/h),分别水洗脱 5、8 BV 和 13 BV (流速 1 BV/h),然后按照表 4 中相应的洗脱剂和洗脱体积 (流速 0.5 BV/h) 洗脱,收集洗脱液,减压干燥为固形物 (富集物),进样分析,计算绿原酸和咖啡酸的含量

和转移率,以综合评分(综合评分 = 含量  $\times$  0.7 + 转移率  $\times$  0.3)作为评价指标,数据利用 SPSS17.0 进行统计分析。含量(%) = 富集物中绿原酸(或咖啡酸)的质量 mg/富集物的质量 mg  $\times$  100%,转移率(%) = 富集物中绿原酸(或咖啡酸)的质量 mg/上样液中相应的绿原酸(或咖啡酸)的质量 mg  $\times$  100%。

### 2.2.11 工艺流程验证实验

制备 10 g 树脂柱,20 g 蒲公英的上样液(浓度 40 g/L,pH3),以 4 BV/h 的流速动态吸附后,水洗脱 8BV(流速 1 BV/h),然后用 20% 乙醇 9BV(流速 0.5 BV/h)洗脱,收集洗脱液,减压干燥,即得富集物,进样分析,计算绿原酸和咖啡酸的含量和转移率。实验重复 5 次。

### 2.2.12 工艺放大实验

按照树脂:药材(g:g)为 1:2 的比例进行工艺放大实验。制备 20、40、80、160、320、640 g 共 6 个树脂柱,相对应蒲公英上样液(浓度 40 g/L,pH3)6 份,以 4 BV/h 的流速动态吸附后,水洗脱 8 BV(流速 1 BV/h),然后用 20% 乙醇 9 BV(流速 0.5 BV/h)洗脱,收集洗脱液,减压干燥,即得富集物,进样分析,计算绿原酸和咖啡酸的含量和转移率,数据利用 SPSS17.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

### 2.2.13 树脂重复使用实验

制备 10 g 树脂柱,20 g 蒲公英的上样液(浓度

40 g/L,pH3),以 4 BV/h 的流速动态吸附后,水洗脱 8 BV(流速 1 BV/h),20% 乙醇 9 BV(流速 0.5 BV/h)洗脱,收集洗脱液,减压干燥,即得富集物,95% 乙醇洗脱 5 BV(流速 0.5 BV/h),水洗脱 10 BV(流速 1 BV/h),4% 氢氧化钠溶液(流速 1 BV/h)洗脱 3 BV,水洗脱 10 BV(流速 1 BV/h),再次加入 20 g 蒲公英的上样液,如此循环 6 次,所得富集物按先后顺序标记为 F1 ~ F6。进样分析,计算绿原酸和咖啡酸的含量和转移率。实验重复 5 次。数据利用 SPSS17.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 结果

#### 3.1.1 树脂型号的确定

结果见表 1,表 2,D101 和 X-5 型树脂的解吸率高,但其他指标都很低;S-8 和 HPD400 型树脂的比上样量、比吸附量和吸附率高,但解吸率和含量低;NKA-II 和 NKA-9 型树脂的解吸率高,但吸附率和含量低,AB-8 和 XDA-1B 型树脂的比上样量和比吸附量虽然是中等强度,但吸附率和解吸率高,对分离纯化有利,尤其 XDA-1B 型树脂的绿原酸和咖啡酸在 50% 乙醇洗脱富集物中含量最高,因此选择 XDA-1B 型树脂为分离纯化的载体。

表 1 绿原酸的吸附和解吸结果( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Results of adsorption and desorption of chlorogenic acid ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

树脂类型 Resin type	比上样量 Loading amount (mg/g)	比吸附量 Absorption amount (mg/g)	吸附率 Absorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)	含量 Content (%)
D101	1.65 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.06	62.52 $\pm$ 1.25	97.24 $\pm$ 1.12	12.24 $\pm$ 1.10
X-5	1.52 $\pm$ 0.12	1.06 $\pm$ 0.10	69.14 $\pm$ 2.09	98.12 $\pm$ 0.21	13.18 $\pm$ 1.05
AB-8	4.06 $\pm$ 0.28	3.86 $\pm$ 0.31	95.17 $\pm$ 1.90	96.24 $\pm$ 1.52	24.13 $\pm$ 1.69
XDA-1B	4.25 $\pm$ 0.26	4.11 $\pm$ 0.29	96.31 $\pm$ 1.08	96.31 $\pm$ 1.27	33.48 $\pm$ 1.25
S-8	6.18 $\pm$ 0.25	6.02 $\pm$ 0.30	97.34 $\pm$ 1.12	32.12 $\pm$ 2.68	16.42 $\pm$ 1.31
HPD400	7.69 $\pm$ 0.46	7.48 $\pm$ 0.52	97.63 $\pm$ 0.98	35.85 $\pm$ 2.07	17.56 $\pm$ 1.05
NKA-II	3.59 $\pm$ 0.29	2.57 $\pm$ 0.23	71.21 $\pm$ 2.15	96.48 $\pm$ 0.39	15.87 $\pm$ 0.79
NKA-9	2.98 $\pm$ 0.21	2.21 $\pm$ 0.18	74.52 $\pm$ 1.48	96.57 $\pm$ 0.75	14.45 $\pm$ 1.06

表 2 咖啡酸的吸附和解吸结果( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Results of adsorption and desorption of caffeic acid ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

树脂类型 Resin type	比上样量 Loading amount (mg/g)	比吸附量 Absorption amount (mg/g)	吸附率 Absorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)	含量 Content (%)
D101	1.79 $\pm$ 0.11	1.14 $\pm$ 0.07	63.52 $\pm$ 1.27	96.89 $\pm$ 1.34	8.21 $\pm$ 0.66

X-5	1.65 ± 0.12	1.12 ± 0.09	67.74 ± 1.36	97.48 ± 0.97	7.87 ± 0.63
AB-8	3.27 ± 0.34	3.10 ± 0.36	94.38 ± 1.89	95.29 ± 1.91	14.15 ± 1.09
XDA-1B	3.36 ± 0.26	3.23 ± 0.29	96.56 ± 1.96	96.86 ± 1.94	21.47 ± 1.64
S-8	6.29 ± 0.31	6.11 ± 0.31	97.23 ± 1.94	30.25 ± 0.61	9.48 ± 0.66
HPD400	7.56 ± 0.45	7.28 ± 0.51	96.28 ± 2.01	34.71 ± 1.04	10.26 ± 0.62
NKA-II	3.48 ± 0.24	2.62 ± 0.16	75.14 ± 2.26	97.21 ± 0.42	7.68 ± 0.38
NKA-9	3.12 ± 0.22	2.26 ± 0.18	72.52 ± 1.45	96.29 ± 1.03	8.34 ± 0.50

### 3.1.2 上样液浓度的确定

结果见图 2, 绿原酸在 10、20 g/L 和 40 g/L 的吸附率都在 95% 以上, 差别不大, 在 80 g/L 时吸附率下降较快, 为 89.47%; 咖啡酸在 10~80 g/L 的吸附率都在 95% 以上, 差别很小, 在 160 g/L 时吸附率下降较快, 为 85.26%。所以选择 40 g/L 为上样液的浓度。

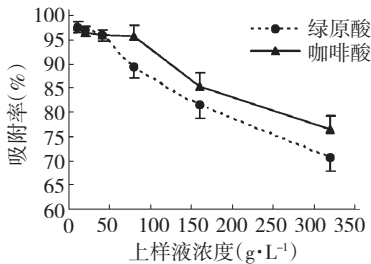


图 2 上样液浓度对吸附率的影响

Fig. 2 Effect of sample concentration on adsorption rate

### 3.1.3 吸附流速的确定

结果见图 3, 绿原酸和咖啡酸在 1~4 BV/h 的吸附率都在 95% 以上, 差别较小, 在 8 BV/h 后下降较快, 所以选择 4 BV/h 为上样液的吸附流速。

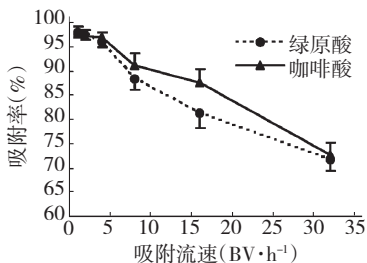


图 3 吸附流速对吸附率的影响

Fig. 3 Effect of sample concentration on adsorption rate

### 3.1.4 上样液 pH 值的确定

结果见图 4, 绿原酸和咖啡酸的吸附率随着上样液 pH 的增加, 呈现先增加后减小的抛物线式变化, 在 pH 为 3 时的吸附率最大, 所以选择上样液的 pH 为 3。

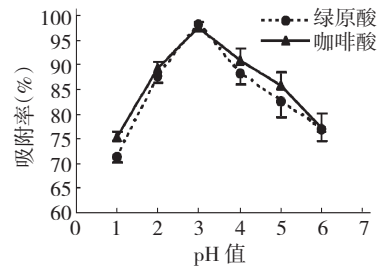


图 4 上样液 pH 值对吸附率的影响

Fig. 4 Effect of sample solution pH on adsorption rate

### 3.1.5 水洗脱体积的确定

结果见图 5。1:2 的树脂柱在 5 BV 后除杂率超过 90%, 5~7 BV 的除杂率的差别很小, 因此选择水洗脱体积为 5 BV; 1:5 及 1:8 的树脂柱除杂率超过 90% 的洗脱体积分别是 8 BV 和 13 BV, 之后的除杂率增加缓慢, 因此分别选择水洗脱体积为 8 BV 和 13 BV。

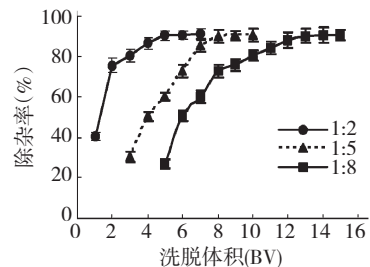


图 5 水洗脱体积对除杂率的影响

Fig. 5 Effect of water elution volume on the impurity removal rate

### 3.1.6 脱附流速的确定

结果见图 6, 随着脱附流速的增加, 解吸率在逐渐降低。10% 乙醇洗脱时绿原酸和咖啡酸解吸率的拐点分别在 1 BV/h 和 0.5 BV/h, 20% 乙醇洗脱时两者解吸率的拐点分别在 0.5 BV/h 和 1 BV/h, 30% 乙醇洗脱时两者解吸率的拐点都在 1 BV/h。所以选择脱附流速为 0.5 BV/h。

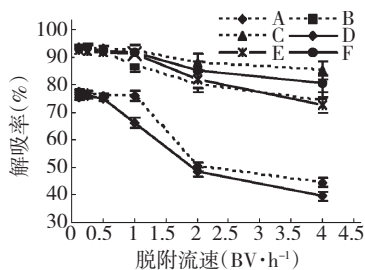


图 6 脱附流速对解吸率的影响

Fig. 6 Effect of desorption velocity on the desorption rate

A-绿原酸(10%乙醇);B-绿原酸(20%乙醇);C-绿原酸(30%乙醇);D-咖啡酸(10%乙醇);E-咖啡酸(20%乙醇);F-咖啡酸(30%乙醇)

A-CHA(10% ethanol);B-CHA(20% ethanol);C-CHA(30% ethanol);D-CAA(10% ethanol);E-CAA(20% ethanol);F-CAA(30% ethanol);(CHA-chlorogenic acid,CAA-caffeic acid)

3.1.7 上样量、洗脱剂及洗脱体积的确定

结果见表 4,表 5。方差分析表明,A 因素(树脂:药材)和 B 因素(洗脱剂浓度)对试验结果有高度影响,是主要影响因素,由表 4 可知,  $\Pi_1 > I_1 > \text{III}_1$ ,  $\Pi_2 > \text{III}_2 > I_2$ , 所以应选  $A_2$  (1:5) 和  $B_2$  (20%);C 因素(洗脱体积)对试验结果有显著影响,是次要影响因素,  $\Pi_3 > \text{III}_3 > I_3$ , 选  $C_2$  (9BV)。所以最佳组合是上样量为树脂:药材(g:g)=1:5;洗脱剂为 20% 乙醇,洗脱体积为 9 BV。

3.1.8 工艺流程验证结果

富集物的色谱图见图 1-C,绿原酸的含量和转移率为  $50.32 \pm 0.74\%$  和  $91.26 \pm 1.06\%$ ,咖啡酸的含量和转移率为  $37.94 \pm 0.67\%$  和  $90.14 \pm 0.93\%$ ,总含量为  $88.18 \pm 1.22\%$ 。

表 3  $L_9(3^4)$  正交试验的因素和水平

Table 3 Factors and levels of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

列号 Code	因素 Factor	水平 Level		
		1	2	3
A	树脂:药材 Resin: sample (g:g)	1:2	1:5	1:8
B	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	10	20	30
C	洗脱体积 Elution volume (BV)	4	9	14

表 4  $L_9(3^4)$  正交试验结果

Table 4 Result of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

	A	B	C	D	绿原酸 Chlorogenic acid		咖啡酸 Caffeic acid		综合评分 Score
					含量 Content (%)	转移率 Transfer rate (%)	含量 Content (%)	转移率 Transfer rate (%)	
1	1	1	1	1	45.02	17.13	63.39	15.54	63.39
2	1	2	2	2	47.21	90.52	111.74	88.57	111.74
3	1	3	3	3	16.43	94.11	76.74	93.85	76.74
4	2	1	2	3	30.14	75.79	82.07	74.26	82.07
5	2	2	3	1	49.28	92.03	115.89	91.26	115.89
6	2	3	1	2	34.89	52.51	72.09	48.42	72.09
7	3	1	3	2	15.97	47.63	46.92	44.58	46.92
8	3	2	1	3	40.05	37.53	69.01	33.89	69.01
9	3	3	2	1	18.65	64.05	57.39	54.91	57.39
$I_j$	251.87	192.38	204.49	236.67					
$\Pi_j$	270.05	296.64	251.2	230.75					
$\text{III}_j$	173.32	206.22	239.55	227.82					



表5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

方差来源 Source	离均差平方和 Sum of square	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
A	1761.92	2	880.96	130.03	$P < 0.01$
B	2137.5	2	1068.75	157.74	$P < 0.01$
C	394.08	2	197.04	29.08	$P < 0.05$
D 误差 Error	13.55	2	6.78		

### 3.1.9 工艺放大结果

结果见图7,不论是绿原酸的含量和转移率,还是咖啡酸的含量和转移率,不同质量树脂之间差别无统计学意义。说明树脂质量在20~640 g范围内工艺稳定,所得产品的均一性好,工艺可放大。

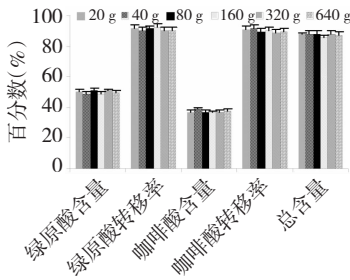


图7 不同质量树脂对含量和转移率的影响

Fig. 7 Effect of the resin with different mass on the content and transfer rate

### 3.1.10 树脂重复使用次数的确定

结果见图8,随着树脂重复使用次数的增加,含量和转移率均呈下降趋势,绿原酸的含量在使用第6次时与第1次使用时有显著性差异( $P < 0.01$ ),下降了4.27%;绿原酸的转移率在第5次,第6次与

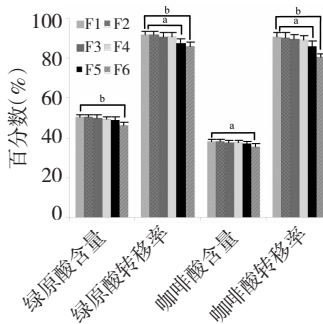


图8 树脂重复使用对含量和转移率的影响

Fig. 8 Effect of repeated use of the resin on the content and transfer rate

a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$ 

第1次相比分别下降了4.37% ( $P < 0.05$ )和5.95% ( $P < 0.01$ )。咖啡酸的含量在第6次时下降了2.55% ( $P < 0.05$ ),转移率在第5次,第6次分别下降了4.60% ( $P < 0.05$ )和10.42% ( $P < 0.01$ )。因此,树脂只能重复使用4次。

## 4 讨论与结论

大孔树脂具有使用方便、经济、易操作、机械强度高、吸附量高、解吸容易、可再生和重复使用等优势,已广泛用于酚酸、香豆素、黄酮类、生物碱、鞣质、萜类和苷类等纯化分离。大孔树脂技术的选择性和分离纯化效能要远远高于溶剂提取技术,本实验制备的醇提取物中绿原酸和咖啡酸的含量是药材中的5倍多,而富集物中绿原酸和咖啡酸的含量是醇提取物的240倍和220倍。对于从天然药物中获取有效部位(本实验中指的是绿原酸和咖啡酸)的制备工艺,富集物中有效部位的含量和转移率是确定工艺流程和评价工艺优劣的两个最重要的指标。有效成分的含量是和药效相关的指标,高含量的有效成分能够获得强烈的药理作用;而有效成分的转移率是和产率(效益)相关的指标,有效成分的高转移率能够降低成本和获得更高的商业利润。但是,这两个指标的贡献率是不一样的,含量的贡献率要大于转移率。绿原酸与咖啡酸同属多酚酸类化合物,在抗菌、抗病毒、抗炎、镇痛、抗氧化方面的活性相似度大,如果获得高含量的绿原酸和咖啡酸的混合物,将会加强上述药理作用,利用大孔树脂技术制备高含量的绿原酸和咖啡酸有效部位富集物对创制新型制剂具有助推作用。

### 参考文献

- Odintsova TI, Rogozhin EA, Sklyar IV. Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. *Protein Pept Lett*, 2010, 17:

- 522-529.
- 2 Koh YJ, Cha DS, Ko JS. Anti-inflammatory effect of *Taraxacum officinale* leaves on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264. 7 cells. *J Med Food*, 2010, 13:870-878.
  - 3 Park CM, Cha YS, Youn HJ. Amelioration of oxidative stress by dandelion extract through CYP2E1 suppression against acute liver injury induced by carbon tetrachloride in Sprague-Dawley rats. *Phytother Res*, 2010, 24:1347-1353.
  - 4 You Y, Yoo S, Yoon HG. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48:1632-1637.
  - 5 Clare BA, Conroy RS, Spelman K. The diuretic effect in human subjects of an extract of *Taraxacum officinale* folium over a single day. *J Altern Complement Med*, 2009, 15:929-934.
  - 6 Ovadje P, Chatterjee S, Griffin C, *et al.* Selective induction of apoptosis through activation of caspase-8 in human leukemia cells (Jurkat) by dandelion root extract. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133:86-91.
  - 7 Williams CA, Goldstone F, Greenham J. Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry*, 1996, 42:121-127.
  - 8 Wang GF, Shi LP, Ren YD. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*. *Antiviral Res*, 2009, 83:186-190.
  - 9 Tunnicliffe JM, Eller LK, Reimer RA. Chlorogenic acid differentially affects postprandial glucose and glucose-dependent insulinotropic polypeptide response in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2011, 36:650-659.
  - 10 Hebeda CB, Bolonheis SM, Nakasato A. Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135:261-269.
  - 11 Karthikesan K, Pari L, Menon VP. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chem Biol Interact*, 2010, 188:643-650.
  - 12 Lee JH, Park JH, Kim YS. Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8:1681-1685.
  - 13 Cho HJ, Kang HJ, Kim YJ. Inhibition of platelet aggregation by chlorogenic acid via cAMP and cGMP-dependent manner. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2012, 23:629-635.
  - 14 Watanabe T, Arai Y, Mitsui Y. The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2006, 28:439-449.
  - 15 Li Y, Shi W, Li Y. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environ Toxicol Pharm*, 2008, 26:13-21.
  - 16 Chang WC, Chen CH, Lee MF. Chlorogenic acid attenuates adhesion molecules up regulation in IL-1 $\beta$ -treated endothelial cells. *Eur J Nutr*, 2010, 49:267-275.
  - 17 Yun N, Kang JW, Lee SM. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Nutr Biochem*. 2012, 23:1249-1255.
  - 18 Shi H, Dong L, Bai Y. Chlorogenic acid against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Eur J Pharm*, 2009, 623:119-124.
  - 19 Xu Y, Chen J, Yu X. Protective effects of chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflamm Res*. 2010, 59:871-877.
  - 20 Lin CL, Chen RF, Chen JY. Protective effect of caffeic acid on paclitaxel induced anti-proliferation and apoptosis of lung cancer cells involves NF- $\kappa$ B pathway. *Int J Mol Sci*, 2012, 13:6236-6245.
  - 21 Zhao HP, Feng J, Sun K. Caffeic acid inhibits acute hyperhomocysteinemia-induced leukocyte rolling and adhesion in mouse cerebral venules. *Microcirculation*, 2012, 19:233-244.
  - 22 Abdallah FB, Fetoui H, Fakhfakh F. Caffeic acid and quercetin protect erythrocytes against the oxidative stress and the genotoxic effects of lambda-cyhalothrin *in vitro*. *Hum Exp Toxicol*, 2012, 31:92-100.
  - 23 Tsai SJ, Chao CY, Yin MC. Preventive and therapeutic effects of caffeic acid against inflammatory injury in striatum of MPTP-treated mice. *Eur J Pharm*. 2011, 670:441-447.
  - 24 Mori H, Iwahashi H. Antioxidant activity of caffeic acid through a novel mechanism under UVA irradiation. *J Clin Biochem Nutr*, 2009, 45:49-55.
  - 25 Fu J, Cheng K, Zhang ZM. Synthesis, structure and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials. *Eur J Med Chem*, 2010, 45:2638-2643.