

金银花中绿原酸的分离纯化工艺研究

杨敏丽, 郝凤霞

(宁夏大学能源化工重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 目的: 对金银花中的绿原酸的提取、分离工艺进行研究。方法: 绿原酸经乙醇热回流提取后, 采用聚酰胺柱层析法进行分离除杂, 对主要工艺参数进行了优化。结果: 将待分离的绿原酸粗品和聚酰胺(80~100目)按物料比1:5装入柱径与柱长比为1:7的层析柱中, 常压下用10%的乙醇以最大流速洗脱至14倍柱体积, 收集绿原酸含量较高($A_{322}/A_{216} \geq 0.9$)的流分, 浓缩后得到纯度为70%的绿原酸产品, 经重结晶后纯度可提高到93%。结论: 该工艺简单、成本较低, 适于工业化。

关键词: 金银花; 绿原酸; 聚酰胺柱层析; 分离; 纯化

Study on Isolation and Purification of Chlorogenic Acid in *Flos Lonicerae*

YANG Min-li, HAO Feng-xia

(Key Laboratory of Energy Sources Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Objective: To study the isolation and purification conditions of chlorogenic acid(CA) from *Flos Lonicerae*. Method: The isolation and purification of CA were achieved by polyamide column chromatography and the main isolation factors were optimized. Results: The optimum isolation is as following: the rate of crude CA to polyamide is 1:5, the rate of diameter to long is 1:7, 10% alcohol washed at high speed under usual pressure, CA is collected between the volume of 5~14 times of column volume($A_{322}/A_{216} \geq 0.9$), under the conditions, the product with above 70% CA is obtained, which can be further crystallized by EtOAc and the purity is enhanced to 93%. Conclusion: This method is simple, low cost, and suitable to be used in industry.

Key words *Flos Lonicerae*; chlorogenic acid; polyamide column chromatography; isolation; purification

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0255-05

金银花属忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb 的干燥花蕾或初开的花, 是传统的清热解毒常用中药^[1], 其主要活性成分为绿原酸。绿原酸是一种多酚类化合物, 异名咖啡鞣酸, 是植物在有氧呼吸过程中产生的苯丙素类化合物^[2]。绿原酸具有抗菌、抗病毒、止血、抗氧化、消除自由基、抑制突变和抗肿瘤等多种生物活性^[3-5], 在医药、卫生等领域具有很大的应用价值, 因此, 从植物中提取分离绿原酸具有重要的意义。目前, 有关绿原酸的分离方法主要有沉淀法, 萃取法, 大孔树脂法等^[6-9], 沉淀法简单, 但在碱性条件下, 绿原酸易发生水解, 得率低; 萃取法产品质量有所提高, 但工序复杂, 需大量有机溶剂; 大孔树脂法分离速度快, 但除杂效果不理想, 所得产物绿原酸含量较低。

本实验以金银花的花蕾为原料, 采用乙醇热回流法提取绿原酸, 然后以聚酰胺为吸附剂, 通过聚酰胺柱

层析对粗提物进行分离除杂, 并对影响分离的主要工艺参数进行了优化选择, 在优化的工艺条件下, 可得到纯度为70%的绿原酸产品, 经乙酸乙酯重结晶后, 产品纯度可提高到93%。该方法工艺简单, 成本低, 可以为绿原酸的工业化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金银花采自宁夏固原市原州区。绿原酸标准品 中国药品生物制品检定所; 甲醇(色谱纯)、磷酸(分析纯) 天津化学试剂有限公司; 乙醇(工业级) 宁夏银川市好利顿酒业; 聚酰胺为80~100目 浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂。

1.2 仪器

玻璃层析柱 $\Phi 2.5 \times 50\text{cm}$ 上海沪试分析仪器有限公司

收稿日期: 2007-06-10

基金项目: 宁夏自治区科技攻关项目(06273); 教育部科学技术研究重点项目(03142)

作者简介: 杨敏丽(1965-), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然药物化学的开发与应用。

公司; RE-52AA 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;
SHB-III 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;
L/L-S 天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; DZF-6000 真空干燥箱 巩义市英峪予华仪器厂; UV-2450 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪 美国安捷伦公司。

1.3 实验方案

1.3.1 工艺流程图

金银花花蕾 $\xrightarrow{\text{粉碎}}$ 细粉 \rightarrow 乙醇提取 \rightarrow 过滤 \rightarrow 浓缩 \rightarrow 绿原酸粗品 \rightarrow 聚酰胺柱分离 \rightarrow 收集流分 \rightarrow 浓缩 \rightarrow 绿原酸产品 \rightarrow 乙酸乙酯重结晶 \rightarrow 绿原酸精品

1.3.2 分离工艺

正交试验法优化了乙醇提取绿原酸的工艺, 结果表明, 当乙醇浓度为 70%, 料液比为 1:8, 提取时间为 3 h, 共提取三次时, 绿原酸的得率最高。在优化的工艺条件下, 将乙醇提取液过滤, 浓缩, 拌入聚酰胺, 真空烘干, 研磨, 过筛, 得粗品, 经聚酰胺柱层析分离, 以产品得率和产品纯度(绿原酸含量)为指标, 分别考察了聚酰胺目数、洗脱剂、物料比、柱径与柱长比、流速、洗脱剂用量等影响因素, 优化出最佳的分离工艺参数。

1.3.3 纯化工艺

对分离后的产品, 选用不同的溶剂进行重结晶, 从中选出最佳的溶剂进行精制, 得到绿原酸精品。

1.4 绿原酸含量的测定

1.4.1 标准溶液的配制

精密称取绿原酸标品 5.0mg, 置 50ml 容量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀得 0.1mg/ml 的标液。分别吸取 1、3、5、7、9ml 标液于五个 10ml 容量瓶中, 加 50% 甲醇定容至刻度, 得到系列标准溶液。

1.4.2 测定波长的选择

取浓度为 0.01mg/ml 的标准溶液, 以 50% 甲醇为参比液, 在 200~400nm 的波长范围扫描, 最大吸收波长为 322nm, 所以选择 322nm 为测定波长。

1.4.3 色谱条件的选择

色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ 柱(5 μ m, 250mm \times 4.6mm), 流动相: 0.3% 磷酸-乙腈(87:13), 检测波长: 322nm, 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 进样量: 10 μ l。

1.4.4 标准曲线的制作

将一系列不同浓度的标准溶液按以上色谱条件测

定, 记录峰面积, 并对样品浓度作图, 得线性回归方程为: $y=14613.54x-3.09$, $r=0.9999$; 绿原酸在 0.01~0.09mg 范围内呈良好的线性关系。

2 结果与分析

以 0.2mol/L 的 HCl 为溶剂, 绿原酸标品在 322nm 和 216nm 处两个吸收峰, 这两个波长下吸光度的比值(A_{322}/A_{216})为 1.37, 研究发现, 当产品中绿原酸含量变化时, 这个比值也随之改变, 产品纯度越高, 比值越接近 1.37, 反之, 产品纯度越低, 比值越小。如当产品中绿原酸含量为 37.8%, A_{322}/A_{216} 为 0.94, 而当产品中绿原酸含量为 49.7%, A_{322}/A_{216} 为 1.08。因此, 可以通过测量这个比值大小初步判断产品中绿原酸的纯度。

2.1 聚酰胺目数和洗脱剂的选择

分别称取目数不同的两种聚酰胺(80~100 目、100~200 目)各 7.0g, 装入柱长和内径完全相同的柱子, 将绿原酸的粗提液浓缩后拌入适量聚酰胺, 烘干, 研磨, 过 60 目筛, 记为绿原酸粗提物。称取该粗提物 1.0g, 两份, 分别装入目数不同的两根柱子顶端, 然后依次用等体积的水和 10%~40% 乙醇洗脱, 收集各自

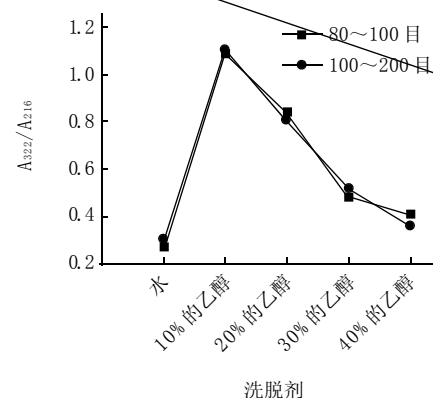
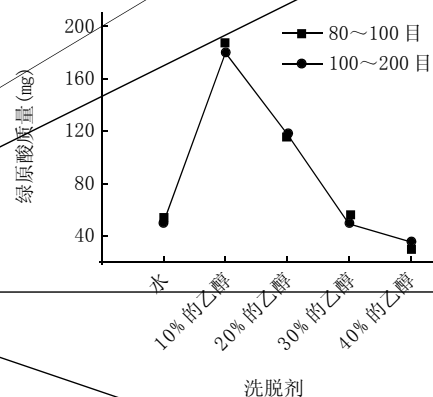


图1 聚酰胺目数和洗脱剂的选择
Fig.1 Selection of polyamide and solvent

的洗脱液,以洗脱液中绿原酸的含量(A_{322}/A_{216})和质量为指标,比较不同目数的聚酰胺和不同洗脱剂对绿原酸的分离提纯效果。结果见图1。

由图1可以看出,聚酰胺的型号对绿原酸的分离效果影响不大,但100~200目的聚酰胺分离速度明显小于80~100目的聚酰胺,故选择80~100目的聚酰胺柱层析法分离绿原酸的吸附剂。用不同的洗脱剂进行洗脱时,发现当洗脱剂为10%乙醇时,绿原酸质量和绿原酸含量都是最高的,所以选择10%乙醇为聚酰胺柱层析的洗脱剂。

2.2 物料比的选择

称取8.0g聚酰胺(80~100目)三份,装入柱长内径完全相同的柱子(2.0cm×14.0cm),分别称取4.5、2.7、1.35g拌入聚酰胺后粗品(含绿原酸粗品分别为2.7、1.6、0.8g),装入相同的三根柱子顶端,使物料比(绿原酸粗品与聚酰胺质量比)分别为1:3、1:5、1:10,用10%的乙醇洗脱,一倍柱体积为一洗脱分别收集,对每个流分分别进行紫外扫描,计算每个流分中的绿原酸的含量(A_{322}/A_{216}),当 $A_{322}/A_{216} \geq 0.9$ 时,流分与绿原酸标准品的紫外图谱比较相似,故合并 $A_{322}/A_{216} \geq 0.9$ 的流分,浓缩、干燥得绿原酸产品,比较不同物料比所得产品得率和产品中绿原酸的纯度,优选出一种理想的物料比。

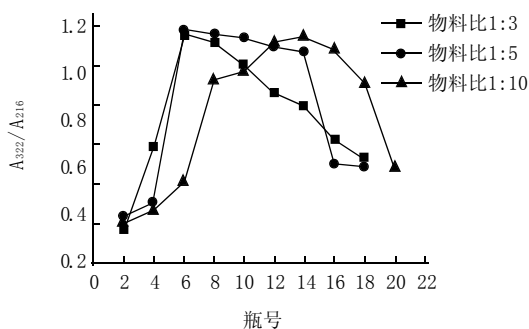


图2 物料比的选择

Fig.2 Selection of rate of crude CA to polymide

表1 物料比对产品得率和绿原酸纯度的影响
Table 1 Effects of rate of crude CA to polymide on product recovery and CA purity

物料比	1:3	1:5	1:10
产品得率(%)	1.74	1.69	1.62
绿原酸纯度(%)	53.6	61.0	50.7

由图2和表1可以得出,当物料比为1:5时,流分中绿原酸出现较集中,所得产品绿原酸纯度最高,产

品得率无明显差别,故选择1:5为合适的物料比。

2.3 柱径与柱长比的选择

称取8.0g聚酰胺(80~100目)三份,分别装入不同直径的柱子中(3.0cm×9.0cm、2.0cm×14.0cm、1.5cm×21cm),则柱径与柱长比分别为1:3、1:7、1:14,称取2.7g粗品(含绿原酸粗品1.6g)三份,使物料比为1:5,分别装入柱径与柱长比不同的三根柱子中,用10%的乙醇洗脱,一倍柱体积为一洗脱分别收集,对每个流分进行紫外扫描,计算每个流分绿原酸的含量(A_{322}/A_{216}),合并 $A_{322}/A_{216} \geq 0.9$ 的流分,浓缩、干燥得绿原酸产品,比较不同物料比所得产品得率和产品中绿原酸的纯度,优选出一种理想的柱径与柱长比。

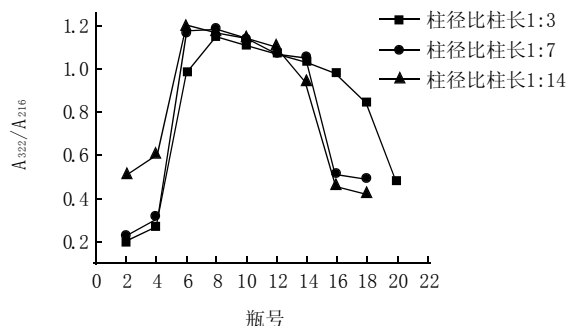


图3 柱径与柱长比的选择

Fig.3 Selection of the rate of diameter to long

表2 柱径与柱长比对产品得率和绿原酸纯度的影响
Table 2 Effects of rate of diameter to long on product recovery and CA purity

柱径与柱长比	1:3	1:7	1:14
产品得率(%)	1.81	1.69	1.55
绿原酸纯度(%)	50.1	61.0	29.7

由图3和表2可以看出,在物料比为1:5的前提下,当柱径与柱长比为1:7时,流分中绿原酸出现较集中,所得产品的绿原酸纯度最高,产品得率无明显差别,故选择1:7为合适的柱径与柱长比。

2.4 流速的选择

称取8.0g聚酰胺(80~100目)两份,装入两根相同柱子(2.0cm×14.0cm)中,柱径与柱长比为1:7,称取2.7g粗品(含绿原酸粗品1.6g)两份,分别装入柱子顶端,使物料比为1:5,用10%的乙醇洗脱,分别调节柱子的活塞至最大流速(2.2ml/min)及较小流速(1.2ml/min)处,比较不同流速下绿原酸的洗脱效果,优选出较理想的洗脱速度。

由图4可以看出,当流速为2.2ml/min和1.2ml/min

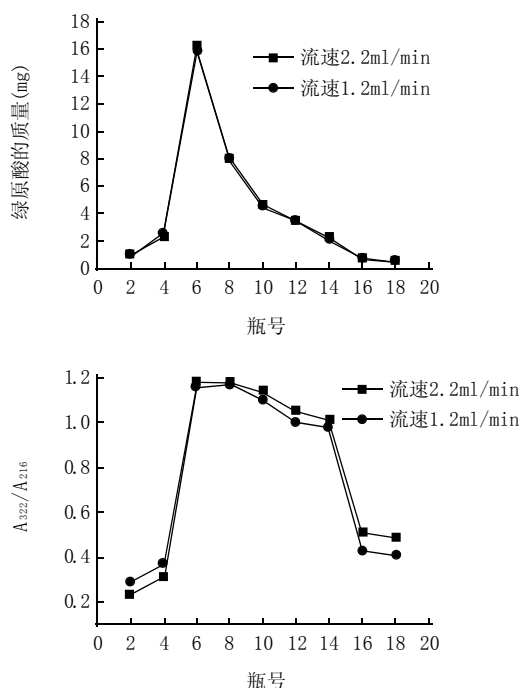


图4 流速的选择

Fig.4 Selection of velocity

时, 绿原酸的洗脱效果极为相似, 产品中绿原酸含量 (A_{322}/A_{216}) 和绿原酸的质量都很相近, 可见, 在常压下, 最大流速下绿原酸已经能够达到很好的分离, 调节流速对绿原酸的分离效果影响不大, 且流速较小时洗脱时间较长, 从经济的角度看, 不太合理, 故选择最大流速为绿原酸分离的合适洗脱速度。

2.5 洗脱剂用量的选择

称取 8.0g 聚酰胺 (80~100 目), 装柱 (2.0cm × 14.0cm), 柱径与柱长比为 1:7, 称取 2.7g 粗品 (含绿原酸粗品 1.6g), 使物料比为 1:5, 常压下用 10% 的乙醇以最大流速洗脱, 一倍柱体积为一洗分, 流分经紫外扫描与绿原酸的标准品对照, 计算各流分的 A_{322}/A_{216} , 收集 $A_{322}/A_{216} \geq 0.9$ 的部分, 观察绿原酸的洗脱情况, 判

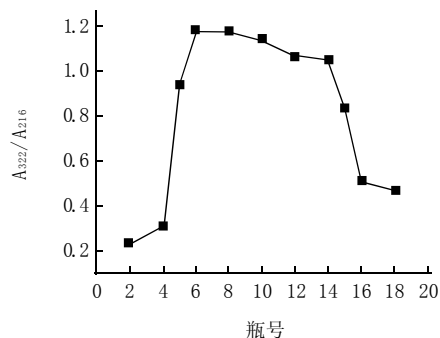


图5 柱体积的选择

Fig.5 Selection of the volume

断洗脱剂用量。

由图 5 可以看出, 当洗脱剂用量为 5 倍柱体积时, $A_{322}/A_{216} > 0.9$, 此时, 流分与绿原酸标准品的紫外图谱相近, 绿原酸已开始大量被洗脱出来, 当洗脱剂洗脱至 14 倍柱体积后, $A_{322}/A_{216} < 0.9$, 流分与绿原酸标准品的紫外图谱有较大差异, 绿原酸已经基本上被洗脱完全, 由此看来, 要保证绿原酸被洗脱完全, 至少需要 14 倍柱体积的洗脱剂, 才能将绿原酸洗脱完全。

综上所述, 聚酰胺柱层析法分离、纯化绿原酸的最佳工艺条件为: 将待分离得绿原酸粗品和聚酰胺 (80~100 目) 按物料比 1:5 装入柱径与柱长比为 1:7 的层析柱中, 常压下用 10% 的乙醇以最大流速洗脱至 14 倍柱体积, 收集绿原酸含量较高 ($A_{322}/A_{216} \geq 0.9$) 的流分, 浓缩后得到

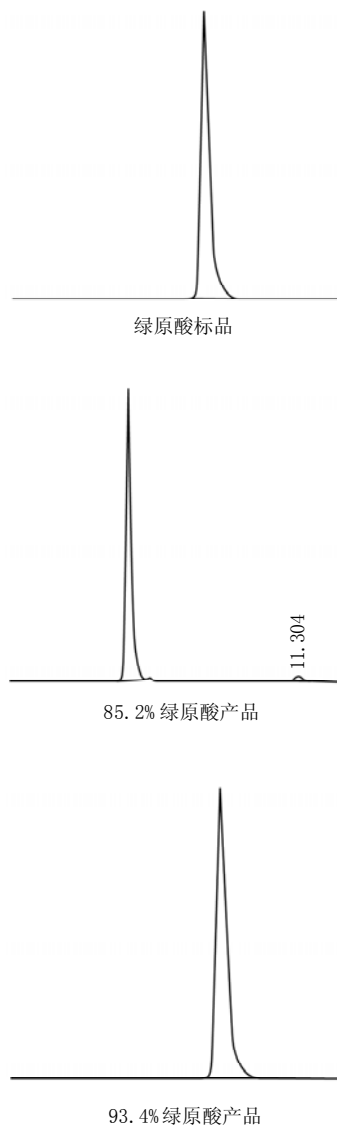


图6 绿原酸标准品及样品色谱图

Fig.6 Chromatograms of CA and sample

产品。

金银花经过乙醇热回流提取后, 浓缩所得绿原酸粗品经过聚酰胺层析柱, 在上述条件下分离除杂, 收集流分后可得绿原酸含量为70%的产品, 得率为1.54%, 如果将此产品再次经过聚酰胺柱层析, 可以得到85%的产品, 此产品经过乙酸乙酯重结晶, 最终可以得到绿原酸含量达93%以上的产品。产品及绿原酸标准品的HPLC色谱图见图6。

3 结 论

3.1 本方法工艺简单, 成本低, 为绿原酸的工业化奠定基础。主要有乙醇提取、聚酰胺柱层析两步完成, 采用工业酒精提取, 10%乙醇洗脱, 而且乙醇可以回收后反复使用, 大大降低了成本, 聚酰胺依次用5% NaOH、H₂O、10% CH₃COOH洗脱后, 也可以反复使用。

3.2 本方法不仅优化了提取工艺, 而且对聚酰胺柱层析的主要工艺参数如聚酰胺的目数、洗脱剂、物料比、柱子的直径比柱长、流速、洗脱剂用量等因素进行了详细的考察, 使实验达到了低耗、高效的目的。

3.3 重结晶时, 分别采用水、氯仿、乙酸乙酯作溶剂, 发现水对样品的溶解性太大, 且难以挥发; 氯仿对绿原酸和样品中的其它物质的溶解性很相近, 达不到

纯化的目的; 而采用乙酸乙酯重结晶时, 效果较好, 故选用乙酸乙酯对产品进行精制。

3.4 本方法稳定、可靠、重现性好, 可为绿原酸的工业化提供一定的参考。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 177.
- [2] 高锦明, 张鞍灵, 张康健. 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.
- [3] RONS TED N, STRANDGAARD H, et al. Chlorogenic acid from three species of *Hydrostachys*[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2002, 30: 1105-1108.
- [4] AWAD M A, JAGER A, et al. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation[J]. *Scientia Horticulturae*, 2000, 83: 249-263.
- [5] HE Cai-xia, CUI Hua. The determination of chlorogenic acid in cigarettes by inhibited chemiluminescence analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 351: 241-246.
- [6] 邓良, 袁华, 喻宗沅. 绿原酸的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2005(7): 4-7.
- [7] 阎巧娟, 韩鲁佳, 江正强. 金银花中绿原酸提取纯化工艺的优化[J]. 中国农业大学学报, 2002, 7(2): 22-26.
- [8] 李志华, 许让翻. 不同提取工艺对金银花中绿原酸提取率的影响[J]. 中草药, 2002, 33(8): 714-715.
- [9] 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.

信 息

以色列开发新型转基因西红柿

科学家最近出一种新型转基因西红柿, 闻起来有玫瑰花和柠檬的香味。相关论文在线发表于《自然—生物技术》上。

进行该项研究的是以色列Newe Yaar研究中心的Efraim Lewinsohn和同事。他们向西红柿中导入了一种柠檬罗勒(*Ocimum basilicum*)基因, 该基因能够制造一种香叶醇合酶(geraniol synthase), 从而使西红柿产生类似柠檬的芳香气味。

从外表上看, 该转基因西红柿仅有一点淡红色, 这是由于它们的番茄红素(lycopene, 赋予西红柿亮红颜色的一种抗氧化物质, 对人体有益)含量仅有传统西红柿的一半。不过, 新的转基因品种可以产生高浓度的挥发性萜类物质(volatile terpenoids), 它们具有消毒杀菌的作用。因此, Lewinsohn表示, 新的转基因西红柿的货架时间更长, 而且在生长过程中需要的农药和杀虫剂较少。

食用含铁量较高食品对 丙肝患者不利

日本专家日前提醒说, 姜黄、小球藻等部分食品含铁量较高, 慢性丙肝患者摄入这类食品, 会妨碍病情的改善。

据日本《读卖新闻》网站报道, 三重大学肝脏内科副教授垣内雅彦等研究人员调查了在这所大学附属医院接受治疗的丙肝患者日常食品的含铁量。

研究人员称, 对健康人来说, 即使摄取过量的铁也不必太担心, 但对丙肝患者来说, 过量的铁很可能蓄积在肝脏中, 制造出活性氧, 破坏肝细胞, 甚至可能促使其癌变。

研究人员提醒说, 丙肝患者每天摄取的铁元素量应该控制在6mg以下。