

金银花中绿原酸和黄酮的同时提取分离 工艺研究

郝凤霞, 杨敏丽

(宁夏大学能源化工重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 采用乙醇超声波法提取, 聚酰胺柱层析法分离的方法对金银花中的绿原酸和黄酮进行提取分离。结果表明: 聚酰胺柱层析法分离、梯度洗脱得到绿原酸、水溶性黄酮和脂溶性黄酮 3 个不同产品 A、B 和 C, 其中 A 绿原酸含量为 68.2%, 得率为 1.34%; B 黄酮含量 95%, 得率为 1.12%; C 中槲皮素和木犀草素含量分别为 7.5%、16.9%, 得率为 0.11%。

关键词: 金银花; 绿原酸; 黄酮; 槲皮素; 木犀草素

Simultaneous Extraction and Isolation of Chlorogenic Acid and Flavonoids from *Flos lonicerae*

HAO Feng-xia, YANG Min-li

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

Abstract: Chlorogenic acid and flavonoids were simultaneously extracted by ethanol with the aid of ultrasonic treatment from *Flos lonicerae* and then isolated by polyamide column chromatography. Results showed that three products (A, B and C) were obtained from column chromatography with gradient elution, which were identified to be chlorogenic acid, soluble flavonoid and lipid-soluble flavonoid, respectively. The chlorogenic acid content in product A was 68.2% with a yield of 1.34%; the flavonoid content in product B was 95.0% with a yield of 1.12%; and the quercetin and lonicetin contents in product C were 7.5 and 16.9%, respectively, with a yield of 0.11%.

Key words: *Flos lonicerae*; chlorogenic acid; flavonoid; quercetin; lonicetin

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0211-04

金银花是一种常用中药, 具有清热解毒、消炎祛风等功能, 金银花中含有多种化学成分, 如绿原酸、黄酮和挥发油等, 其中绿原酸和黄酮被认为是主要药效成分^[1-3]。日前有关金银花的研究主要集中于绿原酸, 而对黄酮的研究较少^[4-6], 对金银花资源的利用也主要是提取其中的绿原酸, 在一定程度上造成资源的浪费。本研究采集宁夏当地种植的金银花, 采用乙醇超声波法同时提取, 聚酰胺柱层析法连续分离, 依次得到绿原酸、水溶性黄酮和脂溶性黄酮 3 个不同类型的产品, 旨在为金银花资源的综合开发与利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金银花采自宁夏银川市合木公司。

甲醇、磷酸、95% 乙醇、氢氧化钠、硝酸铝为

分析纯 天津市科密欧化学试剂有限公司; 绿原酸、芦丁对照品 中国药品生物制品鉴定所; 实验室用水为自制蒸馏水。

1.2 仪器与设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司; UV-2450 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; AL204 型电子天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; 101A-1E 型电热鼓风干燥箱 上海实验仪器厂有限公司; TDL80-2B 型台式离心机 上海安亭科学仪器厂; KQ-250DE 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; SHB-III 型循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司。

1.3 方法

1.3.1 紫外分光光度法

1.3.1.1 芦丁标准溶液的配制

收稿日期: 2009-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(20565003); 宁夏大学科学研究基金项目(ZR200706)

作者简介: 郝凤霞(1978—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事天然产物开发研究。E-mail: hfx220@126.com

准确称取芦丁标品 0.0050g, 用 95% 乙醇溶解, 并完全溶解后转入 25ml 容量瓶中, 用 95% 乙醇定容, 配成 0.20mg/ml 的芦丁标准溶液。

1.3.1.2 标准曲线的绘制

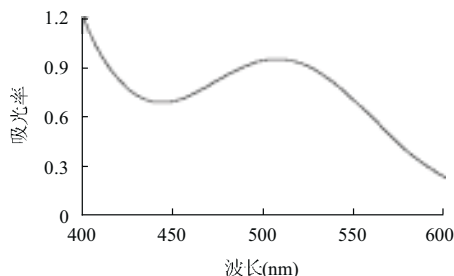


图1 芦丁络合物吸收光谱

Fig.1 Absorption spectrum of rutin complex

分别吸取芦丁标液 0、1、2、3、4、5ml 于 10ml 容量瓶中, 加入 5% NaNO_2 溶液 0.5ml, 放置 6min 后加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.5ml, 摇匀, 放置 6min, 再分别加入 4% NaOH 溶液 5ml, 用 95% 的乙醇稀释至刻度, 摇匀, 放置 12min, 配制不同浓度的络合物。以没加芦丁溶液的做空白, 测定芦丁络合物的最大吸收波长为 505nm, 故选择 505nm 为测定波长(图 1)。

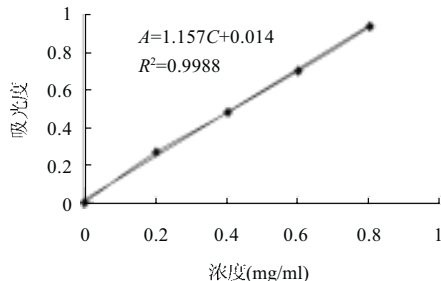


图2 芦丁工作曲线

Fig.2 Standard curve of rutin

在最大吸收波长 505nm 处, 分别测定不同浓度的络合物, 绘制标准曲线(图 2), 得到芦丁浓度 C 与吸光度 A 关系曲线的回归方程式: $A = 1.157C + 0.014$, $R^2 = 0.9988$ 。

1.3.1.3 绿原酸和总黄酮得率的计算

$$\text{绿原酸得率(\%)} = \frac{\text{浓缩液中绿原酸浓度} \times \text{浓缩液体积}}{\text{金银花质量}} \times 100$$

$$\text{总黄酮得率(\%)} = \frac{\text{浓缩液中黄酮浓度} \times \text{浓缩液体积}}{\text{金银花质量}} \times 100$$

1.3.2 高效液相色谱法

1.3.2.1 色谱条件

绿原酸: 色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: 0.4% 磷酸-乙腈(87:13, V/V); 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 327nm; 柱温: 20℃; 进样量: 5 μl。

槲皮素和木犀草素: 色谱柱为 Zorbax-C₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.02% 磷酸(50:50, V/V); 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 350nm; 柱温: 30℃; 进样量: 10.0 μl。

1.3.2.2 对照品溶液的制备

绿原酸: 精密称取绿原酸对照品 0.001g, 用 50% 甲醇溶解, 转移至 50ml 容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 配制成 0.02mg/ml 的绿原酸对照品溶液。

槲皮素和木犀草素: 准确称取槲皮素对照品 0.030g, 用甲醇溶解并定容于 50ml 容量瓶, 配制成 0.60mg/ml 的溶液。取该溶液 1.00ml 用甲醇稀释并定容至 10ml, 即得浓度为 0.06mg/ml 的槲皮素对照品溶液。以相同的方法制备浓度为 0.057mg/ml 的木犀草素的对照品溶液。

1.3.2.3 标准曲线的绘制

绿原酸: 精密吸取绿原酸对照品溶液 0、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、10.0ml 于 10ml 容量瓶中, 用 50% 甲醇定容至刻度, 作峰面积-绿原酸浓度标准曲线, 得直线回归方程为 $y = 14270x$, $R^2 = 0.9997$; 绿原酸在 0~0.02mg/ml 范围内呈良好的线性关系。

槲皮素和木犀草素: 取槲皮素对照品溶液和木犀草素对照品溶液, 分别用甲醇稀释, 得一系列不同质量浓度的对照品溶液后进样, 以对照品溶液的浓度 $C(\mu\text{g/ml})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 得槲皮素和木犀草素的对照品溶液的回归方程分别为: $Y = 19.12C - 0.6778$, $R^2 = 0.9999$ 和 $Y = 47.20C + 120.2$, $R^2 = 0.9999$, 它们分别在 4.0~20 μg/ml 和 3.8~19 μg/ml 范围内呈良好的线性关系。

2 结果与分析

2.1 金银花中绿原酸和总黄酮的提取工艺研究

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in $L_9(3^4)$ orthogonal array design

水平	A 乙醇体积分数(%)	B 料液比(m/V)	C 时间(min)	D 次数
1	70	1:12	10	1
2	50	1:5	30	2
3	95	1:8	50	3

采用乙醇超声波法提取, 考察了乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数这 4 个主要因素对绿原酸和黄酮得率的影响, 并采用正交试验法 $L_9(3^4)$ 对主要影响因素进行了优化, 正交试验结果及分析见表 1~4。

由表2~4直观分析及方差分析结果可知,综合考虑绿原酸和总黄酮得率,得出最佳的提取工艺条件:70%的乙醇体积分数、料液比为1:8、超声时间30min、超声温度为30℃、超声提取两次。

表2 正交试验结果表 $L_9(3^4)$ Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal array design experiments

试验号	A	B	C	D	绿原酸得率(%)	总黄酮得率(%)
1	1	1	1	1	2.37	6.85
2	1	2	2	2	4.82	9.00
3	1	3	3	3	3.54	11.5
4	2	1	2	3	5.57	9.74
5	2	2	3	1	3.10	5.45
6	2	3	1	2	5.18	10.7
7	3	1	3	2	2.53	3.36
8	3	2	1	3	1.33	1.65
9	3	3	2	1	1.14	1.92
绿原酸	K_1	10.73	10.47	8.88	6.61	
	K_2	13.85	9.25	11.53	12.53	
	K_3	5.00	9.86	9.17	10.44	
直观分析	k_1	3.58	3.49	2.96	2.20	
	k_2	4.62	3.08	3.84	4.17	
	k_3	1.67	3.29	3.06	3.48	
	R	2.95	0.41	0.88	1.97	
总黄酮	K_1	27.35	19.95	19.2	14.22	
	K_2	25.89	16.1	20.66	23.06	
	K_3	6.93	24.12	20.31	22.89	
直观分析	k_1	9.12	6.65	6.4	4.74	
	k_2	8.63	5.37	6.89	7.69	
	k_3	2.31	8.04	6.77	7.63	
	R	7.77	2.67	0.49	2.95	

表3 绿原酸方差分析表

Table 3 Variance analysis for chlorogenic acid yield with various extraction conditions

方差来源	自由度	平方和	均方和	F值	F_{α}
A*	2	2.085	1.0425	8.41	
C	2	1.41	0.705	5.68	$F_{0.05}(2,4)=6.94$
D**	2	6.01	3.005	24.23	$F_{0.01}(2,4)=18.00$
误差(e=B)	2	0.248	0.124		
总合	10	9.753			

注: ** .差异极显著, $P<0.01$; * .差异显著, $P<0.05$ 。下同。

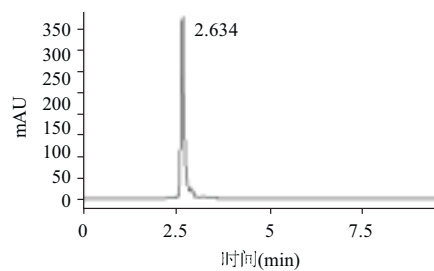
表4 黄酮方差分析表

Table 4 Variance analysis for flavonoid yield with various extraction conditions

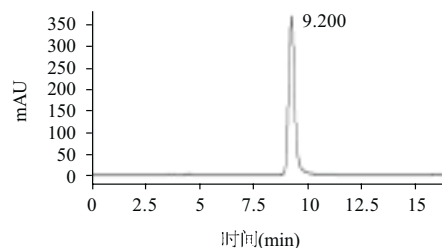
方差来源	自由度	平方和	均方和	F值	F_{α}
A**	2	86.51	43.255	221.82	
B**	2	10.72	5.36	27.49	$F_{0.05}(2,4)=6.94$
D**	2	17.04	8.52	43.69	$F_{0.01}(2,4)=18.00$
误差(e=C)	2	0.39	0.195		
总合	10	34.66			

2.2 金银花中绿原酸和总黄酮的分离

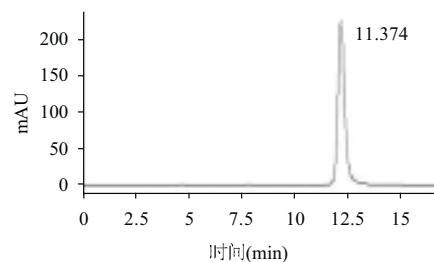
将金银花原料在2.1节优化的工艺条件下提取,得绿原酸和总黄酮的浓缩液。选择聚酰胺为吸附剂,选择不同体积分数的乙醇(10%、50%、90%)作为洗脱剂,通过柱层析梯度连续洗脱,得到绿原酸、水溶性黄酮和脂溶性黄酮3个不同类型的洗脱物。测定结果见图3。



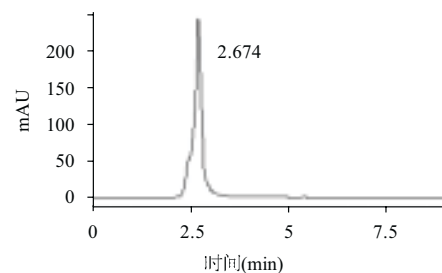
a. 绿原酸对照品



b. 槲皮素对照品



c. 木犀草素对照品



d. 产品A(绿原酸含量68.2%)

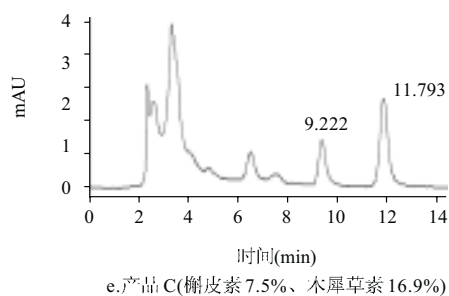


图3 样品检测图谱

Fig.3 HPLC chromatograms: a. chlorogenic acid standard; b. quercetin standard; c. Ionicetin; d. product A; e. product C

梯度洗脱得到绿原酸、水溶性黄酮和脂溶性黄酮 3 个不同产品 A、B 和 C，其中 A 绿原酸含量为 68.2%，得率为 1.34%；B 总黄酮含量 95%，得率为 1.12%；C 中槲皮素和木犀草素含量分别为 7.5%、16.9%，得率为 0.11%。

3 结 论

本实验初步分离出产品 B 为水溶性黄酮，故通过络合反应、紫外 - 可见分光光度法测定这类总黄酮的含量。产品 C 中木犀草素药用价值很高，可进一步将产品 C 富集、二次柱层析，逐步提高木犀草素含量。该工艺简单，成本低，可以连续分离得到 3 个不同类型的洗脱物，为金银花资源的综合利用提供一定的参考。

参考文献：

- [1] 黄丽瑛, 吕植桢, 李继彪, 等. 中药金银花化学成分的研究[J]. 中草药, 1996, 27(11): 645-647.
- [2] 高玉敏, 王名洲, 王建平, 等. 金银花化学成分的研究[J]. 中草药, 1995, 26(11): 568-569.
- [3] 李永梅, 王天志, 王志青. 细毡毛忍冬花蕾化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(1): 45-47.
- [4] 林继娟, 宋劲诗, 吴应熊. 金银花中绿原酸提取工艺探讨[J]. 中成药, 1994, 16(7): 2-3.
- [5] 茅青, 曹东, 贾先生. 灰毡毛忍冬化学成分的研究[J]. 药学报, 1993, 28(4): 35-43.
- [6] 高锦明, 张敏灵, 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.