

金银花中绿原酸的提取工艺

高春荣 胡锦蓉 孙君社

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 研究了金银花绿原酸的醇回流提取工艺及 D101 大孔吸附树脂金银花提取液除杂工艺。采用正交试验法,以绿原酸的提取率及提取物中绿原酸的质量分数为考察指标,对乙醇回流提取金银花绿原酸的工艺进行了优化;采用单因素试验法,以纯化物中绿原酸的质量分数为考察指标,对 D101 大孔吸附树脂金银花提取液除杂工艺进行了筛选。结果表明:乙醇体积分数 70%,乙醇 pH 为 4,回流时间 4 h,回流温度 70 为绿原酸的最佳提取工艺条件;吸附原液金银花质量浓度 0.25 g·mL⁻¹,pH 为 7,流速 3 mL·min⁻¹为 D101 大孔吸附树脂金银花提取液较优除杂工艺条件。本工艺绿原酸的提取率达 85%(与金银花中绿原酸总含量相比)以上,质量分数可达 65.12%,而且工艺简便,树脂再生容易,提取方法可取。

关键词 金银花;绿原酸;提取工艺

中图分类号 R 284.2

文章编号 1007-4333(2003)04-0005-04

文献标识码 A

Study on extraction process of chlorogenic acid from flos lonicerae

Gao Chunrong, Hu Jinrong, Sun Junshe

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract The extraction process of Chlorogenic acid from Flos Lonicerae was studied. The refluxing method was used to extract Chlorogenic acid. D101 macroporous resin was used to purify chlorogenic acid as it can adsorb impurity effectively. The extracting rate is 85% above. The content of Chlorogenic acid is 65.12%. The optimum extraction process is as follows: the content of alcohol is 70%, the pH of alcohol is 4, the time of refluxing is 4 h, the temperature of refluxing is 70. The parameter of purification is as follows: the content of raw material medicine is 0.25 g per mL solution, the pH of solution is 7, the velocity of solution is 3 mL·min⁻¹.

Key words flos lonicerae; chlorogenic acid; extraction process

金银花(flos lonicerae)是忍冬科植物忍冬的干燥花蕾,是临床常用的中药材之一。绿原酸(Chlorogenic acid, CHA)是金银花的主要药用成分,具有显著的清热解毒和抗菌消炎作用,对消化道的癌症有明显的抑制作用,与人体血小板凝集和凝血因子的生成有关,还具有抗生育作用及对免疫系统的调节作用^[1]。绿原酸类化合物是含有羧基和邻二酚羟基的有机酸,易溶于水、醇、丙酮等溶剂。从金银花中提取绿原酸多采用煎煮法、浸渍法、回流法等。传统分离绿原酸的方法有沉淀法、萃取法、层析法等^[2],但沉淀法分离效果不好,萃取法溶剂用量大,层析法成本高、操作复杂。本文中提供了提取纯化绿原酸的一种有效方法,即醇提水沉树脂除杂法。

1 材料与仪器

金银花,山东平邑县产;D101树脂,天津农药总厂生产。

绿原酸标准品,购于中国药品生物制品检定所;其余试剂均为分析纯。

S-52紫外分光光度计,旋转蒸发器,回流提取装置(自制),层析柱高400 mm,直径26 mm。

2 试验方法

2.1 绿原酸的醇提

绿原酸回流提取最优工艺采用正交试验确定,以醇回流法中影响绿原酸提取率的四大因素:乙

收稿日期:2002-09-17

作者简介:高春荣,硕士研究生;孙君社,博士,教授,研究方向为生物技术在农产品加工中的应用

醇体积分数(A)、乙醇 pH(B)、回流时间(C)、回流温度(水浴温度,D)作为考察对象,进行正交试验设计。选用 $L_9(3^4)$ 正交表,每个因素3个水平,共9次试验。

金银花粉碎,回流提取2次,金银花质量与乙醇体积比分别为1:10和1:8,将提取液浓缩至一定体积,得到绿原酸粗提液,待预处理。

2.2 绿原酸粗提液的去杂

1)水沉淀。在绿原酸粗提液中加入一定量的水,磁力搅拌30 min,然后置于冰箱中静置过夜,过滤除去水不溶性杂质,滤液用 0.5 mol L^{-1} 的NaOH调节为中性,过滤,清液待上柱。

2)树脂吸附。

a. 树脂预处理及装柱。将树脂以蒸馏水溶胀后浮选,用 0.5 mol L^{-1} 的HCl浸泡1 d,并不时搅拌,倾去酸液,水洗至中性;再用70%乙醇浸泡1 d,并不时搅拌,水洗至无须状物为止;抽干,室温干燥至不黏。以蒸馏水湿法装柱^[3]。

b. 吸附洗脱。将1)得到的清液上预先装好的树脂柱吸附,以一定的流速使柱内液面高度保持在1~2 cm,收集流出液。待吸附原液走完柱子后,用一定量的洗脱剂洗脱树脂柱,收集洗脱液。合并流

出液和洗脱液,浓缩干燥,测绿原酸含量。

2.3 树脂溶液处理量

称取7份处理过的树脂,每份5 g,分别加入10,15,20,25,30,35和40 mL待上柱的绿原酸溶液,室温下静态吸附24 h,过滤,滤液浓缩干燥,测绿原酸含量,得出树脂最大溶液处理量。

2.4 金银花绿原酸含量测定

金银花5.0 g,粉碎成粗粉,乙醇回流提取2次,每次溶媒200 mL,回流5 h。合并滤液,用 0.2 mol L^{-1} HCl定容至500 mL容量瓶中,取出10 mL离心30 min($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),吸取上清液0.5 mL 3份,用 0.2 mol L^{-1} HCl定容至10 mL容量瓶中,用紫外分光光度计在波长324 nm处测绿原酸含量。重复试验3次^[4]。

3 结果与分析

3.1 醇提试验结果

由表1可知,以绿原酸提取率为考察对象,则试验8为最优参数组合,即乙醇体积分数为80%,乙醇pH为4,回流2 h,温度90℃,乙醇体积分数影响显著;以绿原酸质量分数为考察对象,则试验5为最优参数组合,即乙醇体积分数为70%,乙醇pH为4,

表1 绿原酸回流提取正交试验设计($L_9(3^4)$)及结果

Table 1 The orthogonal design and result of orthogonal experiment on the reflux extraction of CHA

试验号	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇 pH	C 回流时间/h	D 回流温度/	绿原酸提取率/%	绿原酸质量分数/%
1	1(60)	1(3)	1(2)	1(70)	70.24	30.14
2	1(60)	2(4)	2(3)	2(80)	72.83	32.36
3	1(60)	3(5)	3(4)	3(90)	74.97	32.25
4	2(70)	1(3)	2(3)	3(90)	77.35	35.62
5	2(70)	2(4)	3(4)	1(70)	79.24	36.18
6	2(70)	3(5)	1(2)	2(80)	80.65	36.12
7	3(80)	1(3)	3(4)	2(80)	82.62	34.25
8	3(80)	2(4)	1(2)	3(90)	84.02	33.57
9	3(80)	3(5)	2(3)	1(70)	83.56	32.68
k_1	69.44(34.72)	72.62(35.00)	78.08(44.22)	74.54(35.81)		
k_2	77.19(42.54)	78.40(43.57)	74.70(33.69)	76.14(32.99)		
k_3	82.43(34.65)	78.03(32.33)	76.28(34.00)	78.38(43.81)		
R	12.99(7.89)	5.78(11.24)	3.38(10.53)	3.84(11.52)		

注:提取率=提取液中绿原酸质量/金银花中绿原酸质量×100%

回流4 h,温度70℃,回流温度影响最显著,其次是乙醇pH;综合考虑绿原酸提取率及质量分数,取试验5为最优参数组合。以最优参数做进一步验证试验,绿原酸提取率达85.12%,质量分数达36.28%。由表1可看出,随着乙醇体积分数的增大,绿原酸提取率逐渐升高,说明乙醇体积分数对绿原酸提取率有很大影响;但从绿原酸质量分数看,乙醇体积分数70%时高于60%和80%时,原因是乙醇体积分数过低绿原酸不能充分溶出,体积分数过高会将杂质也提取出来,纯度反而降低。最优参数醇提后绿原酸质量分数为36.28%。

3.2 水沉试验结果

在醇提得到的绿原酸粗提液中加入水,使杂质沉淀,滤去不溶于水的成分,以绿原酸粗提液体积为1倍,分别加入2,3,4,5倍的水,沉淀,过滤,滤液浓缩干燥,测绿原酸含量。图1示出用水量对绿原酸纯化效果的影响。加入3倍量水时,绿原酸质量分数达45.38%,较醇提最优条件提取结果提高9.10%,说明水沉有较好的纯化效果。

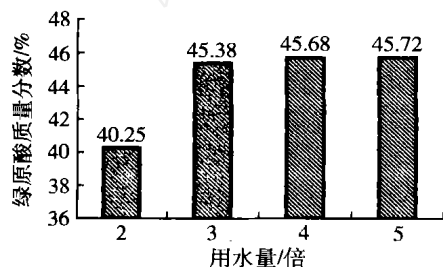


图1 水沉用水量对绿原酸纯化效果的影响

Fig. 1 Effect of water volume on purification of CHA

3.3 树脂去杂试验结果

将金银花质量浓度分别为0.10,0.25,0.50和1.00 g·mL⁻¹的吸附原液进行上柱吸附洗脱,收集流出液,浓缩干燥,测绿原酸含量。图2示出吸附溶液中金银花质量浓度对树脂吸附效果的影响。可以看出,金银花质量浓度为0.25 g·mL⁻¹时纯化物中绿原酸质量分数最高,树脂去杂效果最好。

分别用0.2 mol·L⁻¹的HCl和0.5 mol·L⁻¹的NaOH将吸附原液pH调节为2,4,7和10,进行吸附洗脱,收集流出液,浓缩干燥,测绿原酸含量。由图3可知,溶液pH为7时绿原酸质量分数最高,说明吸附原液在中性条件下杂质较易被树脂吸附。

吸附原液通过树脂的流速一是会影响工作效率,二是会影响树脂对杂质的吸附。由图4知,流速为1~3 mL·min⁻¹时,随着流速的加快,绿原酸质量

分数略有降低;流速大于3 mL·min⁻¹时,绿原酸质量分数降幅很大。综合考虑纯度及生产周期,选择3 mL·min⁻¹为最佳流速。

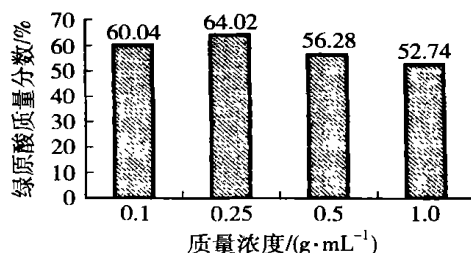


图2 吸附原液金银花质量浓度对树脂吸附效果的影响

Fig. 2 Effect of flos lonicerae quality density in adsorption solution on purification of CHA

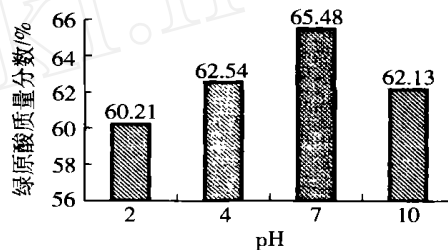


图3 吸附原液pH对绿原酸纯化的影响

Fig. 3 Effect of adsorption solution pH on purification of CHA

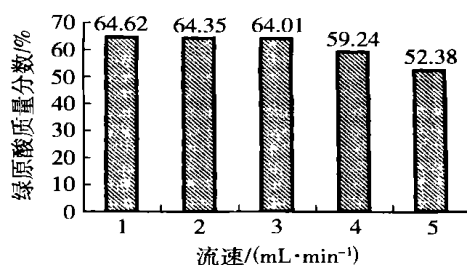


图4 吸附原液流速对绿原酸纯化效果的影响

Fig. 4 Effect of adsorption solution flow rate on purification of CHA

D101树脂不吸附绿原酸,仅吸附大分子色素、黏液质等杂质,用水可将绿原酸全部冲洗下来。以柱床体积为1倍,分别用2,3,4,5和6倍的水冲洗柱子,测纯化物中绿原酸含量。由表2可以看出,冲洗柱子的水为4倍柱床体积时绿原酸质量分数达65.12%,较水沉后提高19.74%,大于4倍时绿原酸质量分数变化很小。综合考虑生产周期及绿原酸质量分数,选用4倍水体积洗脱。

树脂对溶液的处理量由表3可得,5 g预处理后的树脂最多可以吸附25 mL溶液中的杂质,溶液体积大于25 mL时树脂已达到饱和,绿原酸质量分数

明显降低。

表 2 洗脱水量对绿原酸纯化效果的影响

Table 2 Effect of eluting water quantity on the purification of CHA

洗脱水量/倍	2	3	4	5	6
绿原酸质量分数/%	60.58	62.24	65.12	65.31	65.14

表 3 树脂的最大吸附容量

Table 3 The sorption capacity of resin

溶液体积/mL	10	15	20	25	30	35	40
绿原酸质量分数/%	65.34	65.18	65.02	64.84	60.21	54.18	50.24

在以上试验的基础上,选择吸附原液金银花质量浓度为 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 为 7, 流速 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 用水量为 4 倍柱床体积, 进一步试验, 得纯化绿原酸质量分数为 65.12%。

4 结 论

1) 金银花绿原酸的酸醇回流最优提取参数为乙

醇体积分数 70%, 乙醇 pH 为 4, 回流时间 4 h, 温度 70, 此条件下绿原酸提取率达 85.12%, 提取物中绿原酸质量分数达 36.28%。

2) 金银花醇提取液含有较多杂质, 水沉后提取物绿原酸质量分数提高了 9.10%; 经 D101 树脂吸附进一步纯化提取物, 绿原酸质量分数达 65.12%, 较树脂去杂前提高了 19.74%, 说明 D101 树脂吸附去杂效果较好。

参 考 文 献

- [1] 杨怀霞, 寇西桃, 武雪芬, 等. 金银花茎叶中绿原酸的新分离方法研究[J]. 河南中医药学刊, 2000, 15(4): 16~17
- [2] 张文清, 郑 琪. 金银花中绿原酸提取工艺的研究[J]. 广西轻工业, 2000, 8(1): 33~34
- [3] 胡 军, 周跃华. 大孔吸附树脂在中药成分精制纯化中的应用[J]. 中成药, 2002, 24(2): 127~130
- [4] 何德贵, 周芳勇, 李仕先, 等. 金银花不同提取工艺及优选条件探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(1): 6~7

科研简讯

我校“喷灌工程计算机辅助设计软件”达国际先进水平

我校水利与土木工程学院王福军教授和北京市水利水电技术中心何浩总工程师共同主持完成的北京市“十五”科技攻关课题“喷灌工程计算机辅助设计软件”经北京市科委组织专家进行成果鉴定, 其成果软件(IrCAD)完全按照我国相关的技术规范和标准进行开发, 符合我国喷灌规划设计的国家标准和软件开发技术要求。与国外同类软件相比, IrCAD 软件内容丰富、功能强大、技术先进, 具有较强的可扩展性、兼容性、系统性和创新性, 具有广阔的推广应用前景。经专家评议, 该成果达国际先进水平。2003 年度获北京市水利局科技进步一等奖。

我校一项设施农业科研成果达到国际领先水平

2003 年 4 月 4 日, 由我校水利与土木工程学院滕光辉副教授主持完成的国家“九五”重点科技攻关专题“设施农业分布式网络控制技术研究及开发”通过教育部组织的有关专家的鉴定。课题开发的分布式网络控制系统应用于设施农业, 填补了国内空白, 达到国际先进水平, 其中开放型的底层控制网络结构以及嵌入式数据采集技术和控制执行机构, 达到国际领先水平。

该项目的实施, 对于农业高效、可持续发展有着十分重要的战略意义。此项目的推广必将产生显著的经济和社会效益。