

黄花忍冬果实中绿原酸的提取及含量测定

于加平¹, 王夕宇², 马中学¹ (1. 吉林农业科技学院生物工程系, 吉林吉林 132101; 2. 吉林吉药业有限公司, 吉林吉林 132013)

摘要 用乙酸乙酯作溶剂, 采用索氏提取法对黄花忍冬果实中绿原酸进行提取, 高效液相色谱法对绿原酸进行检测和含量的测定。结果表明, 该法对黄花忍冬果实中绿原酸的提取简单、快速; 检测方法可行, 含量测定准确。

关键词 黄花忍冬果实; 绿原酸; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)06-02199-02

Extraction of Chlorogenic Acid in *Lonicera chrysantha* Fruit and its Determination

YU Jia-ping et al (Department of Bio-engineering, College of Agricultural S&T of Jilin, Jilin, Jilin 132101)

Abstract With acetic ether as solvent, the chlorogenic acid in *Lonicera chrysantha*'s fruit was extracted with Soxhlet extraction. After the extraction, the determination was done with HPLC. The testing method was rapid, simple and the determination was accurate.

Key words *Lonicera chrysantha* fruit; Chlorogenic acid; HPLC; Determination

忍冬属是忍冬科中较大的属之一, 现知全世界约有200种, 我国约100种, 广布于各省区, 以西南、华中地区种类最多^[1]。其中黄花忍冬(*Lonicera chrysantha*)是其中一种, 主要分布于华北、东北、西北。该属植物多为直立或攀援状灌木, 许多忍冬可供药用。绿原酸成分一直被认为是忍冬中的主要有效成分, 现代药理研究表明, 其具有抗菌抗病毒作用^[2], 还有保肝利胆、止血、抗氧化、抗生育等作用^[3]。笔者用乙酸乙酯作溶剂^[4], 采用索氏提取法对黄花忍冬果实中绿原酸进行提取, 高效液相色谱法对绿原酸进行检测和含量的测定。结果表明, 在黄花忍冬果实中含有绿原酸, 且含量较高, 为绿原酸的提取提供一种有效方法和原料来源。

1 材料与方 法

1.1 材料 日本JASCO BS 2000型高效液相色谱仪, CKCro工作站, phenomenex[4.6×250.0 mm, Luna 5 μ C₁₈(2)]色谱柱。索氏提取器(上海洪纪仪器设备有限公司)。

乙腈为美国Acetonitrile、色谱纯, 超纯水, 磷酸为分析纯; 绿原酸对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号110753-200212。

黄花忍冬果实采自吉林农业科技学院校园内, 经阴干、低温烘干处理为干品。

1.2 方 法

1.2.1 黄花忍冬果实中绿原酸的提取。将干燥的黄花忍冬果实用研钵研碎, 称取10 g, 用滤纸包好, 置于索氏提取器中, 往圆底烧瓶中加入乙酸乙酯80 ml, 在水浴锅上加热回流3 h, 控制温度在75℃左右。把回流液倒于蒸馏瓶中进行减压蒸馏至20 ml, 超声溶解, 过滤, 装于棕色具塞管中, 得待测液, 放于冰箱中待用。

1.2.2 绿原酸的检测

1.2.2.1 色谱条件。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 乙腈-0.5%磷酸溶液(10:90)为流动相; 检测波长327 nm; 流速1.0 ml/min; 柱温25℃。理论板数按绿原酸峰计算应不低于3000。

1.2.2.2 绿原酸对照品溶液的制备。精密称取绿原酸对照品2.700 mg, 置50 ml容量瓶中, 加甲醇超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 0.2 μm滤膜过滤, 取滤液即得浓度为0.054 ng/ml。

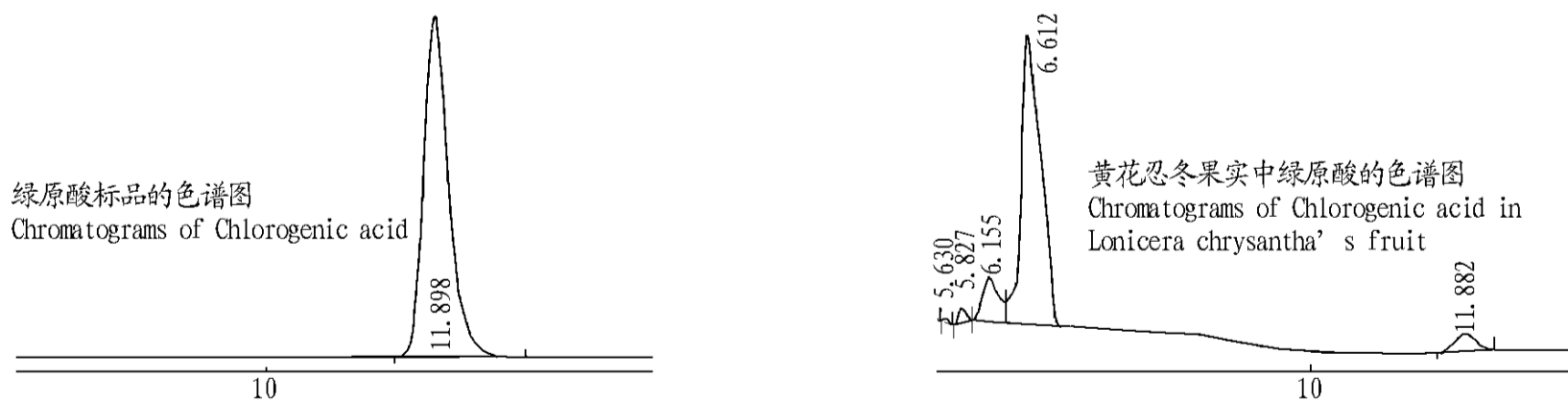


图1 绿原酸对照品与黄花忍冬果实样品 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC Chromatograms of reference substance and sample

2 结果与分析

2.1 黄花忍冬果实中绿原酸的检测 取“1.2.2.2”的标准品溶液5 μl和“1.2.1”提取液10 μl(经0.2 μm滤膜过滤), 按上述色谱条件分别进样分析, 平行进样5次, 得色谱图, 5次得到相同的色谱图, 说明结果准确, 证实样品中含有绿原酸。

2.2 黄花忍冬果实中绿原酸的含量测定

2.2.1 标准曲线的制作。精密吸取对照品溶液(0.054 ng/ml)1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 μl进样, 记录色谱图, 以绿原酸对照品的浓度为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 进行线性回归分析, 得回归方程 $Y = 323\ 624 X - 24\ 308$, 相关系数 $r = 0.999\ 6$ ($n = 5$)。绿原酸在0.000 54 ~ 0.013 50 μg范围内呈现良好线性关系。

2.2.2 稳定性实验。取对照品溶液分别于配制后0、1、2、4、

8、12 h, 取滤液 10 μ 注入色谱仪, 记录色谱图, 考察溶液放置后峰面积的变化情况, RSD 为 0.27%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.3 精密度实验。取对照品溶液连续重复进样 5 次, 记录色谱图, 考察峰面积的变化情况, RSD 为 0.19%, 表明该含量测定方法精密度良好。

2.2.4 回收率实验。精密称定已测定含量的黄花忍冬果实

5 份, 每份约 10.0 g, 按“1.2.1”方法提取后精密加入绿原酸对照品 0.890 ng, 经 0.2 μ m 滤膜过滤, 进样, 测定峰面积。计算平均回收率为 99.37%, RSD 为 1.47%, 结果见表 1。

2.3 样品含量的测定 取“1.2.1”制备的黄花忍冬果实提取液 20 μ l (经 0.2 μ m 滤膜过滤), 平行进样 3 次, 得色谱图, 按外标法计算样品中绿原酸含量, 测得平均含量为 0.28%。

表1 回收率的测定 (n=5)

Table 1 Result of recovery (n=5)

编号 No.	取样量 g Sampling amount	样品含量 ng Sample content	加入对照品 量 ng Addition amount	测得量 ng Determined value	回收率 % Recovery rate	平均回收率 % Average recovery rate	相对标准偏差 % RSD
1	10.325	0.268	0.89	1.157	99.91		
2	10.007	0.260	0.89	1.168	100.86		
3	10.164	0.264	0.89	1.147	99.05	99.37	1.47
4	10.037	0.261	0.89	1.139	98.36		
5	10.061	0.266	0.89	1.143	98.70		

3 结论

(1) 采用索氏提取法对黄花忍冬果实中绿原酸进行提取, 经高效液相色谱法检测, 证实黄花忍冬果实中含有绿原酸, 经外标法测定其含量为 0.28%。

(2) 目前黄花忍冬多数为城市的绿化树种, 其果实是一种尚未被开发利用且很有价值的药用资源, 我国黄花忍冬果实资源极为丰富, 需要对其进行开发研究, 使之得到合理应用。通过该实验证实, 黄花忍冬果实中含有绿原酸且其含量

较高, 这为黄花忍冬果实的综合开发利用奠定了基础。

参考文献

- [1] 李会军, 李萍. 忍冬花蕾的化学成分研究[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(3): 29-32.
- [2] 中国药典委员会. 中国药典: 一部 M. 北京: 化学工业出版社, 2000: 177.
- [3] 邢俊波, 李萍. 忍冬属化学成分研究概况及展望[J]. 中药材, 1999, 22(7): 366-370.
- [4] 邓素兰, 余继宏, 邓芳琴. 金银花中绿原酸提取工艺的对比[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2007, 28(2): 109-112.

(上接第 2190 页)

结果表明(表 2), 对突变株 THB-9 固体发酵产 CMC 酶和 FPA 酶的影响程度为 A > B > C, 麸皮 甘蔗渣最佳配比为 1:2, (NH₄)₂SO₄ 最适量为 1.0 g, K₂HPO₄ 最适量为 0.1 g。最佳培养基配方为 麸皮 + 甘蔗渣(1:2) 40 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.03 g, 含水量 60%, pH 值 5.5。按照该配方配制培养基, 取 40 g 培养基装入 250 ml 三角瓶中, 于 45℃ 下培养 3 d, 测定 CMC 酶和 FPA 酶最高活力可达 832.56 和 70.38 IU。

3 讨论

研究结果表明, THB-9 突变株充分利用天然纤维素类物质麸皮 + 甘蔗渣和相对廉价氮源 (NH₄)₂SO₄ 时, 能产较高量

的纤维素酶, 最适产酶温度为 45℃, 说明该突变株在高温下能利用廉价天然纤维素类物质生产纤维素酶。对该突变株所产纤维素酶进行分离纯化并对其酶学性质进行探讨, 是今后研究的重点。

参考文献

- [1] 林英, 秦萍, 杜志强, 等. 产纤维素酶绿色木霉 FUV 产酶条件优化[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2312-2314.
- [2] 管斌, 孙艳玲, 谢来苏. 纤维素酶高产菌株的选育[J]. 中国酿造, 2002(4): 18-23.
- [3] 张辉, 朱奇, 杨启银, 等. 嗜热纤维素分解菌 THB-9 诱变选育及产酶条件初步研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2318-2320.
- [4] 靖德兵, 李培军, 王力华, 等. 康氏木霉固体发酵生产纤维素酶优化研究——培养基用料与工艺条件优化[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 82-86.
- [5] 伍红, 陆兆新, 吕玫, 等. 黑曲霉 AF-98 固体发酵产纤维素酶的产酶条件研究[J]. 菌物学报, 2006, 25(3): 475-480.