

文章编号:1007-2985(2011)05-0091-04

金银花叶茎藤中黄酮与绿原酸同时提取分离工艺^{*}

罗 悠,陈莉华,梁 玄,黄 浩,李 彪,黄 练

(吉首大学化学化工学院,湖南 吉首 416000)

摘 要:超声辅助乙醇提取金银花叶茎藤中的绿原酸与黄酮,乙酸乙酯萃取分离黄酮与绿原酸,D101 大孔树脂梯度洗脱绿原酸与黄酮,乙醇及正己烷分相法纯化黄酮与绿原酸. 结果表明,乙酸乙酯萃取可将金银花叶茎藤中的黄酮与绿原酸较好的分离,经 D101 大孔树脂吸附、50%乙醇洗脱、浓缩过滤、沉淀用乙醇重结晶后得到的水溶型黄酮纯度达 84.5%;经 D101 大孔树脂吸附、70%乙醇洗脱、浓缩干燥、pH 值 2.97 条件下乙酸乙酯萃取、正己烷分相后,得到的绿原酸纯度达 91.2%. 方法已用于金银花叶茎藤中黄酮与绿原酸的同时提取、分离与纯化,结果满意.

关键词:金银花叶茎藤;黄酮;绿原酸;大孔树脂

中图分类号:O6-332

文献标志码:B

金银花为忍冬科多年生半常绿缠绕植物,又名忍冬花、银花、双花等,《中国药典》^[1] 收载在药材及饮片部分,具有清热解毒、凉热散风的功效^[2]. 长期以来,金银花不仅广泛应用在医院临床和中成药生产中,同时还作为提取绿原酸的大宗工业原料应用于工业生产中,其价格逐年攀升. 而研究中对其枝叶的重视程度却不够,大量金银花的枝叶被视为非药用部位而弃之. 研究表明,金银花叶和金银花在临床上均有清热解毒之功效^[3]. 金银花叶茎藤中主要含有以下成分^[3]: (1)黄酮类. 金银花叶茎藤的黄酮类化合物有木犀草素、忍冬苷等. (2)有机酸类. 绿原酸类化合物是金银花叶的主要有效成分,包括绿原酸和异绿原酸. 同一时期的金银花叶中绿原酸类有效成分约为花的 60%~70%. (3)多糖类. (4)粗蛋白、粗脂肪等营养物质. 金银花植株幼嫩枝叶粗蛋白高于 23%,粗脂肪高于 47%,适口性较好,牛、羊等牲畜喜食.

近 5 年来,金银花叶茎藤中绿原酸的提取仅见于文献^[4],有少量文献关于叶中黄酮的提取^[5-7],尚未见对金银花叶茎藤中黄酮、绿原酸、多糖的综合提取的研究报道. 本研究将以系列文章探讨利用价格低廉的金银花叶茎藤进行黄酮、绿原酸、多糖的联合提取并将残渣处理为饲料添加剂,为金银花叶茎藤资源化综合利用提供实验依据.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

UV75TCRT 紫外分光光度计(日本岛津);KQ-250E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RH-201B-II 旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);pHS-25 酸度计(上海日岛科学仪器有限公司);DZF-6020 真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);HH-S 恒温水浴锅(郑州长城科工贸有限公司);层析柱;粉碎机.

芦丁标准品;绿原酸标准品(中国药品生物制品鉴定所);无水乙醇;石油醚;乙酸乙酯;正己烷;NaNO₂;Al(NO₃)₃;NaOH;HCl. 以上试剂均为分析纯. D101 大孔树脂(安徽三星树脂科技有限公司).

^{*} 收稿日期:2011-07-22

基金项目:科技部科技型中小企业技术创新基金资助项目(10C26214302421);科技部科技型中小企业技术创新基金资助项目(11c26214305373);湘西自治州科技局 2011 年科技创新引导计划;吉首大学大学生研究性学习和创新性实验计划项目(JSU-CX-2011-44)

通讯作者:陈莉华(1961-),女,湖南吉首人,吉首大学化学化工学院教授,博士,主要从事天然产物生理活性成分的提取及应用研究.

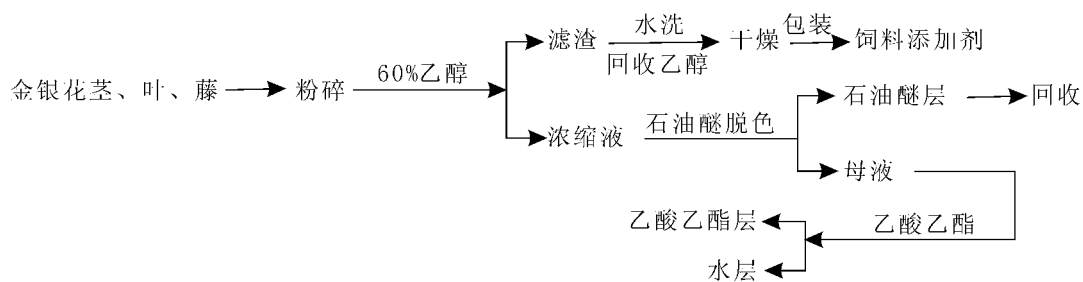
1.2 实验方法

1.2.1 大孔树脂的预处理 取一定量的 D101 大孔树脂,先用 95%乙醇浸洗数次,每次 24 h,至浸洗液加适量的水无白色浑浊现象止.用水反复清洗干净至无醇味,加入 4 倍体积 2 mol/L 的 NaOH 溶液,浸泡 12 h,以水洗至中性.再加入 4 倍体积量 2 mol/L 的 HCl 溶液,浸泡 12 h,用水洗至中性备用.

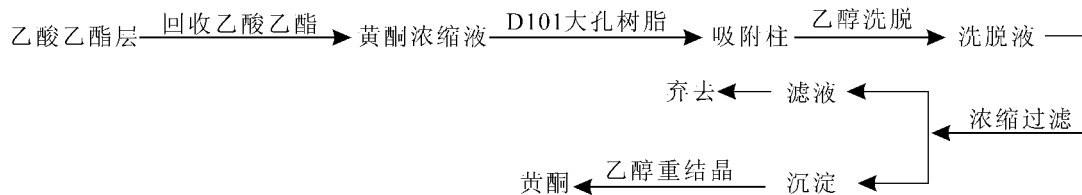
1.2.2 黄酮标准曲线 以芦丁为黄酮对照品按照 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法绘制标准曲线.测定样品溶液在 510 nm 处的吸光度值,以浓度(c)对吸光度(A)进行线性回归得回归方程为: $c=0.0939A$, $R^2=0.9998$,浓度在 0~0.05 mg/mL 之间有良好的线性关系.

1.2.3 绿原酸标准曲线 精确称取绿原酸标准品 5.1 mg,95%的乙醇定容至 25 mL,精密吸取 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,7.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 45%的乙醇定容至 25 mL,混匀.此为标准系列溶液,紫外扫描测出最大吸收波长,并在最大吸收波长处测吸光度.以浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线^[8].在 329 nm 处测一系列的溶液的吸光度 A ,以浓度(c)对吸光度(A)进行线性回归得回归方程为 $c=0.0203A-0.0005$, $R^2=0.9997$,浓度在 0~0.057 mg/mL 之间有良好的线性关系.

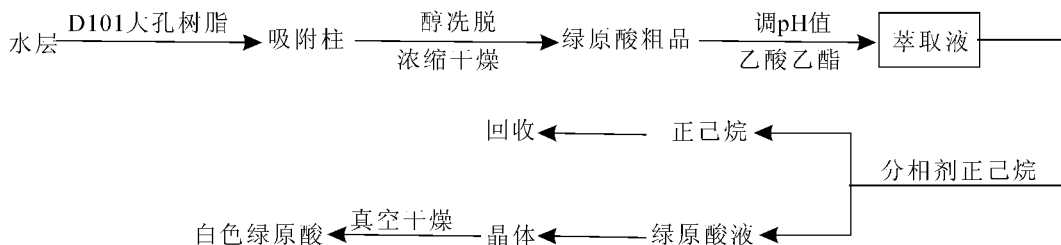
1.2.4 样品的处理与粗分离



1.2.5 黄酮的富集与精制



1.2.6 绿原酸的富集与精制



1.2.7 黄酮与绿原酸的得率与纯度计算 将得到的固体或晶体配制成一定体积的溶液,分别按黄酮及绿原酸的步骤进行处理,在最大吸收波长处测出吸光度,代入线性回归方程求出浓度,结合体积求出各物质的质量,再根据下式求出纯度:

$$\text{黄酮得率} = (\text{黄酮质量} / \text{金银花叶茎藤质量}) \times 100\%$$

$$\text{黄酮纯度} = (\text{芦丁质量} / \text{黄酮精制品质量}) \times 100\%$$

$$\text{绿原酸得率} = (\text{绿原酸质量} / \text{金银花叶茎藤质量}) \times 100\%$$

$$\text{绿原酸纯度} = (\text{绿原酸质量} / \text{绿原酸精制品质量}) \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 样品的处理

称取 50 g 金银花粉末,按料液比 1:10 先加入总体积一半的 60%乙醇,温度 50 °C、功率 100 W、超声萃取 30 min. 超声

波特殊的强纵向振动、冲击破碎、空化效应及搅拌加热等物理性能,破坏提取物的细胞结构,使溶媒能渗入细胞内部,从而加速有效成分的溶解,提高有效成分的提取率。

将上述超声后的溶液抽滤,滤渣再加入另一半体积的 60%乙醇,合并滤液,减压回收乙醇,得浓缩液,滤渣洗净干燥制备绿色饲料的添加剂。

2.2 黄酮与绿原酸的粗分离

在浓缩液中,按 1:1 加入石油醚^[7],脱色 3 次,每次 4 min. 分液,上层为含黄酮的黄绿色乙酸乙酯层,下层为含绿原酸的暗红色水层。

2.3 黄酮的富集

将乙酸乙酯层用旋转蒸发器减压回收乙酸乙酯,得粗黄酮的浓缩液。称取预处理好的 D101 大孔树脂 100 g,湿法装柱,在装柱的过程中,应使层析柱中的大孔树脂一直处于有水的环境中,避免与空气直接接触,导致装柱不密实,出现大量气孔,使柱性能下降,影响分离效果。

将浓缩液倒入玻璃层析柱中浸泡 2 h 后,控制流速 2 mL/min,先用 2 倍柱体积的水洗脱除去糖类、蛋白质和大分子杂质^[7],再用 50%的乙醇洗脱,每一份柱体积收集一份流出液。从每份流出液中取 1 mL 进行黄酮的颜色反应($\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法),溶液由无色变为红色,第 1 份到第 3 份的颜色较深,从第 4 份开始颜色逐渐变浅,在 510 nm 处测第 5 份、第 6 份的吸光度,分别为 0.128,0.084。对应的洗脱液浓度为 0.012,0.084 mg/mL。因此 6 倍体积洗脱液后,大孔树脂中吸附的黄酮已大致洗脱完,合并洗脱液(亮黄色),减压回收乙醇,伴随着乙醇的蒸出,滴液速度渐慢,有淡黄色沉淀析出,重 1.256 1 g。

2.4 黄酮的精制及得率

黄酮易溶于热水、丙酮,溶于甲醇、乙醇。因此,以乙醇为溶剂,采用重结晶法可有效提高金银花叶茎藤中黄酮的纯度。在金银花提取物中加入少量的 50%的乙醇,在恒温水浴中使之溶解,温度 60 °C,时间 30 min。过滤除去不溶物,溶液颜色为淡黄色,用 HCl 调节 pH 值至 4 左右,在室温下静置 8 h,析出淡黄色晶体。过滤,得晶体 0.250 8 g,计算黄酮的得率为 0.5%。本实验中,金银花中黄酮的提取率远低于文献值,除实验条件不同导致的差距外,还可能由于金银花中脂溶性的黄酮远低于水溶性的黄酮的缘故。笔者在实验过程中,曾取含绿原酸的水层溶液少量,做黄酮的颜色反应实验,发现显色较深。说明水溶液层中确实还含有大量的水溶性黄酮,与文献^[6]所得结论一致。

2.5 黄酮的纯度测定

精密称取干燥黄酮晶体 0.081 3 g,置于 100 mL 的容量瓶中,加 95%乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,备用。精密移取对照品溶液 1.0 mL,按照实验方法测定溶液的吸光度为 0.293,计算得到晶体中含黄酮量为 0.068 7 g,因此黄酮的纯度为 84.5%。

2.6 绿原酸的富集

本研究采用了大孔树脂和混合溶剂分相结合法纯化绿原酸,先采用大孔树脂在一定酸性条件下,对绿原酸进行初步富集得到绿原酸粗品(含量 40%左右),然后对绿原酸粗品使用混合溶剂分相新工艺^[9]进行精制,可使绿原酸纯度达到 99.5%。由于绿原酸在酸性条件下,以分子形式存在,又易溶于醇、丙酮等极性溶剂,因此可首先使用萃取剂(乙酸乙酯、正丁醇、异戊醇等偏极性有机溶剂)把绿原酸从其粗品的酸性水溶液中萃取出来,获得萃取液后(萃取液为溶解绿原酸的乙酸乙酯相和极少量与乙酸乙酯互溶的水形成的均相),再加入分相剂(正己烷、苯、石油醚等非极性有机溶剂),此时整个溶剂系统由加入分相剂前的偏极性逐渐向加入后的非极性过渡。同时绿原酸分子不溶于非极性的分相剂以及萃取剂、分相剂的互溶效应远大于萃取剂和少量水的互溶效应,因此充分静置后,萃取剂、分相剂形成均相,而萃取剂中的绿原酸则随少量水重新析出,从而达到纯化的目的。

称取预处理好的 D101 大孔树脂 85 g 湿法装柱,用 HCl 调节水层提取液至 pH 值为 3 左右,上柱,浸泡 2 h 后,控制流速 2 mL/min,先用 2 倍柱体积的水洗脱除去糖类、蛋白质和大分子杂质,再用 70%的乙醇洗脱。每一份柱体积收集一份流出液。第 1 份为浅黄色,第 2 份为橘红色,从第 3 份开始颜色逐渐变浅。在 329 nm 处测第 4 份、第 5 份的吸光度,分别为 0.701,0.160,对应的洗脱液浓度为 0.014,0.003 mg/mL。因此,5 倍体积洗脱液后,绿原酸大致洗脱完全,合并洗脱液(深红色),减压回收洗脱液中的乙醇,并放入真空干燥箱中干燥,时间 30 min,温度 50 °C,真空度 0.09 Mp,得绿原酸粗品(淡黄色)1.288 1 g。

2.7 绿原酸的精制

精密称取粗品 32.4 mg,按料液比 1:7 在绿原酸粗品中加入水 226.8 mL, HCl 调 pH 值至 2.97,再加入等体积的乙酸乙酯,萃取时间为 4 min,萃取次数为 4 次,合并萃取液总计 907.2 mL,按分相剂/萃取液=0.4^[9],加入正己烷 362.8 mL。分液,取下层水溶液层,约为 15 mL,在冰箱中静置 24 h,温度 0 °C,过滤,真空干燥晶体,真空度 0.09 Mp,时间 30 min,温度 50 °C,得白色晶体^[8],称量,为 15.4 mg,得率 1.23%。

2.8 绿原酸纯度的测定

将绿原酸晶体置于 25 mL 容量瓶中,加入 95% 的乙醇溶解.精密吸取 1.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 45% 的乙醇定容,混匀,在最大吸收波长 329 nm 处测吸光度为 1.129,由此算出纯度为 91.2%.

3 结语

本研究以价格低廉的金银花叶茎藤为原料,同时提取绿原酸及黄酮,绿原酸纯度为 91.2%,得率 1.23%,黄酮纯度为 84.5%,得率为 0.5%,文献[10]用金银花为原料同时提取绿原酸及黄酮,绿原酸纯度为 68.2%,得率 1.34%,黄酮纯度为 95%,得率为 1.12.本研究得到的绿原酸纯度比文献[10]得到的绿原酸纯度高 23%,而得率几乎相近.

由此可见:本研究提出的方法能够较好地金银花叶茎藤中的黄酮与绿原酸同时提取分离与纯化;本研究中,提取液经乙酸乙酯萃取后,黄酮与绿原酸得到了较好的分离;与已有研究结果比较表明,本研究结果具有原料来源广、价格低廉、绿原酸产品纯度高、得率高的特点,对金银花叶茎藤的综合开发具有应用价值.

参考文献:

- [1] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典(2005年版1部)[S].北京:化学工业出版社,2005:152-153.
- [2] 庞 瑞.金银花有效成分的药理学研究进展[J].陕西中医学院学报,2011,34(3):77-79.
- [3] 郭 玉,阳育聪,刘运美,等.金银花及其叶中有效成分的比较研究[J].南华大学学报:医学版,2008,36(2):154-157.
- [4] 杨军宣,尹蓉莉,陈金玉,等.金银花叶中绿原酸的大孔吸附树脂纯化工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):20-23.
- [5] 姜洪芳,张卫明,张 玖.忍冬叶黄酮类化合物的提取分离与结构鉴定[J].安徽农业科学,2008,36(27):11 795-11 797.
- [6] 朱 英,裘德胜,陈 民,等.金银花叶总黄酮的水提取工艺研究[J].中成药,2007,29(1):60-63.
- [7] 王丽婷,王丽娟.大孔树脂分离纯化金银花叶中的总黄酮[J].华西药学杂志,2010,25(5):575-576.
- [8] 时军波,徐 娜,刘长安,等.金银花不同部位中绿原酸和木犀草苷含量的测定[J].化学分析计量,2010,19(6):45-47.
- [9] 胡居吾,李雄辉.分相萃取法制备高纯度绿原酸的工艺研究[J].食品科学,2010,31(14):37-41.
- [10] 郝凤霞,杨敏丽.金银花中绿原酸和黄酮的同时提取分离工艺研究[J].食品科学,2009,30(20):211-214.

Simultaneous Extraction and Isolation of Chlorogenic Acid and Flavonoids from Leaves and Rattan of *Lonicera Japonica*

LUO You, CHEN Li-hua, LIANG Xuan, HUANG Hao, LI Biao, HUANG Lian
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou Hunan, 416000)

Abstract: Chlorogenic acid and flavonoids were simultaneously extracted by ethanol with the aid of ultrasonic treatment from leaves and rattan of *Lonicera japonica* and then isolated by ethyl acetate and macroporous resin D101. The purification of soluble flavonoid and chlorogenic acid was achieved by re-crystallization with ethanol and N-Hexane phase separation, respectively. Results showed that two products (A and B) were obtained and identified to be chlorogenic acid and soluble flavonoid. The chlorogenic acid content in product A was 91.2% with a yield of 1.23% and the flavonoid content in product B was 84.5% with a yield of 0.50%. The proposed method has been used to obtain flavonoids and chlorogenic acid from leaves and rattan of *Lonicera japonica* with satisfactory results.

Key words: leaves and rattan of *Lonicera japonica*; flavonoid; chlorogenic acid; macroporous resin

(责任编辑 易必武)