

金银花提取物中绿原酸分离纯化研究

刘玉峰 王有强

山东新时代药业有限公司 山东 临沂 273400

【摘要】：绿原酸是金银花中主要的活性成分，也存在于很多药用植物中，具有抗氧化、抗病毒等功效。除了将绿原酸运用到医药之外，也可加入到化妆品中防止皮肤衰老。后来日本科学家发现绿原酸还拥有预防肥胖的效果，所以被大量应用在食品等领域。因此医学界与药学界都对其特别关注，社会需求尤其大。我国目前的绿原酸只能来源于进口，无法自己生产，因此单价较高。通过实际操作比较绿原酸在纯化过程中的影响因素，选出使绿原酸产品含量最高的工艺条件。实验比较 NKA-D201 以及 HPD826 这三种型号的大孔吸附树脂对绿原酸的吸收解吸效果，选择 NKA-大孔吸附树脂对绿原酸进行分离纯化。通过研究溶液的 pH 值、反应温度、绿原酸溶液的浓度、乙醇的浓度这四个单因素以及正交试验确定出该实验的最佳条件为 pH 值 4.00，温度 45，绿原酸溶液浓度 0.020mg/ml，乙醇浓度 75%。得到产品后加入 50%甲醇配制成溶液，用紫外分光光度计测量吸光度，计算出绿原酸的纯度为 39.03%，得率可达 94.13%。

【关键词】：金银花；绿原酸；大孔吸附树脂；纯化；最优工艺条件

Separation and Purification of Chlorogenic Acid from Honeysuckle Extract

Yufeng Liu, Youqiang Wang

Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd. Shandong Linyi 273400

Abstract: Chlorogenic acid is the main active component in honeysuckle. It also exists in many medicinal plants. It has the effects of anti-oxidation and anti-virus. In addition to applying chlorogenic acid to medicine, it can also be added to cosmetics to prevent skin aging. Later, Japanese scientists found that chlorogenic acid also had the effect of preventing obesity, so it was widely used in food and other fields. Therefore, both medical and pharmaceutical circles pay special attention to it, and the social demand is especially great. Moreover, China's current chlorogenic acid can only be imported and cannot be produced by itself, so the unit price is high. The purpose is to compare the influencing factors of chlorogenic acid in the purification process through practical operation, and select the process conditions for the highest content of chlorogenic acid products. The absorption and desorption effects of three types of macroporous adsorption resins NKA-D201 and HPD826 on chlorogenic acid were compared. NKA macroporous adsorption resin was selected to separate and purify chlorogenic acid. By studying the four single factors of pH value, reaction temperature, chlorogenic acid solution concentration and ethanol concentration and orthogonal test, it is determined that the optimum conditions of the experiment are pH value 4.00, temperature 45, chlorogenic acid solution concentration 0.020mg/ml and ethanol concentration 75%. After the product was obtained, 50% methanol was added to prepare the solution. The absorbance was measured by UV spectrophotometer. The purity of chlorogenic acid was 39.03% and the yield was 94.13%.

Keywords: Honeysuckle; Chlorogenic acid; Macroporous adsorption resin; Purification; Process conditions

1 金银花简介

金银花是一种传统的中药，属于忍冬科植物，又名双花，因为忍冬刚开花时为白色，成熟后变为黄色而得名金银花。它性甘气香，有着清热解毒，抗病菌消除炎症，清络去风，以及能够医治发斑、发疹、身热，咽喉疼痛等症状^[1-2]。金银花在我国和国外均有分布，其具有较强的适应性，能适应多种土壤与气候，当然它最喜欢土层厚的沙质土。

2 金银花的价值

金银花拥有普遍的药用、保健价值^[3]，通常提取里面的主要成分绿原酸。金银花茶能减肥，还能抑制喉咙的病菌等。此外金银花还具有观赏价值、经济价值、生态价值、营养价值^[3-6]。

目前我国金银花的年产值可达 48 万元/hm²，其在山东等

地被当做经济作物栽培，经济效益十分可观。营养价值：金银花中含有碳水化合物，氨基酸以及铁、钴、镍、铜等微量元素。生态价值：金银花为藤本植物，枝叶繁茂，种植在裸岩、边坡等地方可减少水土流失，可防止滑坡、治理荒漠、生态修复、水土保持。药用价值：金银花泡茶可防中暑，清热解渴。它的花蕾有清热解毒的功效，可以治疗感冒、扁桃体发炎；茎叶可以治疗风湿等；种子可清血化热。观赏价值：金银花可用于装饰棚廊、假山等，还可制作成盆景，以及园艺造型的摆设等。

3 绿原酸简介

绿原酸的化学名称为 3-咖啡先奎宁酸，也叫做咖啡鞣酸^[7]。通常从忍冬的花蕾中提取出，具有很多药用或医用功能。可以加入到具有保健功效的药品以及护肤品当中。绿原酸有益于舒

展胆脏的作用,可以促进小鼠分泌大量胆汁。当人体吸入含有绿原酸的物质时会引发过敏,产生皮炎、过敏等症状。

3.1 绿原酸的物理性质

绿原酸通常为针形晶体状,它的分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$,相对分子质量为354.31,熔点为208,110下变成无水化合物。易溶于水和部分有机溶剂。适当升高温度后溶解度更大,微溶或难溶于一些易与油脂融合的溶剂。绿原酸分子中含有三部分(不饱和的酚、酯键、不饱和双键),由于这三个部分不是十分稳定所以易发生异构,其原因是绿原酸的水或分子内酯基的迁移。又由于绿原酸的自身结构容易随外界条件的变化而变化,因此在提取该目标物质时可以使用醇类有机溶剂,并且见光易分解,宜保存在棕色瓶中。

3.2 绿原酸的化学性质

绿原酸具有广泛的生物活性、抗菌、抗病毒、抗氧化、清除自由基、抗肌肉骨骼老化、抗衰老、抗肿瘤等作用。由于它含有一定量的R-OH基形成抗氧化的氢自由基,因此抗氧化能力强于部分小分子量的酚酸类(咖啡酸、对羟基苯酸等)。

3.3 绿原酸的价值

近年来绿原酸的应用十分广泛,市场需求量也很大,超过20万吨。但由于目前国内外对绿原酸的纯化工艺都不太成熟,导致了不同纯度的绿原酸其售价也不相同,其中60%纯度的绿原酸的价格达到350万元/吨。

其应用领域广泛,具体应用方面如下:医药领域:绿原酸可用于抑制病毒的活性,还具有抗肿瘤、抗癌变、抗氧化、预防高血压、预防血栓栓塞等功效。食品领域:绿原酸具有增加食品香味和保护食品原来的颜色等作用,因此常被加在各种食品及饮料中以此保证食品的新鲜。日用品领域:绿原酸能抗氧化,因此可加入化妆品中,可以减缓因紫外线导致的皮肤衰老。

4 绿原酸的分离纯化方法

4.1 金属盐离子沉淀法

金属离子沉淀法的原理是加入金属离子与绿原酸等活性成分生成沉淀,得到的沉淀通过加入酸或盐洗涤,从而分离出绿原酸。该方法通常和水提法配合使用。金属盐离子沉淀法一般包括:石硫醇法:该方法得到的绿原酸的得率和纯度都较低,通常情况下得到绿原酸产品的纯度在22%左右,并且其中包括 Na_2SO_4 等杂质,不易除去。并且当在碱性条件下时,由于绿原酸本身结构的问题,容易发生水解,因此不适合大规模的生产。铅沉法:其需要与其他萃取、结晶等纯化过程相结合使用,能够得到绿原酸纯品,但是得率很低,王洪武等人用铅沉法分离纯化绿原酸,绿原酸产品的得率是0.31%。但绿原酸中任含有极少量的重金属铅,污染环境,更污染绿原酸产品,因此本方法不适合以生产作为原料的绿原酸。

4.2 膜分离技术

上个世纪出现了一种新的分离技术叫膜分离技术,该方法的原理是基于半透膜对粒径大小不同的分子的选择性不同而实现分离的。使用该方法得到的绿原酸产品回收率达到95.4%。吴正奇、凌秀菊等人研究了膜技术分离纯化绿原酸,比较了MF1和MF2两种微滤膜的过滤特性,MF2膜的截留率可降低到3.4%,绿原酸的产率提高了24.8倍,绿原酸的纯度提高到27%。彭小文使用膜分离技术对杜仲叶中的绿原酸水提液进行分离,并与大孔树脂法结合,使得到的绿原酸纯度达到57.5%。该法的缺点在于膜本身,技术流程会使膜被堵塞、污染甚至损坏。需要经常清洗检查,导致使用成本变高,且容易二次污染。

4.3 高速逆流色谱(HSCCC)法

高速逆流色谱法的原理是溶质在两种溶剂中的分配系数不同从而实现分离的。其中不存在固相载体,避免了待分离物品与载体表面发生化学反应,此方法还具有分离纯化速度快、效率高等优点。邵平等人利用高速逆流色谱法分离纯化杜仲叶中提取的绿原酸,在乙酸乙酯-正丁醇-水(3:1:4)溶剂体系,流速2.0ml/min,转速900r/min,温度30,得到绿原酸纯度为98.7%。由于实验室条件不足,实验技术性高,不选用此方法。

5 实验方法

由上述单因素实验与正交试验的实验结果可知,使用NKA-大孔吸附树脂对目标产品进行分离纯化的最佳工艺条件为:温度45℃、溶液浓度0.020mg/ml、溶液pH值4.00、乙醇浓度75%。在该研究条件下,对从金银花中提取出来的粗绿原酸进行分离纯化,检测产品的纯度。

5.1 提取液的处理

提取出来的绿原酸溶液不澄清带有浑浊,应该放入台式冷冻大容量离心机中进行离心沉降,使溶液变得澄清。

5.2 提取液浓度的测定

取离心后的溶液0.1ml于10ml容量瓶中并加入甲醇溶液(体积分数为50%)定容。测量溶液的吸光度,计算溶液浓度。

5.3 绿原酸的分离纯化

称取NKA-大孔吸附树脂10g置于100ml锥形瓶中,向其加入绿原酸溶液20ml,放入45℃恒温振荡箱中振荡24h后,将固体大孔树脂与溶液分离开来,并且测量滤液的吸光度。向锥形瓶中放入吸附了绿原酸的NKA-大孔树脂与50ml的乙醇溶液(75%)后放入恒温振荡箱中,在振荡温度为55和振荡时间为6h的条件下对大孔树脂进行解吸附。反应时间达到要求后取出,将大孔树脂与溶液过滤分开,测量滤液的吸光度。

5.4 重结晶、浓缩

将解吸出来的滤液放入蒸馏烧瓶中,连接好蒸馏装置,将磁力加热搅拌器的温度调到85,蒸馏出滤液中的乙醇。观察蒸

馏装置上的温度计。将蒸馏出乙醇后的绿原酸溶液放入真空干燥箱中，使其干燥浓缩，得到固体绿原酸。

5.5 纯度测定

取绿原酸标准品 2mg 溶解于 50% 甲醇溶液中，定容至 100ml 容量瓶中，测量溶液的吸光度。再取上述浓缩后的绿原酸固体 2mg，同上述样品一样定容到 100ml 容量瓶，测量溶液的吸光度。在温度 45℃、溶液浓度 0.020mg/ml、溶液 pH 值 4.00、乙醇浓度 75% 这个工艺条件下，NKA-大孔吸附树脂分离纯化绿原酸得到的产品得率较高，为 94.13%，绿原酸的纯度较低，为 39.03%。此方法分离纯化金银花提取物中的绿原酸并没有达到理想的纯度，原因为：大孔树脂法是目前比较常用且操作方便的分离纯化方法，但绿原酸纯度不高。NKA-大孔吸附树脂虽有大的吸附容量，但可能对绿原酸的选择性吸附不好。

6 总结

通过实际操作比较大孔树脂法对绿原酸进行纯化的影响因素，在静态实验下比较了 3 种大孔吸附树脂对绿原酸的吸附能力及解吸能力，分别对四个单因素实验包括温度、溶液 pH 值、溶液浓度、乙醇浓度进行实验比较，选出最佳的工艺条件。然后设计正交试验，建立正交试验表进行实验，对实验结果进行分析，选择出使绿原酸的得率最高的优化组合。

6.1 绿原酸标准曲线的建立

配制绿原酸标准溶液，扫描波长 200-300nm，选出最大吸光度处的波长 330nm。测量标准绿原酸溶液在不同浓度下的吸光度，以浓度为横坐标吸光度为纵坐标建立标准曲线，得到回归方程为 $y=56.96x+0.0021$ ， $R^2=0.9997$ 。

6.2 大孔吸附树脂的选择

绿原酸具有亲水性和极性，能溶解于部分大孔吸附树脂（如：极性大孔树脂、弱极性大孔树脂）。D201 型号的大孔树脂虽然对绿原酸的吸附量大，但在树脂的筛选中还要考虑解吸率。NKA-大孔树脂为极性，根据结果分析考虑大孔树脂的吸附率与解吸率，选择 NKA-大孔树脂作为分离绿原酸的树脂。

6.3 溶液 pH 的选择

pH 值的变化对绿原酸的分离纯化有较大影响。绿原酸在

酸性条件下为分子状态，碱性条件下不稳定，易分解为离子状态。而绿原酸在分子状态下更易被吸附。实验比较证明 pH=4.00 时大孔树脂对绿原酸的吸附率最高，得率最高。

6.4 温度的选择

温度占有重要地位。大孔吸附树脂的孔状结构有着类似于热胀冷缩的原理，温度适当增加会使大孔树脂的孔状结构变大，吸附更多的绿原酸。实验温度为 45℃。

6.5 溶液浓度的选择

绿原酸溶液的浓度过低时，部分大孔树脂吸附饱和了，另一部分没有吸附绿原酸，因此大孔树脂使用率降低。实验证明当浓度为 0.0020mg/ml 时，使绿原酸的得率达到最高。

6.6 乙醇浓度的选择

通过实验确定乙醇的最佳浓度为 75%。当乙醇体积分数较低时，它们之间的氢键无法被破坏。当乙醇浓度大于 75% 时，乙醇与绿原酸的极性也相差更大，因此绿原酸不易溶于乙醇，所以绿原酸的解吸量变低。

6.7 正交试验最佳工艺条件的确定

我们可以确定出最佳工艺条件的组合为温度 45℃、溶液浓度为 0.0020mg/ml、pH 值 4.00、乙醇浓度 75%。正交试验结果分析后得出影响绿原酸分离纯化因素的主次关系为：溶液浓度 (mg/ml) > 温度 (℃) > 溶液 pH 值 > 乙醇浓度。

6.8 验证实验

在由正交试验筛选出的最佳工艺条件下，从金银花中提取出的绿原酸溶液进行纯化。通过计算，使用 NKA-大孔吸附树脂分离纯化金银花提取物中绿原酸，绿原酸的得率可达 94.13%，绿原酸的纯度为 39.03%。

研究金银花其提取物中绿原酸的分离纯化工艺及其最佳工艺条件，旨在提高绿原酸的纯度。但是实验室条件的限制以及实验操作不够规范和大孔树脂对绿原酸的选择性不够好，导致本次实验的绿原酸产品的得率虽高，纯度却较低。在今后的实验中，应更加注重选择对绿原酸具有较好选择吸附性的大孔树脂，防止过多杂质被吸附进去，避免影响绿原酸的纯度。

参考文献：

- [1] 张来新,杨琼,马跃.从金银花中提取绿原酸的工艺研究[J].贵州化工,2009,34(03):19-22.
- [2] 符士良,钟杰平,李海霞,谭志雄.从金银花中提取绿原酸的工艺研究[J].广东海洋大学学报,2007(04):70-73
- [3] 黄霞,樊骏,樊军龙,牛建锋.金银花的经济价值与栽培技术[J].陕西林业科技,2004(04):103-105.
- [4] 高建宏.金银花的经济价值及繁殖栽培技术[J].山西农业科学,2010,38(06):87-88.
- [5] 高丽霞,吴焕忠,刘水,陈阳春.藤本植物在边坡水土保持工程中的应用[J].中南林业调查规划,2006(01):23-24+38.
- [6] 唐密林.金银花经济价值及繁殖栽培技术[J].农村实用技术,2011(03):36.
- [7] 兰雪萍,郭思杙,李焰芳,吕远平.金银花中绿原酸的大孔树脂纯化工艺[J].食品科技,2015,40(08):223-228.