

# 烟草绿原酸分离纯化及其抑菌性研究

王海燕<sup>1,2</sup>, 张仕华<sup>3</sup>, 赵谋明<sup>1</sup>, 李同泉<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640) (2. 中国烟草总公司技术培训中心, 河南 郑州 450008)  
(3. 中国烟草总公司烟草研究院, 河南 郑州 450001)

**摘要:** 研究了烟草绿原酸提取纯化工艺条件及其抑菌效果。采用超声波提取、大孔吸附树脂纯化烟草绿原酸, 抑菌圈直径法测量绿原酸抑菌水平。结果表明: 最佳提取条件为乙醇浓度60.5%, 超声波处理时间30.4 min, 温度51.4 °C, 绿原酸得率1.6%; NKA-9型大孔吸附树脂对绿原酸有较好的吸附及解吸效果, 均达70%以上; 烟草绿原酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均具有一定的抑菌效果。

**关键词:** 烟草; 绿原酸; 大孔吸附树脂; 抑菌

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)03-0233-05

## Study on Extraction, Purification and Antimicrobial Activity of Tobacco Chlorogenic Acid

WANG Hai-yan<sup>1,2</sup>, ZHANG Shi-hua<sup>3</sup>, ZHAO Mou-ming<sup>1</sup>, LI Tong-quan<sup>2</sup>

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. China Tobacco Training Center for Professional Technicians, Zhengzhou 450008, China)

(3. Zhengzhou tobacco research institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** The extraction, purification and antimicrobial activity of chlorogenic acid in tobacco leaves were researched. The optimal ultrasonic-assisted extraction conditions were as follows: 60.5% ethanol, 51.4 °C and 30.4 min. Under these conditions, the yield of crude tobacco chlorogenic acid was 1.6%. The crude chlorogenic acid was purified by NKA-9 resin. It was also found that the tobacco chlorogenic acid had inhibition activities on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

**Key words:** tobacco; chlorogenic acid; macroporous resin; antimicrobial activity

绿原酸是一种缩酚酸, 属酚类化合物, 是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类化合物<sup>[1,2]</sup>。它广泛分布于植物界, 具有抗菌、抗病毒、利胆、增高白血球等多种药理作用, 是保健品、食品、药品、化妆品等工业的重要原料<sup>[3,4]</sup>。烟草中存在多种酚类化合物, 其中绿原酸是烟叶中含量最高的多酚化合物, 其含量可占烟草总酚量的70%~85%<sup>[5-7]</sup>。随着国际禁烟运动的开展, 如何更好地利用烟草资源, 提高它的经济价值, 是烟草研究开发所面临的趋势。为了探索绿原酸的新型植物资源和生物活性, 同时为废次烟叶的综合利用开辟有效途径, 本文对烟草中绿原酸的提取纯化及抑菌活性等方面进行了研究, 为烟草多元化利用提供一定技术依据。

收稿日期: 2007-11-09

基金项目: 国家十一五科技支撑计划项目(2006BAD27B03)

作者简介: 王海燕, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术

通讯作者: 赵谋明, 教授, 博导

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 实验材料

烟叶: 烤烟NC89, 取自中国烟草总公司技术培训中心。干燥粉碎过60目筛。

#### 1.1.2 实验菌株

大肠埃希氏菌 (*Escherichia Coli*, G-), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, G+), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, G+)。购于广州微生物研究所。

#### 1.1.3 培养基

采用牛肉膏蛋白胨培养基进行细菌培养。培养基: 蛋白胨10.0 g, 牛肉浸膏5.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂20.0 g, pH 7.2, 121 °C灭菌20 min。

#### 1.1.4 实验试剂

绿原酸标准品 (Sigma公司)、大孔树脂 (南开

大学化工厂), 其它试剂均为分析纯试剂。

### 1.1.5 实验仪器

NP-B-40超声波清洗器(广州新动力公司), UV2100紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司), RE-52A旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器), ALPHA冷冻干燥机(德国CHRIST公司), WATERS 2690高效液相色谱仪(美国Waters公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 烟草绿原酸提取工艺

烟草样品粉碎过60目筛, 准确称取烟末样品10 g, 置于250 mL三角瓶中, 加入提取溶剂浸提, 超声波提取(250 W, 40 kHz), 提取液经大孔树脂纯化, 浓缩, 冷冻干燥, 测定绿原酸含量。

### 1.2.2 大孔吸附树脂吸附量、吸附率及解吸率计算

$$Q = \frac{(C_0 - C_1) \times V}{W}$$

$$A (\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

$$D (\%) = \frac{C_2 V_1}{(C_0 - C_1) V} \times 100\%$$

式中, Q表示树脂吸附量, mg绿原酸/g树脂;  $C_0$ 为绿原酸初始浓度, mg/mL;  $C_1$ 为滤液中绿原酸的浓度, mg/mL; V为滤液体积, mL; W为干树脂重量, g; A表示吸附率。  $C_2$ 为洗脱液绿原酸浓度, mg/mL;  $V_1$ 为洗脱液体积, mL; D表示解吸率。

### 1.2.3 绿原酸测定方法

本实验采用采用高效液相色谱-二极管阵列扫描(HPLC-PDA)法对烟叶绿原酸进行定性定量分析。HPLC-PDA分析条件为: 色谱柱: C18反相柱; 流动相: 0~10 min乙腈-0.2%冰醋酸(V/V=40:60), 10~20 min乙腈-0.2%冰醋酸(V/V=60:40), 20~40 min乙腈-0.2%冰醋酸(V/V=80:20); 流速0.5 mL/min; 进样量10  $\mu$ L; 绿原酸标准品定性定量。

### 1.2.4 绿原酸抑菌实验方法

采用滤纸片法<sup>[8]</sup>, 取直径6 mm的滤纸片, 放入烟叶绿原酸溶液中, 浓度为0.1 mg/mL, 浸泡4 h。取出置于真空干燥箱中灭菌干燥。取各种供试菌悬液各0.2 mL, 分别注入无菌培养皿内, 再倒入15 mL琼脂培养基, 混匀后冷却成含菌平板。然后取浸泡过烟叶绿原酸溶液的滤纸片, 贴在含菌平板上, 每皿贴3片, 每菌作3次重复, 细菌置培养箱中37  $^{\circ}$ C培养24 h, 测量滤纸片抑菌圈直径大小。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取方法的确定

分别以水提取、乙醇提取、超声波水提取、超声波乙醇提取, 四种方法提取烟叶绿原酸, 在相同条件下: 提取温度50  $^{\circ}$ C, 提取时间1 h, 根据绿原酸得率确定烟叶绿原酸提取方法。表1为四种方法提取绿原酸得率。

表1 不同提取方法下绿原酸得率

Table 1 The yield of chlorogenic acid with different extraction agents

提取方法	绿原酸得率/%
水提	1.21
乙醇提	1.42
超声波水提	1.33
超声波乙醇提	1.51

由表1可以看出, 超声波乙醇提取法具有较高的绿原酸得率。因此本实验选用超声波乙醇提取法提取烟叶绿原酸。

### 2.2 超声波乙醇提取单因素实验

#### 2.2.1 乙醇浓度对提取效果的影响

称取10.0 g烟末7份, 分别加入30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%(V/V)的乙醇溶液100 mL, 50  $^{\circ}$ C下超声波提取30 min, 测定绿原酸含量。

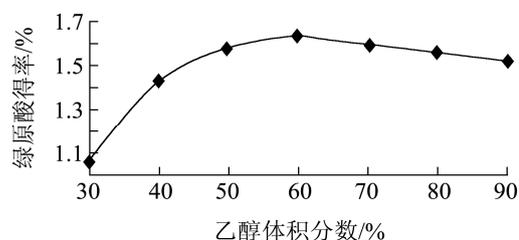


图1 乙醇浓度对烟叶绿原酸提取得率的影响

Fig.1 Effects of alcohol concentration on the yield of chlorogenic acid

从表1可以看出乙醇提取浓度对绿原酸提取率有重要影响。在一定范围内, 浓度越高, 提取物中绿原酸的含量越高, 但当浓度大于60%以后, 提取率反而有所下降, 所以选择浓度50%~70%作为进一步优化范围。

#### 2.2.2 提取温度对提取效果的影响

称取10.0 g烟末6份, 各加入60%(V/V)的乙醇溶液100 mL, 分别在30  $^{\circ}$ C、40  $^{\circ}$ C、50  $^{\circ}$ C、60  $^{\circ}$ C、70  $^{\circ}$ C、80  $^{\circ}$ C下超声波提取30 min, 测定绿原酸含量。

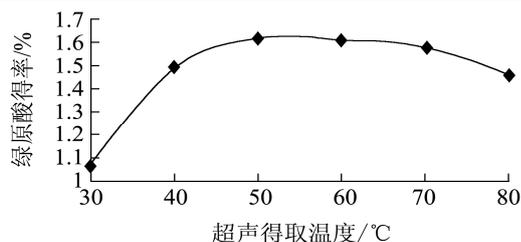


图2 提取温度对绿原酸得率的影响

Fig.2 Effects of extraction temperature on the yield of chlorogenic acid

提取温度是影响提取效率的重要因素之一。随着温度升高,分子运动速度加快,渗透、溶解性增强,但是过高温度会引起化合物结构破坏。由图2看出,在30℃~50℃,随着温度的增加,绿原酸得率显著提高,但高于50℃后,绿原酸得率呈下降趋势,这是因为较高温度使绿原酸结构被氧化破坏,导致其得率下降。根据图2结果,选择40~60℃作为优化范围。

2.2.3 提取时间对提取效果的影响

称取10.0g烟末6份,各加入60%(V/V)的乙醇溶液100mL,在50℃下分别超声波提取10、20、30、40、50、60min,测定绿原酸含量。

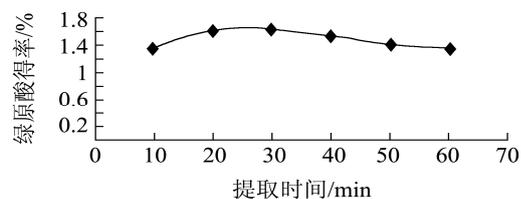


图3 提取时间对绿原酸得率的影响

Fig.3 Effects of extraction temperature on the yield of chlorogenic acid

从图3可以看出,在30min以内,随着提取时间的延长,绿原酸得率不断增加,随着时间进一步延长,绿原酸的得率随着提取时间的增加反而减少,原因可能是绿原酸有酯键,性质不稳定,在长时间的加热情况下易分解。因此选择提取时间的优化范围是20~40min。

2.3 采用响应面分析法优化烟叶绿原酸提取工艺

根据单因素实验结果,选取乙醇浓度50%~70%(V/V)、提取温度40~60℃、提取时间20~40min作为对烟叶绿原酸提取优化范围,在单因素试验的基础上采用三因素三水平的响应面分析方法对提取工艺进行优化,表2、表3分别为响应面分析结果及回归分析。

表2 响应面分析方案及实验结果

Table 2 Program and experimental results of RSA

实验号	A 乙醇浓度/%	B 提取温度/°C	C 提取时间/min	绿原酸得率/%
1	70	60	20	1.48
2	70	40	40	1.42
3	50	60	40	1.37
4	50	40	20	1.26
5	50	50	30	1.54
6	70	50	30	1.55
7	60	40	30	1.46
8	60	60	30	1.52
9	60	50	20	1.50
10	60	50	40	1.53
11	60	50	30	1.61
12	60	50	30	1.60
13	60	50	30	1.59
14	60	50	30	1.62
15	60	50	30	1.60

表3 回归分析结果

Table 3 results of regression analysis

来源	平方和	自由度	均方	F值	P-值 (Prob>F)	显著性
模型	0.14	9	0.016	66.98	0.0001	显著
A	5.000E-005	1	5.000E-005	0.21	0.6624	
B	1.800E-003	1	1.800E-003	7.74	0.0388	
C	4.500E-004	1	4.500E-004	1.93	0.2230	
AB	8.333E-006	1	8.333E-006	0.036	0.8573	
AC	2.083E-004	1	2.083E-004	0.90	0.3874	
BC	5.208E-003	1	5.208E-003	22.39	0.0052	
A <sup>2</sup>	5.227E-003	1	5.227E-003	22.47	0.0051	
B <sup>2</sup>	0.026	1	0.026	111.76	0.0001	
C <sup>2</sup>	0.015	1	0.015	62.74	0.0005	
残差	1.163E-003	5	2.326E-004			
失拟项	6.432E-004	1	6.432E-004	4.95	0.0902	不显著
纯误差	5.200E-004	4	1.300E-004			

经模型回归分析可知,回归模型能够很好的表达各因素与响应值之间的变化关系。由响应面软件预测模型得出烟叶绿原酸最优提取条件为:乙醇浓度60.5%,提取温度51.4℃,提取时间30.4min,模型预

测值为：绿原酸得率1.6%。根据最优条件对实验进行验证，结果表明实验值与预测值相符，模型是适用的。

### 2.4 大孔吸附树脂对烟草绿原酸的吸附分离研究结果

大孔树脂上柱前预处理：树脂→乙醇浸泡24 h→上柱，去离子水洗涤→质量分数5% HCl处理→水洗至中性→质量分数5% NaOH处理→水洗至中性→体积分数95%乙醇洗涤→水洗至中性。

将粗绿原酸浓缩液稀释至绿原酸含量为1 mg/mL的溶液。称取经过预处理的3种吸附树脂各2 g置于三角瓶中，各加40 mL粗绿原酸溶液，振摇24 h后过滤，测定滤液中的绿原酸含量。再各用100 mL 50%乙醇洗涤各树脂，洗脱吸附的绿原酸，分别测定洗脱液中绿原酸含量，计算各树脂吸附率、解吸率，结果见表3。

表4 几种大孔树脂对烟叶绿原酸的吸附及解析效果

Table 4 The Efficiency of macro-adsorbent resin for tobacco chlorogenic acid

树脂型号	吸附率/%	解吸率/%
NKA-9	71.93	74.79
AB-8	63.32	31.87
D101	43.87	53.21

由表4看出，NKA-9树脂在烟草绿原酸粗提液分离中既有较高的吸附率又有较高的解吸率，对烟草绿原酸有较好的富集效果，因此选择NKA-9型树脂对烟叶绿原酸进行纯化处理。

### 2.5 绿原酸性实验结果

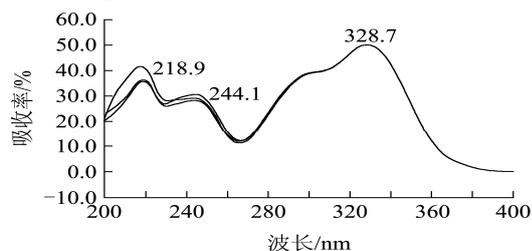


图4 烟草样品中绿原酸 PDA 紫外吸收光谱图

Fig.4 Ultraviolet absorption spectrogram of PDA of chlorogenic acid of tobacco samples

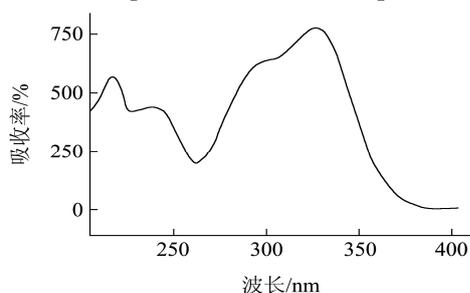


图5 标准绿原酸 PDA 紫外吸收光谱图

Fig.5 Ultraviolet absorption spectrogram of PDA of

### chlorogenic acid of standard samples

绿原酸标准样品与烟叶样品中所含绿原酸的全波长吸收情况对照比较见图4、图5。由图4、图5可看出绿原酸样品及绿原酸标准品的紫外二极管阵列扫描图谱一致，由于它们在HPLC检测中保留时间也一致，因此将样品定性为绿原酸。

### 2.6 绿原酸对实验菌株生长的影响

以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌为实验菌株，测定抑菌圈直径大小，研究纯化的绿原酸样品对实验菌株生长的影响。烟草绿原酸对生长的影响如表4所示。

表5 烟草绿原酸抑菌实验结果

Table 5 The antimicrobial activity of tobacco chlorogenic acid

菌种	抑菌圈直径/mm
大肠杆菌	9.0±0.7
枯草芽孢杆菌	10.9±0.6
金黄色葡萄球菌	13.5±0.5

注：抑菌圈直径包括滤纸片直径6 mm。

由表5可看出烟草绿原酸对三种常见的至病菌大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定的抑菌效果。

## 3 结论

由于水提法制备绿原酸需要较高的温度，易导致绿原酸氧化分解，本研究采用超声波提取法，对烟叶绿原酸进行提取，并优化出提取烟叶绿原酸最佳工艺条件为：乙醇浓度60.5%，时间30.4 min，温度51.4 °C，绿原酸得率为1.6%。

利用大孔吸附树脂对提取液中的绿原酸进行分离，NKA-9型大孔吸附树脂对绿原酸具有较高的吸附及解吸效果，具备、均达70%以上，是一种理想的绿原酸吸附剂。

对烟叶绿原酸的抑菌性进行研究，结果表明烟叶绿原酸对常见至病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有一定抑菌效果。

本研究为开发烟叶多元化应用提供了一定理论依据。

## 参考文献

[1] Kazumi Yagasaki, Yutaka Miura, Rieko Okauchi. Inhibitory effects of chlorogenic acid and its related compounds on the invasion of hepatoma cells in culture technology, 2003, 33 (2) : 229

(下转第213页)