

# 大孔树脂纯化灰毡毛忍冬中绿原酸的研究

陶湘辉<sup>1,2</sup>, 周跃斌<sup>1,2</sup>, 谭文<sup>1,2</sup>

(1. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128)(2. 湖南省天然产物研究中心, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 研究了大孔树脂纯化灰毡毛忍冬绿原酸的性能。结果表明大孔树脂 NKA-9 可用于灰毡毛忍冬中绿原酸粗提物的纯化, 其最佳工艺为: 洗脱液为 45% 乙醇, 样液浓度为 20%, 样液 pH 值为 5, 上柱流速为 0.5 BV/h, 洗脱流速为 1 BV/h, 洗脱液用量为 4 BV。

**关键词:** 灰毡毛忍冬; 绿原酸; NKA-9 树脂

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0521-04

## Purification of Chlorogenic Acid from *Lonicera macranthodes* Hand-Mazz by NKA-9 Resin

TAO Xiang-hui<sup>1,2</sup>, ZHOU Yue-bin<sup>1,2</sup>, TAN Wen<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Tea Science, Ministry of Education, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

(2. Hunan Research Center of Natural Product, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The purification of chlorogenic acid from *Lonicera macranthodes* Hand-Mazz by macro porous resin was studied. HPLC analysis showed that the purity and yield of achieved chlorogenic acid were 75.68% and 82.38%, respectively. The NKA-9 resin showed good properties of sorption and desorption.

**Key words:** *Lonicera macranthodes* Hand-Mazz; Chlorogenic acid; NKA-9 resin

灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthodes* Hand-Mazz), 俗称大花忍冬, 是忍冬科忍冬属木质藤本植物, 为湖南商品金银花的主流品种, 具有清热解毒、凉散风热之功效, 常用于治疗痈肿疮疖、喉痹、丹毒、热血毒痢、风热感冒、温病发热等疾病, 对大肠杆菌、伤寒杆菌、结核杆菌等也有很强的抑制作用。绿原酸是灰毡毛忍冬中的主要有效成分之一。据报道<sup>[1]</sup>, 灰毡毛忍冬中绿原酸的含量约为 4.33%~6.97%。目前用于绿原酸纯化的方法有萃取法<sup>[2]</sup>、沉淀法和柱层析法等, 存在成本高, 操作复杂, 有毒害和污染环境等问题。为此, 本试验尝试采用大孔树脂 NKA-9 对绿原酸类物质进行分离, 寻求更为低廉、高效、环保的纯化方法, 为灰毡毛忍冬在医药、食品工业中的应用提供新的理论依据, 以促进灰毡毛忍冬药用植物资源的有效开发利用。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

收稿日期: 2008-04-10

基金项目: 湖南省科技厅基金项目(B-138)。

作者简介: 陶湘辉, 女(1980-), 汉族, 湖南安化人, 硕士研究生

通讯作者: 周跃斌

灰毡毛忍冬(采自湖南隆回小沙江)。

绿原酸标准品(购自中国药品生物制品检定所)。

乙腈与甲醇为色谱纯, 冰醋酸, 氢氧化钠, 柠檬酸, 浓盐酸等试剂除提取用乙醇外均为分析纯。

### 1.2 仪器

KQ-3200 型超声波清洗器(上海昆山市超声波仪器有限公司), R-200 型旋转蒸发器(瑞士 BÜCHI 公司), AIOPHRI-2LD 冷冻干燥机(德国 CHRIST 公司), SHZ-95 型循环水式多用真空泵(河南予华仪器厂), 常压层析柱(上海亚荣生化仪器厂), BS-30 自动部分收集器(上海青浦户西仪器厂), LC-10AT<sub>VP</sub> 高效液相色谱仪(日本岛津公司) 色谱条件为: 色谱柱: 大连化物所 Kromasil C18 (200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.1%冰醋酸溶液(13:87), 检测波长: 327 nm, 进样量: 10 μL, 流速: 1 mL/min, 柱温: 35 °C。

## 2 方法

### 2.1 标准品溶液的制备及测定

精密称取 5.0 mg 绿原酸标准品, 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 用 70% 的乙醇溶解, 超声, 冷却, 再用 70% 的酒精定容后用高效液相色谱仪作图(稍后处理

请用锡箔纸将容量瓶包好,低温避光储存,备用), 色谱图见图 1。

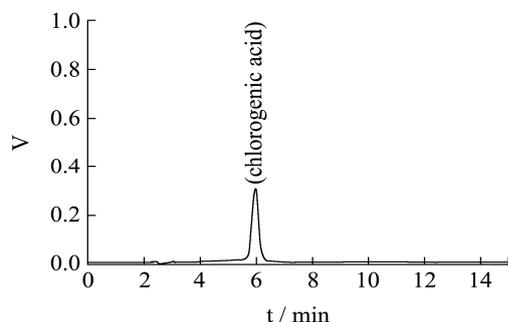


图 1 标准品的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatography of chlorogenic acid reference substance

### 2.2 供试品溶液的制备

称取 10 g 干燥灰毡毛忍冬磨碎样,置于圆底烧瓶中,加入 120 mL 70%乙醇溶液,在 70 °C 水浴下,冷凝回流 60 min,冷却,过滤;再将滤渣重复提取一次,合并两次滤液,浓缩,冷冻,干燥。经 24 h 后,得到粗提物,低温储藏,备用。

精密称取 15.0 mg 供试品,置于 25 mL 容量瓶中,用 70%的乙醇溶解,超声,冷却,用 70%的酒精定容。用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,备用。

## 3 结果与分析

### 3.1 树脂类型的选择

精密量取 NKA-9, S-8, AB-8, HP-20, NKA, D101 等 6 种大孔树脂 20 mL 于锥形瓶中,各加入 30 mL 粗提物水溶液(浓度为 100 mg/mL),封口,置于摇床中,150 r/min,震荡 12 h 后从上清液中取样,检测绿原酸含量并计算吸附量。

分别将上述充分吸附了原液的树脂,过滤除去水液,再将其置于锥形瓶中,加入 80%的乙醇溶液 60 mL,封口后置于摇床,转速为 150 r/min,12 h 后检测绿原酸的含量并计算其解析率。

从表 1 知 NKA-9 比较适于试验。

表 1 灰毡毛忍冬中绿原酸的吸附与解吸附特性

Table 1 Adsorption and desorption of chlorogenic acid of *L. macranthodes* Hand-Mazz) onto NKA-9 resin

树脂类型	吸附量/(mg/mL)	解析率/%	解析量/(mg/mL)
S-8	35.32	51.2	18.09
NKA-9	32.57	85.3	27.78
AB-8	24.39	90.6	21.95
HP-20	21.2	81.2	17.22

D101	18.37	76.8	14.10
NKA	21.38	82.7	17.69

### 3.2 洗脱液浓度的确定

采用柱体积为 200 mL (2.4×50) 的层析柱,加入粗提物 1.5 g 并用少量水溶解,缓慢加入层析柱顶端,静置 0.5~1 h 后,分别用水、10%、20%、30%、40%、50%等梯度乙醇进行洗脱,洗脱体积为 3 BV,流速为 1 BV/h。洗脱液用高效液相色谱检测。

从实验知水洗部分不含绿原酸即水不能将绿原酸洗脱下来,10%、20%、30%乙醇溶液各自的洗脱部分中也不含绿原酸,上述洗脱液都不能洗下绿原酸。40%乙醇洗脱溶液中,有很小峰出现,说明其洗脱能力不够,应该加大洗脱梯度。50%的乙醇洗脱液中则出现其他杂峰,说明 50%乙醇溶液洗脱能力太大。选用 45%乙醇溶液(图 2),有明显的吸收峰,且洗脱 3 BV 后,即使加大乙醇浓度也不能出现吸收峰,说明被吸附的绿原酸几乎洗脱完全。可以确定用 45%的乙醇溶液进行洗脱效果最好。

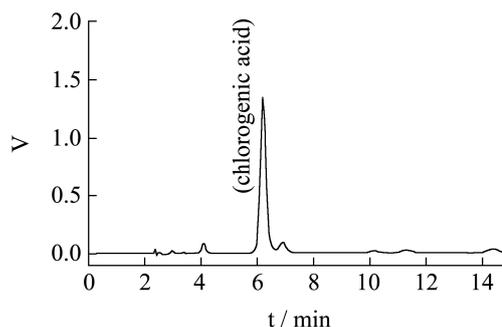


图 2 45%乙醇溶液的洗脱部分

Fig.2 HPLC chromatography of the purified chlorogenic acid eluted by 45% ethanol

### 3.3 吸附条件对绿原酸吸附量的影响

#### 3.3.1 上样浓度对树脂吸附量的影响

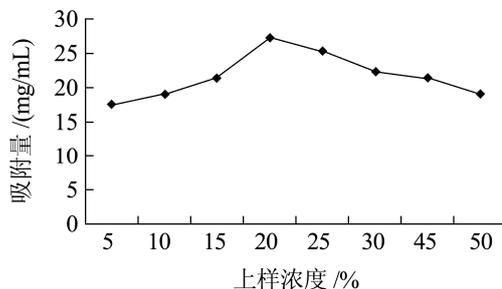


图 3 上样浓度对吸附量的影响

Fig.3 Effect of chlorogenic acid concentration on adsorption capacity of the resin

上样浓度对吸附量的影响如图 3。在粗提物浓度较低时,树脂的吸附能力随着浓度的提高而增加,如上样浓度为 5%时,树脂的吸附能力为 17.63 mg/mL;

上样浓度为20%时,其吸附能力为27.18 mg/mL。在溶液浓度较低时,其渗透压力较小,使得树脂吸附能力低;但随着上样浓度继续增加,各杂质与绿原酸竞争树脂内部的吸附位点能力也增强,使得绿原酸在树脂内部扩散能力降低,而达不到较好的效果。所以,上样浓度应该控制在20%左右。

### 3.3.2 pH值对吸附量的影响

pH值对吸附量的影响如图4,结果表明:绿原酸作为多羟基酚酸,在酸性条件下易被吸附。因为在弱酸性环境时,绿原酸以分子形式存在,疏水性增强,树脂对其吸附增强;在强酸和碱性条件下,以内酯形式存在的绿原酸易水解;碱性条件下,以离子形式存在的绿原酸不易吸附,因此,料液的pH值宜为5左右。

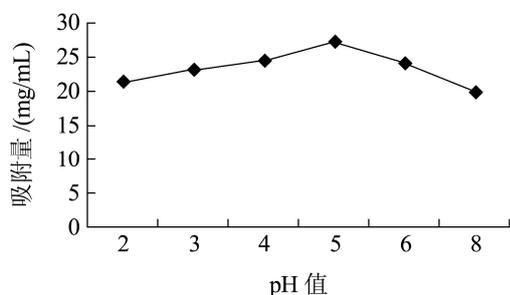


图4 pH值对吸附量的影响

Fig.4 Effect of pH value on adsorption capacity of the resin

### 3.3.3 上柱流速对吸附量的影响

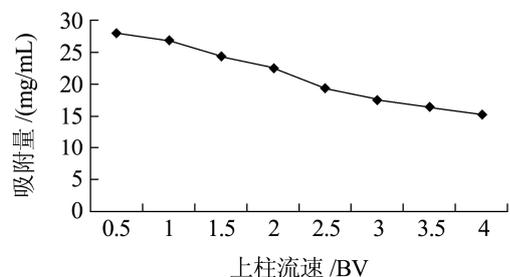


图5 上柱流速对吸附量的影响

Fig.5 Effect of feed rate on adsorption capacity of the resin

上柱速率对吸附量的影响结果见图5,从结果可以看出,树脂的吸附量随着流速的增加而降低。当上柱流速为0.5 BV/h时,树脂的动态吸附量为27.86 mg/mL。当流速提高到3 BV/h时,其动态吸附量降至17.66 mg/mL。这是因为绿原酸物质扩散速度较慢,如果上柱流速过大,则一部分化合物还来不及被树脂充分吸附便流出树脂柱。虽然较低的流速对吸附有利,但流速过低,操作时间长,在实际生产中应综合考虑选择上柱速度,以1 BV/h左右的流速进行上柱为宜。

## 3.4 洗脱条件对洗脱效果的影响

### 3.4.1 洗脱流速对洗脱效果的影响

流速对洗脱效果的影响如图6,表明流速对洗脱效果的影响明显,随着流速的增加其解析能力逐渐降低,两者成反比例关系,这可能是流速对洗脱液与吸附在树脂上各类物质间的交换速率所致,即由于流速过快,一部分被吸附的物质来不及与洗脱液进行吸附位点的交换,而不能完全洗脱下来。为保证生产成本和效率,应该选择洗脱流速为1 BV/h适宜。

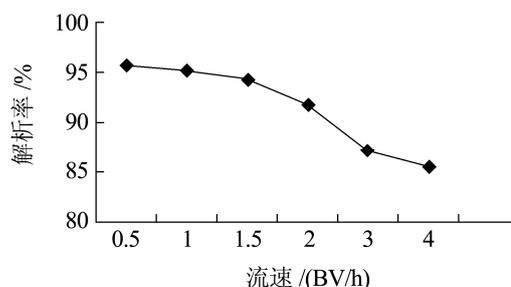


图6 洗脱流速对洗脱效果的影响

Fig.6 Effect of elution rate on de-adsorption efficiency

### 3.4.2 洗脱液用量对洗脱效果的影响

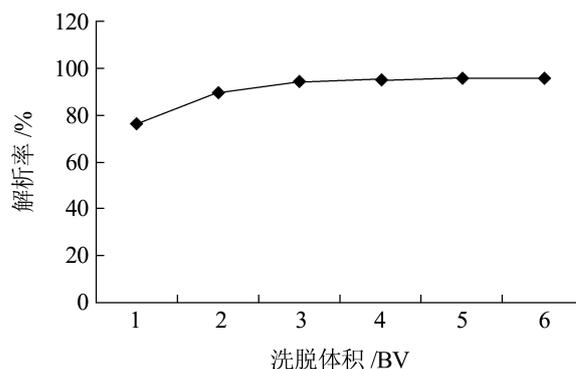


图7 洗脱液用量对洗脱效果的影响

Fig.7 Effect of elution volume on de-adsorption efficiency

洗脱剂的用量对洗脱效果的影响如图7所示,结果表明:洗脱液用量的增加对绿原酸的洗脱能力呈正相关,用量越多,其解析率越大。当洗脱液用量为4 BV时,其解析率达到95.4%,但继续增加用量时,其解析率增加并不明显,从节约成本考虑,应以4 BV的洗脱液用量进行洗脱。

## 4 结论与讨论

4.1 大孔树脂 NKA-9 可用于灰毡毛忍冬中绿原酸粗提物的纯化,其最佳工艺为:洗脱液为45%乙醇,样液浓度为20%,样液pH值为5,上柱流速为0.5 BV/h,洗脱流速为1 BV/h,洗脱液用量为4 BV。

4.2 大孔树脂生产过程中一般均采用工业级原料,产品没有经过进一步净化处理,因此,在树脂使用之前,必须进行预处理,以除去制备和贮存中引入的杂质。

(下转第531页)

