

高速逆流色谱法分离纯化绿原酸研究

陈德经¹, 韩 豪¹, 董博妮²

(1. 陕西理工学院 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000;

2. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000)

摘 要: 利用高速逆流色谱技术分离纯化金银花中的绿原酸。选择正丁醇-冰乙酸-水(4:1:5, V/V)系统来分离, 分离结果经高效液相(HPLC)检测纯度达到 98.1%, 绿原酸的得率为 95%。

关键词: 绿原酸; 高速逆流色谱; 分离

Study on Separation and Purification of Chlorogenic Acid with High-speed Countercurrent Chromatography

CHEN De-jing¹, HAN Hao¹, DONG Bo-ni²

(1. Shaanxi University of Technology, Shanxi Provincial Bio-resource Key Laboratory, Hanzhong 723000, China;

2. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Abstract: High-speed countercurrent chromatography was used to separate chlorogenic acid from 70% ethanol extract of dry *Lonicera japonica* Thunb. with three different solvent systems. It was found experimentally that the optimal solvent system is composed of butanol, acetic acid and water, with the ratio of 4:1:5 (V/V). The purity of obtained chlorogenic acid is determined as 98.1% by high performance liquid chromatograph (HPLC), and its yield is 95%.

Key words: chlorogenic acid; high-speed countercurrent chromatography (HSCCC); separation

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)11-0298-02

绿原酸(chlorogenic acid)为多酚类化合物, 具有抗菌、抗病毒、增高白血球、保肝利胆、抗肿瘤、降血压、降血脂、清除自由基和兴奋中枢神经系统等作用^[1]。绿原酸广泛应用于医药、化工和食品等行业^[2]。但绿原酸在高温、有氧及有光的条件下不稳定, 分离高纯度的绿原酸非常困难^[3]。高速逆流色谱(HSCCC)技术是利用溶质在两种互不相溶的溶剂系统中分配系数不同, 从而实现分离的色谱技术。高速逆流色谱法不需要对样品进行复杂处理, 进样量大到数克, 无固体载体, 不会吸附、污染、损失样品, 在线检测, 分离纯度在 90% 以上^[4]。高速逆流色谱在生物碱、黄酮、酚类、醌类、苷类、脂肪酸、多肽等化合物分离中得到广泛应用^[5-6]。利用该技术分离绿原酸时, 避免了绿原酸纯化时高温氧化分解的问题, 能够得到纯度较高的产品。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金银花, 采于陕西汉中阳春药业公司金银花种植基地。

绿原酸标准品 中国生物制品研究所制; 乙酸乙酯、石油醚、甲醇、正丁醇、氯仿与乙醇(分析纯) 天津市化学试剂六厂, 甲醇、乙腈(色谱纯) 天津市登峰

化学试剂厂; 磷酸、冰乙酸 西安化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

TBE-300A型高速逆流色谱仪 上海同田生化技术有限公司; 1100 型高效液相色谱仪 惠普公司; SK-120E 超声波提取仪 宁波科生仪器有限公司; FA2004 型电子天平 上海精密科学仪器有限公司。

1.3 绿原酸的提取

金银花干样粉碎后精确称取 50g, 用 70% 乙醇溶液, 料液比 1:10, pH4, 在 70℃ 水浴中提取 2 次, 每次提取 1.5h, 合并滤液, 在 60℃ 下减压浓缩至 100ml 左右, 依次用石油醚、乙酸乙酯分别萃取三次, 在 60℃ 下减压浓缩乙酸乙酯层, 置冰箱保存备用。

1.4 高速逆流色谱

1.4.1 溶液系统选择

应用高速逆流色谱仪分离样品时, 最关键的问题是溶剂系统的选择。选择溶剂系统的原则: (1) 形成稳定的两相溶剂体系, 分层时间小于 30s, 保留率大于 50%; (2) 不造成样品的分解与变性; (3) 样品在系统中有合适的分配系数约为 1^[7]。选用氯仿-甲醇-水、正丁醇-冰乙酸-水、乙酸乙酯-甲醇-水三个系统作为绿原酸分离的

收稿日期: 2008-07-11

基金项目: 陕西省重点实验室项目(O5JS12); 陕西理工学院科研基金项目(SLG0724)

作者简介: 陈德经(1961-), 男, 副教授, 研究方向为食品生物技术。E-mail: Cdjslg@126.com

溶剂系统。

1.4.2 固定相保留率和分配系数的测定

取金银花的粗提物于 50ml 容量瓶中, 用预先达到分配平衡的两相溶剂系统的下相将其溶解, 用 HPLC 进行检测, 峰面积为 A_1 。然后取等体积的上相加入此溶液, 剧烈振荡使其充分混合, 待达到分离平衡后, 再取下相用 HPLC 检测, 峰面积为 A_2 。分配系数 K 则按下式计算: $K=(A_1-A_2)/A_2$ [8]。

以 10ml/min 的流速将上相(固定相)泵入管路, 待固定相充满整个管路后, 启动主机, 转速调至 800r/min, 然后以 2.0ml/min 的流速泵入流动相。当流动相从出口处流出, 管路内固定相和流动相达到动力学平衡状态, 此时测量被流动相推出的固定相的体积 V , 按下式计算固定相的保留率 ρ 。

$$\rho(\%) = \frac{V_{\text{总}} - V_{\text{出}}}{V_{\text{总}} - V_{\text{环}}} \times 100$$

式中, $V_{\text{总}}$ 为管路总体积(ml), $V_{\text{出}}$ 为流动相推出的固定相体积(ml), $V_{\text{环}}$ 为进样环的体积。

1.4.3 高速逆流色谱分离

将 100mg 含量为 45% 绿原酸制品溶解下相后, 在固定相和流动相达到平衡状态后, 由进样阀将样品溶液引入管路, 转速 800r/min, 用流动相以 2ml/min 的流速洗脱, 分离温度控制在 25℃, 管路中流出物用紫外检测器检测, 将各峰对应的收集液分别浓缩, 待测。

1.5 高效液相色谱仪检测

色谱条件: 色谱柱 Hypersil ODS(4.6 × 100mm, 5μm); 检测波长: 327nm; 流动相: 0.1% 磷酸-甲醇(80:20); 流速: 1.0ml/min; 柱温: 室温。

2 结果与分析

2.1 溶剂系统的选择结果

在高速逆流色谱上对三种溶剂系统分离结果比较见表 1。

表 1 三种溶剂系统的参数比较
Table 1 Comparison among separation parameters of three solvent systems

系统组成	比例	上下相体 积比	分层时间 (s)	分配系数	保留率(%)
氯仿-甲醇-水	4:3:2	17:19	29	0.8	53.3
乙酸乙酯-甲醇-水	5:2:6	10:17	30	0.5	29
正丁醇-冰乙酸-水	4:1:5	93:87	28	0.9	42

从表 1 中可以看出, 乙酸乙酯-甲醇-水系统保留率最低, 分层时间最长; 正丁醇:冰乙酸-水系统的分层时间最短, 分配系数最大, 保留率合格; 氯仿-甲醇-水, 氯仿-甲醇-水系统的保留率最高。从体积比、分层时间、分配系数和保留率综合考虑乙酸乙酯-甲醇-水系统较为理想。

2.2 高速逆流分离结果

在高速逆流色谱上用正丁醇-冰乙酸-水(4:1:5, V/V)系统分离绿原酸的色谱图见图 1。

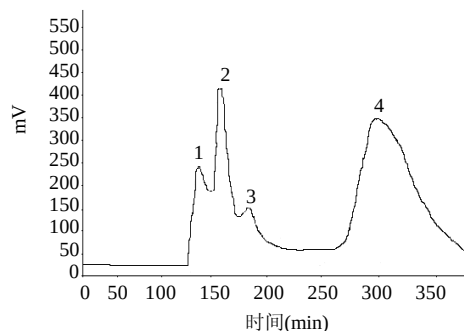


图 1 绿原酸高速逆流分离图

Fig.1 HSCCC profile for chlorogenic acid separation

图 1 表明, 在高速逆流色谱上用正丁醇-冰乙酸-水分离绿原酸, 分离出 4 个峰, 前三个峰面积较小, 第四个峰面积大。

分别收集分离峰 1、2、3、4, 经浓缩干燥后, 用高效液相检测各分离峰绿原酸的含量。各峰出峰时间、重量、含量见表 2。

表 2 正丁醇-冰乙酸-水系统分离结果
Table 2 Separation result of system composed of butanol, acetic acid and water (4:1:5, V/V)

峰号	1	2	3	4
出峰时间(min)	128	155	185	220
重量(mg)	20.7	24.6	12.8	40.7
纯度(%)	0.07	9.6	5.5	98.1

表 2 表明, 正丁醇-冰乙酸-水系统分离绿原酸, 在四个分离峰中, 峰 4 的含量达 98.1%, 绿原酸的得率 95%。

3 结论

用氯仿-甲醇-水、正丁醇-冰乙酸-水、乙酸乙酯-甲醇-水三个系统分离绿原酸, 正丁醇-冰乙酸-水系统的分离效果最好, 得到的绿原酸纯度 98.1%, 得率达 95%, 能够制备高纯度绿原酸。

参考文献:

- [1] 吴卫华, 康杭, 欧阳冬生, 等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 691-694.
- [2] 邓良, 袁华, 喻宗沅. 绿原酸的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2005 (7): 4-6.
- [3] 陈钢, 侯世祥, 胡平, 等. 金银花提取物中绿原酸的稳定性研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28 (3): 223-225.
- [4] 戴德舜, 王义明, 罗国安. 高速逆流色谱研究进展[J]. 分析化学, 2001, 29(8): 586-591.
- [5] 祝顺琴, 谈锋. 高速逆流色谱在天然产物分离中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(12): 788-791.
- [6] 陈爱华, 杨坚. 高速逆流色谱(HSCCC)在食品色素制备中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2005(1): 83-85.
- [7] 李艳, 肖凯军, 郭祀远, 等. 高效逆流色谱研究进展在天然产物有效成分分离方面的应用[J]. 现代食品与药品杂志, 2006, 16 (4): 78-80.
- [8] 颜继忠, 褚建军, 童胜强. 中药分离中高速逆流色谱溶剂体系的选择等. 中国现代应用药学, 2003, 20 (5): 374-376.