

高速逆流色谱法分离纯化金银花中的绿原酸

张霞^{1,2}, 崔海燕¹, 贾晓艳¹, 王玉玲¹, 张志琪^{1*}

(1. 陕西师范大学化学与材料科学学院, 西安 710062 2 宁夏医科大学药学院, 银川 750004)

摘要 目的: 采用高速逆流色谱法对金银花提取液中的绿原酸进行分离纯化。方法: 采用微波辅助提取金银花中的绿原酸, 提取液经过滤、浓缩, 所得浸膏作为高速逆流色谱分离的样品。采用 TBE-300A 型高速逆流色谱仪, 以正丁醇-乙酸-水 (4:1:5) 为溶剂体系进行分离纯化, 用下相作流动相, 上相作固定相, 流动相流速为 $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 仪器转速为 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。结果: 金银花粗提物经过一步纯化, 得到绿原酸的纯度为 98.2%。结论: 用微波辅助提取、高速逆流色谱法分离纯化金银花中的绿原酸, 方法简单、有效, 为绿原酸的分离纯化提供了一种新途径。

关键词: 高速逆流色谱; 金银花; 绿原酸

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)01-0106-04

Separation and purification of chlorogenic acid from *Flos Lonicerae* by high-speed counter current chromatography

ZHANG Xia^{1,2}, CUI Haiyan¹, JIA Xiaoyan¹, WANG Yuling¹, ZHANG Zhiqi^{1*}

(1. School of Chemistry and Material Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

2. College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract Objective To separate and purify of chlorogenic acid from the crude extract of *Flos Lonicerae* by high-speed counter-current chromatography (HSCCC). **Methods** Chlorogenic acid was extracted with the assistance of microwave power, then filtrated and concentrated under reduced pressure. The condensed sample was separated by HSCCC. Two-phase solvent system containing *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:5) was run on a preparative scale. The lower phase was used as the mobile phase and the upper was used as the stationary phase in the head to tail elution mode. The flow rate was $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The running rate was $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. **Results** Chlorogenic acid with 98.2% purity was obtained by once separation. **Conclusion** The HSCCC method is simple, high-performance and suitable for isolating and purifying chlorogenic acid from *Flos Lonicerae*.

Key words HSCCC; *Flos Lonicerae*; chlorogenic acid

高速逆流色谱 (high-speed counter-current chromatography, HSCCC) 是一种基于液-液多级逆流萃取建立的色谱体系, 以轻巧的聚四氟乙烯螺旋管作分离柱, 在行星式运动中连续地完成整个分配、传递、分离过程^[1], 无需固相载体, 避免了待分离样品与固相载体表面产生化学反应而导致的不可逆吸附; 可采用多种溶剂系统实现物质的对流分配; 能在一个流程中分离复杂样品中极性差异较大的各个组分, 制备纯品; 仪器及试剂成本明显低于高效液相色谱^[2-4]。

金银花 (*Flos Lonicerae*) 属忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或初开的花, 是传统的清热解毒常用中药^[5],

其主要活性成分为绿原酸。绿原酸具有抗菌、抗病毒、止血、抗氧化、消除自由基、抑制突变和抗肿瘤等多种生物活性效用^[6-8], 在医药、卫生、食品等领域具有很大的应用价值。因此, 从植物中提取分离绿原酸具有重要的意义。本研究采用高速逆流色谱法对金银花粗提物进行分离纯化, 得到了高纯度的绿原酸, 为金银花中绿原酸的分离制备提供了一种新途径。

1 仪器、样品与试剂

TBE-300A 高速逆流色谱仪 (中国上海同田生化技术有限公司); Waters 1525 型高效液相色谱仪, 配置 Waters 2996 DAD 检测器和 Empower 色谱工作

* 通讯作者 Tel: (029) 85303939 E-mail: zqzhang@snnu.edu.cn

站(美国 Waters 公司);液质联用仪(安捷伦与德国布鲁克公司);Millipore 纯水机(美国 Millipore 公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KD-23B-AN2 微波炉(广东美的);SHZ-D 循环水式真空泵(巩义市英峪华仪器厂);HR-120 电子天平(日本);FW 100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

金银花,购于西安市长延堡中药店;绿原酸对照品,购自中国药品生物制品检定所,质量分数 $\geq 99\%$;乙腈为色谱级,超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法

2.1 样品制备 微波法提取:将金银花粉碎,过 40 目筛。准确称取金银花粉末 10 g 于 1000 mL 圆底烧瓶中,加入 43% 甲醇 400 mL,在 400W 功率下,微波提取 8 min,将提取液浓缩得浸膏 5.16 g 即得微波提取样品。热回流法提取:准确称取上述金银花粉末 10 g 于 1000 mL 圆底烧瓶中,加入 43% 甲醇 400 mL,回流提取 1 h,将提取液浓缩至 80 mL,用石硫法^[9]初步纯化,即用质量分数为 20% 的石灰乳调节浓缩液的 pH 至 12 滤取沉淀物,加 2 倍量乙醇混悬,再用体积分数为 50% 的硫酸将 pH 调为 3 充分搅拌,过滤,滤液用质量分数为 40% 的氢氧化钠溶液中和至中性,再过滤,滤液浓缩干燥,得粗样 0.85 g 即得热回流提取样品。

2.2 供试品溶液制备 称取微波提取样品或热回流提取样品 0.3 g 溶于 10 mL 等体积的两相溶剂体系[正丁醇-乙酸-水(4:1:5)]上、下相中,制成 HSCCC 分离的供试品溶液。

2.3 溶剂体系的选择 在分液漏斗中按适当比例配制两相溶剂体系,充分振摇后静置,分层后备用。取样品 25 mg 放入试样管中,加入已平衡的两相溶剂体系(上、下相溶剂各 2 mL),充分振摇使样品溶解,然后静置,待分层后取上下相各 0.3 mL,分别加入 50% 甲醇 0.7 mL,混合,过 0.45 μm 微孔滤膜,进样 10 μL ,用 HPLC 法对上相和下相中的绿原酸进行分析,根据两相的绿原酸色谱峰面积计算分配系数,通过分配系数 K 选择合适的两相溶剂体系。

2.4 HSCCC 分离过程 配制两相溶剂体系,充分振摇后静置,使用前分开上下相,超声脱气后待用。取上相溶剂作为固定相,下相溶剂为流动相。将固定相以 $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速泵入高速逆流色谱仪的分离柱中,同时开启恒温循环装置使温度保持在 $25\text{ }^\circ\text{C}$,待固定相充满管道后,启动高速逆流色谱仪主机,调整转速为 $1000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,使螺旋管顺时针旋转,待达到

设定转速 ($1000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 时,以 $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速泵入流动相。当流动相从分离柱出口流出时,两相体系已经在高速逆流色谱的分离柱中达到流体动力学平衡,将供试品溶液打入样品环进样。分离柱出口与紫外检测器及色谱工作站连接,在 280 nm 处进行检测,根据色谱工作站谱图收集馏分。

2.5 HPLC 分析条件 采用 Agilent TC- C_{18} 色谱柱 ($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$);流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸(B),梯度洗脱(0~18 min 9% A \rightarrow 15% A; 18~30 min 15% A \rightarrow 24% A; 30~52 min 保持 24% A; 52~55 min 24% A \rightarrow 9% A),流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长 280 nm,柱温为室温,进样量 10 μL 。

3 结果与讨论

3.1 样品制备方法的选择 将微波辅助提取、热回流提取浓缩所得提取物各约 0.25 g 用 40% 甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,精密量取该溶液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加 40% 甲醇,摇匀定容至刻度。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样 10 μL ,用选定的高效液相色谱条件进行分析,色谱图见图 1。由图 1 可知,微波辅助提取对绿原酸物的提取效率优于热回流法提取,且提取物成分相对简单,用 HSCCC 法分离纯化提取物中绿原酸,无需初步纯化,简便省时。因此,样品制备方法确定为微波辅助提取。

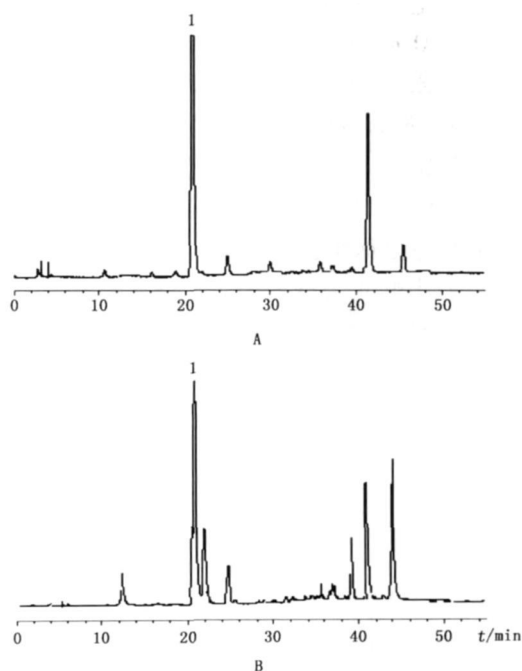


图 1 金银花提取物的高效液相色谱图

Fig 1 Chromatograms for the extract from Flos Lonicerae

A 微波辅助提取 (extracted with the assistance of microwave power)

B 热回流提取 (extracted under reflux)

1. 绿原酸 (chlorogenic acid)

3.2 溶剂体系的选择 在高速逆流色谱中, 溶剂体系的选择至关重要。溶剂体系在静止时要求能明显地分成两相, 样品在两相中要有合适的分配系数, 并且固定相能实现较高的保留。由于绿原酸结构中有酚羟基、羧基等, 属强极性化合物, 因此选择强极性溶剂体系, 由正丁醇和水组成基本溶剂, 考察了正丁醇-水、正丁醇-乙酸-水、正丁醇-乙醇-水 3 个不同极性的溶剂体系, 用高效液相色谱法测定了绿原酸在各溶剂体系中的分配系数, 结果列于表 1。在高速逆流色谱仪上要得到满意的分离效果, 分配系数应调整在 0.5~2.0 之间。根据表 1 的试验结果, 选择正丁醇-乙酸-水 (4:1:5) 作为分离纯化绿原酸的溶剂体系。以上相溶剂为固定相, 下相溶剂为流动相, 获得了很好的分离效果。

表 1 绿原酸在不同溶剂体系中的分配系数 K 值

Tab 1 The K values (partition coefficient) for chlorogenic acid in different solvent systems

溶剂体系 (solvent system)	K
正丁醇 (<i>n</i> -butanol)-水 (water) (1:1)	0.08
正丁醇 (<i>n</i> -butanol)-乙酸 (acetic acid)-水 (water) (4:1:5)	1.96
正丁醇 (<i>n</i> -butanol)-乙醇 (ethanol)-水 (water) (3:2:4)	0.46

3.3 高速逆流色谱分离纯化 在高速逆流色谱仪上用选定的色谱条件: 转速为 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 流动相流速为 $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 分离温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 正丁醇-乙酸-水 (4:1:5) 溶剂体系, 以上相溶剂为固定相, 下相溶剂为流动相, 对提取物浸膏进行分离, 固定相的保留率为 36.5%, 样品进样量为 0.3056 g 所得高速逆流色谱流出曲线如图 2 所示。经与对照品高效液相色谱保留值以及紫外吸收光谱比较, 确定图 2 中流出峰 4 为绿原酸。从图 2 可知, 提取物浸膏中绝大多数杂质成分先于绿原酸流出, 为了提

高分离速度, 减少逆流色谱分离时间, 本实验在进样 4 h 后, 停止主机转动, 用氮气把固定相推出, 并进一步用氮气吹干, 得到 11.2 mg 绿原酸。

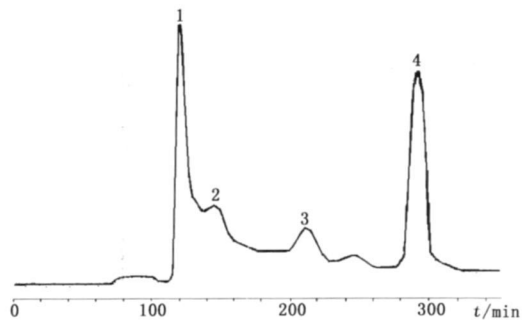


图 2 金银花粗提取物的高速逆流色谱图

Fig 2 HSCCC for the crude extract from Flos Loniceræ

3.4 HPLC及 LC-MS分析 将高速逆流色谱分离纯化得到的绿原酸以高效液相色谱法分析, 色谱图如图 3 色谱保留时间及紫外吸收光谱与绿原酸对照品一致。用归一化法测定, 绿原酸纯度高达 98.2%。进一步对分离纯化得到的绿原酸采用液质联用技术 (ESI源, N_2 干燥气流量 $8.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 干燥气温度 $325 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测电压 4.0 kV, 雾化气电压 241.3 kPa 正离子模式, 80 eV, 扫描范围为 $100 \sim 2000 \text{ m/z}$) 鉴定, 质谱数据 (图 4) 也与对绿原酸对照品一致。

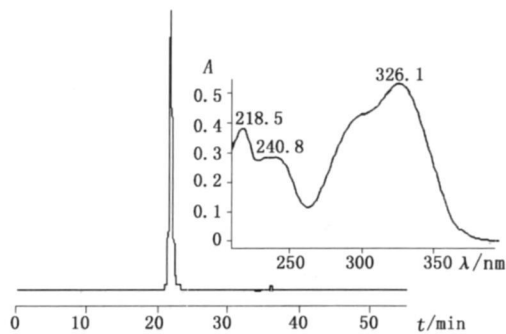


图 3 HSCCC分离纯化得到的绿原酸 HPLC 及 UV 图

Fig 3 HPLC and UV of chlorogenic acid prepared by HSCCC

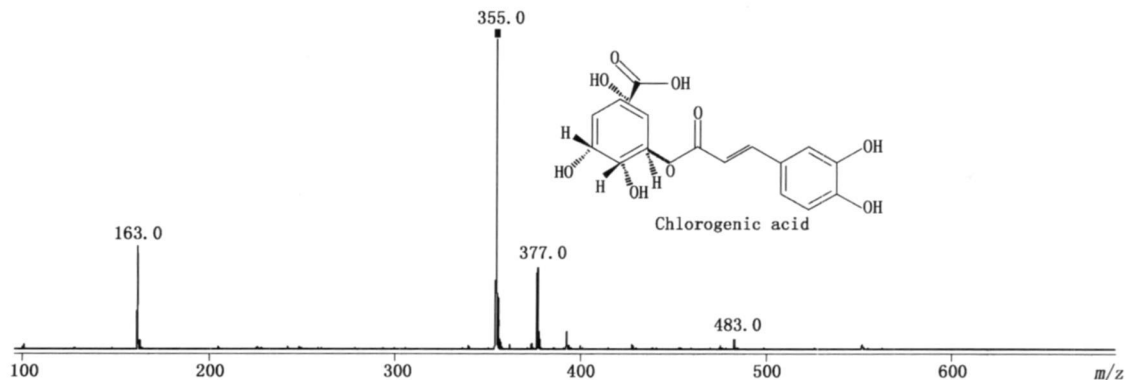


图 4 HSCCC分离纯化得到的绿原酸 MS图

Fig 4 MS spectra of chlorogenic acid prepared by HSCCC

4 结论

与热回流法相比,微波辅助提取金银花中的绿原酸具有选择性强,省时、高效、节能等优点,其粗提物无需初步纯化,可直接作为 HSCCC 分离的样品,使操作更加简便、快速。以正丁醇 - 乙酸 - 水 (4: 1: 5) 为溶剂体系,经高速逆流色谱法一步分离纯化就可获得纯度为 98.2% 的绿原酸。高速逆流色谱处理量大,适应性强,微波辅助提取结合高速逆流色谱技术,为金银花中绿原酸的分离制备提供了一种低成本、高效、节能的新方法。

参考文献

1 Ito Y. Recent advances in counter-current chromatography *J Chromatogr A*, 1991, 538: 3
 2 Owen RO, McCreath GE, Chase HA. A new approach to continuous counter-current protein chromatography: Direct purification of malate dehydrogenase from a *Saccharomyces cerevisiae* homogenate as a model system. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 53(4): 427
 3 YUAN Li-ming (袁黎明), FU Ruo-nong (傅若农), ZHANG Tian-you (张天佑). Application of HSCCC in the separations of

activated substances in plants (高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18 (1): 60
 4 Li H B, Chen F. Preparative isolation and purification of six diterpenoids from the Chinese medical plant *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2001, 952(122): 109
 5 ChP (中国药典). 2005. Vol II : 177
 6 Ronsted N, Strandgaard H, Jensen SR, et al. Chlorogenic acid from three species of hydrostachys *Biodivers Syst Ecol*, 2002, 30: 1105
 7 Awad MA, de Jager A, van Westing IM. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: Characterisation of variation *Sci Horti*, 2000, 83: 249
 8 He Cai-xia, Cui Hua. The determination of chlorogenic acid in cigarettes by inhibited chemiluminescence analysis *Anal Chim Acta*, 1997, 351: 241
 9 MA Xi-han (马希汉), ZHANG Kang-jian (张康健), WEI Qi (尉芹), et al. A study on the isolation of chlorogenic acid from the leaves of *Eucommia ulmoides* (从杜仲叶中提取绿原酸纯品的研究). *J Northwest Forest Coll* (西北林学院学报), 1996, 11(2): 58
 (本文于 2009 年 12 月 15 日修改回)

日本国立感染症研究所胁田隆字教授一行访问中检所

2009 年 12 月 1 日,日本国立感染症研究所病毒二部部长胁田隆字教授一行 5 人对中检所进行了访问并做了学术报告。中检所副所长王军志会见了来宾,细胞室主任王佑春主持了报告会。日方胁田隆字教授作了有关丙型肝炎病毒 (HCV) 研究的专题报告,随行的清水博之教授就 EV71 病毒研究进展向大家作了报告。

详见: [www. nicb.jp org cn](http://www.nicb.jp/org.cn)