

聚酰胺树脂分离纯化忍冬藤叶中绿原酸的工艺优选

喻菁^{1*}, 王小平¹, 陈俊²

(1. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000;

2. 江西省抚州市食品药品检验所, 江西 抚州 344000)

[摘要] **目的:** 优选忍冬藤叶中绿原酸的分离纯化工艺条件。**方法:** 以绿原酸含量为指标, 通过单因素试验考察聚酰胺树脂的静态和动态吸附、解吸性能, 并考察上样量、水洗用量、洗脱剂种类和用量; 以绿原酸纯度和保留率为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察洗脱流速、洗脱剂浓度和用量对忍冬藤叶中绿原酸的分离纯化工艺的影响。**结果:** 优选的分离纯化工艺为绿原酸上样量 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 树脂, 用 2 BV 水洗除杂, 加 3 BV 65% 乙醇洗脱, 洗脱流速 $0.4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集洗脱液。**结论:** 优选的工艺合理、稳定可行, 可为工业化分离纯化绿原酸提供参考。

[关键词] 忍冬藤叶; 分离纯化工艺; 聚酰胺树脂; 正交试验; 绿原酸

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0023-04

[doi] 10.11653/syjf2013080023

Optimization of Separation and Purification Technology for Chlorogenic Acids in Leaves of *Lonicera japonica* with Polyamide Resin

YU Jing^{1*}, WANG Xiao-ping¹, CHEN Jun²

(1. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China;

2. Jiangxi Province Fuzhou Food and Drug Administration, Fuzhou 344000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology of chlorogenic acid in leaves of *Lonicera japonica*. **Method:** With the content of chlorogenic acid as index, static and dynamic absorption, desorption properties of polyamide resin were observed by single factor test, and sample amount, the amount of washing water, type and dosage of eluent were investigated; With purity and retention rate as index, effects of elution flow rate, the concentration and volume of eluent on separation and purification technology was investigated by orthogonal test. **Result:** Optimized separation and purification technology was as following: sample amount $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ resin, washed impurity with 2 BV water, and eluated with 3 BV the amount of 65% ethanol, flow rate of $0.4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, collected eluent. **Conclusion:** This optimized technology was stable and practicable, it could provide reference for industrial separation and purification of chlorogenic acid.

[Key words] *Lonicera japonica*; separation and purification process; polyamide resin; orthogoual test; chlorogenic acid

绿原酸是植物在有氧呼吸过程中经莽草酸途径形成的一种苯丙素类化合物, 属酚酸类化合物, 具有抗菌、抗病毒、升高白细胞、保肝利胆、抗肿瘤、降血

压、降血脂、抗肝纤维化等作用^[1-3], 是金银花、忍冬藤叶中主要有效成分之一。以金银花为原料提取绿原酸的生产成本较高^[4], 而与金银花同株的忍冬藤叶中绿原酸含量也较高, 因此, 从忍冬藤叶中提取分离绿原酸更具有经济意义。本实验以忍冬藤叶为原料, 在乙醇渗漉提取^[5]及大孔吸附树脂初步分离除杂^[6]基础上, 采用聚酰胺树脂吸附法对忍冬藤叶粗提物的分离纯化工艺进行优选。

[收稿日期] 20121114(014)

[基金项目] 江西省卫生厅中医药科研基金课题(2009A035)

[通讯作者] * 喻菁, 教授, 从事基础化学与药物分析研究, Tel: 0794-8239328, E-mail: jxrcwpx@163.com

1 材料

LC-10ATvp 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),N2000 型色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程研究所),DZF-6021 型真空干燥箱(上海一恒),AB265-S 型电子分析天平(瑞士 METTLER-TOLEDO 公司)。

忍冬藤叶由抚州苍源药业有限公司提供,经江西省抚州市食品药品检验所陈俊主任药师鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的叶。聚酰胺树脂(30~60 目,岳阳石化厂),绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110753-200212),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 绿原酸含量测定

2.1.1 色谱条件^[7] Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,大连依利特),流动相乙腈-0.4% 磷酸(13:87),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 327 nm。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 1 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 13.44 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 5 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,置 4℃ 冰箱,备用。

2.1.3 标准曲线的绘制 精密量取绿原酸对照品溶液 1,2,3,4,5,6 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,依次精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 1.491 \times 10^6 X + 6\ 825.7$ ($r = 0.999\ 8$),说明绿原酸在 0.215~1.290 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.4 原药材含量测定 取忍冬藤叶样品适量,粉碎成粗粉,称取 3 份,每份 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定质量,超声 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失质量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,进样量 20 μL,计算绿原酸平均质量分数为 15.77 mg·g⁻¹。

2.2 上柱液的制备 取忍冬藤叶粗粉 4 kg,以流速 12 mL·kg⁻¹·min⁻¹,40% 乙醇为溶媒进行渗漉,收集 8 倍量渗漉液,回收乙醇,减压浓缩至相对密度约 1.0(30~40℃);取浓缩液过大孔吸附树脂柱,用 25% 乙醇洗脱,流速 0.6 BV·h⁻¹,收集洗脱液 2 BV,减压浓缩至相对密度约 1.0(30~40℃)。精密测定残留液体积并测得绿原酸质量浓度 28.6 g·L⁻¹。

2.3 静态吸附、洗脱能力测定 称取预处理好的聚酰胺树脂 10 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加入上柱液 30 mL,浸渍 24 h,不时振摇,依法测定绿原酸含量。于吸附饱和的 10 g 树脂中,加入 95% 乙醇 50 mL,不断振摇,依法测定含量。结果树脂的静态吸附量、洗脱量分别为 17.42,16.03 mg·g⁻¹,吸附率 86.37%,洗脱率 92.01%。

$$Qa = (Co - Ce) \times V/W;$$

$$Ea = (Co - Ce)/Co \times 100\%;$$

$$Qd = Cd \times V/W;$$

$$Ed = Qd/Qa \times 100\%$$

式中 Qa 为吸附量, Co 为吸附液起始质量浓度, Ce 为吸附液平衡质量浓度, V 为溶液体积, W 为树脂质量, Ea 为吸附率, Cd 为洗脱液平衡质量浓度, Qd 为洗脱量, Ed 为洗脱率。

2.4 动态吸附、洗脱能力测定 称取已预处理的树脂 20 g,湿法装柱,取上柱液 20 mL 上柱,用 2 BV 水以 0.5 BV·h⁻¹ 洗脱,再用乙醇以 0.5 BV·h⁻¹ 洗脱,分段收集,采用 TLC 检识,将含有绿原酸成分的洗脱液合并,摇匀,精确测定体积,依法测定绿原酸含量。结果树脂的动态吸附量、洗脱量分别为 7.56,7.17 mg·g⁻¹,吸附率和洗脱率分别为 80.94%,94.84%。

$$Qa = (M_{上} - M_{残} - M_{水洗})/W;$$

$$Ea = (Co - Cr)/Co \times 100\%;$$

$$Qd = M_{洗脱}/W$$

式中 $M_{上}$ 为上柱液中绿原酸质量, $M_{残}$ 为流出残液中绿原酸质量, $M_{水洗}$ 为水洗脱液中绿原酸质量, Cr 为过柱液中绿原酸质量浓度, $M_{洗脱}$ 为洗脱液中绿原酸质量。

2.5 上样量的考察(泄漏点测定) 称取已预处理的树脂 20 g,湿法装柱,取忍冬藤叶浓缩液 20 mL,分成 20 份,依次上样,加水以 0.5 BV·h⁻¹ 洗脱,分段收集(每份 1 mL),采用 TLC 检识。结果表明收集到第 8 份时,绿原酸泄露非常明显。因此,上样量以每克树脂 10 mg 绿原酸为宜。

2.6 水洗除杂用量考察 上柱吸附平衡后,确定水洗脱流速 0.5 BV·h⁻¹。用 3 BV 水洗脱,每 1 BV 收集 1 份,结果表明水洗脱液中绿原酸含量低。分别将 3 份水洗脱液干燥,得浸出物,称重,结果第 3 份水洗脱液中浸膏收率很低,表明 2 BV 水即可基本除去杂质。

2.7 洗脱溶剂的考察 称取已预处理的树脂 5 份,每份 20 g,湿法装柱,分别取忍冬藤叶浓缩液各 7

mL 上柱,用 2 BV 水以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,依次用体积分数 55%,65%,75%,85%,95% 的乙醇溶液以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,分别收集 4 BV 洗脱液,依法测定绿原酸含量。结果绿原酸洗脱量分别为 6.44, 6.91,7.05,7.17,7.23 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,洗脱率分别为 84.40%,90.56%,92.39%,93.97%,95.02%。从经济性与安全性角度考虑,取前 3 个体积分数进行优化试验。

2.8 洗脱溶剂用量的考察 称取已预处理的树脂 3 份,每份 20 g,湿法装柱,分别取忍冬藤叶浓缩液各 7 mL 上样,用 2 BV 水以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,分别用体积分数 55%,65%,75% 的乙醇溶液以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,收集洗脱液,每 1 BV 为 1 份,共收集 5 份,分别至水浴上蒸干,称重。结果前 4 BV 洗脱液的干膏质量占全部干膏质量的比例分别为 92.42%,95.21%,96.17%,因此选择 4 BV 乙醇洗脱。

2.9 分离纯化工艺优选 在预试验基础上,分别取忍冬藤叶浓缩液 9 份,每份 100 mL,上聚酰胺树脂柱,用 2 BV 水以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,水洗脱液另存。以绿原酸保留率及纯度为指标,选取乙醇体积分数、乙醇用量、洗脱流速为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,收集乙醇洗脱液,摇匀,精确测定体积,依法测定绿原酸含量并计算保留率。将乙醇洗脱液进行浓缩,干燥,称重并依法测定含量。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3~4。

表 1 忍冬藤叶中绿原酸分离纯化工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量 /BV	C 洗脱 流速/ $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$
1	55	2	0.4
2	65	3	0.5
3	75	4	0.6

由表 2~4 可知,各因素对绿原酸保留率的影响顺序为 $A > B > C$,其中因素 A,B 具有显著性影响,最佳工艺条件为 $A_3B_3C_1$;各因素对绿原酸纯度的影响顺序为 $A > C > B$,其中因素 A 具有显著性影响,最佳工艺条件为 $A_2B_1C_3$ 。综合考虑,确定优化工艺为 $A_2B_2C_1$,即用 3 BV65% 乙醇洗脱,洗脱流速 $0.4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.10 验证试验 按上述优化工艺条件进行重复性试验 3 次,依法测定绿原酸保留率,将醇洗脱液浓缩,干燥,称重并依法测定绿原酸含量。结果绿原酸平均保留率 85.01%,干膏收率 1.87%,绿原酸纯度 65.26%,表明优化工艺稳定可行。

表 2 忍冬藤叶中绿原酸分离纯化工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	绿原酸/%	
					保留率	纯度
1	1	1	1	1	69.63	47.06
2	1	2	2	2	73.91	49.90
3	1	3	3	3	73.14	50.42
4	2	1	2	3	76.74	69.33
5	2	2	3	1	80.81	66.13
6	2	3	1	2	84.08	65.29
7	3	1	3	2	72.49	66.01
8	3	2	1	3	85.36	64.48
9	3	3	2	1	84.45	61.70
保	K_1	216.68	218.86	239.07	234.89	
留	K_2	241.63	240.08	235.10	230.48	
率	K_3	242.30	241.67	226.44	235.24	
	R	8.54	7.60	4.21	1.59	
纯	K_1	147.38	182.40	176.83	174.89	
度	K_2	200.75	180.51	180.93	181.20	
	K_3	192.19	177.41	182.56	184.23	
	R	17.79	1.66	1.91	3.11	

表 3 保留率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	142.148	2	71.074	30.296	<0.05
B	108.124	2	54.062	23.044	<0.05
C	27.808	2	13.904	5.927	>0.05
D(误差)	4.692	2	2.346		

注: $F_{0.01}(2,2) = 99.00, F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表 4 同)。

表 4 纯度方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	547.730	2	273.865	36.185	<0.05
B	4.231	2	2.116	0.279	>0.05
C	5.811	2	2.905	0.384	>0.05
D(误差)	15.137	2	7.568		

3 讨论

根据合作企业生产设备现状,固定柱子径高比 1:6。考虑到大生产时洗脱流速的实际需要,选定 30~60 目聚酰胺。曾对聚酰胺树脂分离纯化绿原酸的耐用性进行考察,结果表明经 8 次动态吸附、洗脱过程后,树脂的吸附率下降,需进行酸碱处理后再重复使用。采用优选的纯化工艺,以忍冬

响应曲面分析法优化油茶籽中总黄酮提取工艺

陈诗强¹, 林江萧², 陈剑锋², 刘国敏³, 龚林光², 梁一池^{1*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2. 福州大学天然产物与中药现代化研究所, 福州 350108; 3. 福建省闽侯桐口国有林场, 福州 352101)

[摘要] 目的: 优化油茶籽中总黄酮的乙醇提取工艺。方法: 以提取温度、提取时间、乙醇体积分数、料液比为自变量, 应用 Box-Behnken 中心组合设计建立数学模型, 以总黄酮提取率为响应值作响应面和等高线, 采用响应面法优化油茶籽中总黄酮的提取工艺。结果: 最佳提取工艺条件为温度 66 ℃, 70% 乙醇提取 1.3 h, 料液比 1:22; 油茶籽总黄酮提取率 1.87%, 与理论值 (1.89%) 接近。结论: 该优选工艺稳定可靠, 为油茶资源的合理利用提供参考。

[关键词] 油茶籽; 总黄酮; 提取; 优化; 响应曲面分析法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0026-04

[doi] 10.11653/syfyj2013080026

Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids from *Camellia oleifera* Seeds by Response Surface Methodolgy

CHEN Shi-qiang¹, LIN Jiang-xiao², CHEN Jian-feng²,
LIU Guo-min³, GONH Lin-guang², LIANG Yi-chi^{1*}

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Fuzhou 350122, China;
2. Institute of Modern Natural Product & TCM, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;
3. Tongkou National Forest Farm of Minhou, Fuzhou 352101, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids from *Camellia oleifera* seeds. **Method:** With extraction temperature, extraction time, ethanol concentration and solid-liquid ratio as independent variables, Box-Behnken central composite design was used to establish mathematical model, response

[收稿日期] 20121116(014)

[基金项目] 福建省科技厅重点项目(2011N1007);福建省自然科学基金计划项目(2011J05073)

[第一作者] 陈诗强, 硕士, 从事质量控制与品质评价研究, Tel:15705963025, E-mail:462531970@qq.com

[通讯作者] * 梁一池, 教授, 博士生导师, 从事中药材质量控制与品质评价的研究, Tel:13799399596, E-mail:fafulyc@126.com

藤叶干品计算, 绿原酸总保留率达 66.32%。经合作企业中试试表明, 优选的分离纯化工艺较稳定可行, 可用于工业化试生产。

[参考文献]

[1] 杜延兵, 裘爱泳. 绿原酸生物活性、资源及其提取纯 [J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 250.
[2] 史秀玲, 高银辉. 绿原酸对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 199.
[3] 戚晓渊, 史秀灵, 高银辉, 等. 绿原酸抗肝纤维化作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 139.

[4] 杨晓芸, 肖潇, 熊吟, 等. 金银花颜色与有效成分含量的相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 92.
[5] 喻菁, 王小平, 徐强. 忍冬藤叶中绿原酸的提取工艺研究 [J]. 陕西中医, 2008, 29(6): 734.
[6] 喻菁, 王小平, 徐强. 忍冬藤叶中绿原酸的分离纯化工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2379.
[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 206.

[责任编辑 全燕]