

不同纯化方法对金银花提取物中咖啡酰奎宁酸类成分含量的影响

邱新建^{1,2,3}, 赵海鹏^{1,2,3}, 刘向东^{1,2,3}, 苏瑞强^{1,2,3*}, 李守信^{1,2,3}, 赵志全^{1,2,3}

(1. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276006; 2. 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006; 3. 中药制药新技术山东省企业重点实验室, 山东 临沂 276006)

[摘要] 目的: 考察不同纯化方法对金银花提取物中咖啡酰奎宁酸类成分的影响。方法: 应用醇沉法、石硫法、石硫醇法、大孔树脂吸附法及萃取法等对金银花进行提取纯化, 并采用高效液相色谱法测定其中 6 种咖啡酰奎宁酸类成分的含量。结果: 萃取法所得金银花提取物中咖啡酰奎宁酸类成分的含量最高, 总咖啡酰奎宁酸含量达 83.91%。结论: 萃取法是制备金银花提取物的理想方法。

[关键词] 金银花; 咖啡酰奎宁酸; 绿原酸; 萃取法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0083-04

[doi] 10.11653/syfy2013080083

Effects of Different Purification Methods on Content of Caffeoyl Quinic Acids from Flos Lonicerae Extractive

QIU Xin-jian^{1,2,3}, ZHAO Hai-peng^{1,2,3}, LIU Xiang-dong^{1,2,3},
SU Rui-qiang^{1,2,3*}, LI Shou-xin^{1,2,3}, ZHAO Zhi-quan^{1,2,3}

(1. Lunan Pharmaceutical Group Co. Ltd., Linyi 276006, China; 2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Linyi 276006, China; 3. Shangdong Province Key Laboratory of Pharmaceutical New Technology of Chinese Traditional Medicine, Linyi 276006, China)

[收稿日期] 20120904(013)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB724001)

[第一作者] 邱新建, 硕士, 工程师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 0539-8336639, E-mail: qixunjian126@126.com

[通讯作者] * 苏瑞强, 硕士, 研究员, 从事新药研究与开发, Tel: 0539-8336639, E-mail: ruiqianguo@hotmail.com

在今后的实验中应联合蒸发光散射检测器或质谱进行更加全面的分析。

[参考文献]

[1] 吴以岭, 谷春花, 徐贵成, 等. 芪苈强心胶囊治疗慢性心力衰竭随机双盲、多中心临床研究[J]. 疑难病杂志, 2007, 6(5):263.

[2] 魏聪, 贾振华, 吴以岭, 等. 芪苈强心胶囊对兔实验性慢性心力衰竭心室重构的保护作用[J]. 疑难病杂志, 2007, 6(3):144.

[3] 唐思文, 徐登峰, 王玲玲, 等. 芪苈强心胶囊多目标优化组合物对实验性心衰大鼠心功能的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5):532.

[4] 李向军, 徐红辉, 张永峰, 等. 芪苈强心胶囊质量标准研究[J]. 中国药业, 2011, 20(24):44.

[5] 聂磊, 罗国安, 曹进, 等. 中药二维信息指纹图谱模式识别[J]. 药学学报, 2004, 39(2):1362.

[6] 刘智, 王爱民, 许祖超, 等. 全天麻胶囊特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):86.

[7] 周新, 陈会明, 白桦, 等. HPLC 与 UPLC 色谱条件转换方法研究[J]. 分析试验室, 2008, 27(4):56.

[8] 张琦, 王振中, 萧伟, 等. 白芍药材 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6):712.

[9] 马培, 许利嘉, 刘延泽, 等. 虎杖药材 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):72.

[10] 张琦, 王振中, 萧伟, 等. 茯苓 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7):966.

[责任编辑 顾雪竹]

[**Abstract**] **Objective:** To study the effects of different purification ways on the extractive rate of caffeoyl quinic acids in Flos Lonicerae extractive. **Method:** Several purification processes were used respectively in the preparation of Flos Lonicerae extractive, such as alcohol precipitation method, lime-sulfur method, lime-sulfur ethanol method, macroporous resin method, and extraction method etc. The content of the six caffeoyl quinic acids was determined by HPLC. **Result:** The content of the caffeoyl quinic acids in Flos Lonicerae extractive by extraction method was higher than the other methods. Total content of caffeoyl quinic acids was up to 83.91%. **Conclusion:** The extraction method is the best in the preparation of Flos Lonicerae extractive.

[**Key words**] Flos Lonicerae; caffeoyl quinic acids; chlorogenic acid; extraction method; HPLC

金银花为常用中药材,具有清热解毒、凉散风热之功效^[1-2]。绿原酸作为金银花的有效成分之一,一直作为金银花药材的质量控制指标,但化学及药理研究表明,新绿原酸、隐绿原酸、4,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸和 3,4-*O*-双咖啡酰基奎宁酸等也是金银花的主要活性成分^[3-4]。

银黄、茵栀黄系列制剂为临床常用制剂,其中金银花的提取纯化方法有醇沉法、石硫法、石硫醇法、大孔树脂吸附法及萃取法等^[5-6]。本研究采用金银花中主要的 6 种咖啡酰基奎宁酸成分为指标,对 5 种纯化方法所得提取物的含量进行了测定,考察了不同纯化方法对咖啡酰基奎宁酸类成分的影响,为上述复方制剂中该类成分富集方法的选择及优化提供依据。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Mettler Toledo AG285 型电子分析天平($d=0.01$ mg,梅特勒托利多仪器有限公司),Shangping FA1004 型电子分析天平($d=0.1$ mg,上海精科天平仪器厂),KQ5200DB 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

金银花采自山东平邑,采用杀青法烘干;绿原酸(纯度 $\geq 98\%$,批号 110753-200413,中国食品药品检定研究院);新绿原酸、隐绿原酸(纯度 $\geq 98\%$,批号分别为 MUST-10091501, MUST-10091811,成都曼思特生物科技有限公司),4,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、3,4-*O*-双咖啡酰基奎宁酸(纯度 $\geq 98\%$,批号分别为 12022804, 12040507, D100624,成都普瑞法科技开发有限公司),AB-8 大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),甲醇为色谱纯(Merk 公司),水为二次蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);以 0.05% 三氟乙酸溶液为流动相

A,以乙腈为流动相 B,梯度洗脱(0~25 min,90%~85% A;25~60 min,85%~65% A)。理论板数按绿原酸峰计算不低于 1 000,流速 1 mL·min⁻¹,进样体积 10 μL,检测波长 327 nm,柱温 35 ℃。

2.2 对照品和供试品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、4,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸和 3,4-*O*-双咖啡酰基奎宁酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成混合对照品溶液,其质量浓度分别为 0.735, 0.612, 0.639, 0.668, 0.702, 0.727 g·L⁻¹。

2.2.2 金银花提取物的制备 醇沉法^[7]:取金银花,加水浸润 30 分钟,煎煮 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,浓缩至相对密度 1.20~1.25(80 ℃),放冷至 40 ℃,缓缓加入乙醇使含醇量达 75%,充分搅拌,静置 12 h,滤过,取上清液,回收乙醇至无醇味,加入 10 倍量水,充分搅拌,静置 12 h,滤过,滤液浓缩干燥,即得。

石硫法^[8]:取金银花,加水煎煮 2 次,每次 2 h,合并煎液,滤过,滤液加入 20% 石灰乳调节 pH 10~12,静置,滤取沉淀,加适量水,加 50% 硫酸调节 pH 6~7,搅匀,滤过,滤液浓缩干燥,即得。

石硫醇法^[9]:将金银花,加水煎煮 2 次,第 1 次 1 h,第 2 次 45 min,分次滤过,滤液合并减压浓缩至每 1 mL 相当于金银花 2 g,加入 20% 石灰乳,调节 pH 12~13,搅匀,静置,滤过,弃去滤液,沉淀加 2 倍量乙醇,搅匀,过 4 号筛,以 50% 硫酸溶液调节 pH 3~4,搅匀,滤过,滤液用 40% 氢氧化钠溶液中和至 pH 6.5~7.0,滤过,滤液浓缩干燥,即得。

大孔树脂吸附法^[10]:取金银花,以 30% 乙醇提取 3 次,每次 0.5 h,滤过,合并滤液,回收乙醇,浓缩水液上大孔吸附树脂吸附,用 50% 乙醇洗脱,洗脱液过滤浓缩干燥,即得。

萃取法^[11]:取金银花,30% 乙醇提取 3 次,每次 0.5 h,滤过,合并滤液,回收乙醇,调 pH 2.0,以乙酸

乙酯萃取精制,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取各提取物适量,精密称定,加 70% 乙醇超声处理,滤过,作为供试品溶液。药材供试品溶液的制备^[1]:取本品细粉(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 35 kHz)1 h,放冷,再称定质量,用 70% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。各色谱图见图 1。

果表明,各组分在各自浓度范围内线性关系良好,回归方程、相关系数见表 1。

表 1 对照品的标准曲线

成分	标准曲线	相关系数
新绿原酸	$Y = 402.6X + 11.23$	0.999 7
绿原酸	$Y = 389.6X + 12.58$	0.999 8
隐绿原酸	$Y = 391.5X + 10.40$	0.999 8
4,5- <i>O</i> -双咖啡酰基奎宁酸	$Y = 172.1X - 30.51$	0.999 9
3,5- <i>O</i> -双咖啡酰基奎宁酸	$Y = 183.2X - 28.12$	0.999 9
3,4- <i>O</i> -双咖啡酰基奎宁酸	$Y = 170.3X - 31.33$	0.999 8

2.4 精密度试验 对同一混合对照品溶液重复测定 6 次,每次进样 10 μ L,测定峰面积并计算 RSD,结果分别为绿原酸 0.26%,新绿原酸 1.11%,隐绿原酸 0.33%,4,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 0.54%,3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 0.78% 和 3,4-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 0.91%,表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 取金银花药材 6 份,分别依 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下条件进样分析,测定峰面积并计算 RSD,结果分别为绿原酸 0.29%,新绿原酸 0.95%,隐绿原酸 0.71%,4,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 0.87%,3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 0.30% 和 3,4-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 1.01%。

2.6 加样回收试验 取已知含量的金银花药材 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,再按下表分别精密加入对照品溶液适量,置具塞锥形瓶中,挥干溶剂,按照 2.2.3 方法操作制备供试品溶液,照上述高效液相色谱条件测定。结果见表 2。

表 2 金银花中咖啡酰奎宁酸类成分的加样回收率

成分	称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率 /%	RSD /%
新绿原酸	0.250 6	0.100 2	0.100 8	0.197 8	99.6	1.94
	0.250 6	0.100 2	0.100 8	0.203 2		
	0.254 5	0.101 8	0.100 8	0.204 0		
	0.251 7	0.100 7	0.100 8	0.200 2		
	0.250 4	0.100 2	0.100 8	0.200 5		
	0.249 9	0.100 0	0.100 8	0.199 7		
绿原酸	0.250 6	7.718 5	7.756	15.443 5	99.9	0.71
	0.250 6	7.718 5	7.756	15.389 2		
	0.254 5	7.838 6	7.756	15.625 6		
	0.251 7	7.752 4	7.756	15.570 4		
	0.250 4	7.712 3	7.756	15.483 8		
	0.249 9	7.696 9	7.756	15.406 4		
隐绿原酸	0.250 6	0.175 4	0.178 4	0.348 3	99.6	2.08
	0.250 6	0.175 4	0.178 4	0.349 4		
	0.254 5	0.178 2	0.178 4	0.360 3		
	0.251 7	0.176 2	0.178 4	0.357 1		
	0.250 4	0.175 3	0.178 4	0.353 9		
	0.249 9	0.174 9	0.178 4	0.352 4		

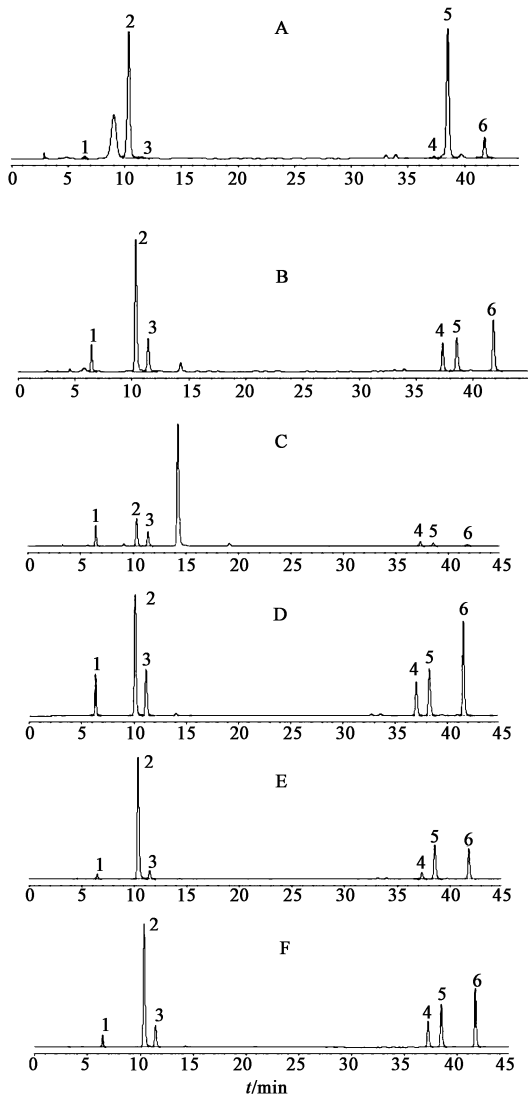


图 1 金银花药材及不同纯化方法的 HPLC
A. 药材; B. 醇沉法; C. 石硫法; D. 石硫醇法;
E. 大孔树脂吸附法; F. 萃取法; 1. 新绿原酸;
2. 绿原酸; 3. 隐绿原酸; 4. (4,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸);
5. (3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸); 6. (3,4-*O*-双咖啡酰基奎宁酸)

2.3 线性关系考察 分别准确吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μ L 进样,记录峰面积,分别以进样量 X (μ g) 为横坐标,峰面积的积分值 Y 为纵坐标绘制标准曲线并计算回归方程。结

续表 2

成分	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均 回收率 /%	RSD /%
4,5- <i>O</i> - 双咖啡酰基 奎宁酸	0.250 6	0.100 2	0.101 6	0.199 3	99.7	1.55
	0.250 6	0.100 2	0.101 6	0.204 0		
	0.254 5	0.101 8	0.101 6	0.203 8		
	0.251 7	0.100 7	0.101 6	0.201 2		
	0.250 4	0.100 2	0.101 6	0.201 0		
3,5- <i>O</i> - 双咖啡酰基 奎宁酸	0.249 9	0.100 0	0.101 6	0.201 3	100.1	0.97
	0.250 6	8.470 3	8.555	17.102 3		
	0.250 6	8.470 3	8.555	17.110 8		
	0.254 5	8.602 1	8.555	17.225 5		
	0.251 7	8.507 5	8.555	17.036 8		
3,4- <i>O</i> - 双咖啡酰基 奎宁酸	0.250 4	8.463 5	8.555	16.924 4	99.8	1.13
	0.249 9	8.446 6	8.555	16.916 1		
	0.250 6	1.202 9	1.228	2.414 9		
	0.250 6	1.202 9	1.228	2.412 5		
	0.254 5	1.221 6	1.228	2.463 1		
3,4- <i>O</i> - 双咖啡酰基 奎宁酸	0.251 7	1.208 2	1.228	2.446 0		
	0.250 4	1.201 9	1.228	2.434 8		
	0.249 9	1.199 5	1.228	2.417 7		

表 3 样品中咖啡酰奎宁酸类成分的含量($n=5$)

样品来源	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	4,5- <i>O</i> -双咖啡 酰基奎宁酸	3,5- <i>O</i> -双咖啡 酰基奎宁酸	3,4- <i>O</i> -双咖啡 酰基奎宁酸	总咖啡酰 奎宁酸
药材	0.04	3.08	0.07	0.04	3.38	0.48	7.09
醇沉法	0.88	6.07	1.57	1.34	1.77	2.38	14.01
石硫法	0.46	0.85	0.47	0.15	0.10	0.06	2.09
石硫醇法	2.00	7.07	7.97	5.17	6.62	13.01	41.84
树脂吸附法	0.59	19.60	1.45	2.60	13.27	11.43	48.94
萃取法	1.45	21.40	3.77	12.04	19.38	25.87	83.91

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 205.
 [2] 杨欣, 李洪波, 陈诚, 等. 金银花药性与功效的文献考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 220.
 [3] 王立娟. 金银花的研究进展[J]. 医学信息, 2010, (8): 2293.
 [4] 于静, 邓雁如, 陈奇, 等. HPLC 测定金银花及金芪降糖片中 6 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 57.
 [5] 马烽, 朱亚玲, 陈明辉, 等. 金银花中绿原酸提取工艺研究进展[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(7): 164.
 [6] 张志旭, 刘东波, 刘鹏, 等. 金银花研究进展与行业发展分析[J]. 湖南农业科学, 2012, (4): 20.

2.7 样品测定 按照试验方法分别测定样品各 5 次, 计算出绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、4,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、3,4-*O*-双咖啡酰基奎宁酸的含量, 结果见表 3。

3 讨论

金银花药材中主要含有绿原酸、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸, 其他 4 个成分含量很低, 经过提取纯化后, 上述 2 个成分含量下降, 而其余 4 个成分含量增加, 说明提取纯化工艺过程中, 成分之间存在转化及分解现象。

石硫醇法与石硫法相比, 能较好保留咖啡酰奎宁酸类成分, 说明加石灰生成的沉淀在醇溶液中比在水溶液中稳定。石硫法所制得提取物, 经过测定, 含有较多量的咖啡酸, 说明咖啡酰奎宁酸类成分在碱性条件下分解成了咖啡酸。

从提取物的纯度角度考虑, 萃取法能达到很好的除杂效果, 优于其他方法, 可以作为纯化金银花提取物的理想方法。

[7] 山东省卫生厅. 山东省中药材标准[S]. 2002: 291.
 [8] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂. 第 14 册[S]. 1997: 98.
 [9] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂. 第 19 册[S]. 1997: 197.
 [10] 李淑芳, 王淑美, 梁生旺, 等. AB-8 大孔吸附树脂纯化双黄连中金银花、连翘提取物工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 4.
 [11] 汪爱国, 杨海燕, 廖晓艳, 等. 逆流萃取法从金银花粗粉中提取绿原酸的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 546.

[责任编辑 顾雪竹]