

金银花绿原酸提取方法研究

李 辉^{1,3}, 逯桃桃², 陈 佳¹, 赵 亮¹, 邱洪灯^{1,3}

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州城市学院, 甘肃 兰州 730070;
3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 采用高效液相色谱法测定金银花中绿原酸的含量, 通过热回流法优化金银花绿原酸提取条件并进行正交试验分析。试验结果表明, 金银花中绿原酸最佳提取条件为乙醇体积分数 80%、提取温度 100 ℃、料液比 1 : 20 (g/mL)、提取时间 2 h 时, 绿原酸提取率为 7.1%。方法分析准确、操作简便、设备要求低, 可用作金银花的质量控制和开发利用。

关键词: 金银花; 绿原酸; 高效液相色谱; 提取

中图分类号: O657.7⁺ 2

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2022)04-0416-06

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2022.04.008

Study on Extraction Method of Chlorogenic Acid from Honeysuckle

LI Hui^{1,3}, LU Tao-tao², CHEN Jia¹, ZHAO Liang¹, QIU Hong-deng^{1,3}

(1. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;
2. Lanzhou City University, Lanzhou 730070, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The content of chlorogenic acid in honeysuckle was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), the extraction conditions of chlorogenic acid from honeysuckle were optimized using a thermal reflux method and the orthogonal test was carried out. The results showed that the best extraction conditions of chlorogenic acid from honeysuckle was ethanol with a volume fraction of 80%, a solid-liquid ratio of 1 : 20 (g/mL), an extraction temperature of 100 ℃, an extraction time of 2 h, and the extraction rate of chlorogenic acid was 7.1%. The method can be used for quality control, development and utilization of honeysuckle with accurate analysis, simple operation and low equipment requirements.

Key words: honeysuckle; chlorogenic acid; HPLC; extraction

金银花(别名: 忍冬藤), 忍冬科忍冬属多年生半常绿缠绕灌木, 味甘、性寒, 广泛分布于山东、陕西、河南、湖北及江西等地, 具有清热解毒、疏风散热之功效^[1]。研究发现金银花的活性成分主要为有机酸、

黄酮、三萜及挥发油等^[2-4], 其中绿原酸、木犀草苷生物活性显著^[5], 对金黄葡萄球菌及上呼吸道感染致病病毒等有较强的抑制力^[6-7]。因此, 为了开发利用金银花, 其有机酸类活性成分的分离纯化一直是

收稿日期: 2022-11-02; 修订日期: 2022-11-21.

基金项目: 兰州化物所青年合作基金(HZJJ20-08), 甘肃省青年科技基金计划(20JR10RA292), 甘肃省高等学校创新基金(2021A-137) [LICP Cooperation Foundation for Young Scholars (HZJJ20-08), Gansu Province Youth Science and Technology Fund Program (20JR10RA292), Higher Education Innovation Fund of Gansu Province (2021A-137)]

作者简介: 李辉(1990-), 男, 助理研究员, 主要从事色谱材料研究, E-mail: lihui@licp.cas.cn

通信作者: 邱洪灯(1980-), 男, 研究员, 《分析测试技术与仪器》编委, 主要从事分析化学研究, E-mail: hdqiu@licp.cas.cn.

金银花高值化利用的重要依据^[8]。

绿原酸是由咖啡酸与奎尼酸生成的缩酚酸^[9-10],含有一定量 R-OH 基,能形成具有抗氧化作用的氢自由基,以消除羟基自由基和超氧阴离子等自由基的活性,从而保护组织免受氧化作用的损害,同时有消炎、降血脂及增强免疫调节等多药理作用^[11-12],且绿原酸在医药保健、日用化工及食品等行业应用广泛^[13-14]。目前绿原酸提取方法众多,与其他方法相比,热回流法因提取高效、操作简单、设备要求低且提取率高于煎煮法等优势而广泛应用^[15-16]。鉴于此,本文优化了热回流法提取金银花绿原酸,考察乙醇体积分数、料液比、温度及提取时间等对提取率的影响,采用正交试验分析最优提取参数。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

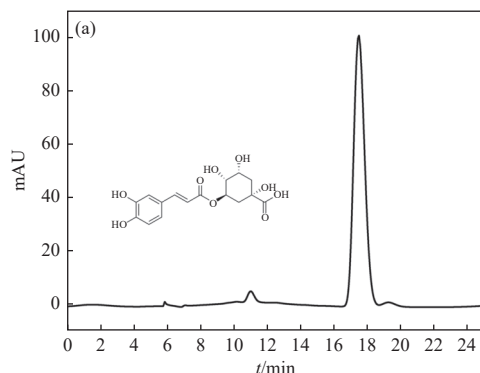
液相色谱仪为 Waters 2487(双波长紫外检测器+waters1525 泵),N-3000 色谱工作站(浙江大学),DF-101S 搅拌器(郑州长城科工贸有限公司),MH-5000 调温电热套(西安常仪仪器设备有限公司),R-1001VN 旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司),TG16-WS 型高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),FA1004 电子秤(上海良平仪器仪表有限公司)。

金银花为市售,甲醇(迈瑞达,色谱纯),磷酸(科密欧,≥85.0%),绿原酸(麦克林,纯度 99.6%),无水乙醇(天津大茂,99.7%),去离子水(摩尔 1010a 30L/H 型)。

1.2 试验方法

1.2.1 液相色谱条件

色谱柱: Hibar® C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),



流动相条件为 0.4% 磷酸溶液: 乙腈(体积比为 87:13), 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 327 nm, 进样体积 10 mL, 柱温为 25 °C。

1.2.2 绿原酸标准曲线制备

准确称取 0.10 g 绿原酸标准品,采用 80% 乙醇溶液溶解后移至 100 mL 容量瓶中摇匀、定容,制得 1.0 mg/mL 绿原酸标准对照品溶液。吸取不同体积标准溶液配制一定浓度绿原酸标准液,采用“1.2.1”条件测定吸光度峰面积,绘制标准曲线。

1.2.3 提取率计算公式

绿原酸检测波长依据《中华人民共和国药典》(2005 版第一部),“金银花”项下绿原酸检测波长为 327 nm。因此在 327 nm 测定绿原酸吸光度,以吸光度作纵坐标,质量浓度为横坐标绘制标准曲线。其中金银花中绿原酸提取率公式为:

$$a = \frac{C \times V \times n \times 10^{-6}}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中, a 为金银花绿原酸提取率, C 为绿原酸提取液稀释后浓度, V 为提取液的体积(mL), n 为稀释倍数, M 为金银花质量(g)^[17-20]。

1.2.4 提取条件

本方法采用热回流法提取,提取流程为:金银花→干燥→粉碎处理→过 178 μm 筛→热回流法提取→过滤→8 000 r/min 离心 5 min→绿原酸提液合并定容→稀释→测定。依照此步骤对金银花中绿原酸进行热回流提取,并对绿原酸标准品和金银花提取液进行高效液相色谱法测定(如图 1 所示)。

1.2.5 单因素试验

采用热回流法提取金银花绿原酸,考察乙醇体积分数(0、20%、40%、60%、80%、100%)、料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25, g/mL)、提取

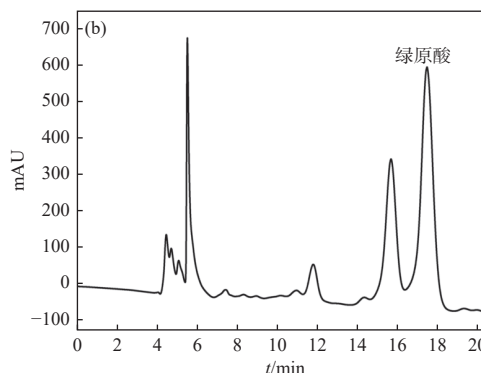


图 1 (a) 绿原酸和 (b) 金银花提取液 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of (a) chlorogenic acid and (b) honeysuckle extract

时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)、提取温度(25、40、60、80、100 ℃)等因素对绿原酸提取率的影响。

1.2.6 正交试验

在单因素试验的基础上,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,以金银花绿原酸的提取率为检测指标,正交试验因素与水平如表 1 所列。

表 1 正交试验因素与水平
Table 1 Orthogonal test factors and levels

水平	影响因素			
	乙醇体积分数 (A)/%	提取温度 (B)/℃	提取时间 (C)/h	料液比 (D)
1	60	60	1.5	1 : 15
2	80	80	2.0	1 : 20
3	100	100	2.5	1 : 25

2 结果与讨论

2.1 绿原酸标准曲线

准确量取标准品溶液 1.0~9.0 mL 转移至 10.0 mL 容量瓶中摇匀、定容,配制 0.1~1.0 mg/mL 的标准溶液,备用待测。分别吸取上述不同浓度对照品溶液 10 μ L 测样,以吸光度值为纵坐标,质量浓度为横坐标。试验结果表明:绿原酸吸光度值与质量浓度满足 $Y=1.83 \times 10^7 C + 495\ 058$, r 为 0.999, R^2 为 0.998,说明在 0.1~1.0 mg/mL 范围内线性关系良好(如图 2 所示)。

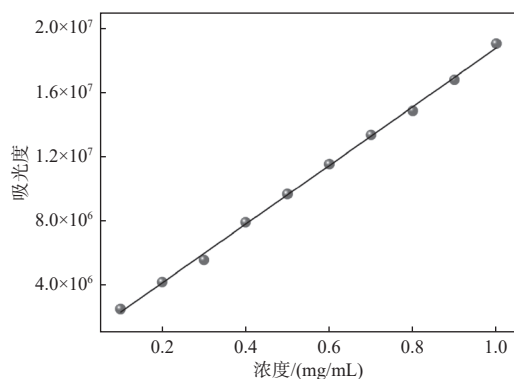


图 2 绿原酸标准曲线

Fig. 2 Standard curve of chlorogenic acid

2.2 单因素考察

2.2.1 不同乙醇体积分数对绿原酸提取率影响

设定提取温度 100 ℃,提取时间 2 h,料液比 1 : 20,考察纯水和乙醇体积分数分别为 20%、40%、

60%、80% 和 100% 时对金银花绿原酸提取率的影响(如图 3 所示)。试验发现乙醇体积分数在 0~80% 范围内,绿原酸提取率随乙醇体积分数增加而增大。当乙醇溶液体积分数为 80% 时,绿原酸的提取率最高,进一步增加乙醇体积分数,提取率反而降低,可能是金银花中的一些脂溶性成分溶出,导致提取率下降。故选乙醇体积分数 60%、80%、100% 进行正交试验。

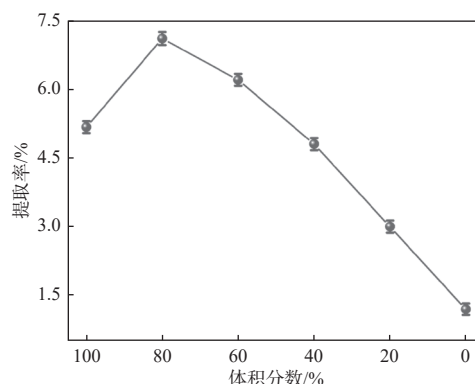


图 3 不同乙醇体积分数对提取率影响

Fig. 3 Effect of ethanol volume fraction on extraction yield

2.2.2 提取温度对绿原酸提取率影响

设定乙醇体积分数 80%,提取时间 2 h,料液比 1 : 20,考察提取温度 25、40、60、80、100 ℃ 对金银花绿原酸提取率的影响(如图 4 所示)。试验发现在 25~100 ℃ 范围内,绿原酸提取率随温度升高而增大,可能因温度升高,细胞壁破裂加快,绿原酸溶解或扩散到溶剂中的速度加快,提取率增大。当温度升高至 100 ℃ 时,绿原酸的提取率最高,故选 60、80、100 ℃ 进行正交试验。

2.2.3 提取时间对绿原酸提取率影响

设定乙醇体积分数 80%,提取温度 100 ℃,料液比 1 : 20,考察提取时间 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 对金银花绿原酸提取率的影响(如图 5 所示)。试验发现在 0.5~1.5 h 提取时间内,绿原酸提取率随时间增加而增大,当提取时间为 2 h 时,提取率达到最大,进一步增加时间提取率反而下降,可能长时间使得细胞壁中杂质溶出而提取率降低,故选择 1.5、2.0、2.5 h 进行正交试验。

2.2.4 料液比对绿原酸提取率影响

设定乙醇体积分数 80%,提取温度 100 ℃,提取时间 2 h,考察料液比 1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25 对金银花绿原酸提取率的影响(如图 6 所示)。

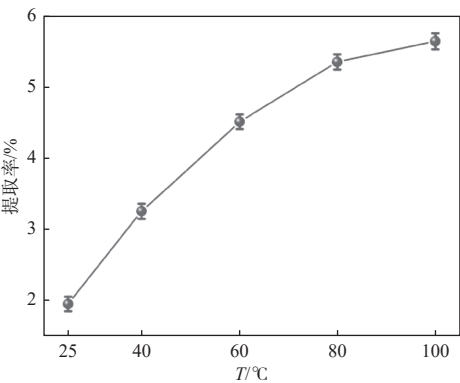


图 4 提取温度对提取率影响

Fig. 4 Effect of extraction temperature on extraction yield

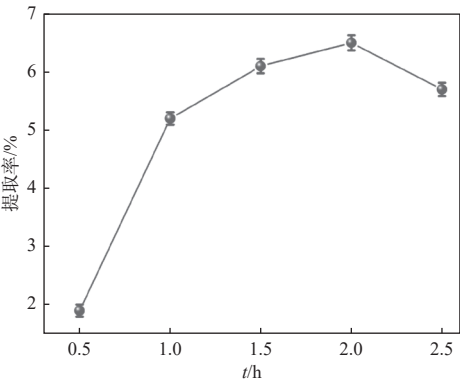


图 5 提取时间对提取率影响

Fig. 5 Effect of extraction time on extraction yield

试验发现绿原酸提取率随料液比增加而增大. 当料液比 1 : 20 时提取率达到最大, 进一步增加料液比提取率反而下降, 可能由于糖类物质溶出而下降, 故选择 1 : 5、1 : 20 及 1 : 25 进行正交试验.

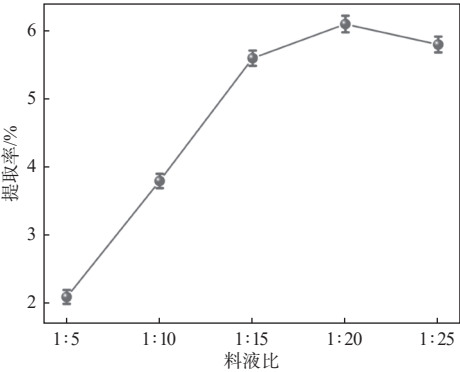


图 6 料液比对提取率影响

Fig. 6 Effect of solid-liquid ratio on extraction yield

2.3 正交试验

在上述单因素考察基础上, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以绿原酸提取率为检测指标, 正交试验结果如

表 2 所列. 由试验数据可知, 金银花中绿原酸最佳提取条件为 $A_2B_3C_2D_2$, 其中 k_i 为 i 水平数据的综合平均, R 为极差. 由极差分析可知, 4 种因素对提取率影响强度依次为提取温度、乙醇体积分数、料液比、提取时间. 根据正交试验结果, 最佳提取条件为乙醇体积分数 80%、提取温度 100℃、提取溶剂 pH 为 6, 提取时间 2 h, 料液比为 1 : 20.

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	3.83
2	1	2	2	2	5.04
3	1	3	3	3	4.91
4	2	1	2	3	4.28
5	2	2	3	1	5.12
6	2	3	1	2	5.45
7	3	1	3	2	4.16
8	3	2	1	3	4.78
9	3	3	2	1	5.32
k_1	4.593	4.090	4.687	4.757	
k_2	4.950	4.980	4.880	4.883	
k_3	4.753	5.227	4.730	4.657	
R	0.357	1.137	0.193	0.226	

3 结论

本文提供的热回流法提取具有操作方法简便、设备要求低、效率高等优势, 可为富含绿原酸的植物高值化利用提供有效手段. 本研究以乙醇-水溶液为提取试剂考察绿原酸最佳提取条件, 结合单因素考察和正交试验结果, 优化金银花绿原酸提取最佳条件, 并确定其提取参数, 提高了绿原酸的收率, 可为规模化生产及综合利用提供理论依据.

参考文献:

[1] 贾文杰. 金银花研究进展[J]. 吉林农业, 2012(8): 223-224. [JIA Wen-jie. Advances in research on Ionicerae[J]. Jilin Agriculture, 2012 (8): 223-224.]

[2] 刘军海, 裴爱泳. 绿原酸及其提取纯化和应用前景[J]. 粮食与油脂, 2003, 16(9): 44-46. [LIU Jun-hai, QIU Ai-yong. Application and extraction, purifying technology of chlorogenic acid[J]. Journal of Cer-

- eals & Oils, 2003, 16 (9): 44-46.]
- [3] 郝梦超, 安超娜, 王乙颖, 刘伟, 刘二奴, 吴睿, 刘存芳, 田光辉. 金银花黄酮的提取工艺及其药理活性研究进展[J]. 饮料工业, 2022, 25(5): 71-75. [HAO Meng-chao, AN Chao-na, WANG Yi-ying, LIU Wei, LIU Er-nu, WU Rui, LIU Cun-fang, TIAN Guang-hui. Research prospect on extraction and pharmacological activity of flavonoids from *lonicerae japonica* [J]. Beverage Industry, 2022, 25 (5): 71-75.]
- [4] 孔凡建, 刘然. HPLC法测定复方金银花颗粒中木犀草苷的含量[J]. 云南中医中药杂志, 2021, 42(2): 71-74. [KONG Fan-jian, LIU Ran. Determination of luteolin in compound Honeysuckle granules by HPLC[J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2021, 42 (2): 71-74.]
- [5] 王燕, 卢恒, 邹晓菊, 王晓, 李丽丽. 金银花中绿原酸提取分离纯化方法研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(8): 186-189. [WANG Yan, LU Heng, ZOU Xiao-ju, WANG Xiao, LI Li-li. Research progress on extraction, separation and purification of chlorogenic acid in Jinyinhua(*lonicerae japonicae flos*) [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2022, 40 (8): 186-189.]
- [6] 周志娥, 罗秋水, 熊建华, 汤凯洁. 绿原酸、异绿原酸A对大肠杆菌的抑菌机制[J]. 食品科技, 2014, 39(3): 228-232. [ZHOU Zhi-e, LUO Qiu-shui, XIONG Jian-hua, TANG Kai-jie. Antimicrobial mechanisms of 3-O-caffeoyl quinic acid and 3, 5-di-O-caffeoyl quinic acid against *Escherichia coli* [J]. Food Science and Technology, 2014, 39 (3): 228-232.]
- [7] 张艳杰. 金银花提取物功能性质的研究进展[J]. 农产品加工, 2022(16): 79-83. [ZHANG Yan-jie. Research progress of honeysuckle extract functional properties[J]. Farm Products Processing, 2022 (16): 79-83.]
- [8] 吴书博. 通渭县金银花产业效益分析及发展前景[J]. 农业科技与信息, 2022(19): 107-109. [WU Shu-bo. Benefit analysis and development prospect of honeysuckle industry in Tongwei county[J]. Agricultural Science-Technology and Information, 2022 (19): 107-109.]
- [9] 张浩, 叶静, 马长宏, 王海艳, 丛鑫, 王岫. 不同产地金银花中酚酸类含量的测定[J]. 人参研究, 2022, 34(5): 20-22. [ZHANG Hao, YE Jing, MA Chang-hong, WANG Hai-yan, CONG Xin, WANG Shen. Determination of phenolic acids in flos *lonicerae* from different habitats[J]. Ginseng Research, 2022, 34 (5): 20-22.]
- [10] 张雪, 郭东晓, 崔伟亮, 栾永福, 孙仟, 张德馨, 赵淑秀, 林永强, 刘青芝. 金银花炮制前后咖啡酰奎宁酸类成分变化[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(16): 1337-1343. [ZHANG Xue, GUO Dong-xiao, CUI Wei-liang, LUAN Yong-fu, SUN Qian, ZHANG De-xin, ZHAO Shu-xiu, LIN Yong-qiang, LIU Qing-zhi. Changes of caffeoylquinic acids in crude and processed *lonicera japonica* [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2022, 57 (16): 1337-1343.]
- [11] 吴卫华, 康桢, 欧阳冬生, 周宏灏. 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. [WU Wei-hua, KANG Zhen, OUYANG Dong-sheng, ZHOU Hong-hao. Progresses in the pharmacology of chlorogenic acid[J]. Natural Product Research and Development, 2006, 18 (4): 691-694.]
- [12] 邢丽娜, 周明眉, 李云, 石晓雯, 贾伟. 绿原酸及其肠道代谢产物对中枢神经系统疾病的作用和机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1044-1047. [XING Li-na, ZHOU Ming-mei, LI Yun, SHI Xiaowen, JIA Wei. Recent progress of potential effects and mechanisms of chlorogenic acid and its intestinal metabolites on central nervous system diseases[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40 (6): 1044-1047.]
- [13] Wu D H, Bao C Y, Li L H, Fu M L, Wang D S, Xie J Y, Gong X G. Chlorogenic acid protects against cholestatic liver injury in rats[J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2015, 129 (3): 177-182.
- [14] Peng B J, Zhu Q, Zhong Y L, Xu S H, Wang Z. Chlorogenic acid maintains glucose homeostasis through modulating the expression of SGLT-1, GLUT-2, and PLG in different intestinal segments of sprague-dawley rats fed a high-fat diet[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2015, 28 (12): 894-903.
- [15] 李泽昱, 孟小玲, 马秀琴, 李欠. 金银花中绿原酸的不同提取方法比较[J]. 农业科技与信息, 2019(16): 48-50, 52. [LI Ze-yu, MENG Xiao-ling, MA Xiu-qin, LI Qian. Comparison of different extraction methods of chlorogenic acid from *lonicerae flos* [J]. Agricultural Science-Technology and Information, 2019 (16): 48-50, 52.]
- [16] 丁敏, 王丽玲, 秦玉川, 刘本同, 黄旭波, 童晓青, 方茹, 王衍彬. 金银花中绿原酸的水提取工艺研究[J]. 浙江林业科技, 2022, 42(2): 15-20. [DING Min, WANG Li-ling, QIN Yu-chuan, LIU Ben-tong, HUANG Xu-bo, TONG Xiao-qing, FANG Ru,

- WANG Yan-bin. Extraction technology of Chlorogenic Acid from *Lonicera japonica* with water as solvent[J]. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 2022, 42 (2): 15-20.]
- [17] 何军. 超声辅助醇提商洛金银花绿原酸工艺优化[J]. *湖北农业科学*, 2020, 59(2): 145-148. [HE Jun. Process optimization of chlorogenic acid in honeysuckle of Shangluo by ultrasound-assisted alcohol extraction[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2020, 59 (2): 145-148.]
- [18] 朱国健, 田帅承, 何宁. 超声回流法提取金银花中绿原酸最佳工艺条件探究[J]. *南方农业*, 2020, 14(6): 126-127. [ZHU Guo-jian, TIAN Shuai-cheng, HE Ning. Extraction of chlorogenic acid from flos *Lonicera* by ultrasonic reflux method[J]. *South China Agriculture*, 2020, 14 (6): 126-127.]
- [19] 李杰, 杨晖, 和素娜, 王学亭. 溶剂热法提取金银花中绿原酸的工艺研究[J]. *中国食品添加剂*, 2015(7): 129-133. [LI Jie, YANG Hui, HE Su-na, WANG Xue-ting. Study on solvothermal extraction of chlorogenic acid from flos *Lonicera*[J]. *China Food Additives*, 2015 (7): 129-133.]
- [20] 石艳宾, 李文静. 响应面优化金银花绿原酸提取工艺及抗氧化作用研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(21): 152-158. [SHI Yan-bin, LI Wen-jing. Optimization on extraction technology of chlorogenic acid from *Lonicera japonica* by RSM and antioxidant activity[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40 (21): 152-158.]

声明

本刊许可中国学术期刊(光盘版)等数字化传播的声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)、超星全文“域出版”期刊、《中文科技期刊数据库》、《中国终身教育学术研究数据库》、《中国科研仪器案例成果数据库》和《万方数据-数字化期刊群》在其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。该社著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我社上述声明。

《分析测试技术与仪器》编辑部