

山银花中绿原酸类化合物的提取工艺优化

涂晓琴, 杨柳, 罗艳*

(湖南省药品检验研究院, 长沙 410001)

摘要: **目的** 优化山银花中绿原酸类化合物的提取工艺。**方法** 取一定量粉碎过筛后的山银花, 通过单因素实验比较提取溶剂、提取料液比及提取次数对提取物的影响, 以绿原酸类化合物的含量及干膏得率为评定指标, 探讨适宜的提取工艺。**结果** 以水为提取溶剂, 按料液比 1:20(m:V)煎煮 2 次, 每次 1 h, 煎液过滤, 合并滤液, 减压浓缩至相对密度为 1.13~1.18(60 °C), 干燥后的山银花提取物, 绿原酸类化合物的含量(95.04%)及干膏得率(42.17%)均较高。**结论** 该提取方法简便可行, 可作为山银花的粗取工艺。

关键词: 山银花提取物; 提取工艺; 绿原酸类化合物; 干膏得率

Optimization of extraction technology of chlorogenic acid compounds from *Lonicerae flos*

TU Xiao-Qin, YANG Liu, LUO Yan*

(Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction technology of chlorogenic acid compounds from *Lonicerae flos*. **Methods** A certain amount of crushed and sifted *Lonicerae flos* were weighed accurately, the effect of extraction solvent, liquid to solid ratio and extraction time on *Lonicerae flos* extract were compared by single factor experiment, and then the suitable extraction technology was discussed based on the content of organic acids and dry cream yield. **Results** Using water as the solvent, cooked twice according to the ratio of material to liquid 1:20, each time for 1 h, filtered the decoction, combined the filtration, and concentrated under reduced pressure to a relative density of 1.13-1.18 (60 °C), then the *Lonicerae flos* extract was dried, the content of chlorogenic acid compounds (95.04%) and the dry cream yield (42.17%) were higher. **Conclusion** The extraction method is simple and feasible, and can be used as the extraction process of *Lonicerae flos*.

KEY WORDS: *Lonicerae flos* extract; extraction technology; chlorogenic acid compounds; dry cream yield

1 引言

以植物为原料, 采用物理化学和生物化学等手段分离纯化出的一种或多种有效成分形成的以生物小分子和高分子为主体的植物产品, 被称为植物提取物(plant extracts, PE)^[1]。植物中有效成分的提取分离技术是根据植物中有效成分在不同条件下的存在状态、形状、溶解性等物理和化

学性质来确定的, 广泛使用的分离技术主要为传统分离法(水蒸气蒸馏法、升华法、冷浸法、沉淀法、渗漉法、煎煮法、索氏提取法等)^[2]。山银花具有优良的药理功效, 其提取物有清热解毒、凉散风热等功效, 广泛应用于医药、食品补充剂、功能性食品、饮料和化妆品等领域^[3,4]。

山银花中的主要功效成分包括有机酸类^[5]、三萜类^[6]及黄酮类^[7,8], 在山银花的提取研究中, 大多以绿原酸类化

*通讯作者: 罗艳, 副主任药师, 主要研究方向为保健食品及化妆品检验。E-mail: zly820601@163.com

*Corresponding author: LUO Yan, Associate Chief Pharmacist, Hunan Institute for Drug Control, No.60, Bayi Road, Furong District, Changsha 410001, China. E-mail: zly820601@163.com

合物含量作为评价指标,探究不同提取方法或条件的影响,刘欣等^[9]分别采用水提法、醇提法、酶解法、超声波法、微波法提取山银花中绿原酸,通过高效液相色谱法测定提取物中绿原酸的含量,赵程林等^[10]以提取物中绿原酸得率为考察指标,以高效液相色谱法为检测手段,设计正交试验,优化山银花中绿原酸的水提、醇提工艺。近些年关于山银花的提取方面的研究略有报道,但山银花提取物没有实行批准文号管理,没有固定的提取方法,故没有统一的质量评判标准,市售的山银花提取物原料来源不明确,虽然附注了提取工艺,但存在以茎叶投料问题和提取工艺的真实性问题。

《中国药典》2015年版一部中暂未有品种使用山银花提取物,但有2个系列的中成药(银黄系列和茵栀黄系列)处方中使用了金银花提取物,并提供了相应制法^[9]。在提取步骤中,涉及的提取溶剂主要有水和不同浓度的乙醇(30%和15%);在浓缩精制步骤中,由于药典制剂通则规定,剂型不同则处理方式不同^[11]。

本研究以湘产山银花为原料,以绿原酸类化合物的含量及干膏得率为指标,优化山银花中绿原酸类化合物的提取工艺,为山银花活性成分的开发利用提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 试剂与材料

乙腈、甲醇(色谱纯,美国Sigma公司);磷酸(优级纯)、乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);新绿原酸(纯度:99.9%)、绿原酸(纯度:99.7%)、隐绿原酸(纯度:99.72%)、咖啡酸(纯度:98.1%)、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸(纯度:98.6%)、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸(纯度:98.7%)和4,5-O-二咖啡酰奎宁酸(纯度:98.53%)(上海安谱实验科技股份有限公司)。超纯水由实验室制得。

山银花原料购自湖南鸿利药业有限公司(湖南省邵阳市隆回县小沙江镇)。

2.2 实验仪器

Ultimate 3000 高效液相色谱仪(带 DAD 检测器,美国 Thermofisher 公司);TB-215D 电子分析天平(北京赛多利斯公司);SB25-12 超声波清洗仪(天津泰林智慧科技有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 对照品溶液的制备

分别精密称取适量新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸和4,5-O-二咖啡酰奎宁酸对照品,分别置于25 mL 量瓶中,甲醇定容配制浓度分别为505.894、472.179、505.381、430.855、419.642、498.632和344.067 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品标准储备溶液。

精密吸取新绿原酸0.05、0.1、0.2、0.5、0.8、1.0 mL 分别置于6个10 mL 容量瓶中,分别精密吸取绿原酸(0.5、0.8、1.0、2.0、2.5、3.0 mL)、隐绿原酸(0.05、0.1、0.2、0.5、0.8、1.0 mL)、咖啡酸(0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL)、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸(0.05、0.1、0.2、0.5、0.8、1.0 mL)、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸(0.05、0.1、0.3、0.8、1.0、1.5 mL)、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸(0.05、0.1、0.2、0.5、0.8、1.0 mL) 依次置于上述6个10 mL 容量瓶中,以50%甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,得7种有机酸的系列混合对照品溶液。

2.3.2 干膏提取得率的测定方法

精密量取3.2绿原酸类化合物的含量测定方法项下供试品溶液的制备项下的续滤液25 mL,置于干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥3 h,置干燥器中冷却30 min,迅速精密称定重量。以干燥品计算供试品中浸出物的含量(%)。

2.3.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱 Acclaim 120 C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);以乙腈为流动相A,0.4%磷酸溶液为流动相B,进行梯度洗(洗脱程序:0~15 min, 5~20% A; 15~30 min, 20%~30% A; 30~40 min, 30% A)。流速为1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;进样量为10 μL ;柱温为25 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为327 nm。

3 结果与分析

3.1 线性关系考察

精密吸取7种有机酸系列混合对照品溶液各10 μL ,注入高效液相色谱仪,测定,以峰面积为纵坐标,进样浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,绘制标准曲线。各成分线性方程、相关系数及线性范围见表1。

3.2 绿原酸类化合物的含量测定

(1) 提取溶剂的选择

取过四号筛(65目)的山银花粉末约0.2 g,精密称定,置3个具塞锥形瓶中,分别精密加入水、50%甲醇和甲醇各50 mL,密塞,称定重量,超声处理(300 W, 40 kHz) 40 min,放冷,再称定重量,分别用各自的溶剂补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液,即得。精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,测定并计算,结果见表2。从表2可知,分别用上述3种溶剂提取供试品,50%甲醇提取所得供试品含量结果最高,因此选择50%甲醇为提取溶剂。

(2) 提取方法的选择

取过四号筛(65目)的山银花粉末约0.2 g,精密称定,置2个具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 mL,密塞,称定重量,分别超声处理(300 W, 40 kHz)和加热回流40 min,放冷,再称定重量,用50%甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液,即得。精密吸取对照品溶液及上述供试品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,测定并计算,结果见

表3。虽然回流提取的样品含量测定结果比超声提取略高,但两者无显著差异[相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为3.2%],说明2种提取方法均能将供试品中的有机酸基本提取完全,故选择操作相对简单的超声处理为提取方法。

(3) 提取时间选择

取过四号筛(65目)的山银花粉末约0.2 g,置具塞锥形

瓶中,精密加入50%甲醇50 mL,密塞,称定重量,分别超声处理(300 W, 40 kHz)30、40及50 min,放冷,再称定重量,用50%甲醇补足减失的重量,过滤,取续滤液,即得。精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μ L,注入液相色谱仪,测定并计算,结果见表4。超声提取40 min样品测定的含量结果最高,因此选择提取时间为40 min。

表1 线性方程、相关系数及线性范围
Table 1 Linear equations, correlation coefficients and effective components

成分	线性方程	相关系数	线性范围/(μ g/mL)
新绿原酸	$Y_1=0.3499X+0.0213$	0.9999	2.53~50.59
绿原酸	$Y_2=0.4219X-0.8113$	0.9998	23.61~141.65
隐绿原酸	$Y_3=0.3717X+0.0601$	0.9999	2.53~50.54
咖啡酸	$Y_4=0.6946X+0.0735$	0.9999	2.15~21.54
3,4-O-二咖啡酰奎宁酸	$Y_5=0.4185X-0.0879$	0.9998	2.10~41.96
3,5-O-二咖啡酰奎宁酸	$Y_6=0.5180X-0.0246$	0.9999	2.49~74.79
4,5-O-二咖啡酰奎宁酸	$Y_7=0.4915X-0.00047$	1.0000	1.72~34.41

表2 提取溶剂选择结果比较表
Table 2 Organic acids comparison of different extraction solvent

取样量/g	提取溶剂	含量/%							总量/%
		新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	3,4-O-二咖啡酰奎宁酸	3,5-O-二咖啡酰奎宁酸	4,5-O-二咖啡酰奎宁酸	
0.2009	水	0.439	2.995	0.174	0.050	0.023	0.395	0.067	4.143
0.2008	50%甲醇	0.534	3.523	0.192	0.061	0.088	2.199	0.375	6.972
0.2002	甲醇	0.374	2.553	0.121	0.065	0.066	1.845	0.293	5.317

表3 提取方法选择结果比较表
Table 3 Organic acids comparison of different extraction method

取样量/g	提取方法	含量/%							总量/%
		新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	3,4-O-二咖啡酰奎宁酸	3,5-O-二咖啡酰奎宁酸	4,5-O-二咖啡酰奎宁酸	
0.2025	超声	0.483	3.396	0.191	0.068	0.067	1.623	1.458	7.285
0.2037	回流	0.470	3.400	0.224	0.071	0.097	1.816	1.449	7.527

表4 提取时间选择结果比较表
Table 4 Organic acids comparison of different extraction time

取样量/g	提取时间/min	含量/%							总量/%
		新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	3,4-O-二咖啡酰奎宁酸	3,5-O-二咖啡酰奎宁酸	4,5-O-二咖啡酰奎宁酸	
0.2037	30	0.475	3.384	0.195	0.068	0.061	1.394	1.449	7.026
0.2025	40	0.483	3.396	0.191	0.068	0.067	1.623	1.458	7.286
0.1998	50	0.474	2.449	0.196	0.068	0.073	1.715	1.476	6.451

综合上述3个方面的考察结果,供试品溶液的制备方法确定为:取本品粉末(过四号筛)约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 mL,密塞,称定重量,超声处理(300 W, 40 kHz)40 min,放冷,再称定重量,用50%甲醇补足减失的重量,过滤,取续滤液,即得。

3.3 山银花提取物提取工艺指标确定

3.3.1 山银花提取物溶剂考察

按干燥品计,以绿原酸类化合物的含量和干膏得率为考察指标,对水、15%乙醇和30%乙醇进行了提取溶剂的考察。以水为提取溶剂采用水煎煮法;以15%乙醇和30%乙醇提取则采用回流提取法。不同提取溶剂绿原酸类化合物的含量考察结果详见表5,不同提取溶剂干膏得率考察结果详见表6。

从表5、6可知,无论是绿原酸类化合物的含量还是干膏得率,30%乙醇回流提取优于水煎煮,水煎煮优于15%乙醇回流提取。从30%乙醇回流提取和水煎煮比较来看,在绿原酸类化合物的提取含量上,前者比后者提高3.8%;在干膏得率上,前者比后者提高3.9%,与提取成本相比较,30%乙醇回流提取优势并不明显,因此,综合考虑提取率与工艺大生产的生产成本,拟定提取溶剂为水提。

3.3.2 山银花提取物提取料液比考察

试验按干燥品计,以绿原酸类化合物的含量为考察指标,提取溶剂为水提,提取料液比分别考察1:10、1:15和1:20(m:V),结果见表7。从表7可知,料液比为1:20(m:V)时,绿原酸类化合物的含量显著高于料液比为1:10和1:15(m:V)。因此,选择提取料液比为1:20(m:V)。

3.3.3 山银花提取物提取次数考察

试验按干燥品计,以绿原酸类化合物的含量为考察指标,提取料液比为1:20(m:V),每次提取1 h,提取次数分别考察1、2和3次,结果见表8。从表8可知,连续提取2次后,绿原酸类化合物提取总量已达95.04%,可以考虑基本提取完全。因此,提取次数选择为2次。

4 结论与讨论

根据上述提取工艺考察,拟定自制山银花提取物提取工艺为:取山银花粉碎,过筛(65目),用水提取,按料液比1:20(m:V)煎煮2次,每次1 h,煎液滤过,滤液合并,减压浓缩至相对密度为1.13~1.18(60 °C),干燥,即得粗提取物。考虑到市场上不同提取物生产企业的提取工艺各不相同,部分工艺还涉及到精制过程(如绿原酸含量达20%以上的需要进行柱层析)。因此,仅对工艺过程的主要步骤进

表5 不同提取溶剂绿原酸类化合物的含量
Table 5 Organic acids content of different extraction solvent

提取溶剂	水	15%乙醇	30%乙醇
取样量/g	0.4896	0.5007	0.4993
新绿原酸/%	0.431	0.444	0.457
绿原酸/%	2.957	2.954	3.254
隐绿原酸/%	0.350	0.368	0.294
咖啡酸/%	0.047	0.050	0.051
3,4-二咖啡酰奎宁酸/%	0.152	0.188	0.162
3,5-二咖啡酰奎宁酸/%	0.669	0.788	0.970
4,5-二咖啡酰奎宁酸/%	1.208	1.181	0.382
总量/%	6.304	6.474	6.069
平均/%	6.389	5.931	6.632

表6 不同提取溶剂干膏得率考察
Table 6 Dry cream yield of different extraction solvent

提取溶剂	水	15%乙醇	30%乙醇
空蒸发皿/g	41.9347	37.5062	15.5732
取样量/g	0.5000	0.5007	0.4993
称重/g	42.0396	37.6123	15.6749
得率/%	41.96	42.38	40.74
平均/%	42.17	40.32	43.83

表7 不同提取液比绿原酸类化合物的含量考察
Table 7 Organic acids content of different liquid to solid ratios

料液比	1:10(m:V)	1:15(m:V)	1:20(m:V)
取样量/g	2.5069	2.4974	2.5382
新绿原酸/%	0.405	0.448	0.512
绿原酸/%	3.086	3.524	3.928
隐绿原酸/%	0.339	0.259	0.433
咖啡酸/%	0.042	0.029	0.096
3,4-二咖啡酰奎宁酸/%	0.162	0.126	0.237
3,5-二咖啡酰奎宁酸/%	0.855	1.114	1.510
4,5-二咖啡酰奎宁酸/%	0.325	0.289	0.540
总量/%	5.214	5.814	7.256

表8 不同提取次数绿原酸类化合物的含量考察
Table 8 Organic acids content of different extraction times

提取次数	1次	2次	3次
取样量/g	2.5251	2.5251	2.5251
新绿原酸/%	0.528	0.085	0.021
绿原酸/%	4.099	0.734	0.185
隐绿原酸/%	0.406	0.073	0.019
咖啡酸/%	0.113	0.028	0.006
3,4-二咖啡酰奎宁酸/%	0.227	0.088	0.026
3,5-二咖啡酰奎宁酸/%	1.828	0.675	0.179
4,5-二咖啡酰奎宁酸/%	0.540	0.238	0.068
总量/%	7.741	1.921	0.504
3次总提取率/%		10.167	
各次提取率占比/%	76.14	18.90	4.96

行了规定。即:山银花→粉碎→提取→过滤→浓缩→精制→干燥→产品。

山银花,尤其是灰毡毛忍冬种质资源丰富,药理作用多样,安全无毒。山银花除可供药用外,还可作为保健食品原料进行深加工开发,但目前对其研究很不系统,基础研究工作相对薄弱,综合开发利用相对欠缺。目前对山银花的研究,主要集中在处理方式对绿原酸活性的影响^[12]及与金银花的研究对比上^[13-15],而缺乏全面、深入、系统的研究,尤其是深入的基础研究和临床应用研究。山银花经提取处理后,其有机酸及其他功效成分含量会有所改变,其生理功效也有待进一步研究。目前市售的山银花提取物没有固定的提取方法和质量标准,由于对实际生产中山银花提取物的精制步骤不清楚,本研究初步探究山银花的粗提工艺,为山银花提取物的综合开发利用提供科学依据。

参考文献

- 张莹,祖元刚,陈小强,等.中国植物提取物的形成与发展策略[J].现代化工,2010,30(3):9-16.
Zhang Y, Zu YG, Chen XQ, et al. Formation and development strategies of plant extract industry in China [J]. Mod Chem Ind, 2010, 30(3): 9-16.
- 周佳儒,李久明,徐宁,等.天然植物中有效成分的提取、分离技术研究进展[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2018,33(1):14-18.
Zhou JR, Li JM, Xu N, et al. Progress in extraction and separation of effective components from natural plants [J]. J Inner Mongolia Univ Nat (Nat Sci Ed), 2018, 33(1): 14-18.
- 刘婧慧.金银花与山银花质量评价及安全性对比研究[D].北京:北京中医药大学,2014.
Liu JH. Comparative study on quality evaluation and safety of *Lonicera japonica* and *Lonicera macranthoides* [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2014.
- 杨斌,丘岳,王柳萍,等.广西山银花绿原酸体外抗炎作用及分子机制研究[J].中国药理学通报,2009,25(4):542-545.
Yang B, Qiu Y, Wang LP, et al. Studies on the anti-inflammatory molecular mechanism of chlorogenic acid extracted from *Lonicera confusa* DC *in vitro* [J]. Chin Pharmacol Bull, 2009, 25(4): 542-545.
- 王亚丹,何轶,戴忠,等.HPLC-MS/MS法同时测定山银花中7个有机酸的含量[J].药物分析杂志,2016,36(6):998-1005.
Wang YD, He Y, Dai Z, et al. Simultaneous determination of seven organic acids in *Lonicerae flos* using HPLC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(6): 998-1005.
- 孙玲,樊晓兰,郭琦,等.一测多评法同时测定山银花药材中5种皂苷类成分的含量[J].中国药房,2017,28(18):2546-2549.
Sun L, Pan XL, Guo Q, et al. Simultaneous determination of 5 saponins in *Lonicerae flos* by QAMS method [J]. China Pharm, 2017, 28(18): 2546-2549.
- 陈雨,冯煦,贾晓东,等.灰毡毛忍冬花蕾的化学成分研究[J].中草药,2008,39(6):823-825.
Chen Y, Feng X, Jia XD, et al. Study on chemical constituents in flower bud of *Lonicera macranthoides* [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2008, 39(6): 823-825.
- Sun MY, Feng X, Lin X, et al. Studies on the chemical constituents from stems and leaves of *Lonicera macranthoides* [J]. J Chin Med Mater, 2011, 34(2): 218-220.
- 刘欣,陈玉保,胡佑帆,等.山银花绿原酸提取方法的比较[J].化学与生物工程,2015,32(4):67-70.
Liu X, Chen YB, Hu YF, et al. Comparison of extraction methods of chlorogenic acid from *Lonicera confusa* [J]. Chem Bioeng, 2015, 32(4): 67-70.
- 赵程林,林冰,赵珊,等.正交试验优化山银花中绿原酸的提取工艺[J].山地农业生物学报,2014,33(2):92-94.
Zhao CL, Lin B, Zhao S, et al. Optimization the extraction process of chlorogenic acid in *Lonicera confusa* by orthogonal test [J]. J Mt Agric Biol, 2014, 33(2): 92-94.
- 国家药典委员会.中国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- 刘亚敏,刘玉民,李琼,等.超声辅助提取山银花绿原酸工艺及其抗

氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 1(35): 186-190.

Liu YM, Liu YM, Li Q, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of chlorogenic acid from *Lonicera macranthoides* Hand-Mazz [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 1(35): 186-190.

- [13] 熊艳, 朱晶晶, 王智民, 等. 金银花与山银花 HPLC 指纹图谱比较研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9): 90-93.

Xiong Y, Zhu JJ, Wang ZM, *et al.* Comparison of HPLC fingerprint profiles of *Lonicera japonica* and *Lonicera confuse* DC [J]. J TCM Univ Hunan, 2010, 30(9): 90-93.

- [14] 刘敏彦, 高淑丽, 刘丽华, 等. HPLC 法同时测定不同产地金银花和山银花中 6 种有机酸成分[J]. 中药材, 2013, 36(2): 196-198.

Liu YM, Gao SL, Liu LH, *et al.* Simultaneous determination of six organic acids in *Lonicera Japonicae flos* and *Lonicerae flos* in different habitats by HPLC [J]. J Chin Mater, 2013, 36(2): 196-198.

- [15] 林永强, 王淑华, 徐丽华, 等. 金银花与山银花的鉴别方法研究[J]. 药学研究, 2013, 32(2): 69-71.

Lin YQ, Wang SH, Xu LH, *et al.* Study on identification method for *Lonicerae japonicae flos* and *Lonicerae flos* [J]. J Pharm Res, 2013, 32(2): 69-71.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



涂晓琴, 硕士, 食品工程师, 主要研究方向为保健食品及化妆品检验。
E-mail: 305178299@qq.com



罗艳, 副主任药师, 主要研究方向为保健食品及化妆品检验。
E-mail: zly820601@163.com