

# 高效率高纯度绿原酸制备工艺研究

陈媛\*, 唐铁鑫, 陈金龙, 蒋林\*

中山大学药学院生药与天然药物化学实验室, 广州 510006

**摘要:** 建立从山银花中制备绿原酸标准品的方法, 并提高绿原酸产率。通过正交试验优化传统水提法和碱水冷提法工艺, 并对 D101 大孔树脂纯化条件、乙酸乙酯萃取次数、结晶溶剂进行优化。通过研究, 最佳提取条件为: 提取溶剂 pH = 10 的碱水, 提取时间 1 h, 料液比 1:30, 提取率为 7.2%; D101 大孔树脂洗脱溶剂: 10% 乙醇洗脱液纯度最高, 30% 乙醇洗脱液得率最高; 最佳萃取次数 5 次; 最佳结晶溶剂: 水饱和和乙酸乙酯。本研究通过创新的提取和纯化条件, 得到纯度 98.7% 的绿原酸, 得率 18.4 mg/g, 纯度和得率都高于现有文献记载, 且常温快速提取, 能耗明显下降, 适用于工业规模高纯度绿原酸生产。

**关键词:** 绿原酸; 山银花; 碱水; D101 大孔树脂; 结晶

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Preparation of Highly Pure Chlorogenic Acid from *Lonicera confusa*

CHEN Yuan\*, TANG Tie-xin, CHEN Jin-long, JIANG Lin\*

School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** This work aimed to establish an efficient method for the preparation of highly pure chlorogenic acid from *Lonicera confusa*. Two extraction methods, conventional water extraction and alkaline water extraction at ambient temperature, were optimized by orthogonal experimental design. The purification processes using D101 macroporous resin, ethyl acetate liquid-liquid extraction, solvent crystallization were also optimized. Maximum extraction yield of 7.2% chlorogenic acid was achieved by using alkaline water at pH = 10 as solvent, extraction time of 1 h, and solid-to-liquid ratio of 1:30. As to the eluent of D101 macroporous resin, eluate of best purity was achieved by using 10% aqueous ethanol, and eluate of highest chlorogenic acid content was achieved by using 30% aqueous ethanol. It was optimized to perform liquid-liquid extraction for 5 times. Ethyl acetate saturated with water was the best solvent for crystallization. With the developed extraction and purification methods, chlorogenic acid at the purity of 98.7% with a yield of 1.84% was achieved. The purity and yield were better than those recorded in other reported methods. Moreover, the extraction was performed at ambient temperature in a short period of time and significantly reduced the energy consumption. Hence, it was suitable for large-scale industrial production.

**Key words:** chlorogenic acid; *Lonicera confusa*; alkaline water extraction; D101 macroporous resin; crystallization

山银花, 忍冬科植物山银花 *Lonicera confusa* DC.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.、毛柱忍冬 *Lonicera dasystyla* Rehd.、灰毡毛忍冬 *Lonicera maeranthoides* Hand-Mazz. 或华南忍冬 *Lonicera confusa*. 的干燥花蕾及带初开的花朵, 具有清热解毒、发散风热的功效。山银花和金银花成分差异较大, 金银花有效成分以木犀草苷为主, 山银花木犀草苷含量甚少, 主要以绿原酸为主, 2005 年版和现行 2010 年版

《中国药典》, 均将“金银花”与“山银花”分列为两种中药材<sup>[1]</sup>。两者价格也有很大差异, 作为提取绿原酸的原料, 价格较低且绿原酸含量高<sup>[2]</sup>的山银花具有明显优势, 且有利于山银花的深加工和开发利用。

绿原酸, 又名咖啡鞣酸, 属酚类化合物, 是一种重要的生物活性物质, 有研究成果表明其具有抗菌、抗病毒、增高白血球、保肝利胆、抗肿瘤、降血压、降血脂、抗氧化及兴奋中枢神经系统等多种药理作用。除了药用外, 绿原酸亦可以作为某些高级化妆品的添加剂、植物生长激素及食品添加剂等, 因此绿原酸是食品、药品、化妆品等工业的重要原料<sup>[3]</sup>。正因

为绿原酸的广泛应用和良好的经济效益,开发出制备高纯度绿原酸的方法具有重要意义。

传统的绿原酸制备方法,多采用水提法<sup>[4,5]</sup>和稀醇回流提取<sup>[5]</sup>。水提法提取温度高、时间长,提取率低;稀醇提取法虽然提取率较高,但不利于后续处理,且提取成本较高;本文采用的碱水提取法,常温操作,提取时间短,能耗低,得率比水提法显著提高。现有方法虽也采用 D101 大孔树脂富集绿原酸,但多以 70% 以上高浓度乙醇洗脱,得到绿原酸纯度较低的洗脱液,再采用聚酰胺<sup>[4]</sup>、反渗透膜<sup>[5]</sup>、多级树脂<sup>[6]</sup>、硅胶<sup>[7]</sup>、纳滤膜<sup>[8]</sup>等方法纯化,操作繁琐,耗时长,损失大、成本高;本文创造性的通过优化 D101 树脂洗脱剂,直接获得绿原酸纯度 70% 以上的洗脱液,再通过萃取、结晶,获得纯度 98.0% 以上绿原酸,样品损失少;缩短操作时间,24 h 内既能制备完毕;常温操作,减少能耗;未涉及复杂操作和仪器,成本低廉,非常适用于工业化生产。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

HPLC 色谱仪:LC-20AB 泵、SIL-20A 自动进样器、SPD-M20A 二极管阵列检测器(日本岛津公司),TGL-16B 安科离心机(上海安亭科学仪器公司),SB25-12DTD 型超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),电子天平(METTLER TOLEDO,0.1 mg),CA-1111 型冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司),SB-2000 型水浴锅(上海爱朗仪器有限公司),SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司),N-1001 型旋转蒸发仪(上海爱朗),DZG-6020 型真空干燥箱(上海森信实验设备有限公司)。

### 1.2 材料

山银花粉末(广西金昊生物科技有限公司),绿原酸对照品(批号:109403-1313098 阿拉丁),乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司)为色谱纯,氢氧

化钠、盐酸、磷酸(广州化学试剂厂)、无水乙醇(天津致远化学试剂有限公司)、乙酸乙酯(天津大茂化学试剂厂)等为分析纯,水为市售纯净水。

## 2 实验方法

### 2.1 含量测定方法

根据中国药典(2010 版)方法测定绿原酸含量<sup>[9]</sup>。

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱:Dikma 公司 Diamonsil-C<sub>18</sub> 柱(250 × 4.6 mm);柱温:25 °C;流动相:乙腈-0.4% 磷酸(13:87);流速:1 mL/min;检测波长:327 nm。

#### 2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取在 50 °C 真空干燥至恒重的绿原酸对照品 5 mg,置 10 L 棕色容量瓶中,加甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 1 mL,置 10 mL 棕色容量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 中含绿原酸 50 μg)。

#### 2.1.3 标准曲线的制备

精密吸取对照品溶液(50 μg/mL)2、4、8、12、16、20 μL,分别注入液相色谱仪,以绿原酸对照品的量为因变量(X),以绿原酸峰面积为自变量(Y),计算回归方程为: $Y = 2946.2X, r = 1$ 。结果表明绿原酸在 100 ~ 1000 μg 范围内呈良好线性关系。

#### 2.1.4 供试品溶液的测定

将各项下提取液、洗脱液、萃取液浓缩至干,精密称定各浓缩物 10 mg 于 10 mL 容量瓶中,50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜过滤后,得样品溶液。

### 2.2 提取工艺优化

#### 2.2.1 传统水提法

通过正交试验,对 pH、温度、提取时间三个因素进行考察,并确定水平值(表 1),选定 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交试验表,进行水提法提取条件优化试验。

表 1 正交因素水平表(热提法)

Table 1 Factors and levels of orthogonal test(conventional water extraction)

水平 Level	因素 Factor		
	pH 值 pH value	温度 Temperature( °C )	时间 Extraction time( min )
1	2	55	60
2	5	75	90
3	7	95	120

称取山银花粉末 10 g 9 份,加水搅拌提取 2 次,料液比为 1:12 和 1:8,合并提取液,离心,取上清液,采用 2.1 项下方法检测。

### 2.2.2 碱水冷提法

通过正交试验,对 pH、料液比、提取时间三个因

素进行考察,并确定水平值(表 2),选定  $L_9(3^3)$  正交试验表,进行水提法提取条件优化试验。

称取山银花粉末 10 g 9 份,常温搅拌提取,离心,取上清液,采用 2.1 项下方法检测。

表 2 正交因素水平表(碱水冷提法)

Table 2 Factors and levels of orthogonal test (alkaline water extraction)

水平 Level	因素 Factor		
	pH pH value	时间 Extraction time(min)	料液比 Solid/Liquid
1	8	30	1:20
2	10	60	1:30
3	13	90	1:40

### 2.3 D101 大孔树脂洗脱剂优化

称取山银花粉末 50 g 4 份,在最佳提取条件下提取,离心后提取液用盐酸调 pH2,上大孔树脂,药材:树脂=1(M):4(V),用 pH2 水冲洗 3~5 BV 洗去杂质,再分别用 10%、30%、50%、70% 乙醇洗脱绿原酸,上样、洗柱、洗脱速度均为 2 BV/h<sup>[10]</sup>。

### 2.4 萃取次数优化

取 2.3 项下所得洗脱剂 55 °C 真空浓缩至约 40 mg/mL(绿原酸在水中溶解度为 4%),即 50 g 药材得 50 mL 浓缩液,1:1 乙酸乙酯萃取,分别检测每次萃取后乙酸乙酯层和水层绿原酸量。

### 2.5 结晶溶剂选择

取 2.4 项下萃取液合并浓缩至干,分为 4 份,三

份分别用甲醇、甲醇-水(1:1)、水饱和乙酸乙酯溶解重结晶,第四份用碱水溶解后加酸析出结晶,测定结晶纯度。

## 3 实验结果

### 3.1 热提法正交实验结果

根据热提法正交试验结果(表 3),各因素对实验结果的影响:pH > 时间 > 温度,且不同 pH 水提取的试验结果之间具有显著性差异。最佳提取条件为:pH=5 的水,95 °C,提取 2 次,每次 90min,在该条件下提取,得绿原酸 388 mg,验证了试验结果。

表 3 正交实验结果(热提法)

Table 3 Orthogonal test and results (conventional water extraction)

试验序号 No.	pH 值 pH value	温度 Temperature(°C)	时间 Extraction time(min)	绿原酸 Content of chlorogenic acid(mg)
1	1	1	1	344
2	1	2	2	361
3	1	3	3	358
4	2	1	2	382
5	2	2	3	379
6	2	3	1	384
7	3	1	3	371
8	3	2	1	362
9	3	3	2	381
$K_1$	1063	1097	1090	
$K_2$	1145	1102	1124	

$K_3$	1114	1123	1108
$P$	0.033	0.238	0.171

表4 正交试验方差表(热提法)

Table 4 Analysis of variance( conventional water extraction)

方差来源 Resource	自由度 DF	偏差平方和 Seq SS	$F$ 值 $F$ value	$P$ 值 $P$ value
pH 值 pH value	2	1172.76	29.52	0.033
温度 Temperature	2	127.40	3.21	0.238
时间 Extraction time	2	192.99	4.86	0.171

### 3.2 碱水冷提法实验结果

根据正交试验结果(表5),各因素对试验结果的影响:pH > 时间 > 料液比,且不同 pH 碱水水提取

的试验结果之间具有显著性差异。最佳提取条件为:pH = 10 的水,料液比 1:30,提取 1h,在该条件下提取,得绿原酸 726 mg,验证了试验结果。

表5 正交实验结果(碱水冷提法)

Table 5 Orthogonal test and results(alkaline water extraction)

试验序号 No.	pH pH value	时间 Extraction time( min)	料液比 Solid/Liquid	绿原酸 Content of chlorogenic acid( mg)
1	1	1	1	536
2	1	2	2	715
3	1	3	3	528
4	2	1	2	553
5	2	2	3	704
6	2	3	1	646
7	3	1	3	158
8	3	2	1	490
9	3	3	2	64
$K_1$	1779	1247	1627	
$K_2$	1903	1909	1332	
$K_3$	712	1238	1390	
$P$	0.050	0.123	0.375	

表6 正交试验方差表(碱水冷提法)

Table 6 Analysis of variance(alkaline water extraction)

方差来源 Resource	自由度 DF	偏差平方和 Seq SS	$F$ 值 $F$ value	$P$ 值 $P$ value
pH 值 pH value	2	281742	19.07	0.050
时间 Temperature	2	100611	7.11	0.123
料液比 Solid: liquid ratio	2	22976	1.67	0.375

### 3.3 传统水提法和碱水冷提法的比较

在最佳提取条件下,碱水冷提法得率是传统水

提法得率的 1.87 倍,得率显著提高,且在常温下提取,比之传统水提法在 95 °C 提取,能耗降低,提取时

间也缩短一半,具有显著优势。

### 3.4 D101 大孔树脂洗脱剂优化结果

不同浓度乙醇洗脱效果见表 7,从表中可看出,用 30% 乙醇洗脱得率最高,而 10% 乙醇洗脱纯度最高,从 HPLC 图(图 1)上也可以看出,10% 乙醇洗脱

液只有绿原酸和异绿原酸两个主要色谱峰,而 30%、50%、70% 乙醇洗脱液色谱图则有较多峰,不利于后续纯化,综合考虑纯度和得率,选取 10% 乙醇作为洗脱剂。

表 7 不同浓度乙醇洗脱效果

Table 7 Effect of different concentrations of alcohol on elution

乙醇浓度 Concentration of alcohol (%)	10	30	50	70
绿原酸洗脱量 Content of chlorogenic acid (mg)	2135	2541	2196	2213
绿原酸纯度 Purity of chlorogenic acid (%)	73.40	59.20	43.60	40.60

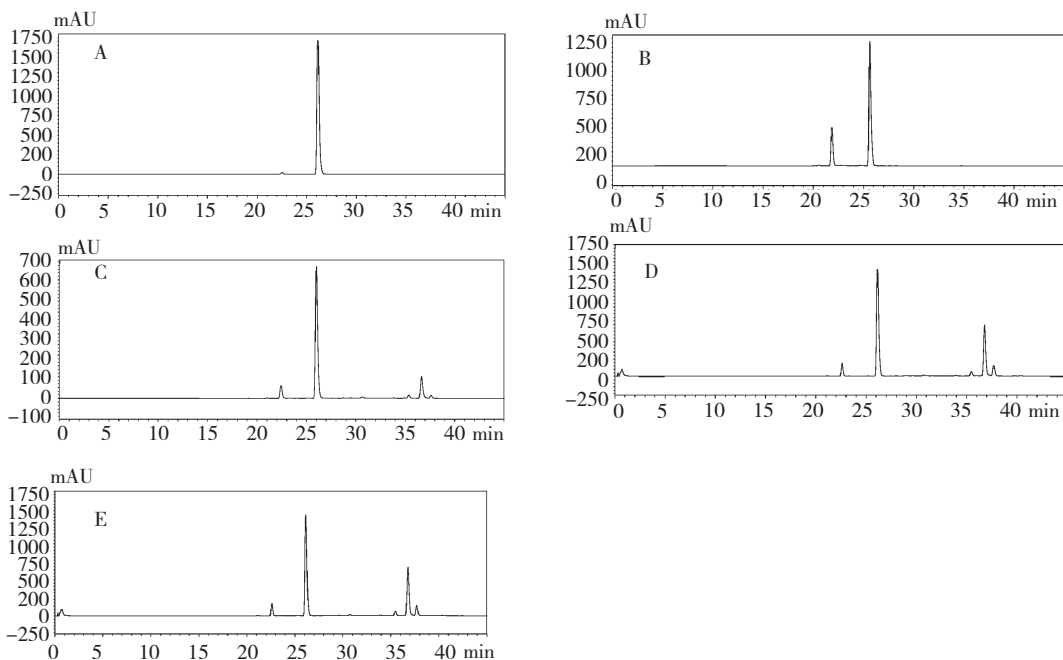


图 1 绿原酸对照品 (A)、10% 乙醇洗脱液 (B)、30% 乙醇洗脱液 (C)、50% 乙醇洗脱液 (D)、70% 乙醇洗脱液 (E) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of chlorogenic acid standard (A), 10% alcohol eluent (B), 30% alcohol eluent (C), 50% alcohol eluent (D) and 70% alcohol eluent (E)

### 3.5 萃取次数优化结果

从表 8 可以看出萃取 5 次后,绿原酸减少量较小且水层中残留量小,从节省溶剂和降低成本考虑,最佳萃取次数为 5 次。

乙酸乙酯萃取后,绿原酸纯度显著提高,从 HPLC 图(图 2)可以看到,10% 乙醇洗脱后有两个主要色谱峰,经萃取后,只剩下绿原酸的色谱峰。

表 8 萃取减少量和残留量

Table 8 The decrement and residual quantity of chlorogenic acid of each extraction

萃取次数 No.	绿原酸残留量 Residual quantity (mg)	减少量 Decrement (mg)
萃取前 Before liquid-liquid extraction	1816	
1	660	1156

2	564	96
3	441	123
4	312	129
5	205	107
6	134	71

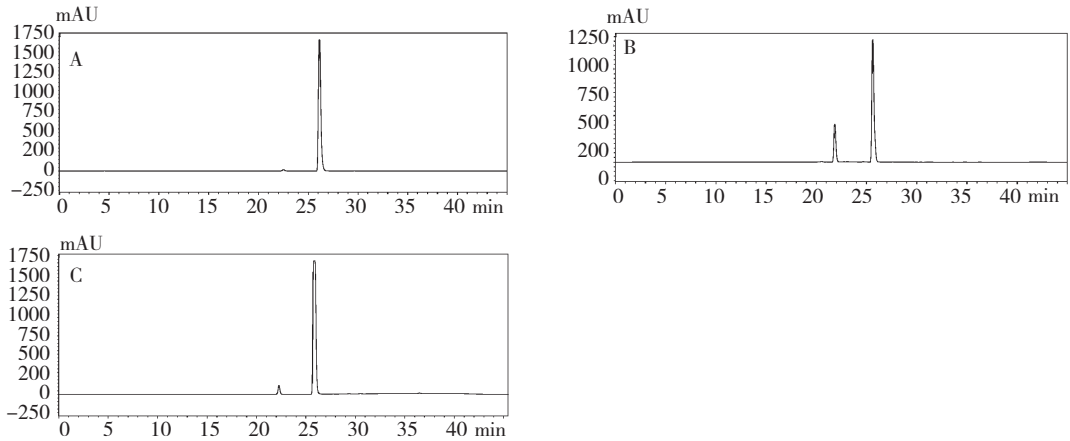


图2 绿原酸对照品(A)、萃取前溶液(B)、萃取后溶液(C)的HPLC图

Fig. 2 HPLC chromatograms of chlorogenic acid standard (A), liquid before extraction (B), liquid after extraction (C)

### 3.6 结晶溶剂选择

四种结晶溶剂所得结晶纯度见表9,析出结晶纯度:乙酸乙酯 > 碱水 > 甲醇 > 甲醇-水,析出结晶速度:碱水 > 乙酸乙酯 > 甲醇 > 甲醇-水,最佳溶剂为水饱和和乙酸乙酯,结晶用乙酸乙酯洗涤3次,离心后真空干燥,用HPLC测得纯度98.7%。

表9 结晶溶剂及纯度

Table 9 Crystallization solvent and purity of crystal

结晶溶剂 Crystallization solvent	纯度 Purity
甲醇:水 Methanol-water	89.16%
甲醇 Methanol	92.04%
碱水 Alkaline water	96.20%
水饱和和乙酸乙酯 Water saturated ethyl acetate	98.70%

### 3.7 得率

在最佳提取纯化结晶条件下,重复操作3次,计算绿原酸平均得率为1.84%。

### 3.8 结构鉴定

制得化合物白色结晶: mp. 208 °C; UV (H<sub>2</sub>O) λ<sub>max</sub>: 326 nm; <sup>13</sup>C NMR (H<sub>2</sub>O, 400MHz) A: 126.6 (C-1), 114.1 (C-2), 144.2 (C-3), 147.0 (C-4), 116.0 (C-5), 122.6 (C-6), 145.9 (C-7), 115.2 (C-8),

168.9 (C-9); B: 76.6 (C-1), 38.3 (C-2), 70.6 (C-3), 72.8 (C-4), 71.0 (C-5), 37.3 (C-6), 180.1 (C-7); <sup>1</sup>H NMR (MeOH, 400 MHz) δ: 7.51 (1H, d, J = 15 Hz, H-7), 6.20 (1H, d, J = 15 Hz, H-8), 7.11 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2), 6.96 (1H, dd, J = 2.1, 8.2 Hz, H-6), 6.79 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 5.21 (1H, m, H-3), 4.04 (1H, m, H-4), 3.49 (1H, m, H-5), 2.11-1.9 (2H, m, H-2, 6)。与文献报导的绿原酸核磁数据基本一致,鉴定为绿原酸<sup>[11]</sup>。

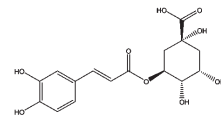


图3 绿原酸结构式

Fig. 3 Chemical structure of chlorogenic acid

## 4 讨论

绿原酸结构中具有羧基,有较强的酸性,在碱性条件下提取有利于绿原酸溶出,提取效果明显优于传统水提工艺,但是绿原酸结构中有酯键和多个酚羟基,在pH13条件下快速水解和氧化,绿原酸得率大幅下降,所以最适pH为8~10。

利用D101大孔树脂的选择吸附性,利用低浓

度醇进行洗脱,仅洗脱极性较大的两个主成分,提高洗脱液的纯度。避免用高浓度醇洗脱使多种杂质的同时洗脱而造成后续纯化困难。

用乙酸乙酯和碱溶酸沉析出结晶的速度很快,碱溶酸沉能立即析出结晶,乙酸乙酯也能在数小时内析出结晶;而用甲醇和甲醇水混合溶剂结晶,因绿原酸在溶剂中溶解度过大,结晶速度很慢,需 24 ~ 48 h,在长时间结晶过程中,绿原酸发生水解和氧化,导致结晶纯度下降。乙酸乙酯安全性高,结晶速度快,结晶纯度高,为最佳结晶溶剂。

本方法采用碱水常温提取、可重复再生利用的 D101 纯化、安全性高的乙酸乙酯作结晶溶剂,成本低廉、工艺简单、制备时间短、安全性高,得率高,是制备纯度 98% 以上绿原酸的优良方法,非常适用于工业生产。

#### 参考文献

- 1 Wang Y(汪冶), Wen HL(文惠玲), Mei SM(梅树模), *et al.* Discussion in the assortment of *Flos Lonicerae japonicae* and *Lonicera confusa*. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2009, 20:150-151.
- 2 Li HX(李红霞), Wang XQ(王雪芹), Li ZG(李振国), *et al.* Comparison of the content of main component in *Flos Lonicerae japonicae* and *Lonicera confusa* from different regions. *J China Pharm*(中国药房), 2011, 22:2935-2937.
- 3 Wang H(王辉), Tian CR(田呈瑞), Ma SL(马守磊), *et al.* The research progress of chlorogenic acid. *Sci Tec Food Ind*(食品工业科技), 2009, 30:341-345.
- 4 Pang ST(庞松涛), Xue H(薛惠). Techniques to extract chlorogenic acid from *Flos Lonicerae japonicae*. CN1616403A, 2005-05-18.
- 5 Wang KM(王刻铭). A technology to extract chlorogenic acid. CN102267906A, 2011-12-07.
- 6 Lu DQ(卢定强), Zhao H(赵辉), Wang J(王俊), *et al.* A new technology to produce chlorogenic acid of high purity. CN200910029959.7, 2009-8-12.
- 7 Bi SB(毕思彬), Zhou RL(周润龙), Luo WW(罗文伟), *et al.* Technology to produce chlorogenic acid of high purity from *Flos Lonicerae Japonicae*. CN200510020080.8, 2006-06-28.
- 8 Liu DF(刘东峰), Zhang Y(张翼), Yang CD(杨成东), *et al.* A technology to extract chlorogenic acid. CN200910035422.1, 2010-05-12.
- 9 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 205-206.
- 10 Ling YP(凌益平), Lv F(吕芳), Luo YQ(骆雅琴), *et al.* Discussion in the method of extraction and purification of chlorogenic acid in industrialization. *J Pharm Res*(药学研究), 2013, 32:55-58.
- 11 Sun QL(孙庆雷), Lin YL(林云良), Wang X(王晓), *et al.* Research of  $^{13}\text{C}$  NMR finger print of *Flos lonicerae*. *Chin J Mag Res*(波谱学杂志), 2006, 23:181-186.

(上接第 1462 页)

- 8 Yuan YF(袁亚菲), Dong T(董婷), Wang JW(王剑文). Effect of endophytic *Penicillium* sp. Y2 on growth and artemisinin biosynthesis of plantlets in tissue cultures of *Artemisia annua* L. *Amino Acids Biotic Resour*(氨基酸和生物资源), 2011, 33(4):1-4.
- 9 Leong LP, Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 2002, 76:69-75.
- 10 Wang JH(王建华), Lei W(雷文), Wang YL(王远亮), *et al.* Synthesis and the free radical inhibition rate to  $\text{O}_2^{\cdot -}$  of shift base containing thiazazole and its complexes of Cu(II), Zn(II), Co(II). *J Chongqing Univ*(重庆大学学报), 2002, 25(7):60-66.