# 金银花多酚类物质的纯化研究

陈 奇，邓雁如*，夏 娜
天津中医药大学，天津 300193

**摘 要：目的** 考察常用的大孔吸附树脂对金银花多酚类物质的纯化效果，筛选纯化工艺条件。**方法** 以总酚的质量分数和回收率作为指标，采用静态吸附及动态吸附考察树脂的吸附、解吸性能。**结果** NKA-2 型树脂对多酚类物质的吸附能力明显强于其他树脂，其载药量为 7 倍树脂体积，水洗 5 倍树脂体积，60%乙醇洗 6 倍树脂体积。此条件下，浸膏量减少 40%左右，总酚质量分数提升近一倍，达到 60%左右，样品回收率达到 55%。**结论** NKA-2 型树脂对金银花多酚类的纯化效果较好，适用于金银花多酚类物质的分离纯化。

**关键词：**多酚；有机酸；黄酮；纯化；NKA-2
**中图分类号：**R284.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 6376 (2012) 03 - 0185 - 05

# Purification of polyphenols from *Lonicerae Flos*

CHEN Qi, DENG Yan-ru, XIA Na
Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To study the process parameters for purification of polyphenols from *Lonicerae Flos* by commonly used macroporous resins, and to optimize the purification technological conditions. **Methods** The purity and recovery of polyphenols were taken as indexes, and the adsorption and desorption performance by difference resins were studied by using static adsorption and dynamic adsorption. **Results** It has been found that NKA-2 resin's adsorption capacity of polyphenols was the best among those resins. The optimum condition is seven volume times of sample, five volume times of water washing, and six volume times of 60% ethanol washing. Under those conditions, 40% extract was reduced with the purity of polyphenols around 60%, and the recovery rate was 55%. **Conclusion** NKA-2 resin has a good performance and is suitable for the production of polyphenols from *Lonicerae Flos*.
**Key words:** *Lonicerae Flos*; polyphenols; organic acids; flavonoids; purification; NKA-2

金银花为中医常用药，具有清热解毒、疏散风热等功效[1]，其有效成分主要为多酚类物质，包括绿原酸、异绿原酸等酚酸类物质及木犀草苷等黄酮类物质，此外还有皂苷、挥发油、鞣质、多糖、蛋白质等成分，其中酚酸类物质具有抗菌、抗病毒、解热、保肝、调节免疫等作用，黄酮类化合物具有抗氧化、清除自由基、调血脂、降血压等功能，对心血管疾病有很好的治疗效果[2]。目前分离纯化金银花多酚类物质的方法主要有醇提水沉、金属离子沉淀、有机溶剂萃取、β-环糊精包合、树脂分离等，其中树脂分离技术是一种相对环保节能的技术，具有选择性好、吸附容量大、再生处理方便、操作简单等优点。本研究依据前人的研究成果[3]，以金银花粗提物为原料，比较研究了具有代表性的 NKA-2、SP850、D101 及 AB-8 树脂的纯化效果，筛选出树脂分离纯化的最优工艺参数，为金银花多酚类的纯化提供参考。

## 1 仪器与材料

安捷伦 1200—DAD 型高效液相色谱仪，大连依利特 ODS $C_{18}$ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），UV2401—PC 型紫外-可见分光光度计（日本岛津公司），旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂），D101、AB-8 及 NKA-2 树脂（天津南开和成科技有限公司），SP850 树脂（日本三菱化学株式会社），甲醇、95%乙醇、乙醇（天津江天化工技术有限公司），色谱纯乙腈（天津康科德科技有限公司），娃哈哈纯净水，绿原酸、咖啡酸、芦丁、木犀草苷、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品均购自中

收稿日期：2012-02-21
基金项目：国家重点基础研究发展规划（2009CB523003）；国家自然科学基金资助项目（81073033）
作者简介：陈 奇（1987—），男，湖南长沙人，在读硕士研究生，主要从事中药药效物质基础研究。
*通讯作者 邓雁如（1963—），女，江西宜春人，博士，教授，主要从事中药有效成分研究与开发工作。

国食品药品检定研究院；金银花药材为市售品，经天津中医药大学李天祥副教授鉴定，为忍冬科植物忍冬 *Lnicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花，符合《中国药典》2010 年版一部相关规定，为合格药材。

## 2 方法与结果

### 2.1 原料液的制备

取 2 kg 金银花药材粉末，按 1∶10 加 70%乙醇于 80 ℃水浴提取 3 次，提取液减压回收溶剂至流浸膏状，加 80%乙醇醇沉，并用超声减缓沉淀的吸附，低温静置过夜，分取上清液过滤，滤液减压回收溶剂至流浸膏状，加纯化水至 7 000 mL，低温静置过夜，滤除绿色不溶性沉淀，滤液为原料液。

### 2.2 总酚的测定[4]

**2.2.1** 工作曲线绘制 精密称取芦丁对照品 7.02 mg 至 50 mL 量瓶中，70%乙醇定容。吸取 6 份不等量对照品溶液至 25 mL 量瓶，各加 70%乙醇至 6 mL，加 5%亚硝酸钠 1 mL，放置 6 min，加 10%硝酸铝 1 mL，放置 6 min，加 4%氢氧化钠 10 mL，加 70%乙醇至刻度，放置 15 min，509 nm 处测定吸光度，以芦丁的质量浓度对吸光度做回归分析，得回归方程 $Y$＝0.012 6 $X$＋0.009 7，$r$＝0.999 8，线性范围为 5.2～31.2 μg/mL。

**2.2.2** 样品的测定 取一定量样品，稀释至适宜浓度，依照“2.2.1”项下测定方法，测得原料液中总酚质量浓度为 23.53 mg/mL。精确移取原料液 5 mL，减压干燥至质量不变，测得原料液总酚的质量分数为 33.19%。

### 2.3 有机酸的测定[5]

**2.3.1** 工作曲线绘制 精密取绿原酸对照品 2.75 mg 至 25 mL 棕色量瓶中，50%甲醇定容，吸取 6 份不等量至 10 mL 棕色量瓶，50%甲醇定容，327 nm 处测定吸光度，以绿原酸的质量浓度对吸光度做回归分析，得回归方程 $Y$＝0.055 6 $X$＋0.002 5；$r$＝1.000 0，线性范围为 2.2～22 μg/mL。

**2.3.2** 样品的测定 取一定量样品，稀释至适宜浓度，依照“2.3.1”项下测定方法，测得原料液中有机酸质量浓度为 13.44 mg/mL。精确移取原料液 5 mL，减压干燥至质量不变，测得原料液中有机酸质量分数为 19.1%。

### 2.4 黄酮的测定[6]

**2.4.1** 工作曲线绘制 精密吸取 6 份不等量“2.2.1”项下芦丁对照品溶液，70%乙醇定容，265 nm 处测定吸光度，以芦丁的质量浓度对吸光度做回归分析，得回归方程 $Y$＝0.033 8 $X$－0.001 5；$r$＝0.999 9，线性范围为 2.12～21.2 μg/mL。

**2.4.2** 样品测定 取一定量样品，稀释至适宜浓度，依照“2.4.1”项下测定方法，测得原料液中黄酮质量浓度为 13.21 mg/mL。精确移取原料液 5 mL，减压干燥至质量不变，测得原料液中黄酮质量分数为 17.35%。

### 2.5 HPLC 法定量测定[7]

**2.5.1** 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸 2.67 mg、咖啡酸 1.78 mg、芦丁 5.30 mg、木犀草苷 2.26 mg、3, 5-二咖啡酰奎宁酸 2.35 mg、4, 5-二咖啡酰奎宁酸 2.29 mg，置于 6 个 10 mL 棕色量瓶中，甲醇定容。

**2.5.2** 色谱条件 流动相为乙腈（A）-0.1%磷酸水溶液（B），梯度洗脱程序为：0～5 min，10%A，90%B；5～13 min，13%A，87%B；13～37 min，15%A，85%B；37～48 min，20%A，80%B。检测波长 327、350 nm；柱温 30 ℃；进样体积 20 μL。

**2.5.3** 工作曲线绘制 精密移取“2.5.1”项下对照品溶液适量，稀释至适宜浓度，依照“2.5.2”项下条件测定，得各成分工作曲线（表 1）。

### 2.6 树脂的筛选

**2.6.1** 静态筛选 精密量取 4 种大孔树脂各 2 mL（湿体积，下同），加入 50 mL 原料液，吸附 12 h，

**表 1 HPLC 法各对照品工作曲线方程**

**Table 1 Standard curve equations of reference substances by HPLC**

| 成 分 | 线性方程 | $r$ | 线性范围/(μg·mL$^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 绿原酸 | $Y$＝25.074 3$X$－20.987 1 | 0.999 7 | 2.67～80.1 |
| 咖啡酸 | $Y$＝52.723 6$X$＋5.607 1 | 0.999 7 | 0.356～3.56 |
| 芦丁 | $Y$＝10.285 7$X$－1.709 7 | 0.999 8 | 0.339 2～23.744 |
| 木犀草苷 | $Y$＝15.523 4$X$＋0.92 | 0.999 7 | 0.072 32～5.062 4 |
| 3, 5--二咖啡酰奎宁酸 | $Y$＝31.867 2$X$＋20.031 3 | 0.999 6 | 2.35～70.5 |
| 4, 5--二咖啡酰奎宁酸 | $Y$＝32.552 7$X$＋5.022 7 | 0.999 8 | 2.29～45.8 |

滤过，滤液测定吸光度值；树脂加入到 50 mL 的 95%乙醇中解吸，解吸 12 h，滤过，解吸液测定吸光度值。结果 D101 的解吸液总酚质量浓度为 2.692 3 mg/mL，解吸率为 89.67%；AB-8 的解吸液总酚质量浓度为 1.896 2 mg/mL，解吸率为 75.7%；SP850 的解吸液总酚质量浓度为 4.881 7 mg/mL，解吸率为 95.86%；NKA-2 的解吸液总酚质量浓度为 5.677 9 mg/mL，解吸率为 90.35%。

**2.6.2** 动态筛选 将 4 份各 50 mL 的原料液分别通过装有 4 种大孔树脂各 10 mL 的色谱柱（200 mm×15 mm，下同），以树脂床容积（bed volume，BV）确定流速，用 50 mL 纯化水以 1 BV/h 淋洗树脂柱，合并流出液和水洗液，用 50%乙醇 50 mL 洗脱树脂柱，结果见表 2。

**表 2 动态筛选树脂结果**

**Table 2 Dynamic screening results of different resins**

| 大孔树脂 | 质量浓度/(mg·mL$^{-1}$) | 样品收量/mg | 解吸率/% | 5 mL 干质量/mg | 总酚质量分数/% | 样品回收率/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| D101 醇洗 | 9.865 6 | 493.28 | 92.50 | 93 | 53.04 | 41.93 |
| AB-8 醇洗 | 9.268 5 | 463.43 | 89.40 | 92 | 50.37 | 39.39 |
| SP850 醇洗 | 12.005 3 | 600.27 | 92.67 | 108 | 55.58 | 51.02 |
| NKA-2 醇洗 | 14.095 2 | 704.76 | 94.32 | 112 | 62.93 | 59.90 |

**2.6.3** 小结 4 种树脂对总酚类吸附能力均较强，其中 NKA-2 因具有适宜的大孔网状结构和独特的表面修饰，而对酚类有特殊的选择性，因此具有较好的纯化效果，其静态吸附率达到每毫升树脂吸附 141.95 mg 样品，在上述动态条件下总酚质量分数能达到 60%以上，样品回收率达到 60%左右。因此本研究选用 NKA-2 树脂做进一步研究。

### 2.7 NKA-2 树脂纯化参数的确定

**2.7.1** 上样量 精确量取树脂 10 mL，湿法装柱，缓慢加入原料液，控制体积流量 1 BV/h，每 1 BV 流出液收集一份，测定流出液中总酚，绘制泄漏曲线（图 1），可知当上样量达到 7 BV 后，流出液总酚质量浓度趋于稳定，说明树脂已经趋于饱和，综合经济性和时效性考虑，上样量为 7 BV 即可。

**2.7.2** 水洗用量 精确量取树脂 10 mL，湿法装柱，缓慢加入原料液 70 mL，控制体积流量为 1 BV/h，收集流出液；用纯化水淋洗树脂，体积流量 1 BV/h，每 1 BV 收集一份，测定流出液中的总酚，绘制水洗曲线（图 1），可知在水洗用量达到 5 BV 时，流出液中总酚质量浓度基本达到稳定，意味着未吸附完全的样品已经基本淋洗干净，综合经济性和时效性考虑，水洗用量为 5 BV 即可。

**2.7.3** 乙醇体积分数 精确量取树脂 10 mL，湿法装柱，缓慢加入原料液 70 mL，控制体积流量 1 BV/h，收集流出液；用 50 mL 纯化水淋洗树脂，体积流量 1 BV/h，收集水洗液；分别用 30%、40%、50%、60%、70%、80%乙醇各 50 mL 洗脱树脂柱，体积流量 1 BV/h，收集醇洗液，测定各收集液的各项指标，数据见表 3，可知 70%乙醇洗脱效果最好，与 60%乙醇相差不大，可将绝大多数样品洗脱，综合经济性考虑，选用 60%乙醇。

**2.7.4** 醇洗用量 精确量取树脂 10 mL，湿法装柱，缓慢加入原料液 70 mL，控制体积流量 1 BV/h，收集流出液；用 50 mL 纯化水淋洗树脂，体积流量 1 BV/h，收集水洗液；缓慢加入 60%乙醇淋洗树脂，体积流量为 1 BV/h，每 1 BV 收集一份，测定醇洗液中的总酚，绘制醇洗曲线（图 1），可知醇洗 6 BV 后流出液中总酚很少，意味着吸附的样品已经基本洗脱完全，综合经济性和时效性考虑，醇洗用量 6 BV 即可。

**表 3 乙醇浓度的选择**

**Table 3 Selection of ethanol concentrations**

| 乙醇/% | 流出量/mg | 水洗量/mg | 吸附量/mg | 醇洗量/mg | 样品洗脱率/% | 5 mL 干质量/mg | 总酚质量分数/% | 样品回收率/% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 30 | 470 | 271 | 907 | 762 | 84.01 | 157 | 48.54 | 46.27 |
| 40 | 413 | 273 | 961 | 827 | 86.06 | 161 | 51.37 | 50.21 |
| 50 | 431 | 248 | 968 | 894 | 92.36 | 160 | 55.88 | 54.28 |
| 60 | 437 | 253 | 957 | 911 | 95.19 | 157 | 58.03 | 55.31 |
| 70 | 455 | 226 | 966 | 926 | 95.86 | 157 | 58.98 | 56.22 |
| 80 | 499 | 237 | 910 | 884 | 97.14 | 148 | 59.73 | 53.67 |

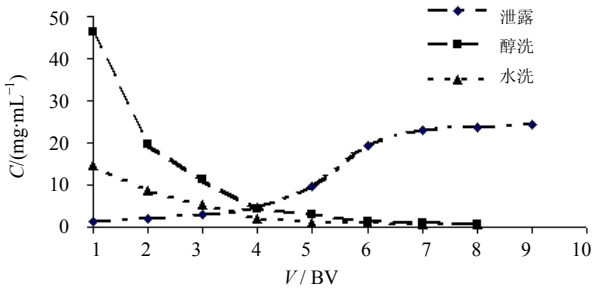


**图 1 NKA-2 树脂泄漏、水洗、醇洗图**

**Fig. 1 Leak, washing, and alcohol washing curves of NKA-2**

**2.7.5** 小结 通过以上实验可以得出 NKA-2 树脂纯化多酚类物质的优化条件为：在此原料液浓度下上样量为 7 BV，水洗 5 BV，6 BV 60%乙醇洗脱，预计总酚质量分数比原料液提升一倍，达 60%左右，浸膏量减少 40%左右，样品回收率达 55%左右。

### 2.8 验证试验

**2.8.1** UV 法验证 依照“2.7.5”项下所述条件平行制备 10 份样品，按照“2.2”、“2.3”、“2.4”项下各方法测定各成分，计算得知上述 10 份样品的黄酮质量分数均值为 31.91%，有机酸质量分数均值为 40.92%，总酚质量分数均值为 60.67%，浸膏减少 37.16%，样品回收率均值为 57.03%，基本达到预期结果，说明所得纯化工艺参数稳定可靠。

**2.8.2** HPLC 法验证 265 nm 与 327 nm 测定值之和大于 509 nm 测定值，说明所得结果不能准确反映样品中有机酸和黄酮的量，因此须运用 HPLC 法进一步确定，按照“2.5”项下方法测定各成分，结果见表 4，通过对比 HPLC 法与 UV 法所得数据，发现 HPLC 法所测质量分数普遍低于 UV 法。

**表 4 HPLC 法测定结果**

**Table 4 Determination by HPLC**

| 取样量/mg | 绿原酸/mg | 咖啡酸/mg | 芦丁/mg | 木犀草苷/mg | 3,5-二咖啡酰奎宁酸/mg | 4,5-二咖啡酰奎宁酸/mg | 有机酸质量分数/% | 黄酮质量分数/% | 总酚质量分数/% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7.523 | 0.816 1 | 0.037 9 | 0.075 1 | 0.070 3 | 0.775 9 | 0.302 0 | 25.68 | 1.93 | 27.61 |
| 9.452 | 1.014 5 | 0.044 5 | 0.092 4 | 0.090 2 | 0.958 0 | 0.362 6 | 25.18 | 1.93 | 27.11 |
| 8.486 | 0.934 6 | 0.042 5 | 0.084 9 | 0.080 3 | 0.843 5 | 0.336 4 | 25.42 | 1.95 | 27.36 |
| 9.276 | 0.976 4 | 0.045 6 | 0.093 4 | 0.088 7 | 0.926 2 | 0.356 3 | 24.84 | 1.96 | 26.81 |
| 7.875 | 0.883 5 | 0.039 1 | 0.079 5 | 0.073 4 | 0.792 4 | 0.296 8 | 25.55 | 1.94 | 27.49 |
| 8.192 | 0.906 6 | 0.039 6 | 0.080 7 | 0.077 4 | 0.779 7 | 0.311 6 | 24.87 | 1.93 | 26.80 |
| 9.347 | 1.021 2 | 0.043 4 | 0.092 4 | 0.091 1 | 0.888 6 | 0.355 7 | 24.70 | 1.96 | 26.67 |
| 7.978 | 0.894 5 | 0.040 1 | 0.080 2 | 0.076 1 | 0.797 7 | 0.310 0 | 25.60 | 1.96 | 27.56 |
| 8.984 | 0.928 4 | 0.041 5 | 0.082 7 | 0.078 1 | 0.868 3 | 0.336 7 | 24.21 | 1.79 | 26.00 |
| 10.319 | 1.136 0 | 0.051 9 | 0.101 6 | 0.100 6 | 1.023 4 | 0.390 7 | 25.22 | 1.96 | 27.18 |

## 3 结果与讨论[4]

造成 HPLC 法与 UV 法测定结果中黄酮质量分数相差巨大的原因可能为有机酸类虽在 265 nm 有最小吸收，但其摩尔吸光系数较大，且其在样品中质量分数远高于黄酮，因此 265 nm 处所测值不能准确反映黄酮的量；而黄酮类在 327 nm 处也有较大的吸收，但由于其质量分数远小于有机酸，因此其在 327 nm 处所产生的吸收值很小，对有机酸的测定影响不大。造成 HPLC 法与 UV 法测定结果中有机酸相差较大的原因可能是因为有机酸中绿原酸、咖啡酸等单咖啡酰奎宁酸类物质含有 1 对邻位酚羟基，而 3, 5-二咖啡酰奎宁酸、4, 5-二咖啡酰奎宁酸等二咖啡酰奎宁酸类物质含有 2 对邻位酚羟基，因此在 327 nm 处两类物质的摩尔吸光系数不同，其比值约为 1∶（1.34～1.38）（使用等浓度对照品溶液 HPLC 法测定）。UV 法中由于选用绿原酸作为参比物，因此所测结果必然大于单独使用各自对照品的 HPLC 法。

在使用 UV 法测定总酚时，因各成分的邻位酚羟基对数不等导致与 $Al^{3+}$形成的络合物摩尔吸光系数不同，且各成分质量分数也不尽相同（HPLC 法测定含 1 对酚羟基的成分与含 2 对酚羟基的成分质量分数之比约为 1∶1.03），因此不管使用何种成分作为参比物均不能精确反映样品中总酚的量，但能在一定程度上反映样品中邻位酚羟基的数量，故具有参考价值。各成分中最稳定易得的就是芦丁，因此选用芦丁作为 UV 法测定总酚的参比物。

摸索工艺时由于样品数量繁多，且有机酸类不

稳定，应使用 UV 法检测；当对样品进行质量控制时必须使用 HPLC 法检测，以得到真实、精确的检测结果。

**参考文献**

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 陈 俊. 金银花提取物的物质基础和制备工艺研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.

[3] 熊建华, 汤凯洁, 罗秋水, 等. 大孔吸附树脂纯化金银花叶总多酚的工艺优化 [J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 52-55.

[4] 郭亚健, 范 莉, 王晓强, 等. 关于 $NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$-NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨 [J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 97-99.

[5] 刘恩荔，李青山. 大孔吸附树脂分离纯化金银花中总有机酸的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1173-1176.

[6] 王 岩, 谢媛媛, 孙嘉鸿, 等. 菊花提取物中总黄酮与总有机酸的含量测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(2): 124-129.

[7] 黄 雄, 李 萍, 张重义, 等. HPLC 同时分析金银花中绿原酸和黄酮类成分的方法建立及其应用 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(10): 780-782.

## 中草药杂志社 4 种期刊为允许刊载处方药广告的医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知，中草药杂志社编辑出版的《中草药》、Chinese Herbal Medicines（CHM，中草药英文版）、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊作为第一批医药专业媒体，允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

**电话：**(022)27474913 23006821 **传真：**23006821 **联系人：**陈常青

**网址：www.中草药杂志社.中国； www.tiprpress.com E-mail: zcy@tiprpress.com**