

# 金银花提取条件对绿原酸含量的影响

白海波,王剑飞,周蒂(海南养生堂药物研究中心,浙江 杭州 310007)

**摘要:**目的 研究金银花中有效成分绿原酸的最佳提取条件。方法 采用正交实验法以乙醇浓度(A)、溶剂量(B)、提取时间(C)和提取次数(D)4个因素,每个因素选取3个水平进行实验。结果 因素A,因素D对绿原酸的含量有极显著影响。结论 以10倍量70%乙醇为溶剂,85℃提取两次,每次1h为最佳提取条件。

**关键词:**金银花;绿原酸;正交实验;高效液相色谱法

中图分类号:R284.2 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2003)02-0130-03

## Influence of extraction process on the content of Chlorogenic Acid in *Flos Lonicerae*

BAI Hai-bo, WANG Jian-fei, ZHOU Di (Hainan Yangshengtang Medical Research Center, Hangzhou 310007, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To optimize the extraction process of Chlorogenic acid from *Flos Lonicerae*. **METHOD** The optimum extraction was investigated by the orthogonal design and Chlorogenic acid determined by HPLC, the concentration of ethanol, volume of solvent, extraction hour and extraction times were the four factors in the experiment, and three levels of which were chosen to be inspected to optimize the process. **RESULTS** The concentration of ethanol and extraction times have significance effect on the content of Chlorogenic acid. **CONCLUSION** The best extraction process is extracting twice with decuple EtOH(70%) and refluxing at 85℃ for 1h each time.

**KEY WORDS:** *Flos Lonicerae*; Chlorogenic acid; Orthogonal design; HPLC

金银花(*Flos Lonicerae*)系忍冬科植物忍冬的干燥花蕾,常用于治疗痈肿、疮疖、风热感冒、咽喉肿痛、腮腺炎、丹毒、菌痢、肠炎、乳腺炎,其主要有效成分为绿原酸。本实验以绿原酸提取率为主要考察指标,采用正交试验法探讨了金银花提取条件对绿原酸含量的影响。

### 1 实验材料与仪器

#### 1.1 材料

金银花于2001年7月购于华东医药股份有限公司中药材分公司,经鉴定为忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的干燥花蕾,产于山东,夏初花开前采收;标准品绿原酸来源于中国药品生物制品检定所(0753-9910),其它试剂均为分析纯。

#### 1.2 仪器

LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-10A 可见紫外检测器,CTO-10A 柱温箱,CLASS-VP 色谱工作站。

### 2 实验方法与结果

#### 2.1 色谱条件

参照文献<sup>[1]</sup>方法,采用150mm×4.6mmC<sub>18</sub>柱,以乙腈-水(7:93)为流动相,在327nm波长,1mL/min流速,33℃下测定。

#### 2.2 水提醇提工艺的比较

取金银花两份,每份10g,分别加水和70%乙醇200mL,水提在电热煲内沸腾回流提取1h,醇提于水浴上85℃回流提取1h,药渣继续加相应溶剂提取1次,分别合并水提液和醇提液并定容至500mL,同法操作共作3份样本,10倍稀释后HPLC法测定绿原酸含量,水浴挥干提取液均得淡黄色固体,称量,结果见表1

表1 金银花水提、醇提工艺比较

Tab 1 Comparison between water and ethanol extraction process

工艺	样本数	绿原酸含量(mg)	提取物重量(g)
水提	3	13.9	3.8347
醇提	3	13.2	2.6029

由以上实验结果可知,乙醇提取的固含量少,绿原酸相对含量高于水提取,故确定醇提工艺。

### 2.3 金银花乙醇提取工艺的正交试验

**2.3.1 药材中绿原酸含量的测定** 在提取工艺研究中,主要以绿原酸提取率为考察指标。因此先测定金银花药材中绿原酸的含量。精密称取金银花 10.0g 于 1000 mL 烧瓶中,加 70%乙醇 200 mL,加热回流提取 5 次,每次 1 h,放冷,用乙醇定容至 1000 mL,过滤,滤液作为供试品溶液。按 HPLC 方法测定,绿原酸含量为 15.3 mg/g。正交试验以此含量作比较,计算金银花提取过程中绿原酸的提取率(提取出的绿原酸含量/药材中绿原酸含量 × 100%)。

**2.3.2 正交实验设计及结果** 以绿原酸提取率为指标,进行  $L_9(3^4)$  的正交试验,正交因素水平见表 2。

表 2 正交试验因素水平表

Tab 2 The factors and levels for the orthogonal test

水平	因素			
	A 乙醇浓度(%)	B 溶剂量(倍)	C 提取时间(h)	D 提取次数(次)
1	50	8	0.5	1
2	60	10	1	2
3	70	12	1.5	3

提取工艺过程为称取金银花 10g 左右,以不同浓度乙醇为溶剂,平行操作条件下,分别按  $L_9(3^4)$  正交试验进行回流提取。合并提取液,以相应的提取溶剂稀释定容,得 1~9 号样品液,做 3 次重复。精密量取上述样品溶液稀释后各注入色谱仪进行测定,以外标法计算绿原酸含量及提取率。计算结果及方差分析见表 3,表 4。

表 3 关于金银花药材提取条件的正交试验表

Tab 3 Orthogonal test for optimizing the extraction conditions of Flos Ionicerae

试验号	A	B	C	D	绿原酸提取率(%)		
1	1	1	1	1	53	55	60
2	1	2	2	2	91	89	87
3	1	3	3	3	92	87	90
4	2	1	2	3	95	92	86
5	2	2	3	1	60	63	65
6	2	3	1	2	91	88	90
7	3	1	3	2	94	92	91
8	3	2	1	3	96	95	93
9	3	3	2	1	68	66	64

$I_j$	704	718	721	554	$G = \sum y_i = 2193$		
$II_j$	730	739	738	813	$G^2 = 4809249$		
$III_j$	759	736	734	826	$CT = G^2/27 = 178120.3$		

离均差平方和 ( $I^2 + II^2 + III^2$ )/9-CT	168.22	28.67	17.56	5230.89
---	--------	-------	-------	---------

试验号	A	B	C	D	绿原酸提取率(%)
误差平方和	123.33				

表 4 影响金银花药材提取因素的方差分析

Tab 4 Root-mean-square deviation analysis of extraction conditions

来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	168.22	2	84.11	12.28	$P < 0.01$
B	28.67	2	14.33	2.1	
C	17.56	2	8.78	1.28	
D	5230.89	2	2615.44	381.7	$P < 0.01$
误差	123.33	18	6.85		

注:查方差分析表,  $F_{0.01(2,18)} = 6.01$ ,  $F_{0.05(2,18)} = 3.55$

由表 3,表 4 可见,以绿原酸提取率为指标,则:

A 因素:极显著性因素,且 III > II > I

B 因素:不显著性因素,且 II > III > I

C 因素:不显著性因素,且 II > III > I

D 因素:极显著性因素,且 III > II > I

因此,较佳提取条件应为  $A_3B_2C_2D_3$ ,即每次加 70%乙醇 10 倍量,回流提取 3 次,每次 1 h。

### 2.4 乙醇提取次数的选择

由于提取次数对绿原酸提取率的影响最为显著,为进一步优化金银花醇提工艺,进行了醇提次数的优选实验,同时与水提进行比较。称取 10g 金银花药材,加 10 倍 70%乙醇,85℃回流提取 1 h,共回流提取 4 次,各次均定容至 100 mL,测定第一、二次醇提液和 4 次醇提液中总绿原酸含量,同法重复一次。结果见表 5。

表 5 金银花不同溶剂提取次数对绿原酸的影响

Tab 5 Chlorogenic acid content influenced by solvent, extraction times

次数	水提绿原酸含量占总提取量的百分比	醇提绿原酸含量占总提取量的百分比
第 1 次	52	63
第 1、2 次	80	90

由表 5 可知,金银花醇提两次绿原酸含量即达 90%,绿原酸的转移率为 88.5%,因此提取两次即可。

## 3 讨论

本实验通过有重复正交试验结合方差分析,对乙醇提取,水提方法提取绿原酸得率的比较表明,醇提较水提为佳,70%的乙醇是一种较好的提取溶剂。何德贵等<sup>[2]</sup>采用均匀设计和分光光度法认为以酸醇提取为优,但酸醇提取作为工业生产不宜提倡。林缎嫦等<sup>[3]</sup>采用分光光度法比较水提、醇提、水提醇沉、水提石灰乳沉淀对绿原酸提取含量的影响,结果表明 70%乙醇提取 2 次,每次 2 h 绿原酸的含量较高。刘祥兰等<sup>[4]</sup>采用无重复正交设计结合极差分析认为影响绿原酸含量的因素顺序是乙醇浓度 > 回流时间 > 乙醇量,本研究利用 HPLC 技术,以绿原酸得率为指标,进行 3 次重复的正交试验结合方差分析表明,影响绿原酸得率的主要因素是提取次数和乙醇浓度,回流时间和乙醇量无显著影响,因此所

得结果较为可靠。本研究得出的金银花最佳提取工艺条件为10倍量70%醇提取2次,每次1h。

#### 参考文献

[1] 曹红,翟嘉涛,刘云.高效液相色谱法测定复方花针颗粒中绿原酸的含量[J].现代仪器,1999,1(6):10.

[2] 何德贵,周芳勇,李仕先,等.金银花不同提取工艺及优选条件探讨[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(1):6.

[3] 林缎嫦,宋劲诗,吴应熊.金银花中绿原酸提取工艺探讨[J].中成药,1994,16(7):16.

[4] 刘祥兰,刘重芳,张英等.金银花中绿原酸提取工艺的比较和优化研究[J].中成药,2000,22(6):402.

收稿日期:2002-01-07