

美洲一枝黄花中天然产物二咖啡酰奎尼酸和绿原酸的分离纯化研究

杨凤平, 李东晓, 王建芬, 陈育如

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省微生物与基因组学重点实验室, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 研究了入侵植物美洲一枝黄花中的成分, 分析鉴定了其中重要成分二咖啡酰奎尼酸和绿原酸的含量并探讨了其分离纯化。美洲一枝黄花不同部位中以花和叶的二咖啡酰奎尼酸和绿原酸有效成分含量最高, 其花蕾中的二咖啡酰奎尼酸和绿原酸的含量最高分别达 1 530 mg/100 g 和 700 mg/100g。以 60%乙醇为提取剂, 在固液比 1:30, 50 ℃超声作用下提取 1 h 可高效提取有效成分, 绿原酸和二咖啡酰奎尼酸的提取率分别达 90.3%和 91.6%。提取液经大孔树脂 CN300 用 40%~50%和 50%~70%的乙醇溶液洗脱, 可有效分离提取液中的二咖啡酰奎尼酸与绿原酸, 再经乙酸乙酯萃取纯化后可分别得到绿原酸和二咖啡酰奎尼酸产品。

[关键词] 美洲一枝黄花, 二咖啡酰奎尼酸, 绿原酸, 分离纯化, 大孔树脂

[中图分类号] TS202.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2016)01-0084-05

The Isolation and Purification of Dicafeoylquinic Acids and Chlorogenic Acid in *Solidago Canadensis*

Yang Fengping, Li Dongxiao, Wang Jianfen, Chen Yuru

(School of Life Science, Jiangsu Engineering and Technology Research Centre for Microbiology Resource, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomic, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: In this work, the natural compounds of the invasive plant *Solidago Canadensis* are studied, and the contents of dicafeoylquinic acids and chlorogenic acid are analyzed. The separation and purification process are discussed. The contents of dicafeoylquinic acids and chlorogenic acid are the highest in flower and leaf of *Solidago Canadensis*. The contents of dicafeoylquinic acids and chlorogenic acid reach 1 530 mg/100 g and 700 mg/100 g in the bud of *Solidago Canadensis* respectively. The extraction rates of chlorogenic acid and dicafeoylquinic acids respectively reach 90.3% and 91.6% under the optimal extraction conditions: ethanol concentration 60%, extraction temperature 50 ℃, extraction time 1 h, and solid-liquid ratio 1:30 g/mL. The dicafeoylquinic acids and chlorogenic acid are effectively extracted by the macroporous resin CN300 with 40%~50% and 50%~70% ethanol solution, and then having been extracted by ethyl acetate, chlorogenic acid and dicafeoylquinic acids are obtained respectively.

Key words: *Solidago Canadensis*, dicafeoylquinic acids, chlorogenic acid, isolation and purification, macroporous resin

美洲一枝黄花(*Solidago canadensis* L.)是原产于北美的多年生草本植物, 亦称加拿大一枝黄花, 在1935年作为花卉引入我国后, 现已成为著名的入侵植物^[1-3]。美洲一枝黄花适应性强、生长迅速, 因此在物种中竞争力极强, 严重破坏生物多样性, 致使本土物种数量减少, 对生态平衡造成影响。目前对美洲一枝黄花的研究侧重于生物学、生理生态学以及防治等方面, 而对提取分离和药理活性等的研究较少。

美洲一枝黄花生物量大, 若能有效利用则是一种资源丰富的材料, 其中的天然产物成分酚酸类(以绿原酸和二咖啡酰奎尼酸为代表)、萜类、苷类等有着不同的生物学功能, 如抗氧化、抗菌、抗肿瘤等^[4-6], 临床

收稿日期: 2015-12-20.

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”人才培养项目(NY-011-2015)、江苏省高校自然科学研究重大项目(15KJA210002)。

通讯联系人: 陈育如, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物与药物研究。E-mail: chenyruru@njnu.edu.cn.

应用广泛,具有良好的应用前景.对美洲一枝黄花的研究开发可化害为利,变废为宝,更好地利用这种植物资源.

酚酸类中的咖啡酰奎尼酸是由奎尼酸和咖啡酸缩合而成的天然产物,包括单咖啡酰奎尼酸(绿原酸即为其中之一)、二咖啡酰奎尼酸、三咖啡酰奎尼酸等^[7],与单咖啡酰奎尼酸相比,多咖啡酰奎尼酸具有更优的生物学性能^[8-12],如良好的抗 HIV-1 功能^[13-14].对美洲一枝黄花中这些成分的鉴定及提取分离可为其开发利用提供科学依据.本工作对美洲一枝黄花中的酚酸类成分特别是富含的二咖啡酰奎尼酸和绿原酸进行了分离提取研究.

1 材料、设备与方法

1.1 材料与试剂

美洲一枝黄花(*Solidago canadensis* L.),采自江苏南京,干燥后粉碎备用;绿原酸、3,4-咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸标准品,成都普瑞法科技开发有限公司.

1.2 仪器与设备

RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵,巩义市英峪予华仪器厂;TL-18M 台式离心机,上海离心机械研究所;KQ-100DE 数控超声波清洗仪,昆山市超声仪器有限公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司.

1.3 分析与分离方法

1.3.1 色谱条件

Ultimate AQ-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱;流动相 A:0.1%乙酸水溶液,流动相 B:甲醇;流速:0.9 mL/min;检测波长:326 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL.洗脱梯度为 80%A~65%A(0~5 min),65%A~50%A(5 min~13 min),50%A~20%A(13 min~18 min),20%A~80%A(18 min~20 min).

1.3.2 咖啡酰奎尼酸的分析

将干燥美洲一枝黄花的根、茎、叶、花蕾、盛花和败花,粉碎过 40 目筛.按固液比 1:30(g/mL)加入不同浓度乙醇,50 ℃下超声提取,将提取液经 0.45 μm 滤膜过滤后,采用 HPLC 分析,并计算提取率:

咖啡酰奎尼酸提取率(%)=咖啡酰奎尼酸提取量(g)/样品中咖啡酰奎尼酸总量(g)×100%,
式中以多次提取的酚酸含量之和作为样品咖啡酰奎尼酸的总量.

1.3.3 树脂分离纯化

称取预处理过的大孔树脂 CN300 湿法装柱,以旋转蒸发除去乙醇的浸提液进行动态吸附.经乙醇洗脱,采用 HPLC 分析洗脱液中的二咖啡酰奎尼酸的含量.

1.3.4 乙酸乙酯萃取分离纯化

洗脱液用乙酸乙酯按体积比 1:1.5 萃取,经旋转蒸发后冷冻干燥,采用 HPLC 分析产物中二咖啡酰奎尼酸的含量.

2 结果与分析

2.1 绿原酸和二咖啡酰奎尼酸提取条件探讨

高效的提取方法是后期分离纯化的关键.研究发现提取溶剂的乙醇浓度对绿原酸和二咖啡酰奎尼酸提取量影响最大,用不同浓度的乙醇提取美洲一枝黄花叶中酚酸类物质的结果如表 1 所示.

表 1 乙醇浓度对美洲一枝黄花叶中绿原酸和二咖啡酰奎尼酸提取量的影响

Table 1 Effect of ethanol concentration on concentration of chlorogenic acids and dicaffeoylquinic acids of *Solidago Canadensis*

乙醇浓度(%)		20	40	60	80
提取量	绿原酸(mg/100 g)	970	1215	1200	1030
	二咖啡酰奎尼酸(mg/100 g)	420	720	960	770

从表 1 可见,不同浓度的乙醇浓度对提取酚酸效果有很大的影响,其中以 60%的乙醇提取的二咖啡酰奎尼酸和绿原酸含量较高,提取率分别可达 91.6%和 90.3%.因此,选择 60%的乙醇作为后续实验的提取溶剂.

2.2 美洲一枝黄花不同部位绿原酸和二咖啡酰奎尼酸的含量分析

对美洲一枝黄花不同部位中的绿原酸和二咖啡酰奎尼酸含量进行分析,结果如图1和图2所示.

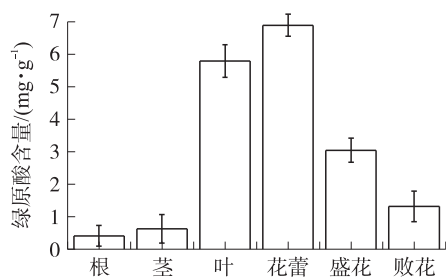


图1 美洲一枝黄花不同部位的绿原酸含量

Fig.1 Content of chlorogenic acids of different parts of *Solidago Canadensis*

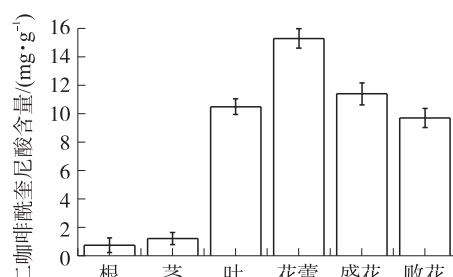


图2 美洲一枝黄花不同部位二咖啡酰奎尼酸含量

Fig.2 Content of dicaffeoylquinic acids of different parts of *Solidago Canadensis*

由图1和图2可见,美洲一枝黄花的根和茎中绿原酸和二咖啡酰奎尼酸的平均含量很低,因此采集时这些部位可弃去.而花蕾中两种物质的含量都很高(二咖啡酰奎尼酸最高可达1530 mg/100 g,绿原酸可达700.0 mg/100 g),远高于烟草和菊芋等植物中总咖啡酰奎尼酸的含量(分别为540.0 mg/100 g和160.0 mg/100 g)^[15-16];盛花和败花中的二咖啡酰奎尼酸含量分别为1130 mg/100 g和1000 mg/100 g;叶中的二咖啡酰奎尼酸和绿原酸的含量也很高.因此,工业应用原料采集应以花和叶为主.在花蕾期清除或收集美洲一枝黄花,既可避免生成植株繁殖所需的大量种子,又可得到富含绿原酸和二咖啡酰奎尼酸的材料,可实现对美洲一枝黄花的有效利用和降低提取成本.

2.3 CN300树脂分离纯化二咖啡酰奎尼酸

绿原酸和二咖啡酰奎尼酸都是性能极好的精细化学品,分离纯化后价值更高.本工作利用树脂材料首先对其进行了分离,结果如图3和图4所示.

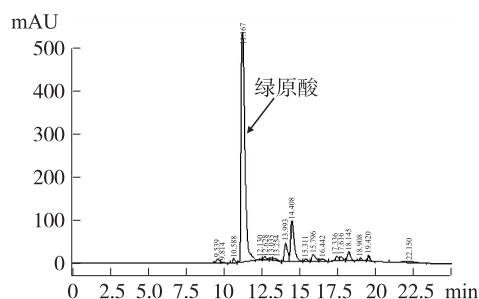


图3 乙醇(40%~50%)洗脱液的HPLC分析

Fig.3 HPLC spectrum of 40%~50% ethanol fraction elution liquid

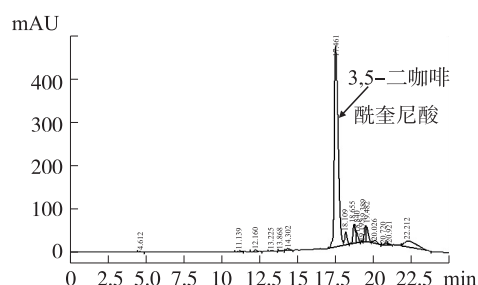


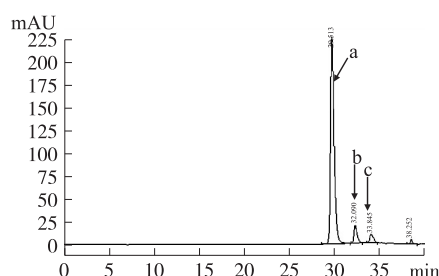
图4 乙醇(50%~70%)洗脱液的HPLC分析

Fig.4 HPLC spectrum of 50%~70% ethanol fraction elution liquid

由图3和图4可见,经树脂分离后,浓度为40%~50%的乙醇可以将绿原酸有效地与杂质和其他成分分离,洗脱液中绿原酸含量达85.3%;而浓度为50%~70%的乙醇可将二咖啡酰奎尼酸与杂质和其他成分分离,为进一步分离洗脱液的其他杂质,后续用乙酸乙酯萃取方法对二咖啡酰奎尼酸进行进一步分离纯化.

2.4 乙酸乙酯萃取分离纯化二咖啡酰奎尼酸

如图5所示,经乙酸乙酯萃取后,液相色谱分析的图谱中除38.2 min的小峰外,其余的3个主峰均为二咖啡酰奎尼酸,杂质得到了很好的分离,3种二咖啡酰奎尼酸中,以3,5-二咖啡酰奎尼酸为主(占90.4%),3,4-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸分别占5.7%和3.5%,杂质仅占0.4%.



a. 3,5-二咖啡酰奎尼酸; b. 3,4-二咖啡酰奎尼酸; c. 4,5-二咖啡酰奎尼酸

图5 萃取样品的HPLC图谱

Fig.5 HPLC spectrum of sample by extracting

3 结语

(1)本研究采用高效液相色谱法比较了美洲一枝黄花不同部位绿原酸和二咖啡酰奎尼酸的含量,以60%乙醇为提取溶剂,在固液比 1:30,50℃超声提取可有效提取其酚酸成分(绿原酸和二咖啡酰奎尼酸的提取率分别达 90.3%和 91.6%)。美洲一枝黄花不同部位中以花蕾中的绿原酸和二咖啡酰奎尼酸含量最高(分别为 700.0 mg/100 g 和 1 530 mg/100 g),盛花、败花、叶片中的含量次之,根和茎中的含量最少。

(2)用大孔树脂 CN300 作为分离美洲一枝黄花中绿原酸和二咖啡酰奎尼酸的材料,采用浓度为 40%~50%的乙醇可有效地将绿原酸与杂质和其他成分分离;而采用浓度为 50%~70%的乙醇可将二咖啡酰奎尼酸与杂质和其他成分分离。

(3)提取液经乙酸乙酯萃取,可进一步纯化含二咖啡酰奎尼酸的溶液。分析结果表明,纯化液中的二咖啡酰奎尼酸量占总酚酸的 99.6%(3,5-二咖啡酰奎尼酸、3,4-二咖啡酰奎尼酸和 4,5-二咖啡酰奎尼酸分别占 90.4%、5.7%和 3.5%)。

提取美洲一枝黄花中的酚酸类可为咖啡酰奎尼酸和绿原酸的制备提供低成本的原料,同时使清理美洲一枝黄花得到的大量物料得到有效利用,减少其对生态造成的危害。对美洲一枝黄花的利用将有着良好的经济、环境和社会效益。

[参考文献](References)

- [1] GUO S L, JIANG H W, FANG F, et al. Influences of herbicides, uprooting and use as cut flowers on sexual reproduction of *Solidago canadensis* [J]. Journal of weed research, 2009, 49(3): 291-299.
- [2] DONG H Y, LI Y, WANG Q, et al. Impacts of invasive plants on ecosystems in natural reserves in Jiangsu of China [J]. Journal of ecology, 2011, 42(2): 133-137.
- [3] 唐路恒, 马利民. 加拿大一枝黄花入侵机理及控制策略 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(21): 138-139.
TANG L H, MA L M. Research on invasion mechanism and control strategy of *Solidago canadensis* L [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2015, 43(21): 138-139. (in Chinese)
- [4] APATI P, SZENTMIHALYI K, KRISTO S T, et al. Herbal remedies of solidago-correlation of phytochemical characteristics and antioxidant properties [J]. Journal of pharmaceutical & biomedical analysis, 2003, 32: 1 045-1 053.
- [5] 许金国, 赵晓莉, 崔小兵. 加拿大一枝黄花与一枝黄化解热镇痛抗炎作用比较 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(12): 72-73.
XU J G, ZHAO X L, CUI X B. Comparison of solidago Canadensis and Solidago decurrens in antipyretic analgesics and anti-inflammatory effect [J]. Journal of Liaoning university of TCM, 2011, 13(12): 72-73. (in Chinese)
- [6] MARIE E, BRADETTE H, JEAN L, et al. A new labdane diterpene from the flowers of *Solidago canadensis* [J]. Chemical and pharmaceutical bulletin, 2008, 56: 82-84.
- [7] 邢丽红, 李文龙, 瞿海. 金银花提取物中 5 种有机酸含量测定的紫外光谱法 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 547-551.
XING L H, LI W L, QU H. Rapid determination of 5 kinds of organic acid in *Flos Lonicerae* extracts by UV spectroscopy [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(3): 547-551. (in Chinese)
- [8] 周志娥, 罗秋水, 熊建华, 等. 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 Z E, LUO Q S, XIONG J H, et al. 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. (in Chinese)
- [9] MAI T T N, SURESH A, YASUHIRO T, et al. Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of chrysanthemum sinense [J]. Journal of thieme, 2006, 72(1): 46-51.
- [10] BRUNA K B, PRISCILA C, GLAUCIA R B M, et al. Chlorogenic acids reduces the glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia [J]. Cell biochemistry and function, 2008, 26(3): 320-328.
- [11] 李森, 王永香, 孟谨, 等. HPLC 法测定金银花中新绿原酸等 8 种成分的量 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 1 006-1 010.
LI M, WANG Y X, MENG J, et al. Determination of eight components in *Lonicerae Japonicae* flos by HPLC [J]. Chinese traditional and herbal drugs, 2014, 45(7): 1 006-1 010. (in Chinese)
- [12] YOSHIMOTO M, YAHARA S, OKUNO S, et al. Antimutagenicity of mono-, di-, and tricaffeoylquinic acids derivatives isolated

- from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaf[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(11): 2336.
- [13] KIM H J, LEE Y S. Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities[J]. Planta medica, 2005, 71(9): 871-876.
- [14] 刘延泽, 许利嘉, 肖伟, 等. 中医药抗艾滋病优势的科学与前景展望[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1 672-1 684.
- LIU Y Z, XU L J, XIAO W, et al. Scientific analysis and prospect outlook on advantages of traditional Chinese medicines against AIDS[J]. Chinese traditional and herbal drugs, 2012, 43(9): 1 672-1 684. (in Chinese)
- [15] 陈育如, 唐刚, 刘虎, 等. 烟草废料中绿原酸的提取工艺研究[J]. 生物加工过程, 2009, 7(6): 55-58.
- CHEN Y R, TANG G, LIU H, et al. Extraction and separation process of chlorogenic acid from tobacco residue[J]. Chinese journal of bioprocess engineering, 2009, 7(6): 55-58. (in Chinese)
- [16] 张海娟, 刘玲, 郑晓涛, 等. 菊芋叶片中绿原酸的提取工艺条件优化研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 261-262, 265.
- ZHANG H J, LIU L, ZHENG X T. Study on optimization of extraction technology of chlorogenic acid in *Helianthus tuberosus* leaves[J]. Science and technology of food industry, 2011, 32(5): 261-262, 265. (in Chinese)

[责任编辑: 严海琳]