

# 咖啡中绿原酸高效液相色谱法测定及不同 提取工艺的比较研究

袁 俊, 阮 鸣, 陈 静, 周益倩

(南京晓庄学院生物化工与环境科学学院, 江苏 南京 211171)

[摘要] 用正交设计对水浸提法、水浸提+超声波法、乙醇浸提法、乙醇浸提+超声波法进行比较,以咖啡提取物中绿原酸的含量为评判指标,考察时间、温度、乙醇浓度对提取物有效成分绿原酸含量的影响.采用高效液相色谱法测定该成分的含量.最佳提取工艺为乙醇浸提+超声波法,最佳提取条件为超声提取 30 min、温度 60 ℃、乙醇浓度 70%,此条件下提取绿原酸的含量最高.影响提取的主次因素为:超声时间>温度>乙醇浓度.

[关键词] 咖啡,绿原酸,高效液相色谱法,正交设计

[中图分类号] Q-33 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2014)04-0094-05

## Study on Optimum Extraction Process of Chlorogenic Acid in Coffee by HPLC Assay

Yuan Jun, Ruan Ming, Chen Jing, Zhou Yiqian

(School of Biochemical and Environmental Engineering, Xiaozhuang College, Nanjing 211171, China)

**Abstract:** With the content of chlorogenic acid as indexes by orthogonal design, four extraction processes were compared respectively, such as water extracting method, water+ultrasonic extracting method, ethanol extracting method and ethanol+ultrasonic extracting method. The factors affecting the content of chlorogenic acid such as the extracting time, the extracting temperature, the content of ethanol were investigated. The content of chlorogenic acid was determined by HPLC. Results showed that, the optimum extraction was ethanol+ultrasonic extracting method. The optimum extraction conditions were that, ultrasonic extracting 30 min, 60 ℃ temperature and 75% ethanol. Under these conditions the content of chlorogenic acid reached the highest levels. The factors influencing this extraction efficiency were as follows: times of ultrasonic>temperature>Consistency of ethanol.

**Key words:** coffee, chlorogenic acid, HPLC, orthogonal design

绿原酸又名咖啡鞣酸,是植物在有氧呼吸过程中产生的一种由咖啡酸与奎尼酸组成的酯类物质,分子式  $C_{16}H_{18}O_9$ ,分子量 345.30<sup>[1]</sup>.绿原酸广泛存在于葵花籽、咖啡豆、杜仲等植物中,其中在咖啡豆中的含量占了 2%~8%<sup>[2,3]</sup>.绿原酸是一种与人类健康密切相关的生理活性物质,其具有利胆、抗菌、抗过敏、抗致畸、增高白血球、抗氧化<sup>[4-6]</sup>、清除体内 DPPH 自由基<sup>[7]</sup>、抗 HIV、预防心血管疾病和糖尿病,保护肝脏<sup>[8]</sup>等作用.目前分离提取绿原酸的材料主要是用金银花和杜仲,原料受到限制,而咖啡中绿原酸的提取研究鲜见报道.本实验主要采用正交分析的方法研究从咖啡中提取绿原酸,用高效液相色谱法测定该成分的含量,以期从咖啡中有效地提取绿原酸及应用研究提供科学参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

绿原酸标准品:色谱纯,sigma 公司;水,实验室自制双蒸水;甲醇、乙醇,色谱纯;冰醋酸,分析纯;市售

收稿日期:2014-05-20.

基金项目:2013 年度江苏省高校自然科学研究面上项目(13KJD180001).

通讯联系人:袁俊,博士,副教授,研究方向:分子生物学、生物化学. E-mail: yuanjun@njjnu.edu.cn

咖啡豆.

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配有紫外检测器,美国安捷伦公司;超声波发生器;AUY120 型电子天平,日本岛津公司;5418R 冷冻离心机,德国艾本德公司;HH-4 型数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂.

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 色谱条件

色谱柱:汉邦 Hedera ODS-2(4.6 mm×250,5 μm);流动相甲醇:0.1% 冰醋酸=30:70,流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:330 nm;进样量:5 μL.

### 1.2.2 标准溶液配制

精密称取对照品绿原酸 4.00 mg,以甲醇溶解,并定容至 5 mL 棕色容量瓶中,得 0.80 mg/mL 的绿原酸标准溶液,储存于冰箱(4 ℃)备用.

### 1.2.3 样品溶液配制

精确称取咖啡豆粉末 0.500 g,采用水浸提法、水浸提+超声波法、乙醇浸提法、乙醇浸提+超声波 4 种方法进行比较,并对其影响因素进行设定(见表 1-2),以绿原酸含量为考察指标,确定最佳提取工艺条件.

表 1 水浸提法及水浸提+超声辅助法正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of water and water adding ultrasonic extracting methods

水平	A 时间/min	B 温度/℃	C 料液比
1	30	40	1:10
2	50	60	1:20
3	70	80	1:30

表 2 乙醇浸提法及乙醇浸提+超声辅助法正交试验因素水平

Table 2 Factors and levels of ethanol and ethanol adding ultrasonic extracting methods

水平	A 时间/min	B 温度/℃	C 乙醇浓度/%
1	30	40	50
2	50	60	60
3	70	80	70

## 2 结果与分析

### 2.1 方法学考察

#### 2.1.1 线性关系考察

分别吸取标准溶液,用甲醇稀释并在容量瓶中定容,使其浓度分别为 0.04 mg/mL、0.08 mg/mL、0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL,按“1.2.1”的色谱条件测定绿原酸的峰面积,色谱图见图 1(a).以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线,得绿原酸的标准曲线方程  $Y=14\,527X-3.377\,6$  ( $r=0.998\,7$ ),在 0.04 mg/mL ~ 0.8 mg/mL 范围内线性关系良好.

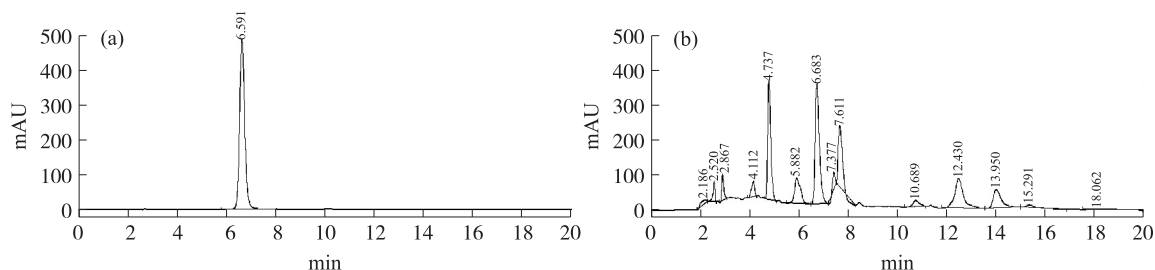


图 1 绿原酸标准品(a)及样品(b)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of chlorogenic acid standards(a) and samples(b)

#### 2.1.2 精密度考察

取绿原酸标准品溶液,连续进样 6 次,绿原酸保留时间的 RSD=0.986%,绿原酸峰面积的 RSD=1.054%,表明该仪器的精密度良好.

#### 2.1.3 稳定性考察

按样品溶液制备方法制样,制得的样品溶液在室温下放置 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h 和 20 h 进行检测.结果表明,绿原酸保留时间的 RSD=0.865%,峰面积的 RSD=1.379%,表明该样品的稳定性良好.

#### 2.1.4 重复性考察

取咖啡样品,按供试品溶液的制备方法得到6份供试品溶液,精密吸取5 $\mu$ L,注入高效液相色谱仪检测.结果表明,绿原酸的保留时间的RSD=0.674%,峰面积的RSD=1.620%,结果表明该方法的重现性良好.

#### 2.1.5 加标回收率试验

准确称量5份咖啡样品,按照样品中绿原酸含量的约0.8、1.0和1.2倍加入对照品,在1.2.1的色谱条件下进样5 $\mu$ L分析,每个样重复3次进样,按样品溶液制备方法制样,结果样品的平均回收率为97.53%,RSD为2.63%,表明样品提取方法可行.

### 2.2 正交实验结果

以咖啡豆粉末为研究对象,按“1.2.3”样品溶液制备方法制样,在“1.2.1”色谱条件下测定,记录其峰面积,计算绿原酸的含量,结果见图1(b)和表3-6.

从表3得知,水浸提法咖啡中绿原酸的最佳提取条件为 $A_2B_1C_3$ ,即浸提时间为50 min,温度为40 $^{\circ}$ C,料液比为1:30,绿原酸的含量为0.496%.各因素对绿原酸提取率的影响大小为料液比>浸提时间>温度.

从表4得知,水浸提+超声波法咖啡中绿原酸的最佳提取条件为 $A_3B_1C_1$ ,即超声时间为70 min,温度为40 $^{\circ}$ C,料液比为1:10,绿原酸的含量为0.572%.各因素对绿原酸提取率的影响大小为料液比>温度>超声时间.

从表5得知,醇浸提法咖啡中绿原酸的最佳提取条件为 $A_2B_1C_2$ ,即浸提时间为50min,温度为40 $^{\circ}$ C,乙醇浓度为60%,绿原酸的含量为0.348%.各因素对绿原酸提取率的影响大小为温度>乙醇浓度>浸提时间.

从表6得知,醇浸提法咖啡中绿原酸的最佳提取条件为 $A_1B_2C_3$ ,即超声时间为30min,温度为60 $^{\circ}$ C,乙醇浓度为70%,绿原酸的含量为0.652%.各因素对绿原酸提取率的影响大小为超声时间>温度>乙醇浓度.

表3 水浸提法正交试验设计及结果

Table 3 Results of orthogonal test of water extracting method

试验号	A 时间/min	B 温度/ $^{\circ}$ C	C 料液比	浓度/(mg/mL)	含量/%
1	1	1	1	0.210	0.420
2	2	2	2	0.169	0.338
3	3	3	3	0.248	0.496
4	1	2	3	0.046	0.092
5	2	3	1	0.139	0.278
6	3	1	2	0.066	0.132
7	1	3	2	0.069	0.138
8	2	1	3	0.246	0.492
9	3	2	1	0.159	0.318
绿原酸浓度					
k1	0.325	0.522	0.508		
k2	0.554	0.374	0.304		
k3	0.473	0.456	0.540		
r	0.229	0.148	0.236		
绿原酸含量					
k1	0.650	1.044	1.016		
k2	1.108	0.748	0.608		
k3	0.946	0.912	1.080		
r	0.458	0.296	0.472		
最优水平	A2	B1	C3		

注:绿原酸含量(%)=  $C \times V \times N / W \times 100\%$ ,式中:C为测量液总绿原酸浓度(mg/mL);V为粗提液体积(mL);N为稀释倍数;W为原料重量(mg).

表 4 水加超声辅助法正交试验设计及结果

Table 4 Results of orthogonal test of water adding ultrasonic extracting method

试验号	A 时间/min	B 温度/℃	C 料液比	浓度/(mg/mL)	含量/%
1	1	1	1	0.286	0.572
2	2	2	2	0.129	0.258
3	3	3	3	0.138	0.276
4	1	2	3	0.085	0.170
5	2	3	1	0.246	0.492
6	3	1	2	0.223	0.446
7	1	3	2	0.148	0.296
8	2	1	3	0.104	0.208
9	3	2	1	0.243	0.486
绿原酸浓度					
k1	0.519	0.613	0.775		
k2	0.479	0.457	0.500		
k3	0.604	0.532	0.327		
r	0.125	0.156	0.448		
绿原酸含量					
k1	1.038	1.226	1.550		
k2	0.958	0.914	1.000		
k3	1.208	1.064	0.654		
r	0.250	0.312	0.896		
最优水平	A3	B1	C1		

表 5 醇浸提法正交试验设计及结果

Table 5 Results of orthogonal test of ethanol extracting method

试验号	A 时间/min	B 温度/℃	C 乙醇浓度/%	浓度/(mg/mL)	含量/%
1	1	1	1	0.164	0.328
2	2	2	2	0.156	0.312
3	3	3	3	0.126	0.252
4	1	2	3	0.136	0.272
5	2	3	1	0.109	0.218
6	3	1	2	0.165	0.330
7	1	3	2	0.129	0.258
8	2	1	3	0.174	0.348
9	3	2	1	0.128	0.256
绿原酸浓度					
k1	0.429	0.503	0.401		
k2	0.439	0.420	0.450		
k3	0.419	0.364	0.436		
r	0.020	0.139	0.049		
绿原酸含量					
k1	0.858	1.006	0.802		
k2	0.878	0.840	0.900		
k3	0.838	0.728	0.872		
r	0.040	0.278	0.096		
最优水平	A2	B1	C2		

表 6 乙醇加超声辅助法正交试验设计及结果

Table 6 Results of orthogonal test of ethanol adding ultrasonic extracting method

试验号	A 时间/min	B 温度/℃	C 乙醇浓度/%	浓度/(mg/mL)	含量/%
1	1	1	1	0.206	0.412
2	2	2	2	0.102	0.204
3	3	3	3	0.095	0.190
4	1	2	3	0.326	0.652
5	2	3	1	0.092	0.184
6	3	1	2	0.176	0.352
7	1	3	2	0.099	0.198
8	2	1	3	0.069	0.138
9	3	2	1	0.098	0.196
绿原酸浓度					
k1	0.631	0.451	0.396		
k2	0.263	0.526	0.377		
k3	0.369	0.286	0.490		
r	0.368	0.240	0.113		
绿原酸含量					
k1	1.262	0.902	0.792		
k2	0.526	1.052	0.754		
k3	0.738	0.572	0.980		
r	0.736	0.480	0.226		
最优水平	A1	B2	C3		

3 结论

本文采用高效液相色谱法探讨从咖啡中提取绿原酸的 4 种方法,结果表明最佳提取工艺为乙醇浸提+超声波法;最佳提取条件为:超声提取 30 min,温度 60 ℃,乙醇浓度 70%,此条件下提取绿原酸的含量最高;影响提取的主次因素为:超声时间>温度>乙醇浓度. 超声波提取法是利用超声波击碎细胞壁,使细胞内组分渗透至溶液中,从而达到分离的目的. 此前周军等<sup>[9]</sup>采用水提法、醇提法、超声波辅助提取法从金银花中提取绿原酸,发现超声波法的提取率优于传统提取. 本文为更加广泛及合理地利用丰富的资源,大力开展绿原酸的提取、纯化与绿原酸产品的开发研究提供了一些理论依据.

[参考文献]

[1] 陈永胜,李志光,董建国. 酶解法提取葵花粕绿原酸工艺研究[J]. 食品科学,2008,29(2):202-204.

[2] 刘军海,裘爱泳. 绿原酸及其提取纯化和应用前景[J]. 粮食与油脂,2003,(9):44-46.

[3] 陈绍华,王亚琴,罗立新. 天然产物绿原酸的研究进展[J]. 食品科技,2008(2):195-198.

[4] Yanagimoto K,Ochi H, Lee K G, et al. Antioxidative activity of fractions obtained from brewed coffee[J]. J of Agric and Food Chem,2004,52(3):592-596.

[5] Iwai K, Kishimoto N, Kakino Y, et al. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans[J]. J of Agric and Food Chem,2004,52(15):4 893-4 898.

[6] Farah A,Paulis T,Trugo L C, et al. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee[J]. J of Agric and Food Chem,2005,53(5):1 505-1 513.

[7] Yen W J,Wang B S,Chang L W, et al. Antioxidant properties of roasted coffee residues[J]. J of Agric and Food Chem,2005,53(7):2 658-2 663.

[8] 史秀玲,高银辉. 绿原酸对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学,2011,17(19):199-202.

[9] 周军,黄琼,李志光,等. 超声波法提取金银花中的绿原酸[J]. 化学与生物工程,2008,25(1):31-33.

[责任编辑:黄 敏]