

金银花中主要有机酸的研究进展

谢碧秀, 孙智达

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 金银花为中医常用药, 其化学成分复杂多样。本文主要介绍了金银花中有机酸的品种、分布及含量、分析方法及鉴定、提取分离及纯化、含量测定、生物活性和产品开发。

关键词: 金银花; 有机酸; 绿原酸

中图分类号: R284; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)09-0093-05

Progress of Researches on the Main Organic Acids in *Honeysuckle*

XIE Bi-xiu, SUN Zhi-da

(Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: As one of traditional Chinese medicines, *Honeysuckle* has complicated chemical composition. In this paper, the varieties, distribution, contents, analysis, identification, isolation and purification, determination of the contents, bioactivity and product development of main organic acids in *Honeysuckle* were discussed.

Key words: *honeysuckle*; organic acid; chlorogenic acid

金银花为忍冬科忍冬属 (*Caprifoliaceae*) 植物忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb), 同属多种植物的干燥花蕾, 为中医常用药^[1]。全世界忍冬植物约 200 种, 我国有 98 种, 广布于全国各地, 而以西南部种类最多, 其中可供药用的品种达 47 种^[2]。金银花化学成分复杂多样, 研究表明, 其富含挥发油, 此外含黄酮类、三萜类及有机酸等^[2]。在本文中, 将就其中的有机酸进行相关探讨。

1 有机酸的品种

绿原酸类化合物是金银花的主要有效成分, 包括绿原酸 (Chlorogenic acid) 和异绿原酸 (Isochlorogenic Acid)^[3,4], 其中异绿原酸为一混合物^[5], 它的异构体有 7 种, 分别为 4,5-二咖啡酸酰奎尼酸, 3,4-二咖啡酸酰奎尼酸, 3,5-二咖啡酸酰奎尼酸, 1,3-二咖啡酸酰奎尼酸, 3-阿魏酰奎尼酸, 4-阿魏酰奎尼酸, 5-阿魏酰奎尼酸。其它有机酸还有咖啡酸 (caffeic acid) 及棕榈酸 (palmitic acid)^[2,6]。绿原酸和异绿原酸的结构式如图 1、图 2。

2 有机酸的含量及分布

收稿日期: 2007-06-17

作者简介: 谢碧秀 (1982-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为天然产物化学及食品化学

通讯作者: 孙智达 (1963-), 男, 博士, 副教授

不同产地、不用品种、不同部位、不同收获时间的金银花中有机酸的含量差别很大。据统计, 绿原酸含量为 0.0423%~5.93%, 3,5-二咖啡酸酰奎尼酸含量为 2.4%~6.1%、咖啡酸含量为 0.0065%~0.0712%^[6-8]。

金银花药材从幼蕾到开放分为幼蕾、三青、二白、大白、银花、金花五个阶段。为了科学确定金银花中绿原酸含量最高时期, 用高效液相色谱法 (刘高峰等, 2001) 对山东平邑产 5 个不同生产阶段金银花以 HPLC 法进行了主要有效成分绿原酸的含量测定, 含量由高到低的顺序为: 三青 (4.62%) > 二白 (4.30%) > 大白 (4.02%) > 银花 (3.87%) > 金花 (3.77%)。以花蕾阶段为高, 花开放后则含量降低^[9]。

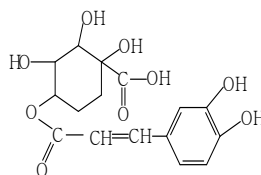


图 1 绿原酸的结构式

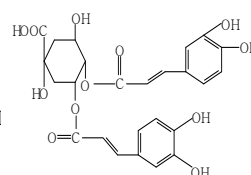


图 2 异绿原酸的结构式

3 分析及鉴定

3.1 物理参数的确定

绿原酸的熔点 206~208 °C, 异绿原酸的熔点 148~150 °C^[10]。

3.2 薄层色谱法

薄层色谱鉴别展开剂为氯仿-甲醇-甲酸 (14:5:1)。

将供试品溶液与对照品溶液点于同一薄层板上,展开,取出,晾干,在紫外光(365 nm)下显蓝色荧光^[11]。

3.3 紫外光谱法

绿原酸、异绿原酸在 328 nm 左右处有强吸收峰,见文献^[10]。

3.4 红外光谱

绿原酸、异绿原酸的红外光谱图见文献^[10]。其特征吸收峰有: $V_{O-H}=3300\text{ cm}^{-1}$, $V_{C-O}=1250\sim 1000\text{ cm}^{-1}$, $V_{C=C}=1650\sim 1450\text{ cm}^{-1}$, $V_{C=O}=1735\text{ cm}^{-1}$ 。

3.5 质谱法^[12]

绿原酸: EI-MSm/z: 354(M⁺), 180(caffeicacid)+, 163(caffeoyl)+。

咖啡酸: EI-MSm/z: 180(M⁺), 163(M+-OH), 136(M+-CO₂, 基峰), 89, 77, 44。

3,5-二咖啡酰奎尼酸: EI-MS m/z: 498(M+-H₂O), 336(M+-H₂O-caffeoylorM+-caffeicacid), 180(caffeicacid)+, 163(caffeoyl)+。

棕榈酸: EI-MSm/z:256(M⁺), 213, 199, 185, 171, 157, 129, 115, 73, 43 (基峰)。

3.6 NMR 谱^[12]

3.6.1 ¹H-NMR

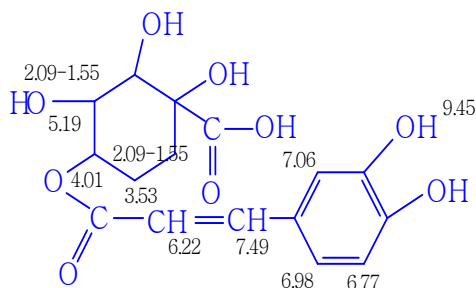


图2 在¹H-NMR 谱中绿原酸的化学位移

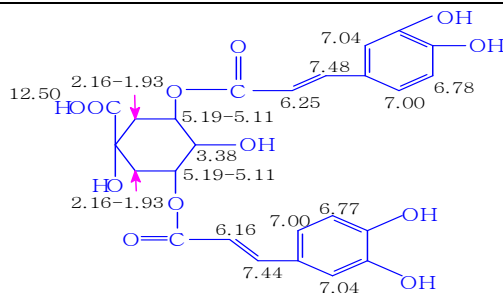


图3 在¹H-NMR 谱中 3,5-二咖啡酰奎尼酸的化学位移

在¹H-NMR 谱中绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎尼酸的化学位移如图 2 和图 3。

3.6.2 ¹³C-NMR

在¹³C-NMR 谱中绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎尼酸的化学位移如图 4 和图 5。

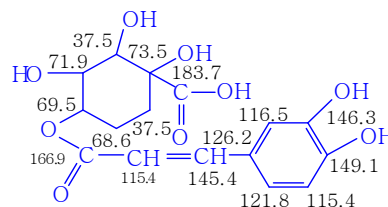


图4 在¹³C-NMR 谱中绿原酸的化学位移

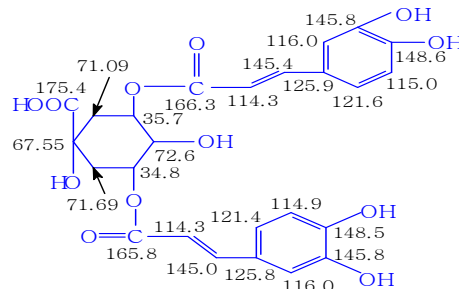


图5 在¹³C-NMR 谱中 3,5-二咖啡酰奎尼酸的化学位移

4 提取分离

4.1 提取

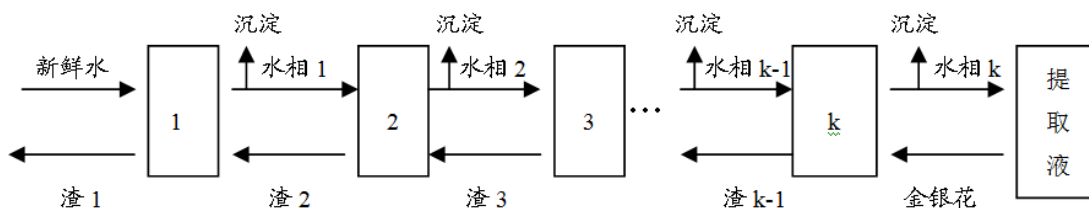


图6 k 级逆流法提取金银花中绿原酸的工艺流程

对于绿原酸的提取,传统的方法有水提醇沉法、稀醇提取法、水提石灰乳沉法等,近年发展起来的还有逆流提取法、减压内部沸腾法、酶法、超滤膜法、超声波法、微波预处理法、超临界 CO₂ 法。在这里,就主要介绍这些新方法。

逆流提取是指提取剂从第 1 级加入流向最后一级,而物料从最后 1 级加入流向第 1 级,即两相逆向流动的

提取过程。逆流法提取金银花中绿原酸的流程(见图 6):新鲜水从第 1 级进入逆流体系,对第 2 级排出的渣 2 进行提取,提取后的渣 1 排出体系;而去除沉淀后的水相 1 进入第 2 级,对第 3 级排出的渣 3 进行提取;分离得到的水相 2 进入第 3 级,对第 4 级的渣 4 进行提取;以此类推,最后水相 k-1 进入 k 级对原料进行提取,排出的渣 k-1 进入 k-1 级,而去除沉淀后的水相 k 部分即

为所需的金银花提取液。

4.1.1 逆流提取法^[13]

经过向智男等人(2006)实验确定了提取温度为 80℃, pH 3.5, 最初料液比为 1:20, 提取时间逐级为 30、20、15 和 10 min 的 4 级逆流法水提绿原酸。

4.1.2 减压内部沸腾法^[14]

该方法首先用少量低沸点解吸剂润湿被提取物料粉末, 使其中的有效成分充分解吸, 然后加入一定温度的热溶剂, 并迅速减压, 使渗透到植物组织内部的解吸剂首先沸腾汽化, 强化提取过程。减压内部沸腾法具有提取温度低、浸膏中绿原酸含量高、杂质含量小、提取时间短等优点。

郝瑞然等(2006)采用减压内部沸腾法提取绿原酸, 在温度为 70℃, 压力为-0.066 MPa, 每次提取时间 4 min 的条件下, 得率为 9.0%, 浸膏绿原酸含量为 18.5%。

4.1.3 酶法^[15]

采用纤维素和果胶酶分别或联合处理药材, 然后再醇提。纤维素酶是一类将纤维素水解成水溶性糖的复合酶类, 金银花用纤维素酶处理后, 结构致密的细胞壁被破坏, 这有利于胞内绿原酸的溶出。加入果胶酶后将金银花中不溶性的果胶降解成可溶性的半乳糖醛酸和其它物质, 增加了提取物的得率。

刘佳佳等(2002)向干金银花粉末中加入 0.5% 纤维素酶液进行酶处理, 处理液经 60% 乙醇 40~50℃ 回流, 结果表明绿原酸粗提物的得率比乙醇回流法提高了 25.97%。

4.1.4 超滤法处理^[16]

依照超滤膜物理化学性能, 采用超滤可除去水提或醇提液中多糖、蛋白质等大分子, 而绿原酸等小分子则可透过膜的一种提取方法。优点是能有效保留有效成分, 无污染, 绿原酸得率较高; 但该法对提取液预处理要求高, 产量易受超滤条件的影响, 且膜清洗麻烦。

4.1.5 超声波法

利用超声产生的强烈振动和空化效应, 加速植物细胞内物质的释放、扩散并溶解到溶液中, 从而达到分离的目的。克服了无水提法难以过滤的制约因素, 无醇提法因溶剂使用而带来的成本高、溶剂回收难之弊, 而且绿原酸的得率和纯度都有所提高^[17]。与常规的溶剂提取法相比, 该方法能大幅度地缩短提取时间、溶剂消耗量少, 但目前仅限于实验室规模。

刘祥兰等(2000)向干金银花粉末中加 12 倍量水, 超声波清洗器(25 Hz)处理 0.5 h, 其提取液减压浓

缩、60℃干燥得浸膏, 加适量水溶解浸膏, 用乙酸乙酯萃取, 萃取液减压浓缩, 60℃干燥得提取终产物^[18], 最终绿原酸的得率为 62.85%。王宏军等(2003)采用同样的方法提取绿原酸, 测得的最终得率为 58%^[19]。

4.1.6 微波预处理法

微波预处理法是利用微波加热的特性来对物料中的目标成分进行选择提取, 与传统法比具有提取时间短、绿原酸提取率高、粗产品中杂质少, 对环境的污染少等优点。

韦藤幼等(2003)确定了微波预处理法提取绿原酸的最佳参数是乙醇浓度为 75%、乙醇溶液用量为样品量的 1.25 倍、微波处理时间为 70 s, 热水温度 90℃、洗涤 10 min 及热水用量为样品量的 25 倍^[20]。

4.1.7 超临界 CO₂ 法

用超临界 CO₂ 提取绿原酸。该方法具有操作范围广, 便于调节的特点, 可以通过控制压力或温度, 有针对性地将绿原酸萃取出来^[16-17]。该方法不仅解决了传统溶剂提取毒性残留的问题, 而且其渗透力极强, 提取效率高, 产品纯度高。但生产成本较高, 只停留在实验室阶段, 还没有大规模应用于工业生产。

4.2 绿原酸的分离纯化

绿原酸的分离纯化的传统方法主要有正丁醇法、絮凝法、乙酸乙酯法等, 在此就不加以累述。本文中主要介绍 β -环糊精共沉淀法、柱层析法、离子交换纤维法。

4.2.1 β -环糊精共沉淀法

将绿原酸提取液中加入一定量的 β -环糊精(β -CD)作为载体, β -CD 与绿原酸形成超分子化合物而产生共沉淀, 进行分离纯化。采用与共沉淀相反的条件使 β -CD-绿原酸解络, 将绿原酸由包合态转换成游离态, 静置分出 β -CD, 回收溶剂后得绿原酸白色粉末。武雪芬等(1999)发现, 当 β -CD 与绿原酸加入量相当时, 二者可形成 1:1 型超分子化合物, 绿原酸得率最高^[21]。该法的优点在于操作简便, 并且 β -CD 可回收再用。

4.2.2 柱层析法

4.2.2.1 大孔树脂法^[22]

绿原酸溶于水、醇等溶剂中, 在测定时很难用溶剂提取等一般分离方法使其与粗提液中水溶性杂质分开。大孔树脂吸附特别适合水溶性化合物纯化分离。该法具有吸附容量大、选择性好、易于解吸、机械强度高、再生处理简单、操作简单、得率恒定、产品质量稳定、成本低等特点, 且吸附法仅用少量溶媒洗脱树脂就能达到浓缩目的, 但耗用时间长, 吸附树

脂清洗困难。采用大孔树脂柱法时, D101 柱不吸附绿原酸, 用水可将其全部洗脱出, 是目前分离绿原酸的最佳途径。高春荣等采用单因素试验法, 以纯化物中绿原酸的质量分数为考察指标, 得出吸附原液金银花质量浓度 0.25 g/mL, pH 值为 7, 流速 3 mL/min, 为 D101 大孔树脂金银花提取液较优的除杂条件。此工艺所得的绿原酸提取率达 85% 以上 (与金银花中绿原酸总含量相比), 质量分数达 65.12%。

4.2.2.2 硅胶柱法

绿原酸粗提液经硅胶柱进行分离, 以乙酸乙酯-甲醇-水混合溶剂洗脱, 回收溶剂后得白色结晶, 即为纯化的提取物。与 β -CD 共沉淀法及正丁醇法相比, 柱层析法所得的产品纯度最高。该法能使绿原酸和黄酮获得较好的分离和提取, 吸附剂聚酰胺可反复使用, 反复层析可以纯化, 纯化度高。但此法操作麻烦, 产量低, 洗脱耗时间较长, 消耗洗脱剂及载体量较大, 不易回收, 费用高, 主要用于分析研究中, 不适于工业生产^[23]。

4.2.3 离子交换纤维法

强碱性离子交换纤维 (Ionexchange fiber, IEF) 是含有羧基的小分子有机物、多酚化合物的良好吸附剂。童勇等 (2006) 以乙醇为溶剂, 采用动态吸附实验考察优化的吸附-解吸条件, 得到了离子交换纤维纯化绿原酸的优化工艺条件为: 吸附时间 60 min, 流速 4.0 mL/min, 解吸时采用体积比甲醇-盐酸 (1 mL/min) =4:1 混合溶液作为解吸剂, 流速为 0.8 mL/min。离子交换法用于绿原酸的分离有其独到的优点, 仅用少量解吸液就能达到浓缩分离的目的, 且工艺较为简单, 绿原酸的得率也比较高^[24]。

4.3 绿原酸含量的测定

绿原酸的测定有容量法、色谱法、比色法、紫外分光光度法、三波长分光光度法、导数光谱法、纸层析-比色法、纸层析-紫外分光光度法、薄层光密度法、薄层层析、紫外分光光度法、薄层扫描法、气相层析法、高效液相层析法^[22,25]。

5 生物活性

绿原酸 (chlorogenic acid, CGA) 化学名 3-*o*-咖啡酰奎尼酸 (3-*o*-caf-feoylquinic acid), 属酚类化合物, 是一种重要的生理活性物质。从结构来看 (见图 1), 它是咖啡酸的葡萄糖苷酯, 应比具有相似分子结构的抗氧化剂如咖啡酸、阿魏酸、芥子酸等有更好的生物代谢功能。绿原酸是酚类抗氧化剂, 研究表明, 它不仅能快速地消除羟基自由基, 而且能有效地通过电子

转移修复脱氧鸟苷酸氧化性羟基加成自由基。除了抗氧化力强外, 绿原酸还具有抑制和杀灭多种致病菌和病毒、抗肿瘤、抑制突变、抗致畸、抗过敏、升高白细胞、保肝利胆、降血压、降血脂及调节细胞色素 P450 连接酶活性等功能^[18,26-29]。

6 产品开发

6.1 医药上的应用

金银花的提取液可制成金银花注射液、银黄注射液、双黄注射液、双黄连粉、金银花流浸膏等多种形式的制剂^[8]。金银花制成的复方药可用于感冒、流感、急性上呼吸道感染、扁桃炎、支气管炎、肺炎、急性菌痢、钩端螺旋体病、急性皮肤感染^[30], 泌尿系感染、血栓性深静脉炎、胆道感染、乳腺炎、急性阑尾炎、传染性肝炎、风湿性关节炎等疾病的治疗。

6.2 保健食品中的应用

用金银花的藤、叶、花蒸馏取露, 称“金银花露”。它是夏令时节芳香可口的保健清凉饮料, 可预防夏秋小儿热病的痄子、中暑、肠道传染病。长期饮用金银花茶还有防感冒、降脂减肥、延缓衰老及滋润皮肤等功效。金银花保健茶属纯天然高级饮品, 具清热解毒, 广谱抗菌, 长期饮用能减少人体大肠对胆固醇的吸收, 起到降血脂, 降胆固醇的作用。是心脏病, 高血压, 高血脂, 糖尿病患者对甜料特殊需求的一种保健饮料。金银花啤酒, 除啤酒自身风味外, 还具有金银花的保健功能。此外, 市场上还出现了金银花润喉片、金银花糖果、金银花冰淇淋、金银花生态水等一系列保健食品。

6.3 化妆品和日用保健品中的应用

用溶剂提取的金银花有效成分, 加入到洗浴剂及化妆品中, 对皮肤没有伤害, 增强皮肤活力, 达到延缓皮肤衰老的作用。此外, 对脂溢性皮炎, 皮肤炎症有一定的疗效; 对去屑止痒, 柔发健肤也有作用^[8,31]。含有金银花有效成分的牙膏, 有减少牙龈红肿、出血的功效。金银花花露水则能够清热解毒、祛痒止痒、提神醒脑。

7 前景与展望

我国金银花植物资源丰富, 采收加工方便, 金银花化学成分复杂、药理作用多样、临床应用频率高。近年来金银花的功能不断被发现, 开始由单一的中草药逐步向茶叶、饮料、化妆品及日用化工品等方面发展。寻找适宜的金银花品种, 研究更适合于工业化提取纯化金银花有机酸的方法, 开发以金银花为主要原

料的制剂,对于满足市场需求,提高金银花的深加工水平,创造极为显著的经济效益和社会效益具有深远意义。

参考文献

- [1] 张永清.金银花名称本草考证[J].山东中医药大学学报,1998,22(6):456
- [2] 赵国玲,刘佳佳,林丹,等.金银花化学成分及药理研究进展[J].中成药,2002,24(12):973-977
- [3] 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
- [4] 王天志,李永梅.金银花的研究进展[J].华西药学杂志,2000,15(4):292-298
- [5] Abraham S K,Sarma L,Kesavan P C.Protective effects of chlorogenic acid,curcuim in and a α -carotene against γ -radiatio Induced in vico chromosomal damaged [J]. Mutation Research,1993,303:109-112
- [6] Iwanhashi H,Negoro Y,Ikeda A,et al.Inhibition by chlorogenic acid of haemat in-cat alysedretinoic acid 5,6-epoxidation[J] Journal of Biochemistry.1986,239: 641-646
- [7] 王天志,李永梅,王志霄.金银花中3种有机酸的反相高效液相色谱法定量分析[J].药物分析杂志,2000,20(5):293-294
- [8] 葛冰,卢向阳,易克.金银花活性成分、药理作用及其应用[J].中国野生植物资源,2004,23(5):13-16
- [9] 刘高峰,孙考祥,黄丽君,等. HPLC 法测定不同生长期金银花中绿原酸含量[J].中医药学报, 2001, 29(3):51
- [10] 钟方晓.金银花有效成分标准物质的研究[J].时珍国医国药,2004,15(7):394-395
- [11] 柴兴云,窦静,贺清辉.山银花中酚酸类成分研究[J].中国天然药物,2004,6(2):339-340
- [12] 李永梅,王天志,王志霄.细毡毛忍冬花蕾化学成分研究[J].中国中药杂志,2001,26(1):45-47
- [13] 向智男,宁正祥,战宇.逆流法提取金银花中的绿原酸研究[J].食品与发酵工业,2006,32(8):131-134
- [14] 郝瑞然,韦藤幼.减压内部沸腾法提取金银花中的绿原酸.广西科学,2006,13(1):43-45
- [15] 刘佳佳.金银花绿原酸酶法提取新工艺研究[J].中成药,2002,24(6):416-418
- [16] 杜延兵,裘爱泳.绿原酸生物活性、资源及其提取纯化[J].现代食品科技,2006,22(2):250-252
- [17] 马柏林,梁淑芳.杜仲叶绿原酸的提取分离研究进展[J].陕西林业科技,2003(4):74-79
- [18] 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): 402-404
- [19] 王宏军,吴国娟,李焕荣,等.金银花中绿原酸提取方法的筛选及其抑菌作用[J].北京农学院学报, 2003,18(4):262-26
- [20] 韦藤幼,赵群莉,阮莉姣,等.微波预处理法提取金银花中的绿原酸[J].中成药. 2003,25(7): 534-537
- [21] 武雪芬,彭仁武,张村,等. β -环糊精在绿原酸分离中的应用研究[J].河南科学,1999,17(4): 385-387
- [22] 郑虎占,黄泽宏,余靖.中药现代化研究与应用[M].北京:学苑出版社,1998:2938-2956.
- [23] 杨怀霞,寇西桃,武雪芬,等.金银花茎叶中绿原酸的新分离方法研究[J].河南中医药学刊,2000,15(4):16-15
- [24] 童勇,曾庆轩,冯长根.离子交换纤维纯化绿原酸的研究[J].齐鲁药事,2006,25(6):360-362
- [25] 于生兰,张龙,孙玲.金银花的研究进展[J].时珍国医国药,2002,13(8):498-500
- [26] Yagasaki K,Miura Y, Okauchi R.Inhibitory effectsof Chlorogenic acid and its related compounds on the invasion of Hepatoma cells in culture[J]. Cytotechnology, 2003, 33(2):229
- [27] Jin Xuehai, Ohgami K, Shiratori K, et al. Effects of blue honeysuckle (Lonicera caerulea L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo [J].Experimental Eye Research, 2006, 82(5) :860-867
- [28] Kono Y,Shibata H,Kodama Y,et al.Chlorogenic acid as aNatural scavenger for hypochlorous acid[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,1995, 217(3): 972-978
- [29] Ricarda N,Anthony JM,Cathie M.Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid[J].Nature Biotechnology,2004,22(6):746-754
- [30] 何显忠,兰荣德.金银花的药理作用与临床应用[J].时珍国医国药,2004,15(12):865-867
- [31] 张永清,程炳嵩.我国金银花资源及其利用[J].中国野生植物,1991,(3):10-14