

金银花中黄酮类化合物的研究进展

张百霞,周凤琴,郭庆梅*

(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 对近 5 年来金银花中黄酮类化合物的化学成分、提取分离、含量测定、药理作用等方面进行总结,为进一步开发利用金银花黄酮类化合物提供依据。金银花黄酮类化合物的提取方法较为成熟包含乙醇回流、水、超声辅助、超高压、超临界流体提取法,但分离纯化方法相对较少仅有大孔树脂柱及聚酰胺柱色谱法;其含量测定主要采用紫外分光光度法,次之为 HPLC 及荧光光度法;金银花黄酮类化合物具有抗氧化及抗自由基、抗菌抗病毒、保肝作用,其保护心血管、消化系统、抗炎及抗免疫、抗肿瘤、镇痛等作用仍需广大医药工作者进一步深入研究。

[关键词] 金银花; 黄酮类化合物; 提取分离; 含量测定; 药理作用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0349-04

Research Progress of Flavonoids on *Lonicerae japonicae* Flos in Last Five Years

ZHANG Bai-xia, ZHOU Feng-qin, GUO Qing-mei*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] This study aims to summarize the research advances on composition, extraction, detection, physiological activity and provides scientific foundation for the development and utilization of flavonoids from *L. japonicae* Flos in last five years. The methods of flavonoids extraction from *L. japonicae* Flos are more mature than separation and purification which are relatively less. Its main content determination is by ultraviolet spectrophotometry, and HPLC is second. The physiological activity of antioxidant, antibacterial and liver protective effect have been reported, so more researches need medical workers to be done is to explain its protect cardiovascular, digestive system, anti-inflammatory and anti-immune, antitumor and analgesic effects.

[Key words] *Lonicerae japonicae* Flos; flavonoids compounds; extraction; detection; physiological activity.

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花,为临床常用中药,具有清热解毒、疏散风热之功效^[1]。早期研究中,人们认为绿原酸为金银花的有效成分,随着研究的深入,发现金银花黄酮有优良的抗氧化、自由基清除、抗炎及调节心血管系统等作用,金银花中的黄酮类化合物已成为当前研究的热点。国内学者对金银花黄酮的化学成分提取分离、含量测定和药理等方面进行了大

量的研究。为了更好地分类开发应用金银花中的有效物质,作者对近 5 年来金银花中黄酮类化合物的成分种类、提取分离、含量测定、药理作用进行介绍。

1 黄酮类化学成分

目前从金银花中分离鉴定出的黄酮类成分主要有黄酮(13个)和黄酮醇(7个)两类。

1.1 黄酮 5-羟基-7,3',4',5'-四甲氧基黄酮(1)、5-羟基-7,3',4'-三甲氧基黄酮(2)、伞花耳草素(3)、5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮(4)、5,3'-二甲氧基木犀草素(5)、芹菜素(6)、3'-甲氧基木犀草素(7)、木犀草素(8)、木犀草素-7-O- α -D-葡萄糖苷(9)、木犀草素-7-O- β -D-半乳糖苷(10)、木犀草素-5-O- β -D-葡萄糖苷(11)、金圣草素-7-O-新橙皮苷(12)和忍冬苷(13),其化合物结构见图 1 和表 1。其中化合物 5,6,11 为近 5 年冯卫平等^[2]首次从该植物中分离得到,其他化合物为之前分离得到。

[收稿日期] 20120323(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973879)

[第一作者] 张百霞,硕士,从事中药质量控制与资源研究, Tel-15963128585, E-mail:baixia575@163.com

[通讯作者] *郭庆梅,教授,博士生导师,长期从事中药质量控制与资源研究的教学与科研工作, Tel-13864149262, E-mail:qmguo@sina.com.cn

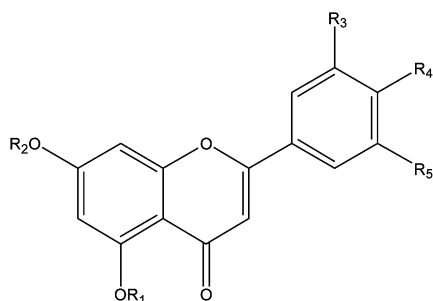


图 1 黄酮类化合物母核

表 1 金银花中黄酮类化合物

No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	H	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
2	H	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
3	H	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
4	H	CH ₃	H	OCH ₃	H
5	CH ₃	H	OCH ₃	OH	H
6	H	H	H	OH	H
7	H	H	OCH ₃	OH	H
8	H	H	OH	OH	H
9	H	glc	OH	OH	H
10	H	gal	OH	OH	H
11	glc	H	OH	OH	H
12	H	rha-glc	OCH ₃	OH	H
13	H	rha-glc	OH	OH	H

1.2 黄酮醇 槲皮素(1)、金丝桃苷(2)、槲皮素-3-*O*-β-*D*-葡萄糖苷(3)、槲皮素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷(4)、苜蓿素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷(5)、芦丁(6)、苜蓿素-7-*O*-新橙皮苷(7),其化合物结构见图 2 和表 2。其中化合物 4 为近 5 年陈秋竹等^[3]首次从该属植物中分离得到,其他化合物为之前分离得到。

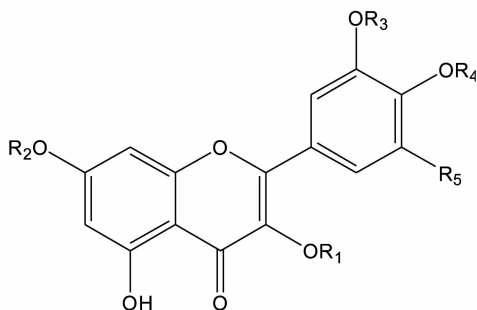


图 2 黄酮醇类化合物母核

研究表明不同花期的金银花中黄酮含量差异明显:以银花中含量最高,为 3.433%;金花次之,为 2.988%;其次是白蕾,为 2.621%;绿蕾中最低,为 2.539%^[4]。

2 黄酮类成分的提取分离

2.1 提取方法

2.1.1 乙醇回流提取法 李荣等^[5]以总黄酮得率为指标,

表 2 黄酮醇类化合物

No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	H	H	H	H	H
2	gal	H	H	H	H
3	glc	H	H	H	H
4	H	glc	H	H	H
5	H	glc	CH ₃	H	OH
6	glc-rha	H	H	H	H
7	H	rha-glc	CH ₃	H	OH

利用正交试验设计进行工艺优化,考察乙醇浓度、料液比、提取时间和提取次数对提取工艺的影响,确立了最佳提取工艺为 12 倍量 90% 的乙醇回流提取 3 次,每次 1 h;实验中用乙酸乙酯萃取,加入碳酸钠使强酸弱碱结合除去绝大部分绿原酸成分,有效地消除了干扰成分的影响,采用比色法并以忍冬苷为对照品检测金银花总黄酮含量。

2.1.2 水提取法 周春晖等^[6]研究了在水提取过程中以 β-环糊精作为金银花黄酮类水提取辅助剂的工艺条件:首先对 β-环糊精用量进行优选,用正交设计法确定了最佳工艺条件为 β-环糊精浓度为 2.0%,提取次数为 2 次,料液比为 1:12 和 1:8,提取温度为 80 ℃,提取时间为 0.5 h,研究表明该方法提取率高达 85% 以上。

2.1.3 超声波辅助提取法 《中国药典》(2005 年版一部)规定对金银花中木犀草苷进行含量测定时采用超声波辅助提取法制备供试品溶液。李晓军等^[7]在单因素实验基础上利用正交试验设计 L₉(3⁴)研究超声波辅助提取金银花黄酮类化合物。正交试验设计的最佳提取条件为:超声时间为 20 min,超声功率为 400 W,物料比为 1:35,进行 3 次平行实验,总黄酮的平均得率为 8.33%。丁既鹏等^[8]对醇提法和超声波法提取金银花黄酮类物质进行了比较,发现超声波法提取得到的黄酮含量高,但同时会引入新的杂质,给含量测定带来不便。

2.1.4 超高压提取法 超高压提取法具有提取时间短,能耗低,杂质成分溶出少,有效成分收率高,常温进行不破坏有效成分结构的优点。纵伟等^[9]考察了超高压技术提取金银花中总黄酮的最佳工艺条件,得到最佳工艺:压力 360 MPa、时间 5 min、固液比 1:14 和原料粒度 80 目;并与热醇浸泡提取法、微波提取法和超声提取法的得率进行比较,其总黄酮得率最高为 13.56%。

2.1.5 超临界流体萃取法 超临界流体萃取法具有热不稳定成分不被破坏或逸散,无溶剂残留,提取率高等优点。靳学远等^[10]考察压力、温度、时间和夹带剂对总黄酮提取率的影响得到超临界萃取最佳条件为压力 30 MPa、温度 40 ℃、时间 120 min 和夹带剂用量 4.5 mL·g⁻¹。

2.2 分离方法

2.2.1 大孔树脂柱色谱法 徐清萍等^[11]考察了 6 种型号的大孔树脂(XAD-16, AB-8, D₁₀₁, HP-20, NKA-9, HZ841)和

聚酰胺对金银花总黄酮的吸附分离性能,6种大孔树脂和聚酰胺对中药总黄酮的分离纯化有较大差别,以吸附量和解析率为指标时 XAD-16 具有较好的性能;以分离后总黄酮含量为指标时,最高的为 NKA-9,其次为 HZ841 和 XAD-16。

2.2.2 聚酰胺柱色谱法 金银花中黄酮类化合物含量较少且种类复杂,在结构上差异较小,且较难溶解于有机溶剂,在进行硅胶柱色谱分离过程中有严重拖尾,而且会损失较多的样品。虽然聚酰胺对样品的吸附量要更大一些,但对黄酮类化合物的分离效果较好。郝凤霞等^[12]通过聚酰胺柱色谱法,梯度洗脱得到绿原酸、水溶性黄酮和脂溶性黄酮3个不同产品 A,B,C。其中 B 总黄酮含量为 95%,得率为 1.12%;槲皮素和木犀草素存在于产品 C 中,含量分别为 7.5%,16.9%,可进行二次柱色谱,逐步提高木犀草素含量。

3 黄酮类成分的测定方法

3.1 紫外分光光度法

3.1.1 芦丁作对照品 芦丁是金银花黄酮类成分含量测定时最为常用的对照品。韩丽琴等^[13]建立了金银花总黄酮含量的测定方法,在显色反应中以芦丁为对照品,确定吸收波长为 510 nm 测得总黄酮含量。秦双双等^[14]以绿原酸和芦丁作为指标对金银花及其变种红色金银花的有效成分含量进行了比较,结果表明红色金银花芦丁含量较高,推测黄酮含量高可能是红色金银花抗寒、抗旱,耐贫瘠土壤的原因之一。

3.1.2 忍冬苷作对照品 邢俊波等^[15]将总黄酮含量作为金银花质量控制的另一标准,旨在建立多指标综合分析金银花质量,并以金银花中主成分忍冬苷为对照品测得总黄酮含量。采用乙酸乙酯萃取,加入碳酸钠使强酸弱碱结合除去绝大部分绿原酸成分,有效地消除了干扰成分的影响,然后用 $Al(NO_3)_3$ 比色法在 510 nm 处测定含量。

3.1.3 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮作对照品 单波长分光光度法测定总黄酮时往往选用芦丁作为对照品,但在三波长分光光度法测定时,芦丁与样品在显色前后最大紫外吸收差别较大。王柯等^[16]采用三波长分光光度法对金银花及叶中的总黄酮进行测定,先以木犀草素、芦丁、槲皮素、5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮等 16 个黄酮化合物分别作为对照品,加入 $AlCl_3$ 显色剂,进行紫外光谱扫描比较,结果表明,5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮与供试品的紫外吸收光谱波形较为一致,最大吸收差别较小,故选其为对照品。

3.2 高效液相色谱法 黄雄等^[17]采用 HPLC 同时测定金银花中 8 种黄酮的含量,色谱柱为 Agilent Zorbax 80A, Extend-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以流动相 A:1.2% THF-0.5% HAc; B 甲醇-乙腈 (40:60) 进行梯度洗脱:0~12 min (10%~20% B), 12~45 min (20% B), 45~60 min (20%~58% B), 检测波长 355 nm, 流速 1.0 mL, 柱温 30 ℃; 8 个黄酮化合物的标准曲线呈良好的线性关系,所有化合物的精密度和重复性的 RSD 均 < 3%,可同时分析金银花中的黄酮类成分。杨蓓蓓等^[18]采用多波长检测的方法,分别在绿原酸、当药苷、忍冬苷的最大吸收波长处进行测定,绘制了 HPLC

图谱,虽然该方法能得到满意的测定结果,但是对仪器条件要求较高,在改变时间的同时需要改变检测波长,操作复杂,不易控制操作条件。

3.3 荧光光度法 荧光光度法是利用黄酮化合物与铝离子生成荧光络合物,并产生特征吸收光谱而进行测定。薛长晖等^[19]采用了荧光光度法对金银花中的总黄酮进行了含量测定,研究了测定时间、干扰离子、表面活性剂、温度以及 pH 对含量测定的影响,选出最佳测定条件为室温 20 ℃,静置 15 min,缓冲液 pH 为 11,表面活性剂为环糊精,认为该方法可以排除含量测定中一些常见金属离子的干扰。

4 金银花黄酮类成分的药理作用

4.1 抗氧化及抗自由基的作用 黄酮类化合物具有多酚结构,能够提供活泼的氢质子与体内氧化产生的自由基结合成稳定的产物,从而阻断氧化过程。刘昌平^[20]利用猪油体系 and 亚油酸体系进行测定,表明金银花黄酮类化合物具有明显的抗氧化活性。沈玲玲等^[21]证明金银花黄酮对 H_2O_2/Fe^{2+} 体系通过 Fenton 反应产生的 ·OH 也具有清除作用,自由基清除率最高达到 92.22%。

4.2 抗菌、抗病毒作用 唐敏^[22]对金银花总黄酮进行了初步分离并研究了各分离组分的体外抑菌作用,通过测定其对临床常见致病菌的 MIC 值,表明黄酮各分离组分均有抑菌作用,其中 B 组分(0% 乙醇洗脱成分)抑菌效果最好,明确金银花黄酮是其主要的抑菌活性成分;并对 C 组分(20% 乙醇洗脱成分)进行进一步的分离纯化,得到金丝桃苷,抑菌实验表明金丝桃苷也是金银花黄酮的主要抗菌活性成分之一。马双成等^[23]分离得到木犀草素和木犀草苷两个黄酮化合物,采用细胞病变法进行了抗呼吸道病毒感染的研究,实验表明木犀草苷抗呼吸道合胞体病毒、副流感 3 型病毒和流感 A 型病毒的作用比木犀草素强,确认黄酮类化合物为金银花抗菌、抗病毒的一类有效成分。

4.3 保肝作用 丘志春等^[24]以猪血清诱导的肝纤维化大鼠为模型观察金银花总黄酮对大鼠各项血清学指标的影响,结果表明金银花总黄酮能降低肝纤维化程度,有效减轻肝细胞损伤,对免疫性肝纤维化具有较好的防治作用。胡成穆等^[25]研究了金银花总黄酮对卡介苗联合脂多糖所致小鼠免疫性肝损伤的保护作用,表明其作用机制可能与减少自由基的产生,抑制细胞膜脂质过氧化,减少 NO 和 TNF-α 等炎症介质的释放有关。

5 结语

综上所述,金银花黄酮类化合物的提取方法及工艺较为成熟,但分离纯化方法相对较少,从金银花中分离出的黄酮类单体化合物种类也不多,分离单体化合物是一切后续研究工作的基础,所以需要利用现代中药技术优化纯化工艺,对化学成分进行深入研究。目前,金银花中总黄酮的含量测定主要采用紫外分光光度法,次之为 HPLC。前者普遍以芦丁为对照品,但杂质干扰严重,有的尝试以忍冬苷和 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮为对照品,但单体对照品缺乏;后者是单体成分分析,尚不能有效地反映总黄酮的含量。因此,金

银花中黄酮类含量测定的专属性以及黄酮类单体成分研究有待深入。

金银花黄酮类化合物具有抗氧化、抗菌抗病毒、保肝作用,上述药理作用已得到证实。此外黄酮类化合物还具有保护心血管、消化系统、抗炎及抗免疫、抗肿瘤、镇痛等作用^[26],而金银花中黄酮类化合物是否具有上述药理作用仍未见报道,因此仍需广大医药工作者进一步深入研究,相信金银花黄酮类成分必将给金银花带来更大的药用价值和经济开发价值。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 205.
[2] 冯卫生, 陈欣, 郑晓珂, 等. 金银花化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(5): 338.
[3] 陈秋竹, 林瑞超, 王钢力, 等. 金银花提取物化学成分研究[J]. 中药材, 2010, 33(6): 920.
[4] 王晋. 金银花不同花期总黄酮含量的测定[J]. 现代农业科技, 2010(21): 114.
[5] 李荣, 胡成穆, 彭磊, 等. 正交设计研究金银花总黄酮提取工艺[J]. 安徽医科大学学报, 2006, 41(4): 410.
[6] 周春晖, 李俊. β -环糊精辅助提取金银花中总黄酮的工艺研究[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1796.
[7] 李晓军. 超声波辅助提取金银花黄酮类化合物的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2009: 33.
[8] 丁既鹏, 李世林. 醇提法和超声波法提取金银花中黄酮类物质的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 64.
[9] 纵伟, 李晓. 超高压法提取金银花中总黄酮的研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(2): 65.
[10] 靳学远, 安广杰. 超临界流体提取金银花中总黄酮研究初报[J]. 医学研究杂志, 2007, 23(9): 156.
[11] 徐清萍, 朱广存. 大孔树脂分离金银花黄酮的研究[J]. 食品工程, 2008(4): 35.
[12] 郝凤霞, 杨敏丽. 金银花中绿原酸和黄酮的同时提取分离工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 211.
[13] 韩丽琴, 董顺福, 刘建华. 金银花中金属元素与总黄酮含量的测定[J]. 中国药房, 2007, 18(33): 2596.

[14] 秦双双, 袁媛, 胡国强, 等. 金银花及其变种有效成分含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 81.
[15] 邢俊波, 李会军, 李萍, 等. 中药金银花质量标准研究——总黄酮的含量测定[J]. 中国现代应用药学杂志, 2002, 19(3): 169.
[16] 王柯, 王勇, 赵东保, 等. 三波长分光光度法测定金银花及叶中总黄酮[J]. 分析实验室, 2011, 30(2): 28.
[17] 黄雄, 李松林, 李萍, 等. HPLC 法同时测定金银花中 8 种黄酮的含量[J]. 药学报, 2005, 40(3): 285.
[18] 杨蓓蓓, 刘超, 王素娟, 等. 高效液相色谱法测定金银花药材中 3 种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 168.
[19] 薛长晖. 胶束增敏荧光法测定金银花中黄酮含量[J]. 辽宁农业科学, 2010(5): 47.
[20] 刘昌平. 金银花黄酮的抗氧化活性分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(20): 9483, 9505.
[21] 沈玲玲, 胡志军, 王志良, 等. 金银花中总黄酮的提取及其消除自由基的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1169.
[22] 唐敏. 金银花黄酮活性成分分离纯化与生物学效应研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2008: 17.
[23] 马双成, 刘燕, 毕培曦, 等. 金银花药材中抗呼吸道感染黄酮类成分的定量研究[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(4): 426.
[24] 丘志春, 陈玉兴, 周瑞玲. 金银花总黄酮抗大鼠免疫性肝纤维化的实验研究[J]. 中药材, 2010, 33(6): 974.
[25] 胡成穆, 姜辉, 刘洪峰, 等. 金银花总黄酮对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 85.
[26] 程秋月, 郭菁, 张成义. 黄酮类化合物药理作用的研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2011, 12(2): 180.

[责任编辑 邹晓翠]