

## 烟叶废弃物中绿原酸的提取与应用研究进展

景浩, 郭得敏, 熊巍\* (西藏自治区烟草专卖局, 西藏拉萨 850000)

**摘要** 绿原酸是烟叶中含量最高的多酚类物质, 中国作为烟草种植大国, 每年烤烟生产过程中会产生大量的低次等废弃烟叶, 从废弃烟叶中提取与纯化出具有广泛应用价值的绿原酸是烟叶综合利用的重要途径。综述了烟草中绿原酸的提取、纯化和检测方法, 对比分析了不同提取工艺、纯化方法和检测方法的应用以及各自的优势与不足, 并对绿原酸的生物活性和药理活性作用进行了详细综述, 以期为后续烟草等植物中绿原酸的提取与利用提供科学的方法与理论指导。

**关键词** 烟草; 绿原酸; 提取工艺; 生物活性; 研究进展

中图分类号 TS49 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)06-0016-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.06.004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### Research Progress on Extraction and Application of Chlorogenic Acid from Tobacco Waste

JING Hao, GUO De-min, XIONG Wei (Tobacco Monopoly Bureau of Tibet Autonomous Region, Lhasa, Tibet 850000)

**Abstract** Chlorogenic acid is the highest content of polyphenols in tobacco leaves. As a large tobacco planting country, China produces a large amount of low-grade waste tobacco during the production process of flue-cured tobacco every year. Extracted and purified from waste tobacco leaves has a wide range of applications. Chlorogenic acid is an important way for comprehensive utilization of tobacco leaves. The extraction, purification and detection methods of chlorogenic acid in tobacco are reviewed, and the application of different extraction processes, purification methods and detection methods as well as their respective advantages and disadvantages are compared and analyzed. The biological and pharmacological activities of chlorogenic acid are analyzed. A detailed review is provided in order to provide scientific methods and theoretical guidance for the subsequent extraction and utilization of chlorogenic acid in tobacco and other plants.

**Key words** Tobacco; Chlorogenic acid; Extraction process; Biological activity; Research progress

绿原酸(chlorogenic acid)是植物有氧呼吸过程合成的一种苯丙素类化合物, 是由奎尼酸与咖啡酸组成的缩酚酸。绿原酸是杜仲、金银花和茵陈等中药材的主要有效成分之一<sup>[1]</sup>, 具有抗氧化、抗病毒、免疫调节、降糖降脂等多种药理作用<sup>[2-3]</sup>, 近年来在医药、化工和食品<sup>[4]</sup>等领域都有应用。

绿原酸易溶于甲醇、丙酮和乙醇等有机溶剂, 难溶于乙醚、苯和氯仿。由于绿原酸的分子结构中含有不饱和双键和酯键以及多元酚, 分子中的邻二酚羟基极易被氧化, 受热、见光都能使其生物学活性丧失, 在酸性环境较碱性环境中更稳定<sup>[3]</sup>。由于其不稳定、难溶于水, 使得应用受到一定限制。目前, 提取和纯化绿原酸的方法主要有溶剂提取法、微波/超声辅助提取法、超临界流体萃取法等提取方法和柱层析、大孔树脂吸附法和膜超滤法等纯化方法<sup>[5]</sup>。

绿原酸是烤烟烟叶中含量最高的多酚类物质, 每年烤烟生产中会产生大量的废弃烟叶和烟杆等<sup>[6-7]</sup>, 若能从中提取和纯化得到绿原酸等活性物质, 会大大增加废弃烟叶的利用价值。该研究综述绿原酸的提取、纯化和检测方法与综合利用现状, 以期为从废弃烟叶中获取纯度更高的绿原酸样品提供方法和理论支撑, 也为烟叶中绿原酸的提取与综合应用提供参考。

## 1 烟草绿原酸的提取方法

**1.1 有机溶剂提取法** 绿原酸的极性较大, 根据“相似相溶”的规律, 可以利用丙酮、甲醇、乙醇等极性较强的有机溶

剂提取。研究表明, 选取 67% 的乙醇水溶液在 61 °C 下可以较好地 从废弃烟叶中提取绿原酸与芸香苷, 2 种化合物的理论提取量之和可达到 43.59 mg/g<sup>[6]</sup>。将浸提温度升高到 90 °C, 可以显著缩短浸提时间, 废次烟叶中绿原酸的提取率可达 0.714%<sup>[8]</sup>。增加浸提液中甲醇的比例, 即使温度降低, 提取时间缩短, 烤烟中绿原酸的 平均提取率也可达到 90.38%<sup>[7]</sup>。也有研究表明, 浸提剂中甲醇比例的增加尤其是当甲醇浓度超过 80% 后, 绿原酸的提取率会显著下降<sup>[9]</sup>。

**1.2 微波/超声波辅助提取法** 微波/超声波辅助可以增加烟叶中绿原酸的提取效率<sup>[10]</sup>, 超声辐照条件下, 采用 95% 乙醇作为浸提剂, 可以使得烟草中绿原酸的提取率达 93.65%<sup>[11]</sup>; 采用氯化胆碱-苹果酸组成的深共熔溶剂体系作为提取溶剂, 30 min 的提取时间, 绿原酸的提取量为 (16.95±0.69) mg/g<sup>[12]</sup>。微波辅助提取技术在提取烟草废弃物中的绿原酸中也有应用, 与传统的回流萃取相比, 微波萃取提取率更高、时间更短。吴晓琼<sup>[13]</sup>以体积分数 70% 的乙醇水溶液为提取剂, 在微波功率 400 W 和温度 60 °C 下, 萃取 90 s, 烟叶废弃物中绿原酸的提取率可达 1.22%。

**1.3 超临界流体提取法** 超临界流体提取法能在较低温度下提取烟叶中的绿原酸, 从而解决绿原酸热稳定性差、在较高提取温度下容易分解的问题, 该方法将萃取和蒸馏分离合并, 可以简化流程, 节省能源消耗, 提取的绿原酸纯度可以在 90% 以上, 但是也存在设备昂贵和维护费用高等缺陷, 目前绿原酸的超临界流体提取还没有大规模工业化应用<sup>[14]</sup>。

## 2 烟草绿原酸的分离纯化方法

**2.1 膜分离法** 超滤法是利用具有一定通透性的超滤膜, 在压力作用下, 将大分子蛋白、糖类 等杂质分离出来的膜分离法, 小分子物质可透过膜从而达到分离和纯化的目的。该方

**基金项目** 中国烟草总公司西藏自治区公司科技创新项目(QJ-JG-2021-04)。

**作者简介** 景浩(1988—), 男, 河南巩义人, 助理工程师, 从事烟草及烟草制品检验工作。\*通信作者, 博士, 从事烟草检验分析研究。

**收稿日期** 2021-05-08; **修回日期** 2021-07-10

法具有操作简单、分离效率高、能耗低、无污染等优点,但也存在对提取液的预处理要求高、膜被污染后难以清洗的缺点,该方法的产量也受膜分离效率等的制约。研究对比了醇沉法和膜分离法对绿原酸的纯化效果,超滤法分离纯化后绿原酸的回收率可达 99%,而用 70%的醇沉法纯化绿原酸的回收率约为 68%<sup>[15]</sup>。

**2.2 柱层析法** 柱层析法广泛应用于分离纯化烟草提取物中的绿原酸,该方法主要利用具有大孔结构的高分子树脂对烟草中绿原酸的吸附分离性能,通过洗脱溶液的共同作用,能够得到纯度较高的绿原酸。该方法具有操作简单、分离效率高、机械强度高、稳定性好和可再生等优点,缺点是耗时较长,使用后树脂清洗较困难。目前,广泛应用于绿原酸分离纯化的树脂主要有 XDA-1 树脂(吸附和解析效果俱佳,绿原酸总回收率可达 80.06%)<sup>[11]</sup>、HPD-400 大孔树脂(柱层析回收率 72.30%)<sup>[16]</sup>和 D101 大孔树脂(动态回收率为 70.37%)<sup>[17]</sup>等。

**2.3 制备色谱法** 现代制备色谱可以用于分离纯化出纯度较高(纯度>95%)的绿原酸产品,是绿原酸应用于医药领域不可缺少的分离手段<sup>[18]</sup>。制备色谱法具有分离速度快、选择性强、产品纯度高、自动化程度高的优点,但是也存在产量低、分离设备造价高昂、技术要求高、对操作人员的素质要求较高的缺点,目前该方法仅用于试验中制备高纯度的绿原酸。

### 3 烟草绿原酸的检测方法

目前,已见报道的绿原酸检测方法有极谱法<sup>[19]</sup>、薄层光密度法、紫外分光光度法、高效毛细管电泳法(HPCE)<sup>[20-21]</sup>、流动注射电致化学发光法、分子印记法、气相色谱法、高效液相色谱及其质谱联用法等。

**3.1 液相色谱法** 目前,涉及绿原酸含量的分析测试方法中,HPLC 法的应用最为广泛,一般选取反相色谱柱分离烟草基质样品中的绿原酸,该方法测定绿原酸分离效果显著,方法的准确度和重复性都较好<sup>[22]</sup>,由于 HPLC 配备的检测器不同,其对绿原酸及其异构体的选择性还存在一定的局限性。基于此,2006 年发布的烟草行业标准就选取 HPLC 法作为烟草及烟草制品中绿原酸的标准检测方法<sup>[23]</sup>。易小丽等<sup>[24]</sup>建立了烟叶中绿原酸及其异构体的 HPLC-UV 检测方法,选取甲醇-水溶液萃取烟叶中的绿原酸,采用反相 C<sub>18</sub> 色谱柱作为分离柱,外标标准曲线法进行定量分析,方法的检出限范围为 0.013~0.028 mg/L,回收率在 92.0%~104.0%。王晋等<sup>[25]</sup>采用 UPLC 法测定烟草中的绿原酸等 8 种多酚类化合物,方法的检出限为 0.35~1.03 μg/g,样品分析时间为 6 min,选取了一种集样品提取、固相萃取净化、过滤和转移为一体的样品萃取瓶,提升了样品处理效率。李力等<sup>[26]</sup>也选取 UPLC 法同时快速测定烤烟中的 6 种多酚,方法的检出限为 3.7~9.9 μg/g,回收率为 94.4%~106.8%,该方法的前处理简单,分析时间短,适合于烤烟中绿原酸等多种多酚含量的测定。由于绿原酸不稳定、易发生水解,在流动性中加入一定比例的乙酸或磷酸能够抑制绿原酸的羟基解离,有效改善目标色谱峰的拖尾现象。

**3.2 液相色谱-串联质谱法** 液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)是最为常用的复杂基质样品中痕量化合物的分析方法,该方法也广泛应用于烟草及烟草废弃物中绿原酸等多酚类物质的准确定量分析。王海燕等<sup>[27]</sup>采用 HPLC-PDA-MS 法对烟草中的多种多酚类化合物的定性分析,选取 53%的甲醇作为提取剂,在微波作用下提取,该方法下总多酚得率为 22.38 mg/g(干重)。LC-MS/MS 还可以实现烟叶中 10 多种多酚类物质的同时定量测定,各目标化合物的检出限均低于 200 ng/mL<sup>[28]</sup>。沈丹红等<sup>[29]</sup>采用 HPLC-UV/MS 同时测定烟叶中绿原酸等 25 种多酚类物质,各目标化合物的检出限均低于 132 ng/mL,回收率为 91.0%~112.4%。Ncube 等<sup>[30]</sup>采用基于源内碰撞诱导解离的 UPLC-QTOF-MS/MS 法测定了烟草组织中的绿原酸和相关的肉桂酸代谢物,该方法可以检测解析绿原酸及其代谢物的异构体。

**3.3 其他新检测方法** 绿原酸的快速检测方法也是近年来的一个研究方向,基于分子印记聚合物的高选择性、压电石英晶体传感器的响应灵敏性能,吴灵等<sup>[31]</sup>研制出分子印记聚合物压电模拟生物传感器测定烟草中的绿原酸的方法,检出限达到  $2.5 \times 10^{-8}$  mol/L,回收率为 96.7%~105.0%,RSD 为 3.7%,该方法具有选择性好、线性范围宽、灵敏度高、准确度高等特点。

### 4 烟草绿原酸的生物活性及应用

绿原酸作为金银花和茵陈等中药材的主要药理活性物质之一,具有广泛的生物活性,目前,对绿原酸生物活性的研究已深入到医药、保健、食品和日用化工等众多领域。

**4.1 抗炎反应作用** 绿原酸含有一定量的 R-OH 基,能够形成氢自由基,产生抗氧化作用,以消除超氧阴离子和羟基自由基等的活性,从而保护组织免受氧化损害,因此,绿原酸是一种较为有效的酚型抗氧化剂。Shi 等<sup>[32]</sup>的研究也显示,绿原酸能够通过激活 Nrf2 信号通路和抑制 NLRP3 因子,达到降低极性肝损伤后的炎症反应作用。丹参酚 B 和绿原酸的联合使用会有效抑制因多氯联苯暴露导致的氧化应激,这也是通过激活 Nrf2 信号通路来实现的<sup>[33]</sup>。新绿原酸能够通过上调 Nrf2/HO-1 和 AMPK 信号通路来抑制脂多糖<sup>[34]</sup>或过氧化氢<sup>[35]</sup>引起的炎症反应,也可以用来抑制巨噬细胞过多导致的急性或慢性的炎症反应,这一作用机理在 MC3T3-E1 细胞试验中也得到了验证<sup>[35]</sup>。一项基于牛乳房上皮细胞的体外试验也表明,绿原酸的使用能够降低炎症反应,预示绿原酸能够作为一种潜在的治疗金黄色葡萄球菌引起的乳房炎症的手段<sup>[36]</sup>。绿原酸能够通过抑制 typeII-5-α 还原酶的活性抑制良性前列腺增生小鼠的前列腺增生<sup>[37]</sup>。

**4.2 神经保护作用** 绿原酸的使用能够防止氧化应激作用引起的脑神经退化,这一作用在很多体外和体内试验中得到证实<sup>[38-39]</sup>。基于全脑缺血再灌注大鼠模型的研究发现,绿原酸具有神经保护作用,主要是通过抑制或下调脑缺血相关的分子标志物实现的<sup>[40]</sup>。Shi 等<sup>[41]</sup>的研究显示,绿原酸有缓解抑郁的作用,这主要是通过保护 PC12 细胞抵抗皮质酮引起的神经毒性来实现的。此外,绿原酸还可以通过抑制内质网应激反应水平使得 6-羟基多巴胺导致的神经毒性降低,这

也预示绿原酸应该能够有效降低帕金森病人体内氧化应激水平和内质网应激水平<sup>[42]</sup>。de Lima等<sup>[43]</sup>对比了绿原酸对遭受慢性束缚应激的小鼠脑内各种标志物的变化,发现绿原酸的使用会下调应激小鼠海马体和大脑皮层中胶质纤维酸性蛋白和纹状体中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )的过表达。绿原酸及其相关化合物还能够保护大鼠皮层神经元免受谷氨酸盐引起的兴奋中毒和氧化应激<sup>[44]</sup>。

**4.3 抗菌和抗病毒作用** 绿原酸具有抗菌作用,因为绿原酸能够与细菌的细胞膜结合,破坏膜结构,损耗膜内电位,释放胞内大分子物质,从而导致细菌死亡<sup>[45]</sup>。绿原酸对金黄色酿脓葡萄球菌有抑制作用<sup>[46]</sup>。

绿原酸能够通过调节群体感应系统降低铜绿假单胞菌毒性,因此,绿原酸是一种潜在的抗铜绿假单胞菌感染的药物<sup>[47]</sup>。Su等<sup>[48]</sup>研究了绿原酸对食源性病原体铜绿假单胞菌的抗菌活性和机理,认为绿原酸能够提高细胞内膜的渗透性,导致线粒体外膜的剥落,扰乱细胞内的代谢,最终导致铜绿假单胞菌的死亡。Martínez等<sup>[49]</sup>研究显示,绿原酸是一种致病性真菌的杀菌剂,这主要源于绿原酸能够促进真菌的细胞溶菌作用,还会使得真菌孢子的膜渗透性增加,从而导致细菌细胞死亡。

绿原酸对流感病毒H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>和H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>具有抑制作用<sup>[50]</sup>,能够有效缓解流感病人肺部的炎症反应,这也显示绿原酸能够作为神经氨酸苷酶阻滞剂抑制细胞和动物模型中的甲型流感病毒(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>/H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>),因此,绿原酸可以作为流感感染的潜在治疗手段<sup>[50]</sup>。

**4.4 对心血管作用** 绿原酸具有清除自由基和抗氧化的作用,在一定程度上抑制由过氧化氢导致的内皮细胞凋亡,抑制血小板的激活,达到防治血栓的功效。体外试验显示:绿原酸能够通过激活血管内皮细胞的SIRT1因子和调节血管内皮细胞的AMPK/PGC-1信号通路,从而降低oxLDL引起的氧化应激水平和线粒体功能障碍<sup>[51]</sup>。绿原酸能够通过抑制溶血磷脂酰胆碱处理的人脐静脉内皮细胞中瞬间受体电位通道蛋白1(TRPC1)来限制钙池操纵的钙通道的作用和活性氧自由基的产生,抑制溶血磷脂酰胆碱带来的血管内皮细胞损伤,从而有效防止动脉粥样硬化<sup>[52]</sup>。此外,绿原酸对氢过氧化物诱导的内皮素细胞损伤和血小板血栓素生物合成有抑制作用。

**4.5 降低肝损伤作用** 绿原酸能够通过降低体内的氧化应激水平从而达到防治肝纤维化的作用<sup>[53]</sup>。异绿原酸可以通过激活肝细胞中的沉默信息调节因子1(SIRT1)达到降低软脂酸诱导的脂肪毒性作用,同时也能够降低肝细胞内的氧化应激水平<sup>[54]</sup>。体外试验也显示,绿原酸能够通过阻止软脂酸诱导内质网应激引起的细胞凋亡,从而减少脂肪酸对肝脏的损伤作用<sup>[55]</sup>。Wu等<sup>[56]</sup>研究发现,绿原酸对胆管结扎术导致的肝损伤有一定的保护作用,这一保护机制在胆管结扎小鼠模型实验中得到验证,绿原酸能够调节胆汁酸和胆红素的运输与代谢,从而有助于降低肝毒性和胆汁淤积,这一作用主要是通过降低胆汁酸和胆红素的摄入合成,促进胆汁酸和

胆红素的排泄来实现的<sup>[57]</sup>。Wei等<sup>[58-59]</sup>的研究也显示,天然的绿原酸能够通过激活ERK/Nrf2抗毒性通路,降低对乙酰氨基酚、雷公藤内酯醇<sup>[60]</sup>和氨甲蝶呤<sup>[61]</sup>引起的肝脏毒性,这也预示绿原酸可以作为对乙酰氨基酚或雷公藤内酯醇导致的肝脏中毒的解毒剂。绿原酸和水飞蓟素的联合使用可以降低因四氯化碳导致的肝损伤<sup>[62]</sup>。

**4.6 对消化道的保护作用** 绿原酸对胃食管返流性胃炎有一定治疗作用,因为胃食管返流会导致食管黏膜和胃黏膜的炎症,而绿原酸有清除自由基和降低体内氧化应激水平的作用,绿原酸的使用能够降低食管的脂质过氧化水平和降低谷胱甘肽/还原性谷胱甘肽的比率,从而对食管和胃黏膜起到一定的保护作用<sup>[63]</sup>。绿原酸可抑制因酒精导致的细胞损伤(PC12细胞),这主要是通过上调相关蛋白-43的表达和抑制线粒体凋亡通路来实现的<sup>[64]</sup>。

**4.7 降脂降糖作用** 绿原酸能在一定程度上预防糖尿病的发生<sup>[65]</sup>,这主要源于绿原酸能够增加链脉佐菌实验性糖尿病大鼠的胰岛素敏感性,提高葡萄糖耐受能力和降低基础的高血糖症<sup>[66]</sup>。一项基于秀丽隐杆线虫的试验也显示,绿原酸能够通过调节秀丽隐杆线虫体内的胰岛素/IGF-1通路增加其寿命<sup>[67]</sup>。研究表明,绿原酸对2型糖尿病大鼠的胰岛素抵抗有明显改善作用,绿原酸可在一定程度上通过影响胰岛素含量来调节葡萄糖向骨骼肌的转运机制。

**4.8 其他作用** 绿原酸还能够通过MAPK/Akt信号通路降低小鼠巨噬细胞(RAW264.7)的铝中毒作用<sup>[68]</sup>。另外一项原代海马神经元细胞试验也显示,绿原酸能够通过螯合作用和抗氧化作用降低铝接触导致的细胞毒性作用<sup>[69]</sup>。绿原酸还能够降低小鼠伽马射线的辐射致死率,这是源于绿原酸与小鼠体内1,1-二苯基-2-吡啶酮自由基与剂量的依赖关系,从而表现出强的抗氧化活性,进而会降低伽马射线导致的小鼠死亡率<sup>[70]</sup>。外敷含有绿原酸的微乳液能够保护皮肤免受紫外线损伤,这一作用在豚鼠上得到验证<sup>[71]</sup>。体内试验显示,绿原酸对视网膜退化有一定的保护作用。绿原酸及咖啡代谢物能够预防视网膜变性,因为这些化合物到达眼内后能够通过降低组织缺氧、视神经压力来达到显著降低细胞凋亡的效果<sup>[72]</sup>。

## 5 存在问题与展望

综上所述,由于绿原酸难溶于水、易水解或热解,在提取烟叶中的绿原酸时需要增加提取剂中有机溶剂的比例,而有机溶剂的增加会导致非极性杂质提取量的增加,导致后续的纯化工艺难度增加。此外,若选用一般的混合溶剂提取方法,需要增加提取温度以提高提取效率、缩短提取时间,而绿原酸属于易水解和热解的化合物,这会导致回收率显著降低。基于此,应选取其他的方式如微波辅助或超声辅助来增加提取效率。

膜分离、柱层析和高效液相制备色谱是最为常用的绿原酸纯化的方法,3种方法各有利弊,在对纯度要求不是特别高、又需制备大量的绿原酸样品时,宜选取柱层析法;若需制备少量高纯度的绿原酸,或者制备药用级或绿原酸标准品

时,宜选用高效液相制备色谱。同样由于绿原酸难溶于水,易水解或热解,导致准确测定其含量存在一定的困难,降低柱温和在流动相中加入一定的酸有利于抑制绿原酸的热解和水解,提高分析的准确度。UPLC 的使用有助于提高方法的选择性、降低方法的分析时间、提高检测通量,该方法与串联质谱的结合是以后复杂样品基质中绿原酸最为主要的检测方法。

绿原酸虽然具有较为广泛的药理作用,但由于其不稳定和难溶于水的特性,使得其作为口服药物的生物利用度低,导致其药物研发存在较大的局限性。从现有的研究结果来看,确需制备绿原酸相关的口服药物可以通过改进制剂方式如微粉化或者络合法来改进。此外,对绿原酸的原型分子进行修饰或者改性可能会增加其溶解性或者药理活性,鉴于其极其广泛的药理活性,未来以绿原酸为原型物生产出一类新型高效低不良反应的药物,可为保障人类健康发挥更大的作用。

### 参考文献

- [1] 王珍,李宗芸.绿原酸的生物活性及甘薯绿原酸研究进展[J].江苏师范大学学报(自然科学版),2017,35(3):30-34,48.
- [2] 王海燕,张仕华,赵谋明,等.烟草绿原酸分离纯化及其抑菌性研究[J].现代食品科技,2008,24(3):233-236,213.
- [3] 王庆华,杜婷婷,张智慧,等.绿原酸的药理作用及机制研究进展[J].药学学报,2020,55(10):2273-2280.
- [4] 王晓梅,奚宇,范新光,等.绿原酸的生物利用率和抗氧化活性研究进展[J].中国食品学报,2019,19(1):271-279.
- [5] BANOŽIĆ M, BANJARI I, JAKOVLJEVIĆ M, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of some bioactive compounds from tobacco waste [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1-14.
- [6] 许诗豪,彭曙光,罗井清,等.低次烟叶中绿原酸与芸香苷提取工艺的研究[J].中国农学通报,2019,35(1):57-62.
- [7] 张伟娜,王志刚,李岩,等.不同提取工艺对烤烟品种 NC102 中绿原酸提取率的影响[J].现代农业,2017(1):106-108.
- [8] 卫佳.废次烟叶中绿原酸提取工艺优化及抗氧化性研究[J].黑龙江农业科学,2018(12):79-84.
- [9] 李晓芹,杜咏梅,张怀宝,等.烟草绿原酸、芸香苷、烟碱和茄尼醇的提取技术研究[J].中国烟草科学,2015,36(1):1-4.
- [10] 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.
- [11] 艾心灵,王洪新,朱松.烟草中绿原酸、烟碱和茄尼醇的超声波辅助提取[J].烟草科技,2007,40(4):45-48.
- [12] 尚宪超,谭家能,杜咏梅,等.超声辅助深共熔溶剂提取两种烟草多酚的方法研究[J].中国烟草科学,2017,38(6):55-60.
- [13] 吴晓琼.微波辅助提取烟草废弃物中的绿原酸[J].安徽农业科学,2010,38(34):19579-19580.
- [14] 马柏林,梁淑芳.杜仲中绿原酸的提取分离研究进展[J].陕西林业科技,2003(4):74-79.
- [15] 刘振丽,张秋海,欧兴长,等.超滤及醇沉对金银花中绿原酸的影响[J].中成药,1996,18(2):4-6.
- [16] 古君平,魏万之.废次烟叶中绿原酸的提取与分离[J].烟草科技,2010,43(2):43-47.
- [17] 张献忠,钟烈洲,黄海智,等.大孔树脂纯化废次烟叶中烟草多酚的工艺[J].化工进展,2012,31(12):2626-2631.
- [18] 彭密军,周春山,钟世安,等.制备型高效液相色谱法分离纯化绿原酸[J].中南大学学报(自然科学版),2004,35(3):408-412.
- [19] CHOUTEAU J, LOCHE J. Polarographic determination of the chlorogenic acid of tobacco; Polarographic behavior of caffeic and chlorogenic acids in basic media [J]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, 1962, 254: 2064-2066.
- [20] HAN S Q. Capillary electrophoresis with chemiluminescence detection of rutin and chlorogenic acid based on its enhancing effect for the luminol-ferrocyanide system [J]. *Analytical sciences*, 2005, 21(11): 1371-1374.
- [21] LI Z B, HUANG D N, TANG Z X, et al. Fast determination of chlorogenic acid in tobacco residues using microwave-assisted extraction and capillary zone electrophoresis technique [J]. *Talanta*, 2010, 82(4): 1181-1185.
- [22] 陈开波,田振峰,陈闯.RP-HPLC 法测定烟草中绿原酸含量的研究[J].分析测试技术与仪器,2005,11(1):60-62.
- [23] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品 多酚类化合物 绿原酸、苜蓿亭和芸香苷的测定:YC/T 202-2006[S].北京:中国标准出版社,2006:1-12.
- [24] 易小丽,周昭娟,王丽达,等.高效液相色谱法测定烟叶中的绿原酸及其异构体[J].理化检验-化学分册,2019,55(1):78-82.
- [25] 王晋,黄海涛,刘欣,等.快速高效液相色谱法测定烟草中的多酚[J].烟草科技,2018,51(11):66-72.
- [26] 李力,李东亮,邓发达,等.UPLC 法同时测定烟叶中 6 种多酚的研究[J].中国农学通报,2018,34(10):131-137.
- [27] 王海燕,崔春,赵谋明,等.烟草多酚提取工艺优化及成分定性分析[J].华南理工大学学报(自然科学版),2008,36(3):64-68.
- [28] 刘萍萍,卢紫舒,罗朝鹏,等.高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定烟叶中 10 种多酚类化合物[J].烟草科技,2019,52(6):42-50.
- [29] 沈丹红,路鑫,常玉玮,等.高效液相色谱-紫外/质谱检测法联合测定新鲜烟叶中的 25 种酚类物质[J].色谱,2014,32(1):40-46.
- [30] NCUBE E N, MHLONGO M I, PIATER L A, et al. Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method [J]. *Chemistry central journal*, 2014, 8(1):1-10.
- [31] 吴灵,卢红兵,钟科军.分子印记聚合物压电模拟生物传感器测定烟草中的绿原酸[J].烟草科技,2004,37(6):16-19,28.
- [32] SHI A M, SHI H T, WANG Y, et al. Activation of Nrf2 pathway and inhibition of NLRP3 inflammasome activation contribute to the protective effect of chlorogenic acid on acute liver injury [J]. *International immunopharmacology*, 2018, 54: 125-130.
- [33] CHEN L J, LI Y, YIN W Q, et al. Combination of chlorogenic acid and salvianolic acid B protects against polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress through Nrf2 [J]. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2016, 46: 255-263.
- [34] PARK S Y, JIN M L, YI E H, et al. Neochlorogenic acid inhibits against LPS-activated inflammatory responses through up-regulation of Nrf2/HO-1 and involving AMPK pathway [J]. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2018, 62: 1-10.
- [35] HAN D D, CHEN W, GU X L, et al. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells through PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 14680-14692.
- [36] GONG X X, SU X S, ZHAN K, et al. The protective effect of chlorogenic acid on bovine mammary epithelial cells and neutrophil function [J]. *Journal of dairy science*, 2018, 101(11): 10089-10097.
- [37] HUANG Y, CHEN H G, ZHOU X, et al. Inhibition effects of chlorogenic acid on benign prostatic hyperplasia in mice [J]. *European journal of pharmacology*, 2017, 809: 191-195.
- [38] HEITMAN E, INGRAM D K. Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid [J]. *Nutritional neuroscience*, 2017, 20(1): 32-39.
- [39] LI Y J, SHI W, LI Y D, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury [J]. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2008, 26(1): 13-21.
- [40] KUMAR G, MUKHERJEE S, PALIWAL P, et al. Neuroprotective effect of chlorogenic acid in global cerebral ischemia-reperfusion rat model [J]. *Naunyn schmiedebergs arch pharmacol*, 2019, 392(10): 1293-1309.
- [41] SHI X W, ZHOU N, CHENG J Y, et al. Chlorogenic acid protects PC12 cells against corticosterone-induced neurotoxicity related to inhibition of autophagy and apoptosis [J]. *BMC pharmacology and toxicology*, 2019, 20(1): 1-10.
- [42] SHAN S, TIAN L, FANG R. Chlorogenic acid exerts beneficial effects in 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity by inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. *Medical science monitor*, 2019, 25: 453-459.
- [43] DE LIMA M E, CEOLIN COLPO A Z, MAYA-LÓPEZ M, et al. Comparing the effects of chlorogenic acid and *Ilex paraguariensis* extracts on different markers of brain alterations in rats subjected to chronic restraint stress [J]. *Neurotoxicity research*, 2019, 35(2): 373-386.
- [44] REBAI O, BELKHIR M, SANCHEZ-GOMEZ M V, et al. Differential molecular targets for neuroprotective effect of chlorogenic acid and its related compounds against glutamate induced excitotoxicity and oxidative stress in rat cortical neurons [J]. *Neurochemical research*, 2017, 42(12): 3559-3572.
- [45] LOU Z X, WANG H X, ZHU S, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid [J]. *Journal of food science*, 2011, 76(6):

- M398–M403.
- [46] WANG L, BI C W, CAI H J, et al. The therapeutic effect of chlorogenic acid against *Staphylococcus aureus* infection through sortase A inhibition [J]. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 1–12.
- [47] WANG H, CHU W, YE C, et al. Chlorogenic acid attenuates virulence factors and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* by regulating quorum sensing [J]. *Applied microbiology & biotechnology*, 2019, 103 (2): 903–915.
- [48] SU M M, LIU F, LUO Z, et al. The antibacterial activity and mechanism of chlorogenic acid against foodborne pathogen *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Foodborne pathogens and disease*, 2019, 16 (12): 823–830.
- [49] MART ÍNEZ G, REGENTE M, JACOBI S, et al. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi [J]. *Pesticide biochemistry and physiology*, 2017, 140: 30–35.
- [50] DING Y, CAO Z Y, CAO L, et al. Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase [J]. *Scientific reports*, 2017, 7: 1–11.
- [51] TSAI K L, HUNG C H, CHAN S H, et al. Chlorogenic acid protects against oxLDL-induced oxidative damage and mitochondrial dysfunction by modulating SIRT1 in endothelial cells [J/OL]. *Molecular nutrition & food research*, 2018, 62 (11) [2021-01-17]. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700928>.
- [52] JUNG H J, IM S S, SONG D K, et al. Effects of chlorogenic acid on intracellular calcium regulation in lysophosphatidylcholine-treated endothelial cells [J]. *BMB reports*, 2017, 50 (6): 323–328.
- [53] SHI H T, SHI A M, DONG L, et al. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis *in vivo* and *in vitro* through inhibition of oxidative stress [J]. *Clinical nutrition*, 2016, 35 (6): 1366–1373.
- [54] YANG L L, WEI J C, SHENG F Y, et al. Attenuation of palmitic acid-induced lipotoxicity by chlorogenic acid through activation of SIRT1 in hepatocytes [J]. *Molecular nutrition & food research*, 2019, 63 (14): 1–12.
- [55] ZHANG Y, MIAO L S, ZHANG H J, et al. Chlorogenic acid against palmitic acid in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis resulting in protective effect of primary rat hepatocytes [J]. *Lipids in health and disease*, 2018, 17 (1): 1–8.
- [56] WU D H, BAO C Y, LI L H, et al. Chlorogenic acid protects against cholestatic liver injury in rats [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 129 (3): 177–182.
- [57] ZHU L L, WANG L, CAO F, et al. Modulation of transport and metabolism of bile acids and bilirubin by chlorogenic acid against hepatotoxicity and cholestasis in bile duct ligation rats: Involvement of SIRT1-mediated deacetylation of FXR and PGC-1 $\alpha$  [J]. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*, 2018, 25 (3): 195–205.
- [58] WEI M J, ZHENG Z Y, SHI L, et al. Natural polyphenol chlorogenic acid protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by activating ERK/Nrf2 antioxidative pathway [J]. *Toxicological sciences*, 2018, 162 (1): 99–112.
- [59] ZHENG Z Y, SHENG Y C, LU B, et al. The therapeutic detoxification of chlorogenic acid against acetaminophen-induced liver injury by ameliorating hepatic inflammation [J]. *Chemico-biological interactions*, 2015, 238: 93–101.
- [60] WANG J M, CHEN R X, ZHANG L L, et al. *In vivo* protective effects of chlorogenic acid against triptolide-induced hepatotoxicity and its mechanism [J]. *Pharmaceutical biology*, 2018, 56 (1): 626–631.
- [61] ALI N, RASHID S, NAFEES S, et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach [J]. *Chemico-biological interactions*, 2017, 272: 80–91.
- [62] AL-RASHEED N, FADDAH L, AL-RASHEED N, et al. Protective effects of silymarin, alone or in combination with chlorogenic acid and/or melatonin, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity [J]. *Pharmacognosy magazine*, 2016, 12 (S3): S337–S345.
- [63] KANG J W, LEE S M. Protective effects of chlorogenic acid against experimental reflux esophagitis in rats [J]. *Biomolecules & therapeutics*, 2014, 22 (5): 420–425.
- [64] FANG S Q, WANG Y T, WEI J X, et al. Beneficial effects of chlorogenic acid on alcohol-induced damage in PC12 cells [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2016, 79: 254–262.
- [65] YAN Y W, ZHOU X, GUO K X, et al. Use of chlorogenic acid against diabetes mellitus and its complications [J]. *Journal of immunology research*, 2020, 2020: 1–6.
- [66] FERRARE K, BIDELE P R, AWWAD A, et al. Increase in insulin sensitivity by the association of chioric acid and chlorogenic acid contained in a natural chioric acid extract (NCRAE) of chioric (*Cichorium intybus* L.) for an antidiabetic effect [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 215: 241–248.
- [67] ZHENG S Q, HUANG X B, XING T K, et al. Chlorogenic acid extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via insulin/IGF-1 signaling pathway [J]. *The journals of gerontology series A: Biological sciences and medical sciences*, 2017, 72 (4): 464–472.
- [68] CHENG D, ZHANG X Y, TANG J L, et al. Chlorogenic acid protects against aluminum toxicity via MAPK/Akt signaling pathway in murine RAW264.7 macrophages [J]. *Journal of inorganic biochemistry*, 2019, 190: 113–120.
- [69] WANG X M, FAN X G, YUAN S Z, et al. Chlorogenic acid protects against aluminium-induced cytotoxicity through chelation and antioxidant actions in primary hippocampal neuronal cells [J]. *Food & function*, 2017, 8 (8): 2924–2934.
- [70] HOSSEINIMEHR S J, ZAKARYAEV V, AHMADI A, et al. Radioprotective effects of chlorogenic acid against mortality induced by gamma-irradiation in mice [J]. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 2008, 30 (1): 13–16.
- [71] KITAGAWA S, YOSHII K, MORITA S Y, et al. Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage [J]. *Journal of immunology research*, 2011, 59 (6): 793–796.
- [72] JANG H, CHOI Y, AHN H R, et al. Effects of phenolic acid metabolites formed after chlorogenic acid consumption on retinal degeneration *in vivo* [J]. *Molecular nutrition & food research*, 2015, 59 (10): 1918–1929.

(上接第 15 页)

- [35] KRAUSE M, GAUTREAU A. Steering cell migration: Lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15 (9): 577–590.
- [36] BYZOVA T V, GOLDMAN C K, PAMPORI N, et al. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: Activation of the integrins [J]. *Mol Cell*, 2000, 6 (4): 851–860.
- [37] SOARES M A, TEIXEIRA F C O B, FONTES M, et al. Heparan sulfate proteoglycans may promote or inhibit cancer progression by interacting with integrins and affecting cell migration [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 1–8.
- [38] WANG C L, CHOWDHURY S, DRISCOLL M, et al. The interplay of cell-cell and cell-substrate adhesion in collective cell migration [J]. *J R Soc Interface*, 2014, 11 (100): 1–10.
- [39] CRUZ-MONSERRATE Z, O'CONNOR K L. Integrin alpha 6 beta 4 promotes migration, invasion through Tiam1 upregulation, and subsequent Rac activation [J]. *Neoplasia*, 2008, 10 (5): 408–417.
- [40] LIN L Q, ZENG X W. Numerical investigation of the role of intercellular interactions on collective epithelial cell migration [J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2018, 17 (2): 439–448.
- [41] NIESSEN C M. Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127 (11): 2525–2532.
- [42] LEBRETON G, CASANOVA J. Ligand-binding and constitutive FGF receptors in single *Drosophila* tracheal cells: Implications for the role of FGF in collective migration [J]. *Dev Dyn*, 2016, 245 (3): 372–378.
- [43] LEBRETON G, CASANOVA J. Specification of leading and trailing cell features during collective migration in the *Drosophila* trachea [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127 (Pt2): 465–474.
- [44] DAI W, MONTELL D J. Live imaging of border cell migration in *Drosophila* [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1407: 153–168.
- [45] WANG X B, HE L, WU Y I, et al. Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement *in vivo* [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12 (6): 591–597.
- [46] RAMEL D, WANG X B, LAFLAMME C, et al. Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15 (3): 317–324.