

HPLC 指纹图谱结合化学计量学与抗氧化能力评价不同产地槐米的品质

刘金亮^{1,2,3}, 李隆云^{1*}, 何光华^{2*}, 张 雪^{1,4}, 宋旭红¹, 崔广林¹, 廖尚强⁵

1. 重庆市中药研究院中药种植研究所 (重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆市中药资源学重点实验室), 中国中医科学院中药资源中心 重庆分中心, 重庆 400065
2. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715
3. 贵州大学烟草学院, 贵州 贵阳 550025
4. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331
5. 重庆恒林农业开发有限公司, 重庆 400700

摘要: 目的 以连续 2 年收集于不同产地的槐米样品为材料, 建立槐米 HPLC 指纹图谱, 并采用 HPLC 法同时测定 5 种黄酮类组分含量, 结合总黄酮含量及抗氧化能力评价不同产地槐米的品质。方法 采用 HPLC 法和分光光度法对已收集 54 份槐米样品的芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚、异鼠李素和总黄酮组分含量及 DPPH、羟自由基、超氧阴离子清除能力和脂质过氧化抑制能力等指标进行测定, 运用相似度、聚类分析、主成分分析方法综合分析不同产地槐米的品质。结果 建立了 HPLC 指纹图谱, 样品组分分离良好, 方法学考察均符合要求, 共有峰 28 个, 确定了峰面积之和占共有峰总峰面积 80% 以上的 5 个组分; 以总黄酮和 5 个黄酮类组分的含量以及 4 个抗氧化能力指标为依据, 将 54 份样品进行聚类分析和主成分分析, 两者结果一致, 不同产地的样品没有表现出显著的地域特性。结论 HPLC 结合化学计量学及抗氧化能力可准确、综合地对槐米进行品质评价, 通过分析表明不同生产年度同一产地间的样品品质有差异, 同一生产年度不同产地间样品品质有差异, 说明槐米品质受气候的影响; 还表明同一生产年度同一产地的不同样品品质也有差异, 充分说明了槐米的品质也受关键生产技术环节的影响。

关键词: 槐米; HPLC 指纹图谱; 化学计量学; 抗氧化能力; 芦丁; 槲皮素; 染料木素; 山柰酚; 异鼠李素; 总黄酮

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4644-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.027

Quality evaluation of *Flos Sophorae Immaturus* from different habitats by HPLC coupled with chemometrics and anti-oxidant ability

LIU Jin-liang^{1,2,3}, LI Long-yun¹, HE Guang-hua², ZHANG Xue^{1,4}, SONG Xu-hong¹, CUI Guang-lin¹, LIAO Shang-qiang⁵

1. Institute of Material Medical Planting, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica (Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica, Chongqing Key Laboratory of Chinese Medicine Resources), Chongqing Sub-center of National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Chongqing 400065, China
2. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China
3. College of Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China
4. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China
5. Chongqing Henglin Agricultural Development Co., Ltd., Chongqing 400700, China

Abstract: Objective Taking *Flos Sophorae Immaturus* (FSI) samples from different habitats in two years as materials, to establish the HPLC fingerprint of FSI, determine the contents of five kinds of flavonoids by HPLC, and evaluate the quality of FSI from different habitats according to the total flavonoids contents and anti-oxidant ability. **Methods** Total flavonoids, rutin, quercetin, genistein, kaempferol, isorhamnetin, DPPH, hydroxyl radicals, superoxide anion radicals, lipid peroxidation of 54 pieces

收稿日期: 2018-03-02

基金项目: 中央本级重大增减支项目 (2060302); 重庆市林业重点科技攻关项目 (2016-14); 国家中药材产业技术体系 (CARS-21); 重庆市中药材产业技术体系建设项目 (2018 [5] 号)

作者简介: 刘金亮 (1983—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药材品质评控理论与技术。E-mail: liujinliang0827@163.com

*通信作者 李隆云 (1964—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药材良种选育与规范化生产技术。Tel: (023)89029118 E-mail: lilongyun8@163.com
何光华, 男, 博士, 博士生导师, 教授, 研究方向为作物遗传育种与分子生物学。E-mail: hegh@swu.edu.cn

of FSI samples were determined by HPLC and spectrophotometry. The quality of FSI from different areas were analyzed by similarity, clustering analysis, and principal component analysis method. **Results** HPLC fingerprint was established and all samples could be separated well. All the indexes of the methodological investigation arrived the requirements, and 28 common peaks in fingerprints were found, five characteristic peaks whose total peak area is more than 80% of the common peak area were identified, respectively. Based on the contents of total flavonoids, five flavonoids, and four anti-oxidative ability, 54 pieces of samples were analyzed by cluster analysis and principal component analysis. The results were the same, which did not show obvious geographical characters from different samples. **Conclusion** HPLC combined with chemometric method and anti-oxidant ability is accurate and comprehensive for the quantitative analysis of FSI. The quality of FSI samples from the same growing areas in different growing years and from different growing areas in the same growing year were different, which showed that the quality of FSI was affected by climate. Different samples from the same growing area in the same year were different, which showed that the quality of FSI also was affected by key producing technology.

Key words: *Flos Sophorae Immaturus*; HPLC fingerprint; chemometrics; anti-oxidant ability; rutin; quercetin; genistein; kaempferol; isorhamnetin; total flavonoids

国槐 *Sophora japonica* Linn. 属蝶形花科多年生落叶乔木,其未开放的花蕾称为槐米,收载于《中国药典》2015年版一部,具有止血凉血、清肝泻火功效^[1]。国槐是集药、食、材、赏于一体的优良树种,在我国分布极广,从东到西,从南到北均有分布,北京、河北、河南、山西、陕西、安徽、辽宁、山东和甘肃等省的多个管辖市将其定为市树,主要以行道树的形式存在,能够提供一定量的槐米供医药领域所用。除此之外,在广西、重庆、山西、湖南等地亦有规模化种植国槐的基地,专门生产槐米供于医药领域,这样一来就出现了一药多产地的现象^[2]。由于不同产地间的光照、气温、降水等气候及土壤条件均有显著差异,这些差异都会影响到槐米品质的稳定性、一致性和有效性。目前已有只针对芦丁一种成分来评价不同产地槐米品质的研究报道^[3-4],但是未见其他系统、全面、科学的相关研究报道。因此,本研究考察不同产地槐米5种黄酮类组分含量、总黄酮含量和抗氧化能力等的差异,系统、全面、多维度地评价和比较不同产地槐米的品质,为国槐合理的种植区划及其开发利用提供依据。

1 仪器与材料

Shimadzu LC-20AD 系列超高效液相色谱仪(包括PDA检测器、四元泵、自动进样器、柱温箱等);岛津 UV-2600 紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 集团);CAP 225D 电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);CEM MARS 6 微波消解/萃取系统(美国 CEM 公司);甲醇(HPLC级)和乙腈(HPLC级)购买于赛默飞世尔科技股份有限公司;超纯水由娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)代替;冰醋酸、过氧化氢、DPPH、抗坏血酸、脱氧核糖等试剂均为分析纯。

对照品芦丁(批号 100080-201409)、槲皮素(批号 100081-201408)、染料木素(批号 111704-201302)、山柰酚(批号 110861-201310)和异鼠李素(批号 110860-201410)均购于中国食品药品检定研究院,质量分数大于 98%。

槐米样品于 2014 年和 2015 年在广西壮族自治区桂林市全州县庙头镇、枫塘镇、全州镇、东山瑶族乡、永岁乡、咸水镇、绍水乡、白宝乡、才湾镇、黄沙河镇,兴安县湘漓镇;湖南省永州市道县蔡市镇、寿雁镇、四马桥镇,东安县横塘镇;重庆市大足区、北碚区、涪陵区、万州区、巫山县;河南省、河北省、山西省、陕西省、甘肃省等地收集(表 1),经重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定为蝶形花科槐属植物国槐 *Sophora japonica* Linn. 未开放的花蕾。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Ultimate C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0~5 min,乙腈-甲醇-0.5%冰醋酸(0:25:75),5~50 min,乙腈-甲醇-0.5%冰醋酸(10→25:15→0:75),50~70 min,乙腈-甲醇-0.5%冰醋酸(25:0:75),70~80 min,乙腈-甲醇-0.5%冰醋酸(0:25:75);体积流量 0.8 mL/min;检测波长 260 nm;柱温 25 ℃,进样体积 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取各对照品,用甲醇溶解,混合对照品溶液中芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素质量浓度分别为 2.57、0.56、0.20、0.26、0.23 mg/mL,0.22 μm 微孔滤膜滤过,备用。

2.3 供试品溶液的制备

将干燥的槐米样品粉碎,过 100 目筛,精确称取 0.5 g 槐米样品加入 25 mL 甲醇,微波(287 W)

表 1 不同产地槐米样品

Table 1 Different growing areas of *Flos Sophorae Immaturus*

序号	地点	采集时间	序号	地点	采集时间
1	广西全州县庙头镇宜湘河村 1	2014 年	28	重庆北碚区西山坪村	2014 年
2	广西全州县庙头镇宜湘河村 2	2014 年	29	重庆涪陵区	2014 年
3	广西全州县庙头镇宜湘河村 3	2014 年	30	广西全州县永胜乡	2014 年
4	广西全州县枫塘镇时家村	2014 年	31	山西稷山县	2014 年
5	广西全州县庙头镇宜湘河村 4	2014 年	32	山西临汾市 1	2014 年
6	广西全州县枫塘镇土桥村	2014 年	33	山西临汾市 2	2014 年
7	广西全州县全州镇玫节岗村	2014 年	34	山西临汾市 3	2014 年
8	广西全州县东山瑶族乡白竹村	2014 年	35	重庆万州区	2014 年
9	广西全州县永岁乡下改州村 1	2014 年	36	重庆北碚西山坪村 1	2015 年
10	广西全州县咸水镇桂北农场	2014 年	37	重庆北碚西山坪村 2	2015 年
11	广西全州县永岁乡下改州村 2	2014 年	38	重庆万州区	2015 年
12	广西全州县绍水乡桂北农场	2014 年	39	重庆大足区株溪镇	2015 年
13	广西全州县白宝乡梅林村	2014 年	40	广西全州县 1	2015 年
14	广西全州县才湾镇鲁板桥村	2014 年	41	重庆大足区鸡公岭	2015 年
15	广西全州县黄沙河镇慕古村	2014 年	42	重庆北碚西山坪村 3	2015 年
16	湖南永州市行道树国槐	2014 年	43	广西全州县 2	2015 年
17	湖南永州市蔡市镇三龙塘村 (二年生小树)	2014 年	44	重庆北碚西山坪村 4	2015 年
18	湖南永州市蔡市镇三龙塘村	2014 年	45	重庆巫山县	2015 年
19	湖南永州道县寿雁镇鲤鱼坝村	2014 年	46	北京市	2015 年
20	湖南省永州市道县四马桥镇	2014 年	47	广西全州县 3	2015 年
21	广西兴安县湘漓镇西街头村	2014 年	48	陕西大荔县	2015 年
22	广西兴安县湘漓镇义和村 1	2014 年	49	重庆涪陵区	2015 年
23	湖南永州东安县横塘镇三直村 1	2014 年	50	甘肃兰州市	2015 年
24	湖南永州东安县横塘镇三直村 2	2014 年	51	河南漯河市	2015 年
25	湖南永州东安县横塘镇三直村 3	2014 年	52	重庆万州区太安镇 1	2015 年
26	广西兴安县湘漓镇义和村 2	2014 年	53	重庆万州区太安镇 2	2015 年
27	河北安国市	2014 年	54	重庆万州区太安镇 3	2015 年

提取 80 s, 合并提取液后用 0.22 μm 的针筒过滤器滤过, 滤液收集于 1.5 mL 进样瓶中上机分析^[5]。对照品和样品 HPLC 色谱图见图 1。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取“2.3”项下制备的槐米供试品溶液 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰的相对保留时间和共有峰峰面积 RSD 均小于 2%, 表明仪器具有良好

的精密度。

2.4.2 重复性试验 取同一批槐米样品 6 份 (1 号样品), 按“2.3”项下方法制备样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.4.3 稳定性试验 取 1 号样品按“2.3”项制备的供试品溶液, 室温放置, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定, 记录

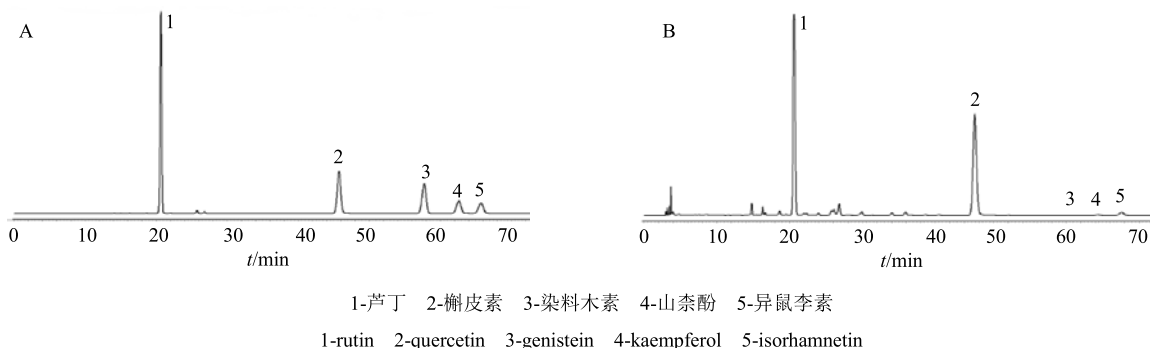


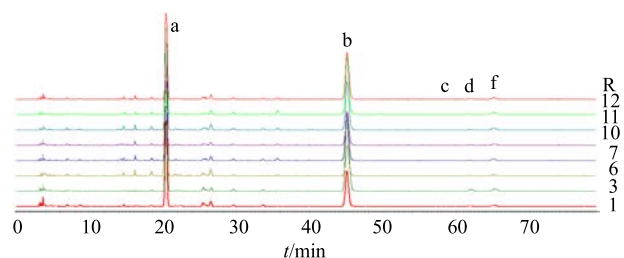
图 1 混合对照品 (A) 和槐米样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of mixed standards (A) and sample (B)

共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%，表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 不同产地槐米指纹图谱的建立

于 2014 年和 2015 年收集的不同产地槐米样品按“2.3”项下方法制备，按“2.1”项下色谱条件进样，进行 HPLC 分析，得到不同产地槐米指纹图谱，采用“2012 年版中药色谱指纹图谱相似度评价系统”分析，得到 28 个共有峰，确定出峰面积较大的 5 个共有峰，占指纹图谱共有峰总面积的 80% 以上，分别是芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素；采用平均数法，时间窗宽度为 0.3，经过多点矫正、峰匹配、生成对照等步骤，生成对照指纹图谱，见图 2（因为样品太多，图谱叠加看不清楚，故仅选择部分样品 1、3、6、7、10、11 和 12）。计算样品指纹图谱、对照图谱间的相似度，结果显示样品间相似度为 0.60~0.99，表明供试样品间差异较大，建立的指纹图谱具有代表性；样品与对照指纹图谱的相似度均大于 0.85，表明对照指纹图谱良好。



R-对照指纹图谱 a-芦丁 b-槲皮素 c-染料木素 d-山柰酚 f-异鼠李素
R-reference fingerprint a-rutin b-quercetin c-genistein d-kaempferol f-isorhamnetin

图 2 不同产地槐米样品及对照指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of s reference and sample in different growing areas

2.6 5 种黄酮类组分、总黄酮含量及抗氧化能力测定

2.6.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下稀释的不同质量浓度梯度的对照品溶液按“2.1”项下色谱条件测定，测定 3 次，取平均峰面积。以进样量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线并进行回归计算，得到芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素的线性回归方程（表 2）。

2.6.2 精密度试验 精密吸取“2.3”项下制备的槐米供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素的相对保留时间和相对峰面积。结果各组分的

表 2 线性回归方程

Table 2 Linear regression equation of reference substances

组分	回归方程	r^2	线性范围/(mg·L ⁻¹)
芦丁	$Y=163\ 132.07+2\ 175\ 345.7 X$	0.999	257~12 850
槲皮素	$Y=-77\ 673.04+4\ 980\ 836.7 X$	0.999	56~5 600
染料木素	$Y=7\ 227.743\ 9+10\ 110\ 996 X$	0.999	20~2 000
山柰酚	$Y=-31\ 218.48+4\ 506\ 392.2 X$	0.999	26~2 600
异鼠李素	$Y=-53\ 487.48+4\ 505\ 327.5 X$	0.999	46~2 300

相对保留时间和共有峰峰面积 RSD 均小于 1.5%。

2.6.3 重复性试验 取同一批（1 号样品）槐米样品 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各组分的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 2%。

2.6.4 稳定性试验 按“2.3”项下方法制备的同一供试品（1 号样品）溶液，室温放置，按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定，记录芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各组分的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 1%，表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取已测定的样品 6 份，精密称定并加入一定量芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素对照品，按“2.3”项下方法制备样品，计算加样回收率，结果显示上述 5 种药效成分的平均加样回收率均高于 95%，其 RSD 均小于 2%。

2.6.6 样品测定 收集不同产地的样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，利用已建立的标准曲线计算样品中芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素的含量，结果见表 3、4。按照《中国药典》2015 年版一部^[1]及已报道的抗氧化能力测定方法^[6-8]（按“2.3”项下方法制备供试品溶液）分别测定不同产地样品的 5 种黄酮及总黄酮含量和 DPPH·、羟自由基清除能力、超氧阴离子清除能力、脂质过氧化抑制能力等抗氧化指标，结果见表 3~6。

本研究材料采集于 2014 年和 2015 年不同生产年度的多个产区，考察不同年度间及不同产区间槐米的品质差异，如表 3~6 所示，不同生产年度间的槐米品质有差异，不同生产区间的样品品质也有差异。

2.7 系统聚类分析

采用 JMP 11 统计软件对上述 2014 年收集的 35 个不同产地样品和 2015 年收集的 19 个不同产地样品

表 3 2014 年不同产区样品的组分含量

Table 3 Ingredients content of different geographical sources

编号	质量分数/%					
	总黄酮	芦丁	槲皮素	染料木素	山柰酚	异鼠李素
1	24.40±0.14	20.33±1.06	3.54±0.17	0.001±0.000	0.07±0.00	0.20±0.01
2	33.36±1.46	29.46±0.69	4.70±0.15	0.002±0.000	0.14±0.00	0.26±0.01
3	24.01±0.12	15.95±0.22	7.92±0.09	0.004±0.000	0.28±0.01	0.38±0.00
4	21.52±1.13	13.82±1.04	6.46±0.67	0.004±0.000	0.07±0.00	0.40±0.05
5	13.78±1.71	9.46±0.76	1.98±0.24	0.001±0.000	0.05±0.00	0.52±0.05
6	37.65±0.53	33.98±0.43	2.93±0.02	0.007±0.000	0.04±0.00	0.15±0.01
7	22.93±0.91	15.81±0.08	4.53±0.34	0.002±0.000	0.05±0.00	0.24±0.02
8	19.95±0.60	14.93±0.50	3.28±0.18	0.003±0.000	0.03±0.00	0.19±0.00
9	20.85±0.06	12.66±0.13	5.77±0.26	0.004±0.000	0.07±0.00	0.26±0.01
10	16.95±0.88	11.59±1.11	3.31±0.00	0.001±0.000	0.06±0.00	0.17±0.00
11	30.19±1.46	25.03±1.18	4.51±0.58	0.004±0.000	0.05±0.00	0.27±0.02
12	29.07±1.03	23.02±1.06	6.78±0.17	0.007±0.000	0.05±0.00	0.37±0.01
13	22.41±1.77	14.78±1.28	5.67±0.46	0.002±0.000	0.05±0.00	0.35±0.01
14	20.02±0.78	9.29±0.79	8.39±0.54	0.005±0.000	0.08±0.01	0.50±0.02
15	43.92±0.60	43.84±0.95	1.62±0.04	0.005±0.000	0.04±0.00	0.12±0.01
16	25.35±1.60	20.62±1.08	2.91±0.27	0.001±0.000	0.15±0.04	0.50±0.02
17	13.14±1.17	8.82±0.43	2.45±0.09	0.002±0.000	0.02±0.00	0.13±0.00
18	32.13±1.07	31.55±0.45	0.12±0.00	0.001±0.000	0.01±0.00	0.02±0.00
19	34.05±2.47	33.39±3.20	0.55±0.06	0.002±0.000	0.01±0.00	0.05±0.00
20	35.73±0.21	33.70±1.41	1.26±0.08	0.007±0.000	0.02±0.00	0.08±0.00
21	34.72±0.08	32.25±0.22	1.51±0.00	0.001±0.000	0.02±0.00	0.11±0.00
22	24.27±0.12	23.52±0.39	0.64±0.01	0.001±0.000	0.04±0.00	0.17±0.00
23	33.42±1.91	32.40±1.23	1.75±0.02	0.005±0.000	0.05±0.00	0.11±0.00
24	30.25±0.76	29.69±1.16	2.07±0.04	0.001±0.000	0.03±0.00	0.28±0.01
25	35.76±0.21	33.67±0.33	2.47±0.02	0.001±0.000	0.08±0.01	0.17±0.00
26	24.68±2.18	21.74±1.23	1.23±0.03	0.001±0.000	0.05±0.00	0.29±0.01
27	29.81±0.60	27.62±0.91	0.08±0.01	0.001±0.000	0.01±0.00	0.01±0.00
28	16.72±0.31	14.62±0.37	0.13±0.01	0.001±0.000	0.01±0.00	0.01±0.00
29	41.68±2.82	39.83±0.35	0.12±0.00	0.001±0.000	0.01±0.00	0.01±0.00
30	37.52±1.50	36.66±0.26	0.39±0.01	0.001±0.000	0.02±0.00	0.02±0.00
31	21.80±0.62	18.17±0.04	0.08±0.00	0.002±0.000	0.01±0.00	0.01±0.00
32	19.05±2.61	16.32±1.27	1.61±0.11	0.001±0.000	0.12±0.01	0.16±0.02
33	23.65±1.21	21.85±1.36	0.45±0.06	0.001±0.000	0.04±0.01	0.05±0.01
34	20.24±0.39	17.59±0.21	0.64±0.00	0.001±0.000	0.07±0.00	0.07±0.00
35	26.77±0.62	23.18±0.77	0.14±0.00	0.001±0.000	0.02±0.00	0.02±0.00

表 4 2015 年不同产区样品的组分含量

Table 4 Ingredients content of different geographical sources

编号	质量分数/%					
	总黄酮	芦丁	槲皮素	染料木素	山柰酚	异鼠李素
36	35.76±2.84	33.52±0.80	1.07±0.02	0.001±0.000	0.02±0.00	0.07±0.01
37	43.46±4.51	40.00±3.17	0.52±0.01	0.001±0.000	0.01±0.00	0.03±0.01
38	41.07±1.63	36.52±0.26	1.67±0.01	0.001±0.000	0.03±0.00	0.08±0.01
39	45.29±3.68	42.45±1.40	0.60±0.02	0.001±0.000	0.01±0.00	0.03±0.00
40	46.14±4.34	44.32±5.39	0.86±0.07	0.001±0.000	0.04±0.00	0.04±0.00
41	39.57±3.62	41.64±4.35	0.82±0.01	0.001±0.000	0.02±0.00	0.04±0.00
42	39.08±1.77	34.95±1.13	0.83±0.01	0.001±0.000	0.02±0.00	0.04±0.01
43	47.05±0.91	44.73±1.83	0.57±0.02	0.001±0.000	0.02±0.00	0.03±0.00
44	43.47±1.93	39.90±2.00	0.42±0.01	0.001±0.000	0.01±0.00	0.02±0.00
45	41.86±2.78	37.08±0.92	1.90±0.08	0.001±0.000	0.03±0.00	0.10±0.00
46	34.44±0.88	32.74±0.23	0.04±0.00	0.001±0.000	0.01±0.00	0.01±0.00
47	43.42±0.95	40.56±4.35	0.62±0.05	0.001±0.000	0.01±0.00	0.03±0.00
48	27.95±0.93	24.24±0.21	0.81±0.01	0.001±0.000	0.02±0.00	0.10±0.00
49	24.53±2.10	22.15±1.92	0.57±0.04	0.001±0.000	0.06±0.00	0.07±0.00
50	29.12±0.06	25.86±0.45	1.15±0.16	0.001±0.000	0.04±0.00	0.06±0.01
51	17.19±1.46	14.86±0.17	0.16±0.01	0.001±0.000	0.02±0.00	0.03±0.01
52	39.04±0.51	36.08±0.72	0.83±0.02	0.001±0.000	0.03±0.00	0.04±0.00
53	39.27±1.50	37.02±1.08	0.75±0.03	0.001±0.000	0.03±0.00	0.04±0.00
54	40.68±0.58	37.75±0.73	0.47±0.02	0.001±0.000	0.02±0.00	0.02±0.00

表5 2014年不同产区样品的抗氧化能力

Table 5 Antioxidant capacity of different geographical sources

编号	DPPH·/%	羟自由基/%	超氧阴离子/%	脂质过氧化/%
1	92.84±0.17	28.15±0.21	20.71±0.66	60.43±11.19
2	93.14±0.19	29.65±1.34	21.93±3.22	64.74±3.05
3	93.60±0.14	41.10±1.98	31.55±2.03	61.87±7.12
4	93.09±0.17	36.10±2.97	28.85±9.30	59.56±2.23
5	89.53±0.49	24.20±0.42	32.77±9.01	57.55±3.05
6	92.62±0.16	28.90±0.99	28.76±3.10	53.23±1.01
7	92.95±0.10	29.10±1.27	24.21±1.31	54.49±1.27
8	92.94±0.49	27.90±0.57	17.12±2.74	53.23±7.12
9	93.51±0.39	31.25±1.20	25.77±4.71	56.11±1.01
10	92.56±0.24	28.75±1.06	16.58±1.61	43.16±13.22
11	93.06±0.01	30.80±1.13	19.15±3.82	52.51±2.03
12	93.32±0.19	32.90±2.97	25.85±3.76	46.76±4.06
13	93.14±0.07	33.30±3.39	28.81±12.59	49.64±8.13
14	93.41±0.01	47.75±1.34	32.35±2.92	51.07±6.10
15	92.90±0.08	27.70±0.14	26.91±2.86	48.20±2.03
16	92.43±0.16	29.10±2.26	34.16±6.08	46.76±0.00
17	90.94±0.13	23.75±0.21	13.67±1.07	54.67±7.12
18	91.75±0.13	23.45±0.21	31.51±1.61	48.20±8.13
19	92.02±0.04	25.35±0.64	32.31±3.58	39.56±2.38
20	92.15±0.26	26.20±0.14	31.34±0.54	45.32±10.17
21	91.75±0.42	26.40±0.28	26.06±2.15	66.18±3.05
22	87.24±6.56	22.65±0.49	20.24±2.51	67.62±5.08
23	92.25±0.16	27.25±1.63	31.76±2.09	59.71±4.06
24	92.23±0.51	27.20±0.28	27.29±2.80	48.20±2.34
25	92.02±0.92	27.55±0.21	25.47±2.03	58.99±1.01
26	85.83±8.17	24.85±1.34	24.29±3.22	38.12±3.62
27	90.76±0.10	12.55±0.49	15.86±3.22	46.76±8.13
28	65.49±2.01	9.15±0.35	26.66±2.03	32.37±6.10
29	92.78±0.05	16.65±0.21	22.61±0.00	30.93±10.17
30	92.48±0.01	15.65±0.07	21.09±0.60	49.64±0.01
31	79.18±0.43	9.95±0.49	20.12±1.85	41.72±1.01
32	79.12±5.38	10.55±1.06	28.26±1.07	45.32±4.06
33	85.14±0.93	11.35±0.78	20.08±2.03	26.61±2.03
34	76.31±0.70	10.05±0.07	16.07±0.89	35.25±2.03
35	86.64±3.99	11.20±0.14	9.95±2.03	42.44±6.10

表6 2015年不同产区样品的抗氧化能力

Table 6 Antioxidant capacity of different geographical sources

编号	DPPH·/%	羟自由基/%	超氧阴离子/%	脂质过氧化/%
36	91.65±0.48	17.15±2.19	30.83±2.21	59.71±4.06
37	91.84±0.40	18.35±3.61	27.08±3.82	61.07±0.10
38	92.24±0.43	19.25±1.48	25.81±1.43	66.18±5.08
39	92.45±0.36	18.45±1.63	24.34±1.01	61.15±6.10
40	92.13±0.02	20.40±1.56	23.11±1.79	64.02±4.06
41	92.40±0.23	18.95±2.19	26.32±4.89	66.18±1.01
42	92.41±0.04	17.95±0.64	27.12±0.42	63.30±3.05
43	92.25±0.16	19.75±0.07	24.76±0.78	48.20±4.06
44	92.12±0.01	19.00±2.12	24.59±1.73	61.65±0.71
45	92.64±0.16	18.60±0.14	25.94±4.59	62.58±8.13
46	90.52±0.40	14.70±0.42	27.75±0.72	52.41±0.15
47	86.55±8.30	13.50±4.53	19.53±3.40	59.71±4.06
48	89.43±2.26	13.90±1.13	24.67±5.07	46.76±4.06
49	65.04±6.56	10.95±0.49	22.02±1.67	59.71±4.06
50	79.34±0.04	13.80±0.85	21.17±0.00	48.20±2.03
51	48.10±0.16	7.90±0.28	20.54±0.30	53.23±3.05
52	88.79±0.83	16.40±0.42	23.03±0.24	59.67±4.12
53	89.03±0.40	16.40±0.99	23.91±0.89	55.39±2.03
54	89.23±1.71	16.50±0.42	23.24±0.78	52.51±8.13

的组分含量及抗氧化能力数据进行系统聚类分析, 平方 Euclidean 距离为度量标准, Ward 联接法绘制系统聚类树状图。如图 3 和图 4 可知, 对不同产区的槐米品质指标进行系统聚类分析, 但是没有显现出不同产区的特殊性, 也就是说没有将每个产区或气候相近产区的样品分为有规律的组别, 没有明确指出哪个产区的槐米品质优, 哪个产区的劣, 而是任意一个产区的槐米均有品质优劣之分。

2.8 主成分分析

采用 JMP 11 统计软件对上述收集于不同产地槐米样品的组分含量及抗氧化能力数据进行主成分分析, 计算主成分得分, 绘制样品在二维空间的分布情况。由图 5 和图 6 可知, 不同产区的样品在主成分得分图上呈无规律的分布, 没有显示出不同产区 (或地理位置相近产区、气候条件差异大的产区) 间样品规律性的分布, 与系统聚类分析结果一致。充分说明了同一产区的槐米品质有差异, 不同产区间槐米品质亦有差异, 其品质一致性较差, 也可以说明槐米的品质受气候条件影响不大, 受生产过程中关键生产技术影响较大。

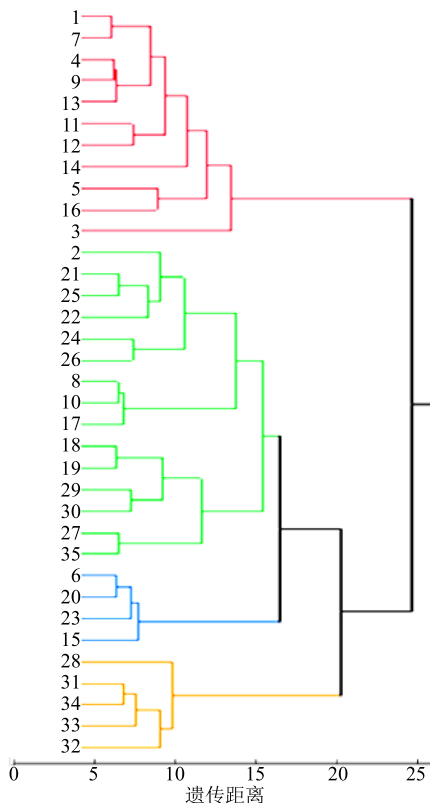


图 3 2014 年不同产区槐米系统聚类分析

Fig. 3 Dendrogram of hierarchical cluster analysis in samples from different geographical sources

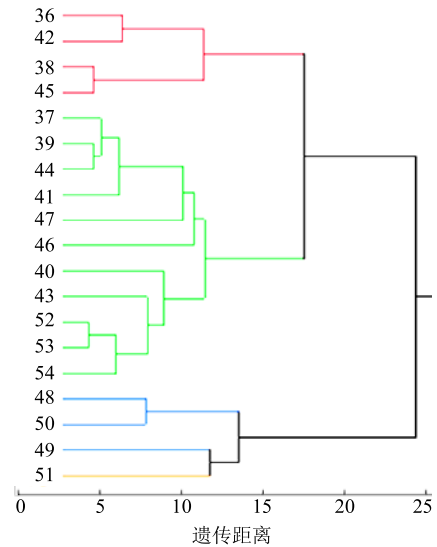


图 4 2015 年不同产区槐米系统聚类分析

Fig. 4 Dendrogram of hierarchical cluster analysis in samples from different geographical sources

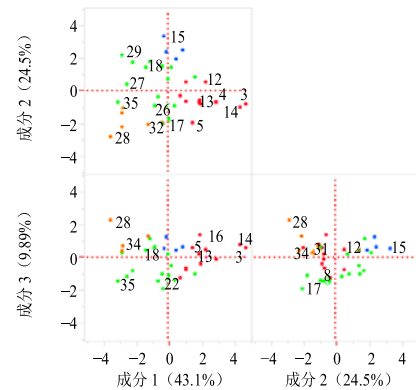


图 5 2014 年不同产区槐米主成分分析

Fig. 5 Principal component analysis in samples from different geographical sources

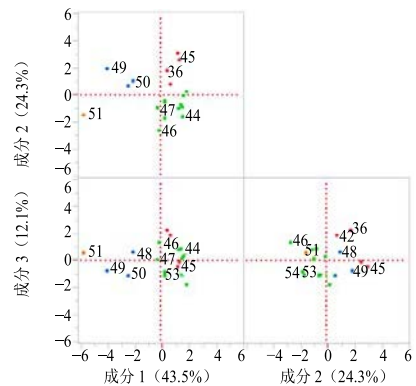


图 6 2015 年不同产区槐米主成分分析

Fig. 6 Principal component analysis in samples from different geographical sources

3 讨论

3.1 槐米品质评价方法

自古“中医中药不分家”，药为医所用，医因药而存。从一定程度上讲，中药品质是维系中医临床疗效的关键因素，由于中药资源枯竭引起野生变家种，以及不规范种植与加工、人为掺假等问题，严重影响了中医临床疗效^[9]。所以中药材的品质评价和品质控制理论与技术研究尤为重要，一直是中医药研究的难点和热点，也是制约中药现代化发展的关键因素。

《中国药典》2015年版一部规定槐米的芦丁含量不得低于15%，总黄酮的含量不得低于20%，浸出物含量不得低于43%，再加上水分、总灰分和酸不溶性灰分等指标来评价槐米药材的质量，是衡量药材合格与否的标准^[1]。此法中规定水分含量不得超过11%，笔者根据自身对槐米的研究理解及认识，认为水分含量是良好贮存的重要影响因素，因为水分过高槐米很快会发生霉变，不利于其长期贮存及用药安全；总灰分（不得超过9%）和酸不溶性灰分（不得超过3%）是指槐米药材中含有枝梗、叶、泥土等杂质多少的量化指标，是对药材洁净程度的要求；芦丁、总黄酮和浸出物的含量是槐米药材品质的度量标准，此品质指标可用于评价市场内药材的合格与否，是否达到用药要求，但是不太适合用于研究气候、土壤、营养等因素对其品质的影响，笔者认为以芦丁、总黄酮和浸出物为参照进行科学研究时显得过于笼统，尤其是新仪器、新方法快速发展的现阶段，应该将品质指标更加深入、细化（标志物）及丰富^[9-10]。

有研究者建立HPLC法测定槐米或槐花中芦丁、槲皮素、山柰酚等单一药效成分的含量并用于评价其品质^[3-4,11-26]，但是由于测定方法的流动相组成及比例、检测波长、流动速度等条件不一致，导致不同方法之间测定的各药效成分含量差异较大。在测定单一药效成分的基础上，研究者们建立测定几种药效成分含量的方法来评价槐米或槐花的品质，如建立HPLC同时测定槐米或槐花中芦丁和槲皮素含量的方法^[27-31]，建立HPLC同时测定槐米中芦丁、槲皮素和染料木素含量的方法^[32]，建立HPLC-DAD-MS同时测定槐米中芦丁、槲皮素和水仙碱含量的方法^[33]。上述研究者建立了HPLC同时测定槐米或槐花中多种药效成分的含量来评价其品质的方法，但是这些方法的测定条件及测定的药

效成分种类和数量很不统一，有的测定2种成分（芦丁和槲皮素），有的测定3种成分（芦丁、槲皮素和染料木素，芦丁、槲皮素和水仙碱），有的测定4种成分（槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素，染料木素、芦丁、槲皮素和染料木素）。通过本实验研究发现，槐米的主要组分为黄酮类物质，芦丁含量最高，其次是槲皮素，且芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素5种黄酮类组分的峰面积之和占指纹图谱总峰面积的80%以上，抗氧化是黄酮类物质的主要作用之一，故笔者认为以总黄酮、芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素的含量再加上抗氧化能力评价槐米品质更加合理。

笔者之前建立过UPLC-MS同时测定芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素5种组分的方法^[5]，考虑到实验室里UPLC的普及率没有HPLC高，或者多数的实验室UPLC没有HPLC数量多，笔者认为再建立HPLC指纹图谱结合化学计量学同时测定这5种组分的方法更有利于槐米的品质评价。因此，本研究对色谱溶剂（乙腈和甲醇）与不同浓度的乙酸和水组成的流动体系（甲醇-水、甲醇-乙酸、乙腈-水、乙腈-乙酸和甲醇-乙腈-乙酸等）、柱温（25、30、35、40、45℃）和体积流量（0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mL/min）等单变量（因素）试验，优化出了同时测定芦丁、槲皮素、染料木素、山柰酚和异鼠李素含量的HPLC方法，即选用流动相为0~5 min，乙腈-甲醇-0.5%冰醋酸（0:25:75），5~50 min，乙腈-甲醇-0.5%冰醋酸（10→25:15→0:75），50~70 min，乙腈-甲醇-0.5%冰醋酸（25:0:75），70~80 min，乙腈-甲醇-0.5%冰醋酸（0:25:75）；体积流量0.8 mL/min；检测波长：芦丁256 nm，槲皮素372 nm，染料木素260 nm，山柰酚366 nm，异鼠李素371 nm；柱温25℃，进样体积10 μL。本实验通过对测定方法的考察，建立了高重现性、同时测定槐米药材中5种主要药效成分含量的测定方法且线性、精密度、重复性和回收率均良好，大大地提高了工作效率，同时也降低了测定成本，再加上总黄酮含量及抗氧化能力等指标，此方法可以全面应用于槐米药材的品质评价。

3.2 不同产地槐米品质

不同的生产区或生产年度间会因为气候不同而造成药材的品质差异，但是本研究所采集的多个产区的槐米没有表现出地域特性，而不同生产年度间的样品显现出差异。同一生产年度的槐米有品质

优的,也有品质劣的,不同产区亦如此,并与文献记载的结果一致^[3]。药用槐米基本上是靠人工栽培的,品种选择、繁殖、营养、采收、初加工等环节均受人为因素的影响,由于不同的种植者之间的技术标准不一致(基本上全靠经验进行生产),给槐米品质的稳定性和一致性带来了不利因素;但是也受气候、土壤等因素影响,同一产区的不同生产年度间其品质有差异,或同一种植户的不同生产年度间其品质也有差异,说明气候对其品质有影响;同一产区的不同地点间的药材品质有差异,说明土壤环境或生产关键技术环节也是影响其品质的因素。笔者通过多年的研究认识及理解认为造成槐米品质差异的主要影响因素是关键生产技术环节,但是也受气候、土壤及槐米自身生长状况的影响。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 谢 锋.金槐槐米品质及规范化种植关键技术研究[D].成都:成都中医药大学,2014.
- [3] 李振志,朱 华,谢 锋,等.不同产地槐米中芦丁的含量测定[J].世界中医药,2013,8(8):952-954.
- [4] 李培凡,张韻慧,肖 莉,等.RP-HPLC法测定不同产地槐米中芦丁[J].中草药,2006,37(9):1419-1420.
- [5] Liu J L, Li L Y, He G H. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for five major bioactive compounds from *Flos Sophorae immaturus* (cultivars of *Sophora japonica* L.) using response surface methodology[J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 296-309.
- [6] 代 沙.紫苏叶抗氧化物质提取、含量测定及抗氧化活性研究[D].雅安:四川农业大学,2013.
- [7] Liu J, Zheng S, Fan Q, et al. Optimisation of high-pressure ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacity of polysaccharides from the rhizome of *Ligusticum chuansiong* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 76: 80-85.
- [8] Zhang G W, He L, Hu M M. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro [J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2011, 12(1): 18-25.
- [9] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等.中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J].中草药,2016,47(9):1443-1457.
- [10] 刘昌孝.从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展[J].中草药,2016,47(18):3149-3154.
- [11] 姚 倩,郭晓强,宋 芹,等.槐米中芦丁提取工艺的比较研究[J].成都大学学报:自然科学版,2013,32(4):332-334.
- [12] 付起凤,王德娟,孟凡佳.正交法优化槐米中芦丁的超声提取工艺[J].中医药信息,2012,29(6):49-52.
- [13] 顾生玖,杨 娜,朱开梅,等.桂北金槐槐米中芦丁微波提取的工艺研究[J].中国现代应用药学,2011,28(2):121-124.
- [14] 张良蕾,姚 倩,陈开晓,等.星点设计效应面法优化槐花米中槲皮素提取工艺[J].时珍国医国药,2010,21(8):2068-2069.
- [15] 李婉婉,原思通.中药槐花饮片 RP-HPLC 特征图谱研究[J].药物分析杂志,2010,30(11):2137-2141.
- [16] 李 敏,马 晓.槐米中芦丁的微波提取研究[J].今日科苑,2009,6:44-46.
- [17] 郭利民,钟世华,王招弟. HPLC 法测定槐米中槲皮素成分的微波辅助提取[J].中外医疗,2008(2):21.
- [18] 陈燕芬,陈丽娟,杨 柳.微波技术提取槐米中芦丁的研究[J].中药材,2007,30(7):866-867.
- [19] 黄 千,刘 辉,李遇伯,等. HPLC 法测定槐花中槲皮素的含量[J].天津药学,2007,19(2):10-11.
- [20] 赵文彬,刘金荣,樊莲莲,等.从槐米中提取槲皮素方法的研究[J].石河子大学学报:自然科学版,2006,24(3):302-304.
- [21] 董庆洁,邵仕香,葛 卿,等.微波辅助萃取槐米中芦丁工艺条件的探讨[J].中草药,2006,37(10):1510-1511.
- [22] 蒙松年,陈代武.微波辅助提取槐米中的槲皮素[J].华西药学杂志,2005,20(6):561-562.
- [23] 徐雄良,张志荣,柯尊洪,等. RP-HPLC 法测定槐米中槲皮素的含量[J].中草药,2003,34(6):88-90.
- [24] 邓富良,陈本美.高效液相色谱法测定槐米中的芦丁含量[J].湖南医科大学学报,2000,25(6):597-598.
- [25] 杨美华,陈小荣,郑俊华.高效液相色谱法测定槐花药材中芦丁的含量[J].中国药事,2000(1):34-35.
- [26] Liao J, Qu B, Liu D, et al. New method to enhance the extraction yield of rutin from *Sophora japonica* using a novel ultrasonic extraction system by determining optimum ultrasonic frequency[J]. *Ultrason Sonochem*, 2015, 27: 110-116.
- [27] 居尔艾特提·拜克,杨如箴,马佳喻,等.槐米中黄酮类成分的超声提取及 RP-HPLC 色谱分析[J].伊犁师范学院学报:自然科学版,2013,7(4):61-63.
- [28] 杜玉然,贺福元,周逸群,等. HPLC 测定槐花药材不同部位芦丁和槲皮素含量[J].中国中医药信息杂志,2012,19(12):43-45.
- [29] 程秀民,尘学兰,高彦慧,等. RP-HPLC 测定槐米中芦丁和槲皮素含量[J].中成药,2004,26(8):80-82.
- [30] 李敏晶,游景艳,刘忠英,等.微波辅助流动萃取槐花中的黄酮类成分[J].高等学校化学学报,2004,25(5):850-852.
- [31] 李 鹏,成玉怀,洪成林,等.新疆产两种槐花中芦丁和槲皮素的含量测定[J].农垦医学,2001,23(1):1-2.
- [32] 严 军,张志远,刘绍璞.反相高效液相色谱法分离测定5种黄酮类化合物[J].西南大学学报:自然科学版,2007,29(3):41-44.
- [33] Xie Z, Lam S, Wu J, et al. Chemical fingerprint and simultaneous determination of flavonoids in *Flos Sophorae Immaturus* by HPLC-DAD and HPLC-DAD-ESI-MS/MS combined with chemometrics analysis[J]. *Anal Method*, 2014, 6(12): 4328-4335.