

山银花、金银花中绿原酸和总黄酮含量及抗氧化活性测定

肖作为^{1,3}, 谢梦洲^{3*}, 甘 龙¹, 方茗妍¹, 周新源¹, 周一苗¹, 贺 炜⁴, 陈 林², 黄建华^{2,3*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013
3. 湖南省药食同源功能性食品工程技术中心, 湖南 长沙 410208
4. 绿之韵生物工程集团有限公司, 湖南 长沙 410329

摘要: 目的 对 3 个不同产地山银花和金银花中绿原酸、总黄酮含量及抗氧化活性进行分析, 并比较之间的差异。方法 对绿原酸提取条件进行优化, 最佳提取条件为 65 °C 下 60%乙醇溶液按料液比 1 : 20 超声提取 30 min; 总黄酮最佳提取条件为 65 °C 下用 60%甲醇溶液按料液比 1 : 10 超声提取 30 min。分别采用高效液相色谱法和紫外分光光度法对样品的绿原酸和总黄酮进行含量测定, 并用 DPPH 自由基清除率来检测山银花、金银花的抗氧化活性。结果 建立了良好的绿原酸和总黄酮含量分析方法, 绿原酸在 0.119~1.190 mg/mL 内线性关系良好, r^2 为 0.999 2 ($n=6$); 总黄酮在 8.48~50.88 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好, r^2 为 0.999 5 ($n=6$)。湖南产地山银花绿原酸量、总黄酮量及自由基清除率分别为 3.99%、13.43%、62.41%。重庆产地山银花绿原酸量、总黄酮量及自由基清除率分别为 3.29%、10.08%、51.48%。广西产地金银花绿原酸量、总黄酮量、自由基清除率分别为 2.55%、7.10%、39.51%。结论 提出了结合化学成分分析和抗氧化性活性来比较不同产地山银花和金银花之间区别的分析方法, 从“谱-效”结合思路, 为山银花和金银花质量控制及鉴别提供一种新的模式。

关键词: 山银花; 金银花; 抗氧化活性; 绿原酸; 总黄酮

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0210-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.031

Determination of chlorogenic acid, total flavones, and anti-oxidant activity of *Flos Lonicerae Japonicae* and *Flos Lonicerae*

XIAO Zuo-wei^{1,4}, XIE Meng-zhou³, GAN Long¹, FANG Ming-yan¹, ZHOU Xin-yuan¹, ZHOU Yi-miao¹, HE Wei⁴, CHEN Lin², HUANG Jian-hua^{2,3}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Institution of Chinese Medicine, Changsha 410013, China
3. Hunan Engineering Research Center of Drug and Food Homology Functional Food, Changsha 410208, China
4. Resgreen Bioengineering Group Co., Ltd., Changsha 410329, China

Abstract: Objective To determine the content of chlorogenic acid, total flavones, and anti-oxidant activity in *Flos Lonicerae japonicae* and *Flos Lonicerae* obtained from three different origins and compare their differences. **Methods** The optimized extraction conditions of chlorogenic acid were ultrasonic extraction 30 min in 65 °C with ethanol: water (60 : 40) and solid-liquid ratio (1 : 20). The optimized extraction conditions of total flavonoids were ultrasonic extraction 30 min at 65 °C with 60% methanol solution, solid-liquid ratio (1 : 10). HPLC and UV spectrophotometry were used to determine the content of chlorogenic acid and total flavonoids in the samples, and then estimation of anti-oxidative activity of *Flos Lonicerae japonicae* and *Flos Lonicerae* by DPPH radical scavenging capacity method. **Results** A method for the analysis of chlorogenic acid and total flavonoids was established, which have a good linear relationship of chlorogenic acid in 0.119—1.190 mg/mL and R^2 was 0.999 2 ($n=6$); A good linear relationship between 0.008 and 0.050 mg/mL and r^2 was 0.999 5 ($n=6$) for analysis of the total flavonoids. The average

收稿日期: 2018-05-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603400); 长沙市杰出创新青年培养计划 (kq1802017); 湖南省中医药管理局项目 (201702); 湖南省“中医学”重点学科资助项目 (湘教通 [2011] 76 号); 湖南大学生创新课题 (0110-0901002016, 1021-0001017096); 国家重点学科中医诊断学开放基金资助项目

作者简介: 肖作为, 男, 副教授, 研究方向为中药保健食品研究与开发。Tel: (0731)88458331 15211038596 E-mail: 574512660@qq.com

***通信作者** 黄建华, 男, 研究方向为天然药物化学。Tel: 18692265317

谢梦洲, 女, 教授, 研究方向为功能性食品开发。E-mail: xiemz64@163.com

content of chlorogenic acid, total flavonoids, and free radical scavenging rate of *Flos Lonicerae* from Hunan Province was 3.99%, 13.43%, and 62.41%, respectively. The average content of chlorogenic acid, total flavonoids and free radical scavenging rate of *Flos Lonicerae* from Chongqing were 3.29%, 10.08%, and 51.48% respectively. The average content of chlorogenic acid, total flavonoids, and free radical scavenging rate of *Flos Lonicerae japonicae* from Guangxi Province were 2.55%, 7.10%, and 39.51%, respectively.

Conclusion This study proposed an analytical method combining the chemical composition analysis and anti-oxidant activity to compare the differences between the different producing areas of *Flos Lonicerae japonicae* and *Flos Lonicerae*. Combining the “spectrum-effect”, it provides a new model for the quality control and identification of two plants.

Key words: *Flos Lonicerae Japonicae*; *Flos Lonicerae*; anti-oxidant activity; chlorogenic acid; total flavonoids

金银花、山银花是常用的大宗中药材，具有清热解毒，疏散风热之功，在 20%~33% 的中药处方、200 多种中成药、500 多种食品及保健品中使用。金银花植物种类繁多，全世界忍冬科植物约 200 种，我国有 98 种，广泛分布于全国各地。而以西南、华南种类最多，其中可供药用的达 47 种^[1]。随着《中国药典》2005 年版将原收录的金银花分为金银花 *Flos Lonicerae Japonicae* 和山银花 *Flos Lonicerae* 2 种药材，金银花只收录了忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 1 个种，而把灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglaucula* Miq.、华南忍冬 *Lonicera confusa* DC. 作为山银花的基源。《中国药典》2010 年版在 2005 年版基础上，在山银花项下增加了黄褐毛忍冬 *L. fulvotomentosa* Hsuet S. C. Cheng。而《中国药典》2015 年版依然将山银花和金银花分列 2 类^[2]。

山银花由于适应性强，对环境要求不高，且具有抗逆性强、花蕾大，产量高、气清香、种植效益好等优良性状，因而得到大规模的种植，使得山银花占有 70% 以上的市场份额。在湖南省主要种植区有隆回、溆浦、新化等地区。但受到药典规定的影响，使得山银花的使用面临着巨大的挑战。从 2005 年来，《中国药典》将山银花和金银花分列 2 项开始，在这 10 年中，药学专家对山银花与金银花的物质基础、功能作用、作用机制、遗传基因等一系列问题进行了细致、广泛的研究^[3]。金银花与山银花的化学成分非常复杂，已经鉴别的有 60 多种，其中具有药理活性的主要成分类别为挥发油类（芳香醇、棕榈酸、双花醇等）、黄酮类（木犀草素、忍冬苷、金丝桃苷、槲皮素等）、有机酸类（绿原酸、异绿原酸、新绿原酸、咖啡酸等）、三萜皂苷类（川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷甲、灰毡毛忍冬皂苷乙、木通皂苷 D 等）^[4]。金银花与山银花活性成分不同，

金银花中含有木犀草苷（黄酮类）成分，明显高于山银花；山银花绿原酸含量高于金银花；金银花不含皂苷类成分，山银花即灰毡毛忍冬含大量皂苷类成分^[5]。在药理作用研究方面，现代药理学证明金银花、山银花具有抑菌及杀菌作用、抗病毒作用、抗过敏作用、解热作用和肝脏保护作用^[6-7]。随着山银花研究的逐步深入，其在药用领域研究也有重大进展。近期的研究表明，山银花中所含的黄酮类、常青藤皂苷类成分具有抗肿瘤方面的优势，有望开发成高效、价廉、低毒的新型抗肿瘤药物^[8]。

中药是传统医药预防、治疗疾病的物质基础，是我国人民几千年来的智慧结晶。中药材质量的提升是促进我国传统医药发展的基石。中药材质量图谱分析方法是中药质量控制最常用的方法之一^[9]。传统中药用于抵御各种疾病虽已有千年历史，但是对它们的作用机制还知之甚少。究其原因，主要是因为中药本身都是复杂的混合物体系，不能简单采用一个或几个指标化合物来表征其整体生物活性^[9]。因此本研究在对山银花、金银花进行鉴别及质量控制时，提出利用化学成分和生物活性为检测指标的方法，对山银花和金银花中绿原酸、总黄酮含量和抗氧化活性进行检测，将 2 类中药材进行分析和比较，为中药质量控制及鉴别提供一种新的模式。

1 材料

1.1 试药

对照品绿原酸（批号 110753-201415）、芦丁（批号 100080-201409）、维生素 C（批号 100425-200702）均购于中国食品药品检定研究院，质量分数大于 98%，供含量测定用；药材均经湖南中医药大学龚力民副教授鉴定，山银花来源于忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglaucula* Miq.，金银花来源于忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.，见表 1。

表 1 药材信息表

Table 1 Sample information

序号	植物来源	产地
1~50	灰毡毛忍冬	湖南隆回
51~100	红腺忍冬	重庆秀山
101~150	忍冬	广西忻城

1.2 试剂

DPPH 试剂[梯希爱(上海)化成工业公司]; 甲酸(AR, 天津光复精细化工研究所); 亚硝酸钠(AR, 国药集团化学试剂公司); 硝酸铝(AR, 国药集团化学试剂公司); 氢氧化钠(AR, 国药集团化学试剂公司); 乙醇(AR, 国药集团化学试剂公司); 甲醇(HPLC 级, 美国 Sigma 公司); 乙腈(HPLC 级, 美国 Sigma 公司); 怡宝纯净水。

1.3 仪器

Ultra-3400 型紫外-可见分光光度计(北京普源精电科技有限公司); KQ2200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XS205 型 1/10 万天平(瑞士, 梅特勒-托利多仪器有限公司); H1650 型离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司); DK-98-1 型电子恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪, Agilent OpenLAB 色谱工作站(德国, 安捷伦公司)。

2 方法与结果

2.1 绿原酸测定

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒定质量的绿原酸对照品 11.9 mg 于 10 mL 量瓶中, 加 60% 甲醇适量, 65 °C 水浴下超声 30 min 使溶解, 再加 60% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得 1.19 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取药材粉末(过 3 号筛) 2.5 g 置于 25 mL 量瓶中, 用 60% 甲醇定容至刻度, 密塞, 摇匀, 65 °C 水浴下超声提取 30 min, 将所得提取液以 10 000 r/min 离心 10 min, 精密量取上清液 1.00 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 60% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱: Agilent TC-C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 温度 20 °C; 检测波长 317 nm; 进样量 10 μL; 体积流量 1.0 mL/min; 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸(B); 梯度洗脱条件为 0~10 min, 11.5%~15% A; 10~12 min, 15%~29% A; 12~15 min, 29%~31% A; 15~20 min, 31%~45% A, 20~30 min, 45%~100% A。色谱图见图 1。

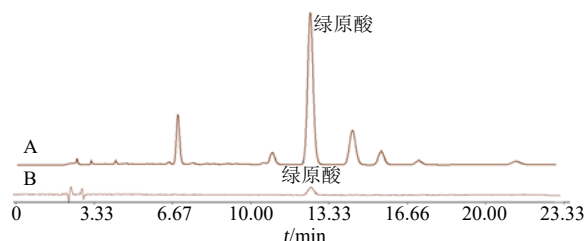


图 1 样品 (A) 和对照品 (B) 的色谱图

Fig. 1 HPLC of samples (A) and control (B)

2.1.4 线性关系考察 精密吸取绿原酸对照品溶液, 制备质量浓度分别为 0、0.119 0、0.285 6、0.624 75、0.892 5、1.190 0 mg/mL 的系列对照品溶液。按“2.1.3”项下色谱条件进行绿原酸含量测定, 以绿原酸质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程为 $Y=9621.1X-124.41$ 。结果表明, 绿原酸在 0.119~1.190 mg/mL 线性关系良好, $r^2=0.9992$ 。

2.1.5 精密度试验 取 9 号样品, 过 3 号筛, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, “2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算绿原酸峰面积的 RSD 为 0.30%, 结果表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取 9 号样品, 过 3 号筛, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备 0、2、4、8、12、24 h 后, 按“2.1.3”项下色谱条件进样分析。绿原酸峰面积 RSD 为 3.33%, 结果表明 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取 9 号样品, 过 3 号筛, 按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样分析。绿原酸峰面积 RSD 为 3.52%, 结果表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取 9 号样品, 过 3 号筛(已测得其绿原酸质量分数为 4.92%)按“2.1.2”项下供试品溶液配制方法制备 4 份平行溶液, 分别加入相当于样品中绿原酸质量分数 0、80%、100%、120% 的绿原酸对照品, 按“2.1.3”项下色谱条件进样分析。以绿原酸峰面积计算平均加样回收率为 102.52%, RSD 为 3.21%, 表明该方法的准确度良好。

2.1.9 山银花、金银花绿原酸含量测定 所有样品按“2.1.2”项下供试品溶液配制方法制备溶液, 分别按“2.1.3”项下色谱条件进样分析。结果表明, 湖南隆回产地山银花中绿原酸平均质量分数为 3.99%, 重庆秀山产地山银花中绿原酸平均质量分

数为3.29%，广西忻城产地金银花中绿原酸平均质量分数为2.55%。具体结果见表2。

2.2 总黄酮的测定

2.2.1 对照品溶液制备 精确称量芦丁对照品5.0 mg，置于25 mL量瓶中，加入适量无水乙醇，超声处理至完全溶解，加无水乙醇至刻度，得到0.2 mg/mL芦丁对照品溶液。精密吸取芦丁对照品溶液3.00 mL置25 mL量瓶中，加蒸馏水至7.00 mL，加5%亚硝酸钠溶液1 mL，使混匀，放置6 min，加10%硝酸铝溶液1 mL，摇匀，放置6 min，加4%氢氧化钠10 mL，再加蒸馏水至刻度，摇匀，放置15 min，即得。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取样品0.5 g（过3号筛）于50 mL锥形瓶中，加入10 mL 60%乙醇，超声30 min，取2.0 mL上清液于离心管中，10 000 r/min离心10 min。精密移取0.8 mL上清液于25 mL量瓶中，定容至刻度，即得样品提取液。精密移取1.5 mL样品提取液于25 mL量瓶中，加水4.5 mL，加5%亚硝酸钠溶液1 mL，摇匀，放置6 min，加10%硝酸铝溶液1 mL，摇匀，放置6 min，加4%氢氧化钠溶液，再加水至刻度，摇匀，放置15 min，即得。

2.2.3 线性关系考察 精密量取芦丁对照品溶液1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 mL，分别置于25 mL量瓶中，各加纯净水至6 mL，加5%亚硝酸钠1 mL，摇匀，放置6 min，加10%硝酸铝1 mL，摇匀，放置6 min，加入4%氢氧化钠10 mL，加水至刻度，摇匀，放置15 min，以相应试剂为空白对照，紫外可见分光光度法在511 nm波长测定。以吸光度（A）为纵坐标，对照品质量浓度为横坐标绘制标准曲线，计算回归方程为 $Y=11.668 X-0.0018$ 。结果表明，芦丁在8.48~50.88 μg/mL内线性关系良好， $r^2=0.9995$ 。

2.2.4 精密度试验 取9号样品，过3号筛，按“2.2.2”项下制备方法供试品溶液，连续测定6次，计算总黄酮含量的RSD为0.17%，结果表明，该仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取9号样品，过3号筛，平行6份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，测定A值，计算总黄酮含量的RSD为2.60%，结果表明，该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取9号样品，过3号筛，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别避光放置

20、40、60、80、120 min后测定A值，计算总黄酮含量的RSD为2.71%，结果表明该方法稳定性良好。

2.2.7 总黄酮含量测定 采用比色法于511 nm波长下测定供试品溶液A值，按标准曲线法计算样品中总黄酮含量。将150个样品分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.3”项下样品测定方法测定A值及计算总黄酮含量，结果表明，湖南隆回产地山银花中总黄酮平均质量分数为13.43%，重庆秀山产地山银花中总黄酮平均质量分数为10.08%，广西忻城产地金银花中总黄酮平均质量分数为7.10%。具体结果见表2。

2.3 抗氧化活性测定

2.3.1 DPPH乙醇溶液的制备 精确称取0.002 0 g DPPH，置于50 mL棕色量瓶中，加无水乙醇至刻度，摇匀，避光放置，即得0.1 mmol/mL DPPH溶液。

2.3.2 供试品溶液制备 精密称取0.5 g样品（过3号筛）于具塞锥形瓶中，加入10 mL 60%乙醇，65℃超声30 min，10 000 r/min离心10 min，取上清液0.48 mL于50 mL量瓶中，用60%乙醇溶液定容，即得。

2.3.3 线性关系考察 精密移取1 mL不同浓度维生素C对照品溶液与4 mL DPPH溶液分别置于试管中，摇匀，避光放置30 min，于517 nm波长处测定 A_i 。精密移取1 mL不同质量浓度维生素C对照品溶液与4 mL无水乙醇分别置于试管中，摇匀，避光放置30 min，于517 nm波长处测定 A_j 。精密移取1 mL蒸馏水与4 mL DPPH溶液分别置于试管中，摇匀，避光放置30 min，于517 nm波长处测定 A_0 。清除率 $=1-(A_i-A_j)/A_0$ 。以清除率为纵坐标（Y），维生素C溶液浓度为横坐标（X），绘制标准曲线。计算回归方程为 $Y=192.2 X+0.1272$ ，结果表明，在0.5~4.0 μg/mL（自由基清除率为15.82%~88.99%）内线性关系良好， $r^2=0.9996$ 。

2.3.4 样品DPPH清除率测定 精密移取1 mL供试品溶液与4 mL DPPH溶液于试管中，摇匀，避光处理30 min，于517 nm波长处测定 A_1 。精密移取1 mL供试品溶液与4 mL 60%乙醇于试管中，摇匀，避光处理30 min，于517 nm波长处测定 A_2 。精密移取1 mL 60%乙醇与4 mL DPPH溶液于试管中，摇匀，避光处理30 min，于517 nm波长处测定 A_0 。计算清除率 $[1-(A_1-A_2)/A_0]$ 。将150个样品按

“2.3.2”项下方法制备样品溶液,按“2.3.3”项下方法测定,得到其抗氧化活性,以自由基清除率表示。结果表明,湖南隆回产地山银花自由基清除率为62.41%,重庆秀山产地山银花自由基清除率为51.48%,广西忻城产地金银花自由基清除率为39.51%。从含量测定结果可以看到,湖南隆回的山银花中绿原酸质量分数分布于3.07%~7.09%,平均是3.99%。重庆秀山的山银花中绿原酸质量分数分布于2.14%~4.78%,平均3.29%。广西忻城金银花中绿原酸质量分数分布于1.28%~3.23%,平均2.55%。湖南隆回的山银花中总黄酮量分布于

5.54%~21.94%,平均质量分数是13.43%。重庆秀山的山银花中总黄酮质量分数分布于6.14%~19.21%,平均10.08%。广西忻城金银花中总黄酮质量分数分布于4.54%~11.75%,平均7.10%。通过对山银花、金银花的抗氧化活性测定,结果显示,湖南隆回的山银花自由基清除率分布于21.87%~86.74%,平均清除率是62.41%。重庆秀山的山银花自由基清除率分布于31.41%~90.64%,平均清除率是51.48%。广西忻城金银花自由基清除率为21.22%~77.68%,平均清除率是39.51%。具体结果见表2。

表2 绿原酸、总黄酮含量及自由基清除率测定结果

Table 2 Content of chlorogenic acid, total flavones, and anti-oxidant activity

编号	绿原酸/%	总黄酮/%	自由基清除率/%	编号	绿原酸/%	总黄酮/%	自由基清除率/%
1	7.09	21.10	64.61	35	3.31	19.98	86.74
2	3.60	14.04	48.17	36	3.69	8.82	48.69
3	4.57	16.12	79.82	37	4.23	6.99	39.16
4	4.22	13.69	69.15	38	4.30	9.49	52.18
5	4.38	9.29	48.06	39	3.07	15.79	79.40
6	3.85	9.96	62.27	40	3.92	15.47	70.55
7	4.01	14.21	79.94	41	3.34	20.45	82.40
8	4.24	8.83	55.30	42	3.65	17.33	61.78
9	4.92	18.72	85.79	43	3.78	18.58	84.52
10	4.76	9.70	75.53	44	3.11	17.99	79.19
11	4.65	19.92	85.89	45	3.75	10.25	47.03
12	3.88	13.70	63.68	46	3.91	6.26	46.20
13	4.18	17.30	76.24	47	4.01	14.83	75.06
14	4.02	11.60	54.63	48	3.63	15.43	74.02
15	3.96	15.83	71.57	49	3.96	13.56	69.71
16	4.26	7.66	40.28	50	4.78	8.42	49.78
17	3.95	11.10	56.55	51	3.07	12.15	47.64
18	3.71	13.46	52.13	52	3.64	10.54	38.94
19	4.00	9.65	49.38	53	3.88	8.77	52.40
20	4.49	7.54	45.14	54	3.57	8.84	50.95
21	4.09	15.23	80.26	55	3.80	11.58	65.16
22	3.54	8.19	39.55	56	3.86	10.60	69.75
23	3.76	21.13	84.16	57	4.02	10.68	68.92
24	3.79	11.16	53.57	58	3.70	19.21	90.64
25	4.02	11.81	36.47	59	3.87	8.18	56.35
26	3.69	10.95	46.07	60	3.83	9.73	65.46
27	4.03	21.56	82.62	61	3.65	11.41	75.94
28	3.34	5.54	40.59	62	4.13	12.15	58.13
29	4.28	16.85	78.17	63	3.87	10.08	49.08
30	4.16	11.60	59.94	64	3.78	7.72	39.94
31	3.27	20.37	79.70	65	4.05	9.99	53.33
32	3.32	21.94	85.28	66	3.60	8.98	48.45
33	4.13	17.36	85.19	67	3.67	9.77	54.43
34	3.92	8.41	21.87	68	3.69	7.75	37.78

续表 2

编号	绿原酸/%	总黄酮/%	自由基清除率/%	编号	绿原酸/%	总黄酮/%	自由基清除率/%
69	3.97	17.53	72.31	110	1.92	10.01	77.68
70	3.84	9.77	49.90	111	2.25	5.47	48.75
71	3.38	8.52	45.26	112	1.85	10.73	46.43
72	3.23	7.76	41.56	113	1.97	9.77	44.36
73	3.39	10.05	51.77	114	2.48	5.62	21.22
74	3.38	10.19	46.59	115	2.59	7.05	38.79
75	2.94	9.33	41.97	116	2.34	8.98	48.67
76	2.31	9.43	44.77	117	2.46	6.61	37.59
77	2.57	6.40	43.71	118	2.20	8.63	48.68
78	3.08	6.61	42.52	119	1.97	5.38	33.14
79	3.40	7.14	44.13	120	2.39	10.94	62.00
80	3.50	11.78	47.77	121	2.16	4.54	37.80
81	2.51	9.41	41.02	122	2.64	5.12	29.07
82	3.04	9.00	42.96	123	3.12	5.69	30.40
83	3.11	15.54	70.97	124	3.11	10.65	46.18
84	3.04	16.59	73.12	125	2.17	6.79	31.40
85	2.33	12.52	61.44	126	2.27	6.61	26.58
86	2.40	10.12	44.23	127	2.41	6.31	36.81
87	2.18	8.49	40.86	128	2.19	6.07	32.11
88	2.86	12.43	61.25	129	2.19	6.58	31.23
89	3.57	7.93	31.41	130	2.49	8.60	40.31
90	3.71	12.73	41.27	131	3.00	5.67	35.79
91	2.74	9.17	35.72	132	3.12	11.75	66.04
92	2.78	8.62	44.69	133	3.10	4.83	33.62
93	3.23	13.41	61.47	134	2.96	5.88	63.11
94	3.02	9.09	45.77	135	2.82	11.03	40.27
95	2.14	7.06	48.39	136	2.76	4.78	33.62
96	2.66	6.76	49.71	137	2.78	10.46	55.56
97	2.36	6.14	45.39	138	2.90	8.58	46.54
98	2.34	10.13	48.38	139	2.71	5.62	31.20
99	3.26	7.42	42.53	140	3.21	5.98	32.62
100	3.77	8.61	47.65	141	2.83	10.64	52.52
101	2.42	6.27	25.88	142	3.05	5.12	23.26
102	2.37	7.26	25.49	143	3.19	8.66	37.05
103	2.22	6.23	34.93	144	3.23	5.92	21.73
104	1.28	5.17	32.28	145	2.72	7.68	47.23
105	2.28	5.48	29.31	146	2.95	4.88	25.70
106	2.06	5.64	36.31	147	3.06	7.39	42.35
107	1.77	6.01	36.82	148	2.72	5.01	34.31
108	1.89	11.02	60.85	149	3.05	5.43	35.80
109	1.42	5.98	52.85	150	2.97	4.61	33.39

3 讨论

经过文献调研发现,山银花和金银花中绿原酸的提取工艺参数主要由提取温度、提取溶液组成、浸提时间、料液比 4 类因素决定^[10],因此本实验对上述因素进行考察,以提取温度,甲醇浓度,提取时间,料液比 4 个因素为自变量,绿原酸百分含量为响应值设计实验。得到最佳提取条件为在 65 ℃

条件下,用 60%甲醇溶液,按料液比 1:10 超声提取 30 min。

在对色谱条件进行考察时,参考相关文献方法^[2,11],分别选择了乙腈、甲醇、0.1%甲酸水、0.1%醋酸水、0.1%磷酸水进行实验,结果表明乙腈-0.1%甲酸水作为流动相,得到的图谱峰型及分离度较好,分析时间更短。进行全波长扫描后发现在 323

nm 处绿原酸有最大吸收, 且其他组分干扰最小。

进行总黄酮提取工艺优化时, 以提取温度、乙醇浓度、提取时间、料液比 4 个因素为自变量, 总黄酮提取率为响应值设计试验^[12]。得到总黄酮最佳提取条件为在 65 °C 下用 60%乙醇溶液按料液比为 1 : 20 超声提取 30 min。

黄酮的基本结构是 A 和 C 环, B 和 C 环 2 个共轭体系, 而芦丁可以充分的满足这个标准的结构, 本实验测总黄酮选用的是紫外检测器, 紫外对这两个共轭体系的吸收是非常明显的, 因此选用芦丁作为总黄酮含量的基准物质。选用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 溶液作为显色剂, 可排除其他物质对检测结果的干扰^[13]。采用全波长扫描的形式, 找出最大吸收波长为 511 nm。

DPPH 是一种具有 3 个苯环结构的人工合成的稳定自由基, 易溶于乙醇溶液并在其中呈紫红色, 于 515 nm 左右处有最大吸收。当与自由基清除剂共存时, DPPH 的颜色会减退, 其褪色程度与自由基清除剂的清除能力及数量存在定量关系。由于 DPPH 法稳定性好、操作方便, 目前其已广泛用于体外抗氧化性评价^[14]。因此, 本实验以 DPPH 清除率作为衡量山银花、金银花抗氧化活性评价指标。本实验结果显示, 绿原酸含量和总黄酮含量为湖南隆回 > 重庆秀山 > 广西忻城, 说明湖南隆回的山银花中活性成分相对较多, 品质较好。从上述结果可以看出, 采用化学成分分析和生物活性相结合的方式作为质量控制的方法, 能够更加全面、准确地评估药材的质量。但因药材产地取样的局限性, 本实验不能完全代表各产地的质量差异, 应进一步在其他成分或品种产地进行分析, 需要更加深入的研究。

目前, 中药的质量控制主要集中于化学指纹图谱分析, 通过对其高含量、易检测、响应度好的物质进行含量测定, 以此来评价质量优劣。但此法往往检测成分较为单一, 不够全面, 难以准确鉴别^[15]。因此, 本实验采用了多成分分析联合生物活性评价, 从“谱-效”关系的角度开展中药质量控制和评价相对

更加精准, 为中药质量控制提出新模式和方法。

参考文献

- [1] 王志萍, 邓家刚, 王 勤, 等. 山银花研究的最新进展 [J]. 广西中医药大学学报, 2008, 11(4): 59-61.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 张 妍. 金银花与山银花质量控制研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2014.
- [4] 肖美凤, 刘文龙, 周 晋, 等. 金银花和山银花的研究现状及质量控制的关键问题 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4905-4911.
- [5] 李泮霖, 李楚源, 刘孟华, 等. 基于 UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS 技术的金银花、山银花化学成分比较 [J]. 中南药学, 2016(4): 363-369.
- [6] 王 芳, 高 松. 金银花、山银花药理学研究现状 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(4): 237-239.
- [7] 王林青. 金银花、山银花体外抗病毒与免疫增强活性研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2008.
- [8] 王林青, 张红英, 崔保安, 等. 金银花、山银花绿原酸类提取物体外抗 NDV 作用研究 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(19): 277-282.
- [9] 梁逸曾, 王 兵, 曾茂茂, 等. 色谱指纹图谱与中药质量控制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(1): 94-98.
- [10] 邓素兰, 余继宏, 邓芳琴. 金银花中绿原酸提取工艺的对比 [J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2007, 28(2): 109-112.
- [11] 卢凤来, 蒋海英, 陈月圆, 等. HPLC-ELSD 法测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙 [J]. 中成药, 2016, 35(1): 1821-1823.
- [12] 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, 2002, 19(3): 169-170.
- [13] 胡远艳, 田建平, 张吉贞. 海南产山银花总黄酮含量的测定 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(24): 12007-12008.
- [14] Zheng L Z, Li S X, Yuan Q S. Study on the antioxygenation of soybean isoflavone [J]. Food Drug, 2006, 2: 1369-1378.
- [15] 严红梅, 陈小云, 张振海, 等. 基于中药组分和“组分结构”理论的中药研究模式的探讨 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1103-1110.