

基于离线 2D-HPLC-DPPH-ESI-Q-TOF/MS 联用技术的金银花抗氧化成分系统筛选研究

张敏敏^{1,2}, 赵志国^{1,2}, 刘倩^{1,2}, 刘伟^{1,2}, 王晓^{1,2}, 赵恒强^{1,2*}

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014

2. 齐鲁工业大学(山东省科学院)药学院, 山东 济南 250014

摘要: **目的** 建立基于离线二维色谱-二苯基三硝基苯肼-电喷雾飞行时间质谱结合技术(2D-HPLC-DPPH-ESI-Q-TOF/MS)的金银花中抗氧化成分系统筛选方法。**方法** 采用离线二维色谱对金银花提取物进行分段富集、分析, 第一维采用 semi-PREP-HPLC 技术对金银花提取物进行极性分段制备和富集浓缩, 第二维分别采用亲水和反相色谱技术进行分析; 进一步结合 DPPH 在线筛选技术实现金银花复杂组分中抗氧化成分的快速发现; 采用 ESI-Q-TOF/MS 技术进行初步鉴别, 并通过部分单体化合物的体外抗氧化活性评价对筛选结果进行验证。**结果** 该方法可以实现金银花中不同极性和不同含量抗氧化成分的快速筛选, 从金银花提取物中共筛选出 36 种具有抗氧化活性的成分, 采用高分辨质谱初步鉴定出 12 种, 对 9 种成分进行活性验证, 其中 7 种成分(异绿原酸 B、异绿原酸 A、1,3-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C、芦丁、隐绿原酸、绿原酸)的半数抑制浓度(IC₅₀)优于阳性对照维生素 C。**结论** 该方法高效、快速, 为复杂体系天然产物中不同极性和含量抗氧化成分的发现提供了技术和平台支持。

关键词: 金银花; 抗氧化成分; 在线筛选; 离线二维色谱; 电喷雾-四级杆-飞行时间质谱; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 1,3-二咖啡酰奎宁酸; 异绿原酸 C; 芦丁; 隐绿原酸; 绿原酸

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)11-3193-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.005

Rapid discovery of trace antioxidants in *Lonicerae Japonicae Flos* by 2D-HPLC-DPPH-ESI-TOF/MS

ZHANG Min-min^{1,2}, ZHAO Zhi-guo^{1,2}, LIU Qian^{1,2}, LIU Wei^{1,2}, WANG Xiao^{1,2}, ZHAO Heng-qiang^{1,2}

1. Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China

Abstract: **Objective** A two-dimensional liquid chromatography (2D-HPLC-DPPH-ESI-Q-TOF/MS) method combined with on-line antioxidant screening technique was established for rapid detection of trace antioxidants in *Lonicerae Japonicae Flos*. **Methods** The 2D-HPLC method was used for the preparation, which can achieve the enrichment and polarity grouping of trace components in *Lonicerae Japonicae Flos*. In the first dimension, the extract was subjected to polar grouping and enrichment by semi-PREP-HPLC technique. In the second dimension, HILIC and RP2-UPLC techniques were used for analysis. Furthermore, DPPH online screening technology was combined to achieve the rapid discovery and screening of trace antioxidant components in the complex components of *Lonicerae Japonicae Flos*. ESI-Q-TOF/MS technique was used for preliminary identification, and the screening results were verified by the *in vitro* antioxidant activity evaluation of some monomeric compounds. **Results** The results showed that this method can rapidly enrich and screen different polar antioxidants in *Lonicerae Japonicae Flos*, and 36 compounds with antioxidant activity were screened in *Lonicerae Japonicae Flos*. Twelve compounds were identified by high resolution mass

收稿日期: 2020-10-20

基金项目: 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302); 山东省重点研发计划(2019GSF108062, 2016GSF202014, 2017GSF216002); 山东省自然科学基金(ZR2017LH071, ZR2016YL006); 山东省重大科技创新工程(2017CXGC1308); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-21); 山东省泰山学者岗位资助(郭兰萍); 山东省科学院先导专项(郭兰萍)

作者简介: 张敏敏(1990—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向为天然产物分析。E-mail: zhangminminff@163.com

***通信作者:** 赵恒强, 博士, 副研究员, 主要从事天然产物分析研究。Tel: (0531)82605319 E-mail: hqzhao2007@163.com

spectrometry. The activity of nine components was verified, and the IC_{50} value of seven compounds (isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, 1,3-dicaffeoylquinic acid, isochlorogenic acid C, rutin, cryptochlorogenic acid, and chlorogenic acid) was better than positive control-vitamin C. **Conclusion** The method is efficient and rapid, which provides technical basis and platform support for the rapid discovery of trace antioxidant components in natural products of complex systems.

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; trace antioxidants; on-line screening; two-dimensional liquid chromatography (2D-HPLC); electrospray ionization-time of flight-mass spectrum (ESI-TOF/MS); isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; 1,3-dicaffeoylquinic acid; isochlorogenic acid C; rutin; cryptochlorogenic acid; chlorogenic acid

自由基是 1 个含有不成对电子的原子团, 性质极不稳定。体内过盛的自由基会攻击人体细胞对人体造成严重损伤, 维持体内自由基平衡是保证人体健康的重要途径。抗氧化剂是一类能帮助捕获并中和自由基, 从而祛除自由基对人体损害的一类物质。具有自由基清除作用的抗氧化剂的研究已成热点, 其中天然抗氧化剂以其高安全性、强环保性等优势成为科学研究中的重要目标^[1-2]。天然抗氧化剂的发现也是天然产物研究领域的重要研究方向。

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^[3], 在我国传统中药处方中广泛用于治疗发烧、感染、疮疡和肿胀等疾病^[4-5], 2002 年被列入原卫生部公布的《既是食品又是药品的药物名单》, 成为药食同源食品被广泛应用于保健食品和功能饮料行业^[6-7]。现代药理学研究表明, 金银花提取物具有解热、保肝、抗菌、抗炎、抗氧化、抗病毒等广泛的生物活性^[8-11]。王春鹏等^[12]建立了金银花抗氧化活性指纹图谱, 从其中筛选出绿原酸和异绿原酸 A 为主的 8 个抗氧化成分; 梁从莲等^[13]建立金银花指纹图谱及清除 DPPH 自由基的谱-效关系, 由此可见, 金银花也是天然抗氧化剂的一个良好来源。研究发现, 金银花中含有酚酸类、黄酮类、环烯醚萜类等多种化学成分^[14-16], 且各成分含量、极性差异较大, 是复杂体系天然产物的代表。由于化学成分的复杂性对其提取物中抗氧化活性成分发现造成了较大的干扰, 尤其是对低含量化合物的活性发现和应用造成了较大困难。

传统的天然产物活性成分发现方法一般是采用一系列的分离和纯化技术得到单体成分, 再进行体内或体外药理学筛选, 该方法在药物开发中发挥着重要作用^[17-19]。但是, 该方法存在耗时、耗能、效率较低、较为盲目等不足。另外, 某些化合物由于含量较低和分离纯化过程中性质不稳定等因素使其抗氧化活性难以被发现。近年来, 基于液相色谱-二苯基-三硝基-苯肼 [high performance liquid chromatography-2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)

hydrazyl, HPLC-DPPH] 技术的在线抗氧化成分筛选技术, 具有色谱分离和活性筛选同时进行, 高效、快速等优势, 目前已广泛用于天然抗氧化活性成分的快速筛选^[20-25], 成为天然产物中抗氧化成分筛选的主要方法之一。本课题组也应用该技术进行了木瓜、厚朴等多种天然产物中抗氧化成分的快速筛选^[26-27], 取得了较好的结果。但综合对比以往的研究可以发现, 该方法对化学成分相对简单, 含量较高成分的筛选效果较好, 但对复杂体系天然产物中极性差异大和含量较低活性成分的同时筛选仍然存在一定困难, 制约了该技术在天然产物抗氧化成分筛选中的应用。

离线二维色谱技术具有分辨率高、通量大、仪器配置要求低等优点, 结合高分辨飞行时间质谱技术可以实现复杂体系天然产物中化学成分的分析表征。特别适合不同极性成分、结构类似物的分析表征, 并且可以实现低含量成分的富集。离线二维色谱技术与 DPPH-HPLC 技术联用将大大增加复杂体系天然产物中抗氧化成分的筛选能力, 有关这方面的研究未见报道。

本研究提出了离线二维色谱联合 DPPH-HPLC-ESI-Q-TOF/MS 技术的金银花抗氧化成分的系统筛选方法。运用该方法从金银花中筛选出 36 种具有抗氧化活性的化学成分。该研究为复杂体系天然产物中抗氧化成分的系统筛选研究提供方法和技术支持。

1 仪器与材料

赛默飞 Unimates3000 系列高效液相色谱系统 (美国赛默飞世尔科技公司); 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); Tecan M20 系列多功能酶标仪 (瑞士帝肯集团有限公司); 布鲁克 IMPACT II ESI-Q-TOF/MS 质谱仪 (美国布鲁克公司); MICROTETTM96 孔酶标板 (波士顿狄金森公司); SB-5200D 系列高功率超声波清洗仪 (宁波新芝公司); CPA225D 型十万分之一电子分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)购买于 Sigma 公司,乙腈(色谱纯)购于 Merch 公司;对照品新绿原酸(批号 M07GB140938)、绿原酸(批号 Y24J7K16726)、隐绿原酸(批号 M06GB147634)、芦丁(批号 A05GB144263)、木犀草苷(批号 Y13J10H93050)、异绿原酸(批号 AP11D11L134209)、异绿原酸(批号 BP17N11L131404)、异绿原酸 C(批号 M11GB140940)、1,3-二咖啡酰奎宁酸(批号 P22J11F116507)均购于上海源叶生物技术公司,质量分数>98%。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。实验用水为超纯水(Millipore Q-Plus 系统,美国)。

金银花样品购于济南漱玉平民大药房,经齐鲁工业大学(山东科学院山东省分析测试中心)王晓教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* Thunb. 的干燥花蕾。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

2.1.1 待测样品 精密称定金银花粉末 10 g,加入 70%甲醇 1000 mL,超声提取 30 min,减压蒸干后用 20 mL 70%甲醇复溶,过 0.45 微孔滤膜,备用。

2.1.2 筛选试剂 精密称定 DPPH,用 80%乙腈配制成浓度为 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 自由基溶液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.1.3 对照品溶液 分别精密称定各对照品 1.0 mg 于 1 mL 量瓶中,溶解后用甲醇定容,配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液。

2.2 色谱条件

2.2.1 一维色谱条件 采用 RIGOL-3245 半制备液相色谱系统结合反相制备色谱柱对金银花粗提物进行初步分段制备。色谱柱:YMC-Pack ODS-A 柱(250 mm $\times$ 10.0 mm, 5 μm);流动相:0.2%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)。梯度洗脱:0~20 min, 10%~40% B; 20~30 min, 40%~50% B; 30~31 min, 50%~100% B。体积流量 3.0 mL/min,检测波长为 280 nm。进样量为 100 μL 。3 部分流分(流分 A~C)收集后冷冻干燥,用 70%甲醇复溶,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后用于后续分析、鉴定和筛选。

2.2.2 二维色谱条件 采用赛默飞 U3000 超高效液相色谱系统完成样品的分段分析。鉴于组分间极性和含量的差异,需针对 3 个流分分别优化出不同的液相分离条件和质谱鉴别条件,以获得更多的色谱分离峰和较好的分离效果。

(1) 流分 A 色谱分析:沃特世 XBridge Amide

色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μm);流动相:水(含 0.8%甲酸、10 mmol/L 甲酸铵,A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~5 min, 96%~93% B; 5~20 min, 93% B; 20~30 min, 93%~85% B; 30~40 min, 85%~82% B; 40~50 min, 82%~78% B; 50~51 min, 78%~50% B; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 流分 B 色谱分析:安捷伦 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 3.0 mm, 1.8 μm);流动相:水(含 0.6%甲酸,A)-乙腈(含 10%水,B);梯度洗脱:0~5 min, 5%~6% B; 5~15 min, 6%~8% B; 15~25 min, 8%~10% B; 25~40 min, 10%~13% B; 40~45 min, 13%~15% B; 45~55 min, 15%~17% B; 55~65 min, 17%~30% B; 65~70 min, 30%~45% B; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

(3) 流分 C 色谱分析:沃特世 Xselect HSS T3 色谱柱(150 mm $\times$ 3.0 mm, 3.5 μm);流动相:水(含 0.8%甲酸、10 mmol/L 甲酸铵,A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~10 min, 14%~17% B; 10~20 min, 17%~18% B; 20~30 min, 18%~19% B; 30~50 min, 19%~23% B; 50~65 min, 23%~28% B; 65~75 min, 28%~35% B; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长 345 nm; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 在线抗氧化筛选

利用赛默飞 U3000 双三元液相色谱系统完成各组分在线抗氧化筛选。各流分利用右泵经最优化的色谱条件进样分析,样品经过色谱柱分离后与左泵泵出的 DPPH 溶液混合,混合液在反应池中反应后流入 HPLC 系统的 DAD 检测器进行检测。鉴于 DPPH 在波长 517 nm 处的特征峰由于 DPPH 自由基被抗氧化活性成分清除后会形成倒峰。对比样品最佳吸收波长下和 DPPH 自由基特征波长下的 HPLC 图谱确定筛选出抗氧化活性成分。

2.4 ESI-Q-TOF/MS 分析

电喷雾正负离子全扫描检测;全扫描范围 m/z 50~1500;锥孔电压 60 V;毛细管电压 5.0 kV;裂解电压 120 V;喷雾气压 310 kPa;干燥气体积流量 8.0 L/min;干燥气温度 200 $^{\circ}\text{C}$,通过以上质谱条件对这 3 组流分分别进行质谱鉴别分析。

2.5 活性验证

将各单一对照品储备液分别稀释至 7 个不同的质量浓度(0.50、0.25、0.10、0.05、0.02、0.01、0.005

mg/mL), 作为待测样品备用。

取待测溶液 50 μ L, 0.04 mg/mL DPPH 溶液 100 μ L 加入到 96 孔板中混匀, 室温避光孵育 30 min 后在酶标仪 517 nm 下测定吸光度 (A) 值。对照组中以 50 μ L 甲醇代替 50 μ L 待测溶液, 其余添加溶液不变。空白组仅添加 150 μ L 甲醇。以维生素 C 作为阳性对照。按照公式计算 DPPH 自由基清除率, 以清除率为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线, 计算各对照品的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。

$$\text{自由基清除率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

3 结果与分析

3.1 金银花提取物的离线二维色谱分析

本课题组在前期研究中建立了 RP-HPLC-DAD 法分析金银花活性成分的方法^[28], 并且发现金银花甲醇水提取物中活性成分较多, 种类较为复杂, 含量差异较大, 除绿原酸和异绿原酸含量较高外, 其他大部分成分含量较低^[16]。另外, 部分化学成分极性较高, 采用反相色谱柱难以分离。含量和极性的显著差异对在线筛选的分辨率和灵敏度提出了更高要求。针对以上问题, 本研究采用反相半制备液相色谱技术, 根据色谱图中各色谱峰的出峰顺序和含量特点, 对金银花提取物进行初步分离, 从而实现低含量成分的富集和不同极性成分的初步分段。进一步采用不同类型色谱柱进行分析, 以提高在线筛选的分辨率和灵敏度。

3.1.1 一维色谱条件优化 反相高效液相色谱系统已广泛应用于天然产物的分离纯化中, 具有高效率, 高分离度和高回收率的优点^[29]。本部分利用反相半制备液相色谱技术将金银花提取物进行分段分析。在本研究中, 考虑到金银花提取物的复杂性, 采用梯度洗脱方法进行初步分离。通过半制备液相色谱柱洗脱出的样品按照极性和含量等综合评估分别收集 A、B、C 3 个流分 (制备分离结果见图 1)。其中, 流分 A 所含化学成分极性较强且含量较低, 流分 C 化学成分极性稍弱、含量亦较低, 需要多次进行富集。为从金银花中发现更多的低含量抗氧化成分, 本研究对流分 A 和 C 进行了多次制备和浓缩, 对流分 B 进行了适当制备浓缩。

3.1.2 二维色谱分析条件优化 流分 A 在半制备液相上出峰较快。所含化学成分极性较强, 采用普通反相色谱柱难以实现其有效分离, 因此选用亲水色谱柱进行分析。考察了 XBridgeTM HILIC column (150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m), SeQuantTM ZIC-HILIC

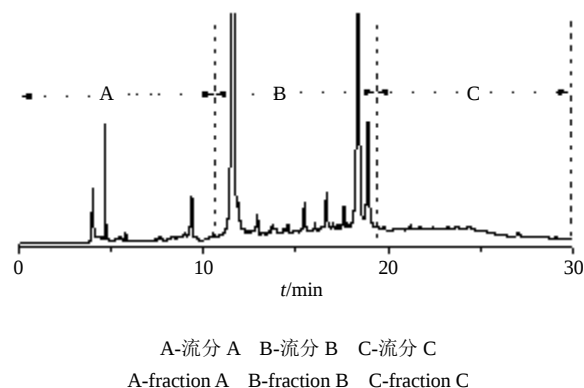


图 1 金银花流分富集制备 HPLC 图谱 (280 nm)

Fig. 1 Preparative chromatogram of *Lonicerae Japonicae Flos* segmentation (280 nm)

column (150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m;) 和 XBridgeTM Amide column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μ m) 3 根不同的亲水色谱柱对该组分的分离效果。结果表明, 利用 XBridgeTM Amide column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μ m) 进行分离时, 出峰数量较多、分离度较好、峰形较尖锐, 因此选用该色谱柱对流分 A 进行色谱分离。流动相是影响色谱分离的又一项重要因素。经过考察发现, 采用乙腈-水体系梯度洗脱可以实现流分 A 中化学成分的较好分离。为了改善色谱峰拖尾现象, 经过优化在水相中加入 0.8% 甲酸、10 mmol/L 甲酸铵可以得到较好的色谱峰型。HILIC 色谱柱分离效果受柱温影响较大, 因此本研究考察了 4 个不同柱温 (25、30、35、40 $^{\circ}$ C) 对色谱分离的影响。结果表明, 柱温为 35 $^{\circ}$ C 时, 峰形尖锐、分离度高、对称性好。优化后的色谱图见图 2-A。

根据流分 B 在半制备液相色谱上的出峰时间, 选择反相色谱柱进行分析。另外, 由于流分 B 中化学成分较多, 各成分间极性差异性较小, 单纯采用乙腈-水体系梯度洗脱难以实现其有效分离。进一步考察了在乙腈中加入不同比例水 (5%、10%、15%) 的分离效果, 结果表明, 采用乙腈 (10% 水)-水体系, 梯度洗脱, 可以实现流分 B 的较好分离。同时, 考虑到金银花中所含主要化学成分为酚酸、黄酮类化合物, 易造成 C_{18} 柱拖尾现象, 通过优化考察, 在水相中添加一定比例的酸 (0.6% 甲酸) 以达到改善色谱峰形的效果。在优化的色谱条件下, 流分 B 的色谱分离图见图 2-B。

流分 C 在半制备色谱柱上出峰时间较晚, 说明其极性稍弱, 本研究采用反相色谱柱用于其分析研究。采用跟流分 B 相同的方法和思路对流分 C 色谱

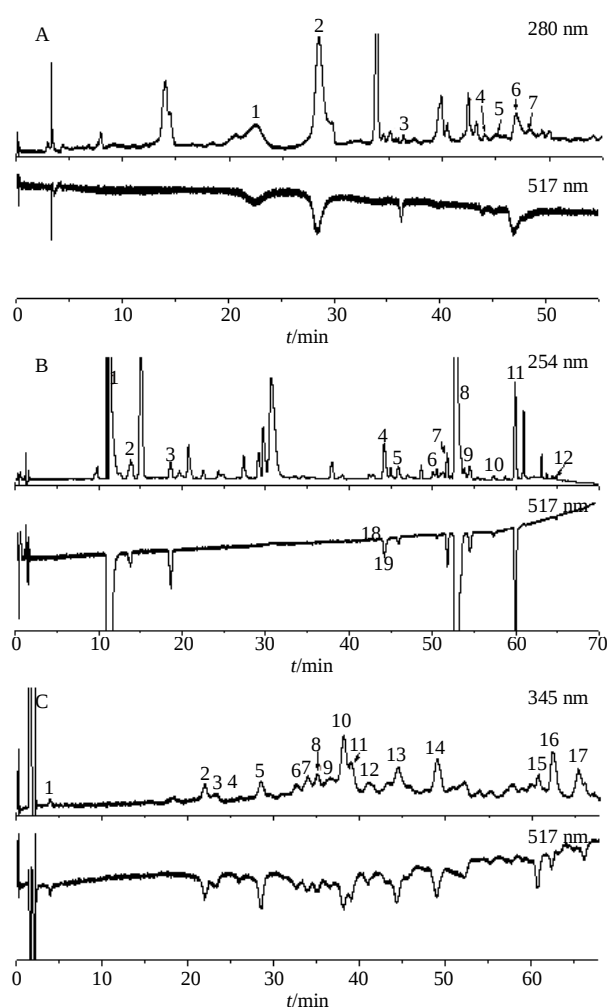


图 2 金银花不同流分 (A~C) 的 HPLC-DPPH 筛选图谱
Fig. 2 HPLC-DPPH screening chromatogram of honeysuckle fraction A, B and C

条件进行了系统优化, 最终选用 0.8% 甲酸和 10mmol/L 甲酸铵作为流动相 A, 乙腈作为流动相 B, 柱温 40 °C 作为最优色谱条件用于分析, 所得色谱图如图 2-C 所示。

3.2 提取物的在线筛选

3.2.1 在线筛选条件优化 本研究所用在线筛选条件是在本课题组前期建立的在线抗氧化筛选模型^[26]基础上进行了适当调整。重点针对 DPPH 溶剂、DPPH 浓度、DPPH 体积流量和反应池规格 (内径和长度) 等进行优化考察。

由于流分 A、B、C 的色谱分析均采用乙腈-水为流动相, 为了保证基线稳定, 研究选取 3 种不同体积分数 (50%、80%、100%) 的乙腈作为 DPPH 溶解溶剂进行了对比优化。结果表明, 针对该实验体系 80% 乙腈水为溶剂时基线较为平稳。通过对比

3 个不同浓度的 DPPH 溶液 (0.6、6、60 $\mu\text{mol/L}$) 的筛选效果, 可以看出在一定范围中筛选效果随着浓度的增大而增大, 直至平稳。但过大的浓度影响基线的稳定性。因此, 选择 60 $\mu\text{mol/L}$ 作为最适浓度用于筛选。另外, 针对不同色谱分离条件需优化调整 DPPH 溶液泵入体积流量, 本研究结合各组分色谱条件对 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL/min 5 个 DPPH 溶液泵入体积流量进行分析, 结果表明在合适的范围内随着泵入体积流量的增大, 倒峰峰高不断增高, 渐趋平稳。但相应可知, 过大的体积流量会造成基线的强烈波动影响筛选灵敏度。因此, 流分 A 筛选体积流量确定为 0.8 mL/min, 流分 B 和 C 筛选体积流量确定为 0.4 mL/min。

反应池规格会影响反应时间的长度, 从而影响筛选效果。反应池规格包含反应管内径和反应管长度两项。本实验对 2 种内径 (0.18、0.25 mm) 和 3 个长度 (5、10、15 m) 进行优化分析。研究结果表明: 反应管越短, 峰宽越窄, 负峰分离度越高; 反应管越长, 峰高越高, 负峰分离度越差。反应管内径越小, 峰宽越窄, 负峰分离度越高; 反应管内径越大, 峰高较高, 分离度越差。综合考虑以上因素, 确定内径为 0.25 mm, 长度为 10 m 的 PEEK 管为流分 A 最适反应池, 确定内径为 0.25 mm, 长度为 10 m 的 PEEK 管为流分 B、C 最适反应池。

3.2.2 抗氧化成分的筛选 采用最优化的色谱分析条件和在线筛选条件对金银花提取物的 3 个组分进行抗氧化成分在线筛选, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 金银花提取物 A、B、C 3 个流分均实现了较好的色谱分离, 色谱峰的数量较金银花提取物的色谱图 (图 1) 明显增加, 且色谱峰信号强度适中, 可以满足在线筛选的需求。最终, 在 A 组分中共筛选出 7 个具有抗氧化活性的化合物, B 组分中共筛选出 12 个具有抗氧化活性的化合物, C 组分中共筛选出 17 个抗氧化活性成分。综合上述筛选结果发现, 经过离线二重分离分析后, 在金银花不同极性组分中共筛选出 36 种具有抗氧化活性的化学成分, 研究结果明显优于文献报道中金银花中的抗氧化成分数量^[30]。

3.3 抗氧化成分的 ESI-Q-TOF/MS 鉴别

按最优化的 HPLC 条件和 ESI-Q-TOF-MS 条件对流分 A、B、C 分别进行高分辨飞行时间质谱分析, 根据各化合物的精确相对分子质量、特征吸收波长, 并参照文献报道^[31-33]对筛选出的抗氧化活性成分进行鉴别, 结果见表 1。其中, 初步鉴定出 12

表 1 金银花中抗氧化成分 ESI-Q-TOF-MS 鉴别

Table 1 ESI-Q-TOF-MS identification of antioxidants in *Lonicerae Japonicae Flos*

峰号	化合物	分子式	正离子 (m/z)	负离子 (m/z)	λ/nm	类型
A1	未知		$[2M+Na]^+$ 467.171 4, $[M+H]^+$ 445.193 1	$[M-H]^-$ 443.163 9	254、280	
A2	新绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[2M+Na]^+$ 731.152 3	$[2M-H]^-$ 707.180 7	280、354	有机酸
A3	未知		536.193 3	589.773 2	262、280	
A4	未知		701.468 1	547.128 8, 678.360 0	254、280	
A5	未知		599.094 6	600.347 6, 627.365 2	280	
A6	pomacrerone	$C_{30}H_{44}O_3$	$[M+Na]^+$ 475.316 2		254、280	三萜
A7	未知		623.185 9	578.742 0	254、280	
B1	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[2M+Na]^+$ 731.176 9	$[2M-H]^-$ 707.180 2	280、327	有机酸
B2	隐绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[2M+H]^+$ 709.197 4	$[2M-H]^-$ 707.182 9	254、327	有机酸
B3	未知		699.231 1, 721.213 0	697.214 2	280、327	
B4	芦丁	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M+H]^+$ 611.158 4, $[M+Na]^+$ 633.140 2	$[M-H]^-$ 609.133 2	254、327	黄酮
B5	木犀草苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$		$[M-H]^-$ 447.094 1	254、280、327	黄酮
B6	未知		566.425 1, 588.406 9	743.2342	254	
B7	异绿原酸 B	$C_{25}H_{24}O_{12}$		$[M-H]^-$ 515.115 9	254、280	有机酸
B8	异绿原酸 A	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M+H]^+$ 517.131 9, $[M+Na]^+$ 539.113 6	$[M-H]^-$ 515.115 9	280、327	有机酸
B9	异绿原酸 C	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M+H]^+$ 517.131 9, $[M+Na]^+$ 539.113 6	$[M-H]^-$ 515.115 9	254、327	有机酸
B10	未知		745.251 3, 767.233 2	743.234 6	280、327	
B11	未知		$[M+H]^+$ 679.509 0, $[M+Na]^+$ 701.490 8	515.111 5, 537.090 7	254	
B12	未知		745.252 2, 767.234 1	789.237 3	254	
C1	未知		622.026 9		254	
C2	未知		566.414 9, 687.507 1, 787.259 2		280、345	
C3	未知		567.418 4		254	
C4	未知		584.157 8, 562.178 5, 566.414 0	546.693 4, 729.177 7	254	
C5	1,3-二咖啡酰奎宁酸	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M+H]^+$ 517.121 0, $[M+Na]^+$ 539.102 9	$[M-H]^-$ 515.116 2	254、280、345	有机酸
C6	未知		$[M+H]^+$ 461.166 9, $[M+Na]^+$ 483.116 7		254、280	
C7	未知		$[M+H]^+$ 523.108 4, $[M+Na]^+$ 545.089 4		280	
C8	squarrosidine	$C_{27}H_{24}O_9$	$[M+Na]^+$ 515.133 5		254、280、345	黄酮
C9	未知		513.123 8	470.818 2	345	
C10	未知		792.575 1, 814.556 5		280、345	
C11	未知		579.203 4		254	
C12	未知		585.201 7, 747.250 9, 687.244 1		345	
C13	啤酒甾醇	$C_{28}H_{46}O_3$	$[M+Na]^+$ 453.332 2		262、345	甾醇
C14	未知		509.871 6		262、345	
C15	未知		497.027 8, 622.952 5, 745.038 4		262、345	
C16	未知		523.202 7, 702.277 5, 762.333 2		262、345	
C17	未知		468.999 6, 572.749 9, 643.388 6, 904.259 3		262、345	

A1~A7、B1~B12、C1~C17 分别对应图 2 中 3 个流分 A、B 和 C 中筛选出的抗氧化成分

A1—A7, B1—B12, C1—C17 represents the antioxidants screened from the three streams (A, B, C) in Figure 2, respectively

种活性成分。另外,由表 1 信息结合各类化合物的光谱特征可以看出金银花中筛选出的抗氧化成分以

有机酸类为主,同时含有部分黄酮类成分等,以化合物 B4 为例,其 m/z 609.133 2 为 $[M-H]^-$ 峰,碎

片离子含有 300.028 3 且其在 254、327 nm 处有较大吸收,符合黄酮类化合物甲醇溶液在 200~400 nm 的区域内存在 2 个主要的紫外吸收带——峰带 I(300~400 nm)和峰带 II(220~280 nm)的特征,因此结合文献报道^[34]鉴定化合物 B4 为黄酮类化合物芦丁;研究表明金银花中有机酸类化合物紫外特征吸收光谱最大值约在 280、330 nm^[35],化合物 B8 m/z 515.115 9 为 $[M-H]^-$ 峰,且含有离子峰 $[M+H]^+$ 517.131 9 和 $[M+Na]^+$ 539.113 6,因此初步鉴别 B8 为有机酸类化合物异绿原酸,结合出峰顺序等因素判定其为异绿原酸 A。

3.4 活性验证

本研究采用化合物体外 DPPH 自由基清除试

验来实现单体化合物的活性验证。测定了其中 9 个化合物的抗氧化活性及 IC_{50} 值,结果见表 2。结果表明,这 9 个化合物均具有一定的抗氧化活性且在一定范围内呈现良好的量效关系。其中异绿原酸 B 的 IC_{50} 值最小(19.0 $\mu\text{mol/L}$),表明其抗氧化活性最好。对比各化合物的 IC_{50} 值,得出抗氧化活性顺序为:异绿原酸 B>异绿原酸 A>1,3-二咖啡酰奎宁酸>异绿原酸 C>芦丁>隐绿原酸>绿原酸>维生素 C>新绿原酸>木犀草苷。其中,有 7 种成分的抗氧化活性明显优于阳性对照维生素 C。该结果进一步表明金银花的抗氧化活性是其中所含多种抗氧化成分共同作用的结果。

表 2 金银花中抗氧化成分活性验证

Table 2 Antioxidant activity verification of components in *Lonicerae Japonicae Flos*

化合物	抑制率 $a/\%$	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	化合物	抑制率 $a/\%$	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
新绿原酸	20.7	333.9	异绿原酸 B	68.2	19.0
绿原酸	58.4	45.2	异绿原酸 A	76.4	22.8
隐绿原酸	63.4	44.9	异绿原酸 C	65.0	27.1
芦丁	49.2	34.2	1,3-二咖啡酰奎宁酸	70.2	24.8
木犀草苷	16.9	634.1	维生素 C	72.1	56.8

a-表示样品浓度为 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 DPPH 的清除率

a-scavenging rate of DPPH at the concentration of 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

4 讨论

本研究建立了离线二维色谱-DPPH-ESI-Q-TOF/MS 法系统筛选金银花中抗氧化活性成分的方法。通过该发法从金银花提取物中共筛选出 36 种具有抗氧化活性的成分,采用高分辨质谱鉴别出 12 种,体外 DPPH 自由基清除活性验证实验表明,其中 7 种成分的抗氧化活性优于阳性对照(维生素 C)。该方法克服了金银花化学成分种类多、含量和极性差异较大而造成的抗氧化成分筛选假阴性问题。为后续从复杂体系中较为全面的筛选抗氧化活性成分提供了新的研究思路和方法技术支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王旭,赵月,李婷婷,等.天然抗氧化剂对玉米油稳定性的影响[J].食品科学,2018,39(16):7-12.
- [2] 郑萍.天然抗氧化剂的应用与发展[J].科技展望,2016,1:123-124.
- [3] 中国药典[S].一部.2020:237-239.
- [4] 唐晓红.浅论金银花的药用成分及临床药理作用[J].

当代医药论丛,2016,14(9):3-5.

- [5] 李兴平,白筱璐,雷玲,等.金银花的解热作用[J].中药药理与临床,2012,28(2):36-39.
- [6] 程玉江,唐海皇,吴晓霞,等.胖大海金银花罗汉果复合保健饮料研制[J].农产品加工,2015(2):18-21.
- [7] 刘程.金银花类饮料生产过程中的浸提条件优化及产品沉淀控制[D].武汉:华中农业大学,2014.
- [8] 林丹,赵国玲,刘佳佳.中药金银花药用成分的提取及抑菌实验的研究[J].天然产物研究与开发,2003,15(5):436-437.
- [9] Yang J, Li Y, Zhou X R, et al. Two thymol derivatives from the flower buds of *Lonicera japonica* and their antibacterial activity[J]. Nat Prod Res, 2018, 32(18): 2238-2243.
- [10] Fan L, Lin C H, Duan W J, et al. Rapid and quantitative determination of 10 major active components in *Lonicera japonica* Thunb. by ultrahigh pressure extraction-HPLC/DAD[J]. High Pressure Res, 2015, 35: 57-68.
- [11] 华桦,鄢良春,吴诗惠,等.山银花、金银花微毒测试(Microtox)与安全性研究[J].世界中医药,2020,15(2):219-224

- [12] 王春鹏, 朱子微, 李晋, 等. 金银花抗氧化活性整合指纹图谱的建立及其在质量评价中应用 [J]. 天津中医药大学学报, 2014, 5(33): 291-295.
- [13] 梁从莲, 刘红燕, 崔媛, 等. 金银花指纹图谱及其清除 DPPH 自由基的谱-效关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 44-46.
- [14] 赵金娟, 管仁伟, 路俊仙, 等. HPLC 测定不同品种金银花及叶中木犀草苷含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 103-106.
- [15] 刘敏彦, 高淑丽, 刘丽华, 等. HPLC 法同时测定不同产地金银花和山银花中 6 种有机酸成分 [J]. 中药材, 2013, 36(2): 196-198.
- [16] 张敏敏, 刘代成, 王岱杰, 等. SPME-GC/MS 联合 HSDE-HPLC-DAD 分析表征金银花新品种中的主要化学成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28: 1390-1396.
- [17] 楼招欢, 杨波, 沈炜, 等. 丹参二萜醌部位高速逆流色谱制备工艺及体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 679-682.
- [18] 栗雯. 高速逆流色谱分离纯化中草药广金钱草和连翘活性成分的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2014.
- [19] Pan C L, Lu H T. Preparative separation of quercetin, ombuin and kaempferide from *Gynostemma pentaphyllum* by high-speed countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(3): 265-271.
- [20] 张敏敏, 程素盼, 赵志国, 等. UPLC-DPPH-PAD-ESI-TOF/MS 在线联用技术快速筛选丹参中的抗氧化成分 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2908-2913.
- [21] 耿丹丹, 董琦, 谭亮, 等. HPLC-DAD-ESI /MSⁿ-DPPH 在线筛选与鉴别 丹参和康定鼠尾草中抗氧化活性成分 [J]. 分析测试学报, 2015, 34(3): 314-320.
- [22] Koleva I I, Niederlander H A, Van Beek T A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(14): 3373-3381.
- [23] Bandoniene D, Murkovic M. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(9): 2482-2487.
- [24] 裴世春, 徐玖亮, Byunghun U M, 等. HPLC-ABTS⁺在线法筛选细叶杜香叶部抗氧化活性成分 [J]. 食品科学, 2012, 33(19): 88-91.
- [25] Ou Z Q, Schmierer D M, Rades T, et al. Application of an online post-column derivatization HPLC-DPPH assay to detect compounds responsible for antioxidant activity in *Sonchus oleraceus* L. leaf extracts [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(2): 271-279.
- [26] Zhang M M, Zhao R X, Zhou S D, et al. Chemical characterization and evaluation of the antioxidants in *Chaenomeles* fruits by an improved HPLC-TOF/MS coupled to an on-line DPPH-HPLC method [J]. *J Environmental Sci Health, Part C*, 2018, 36(1): 43-62.
- [27] Zhang M M, Cheng S P, Liang Y, et al. Rapid purification of antioxidants from *Magnolia officinalis* by semi-prep-HPLC with a two-step separation strategy guided by on-line HPLC-radical scavenging detection [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1100: 140-147.
- [28] 朱姮, 于金倩, 刘倩, 等. 基于 RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术的山东金银花多指标定量指纹图谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 82-89.
- [29] 朱靖博, 李文玉, 肖伟, 等. 二维反相液相色谱制备五味子中的木脂素 [J]. 色谱, 2018, 6(5): 464-473.
- [30] Tang D, Li H J, Chen J, et al. Rapid and simple method for screening of natural antioxidants from Chinese herb *Flos Lonicerae Japonicae* by DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS [J]. *J Separ Sci*, 2008, 31(20): 3519-3526.
- [31] Li X Q, Sun X H, Cai S, et al. Investigation on the chemical constituents and variation of the flower buds of *Lonicera* species by UPLC-ESI-MS/MS and principle component analysis [J]. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44(8): 895-904.
- [32] Wang D J, Du N, Wen L, et al. An efficient method for the preparative isolation and purification of flavonoid glycosides and caffeoylquinic acid derivatives from leaves of *Lonicera japonica* Thunb. using high speed counter-current chromatography (HSCCC) and Prep-HPLC guided by DPPH-HPLC experiments [J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 229-241.
- [33] Wang Y D, He Y, Dai Z, et al. A comparative study on bioactive constituents in different parts of *Lonicera japonica* determined by HPLC-ESI-MS(n) [J]. *J Asian Nat Prods Res*, 2016, 18(10): 988-1003.
- [34] 张丽媛, 李遇伯, 李利新, 等. RRLC-Q-TOF/MS 分析金银花的化学成分 [J]. 中南药学, 2012, 10(3): 204-208.
- [35] 邢丽红, 李文龙, 翟海斌. 金银花提取物中 5 种有机酸含量测定的紫外光谱法 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 547-551.