

# 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

张敏敏<sup>1,2</sup>, 刘代成<sup>1</sup>, 王岱杰<sup>2</sup>, 耿岩玲<sup>2</sup>, 王晓<sup>2</sup>, 赵恒强<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 山东师范大学生命科学学院; <sup>2</sup> 山东省中药质量控制技术重点实验室 山东省分析测试中心, 济南 250014

**摘要:** 本文运用 SPME-GC/MS 联合 HPLC-DAD 法分析表征金银花新品种花和叶中的主要化学成分, 为开发利用金银花新品种提供数据支持。采用 SPME-GC/MS 对该品种花及叶片中的挥发油成分进行检测; 并采用 HSDE-HPLC-DAD 对该品种花及叶片中有机酸、黄酮、环烯醚萜苷类成分进行分析测定。最终从该品种金银花中检测出 54 种挥发油成分, 定量测定出四种有机酸(绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C)、两种黄酮(芦丁、木犀草苷)、两种环烯醚萜苷(马钱酸、当药苷)共八个化合物的含量。该方法以金银花中四类主要成分为指标, 全面系统的对该金银花新品种花及叶进行分析测定和质量评价, 为新品种金银花的推广及应用提供科学依据。

**关键词:** GC/MS; HPLC-DAD; 金银花; 挥发油类; 黄酮类; 有机酸类; 环烯醚萜苷类

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.9.009

## Analysis and Characterization of the Chemical Ingredients of *Lonicera japonica* by SPME-GC/MS Coupled with HSDE-HPLC-DAD

ZHANG Min-min<sup>1,2</sup>, LIU Dai-cheng<sup>1</sup>, WANG Dai-jie<sup>2</sup>, GENG Yan-ling<sup>2</sup>, WANG Xiao<sup>2</sup>, ZHAO Heng-qiang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Science, Shandong Normal University; <sup>2</sup> Key Laboratory of Shandong TCM

Quality Control Technology, Shandong Analysis and Test Center, Process Control Research Center of

Traditional Chinese Medicine of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

**Abstract:** In this study, a comprehensive method was established to analyze and characterize the chemical ingredients in a new variety of *Lonicera japonica* by SPME-GC/MS coupled with HPLC-DAD. The volatile oils of the investigated sample were determined by GC/MS. Other organic acids, flavonoids and iridoids were analyzed by HSDE-HPLC-DAD. As a result, 54 volatile oils were detected. In addition, the contents of four organic acids (chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C), two flavonoids (rutin and galuteolin) and two iridoids (loganic acid and chiratin) were determined. This study proposed a method for the comprehensively and systematically evaluation of germplasm by determining the 4 types of main ingredients in *L. japonica*. It will provide scientific basis for the popularization and further utility of *L. japonica*.

**Key words:** GC/MS; HPLC-DAD; *Lonicera japonica*; volatile oil; organic acid; flavonoid; iridoid

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。作为我国传统中药, 具有悠久的临床应用历史。其味甘、性寒, 具有清热解毒、疏散风热的功能, 中医临床上常用于治疗痈肿疔、热毒血痢、风热感冒、温病发热等症<sup>[1]</sup>。金银花种质资源丰富, 在全国各省几乎均有种植。山

东作为金银花主要道地产区, 不但植有传统的道地品种, 亦在不断引进新品种以扩充其种质资源<sup>[2]</sup>。目前, 对当地种质资源的扩充是一个重要的研究方向。本实验所研究的金银花是源于美国的一个金银花品种, 该品种适应性强, 花期较长, 可持续开放到十月份, 避免了药材集中大量上市引起的弊端。因此该品种金银花化学成分分析及主要化学成分的含量测定, 对于阐明其质量现状, 指导后续临床应用和种质资源的扩充具有重要意义。

现代研究表明, 金银花中主要含有有机酸类、黄

收稿日期: 2016-05-05 接受日期: 2016-06-21

基金项目: 国家自然科学基金(81473298); 山东省攻关计划(2014GSF119031); 山东省自然科学基金(ZR2013HL029); 山东省科学院青年基金(2014-5)

\* 通讯作者 Tel: 86-531-82605319; E-mail: hqzhao2007@163.com

酮类、环烯醚萜苷类、皂苷类和挥发油等多种化学成分<sup>[3]</sup>,具有抗病毒、抗炎、抗氧化等作用<sup>[4-10]</sup>。2015版《中国药典》一部中以绿原酸和木犀草苷的含量作为金银花的质量评价指标。但鉴于金银花化学成分复杂,仅通过两个指标的含量测定对金银花进行质量评价具有很大的局限性。因此,本实验采用 SPME-GC/MS 对该品种金银花和其叶片的挥发油成分进行测定。同时,运用高剪切分散乳化技术(HSDE)<sup>[11,12]</sup>进行提取结合 HPLC-DAD 技术测定了花和叶片中的四种有机酸(绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C)、两种黄酮(芦丁、木犀草苷)、两种环烯醚萜苷(马钱酸、当药苷)等八种成分。以期对该金银花新品种质量进行较系统全面的评价,为开发利用金银花新资源提供技术和数据支持。

## 1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),Agilent 6890N 气相色谱仪(美国安捷伦公司),Agilent 5973N 质谱仪(美国安捷伦公司);万分之一电子分析天平(SARTORIUS BSA);SB-5200D 型高功率数控超声波仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);FA25-186 高剪切分散乳化机(上海弗鲁克流体机械制造有限公司)。

对照品绿原酸(RA0426FA14),异绿原酸 A(批号: MUST-14071507),异绿原酸 C(批号: MUST-14111414),隐绿原酸(批号: MUST-15011413),木犀草苷(批号: MUST-15012204),芦丁(批号: Y22S6S3719),马钱酸(批号: MUST-15012207),当药苷(批号: KA0809RA14)购于上海源叶生物科技有限公司(纯度均大于 98%)。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。金银花(从美国引进新品种)采自山东亚特生态技术有限公司金银花种质资源库繁育基地(山东临沂),经山东省分析测试中心王晓研究员鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.,分别取其花与叶进行分析检测。

## 2 实验方法

### 2.1 样品前处理

#### 2.1.1 样品干燥

精密称定金银花的花和叶的鲜样各 1.0 g,置于恒温干燥箱中 35 °C 干燥至恒重,平行 6 次。鲜花样干燥后重量为 0.262 g,鲜叶样干燥后重量为 0.213 g。

#### 2.1.2 固相微萃取条件

将固相微萃取装置的萃取头插入 Agilent 6890N 气相色谱的进样口,240 °C 老化 20 min,载气量 1.0 mL/min。取金银花的黄花和叶的鲜样各 3.0 g,剪碎后分别加入到 15 mL 的顶空瓶中,密封后置于 80 °C 水浴中 70 min 进行静态吸附。萃取头需置于气相色谱仪进样口 240 °C 进行解吸 3 min,采集数据。

#### 2.1.3 高剪切分散乳化提取条件

分别精密称定金银花的花和叶的鲜样 1.0 g,加甲醇 10 mL,60 °C 水浴 10 min 后加入 5 mL 纯水,采用高剪切分散乳化机 1300 rpm 提取 1 min。提取液过 0.22 μm 滤膜,备用。

### 2.2 对照品溶液制备

精密称定绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、隐绿原酸、芦丁、木犀草苷、马钱酸和当药苷对照品各 1.0 mg,加甲醇(木犀草苷用 70% 乙醇)配制成浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液备用。

### 2.3 GC-MS 分析条件

Agilent 6890N 气相色谱仪,HP-5MS(30 m × 250 μm × 0.25 μm)石英毛细管柱。载气:氦气(99.999%),流速 1.0 mL/min,进样口温度 240 °C,进样方式为不分流进样。程序升温条件:50 °C(保留 3 min),5 °C/min-130 °C(保留 6 min),5 °C/min-220 °C(保留 15 min)。Agilent 5973N 质谱仪,EI 电离,离子源温度:240 °C,70 eV 电子电量,灯丝发射电流 200 μA,扫描质量范围为 30 ~ 500 aMu。

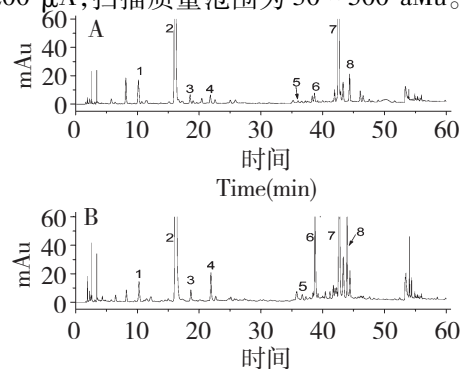


图 1 金银花新品种花(A)及叶片(B)鲜样提取物的 HPLC 色谱图( $\lambda = 240 \text{ nm}$ )

Fig. 1 HPLC chromatograms of fresh samples of *L. japonica* flower (A) and leaf (B)

注:1 马钱酸;2 绿原酸;3 隐绿原酸;4 当药苷;5 芦丁;6 木犀草苷;7 异绿原酸 A;8 异绿原酸 C

Note:1 loganic acid;2 chlorogenic acid;3 cryptochlorogenic acid;4 chiratin;5 rutin;6 galuteolin;7 isochlorogenic acid A;8 isochlorogenic acid C

## 2.4 HPLC 分析条件

Agilent 1260 液相色谱仪, Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 μm) 柱。流动相: 乙腈-0.2% 甲酸水, 梯度洗脱: T (min): 0-10-20-30-40-50-51-61, 乙腈 (%): 8-10-15-15-25-30-100-100; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长: 240 nm, 320 nm。金银花鲜样提取物的 HPLC 色谱图见图 1。

## 3 结果与讨论

### 3.1 花和叶中的挥发性成分组成特点

将待测样品按照 2.1.2 固相微萃取条件进行处理后按 2.3 GC-MS 条件进样分析。GC-MS 结果见表 1。

表 1 金银花花和叶中的挥发性物质

Table 1 Volatile oils in flowers and leaves of *L. japonica*

| 编号<br>No.       | 成分<br>Compounds   | 分子量<br>Molecular weight | 相对质量分数<br>Relative content (%) |           |
|-----------------|---|-------------------------|--------------------------------|-----------|
|                 |   |                         | 花<br>Flower                    | 叶<br>Leaf |
| 烃类 Hydrocarbons |   |                         |                                |           |
| 1               | 蒎烷 <i>cis</i> -Pinane   | 138.14                  | 0.4                            | —         |
| 2               | 二十烷 Eicosane  | 282.55                  | 0.77                           | —         |
| 3               | 正二十一烷 Heneicosane   | 296.57                  | 0.34                           | —         |
| 4               | 二十四烷 Eicosane   | 338.65                  | 1.89                           | 0.36      |
| 5               | 正二十七烷 Heptacosane   | 380.44                  | 9.18                           | 1.50      |
| 6               | 二十八烷 Octacosane   | 394.77                  | 1.03                           | 0.51      |
| 7               | 正二十九烷 Nonacosane  | 408.47                  | 26.80                          | 19.67     |
| 8               | 正三十烷 Triacontane  | 422.82                  | 0.72                           | 0.86      |
| 9               | 正三十一烷 Hentriacontane  | 436.50                  | 13.30                          | 20.78     |
| 10              | 正三十二烷 Dotriacontane   | 450.87                  | —                              | 0.35      |
| 11              | 正三十三烷 Tritriacontane  | 464.53                  | 2.95                           | 4.00      |
| 总计 Total        |   |                         |                                |           |
| 醇类 Alcohols     |   |                         | 57.38                          | 48.03     |
| 12              | (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-(-)-2,3-丁二醇 ( <i>R,R</i> )-2,3-Butanediol | 90.07                   | 0.19                           | —         |
| 13              | 苯甲醇 Benzyl alcohol  | 108.06                  | —                              | 0.10      |
| 14              | 10-十九醇 10-Nonadecanol   | 284.31                  | 6.64                           | 27.12     |
| 15              | ( <i>Z</i> )-8-十二烯-1-醇 ( <i>Z</i> )-8-Dodecen-1-ol                  | 184.18                  | 0.15                           | —         |
| 总计 Total        |   |                         |                                |           |
| 酯类 Esters       |   |                         | 6.98                           | 27.22     |
| 16              | 甘油单乙酸酯 Monoacetin   | 134.06                  | 0.08                           | —         |
| 17              | 二氢猕猴桃内酯 Dihydroactinolide   | 180.12                  | 0.06                           | 0.52      |
| 18              | 苯甲酸苯酯 Benzyl benzoate   | 212.08                  | 0.13                           | —         |
| 19              | 棕榈酸甲酯 Methyl hexadecanoate  | 270.26                  | 0.10                           | 0.90      |
| 20              | 棕榈酸乙酯 Acid methyl ester   | 284.27                  | 0.21                           | —         |
| 21              | 亚油酸甲酯 Methyl linoleate  | 294.26                  | —                              | 0.26      |
| 22              | 亚麻酸甲酯 Methyl linolenate   | 292.24                  | 0.12                           | 0.81      |
| 23              | 亚油酸乙酯 Ethyl linoleate   | 308.27                  | 0.15                           | —         |
| 24              | 亚麻酸乙酯 Ethyl linoleate   | 306.26                  | 0.16                           | —         |
| 25              | 二十二烷酸甲酯 Docosanoic acid, methyl ester                               | 354.35                  | 1.20                           | —         |

| 编号<br>No.                         | 成分<br>Compounds  | 分子量<br>Molecular weight | 相对质量分数<br>Relative content (%) |           |
|-----------------------------------|--|-------------------------|--------------------------------|-----------|
|                                   |  |                         | 花<br>Flower                    | 叶<br>Leaf |
| 26                                | 硬脂酸己酯 Octadecanoic acid, hexyl ester                   | 368.37                  | 1.24                           | -         |
| 27                                | 木蜡酸甲酯 Tetracosanoic acid, methyl ester                 | 382.38                  | 6.80                           | -         |
| 28                                | 十八烷酸辛酯 Octadecanoic acid, octyl ester                  | 396.4                   | 0.66                           | -         |
| 29                                | 二十六酸甲酯 Hexacosanoic acid, methyl ester                 | 410.41                  | 1.12                           | -         |
| 总计 Total                          |  |                         |                                |           |
| 萜类 Terpenoids                     |  |                         | 12.03                          | 2.49      |
| 30                                | $\alpha$ -姜黄烯 $\alpha$ -Curcumene                      | 202.17                  | -                              | 0.12      |
| 31                                | 植醇 Phytol  | 296.31                  | 0.65                           | 9.64      |
| 32                                | $\alpha$ -香树脂醇 $\alpha$ -Amyrin                        | 426.39                  | 0.35                           | -         |
| 总计 Total                          |  |                         |                                |           |
| 酸类 Acids                          |  |                         | 1.0                            | 9.76      |
| 33                                | 己酸 Hexanoic acid                                       | 116.08                  | 0.17                           | 0.22      |
| 34                                | 十六碳二烯酸 1,15-Hexadecadiene                              | 222.24                  | 0.06                           | -         |
| 35                                | 肉豆蔻酸 Tetradecanoic acid                                | 228.21                  | -                              | 0.34      |
| 总计 Total                          |  |                         |                                |           |
| 甾醇类 Sterols                       |  |                         | 0.23                           | 0.56      |
| 36                                | 菜油甾醇 Campesterol                                       | 400.37                  | 2.46                           | 0.77      |
| 37                                | 豆甾醇 Stigmasterol                                       | 412.37                  | 2.40                           | -         |
| 38                                | $\gamma$ -谷甾醇 $\gamma$ -Sitosterol                     | 414.39                  | 5.70                           | 1.64      |
| 总计 Total                          |  |                         |                                |           |
| 醛、酮、醚类<br>Aldehyde, ketone, ether |  |                         | 10.56                          | 2.41      |
| 39                                | ( <i>E,E</i> )-2,4-庚二烯醛 ( <i>E,E</i> )-2,4-Heptadienal | 110.07                  | 0.08                           | -         |
| 40                                | 十二醛 Dodecyl aldehyde                                   | 184.18                  | 0.03                           | -         |
| 41                                | 反式-2,4-癸二烯醛 ( <i>E,E</i> )-2,4-Decadien-1-al           | 152.12                  | 0.08                           | -         |
| 42                                | 异丁香酚甲醚 Methyl isoeugenol                               | 178.10                  | -                              | 0.36      |
| 43                                | 植酮 Fitone  | 268.28                  | 0.13                           | 0.5       |
| 44                                | 十七烷酮 2-Heptadecanone                                   | 254.26                  | 0.42                           | -         |
| 总计 Total                          |  |                         |                                |           |
| 其它 Others                         |  |                         | 0.74                           | 0.86      |
| 45                                | 2-巯基苯并噻唑 2-Mercaptobenzothiazole                       | 166.99                  | 0.44                           | -         |
| 46                                | 2,5,8-三甲基-1-萘酚 2,3-Dehydro-1,8-cineole                 | 152.12                  | -                              | 0.14      |
| 47                                | 维生素 E Vitamin E  | 430.38                  | 1.27                           | -         |
| 48                                | 3-Dodecene   | 168.19                  | 0.03                           | -         |
| 49                                | (ethenylthio)-Cyclohexane                              | 142.08                  | 0.02                           | -         |
| 50                                | 4-Vinylcyclohexene dioxide                             | 140.08                  | 0.04                           | -         |
| 51                                | 7Z,10Z,13Z-Hexadecatrienal                             | 234.20                  | 0.10                           | -         |
| 52                                | [2R,4R,6R,(-)]-2,4,6-Trimethylnonanoic                 | 214.19                  | -                              | 0.12      |
| 53                                | 1,4-Eicosadiene  | 278.30                  | 0.12                           | -         |
| 54                                | Cyclotriacontane                                       | 420.47                  | 0.43                           | -         |
| 总计 Total                          |  |                         | 2.35                           | 0.26      |

根据文献报道,金银花不同部位中挥发性成分含量不同<sup>[13]</sup>。本实验同时测定了金银花鲜样的花和叶中的挥发性成分。由表 1 可知,花中共鉴定出 46 个色谱峰化合物,占总峰面积的 91.27%。主要为正二十九烷,占 26.8%。其中烃类 57.38%,醇类 6.98%,酯类 12.03%,萜类 1.0%,酸类 0.23%,甾醇类 10.56%,酮、醛、醚类 0.74%,其他 2.35%。叶中共鉴定出 24 个化合物,占总峰面积的 91.59%。主要挥发性物质为 10-十九醇,占 27.12%。其中烃类 48.03%,醇类 27.22%,酯类 2.49%,萜类 9.76%,酸类 0.56%,甾醇类 2.41%,酮、醛、醚类 0.86%,其他 0.26%。结果表明,该品种金银花的花和叶中的挥发油成分和含量差别极大,但都以烃类为主。

### 3.2 HPLC 条件优化

研究表明,金银花鲜样提取物中化学成分复杂多样<sup>[14]</sup>,化合物极性整体较强,故采用洗脱范围较广的乙腈-水作为流动相对金银花提取物进行洗脱。另外,本实验考察比较了 Agilent TC-C<sub>18</sub> (4.6 × 250 nm, 5 μm) 柱, Agilent SB-C<sub>18</sub> (4.6 × 250 nm, 5 μm) 柱, Agilent XDB-C<sub>18</sub> (4.6 × 250 nm, 5 μm) 柱以及 symmetry (4.6 × 250 nm, 5 μm) 柱共四个不同类型 C<sub>18</sub> 柱对金银花提取物的分离效果,结果发现,采用

symmetry (4.6 × 250 nm, 5 μm) 柱时分离度较好、色谱峰较多。因此,选用 symmetry C<sub>18</sub> (4.6 × 250 nm, 5 μm) 柱对提取物进行色谱分离分析。由于金银花中有机酸类含量较高,易造成色谱峰拖尾现象,考虑在流动相中加入酸来改善分离度及峰型。考察了水相中分别加入 0.1% 甲酸、0.2% 甲酸和 0.4% 甲酸,对金银花提取物色谱分离的影响,结果发现水相中加入 0.2% 甲酸时色谱峰对称性较好、峰型尖锐。另外,先后调节柱温箱温度在 20、25 °C 和 30 °C 时比较得出,当柱温为 25 °C 时,色谱峰分离度和峰型较好。在波长选择上,鉴于本实验同时测定有机酸、黄酮、环烯醚萜苷三类共八种化合物含量。综合这八种化合物的紫外吸收特征波长,确定在 240 nm 下测定四个有机酸和两个环烯醚萜苷含量,在 320 nm 下测定两个黄酮含量。

### 3.3 HPLC 分析方法学考察

#### 3.3.1 线性关系考察

分别精密吸取八种对照品溶液适量,分别稀释得到六个浓度的对照品混合溶液,按照“2.4”项下色谱条件进样分析。以峰面积积分值(Y)对质量浓度(X)进行回归计算,各成分的回归方程、相关系数、线性范围、检测限、信噪比见表 2。

表 2 样品回归方程、检出限和定量限

Table 2 Regression equations, limit of detection and limit of quantitation

| 峰号<br>Peaks | 化合物<br>Compound              | 回归方程<br>Calibration curve | 相关系数<br>R <sup>2</sup> | 线性范围<br>Linear range (μg) | 检测限<br>Limit of detection (μg/mL) | 定量限<br>Limit of quantification (μg/mL) |
|-------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--|
| 1           | 马钱酸 Loganic acid             | Y = 13.009x + 34.322      | 0.9997                 | 0.03 ~ 1.25               | 0.006                             | 0.020                                  |
| 2           | 绿原酸 Chlorogenic acid         | Y = 28.196x + 693.81      | 0.9993                 | 0.13 ~ 12.5               | 0.005                             | 0.015                                  |
| 3           | 隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid  | Y = 28.006x - 3.2622      | 0.9999                 | 0.01-0.63                 | 0.003                             | 0.010                                  |
| 4           | 当药昔 Chiratin                 | Y = 16.923x + 2.7221      | 0.9999                 | 0.01 ~ 0.63               | 0.002                             | 0.007                                  |
| 5           | 芦丁 Rutin                     | Y = 11.807x - 1.6634      | 0.9999                 | 0.01 ~ 0.26               | 0.010                             | 0.033                                  |
| 6           | 木犀草昔 Galuteolin              | Y = 18.938x + 1.8497      | 0.9999                 | 0.01 ~ 0.63               | 0.017                             | 0.057                                  |
| 7           | 异绿原酸 A Isochlorogenic acid A | Y = 24.793x + 1851.7      | 0.9990                 | 0.13 ~ 12.50              | 0.028                             | 0.093                                  |
| 8           | 异绿原酸 C Isochlorogenic acid C | Y = 42.783x - 6.3165      | 0.9999                 | 0.01 ~ 1.00               | 0.024                             | 0.079                                  |

#### 3.3.2 精密度实验

取同一批次金银花鲜样提取液,按“2.4”项下色谱条件连续进样 6 次,分别测出选定的八种化合物的峰面积和保留时间,计算出各个化合物的峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)。八种化合物峰面积 RSD 分别为 1.93%、2.35%、1.07%、

3.70%、4.21%、1.97%、2.17%、2.08%;保留时间的 RSD 分别为 0.34%、0.16%、0.14%、0.11%、0.13%、0.09%、0.07%、0.06%,说明仪器精密度良好。

#### 3.3.3 重复性实验

精密称定同一金银花鲜样 6 份,分别用均质机提取后进样分析,经过计算得到 8 个特征化合物峰

面积的 RSD 分别为 2.40%、2.90%、3.37%、2.04%、3.89%、3.06%、3.20%、3.28%；保留时间的 RSD 分别为 0.76%、0.45%、0.37%、0.34%、0.33%、0.15%、0.10%、0.06%，说明该方法的重现性较好。

### 3.3.4 稳定性实验

取同一待测样分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 进样分析,检测和计算得到 8 个化合物峰面积的 RSD 分别为 4.29%、3.14%、2.25%、2.27%、2.52%、1.87%、2.07%、2.48%；保留时间的 RSD 分别为 0.39%、0.14%、0.11%、0.08%、0.09%、0.07%、0.04%、0.04%。由于其保留时间的 RSD 均小于 1%，峰面积的相 RSD 均小于 5%，说明该样的化学性质在 24 h 内较稳定。

### 3.3.5 加标回收率

精密称取金银花鲜样六分,每份 1.0 g,分别精密称定加入马钱酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 标准品适量,按上述供试品溶液制备方法处理后进样分析。其平均回收率分别为:99.32%、100.44%、98.75%、99.01%、98.96%、98.02%、98.19%、100.08%,相对标准偏差分别为:2.45%、2.01%、1.98%、2.19%、1.87%、1.99%、2.33%、2.97%。

### 3.4 花和叶中主要化学成分含量测定

将金银花样品之花和叶的鲜样处理后分别进样分析,得出各化合物的相应峰面积,根据上面得出的回归方程算出各化合物的含量,平行三次取平均值,结果见表 3。

表 3 含量测定结果( $n=3$ )

Table 3 Content determination results of eight compounds( $n=3$ )

| 化合物<br>Compounds             | 含量 Content (mg/g) |              |
|------------------------------|-------------------|--------------|
|                              | 花 Flower          | 叶 Leaf       |
| 马钱酸 Loganic acid             | 0.40 ± 0.080      | 0.23 ± 0.04  |
| 绿原酸 Chlorogenic acid         | 4.17 ± 0.32       | 8.51 ± 0.68  |
| 隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid  | 0.08 ± 0.01       | 0.10 ± 0.02  |
| 当药苷 Chiratin                 | 0.08 ± 0.01       | 0.48 ± 0.05  |
| 芦丁 Rutin                     | 0.03 ± 0.00       | 0.09 ± 0.00  |
| 木犀草苷 Galuteolin              | 0.07 ± 0.00       | 1.48 ± 0.10  |
| 异绿原酸 A Isochlorogenic acid A | 3.22 ± 0.20       | 2.76 ± 0.17  |
| 异绿原酸 C Isochlorogenic acid C | 0.13 ± 0.02       | 0.14 ± 0.03  |
| 总和 Total                     | 8.11 ± 0.080      | 13.79 ± 0.14 |

金银花品种繁多,多项研究表明:不同种类,不同产地的金银花中的化合物含量差别较大<sup>[15,16]</sup>。

高剪切分散乳化技术(HSDE)是通过定子与转子之间形成狭窄的剪切空间、强烈的机械撞击和液层摩擦而实现快速提取功能的。与传统的提取方式相比,HSDE 具有耗能少、耗时短、省溶剂以及高提取率的优势。采用 HSDE 技术作为进行 HPLC 测定的样品前处理方式可以大大地提高含量测定的准确度和灵敏度。

由表 3 中数据可以看出该品种花鲜样中绿原酸含量最高,为 4.17 mg/g,芦丁含量最低,为 0.03 mg/g,八种化合物总含量为 8.11 mg/g。叶鲜样中绿原酸含量最高,为 8.51 mg/g,芦丁含量最低,为 0.09 mg/g,八种化合物总含量为 13.79 mg/g。

另外,通过样品干燥处理测得的该金银花品种

的花和叶的干燥比分别为 0.262 和 0.213,经过干燥比换算得出以干重计,这八种化合物在花中的含量为:马钱酸 0.040%,绿原酸 0.417%,隐绿原酸 0.008%,当药苷 0.008%,芦丁 0.003%,木犀草苷 0.007%,异绿原酸 A 0.322%,异绿原酸 C 0.013%;在叶中的含量为:马钱酸 0.108%,绿原酸 3.995%,隐绿原酸 0.047%,当药苷 0.225%,芦丁 0.042%,木犀草苷 0.695%,异绿原酸 A 1.296%,异绿原酸 C 0.066%。

### 3.5 不同品种不同部位含量差异比较

不同品种金银花的挥发油成分和含量均不相同。本品种金银花挥发油成分与山东主流品种相比,花中烃类与酯类含量均高于普通忍冬的含烃类约 19% 和酯类约 9%,而萜类含量较主流品种的含萜类约 30% 低,叶中醇类含量远低于主流品种约

80%的醇类含量<sup>[17,18]</sup>。其余八种化合物含量也存在品种差异。本品种中这八种化合物的含量与山东道地金银花品种<sup>[19-21]</sup>比较可知:该品种的花中绿原酸与木犀草苷含量较低,其余成分含量差别不大,但该品种花和叶之间各成分含量的差别较大,叶中的绿原酸、当药苷、芦丁、木犀草苷含量分别为花中的9.58倍、28.13倍、14.00倍、99.29倍。并且叶中绿原酸和木犀草苷含量分别是药典中这两种指标含量的2.66倍和13.9倍。说明该品种金银花的叶也可作为一个药用来源。

## 4 结论

本研究运用 SPME-GC/MS 联合 HSDE-HPLC-DAD 法对新品种金银花花和叶化学成分进行了系统的分析测定。定性测定出 54 种挥发性物质,定量测定出四种有机酸、两种黄酮、两种环烯醚萜苷共八个重要化学成分的含量。研究表明,该品种金银花中所含挥发性成分种类较多,八种主要化学成分含量与山东道地产区较为接近,尤其是叶片中活性成分含量较高,具有较好开发价值。本研究为开发利用新品种金银花资源提供了技术和数据支持。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 221.
- 2 Zhou FQ (周凤琴), Li J (李佳), Ran R (冉蓉), et al. Investigate on the germplasm resources for main produce area of *Flos Lonicerae*. *Chin Med J Res Prac* (现代中药研究与实践), 2010, 24: 21-24.
- 3 Li XQ, Sun XH, 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. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44: 895-904.
- 4 Su XP (苏香萍), Song BW (宋必卫), Chen ZH (陈振华), et al. Study on the volatile oil of *Flos lonicerae* by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and its anti-inflammatory activity. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 663-666.
- 5 Yang X (杨欣), Li HB (李洪波), Chen C (陈诚), et al. Herbal medicinal textual research on efficacy of *Lonicerae japonicae flos*. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 220-222.
- 6 Li W (李伟), Wang BC (王伯初), Yang X (杨宪). Sim-

- ultaneous determination of three flavonoids of *Lonicera japonica* using HF-LPME-UHPLC-MS. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 217-220.
- 7 Xie XB (谢碧秀), Sun ZD (孙智达). Progress of researches on the main organic acids in *Honeysuckle*. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2007, 23: 93-97.
- 8 Ma SC (马双成), Liu Y (刘燕), Bi PX (毕培曦), et al. Antiviral activities of flavonoids isolated from *Lonicera japonica* Thunb. *J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26: 426-430.
- 9 Ma SC (马双成), Liu Y (刘燕), Bi PX (毕培曦), et al. Antiviral activities of iridoids isolated from *Lonicera japonica* Thunb. *J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26: 1039-1042.
- 10 Fan XL (范兴丽), Wang H (王鸿), Shen XD (沈香娣), et al. Observation on antibacterial effect in vitro of two kinds of plant volatile oil. *Chin J Disinf* (中国消毒学杂志), 2012, 29: 663-665.
- 11 Zhang ZX (张振兴), Liu YF (刘永峰), Liu Y (刘毅), et al. A novel high-speed shear dispersing emulsification pretreatment method for the extraction of active ingredients of *Olea europaea* L. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1555-1561.
- 12 Hua JN (滑聚娜), Feng ZF (冯祖飞), Liu YF (刘永峰), et al. Extraction kinetics research of flavonoids from *Radix astragalii* based on high shear dispersing emulsifier. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2012, 40: 752-756.
- 13 Wang JM (王金梅), Ji ZQ (姬志强), Kang WY (康文艺). The volatile oil from different parts of *Lonicera japonica* Thunb. *Fine Chem* (精细化工), 2008, 25: 1075-1078.
- 14 Fan L, Lin CH, Duan WJ, et al. Rapid and quantitative determination of 10 major active components in *Lonicera japonica* Thunb. by ultrahigh pressure extraction-HPLC/DAD. *High Press Res*, 2015, 35: 57-68.
- 15 Shi FH (师凤华), Zhao XS (赵祥升), Mo QC (莫乔程), et al. Determination of chlorogenic acid and luteoside in *Lonicerae flos* of different habitats and germplasms. *Chin Pharm J* (中药材), 2014, 37: 1145-1148.
- 16 Xin H (辛华), Feng J (丰杰), Cheng RM (程若敏), et al. Simultaneous determination of chlorogenic acid and galuteolin in *Honeysuckle*. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17: 60-63.
- 17 Zhang L (张玲), Peng GF (彭广芳), Yu ZY (于宗渊), et al. The chemical constituents of essential oils in *Lonicera japonica* Thunb. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1994, 25: 184-187.