

山银花油 GC-MS 及 LC-MS 的全成分表征及 体外抗炎和抗氧化活性研究

刘恃君,陆玉爱,李利,汤杨黔南,林丽美,谢明霞*,夏伯候*

湖南中医药大学药学院 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室,长沙 410208

摘要:山银花是一种有价值的药用资源,但其油的化学成分和生物活性尚未深入研究。本文通过气相色谱-质谱仪联用法(GC-MS)及超高效液相色谱-高分辨质谱联用(UHPLC-QE-MS)对超临界CO₂萃取法得到的山银花油进行系统的化学成分表征,并探讨其体外抗氧化及细胞抗炎能力等生物活性。GC-MS共鉴别出66种化合物,主要为脂肪酸类、甾醇类和烷烃类化合物。UHPLC-QE-MS在正负离子模式下分别鉴别出83和71种化合物,主要为萜类、黄酮类等化合物。抗氧化结果表明山银花油清除ABTS自由基能力呈良好的剂量依赖性,DPPH自由基的IC₅₀值为3.49 mg/mL。同时抗炎实验表明山银花油可显著抑制脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞(RAW 264.7)炎症因子IL-6($P < 0.05$)和NO($P < 0.05$)的释放,发挥抗炎作用。以上结果表明,山银花油化学成分复杂多样,是一种具有较优抗炎作用的天然活性来源,且在食品医药中有较好的开发和应用价值。

关键词:山银花;挥发油;GC-MS;LC-MS;生物活性

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)11-1842-15

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.11.002

Systematic chemical characterization of Lonicerae Flos oil by GC-MS and LC-MS and their *in vitro* anti-inflammatory and antioxidant activities

LIU Shi-Jun, LU Yu-ai, LI Li, TANG Yang-qian-nan, LIN Li-mei, XIE Ming-xia*, XIA Bo-hou*

Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, College of Pharmacy,
Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Lonicerae Flos is a valuable medicinal resource, but the chemical composition and biological activity of its oil have not been studied in depth. In this study, the Lonicerae Flos oil was prepared by supercritical CO₂ extraction method. A systematic characterization of chemical components was performed based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC-QE-MS). Its biological activities such as anti-inflammatory and antioxidant activities *in vitro* were also studied. The GC-MS results based on non-methylation and methyl esterification methods indicated a total of 66 chemicals and the main compounds were fatty acids, sterols, and alkanes. UHPLC-QE-MS identified 83 and 71 compounds in positive and negative ion modes, respectively, mainly including terpenoids and flavonoids. Moreover, antioxidant activity analysis indicated that the ability of Lonicerae Flos oil to scavenge ABTS free radical has a good dose-dependent, and the IC₅₀ of Lonicerae Flos oil involved in the DPPH free radical scavenging assay was 3.49 mg/mL. Meanwhile, the anti-inflammatory test showed that oil can significantly inhibit the expression of IL-6 ($P < 0.05$) and NO ($P < 0.05$) levels in RAW 264.7 cells induced by LPS. These results show that the Lonicerae Flos oil is a natural active source with good anti-inflammatory and antioxidant activities, and it has good development and application value in Food and medicine.

Key words: Lonicerae Flos; essential oil; GC-MS; LC-MS; biological activity

收稿日期:2023-03-27 接受日期:2023-08-15

基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2017YFC1701900);湖南省自然科学基金(2022JJ50008);长沙市科技计划(kq2004054);湖南中医药大学中药学一流学科(2018-3)

*通信作者 Tel:86-731-88458230;E-mail:xiemingxia0618@163.com, xiabohou@163.com

山银花为忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.、华南忍冬 *Lonicera confuse* DC. 或黄褐毛忍冬 *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng 的干燥花蕾或带初开的花^[1]。山银花主要用于治疗外感风热或流行性热病的早期感染、疮、痈、疖和肿等细菌和病毒诱导的以热、红、痛和肿为主的炎症过程^[2]。山银花是中成药维 C 银翘片、感冒止咳糖浆和复方大青叶合剂等大品种的主要组成药物。此外,山银花还经常被用作生产各种保健品的原料,如茶和酒等。

大量植物化学研究表明山银花中含有黄酮类化合物、有机酸、环烯醚萜、皂苷和油^[3,4]。然而,对其油的化学成分和生物活性进行深度研究的文献较少。从研究方法上可得,报道文献主要采用气质联用(GC-MS)及顶空固相萃取结合气质联用(HS-SPME-GC-MS)技术。从提取方法上可得,主要采用的是超声、微波、索氏提取及水蒸气蒸馏等^[5,6]。从提取方法的广度看,CO₂超临界提取得到油的研究较少。从检测方法的全面性看,缺少油中中等极性物质的检测。此外,山银花油具有较好的生物活性,值得进一步的开发研究^[7]。

因此,本研究以山银花油为研究对象,应用 CO₂超临界萃取得到山银花油;通过甲酯化及非甲酯化结合 GC-MS 分析油中的挥发性及小极性成分;通过超高效液相色谱-质谱联用(UHPLC-QE-MS)结合标准品谱库鉴定油中的中等极性成分。以期全面解析山银花的化学成分。同时,本研究采用体外抗氧化方法和体外细胞抗炎试验评估山银花油的抗氧化及抗炎活性,为其进一步的开发利用提供科学指导。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

HL-2L-50-IIIIB 超临界流体二氧化碳萃取装置(杭州华赛泵业设备有限公司);GCMS-QP2020NX 气相色谱质谱联用仪(日本 Shimadzu 公司);1290 UHPLC 超高效液相(美国 Agilent 公司);Q Exactive Focus 高分辨质谱(Thermo Fisher Scientific);EnSpire 多功能酶标仪(美国哲成科技有限公司);BEH C₁₈ 色谱柱(美国沃特世公司)。

小鼠巨噬细胞 RAW 264.7(中国科学院上海细胞库);阳性药物地塞米松(DXMS,批号:D8040,北京索莱宝科技有限公司);胎牛血清(批号:27250-018,美国 Hyclone 公司);MTT(批号:1003010349, Sigma 公司);脂多糖(LPS,批号:12171104, Sigma 公

司);小鼠白细胞介素 6 高敏 ELISA 试剂盒(批号:MU30044,武汉贝茵莱生物科技有限公司);NO Griess 试剂盒(批号:202003,碧云天生物技术研究所);ABTS 试剂盒(批号:070319191112,上海碧云天生物技术有限公司);C₁₀~C₄₀偶数碳正构烷烃(Sigma 公司);二甲基亚砜(DMSO,分析纯,纯度≥99.9%,Sigma 公司);其他试剂均为分析纯。

山银花药材购自长沙市高桥药材市场,经湖南中医药大学药学院王智老师鉴定为忍冬科忍冬属植物华南忍冬 *Lonicera confuse* DC. 的干燥花蕾。标本存放于湖南中医药大学湘产大宗重点实验室(编号 20210416)。

1.2 精油提取

山银花药材打粉,真空干燥后过 60 目筛,将干粉置于超临界流体萃取设备中。萃取釜温度为 45 °C,萃取压力为 25 MPa;分离釜 1 的温度为 50 °C,萃取压力为 5 MPa;分离釜 2 的温度为 55 °C,萃取压力为 5 MPa。提取时间为 3 h,获得油,将油样品置于 50 mL 离心管并存放于-20 °C 的冰箱中备用。

1.3 GC-MS 分析

1.3.1 非甲酯化前处理及分析

精密称取 12 mg 油样品,用正己烷定容至 10 mL 容量瓶,并用 0.22 μm 微孔过滤器过滤混合物。同时取 C₁₀~C₄₀正构烷烃标准品适量,待 GC-MS 检测。

GC 条件:石英毛细管色谱柱 Rtx-5MS 色谱柱(30m × 250 μm, 0.25 μm);载气:氦气(纯度为 99.99%);载气流速:0.76 mL/min;载气压力:57.4 kPa;进样口温度:270 °C;温度程序为:初始温度 120 °C,2 min;120~220 °C,20 °C/min;220~250 °C,3 °C/min;250~300 °C,2 °C/min,10 min;进样量:1 μL;分流比:20:1。

MS 条件:电子电离源:70 eV;离子源温度:200 °C;接口温度:280 °C;溶剂延迟时间:5 min;质谱扫描范围:35~700 m/z。

1.3.2 甲酯化前处理及分析

精密称取 200 mg 油样品,加入 2 mL 2 mol/L KOH-CH₃OH,10 mL 正庚烷,在漩涡震荡仪上以 1 500 r/min 震荡 2 min,静置分层,取上清液用 0.22 μm 微孔过滤器过滤;样品溶液待 GC-MS 进样分析。同时取 C₁₀~C₄₀偶数碳正构烷烃混标适量,待 GC-MS 检测。

GC 条件:石英毛细管色谱柱 Rtx-5MS 色谱柱(30 m × 250 μm, 0.25 μm);载气:氦气(纯度为 99.99%);载气流速:0.76 mL/min;载气压力:57.4

kPa;进样口温度:270 °C;温度程序为:初始温度 120 °C, 2 min;120 ~ 220 °C, 10 °C/min;220 ~ 224 °C, 1 °C/min;224 ~ 258 °C, 10 °C/min;258 ~ 282 °C, 3 °C/min;282 ~ 300 °C, 1 °C/min, 10 min;进样量:1 μL;分流比:40:1。

MS 条件:电子电离源:70 eV;离子源温度:200 °C;接口温度:280 °C;溶剂延迟时间:5 min;质谱扫描范围:35 ~ 700 *m/z*。

两种处理方式均在全扫描(Scan)检测模式下进行样品分析,记录总离子流图。大多数成分根据 Vanden Dool 和 Kratz 线性程序升温原理的保留指数原理,利用公式求得各成分的保留指数(retention index)并与 NIST 17 质谱库中检索得到的保留指数进行比对,从而对油成分进行定性分析,最后通过峰面积归一法计算各组分的相对含量。

1.4 LC-MS 分析

精密称取 10 mg 山银花油,加 500 μL 甲醇,在漩涡震荡仪上震荡 1 min,冰水浴超声 1 h, -40 °C 静置 1 h 后将样本 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液待 LC-MS 进样分析检测。

LC 条件:色谱柱为 BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 μm × 2.1 × 100 mm);流动相:0.1% 甲酸乙腈溶液(A) 0.1% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 3.5 min, 95% ~ 85% B; 3.5 ~ 6 min, 85% ~ 70% B; 6 ~ 6.5 min, 70% B; 6.5 ~ 12 min, 70% ~ 30% B; 12 ~ 12.5 min, 30% B; 12.5 ~ 18 min, 30% ~ 0% B; 18 ~ 25 min, 0% B; 25 ~ 26 min, 0% ~ 95% B; 26 ~ 30 min, 95% B);流速 0.4 mL/min,进样体积 5 μL。

MS 条件:扫描质量范围为 *m/z* 100 ~ 1 500,鞘气流速 45 Arb,辅助气流速 15 Arb,毛细管温度 400 °C, Full MS 分辨率:70 000, MS/MS 分辨率:17 500,在 NCE 模式下,轰击能量:15/30/45 eV,喷射电压:4.0 kV(正离子模式)或 -3.6 kV(负离子模式)。

Q Exactive Focus 质谱仪能够在控制软件(Xcalibur, Thermo Fisher Scientific)控制下基于 FullScan-ddMS² 功能进行一级、二级质谱数据采集。将获得的质谱原始数据转换成 mzML 格式,再对保留时间的峰矫正和峰积分、峰识别、峰对齐等提取工作,基于自建数据库 MWDB(Metware Database)及代谢物信息公共数据库对物质进行筛选和鉴定。

1.5 抗氧化活性的测定

1.5.1 ABTS 自由基清除

按照试剂盒操作说明,并在参考文献^[8]的方法上稍作修改,将山银花油溶液配制成浓度为(0.5、

1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mg/mL)的供试品溶液,其他溶液按照试剂盒操作说明。在 96 孔板样品检测孔内加入各浓度样品 10 μL/孔再加入 ABTS 工作液 200 μL/孔,平行 3 份;样品空白孔加入各浓度样品 10 μL/孔再加入工作液溶剂 80% 乙醇 200 μL/孔;空白对照孔中加入 DMSO 10 μL/孔和 80% 乙醇 200 μL/孔。阳性对照孔加入标准品溶液 10 μL/孔和 80% 乙醇 200 μL/孔;轻轻混匀,室温孵育 6 min 后测定其在 405 nm 处吸光度;以 Trolox 为阳性对照。样品抗氧化结果以 Trolox 当量(mmol/g)表示。

1.5.2 DPPH 自由基清除

在参考文献^[9,10]的方法上稍作修改,用 DMSO 试剂配制 DPPH 成 0.1 mg/mL 的溶液,并配制成不同浓度的山银花油溶液(1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、9.0 mg/mL),分别将不同浓度的山银花油溶液与 DPPH 溶液按 1:1(100 μL:100 μL)比例加至 96 孔板中,避光反应 30 min,测吸光度 A₁(515 nm)。用等体积 DMSO 分别替代 DPPH 溶液和山银花油溶液,测得的吸光度分别为 A₂ 和 A₀。每份样品平行操作 3 次,取算术平均值,计算半数抑制率 IC₅₀ 值。按公式(1)计算清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

1.6 抗炎实验

1.6.1 细胞培养及分组

将 RAW 264.7 细胞用含有 10% 的胎牛血清和 1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 完全培养基培养,放于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中。实验分为:空白对照组;DMSO 组(0.2%);模型组(1 μg/mL LPS);DXMS 组(50 μg/mL);山银花油低、中、高剂量组(30、40、50 μg/mL);不同药物浓度及溶剂组孵育 2 h 后,再加入终浓度为 1 μg/mL 的 LPS,继续培养。

1.6.2 RAW 264.7 细胞毒性实验

将细胞分为两组种板操作同上述,山银花组各孔加入含有不同浓度(0、20、30、40、50、60、70、80 μg/mL)山银花油完全培养液 100 μL,第一组不加 LPS 处理,第二组孵育 2 h 后加入终浓度为 1 μg/mL 的 LPS,空白组与溶剂组加入等体积溶剂。药物每组 4 个复孔,培养 24 h 后,吸去上清,每孔加入 100 μL MTT(0.5 mg/mL),继续培养 4 h,弃培养液,加入 150 μL DMSO,震荡、混匀 10 min 后于酶标仪 490 nm 波长下测吸光度,分别计算两组细胞的存活率。

1.6.3 炎症因子 IL-6、NO 含量检测

上清液收集:取小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞接种于 48 孔培养板中,细胞密度为 2 × 10⁴ 个/mL,每孔

200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养过夜后, 弃培养液, 加入无血清 DMEM 培养基同步化 24 h。山银花油低、中、高剂量完全培养液 200 μL , 设置 4 个复孔; 阳性药物组加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DXMS, 除空白对照组外其余各组孵育 2 h 后加入 200 μL LPS 使得终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 空白组加入等体积无血 DMEM。孵育 24 h 后收集各孔上清液 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 用于炎症因子检测。

炎症因子测定: 按照 ELISA 与 Griess 试剂盒说明书操作检测细胞培养液中 IL-6、NO 的含量, 每组设置 4 个复孔, 根据标准曲线计算各组浓度。

1.7 统计学分析

应用 Graphpad prism 8.0 和 SPSS 22.0 统计学软件处理数据及分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各指标组间比较采用单因素方差分析,

$P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 GC-MS 分析山银花油的化学成分

采用超临界 CO_2 萃取法提取山银花油, 其得率为 1.75%。GC-MS 结果显示, 山银花油通过非甲酯化(见图 1A)和甲酯化(见图 1B)分别鉴定出 29 和 39 种化合物。其中, 非甲酯化处理得到的化合物占总油的 51.91% (见表 1)。主要成分为 γ -谷甾醇(8.12%)、角鲨烷(7.28%)、天然维生素 E(2.87%)、豆甾醇(2.41%)和 2-单棕榈酸甘油(1.99%)等。由于沸点比较高, 不容易气化及分离的物质在甲酯化后更容易被鉴别, 通过甲酯化鉴定的化合物占总油的 75.88% (见表 1)。主要成分包括油酸乙酯(18.92%)、棕榈酸甲酯(7.78%)、角鲨烷(6.29%)、 γ -谷甾醇(5.98%)和亚油酸甲酯(5.76%)等。

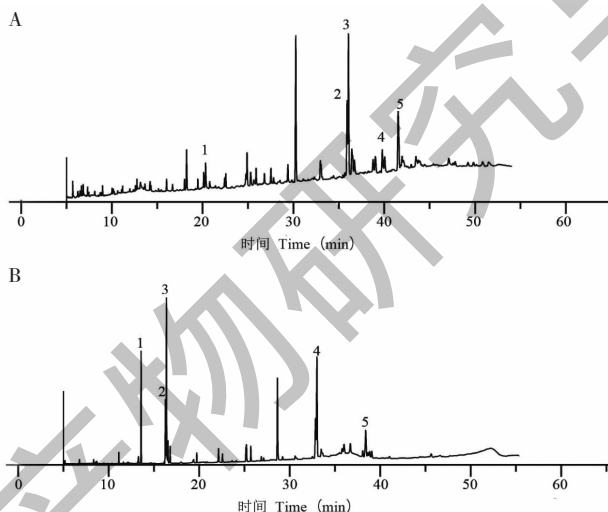


图 1 非甲酯化处理(A)和甲酯化处理(B)的山银花油 GC-MS 离子流图

Fig. 1 GC-MS ion flow diagrams of non-methyl esterified (A) and methyl esterified (B) Lonicerae Flos oil

注: (A) 1: 2-单棕榈酸甘油; 2: 角鲨烷; 3: 维生素 E; 4: 豆甾醇; 5: γ -谷甾醇; (B) 1: 棕榈酸甲酯; 2: 亚油酸甲酯; 3: 油酸乙酯; 4: 角鲨烷; 5: γ -谷甾醇。Note: (A) 1: 2-Palmitoylglycerol; 2: Squalene; 3: Vitamin E; 4: Stigmasterol; 5: γ -Sitosterol; (B) 1: Methyl palmitate; 2: Methyl linoleate; 3: Ethyl oleate; 4: Squalene; 5: γ -Sitosterol.

表 1 山银花油 GC-MS 化学成分

Table 1 GC-MS chemical constituents of Lonicerae Flos oil

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	t_R (min)	相对含量 Content (%)		保留指数 Retention index	
				非甲酯化 Non methyl esterification	甲酯化 Methyl esterification	计算值 Calculated value	参考值 Reference value
1	反式肉桂醛 Cinnamic aldehyde	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}$	5.176	-	0.23	1 270	1 271.3
2	α -蒎烯 α -Copaene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	5.685	0.49	-	1 388	1 376.2
3	正十四烷 Tetradecane	$\text{C}_{14}\text{H}_{30}$	5.729	0.13	-	1 398	1 413

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	t_R (min)	相对含量 Content(%)		保留指数 Retention index	
				非甲酯化 Non methyl esterification	甲酯化 Methyl esterification	计算值 Calculated value	参考值 Reference value
4	γ -依兰烯 γ -Ylangene	$C_{15}H_{24}$	6.527	0.05	-	1 497	1 476.2
5	2,6,10-三甲基十三烷 2,6,10-Trimethyldecane	$C_{16}H_{34}$	6.562	0.05	-	1 502	1 419
6	α -衣兰油烯 α -Murolene	$C_{15}H_{24}$	6.695	0.21	-	1 519	1 498.3
7	α -蒎烯 α -Copaene	$C_{15}H_{24}$	6.768	-	0.29	1 388	1 376.2
8	Δ -杜松烯 (+)- δ -Cadinene	$C_{15}H_{24}$	6.840	0.37	-	1 537	1 523.9
9	顺-菖蒲烯 <i>cis</i> -Calamenene	$C_{15}H_{22}$	6.886	0.13	-	1 543	1 537
10	对苯二甲酸二甲酯 Dimethyl terephthalate	$C_{10}H_{10}O_4$	8.342	-	0.28	1 504	1 440
11	α -衣兰油烯 α -Murolene	$C_{15}H_{24}$	8.445	-	0.12	1 530	1 498.3
12	月桂酸甲酯 Methyl laurate	$C_{13}H_{26}O_2$	8.582	-	0.12	1 522	1 580
13	Δ -杜松烯 (+)- δ -Cadinene	$C_{15}H_{24}$	8.702	-	0.14	1 530	1 523.2
14	Mintsulphide	$C_{15}H_{24}S$	8.810	0.13	-	1 778	*
15	顺-7,10-十八(碳)二烯酸 (7Z,10Z)-Octadecadienoic acid	$C_{16}H_{28}O$	9.423	-	0.05	1 584	1 537
16	十七烷酮 2-Heptadecanone	$C_{17}H_{34}O$	10.015	0.26	-	1 892	1 903.3
17	棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	$C_{17}H_{34}O_2$	10.246	0.13	-	1 913	1 924.2
18	棕榈酸 Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	10.638	0.09	-	1 948	1 968.4
19	棕榈酸乙酯 Ethyl palmitate	$C_{18}H_{36}O_2$	11.065	0.16	-	1 986	1 991.5
20	五甲基呋喃溴酸酯 Methyl myristate	$C_{15}H_{30}O_2$	11.126	-	0.62	1 722	1 723.3
21	正二十烷 Tetradecane	$C_{20}H_{42}$	11.179	0.25	-	1 996	2 109
22	顺式-十八烷酸甲酯 Methyl 6-octadecenoate	$C_{19}H_{36}O_2$	12.121	-	0.08	1 818	-2 099
23	十六醛 1-Hexadecanal	$C_{16}H_{32}O$	12.252	-	0.06	1 814	1 816.5
24	十五烷酸甲酯 Methylpentadecanoate	$C_{16}H_{32}O_2$	12.310	-	0.05	1 818	1 779
25	十九醇 1-Nonadecanol	$C_{19}H_{40}O$	12.367	0.09	-	2 075	-2 150
26	植酮 Hexahydrofarnesyl acetone	$C_{18}H_{36}O$	12.540	-	0.08	1 892	1 844.4
27	叶绿醇 Phytol	$C_{20}H_{40}O$	12.759	0.52	-	2 101	2 116.4
28	亚油酸 Linoleic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	13.143	0.37	-	2 128	2 128.9
29	7,10,13-十六碳三烯酸甲酯 7,10,13-Hexadecatrienoic acid methyl ester	$C_{17}H_{28}O_2$	13.230	-	0.17	1 887	1 902
30	十七烷酮 2-Heptadecanone	$C_{17}H_{34}O$	13.292	-	0.64	1 892	1 903.4
31	棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	$C_{17}H_{34}O_2$	13.591	-	7.78	1 914	1 924.2
32	十八烯酸乙酯 Ethyl oleate	$C_{20}H_{38}O_2$	13.637	0.26	-	2 159	2 241
33	二十八烷基醋酸酯	$C_{30}H_{60}O_2$	14.310	0.27	-	2 203	*
34	十七烷酸甲酯 Methyl heptadecanoate	$C_{18}H_{36}O_2$	15.077	-	0.13	2 021	1 978
35	十九烷醇 1-Nonadecanol	$C_{19}H_{40}O$	16.125	-	0.13	2 101	2 153
36	亚油酸甲酯 Methyl linoleate	$C_{19}H_{34}O_2$	16.275	-	5.76	2 101	2 091.1
37	油酸乙酯 Ethyl oleate	$C_{20}H_{38}O_2$	16.395	-	16.49	2 100	2 185
38	反-9-十八碳烯酸甲酯 Methyl (9E)-9-octadecenoate	$C_{19}H_{36}O_2$	16.471	-	0.55	2 101	2 085
39	植物醇 Phytol	$C_{20}H_{40}O$	16.556	-	1.9	2 111	2 116.4

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	t_R (min)	相对含量 Content(%)		保留指数 Retention index	
				非甲酯化 Non methyl esterification	甲酯化 Methyl esterification	计算值 Calculated value	参考值 Reference value
40	十八碳酸甲酯 Methyl stearate	$C_{19}H_{38}O_2$	16.802	-	1.32	2 101	2 126.7
41	2-单棕榈酸甘油 2-Palmitoylglycerol	$C_{19}H_{38}O_4$	20.306	1.99	-	2 501	2 498
42	二十七烷醇 1-Heptacosanol	$C_{27}H_{56}O$	22.054	-	0.13	2 494	2 491
43	亚麻酸甲酯 Methyl linolenate	$C_{19}H_{32}O_2$	22.263	-	0.09	2 493	2 475
44	二十三酸甲酯 Methyl tricosanoate	$C_{24}H_{48}O_2$	24.096	-	0.13	2 625	2 574
45	单硬脂酸甘油酯 Monostearin	$C_{21}H_{42}O_4$	25.291	1.29	-	2 709	2 697
46	木蜡酸甲酯 Methyl lignocerate	$C_{25}H_{50}O_2$	25.710	-	1.52	2 724	2 674
47	角鲨烯 Squalene	$C_{30}H_{50}$	27.129	-	0.32	2 810	-2 847
48	反式角鲨烯 <i>trans</i> -Squalene	$C_{30}H_{50}$	27.817	0.44	-	2 807	2 914
49	二十六烷酸甲酯 Hexacosanoic acid methyl ester	$C_{27}H_{54}O_2$	29.227	-	0.41	2 923	2 872
50	二十九烷酮 Methyl nonacosanoate	$C_{29}H_{58}O$	32.518	-	0.25	3 092	3 040
51	角鲨烷 Squalene	$C_{30}H_{62}$	32.846	-	6.29	3 099	2 914
52	二十八酸甲酯 Octacosanoic acid methyl ester	$C_{29}H_{58}O_2$	33.603	-	0.72	3 124	3 071
53	10-二十九酮	$C_{29}H_{58}O$	35.450	0.3	-	3 080	3 044
54	2-苯乙基-二十二烷酸甲酯 Methyl behenate	$C_{30}H_{52}O_2$	35.673	0.45	-	3 088	3 032
55	异岩藻甾醇 Fucosterol	$C_{29}H_{48}O$	35.816	-	1.04	3 214	3 203
56	角鲨烯 Squalene	$C_{30}H_{62}$	35.905	7.28	-	3 096	-3 441
57	22-二氢菜子甾醇 22-Dihydrobrassicasterol	$C_{28}H_{48}O$	36.019	-	2.03	3 221	3 214
58	天然维生素 E Vitamin E	$C_{20}H_{38}O_2$	36.427	2.87	-	3 114	3 149
59	豆甾醇 Stigmasterol	$C_{30}H_{60}O_2$	36.713	-	1.93	3 245	3 239
60	γ -谷甾醇 γ -Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	38.404	-	5.98	3 303	-3 324
61	燕麦甾醇 Avenasterol	$C_{29}H_{48}O$	38.847	-	1.21	3 318	*
62	三十酸甲酯 Methyl melissate	$C_{31}H_{62}O_2$	39.070	-	1.2	3 326	3 270
63	豆甾醇 Stigmasterol	$C_{29}H_{48}O$	39.775	2.41	-	3 232	3 239
64	α -香树脂醇 α -Amyrin	$C_{30}H_{50}O$	41.018	-	0.33	3 393	-3 376
65	γ -谷甾醇 γ -Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	41.535	8.12	-	3 293	-3 324
66	三十二烷酸甲酯 Methyl triacylate	$C_{33}H_{66}O_2$	45.633	-	0.72	3 526	3 469

注: * 未检出。Note: * Note detected.

2.2 LC-MS 分析山银花油的化学成分

为了进一步研究油中的化学成分,用 UHPLC-QE-MS 对山银花油中化学成分进行分析。山银花油在正离子模式下的离子流图见图 2A,根据提供的准确分子质量和数据库提供的信息匹配后检测到 83 个化合物(见表 2),其中包括 37 个萜类、9 个香

豆素及其衍生物类、6 个苯丙素类、5 个生物碱类、4 个黄酮类等(见图 3A)14 类化合物。在负离子模式下的离子流图见图 2B,根据提供的准确分子质量和数据库提供的信息匹配后检测到 71 个化合物(见表 3),其中包括 21 个萜类、12 个黄酮类、7 个脂肪酸类、7 个酚类、5 个苯丙素类等(见图 3B)16 类化合物。

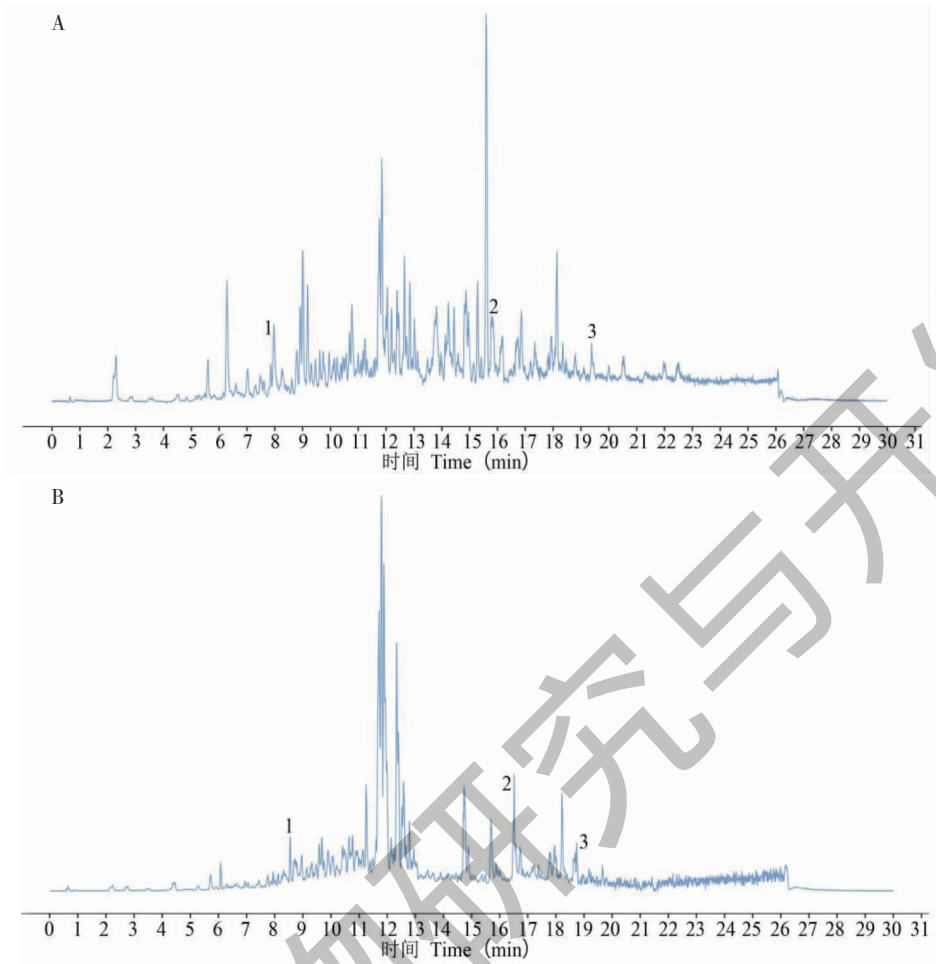


图2 山银花油 UHPLC-QE-MS 正离子(A)和负离子(B)模式离子流图

Fig. 2 UHPLC-QE-MS ion flow diagrams of Lonicerae Flos oil in the positive (A) and negative (B) ion mode

注:(A)1:柚皮素;2:熊果酮酸;3:维生素D₂; (B)1:柚皮苷;2:巴西苏木素;3:阿魏酸。Note:(A) 1:Naringenin;2:Ursolic acid;3:Vitamin D₂; (B) 1:Naringin;2:Brazilin;3:Ferulic acid.

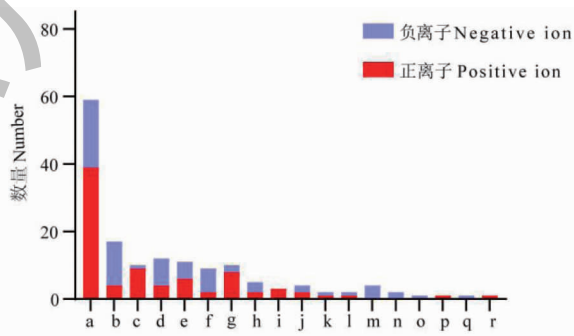


图3 UHPLC-QE-MS 正负离子模式山银花油全成分分类统计图

Fig. 3 UHPLC-QE-MS full component classification statistical chart of Lonicerae Flos oil in the positive and negative ion mode

注:a:萜类;b:黄酮类;c:香豆素及其衍生物类;d:酚类;e:苯丙素类;f:脂肪酸类;g:其他类;h:脂肪酰类;i:生物碱;j:氨基酸衍生物;k:酚醚类;l:酚酸类;m:有机酸及其衍生物;n:木脂素类;o:糖类多酮类;p:酯类;q:糖类及其衍生物;r:糖苷类。Note:a:Terpenoids;b:Flavonoids;c: Coumarins and derivatives;d:Phenols;e:Phenylpropanoids;f:Fatty acids;g:Others;h:Fatty Acyls;i:Alkaloids;j:Amino acid derivatives;k:Phenol ethers;l:Phenolic acids;m:Organic acids and derivatives;n:Lignans;o:Phenylpropanoids and polyketides;p:Esters;q:Carbohydrates and derivatives; r:Glycosides.

表 2 UHPLC-QE-MS 正离子模式山银花油成分分析

Table 2 Composition analysis of Lonicerae Flos oil by UHPLC-QE-MS in positive ion mode

序号 No.	分类 Classification	t_R (min)	分子量 Molecular mass (m/z)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	二级匹配度 Secondary matching degree (%)
1	生物碱 Alkaloids	29.38	124.04	$C_6H_5NO_2$	烟酸 Nicotinic acid	100
2		6.69	295.19	$C_{19}H_{22}N_2O$	辛可宁 Cinchonine	100
3		0.88	123.06	$C_6H_6N_2O$	烟酰胺 Nicotinamide	99
4	氨基酸衍生物 Amino acid derivatives	0.64	118.09	$C_5H_{11}NO_2$	<i>L</i> -缬氨酸 <i>L</i> -Valine	95
5		9.65	247.13	$C_{15}H_{18}O_3$	去乙酰氧基母芥素 Leucodin	97
6	糖苷类 Glycosides	8.74	265.14	$C_{10}H_{17}NO_6$	菜豆苷 Linamarin	90
7	香豆素及其衍生物类 Coumarins and derivatives	14.19	203.03	$C_{11}H_6O_4$	佛手柑醇 4-Hydroxyfuro[3,2-g]chromen-7-one	100
8		5.29	223.06	$C_{11}H_{10}O_5$	白蜡树精 Fraxinol	100
9		13.69	163.04	$C_9H_6O_3$	7-羟基香豆素 7-Hydroxycoumarin	100
10		8.80	217.05	$C_{12}H_8O_4$	佛手柑内酯 5-Methoxypsoralen	99
11		6.28	147.04	$C_9H_6O_2$	香豆素 Coumarin	98
12		11.57	271.10	$C_{16}H_{14}O_4$	异欧前胡素 Isoimperatorin	98
13		9.49	203.03	$C_{11}H_6O_4$	香柑醇 Xanthoxol	98
14		6.61	261.11	$C_{15}H_{16}O_4$	异橙皮内酯 Isomeranzin	94
15		5.00	193.05	$C_{10}H_8O_4$	东莨菪内酯 Scopoletin	94
16	酯类 Esters	16.11	379.28	$C_{21}H_{40}O_4$	油酸甘油酯 Monoolein	99
17	脂肪酸类 Fatty acids	13.07	298.27	$C_{18}H_{32}O_2$	大枫子油酸 Chaulmoogric acid	94
18		6.74	211.13	$C_{12}H_{18}O_3$	(±)-茉莉酸 (+/-)-Jasmonic acid	91
19		12.19	279.23	$C_{18}H_{30}O_2$	亚麻子油酸 Linolenic acid	98
20		15.82	281.25	$C_{18}H_{32}O_2$	亚油酸 Linoleic acid	97
21	黄酮类 Flavonoids	7.92	273.08	$C_{15}H_{12}O_5$	柚皮素 Naringenin	100
22		8.14	301.07	$C_{16}H_{12}O_6$	山奈素 Kaempferide	97
23		6.18	303.09	$C_{16}H_{14}O_6$	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3,5-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydrochromen-4-one	93
24		12.56	209.10	$C_{15}H_{12}O$	反-查耳酮 Chalcone	93
25	其他类 Other	2.12	245.10	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	生物素 Biotin	95
26		13.14	149.02	$C_8H_4O_3$	苯酐 Phthalic anhydride	100
27		13.88	375.25	$C_{21}H_{36}O_4$	甘油亚麻酸酯 Glyceryl linolenate	100
28		15.00	307.26	$C_{20}H_{34}O_2$	亚麻酸乙酯 Linolenic acid ethyl ester	100
29		11.95	435.27	$C_6H_6O_3$	5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural	95
30		17.92	391.28	$C_{25}H_{38}O_6$	[(2 <i>R</i>)-2-[(<i>E</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4,6-Dimethyloct-6-en-2-yl]-6-oxo-2,3-dihydropyran-3-yl](2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>S</i>)-8-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methylocta-2,4-dienoate	94
31		4.73	211.14	$C_{24}H_{38}O_4$	邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 Dis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	93
32		0.87	127.04	$C_{11}H_{18}N_2O_2$	环(脯氨酸-亮氨酸)二肽 Cyclo(leucylprolyl)	92
33	酚醚类 Phenol ethers	26.09	152.07	$C_8H_9NO_2$	对乙酰氨基苯酚 Paracetamol	91
34		8.98	375.29	$C_{24}H_{38}O_3$	银杏酸 C17:1 Ginkgolic acid C17:1	99
35	酚类 Phenols	8.13	391.14	$C_{20}H_{22}O_8$	虎杖甙 Polydatin	100
36		3.63	123.04	$C_7H_6O_2$	间羟苯甲醛 3-Hydroxybenzaldehyde	99

续表 2 (Continued Tab. 2)

序号 No.	分类 Classification	t_R (min)	分子量 Molecular mass (m/z)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	二级匹配度 Secondary matching degree (%)
37	酚类 Phenols	5.21	301.13	$C_{14}H_{20}O_7$	红景天苷 Rhodioloside	98
38		10.85	151.11	$C_{10}H_{14}O$	百里酚 Thymol	91
39	苯丙素类 Phenylpropanoids	15.91	133.06	C_9H_8O	肉桂醛 Cinnamaldehyde	99
40		5.10	195.07	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸 Ferulic acid	98
41		11.35	245.12	$C_{15}H_{16}O_3$	蛇床子素 Osthole	96
42		10.14	425.14	$C_{22}H_{26}O_6$	桉脂素 Eudesmin	94
43		5.83	179.07	$C_{10}H_{10}O_3$	松柏醛 Coniferyl aldehyde	91
44		9.17	299.07	$C_{15}H_{16}O_4$	6-Methoxy-7-(3-methylbut-2-enoxy) chromen-2-one	90
45	萜类 Terpenoids	7.27	133.10	$C_{10}H_{14}O$	4-异丙基苯甲醇 4-Isopropylbenzyl alcohol	95
46		21.97	135.12	$C_{10}H_{16}O$	香芹酚 Carveol	93
47		8.53	266.17	$C_{15}H_{20}O_3$	小白菊内酯 Parthenolide	99
48		13.83	219.17	$C_{15}H_{22}O$	吉马酮 Germacrone	98
49		12.48	231.14	$C_{15}H_{18}O_2$	苍术内酯 I Atractylenolide I	97
50		11.58	233.15	$C_{15}H_{20}O_2$	苍术内酯 II Atractylenolide II	96
51		7.00	287.13	$C_{15}H_{20}O_4$	脱落酸 Abscisic acid	93
52		8.07	291.14	$C_{15}H_{24}O_3$	莜术隆二醇 3,8-Dihydroxy-3,8-dimethyl-5-propan-2-ylidene-1,2,3a,4,7,8a-hexahydroazulen-6-one	100
53		11.10	334.24	$C_{20}H_{28}O_3$	9-Hydroxy-1,4a-dimethyl-7-propan-2-yl-2,3,4,9,10,10a-hexahydrophenanthrene-1-carboxylic acid	100
54		15.14	387.25	$C_{24}H_{34}O_4$	蟾毒灵 Bufalin	100
55		11.23	391.24	$C_{23}H_{34}O_5$	杠柳昔元 Periplogenin	100
56		13.03	405.26	$C_{24}H_{36}O_5$	洛伐他汀 Lovastatin	99
57		14.95	457.37	$C_{30}H_{48}O_3$	(1S,2R,4aS,6aS,6bR,10S,12aR)-10-Hydroxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-1H-picene-4a-carboxylic acid	99
58		16.44	529.35	$C_{32}H_{48}O_6$	泽泻醇 C-23-醋酸酯 Alisol C 23-acetate	99
59		11.57	219.17	$C_{15}H_{22}O$	α -香附酮 α -Cyperone	99
60		12.94	344.26	$C_{22}H_{33}NO_2$	雪上一枝蒿甲素 Bullatine A	98
61		13.02	317.21	$C_{20}H_{28}O_3$	咖啡油醇 Cafestol	98
62		11.32	335.22	$C_{20}H_{30}O_4$	去氧穿心莲内酯 Deoxyandrographolide	98
63		19.85	397.35	$C_{28}H_{44}O$	维生素 D2 Vitamin D2	97
64		11.18	231.14	$C_{15}H_{18}O_2$	乌药醇 Lindenol	97
65		12.61	409.29	$C_{24}H_{40}O_5$	胆酸 Cholic acid	97
66		15.85	455.35	$C_{30}H_{46}O_3$	熊果酮酸 Ursonic acid	97
67		13.61	409.29	$C_{24}H_{40}O_5$	别胆酸 Allocholic acid	96
68		15.60	320.26	$C_{20}H_{30}O_2$	(1R,7R)-7-Ethenyl-1,4a,7-trimethyl-3,4,4b,5,6,9,10,10a-octahydro-2H-phenanthrene-1-carboxylic acid	96
69		9.32	153.13	$C_{10}H_{16}O$	樟脑 Camphor	96
70		14.64	343.22	$C_{20}H_{32}O_3$	1-Naphthalenecarboxylic acid, decahydro-5-[(3Z)-5-hydroxy-3-methyl-3-penten-1-yl]-1,4a-dimethyl-6-methylene-	96
71		12.98	219.17	$C_{15}H_{22}O$	诺卡酮(+) - Nootkatone	95
72		16.13	443.39	$C_{30}H_{50}O_2$	桦木醇 Betulin	95

续表 2 (Continued Tab. 2)

序号 No.	分类 Classification	t_R (min)	分子量 Molecular mass (m/z)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	二级匹配度 Secondary matching degree (%)
73	萜类 Terpenoids	11.62	251.20	$C_{16}H_{26}O_2$	香紫苏内酯 Clareolide	95
74		7.49	275.16	$C_{15}H_{24}O_3$	2-Naphthaleneacetic acid, decahydro-8-hydroxy-4 α ,8-dimethyl- α -methylene-	94
75		14.44	303.23	$C_{20}H_{30}O_2$	(5 ξ ,9 ξ ,10 α)-Kaur-16-en-18-oic acid	94
76		17.08	399.29	$C_{24}H_{40}O_3$	石胆酸 Lithocholic acid	94
77		10.50	361.20	$C_{21}H_{28}O_5$	可的松 Cortisone	93
78		7.99	235.17	$C_{15}H_{22}O_2$	莪术醇 Curcumenol	92
79		5.59	197.12	$C_{11}H_{16}O_3$	黑麦草内酯 Loliolide	92
80		12.69	303.23	$C_{20}H_{30}O_2$	松香酸 Abietic acid	91
81		11.90	237.18	$C_{15}H_{24}O_2$	二氢青蒿酸 Dihydroartemisinic acid	91
82		8.25	251.16	$C_{15}H_{22}O_3$	甘松新酮 Nardosinone	91
83		12.43	347.22	$C_{21}H_{30}O_4$	肾上腺酮 Corticosterone	90

表 3 UHPLC-QE-MS 负离子模式山银花油成分分析

Table 3 Composition analysis of Lonicerae Flos oil by UHPLC-QE-MS in negative ion mode

序号 No.	分类 Classification	t_R (min)	分子量 Molecular mass (m/z)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	二级匹配度 Secondary matching degree (%)
1	氨基酸衍生物 Amino acid derivatives	26.55	174.96	$C_5H_8N_2O_5$	三七素 3-[(Carboxycarbonyl) amino]-L-alanine	98
2		26.32	128.04	$C_5H_7NO_3$	D-焦谷氨酸 5-Oxd-D-proline	100
3	糖类及其衍生物 Carbohydrates and derivatives	0.64	341.11	$C_{12}H_{22}O_{11}$	蔗糖 Sucrose	90
4	香豆素及其衍生物类 Coumarins and derivatives	10.28	269.08	$C_{16}H_{14}O_4$	异欧前胡素 Isoimperatorin	98
5	脂肪酸类 Fatty acids	14.13	255.23	$C_{12}H_{24}O_2$	月桂酸 Lauric acid	98
6		20.23	353.34	$C_{16}H_{32}O_2$	14-甲基十五烷酸 Isopalmitic acid	100
7		13.31	199.17	$C_{14}H_{28}O_2$	肉豆蔻酸 Myristic acid	93
8		19.21	325.31	$C_{18}H_{34}O_2$	油酸 Oleic acid	93
9		16.74	281.25	$C_{20}H_{40}O_2$	花生酸 Arachidic acid	90
10		15.04	227.20	$C_{21}H_{42}O_2$	二十一碳酸 Heneicosanoic acid	95
11		18.77	311.30	$C_{23}H_{46}O_2$	二十三碳酸 Tricosanoic acid	99
12	脂肪酰类 Fatty acyls	11.79	315.25	$C_{17}H_{34}O_2$	棕榈酸甲酯 Methyl hexadecanoate	99
13		14.39	255.23	$C_{16}H_{32}O_2$	棕榈酸 Palmitic acid	93
14		16.26	279.23	$C_{18}H_{32}O_2$	亚油酸 Linoleic acid	93
15	黄酮类 Flavonoids	15.53	353.14	$C_{21}H_{22}O_5$	异黄酮醇 Isoxanthohumol	91
16		9.79	285.08	$C_{27}H_{32}O_{14}$	柚皮苷 Naringin	93
17		7.58	269.08	$C_{16}H_{14}O_4$	异美迪紫檀素 Medicarpin	100
18		16.66	269.05	$C_{17}H_{14}O_7$	鸢尾甲黄素 B Iristectorigenin B	97
19		11.14	267.07	$C_{18}H_{16}O_8$	野鸢尾黄素 Irigenin	91

续表 3 (Continued Tab. 3)

序号 No.	分类 Classification	t_R (min)	分子量 Molecular mass (m/z)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	二级匹配度 Secondary matching degree (%)
20	黄酮类 Flavonoids	10.98	269.05	$C_{17}H_{14}O_6$	柳穿鱼黄素 Pectolarigenin	96
21		9.86	283.06	$C_{16}H_{14}O_5$	巴西苏木素 Brazilin	100
22		8.09	329.07	$C_{16}H_{12}O_5$	山槐素 Inermin	98
23		13.14	337.14	$C_{17}H_{14}O_6$	蒟黄素 Cirsimaritin	90
24		9.08	313.07	$C_{15}H_{10}O_5$	染料木素 Genistein	99
25		5.88	579.17	$C_{16}H_{12}O_4$	芒柄花黄素 Formononetin	100
26		8.18	359.08	$C_{20}H_{20}O_4$	补骨脂查耳酮 Bavachalcone	96
27		10.02	313.07	$C_{15}H_{10}O_5$	芹菜素 Apigenin	100
28	木脂素类 Lignans	13.86	265.12	$C_{18}H_{18}O_2$	和厚朴酚 Honokiol	93
29		9.83	265.12	$C_{18}H_{18}O_2$	厚朴酚 Magnolol	95
30	其他类 Others	4.61	403.12	$C_{17}H_{24}O_{11}$	Methyl (1 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,7 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> -hydroxy-7-(hydroxymethyl)-1-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-5,7 <i>a</i> -dihydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>c</i>]pyran-4-carboxylate	96
31		11.50	265.15	$C_{12}H_{26}O_4S$	十二烷基硫酸盐 Lauryl sulfate	94
32	有机酸及其衍生物 Organic acids and derivatives	26.09	115.00	$C_{16}H_{22}O_4$	邻苯二甲酸二正丁酯 Dis- <i>n</i> -butyl phthalate	94
33		13.20	343.08	$C_{18}H_{30}O_2$	γ -亚麻酸 γ -Linolenic acid	92
34		11.96	277.14	$C_{18}H_{16}O_7$	松萝酸 (+)-Usnicin	98
35		12.58	277.22	$C_4H_4O_4$	富马酸 Fumaric acid	100
36	酚醚类 Phenol ethers	4.73	150.06	$C_8H_9NO_2$	对乙酰氨基苯酚 Paracetamol	95
37		8.05	193.09	$C_{11}H_{14}O_3$	3-(4-氟苯氧基)哌啶盐酸盐 Isobutyl 4-hydroxybenzoate	96
38	酚类 Phenols	2.86	137.02	$C_7H_6O_3$	3-羟基苯甲酸 3-Hydroxybenzoic acid	90
39		3.53	121.03	$C_7H_6O_3$	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic acid	90
40		2.75	125.02	$C_6H_6O_3$	邻苯三酚 Pyrogallol	100
41		5.73	137.02	$C_7H_6O_2$	4-羟基苯甲醛 4-Hydroxybenzaldehyde	100
42		9.27	343.08	$C_7H_6O_3$	水杨酸 Salicylic acid	99
43		10.20	293.18	$C_6H_5NO_3$	对硝基苯酚 4-Nitrophenol	94
44		5.92	138.02	$C_{18}H_{16}O_7$	松萝酸 Usnic acid	96
45		0.32	137.02	$C_{17}H_{26}O_4$	6-姜酚 6-Gingerol	95
46	糖类多酮类 Phenylpropanoids and polyketides	4.83	195.06	$C_{10}H_{12}O_4$	磷酸异丙酯 Dihydroferulic acid	100
47	苯丙素类 Phenylpropanoids	16.57	355.16	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸 Ferulic acid	97
48		6.53	193.05	$C_{10}H_{10}O_4$	异阿魏酸 Isoferulic acid	98
49		4.99	193.05	$C_{20}H_{22}O_6$	罗汉松树脂酚 Matairesinol	93
50		8.04	357.13	$C_{14}H_{14}O_4$	二氢山芹醇 Columbianetin	91
51		11.00	245.08	$C_{21}H_{24}O_5$	芸香内酯 Rutamarin	99
52	萜类 Terpenoids	6.95	263.13	$C_{15}H_{20}O_4$	脱落酸 Abscisic acid	99
53		14.72	395.16	$C_{15}H_{22}O_3$	甘松新酮 Nardosinone	91
54		12.57	319.23	$C_{26}H_{43}NO_6$	甘氨酸 Glycocholic acid	94
55		12.23	233.15	$C_{26}H_{30}O_8$	柠檬苦素 Limonin	94

续表 3 (Continued Tab. 3)

序号 No.	分类 Classification	t_R (min)	分子量 Molecular mass (m/z)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	二级匹配度 Secondary matching degree (%)
56	萜类 Terpenoids	11.71	235.17	$C_{24}H_{40}O_5$	胆酸 Cholic acid	98
57		11.44	391.29	$C_{30}H_{48}O_4$	科罗索酸 Corosolic acid	94
58		9.93	407.28	$C_{24}H_{40}O_4$	去氧胆酸 Deoxycholic acid	98
59		13.62	749.45	$C_{31}H_{48}O_6$	夫西地酸 Fusidine	96
60		13.12	319.23	$C_{15}H_{24}O_2$	二氢青蒿酸 Dihydroartemisinic acid	99
61		11.57	515.34	$C_{15}H_{22}O_2$	(<i>E</i>)-5-(2,3-Dimethyl-4,5,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> -tricyclo [2.2.1.0 _{2,6}]heptan-3-yl)-2-methylpent-2-enoic acid	99
62		14.65	389.24	$C_{20}H_{32}O_3$	5-[(<i>Z</i>)-5-Hydroxy-3-methylpent-3-enyl]- 1,4a-Dimethyl-6-methylidene- 3,4,5,7,8,8a-hexahydro-2 <i>H</i> -naphthalene-1-carboxylic acid	99
63		14.62	301.22	$C_{20}H_{32}O_3$	(5 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-14-(Hydroxymethyl)-5,9-dimethyltricyclo [11.2.1.0 _{1,9}]hexadecane-5-carboxylic acid	97
64		13.62	513.36	$C_{41}H_{66}O_{12}$	白头翁皂苷 A3 Pulchrenoside A3	92
65		9.01	464.30	$C_{41}H_{66}O_{12}$	α -常春藤皂苷 α -Hederin	97
66		9.51	469.19	$C_{32}H_{50}O_5$	3- <i>O</i> -乙酰基-16 α -羟基-氢化松苓酸 3- <i>O</i> -Acetyl-16 α -hydroxytrametenolic acid	95
67		11.11	471.35	$C_{30}H_{46}O_4$	甘草次酸 Enoxolone	91
68		14.37	453.26	$C_{28}H_{40}O_6$	2,4,6-Trihydroxy-5-[1-(4-hydroxy-1,1,4,7-tetramethyl- 1a,2,3,4a,5,6,7a,7b-octahydrocyclopropa[<i>h</i>]azulen-7-yl)- 3-methylbutyl]benzene-1,3-dicarbaldehyde	93
69		13.24	749.45	$C_{20}H_{30}O_2$	松香酸 Abietic acid	96
70		8.92	249.15	$C_{23}H_{34}O_5$	地黄苷元 Digoxigenine	96
71		13.91	469.33	$C_{21}H_{28}O_5$	可的松 Cortisone	100

2.3 抗氧化活性

山银花油样品清除 ABTS 自由基能力的结果以 Trolox 当量 (mmol/g) 表示。结果可得 (见图 4A), 山银花油对 ABTS 的抗氧化能力存在一定的剂量关系, 随着油浓度的增加, Trolox 当量值越小, 表明其

抗氧化能力越强。同样的, 山银花油清除 DPPH 自由基能力的结果与 ABTS 具有较好的一致性, 呈现一定的剂量依赖性, 结果可得 (见图 4B), 其 IC_{50} 值为 3.49 mg/mL。

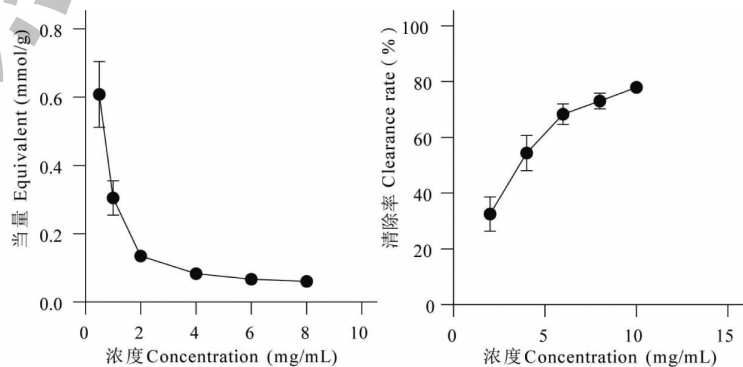


图 4 山银花油对 ABTS (A) 和 DPPH (B) 自由基清除能力

Fig. 4 The scavenging ability of Lonicerae Flos oil on ABTS (A) and DPPH (B) free radicals

2.4 抗炎活性

2.4.1 MTT 法测定药物对 RAW 264.7 细胞活性影响

山银花油对 RAW 264.7 细胞活力的影响见图 5, 与正常组比较, DMSO 溶剂组的细胞存活率无显著性差异 ($P < 0.05$), 可知 0.2% 的 DMSO 溶剂在提

高药物溶解度的同时对细胞无毒性, 药物浓度在 70 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的时候对细胞有一定的毒性, 在 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下浓度时, 给药浓度在安全范围内, 可以用于对细胞实验进行研究。

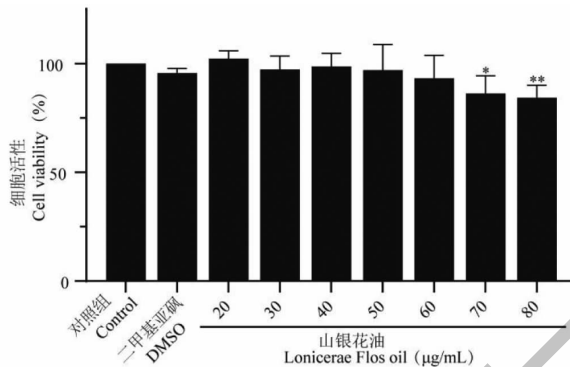


图 5 山银花油对 RAW 264.7 细胞活性影响

Fig. 5 Effect of Lonicerae Flos oil on the activity of RAW264.7 cells

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4.2 MTT 法测定药物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞活性影响

为了确保实验过程中药物溶液对于 LPS 引起的炎症反应作用不是由于其对细胞的毒性作用所致, 研究采用 MTT 检测不同浓度药物对细胞的存活

率的影响。山银花油对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞活力的影响见图 6, 实验结果显示, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 会促进细胞增殖, 给药后细胞增殖均受到不同的抑制, 但 20 ~ 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 仍然是安全浓度范围, 可用于后续炎症因子测定实验。

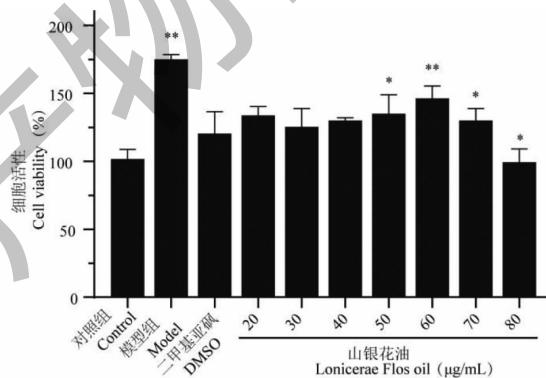


图 6 山银花油对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞活性影响

Fig. 6 Effect of Lonicerae Flos oil on the activity of LPS-induced RAW 264.7 cells

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4.3 药物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 和 IL-6 分泌的影响

Griess 法和 ELISA 检测山银花油对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞上清液中 NO 和 IL-6 含量的影响见图 7 图 8, 巨噬细胞经 LPS 刺激 24 h 后大量分泌 NO 和 IL-6, 与对照组相比, 模型组的 NO 和 IL-6 释

放量极显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 山银花油高、中、低剂量组均能显著抑制 NO 和 IL-6 的释放量 ($P < 0.01$), 且随着药物剂量的增加, 抑制率也相应增加, 均在高剂量组显示出最佳的抑制结果, 表明山银花油都可显著抑制炎症因子释放且呈现剂量依赖性。

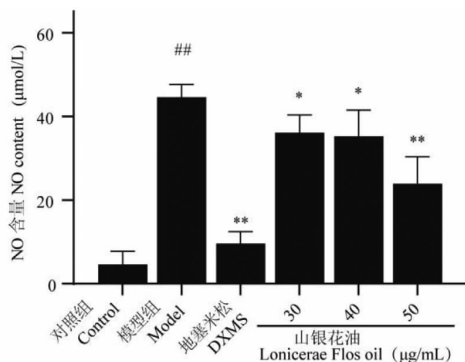


图7 山银花油对LPS刺激RAW 264.7细胞NO分泌的影响

Fig. 7 Effect of Lonicerae Flos oil on NO secretion in LPS-stimulated RAW 264.7 cell

注:与对照组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$;与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。Note: Compared with control, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with model, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

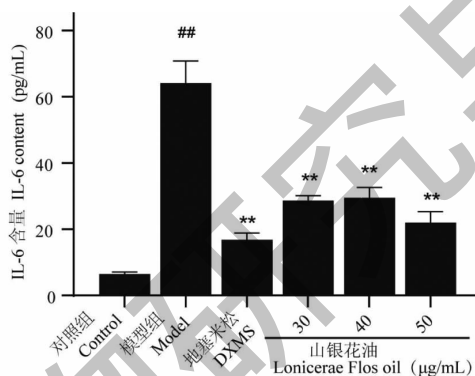


图8 山银花油对LPS刺激RAW 264.7细胞IL-6分泌的影响

Fig. 8 Effect of Lonicerae Flos oil on IL-6 secretion in LPS stimulated RAW 264.7 cells

注:与对照组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$;与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。Note: Compared with control, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with model, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

3 讨论与结论

本研究通过脂多糖(LPS)诱导的细胞炎症模型对山银花油进行体外抗炎和抗氧化活性评价,并基于GC-MS和UHPLC-QE-MS对山银花油进行全成分分析。本文中山银花油的提取采用了溶剂溶解性好,提取温度低,安全性极大,并能有效的预防药材中活性成分的氧化分解的超临界CO₂萃取法^[11]。通过GC-MS分析可知山银花油共鉴别出66种化合物,主要为脂肪酸类(棕榈酸甲酯、亚油酸甲酯等)、甾醇类(γ-谷甾醇、豆甾醇、等)及烷烃类(角鲨烷、正二十四烷等)化合物。研究表明,亚油酸等多不饱和脂肪酸能够抑制引起炎症的介质和细胞因子的致炎作用,缓解急性和慢性炎症相关疾病^[12];豆甾醇等甾醇类化合物可有效地延缓油脂脂质过氧化反应,抑制油脂酸价和过氧化值的升高,其抗氧化作用明显优于二丁基羟基甲苯(BHT)和维生素C^[13]。

通过UHPLC-QE-MS在正负离子模式下分别鉴别出142和83种化合物,主要有萜类、香豆素及其衍生物类、苯丙素类、生物碱类、黄酮类等化合物。据文献报道,维生素D2、熊果酮酸等萜类化合物能减少体内及体外的IL-6、TNF-α的表达发挥抗炎作用,且有显著的体外抗氧化能力^[14-16]。柚皮素、巴西苏木素等黄酮类化合物能抑LPS诱导的RAW 264.7细胞中NO、PGE2、TNF-α等炎症因子的释放,并能发挥抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[17,18]。阿魏酸等苯丙素类化合物有研究表明能有效清除过氧化氢、过氧化亚硝基、超氧自由基^[19]。因此,从以上结果可以推测山银花油具有抗氧化和抗炎等活性。

Zeng等^[20]通过金银花和山银花提取物均能显著抑制二甲苯所致小鼠的耳廓肿胀程度及在体外细胞模型中可抑制LPS诱导的RAW 264.7细胞炎症因子的释放,都具有良好的体内外抗炎作用。Zou

等^[21]采用 LPS 诱导的细胞炎症模型对山银花不同萃取部位进行体外抗炎活性评价,山银花不同萃取部位均有不同程度的抗炎活性。本研究采用 LPS 诱导的细胞炎症模型评价了山银花油的抗炎活性,表明山银花油具有显著的抗炎活性并呈现剂量依赖,与前人研究具有相似的结论。

事实上,抗炎实验表明山银花油能显著抑制炎症因子的释放,表现出抗炎作用。以上结果说明,山银花油是一种具有较好抗炎作用的天然活性物质,具有较好的开发和应用价值。本研究的抗氧化结果表明山银花油清除 ABTS 及 DPPH 自由基的能力不强,可能是由于本方法提取的油中的抗氧化物质含量太低的原因,也提示我们可以进一步开发新的提取方法。因此,本研究的全面化学分析结果及初步活性评价可为山银花在药食两用的全面开发提供基础。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 32-33.
- Li Y, Cai W, Weng X, et al. Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos; a systematic pharmacology review [J]. Evid-based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 905063.
- Zhu H, Liu Q, Jiang J. Determination of chemical constituents in *Lonicera maackii* with HPLC-DAD-ESI-Q-TOF/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 2300-2305.
- Zou XR, Wang ZH, Long YQ, et al. Prediction and analysis of the quality marker of Lonicerae Flos by HPLC fingerprint and network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2023, 35: 208-220.
- Wu C, Wang F, Liu J, et al. A comparison of volatile fractions obtained from *Lonicera macranthoides* via different extraction processes: ultrasound, microwave, Soxhlet extraction, hydro-distillation, and cold maceration [J]. Integr Med Res, 2015, 4: 171-177.
- Zhang, J, Yang C, Zhu L, et al. Evaluation of the volatile from *Lonicera macranthoides* obtained with different processing methods by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) [J]. Chem Pap, 2021, 75: 3847-3857.
- Sun T, Shi Y, Mao YX, et al. Chemical composition and antibacterial activity of the oil isolated from Flos Lonicerae (flower buds of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.) [J]. Nat Prod Commun, 2021, 16: 1934578X211008318.
- He YF, Wang RN, Ji DJ, et al. Study on the extraction process and antioxidant activity of volatile oil from Tibetan medicine *Artemisia sphaerocephala* Krasch [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2020, 37: 2834-2838.
- Jaradat N, Adwan L, K'aibni S, et al. Chemical composition, anthelmintic, antibacterial and antioxidant effects of *Thymus bovei* oil [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 418.
- Ma M, Tao T, Mao TJ. Study on purification, structure and *in vitro* antioxidant activity of buckwheat peptides [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34: 2011-2017.
- Tang LJ, Zou RB, Liu XR, et al. GC-MS analysis of volatile oil extracted from *Lonicera macranthodes* Hand-Mazz. with supercritical CO₂ fluid extraction and steam distillation [J]. Hannan Univ Tradit Chin Med (湖南中医药大学学报), 2010, 30: 109-113.
- Yang M, Wei B, Meng J, et al. Progress in sources and physiological function of ω -3 polyunsaturated fatty acids [J]. China Oils Fats (中国油脂), 2019, 44: 110-115.
- Xu T. Effect of phytosterols on the antioxidant effect of oils and fats [J]. China Food Safe Mag (食品安全导刊), 2019, 21: 141.
- Shi Y, Leng Y, Liu D, et al. Research advances in protective effects of ursolic acid and oleanolic acid against gastrointestinal diseases [J]. Am J Chin Med, 2021, 49: 413-435.
- Nor FM, Mohamed S, Idris NA, et al. Antioxidative properties of *Pandanus amaryllifolius* leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies [J]. Food Chem, 2008, 110: 319-327.
- Li B, Baylink DJ, Deb C, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses TLR8 expression and TLR8-mediated inflammatory responses in monocytes *in vitro* and experimental autoimmune encephalomyelitis *in vivo* [J]. PLoS One, 2013, 8: e58808.
- Liu YX, Li XZ, Zou J et al. Cellulose nanocrystals as carriers for hydrophobic naringenin to enhance its anti-oxidation activity [J]. China Pulp Paper (中国造纸), 2019, 38: 8-13.
- Wang X, Zhao HX, Bai H. Research progress of brazilin [J]. Acta Chin Med Pharm (中医药学报), 2013, 41: 164-168.
- Zhouen Z, Side Y, Weizhen L, et al. Mechanism of reaction of nitrogen dioxide radical with hydroxycinnamic acid derivatives; a pulse radiolysis study [J]. Free radical Res, 1998, 29: 13-16.
- Zeng AQ, Hua Y, Cheng ZR, et al. Comparative study on anti-inflammatory effect of Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 3938-3944.
- Zhou F, Yan YL, Huang K, et al. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory and antioxidant activities and analysis of chemical components in different extraction part of Lonicerae Flos [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2021, 42: 81-87.