液相色谱-串联质谱法测定山银花中有机酸和黄酮类化合物的含量

史颖珠[1]，侯建波[2,3]，谢文[2,3]，钱艳[3]，黄超群[2,3]，张雅琴[3]，刘翠平[2]，张辉[1]

（1.浙江大学生物系统工程与食品科学学院，浙江杭州 310058）

（2.杭州海关技术中心，浙江杭州 310016）（3.浙江省检验检疫科学技术研究院，浙江杭州 310016）

摘要：本文通过甲醇溶液超声提取，HLB 固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法检测，建立了山银花中 4 种有机酸（绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C）和 14 种黄酮类化合物（槲皮素、芦丁、木犀草素、木犀草苷、山奈酚、紫云英苷、芹菜素、野漆树苷、黄芩素、黄芩苷、槲皮素-3-甲基醚、香叶木素、白杨素和山奈素）含量测定的方法。山银花样品经 50%的甲醇溶液超声提取 40 分钟，HLB 固相萃取柱净化，采用 Mightysil RP-18 色谱柱分离，液相色谱-串联质谱法进行检测（电喷雾离子源，多反应监测模式，负离子扫描），外标法定量进行测定。方法定量限（以 *S/N* 大于 10 计）0.005 g/kg-0.05 g/kg，配制 0.05、0.10、0.20、0.50 和 1.00 g/kg 线性工作曲线，线性相关系数大于 0.993。在山银花样品中进行添加回收试验（添加水平绿原酸 10.0、20.0 和 40.0 g/kg，咖啡酸 1.0、2.0 和 4.0 g/kg，异绿原酸 A 和异绿原酸 C 5.0、10.0 和 20.0 g/kg，其他化合物 0.05、0.10 和 0.20 g/kg），方法总体回收率 69.2%~116%，相对标准偏差 3.3%~12.0%。方法实现了山银花中多种主要有机酸和黄酮类化合物含量的同时测定。

关键词：山银花；有机酸；黄酮；液相色谱-串联质谱法

文章篇号：1673-9078(2021)03-275-285 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.3.0814

Simultaneous Determination of Organic Acids and Flavonoids in *Lonicerae flos* by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

SHI Ying-zhu[1], HOU Jian-bo[2,3], XIE Wen[2,3], QIAN Yan[3], HUANG Chao-qun[2,3], ZHANG Ya-qin[3], LIU Cui-ping[2], ZHANG Hui[1]

(1.The College of Biosystems Engineering and Food Science of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

(2.The Technic Center of Hangzhou Customs, Hangzhou 310016, China)

(3.Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China)

Abstract: In this paper, an analytical method for the determination of 4 organic acids (chlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C) and 14 flavonoids (quercetin, rutin, luteolin, cynaroside, kaempferol, astragalin, apigenin, rhoifolin, baicalein, baicalin, quercetin-3-methylether, diosmetin, chrysin and kaempferide) in *Lonicerae flos* were developed and validated by solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In *Lonicerae flos* samples, the organic acids and flavonoids were extracted by methanol solution (concentration: 50%), ultrasonication for 40 min, and cleaned up with HLB column by solid phase extraction. The methanol eluent was filtered through nylon membrane and analysis by LC-MS/MS. The solution was separated by Mightysil RP-18 column (150 mm × 4.6 mm (i.d), 3 μm) and the quantitative detection was performed on LC-MS/MS by multiple reaction monitoring (MRM) mode under negative electrospray ionization (ESI^-). External standard method was used for quantitation analysis. The limits

引文格式：

史颖珠,侯建波,谢文,等.液相色谱-串联质谱法测定山银花中有机酸和黄酮类化合物的含量[J].现代食品科技,2021,37(3):275-285

SHI Ying-zhu, HOU Jian-bo, XIE Wen, et al. Simultaneous determination of organic acids and flavonoids in *Lonicerae flos* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 275-285

收稿日期：2020-08-13

基金项目：国家重点研发计划项目（2017YFF0211000）

作者简介：史颖珠（1986-），女，高级工程师，研究方向：食品中药物残留检测

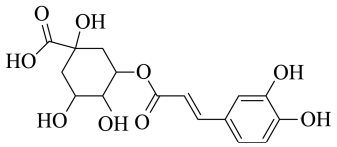
通讯作者：侯建波（1983-），男，博士，高级工程师，研究方向：食品质量安全检测研究

of quantification (LOQs, *S/N*>10) were 0.005 g/kg~0.05 g/kg. Single-laboratory method validation data were determined, the calibration standard curves concentrations were 0.05~1.00 g/kg and the correlation coefficient of calibration standard curves was more than 0.993. The recoveries were found in the range of 69.2%~116% and the relative standard deviations were 3.3%~12.0% at the respiked levels (10.0, 20.0 and 40.0 g/kg for chlorogenic acid; 1.0, 2.0 and 4.0 g/kg for caffeic acid; 5.00, 10.0 and 20.0 g/kg for isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C; 0.05, 0.10 and 0.20 g/kg for other compounds). This method was suitable for simultaneous determination and confirmation of 4 organic acid and 14 flavonoids in *Lonicerae flos*.

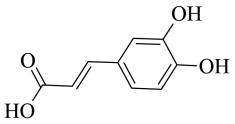
Key words: *Lonicerae flos*; organic acid; flavonoids; high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry

山银花是从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 confusa* 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，并在夏初花开放前采收获得，自《中国药典》2005 年版起，与金银花进行区分。具有清热解毒，疏散风热的功效，可用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热[1]。也具有抗菌、抗病毒、抗氧化和抗动脉粥样硬化等作用[2-5]。因此，2014 年正式被国家卫生计生委批准为“按照传统既是食品又是中药材物质”[6,7]。

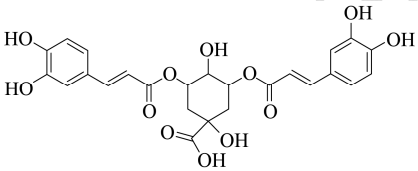
绿原酸



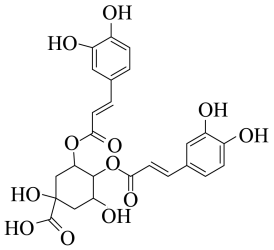
咖啡酸



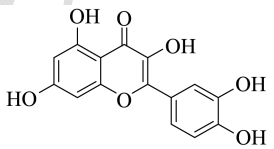
异绿原酸 A



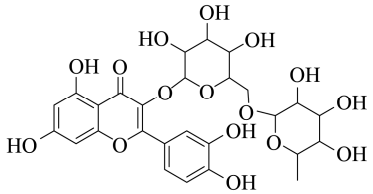
异绿原酸 C



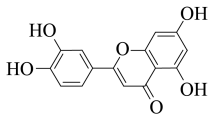
槲皮素



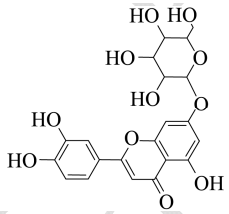
芦丁



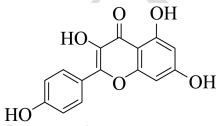
木犀草素



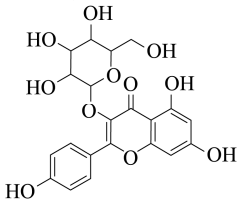
木犀草苷



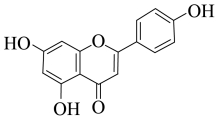
山奈酚



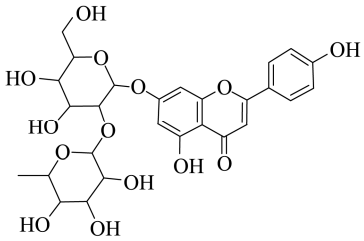
紫云英苷



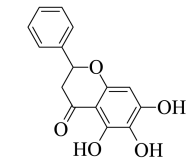
芹菜素



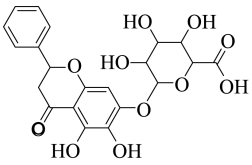
野漆树苷



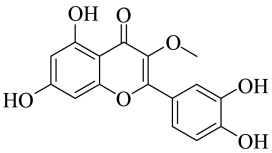
黄芩素



黄芩苷



槲皮素-3-甲基醚



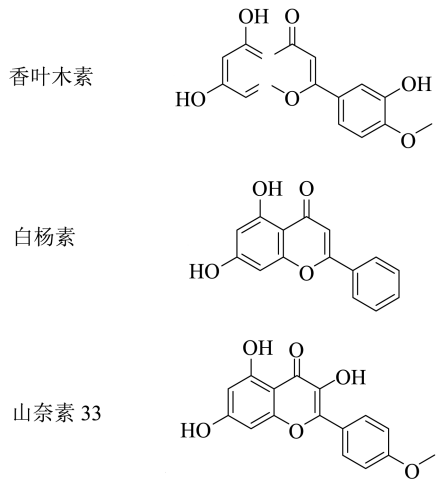


图 1 有机酸和黄酮类化合物结构式

Fig.1 The chemical structures of investigated organic acids and flavonoids

研究发现山银花的有效成分除绿原酸，灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙外，还有黄酮类化合物、挥发油类化合物、有机酸类和三萜类化合物[8-12]，研究人员通过 HPLC，LC-MS/MS、高分辨质谱法和波谱学等方法来测定和鉴别山银花中各成分的结构和含量[13-15]，以及开展指纹图谱、产品和品种的鉴别研究[16-20]。目前已发表的分析方法中除高分辨质谱仪检测可一次性筛查出山银花中较多的有效成分外，其他检测均较难获得很多有效成分信息。但高分辨质谱仪价格昂贵，影响了它的应用范围。本文通过文献调研筛选出山银花中 4 种主要有机酸和 14 种黄酮类化合物，采用酸性甲醇溶液超声提取，HLB 固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，建立了如图 1 所示的山银花中绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、芦丁、木犀草素、木犀草苷、山奈酚、紫云英苷、芹菜素、野漆树苷、黄芩素、黄芩苷、槲皮素-3-甲基醚、香叶木素、白杨素和山奈素含量测定的方法，实现了山银花中主要的4种有机酸和14种黄酮类化合物含量的同时测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器设备

API 4000 型三重四极杆串联质谱仪（配电喷雾离子源 ESI，AB 公司，美国）；1100 型液相色谱仪（Agilent 公司，美国）；Milli-Q Synergy 185 超纯水器（Millipore 公司，美国）；IKA MS3 Basic 型涡旋器（IKA 公司，德国）；24 孔固相萃取装置（Supelco 公司，美国）；Heraeus Multifuge X1R 型台式离心机（Thermo 公司，美国）；P 300 H 型超声波清洗机（Elma 公司，德国）；G&G JJ500 型电子天平（双杰公司产品，中国）；Mettler AE260 型电子天平（Mettler Toledo 公司产品，瑞士）。

1.1.2 主要耗材和试剂

甲醇（色谱纯），Tedia 公司；甲酸（质谱级），Scharlau 公司；乙腈（色谱纯），Scharlau 公司；盐酸（优级醇），永华化学科技（江苏）有限公司；叔丁基对苯二酚（*tert*-Butylhydroquinone，简称：TBHQ，分析纯），Aladdin 公司；*L*-(+)-抗坏血酸（*L*(+)-Ascorbic acid，分析纯），广东光华科技股份有限公司；CNW C_{18} 固相萃取柱（6 mL，500 mg），Anpel 公司；Waters HLB 固相萃取柱（6 mL，200 mg），Waters 公司。

标准物质：绿原酸（纯度 99.9%），ANPEL 公司；咖啡酸（纯度 98.1%），ANPEL 公司；异绿原酸 A（纯度 98.8%），ANPEL 公司；异绿原酸 C（纯度 99.5%），ANPEL 公司；槲皮素（纯度 96.4%），ChromaDex 公司；芦丁（纯度 95.0%），TRC 公司；木犀草素（纯度 96.9%），ChromaDex 公司；木犀草苷（纯度 98.9%），ANPEL 公司；山萘酚（纯度 95.5%），中国食品药品检定研究院、紫云英苷（纯度 99.1%），ANPEL 公司；芹菜素（纯度 98.5%），Bepure 公司；野漆树苷（纯度 98.9%），ANPEL 公司；黄芩素（纯度 99.2%），ANPEL 公司；黄芩苷（纯度 96.8%），ChromaDex 公司；槲皮素-3-甲基醚（纯度 97.0%），TRC 公司；香叶木素（纯度 97.8%），ChromaDex 公司；白杨素（纯度 98.0%），TRC 公司；山奈素（纯度 97.8%），ChromaDex 公司。用甲醇将各化合物固体标准品溶解，稀释并定容获得 10 mg/mL 标准储备液，根据需要用甲醇将其储备液稀释至所需浓度。

1.1.3 仪器工作条件

色谱参数：色谱柱：Mightysil RP-18，3 μm，4.6×150 mm，流动相：甲醇（A）-0.15%甲酸溶液（B），流动相梯度洗脱程序：0~10.0 min时40%（A）线性增加至75%；10.0~15.0 min时75%（A）线性增加至90%；15.0~22.0 min时90%（A）保持不变；22.0~23.0 min线性下降至40%（A）；23.0~30.0 min 40%（A）进行系统平衡；流速：0.4 mL/min；进样量：20 μL；柱温25 ℃。

质谱参数：离子源：电喷雾离子源（ESI）；扫描模式：负离子扫描；监测方式：多反应监测（MRM）；电喷雾电压（IS）：-4500 V；雾化气压力（GS1）：289 kPa（42 psi）；气帘气压力（GS2）：310 kPa（45 psi）；辅助气流速（CUR）：172 kPa（25 psi）；离子源温度（TEM）：540 ℃，驻留时间30 ms；其它质谱参数如表1所示。

表 1 各化合物基本信息及质谱测定条件

Table 1 Standard information and optimized mass spectrometric parameters of compounds

化合物	母离子/(*m*/*z*)	子离子/(*m*/*z*)	去簇电压/V	碰撞气电压/V	碰撞室出口电压/V
绿原酸	353.1	191.2*	-50	-22	-15
	353.1	161.1	-50	-30	-15
咖啡酸	179.0	135.0*	-65	-23	-15
	179.0	107.1	-65	-32	-15
异绿原酸 A	515.2	353.4*	-90	-23	-15
	515.2	191.2	-90	-45	-15
异绿原酸 C	515.2	353.2*	-90	-27	-15
	515.2	173.1	-90	-45	-15
槲皮素	301.1	151.1*	-100	-30	-10
	301.1	179.1	-100	-27	-10
芦丁	609.2	300.2*	-150	-50	-14
	609.2	151.1	-150	-70	-14
木犀草素	285.2	132.9*	-115	-48	-10
	285.2	150.8	-115	-36	-10
木犀草苷	447.1	285.1*	-110	-40	-15
	447.1	151.0	-110	-72	-15
山萘酚	285.1	92.9*	-115	-50	-15
	285.1	117.1	-115	-58	-15
紫云英苷	447.1	284.1*	-105	-40	-15
	447.1	255.2	-105	-58	-15
芹菜素	269.2	117.1*	-100	-47	-10
	269.2	150.9	-100	-35	-10
野漆树苷	577.2	269.2*	-130	-53	-15
	577.2.	413.2	-130	-45	-15
黄芩素	269.1	223.1*	-95	-34	-12
	269.1	241.1	-95	-32	-12
黄芩苷	445.1	269.1*	-70	-26	-15
	445.1	113.1	-70	-23	-15
槲皮素-3-甲基醚	315.2	300.2*	-75	-27	-15
	315.2	271.3	-75	-43	-15
香叶木素	299.1	284.2*	-110	-30	-15
	299.1	151.2	-110	-50	-15
白杨素	253.4	142.8*	-120	-38	-10
	253.4	63.3	-120	-55	-10
山奈素	299.1	284.1*	-90	-31	-15
	299.1	151.1	-90	-44	-15

注：*为定量离子对。

1.1.4 试验方法

称取 0.5 g 试样（精确到 0.01 g）置于 50 mL 具塞离心管中，加 0.5 g TBHQ，加入 40 mL 50%的甲醇溶液，涡旋均匀，超声 40 min（100 W，37 kHz，30 ℃），静置冷却至室温后，于 8500 r/min 高速离心 5 min，滤纸过滤上清液转移至 50 mL 容量瓶中，加水定容至 50 mL，混匀，取 1 mL 加 8.5 mL 水和 0.5 mL 浓盐酸，涡旋混匀并转移至 HLB 固相萃取柱中（依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 5%甲醇溶液活化），加入 5 mL 5%甲醇溶液淋洗，抽干，加 10 mL 甲醇进行洗脱，控制流速

1~2 mL/min，收集全部洗脱液，定容至 10 mL，摇匀，过 0.22 μm 有机滤膜，取 1.0 mL 定容溶液，加 40%的甲醇溶液稀释定容至 25 mL，混合均匀，供液相色谱-串联质谱仪测定。

1.2 数据处理

标准溶液和实验溶液通过液相色谱-串联质谱仪进行测试，以标准品峰面积 Y 为纵坐标，以待测物质量浓度 X（g/kg）为横坐标对标准溶液绘制标准工作曲线，并对实验溶液进行定量计算。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的选择

本试验参考中国药典的方法[1]，采用超声方式进行提取，并考察了超声波清洗仪参数、抗氧化剂对提取情况的影响。结果发现，超声频率在 37 kHz 和 80 kHz，有效功率 100 W，对提取结果显示无明显差别。比较超声时间在 10、20、30、40、50、60 min 的提取情况，在 40 min 时的回收率最高，当超声时间大于 40 min 后，山银花本底中的绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 含量，和通过外部添加方式加入的黄芩素和黄芩苷回收率下降 10%~15%。对比 TBHQ 和抗坏血酸两种不同抗氧化剂的保护情况，结果表明，在没有抗氧化剂的情况下，山萘酚的回收率低于 70%，在 TBHQ 加入后，山萘酚的回收率可以达到 80%以上，山奈素回收率提高约 10%。综上情况，最终选择超声频率 37 kHz，有效功率 100 W，超声时间 40 min，50%甲醇溶液，TBHQ 保护下开展提取实验。

2.2 净化条件的选择

本试验考察了 C_{18} 和 HLB 两种类型固相萃取柱的净化情况，以降低基质效应对液相色谱-串联质谱法定量测定的基质干扰，提高检测结果的准确性。取 1 mL 200 ng/mL 的标准溶液（50%甲醇溶液，0.5 g TBHQ），加入 9 mL 水，考察盐酸浓度分别为 0%、2.5%、5%、10%、15%的净化情况，混匀上样后，采取 5 mL 的 10%、20%、30%、40%、50%甲醇溶液进行淋洗和 10 mL 甲醇进行洗脱。结果如图 2 所示，酸性环境有助于提高固相萃取净化时化合物的稳定性，不加盐酸时芦丁、木犀草素、山奈酚、紫云英苷、芹菜素、野漆树苷、黄芩素、槲皮素-3-甲基醚和香叶木素的净化回收率均低于含有盐酸的情况，对不同浓度的盐酸考察发现，盐酸浓度 5%时化合物回收率整体较好。淋洗实验发现，在甲醇含量为 20%时，在 C_{18} 固相萃取柱中绿原酸和咖啡酸会被洗脱，在 HLB 固相萃取柱中，甲醇含量大于 30%时绿原酸和咖啡酸会被洗脱，HLB 固相萃取柱的净化回收率和稳定性好于 C_{18} 固相萃取柱。因此试验采用 HLB 固相萃取柱，甲醇溶液上样（含有 5%盐酸），5%甲醇淋洗，甲醇洗脱的方式进行净化。

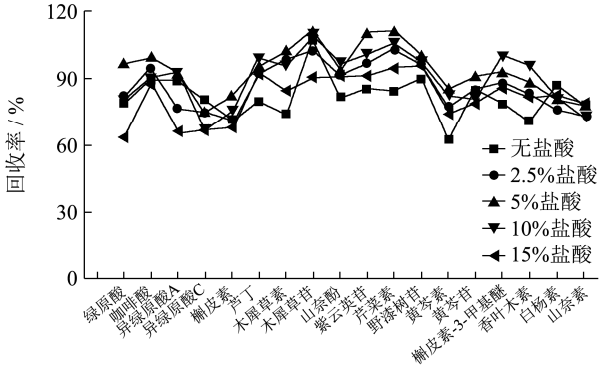


图 2 不同盐酸浓度在 HLB 固相萃取柱中的净化情况对比图

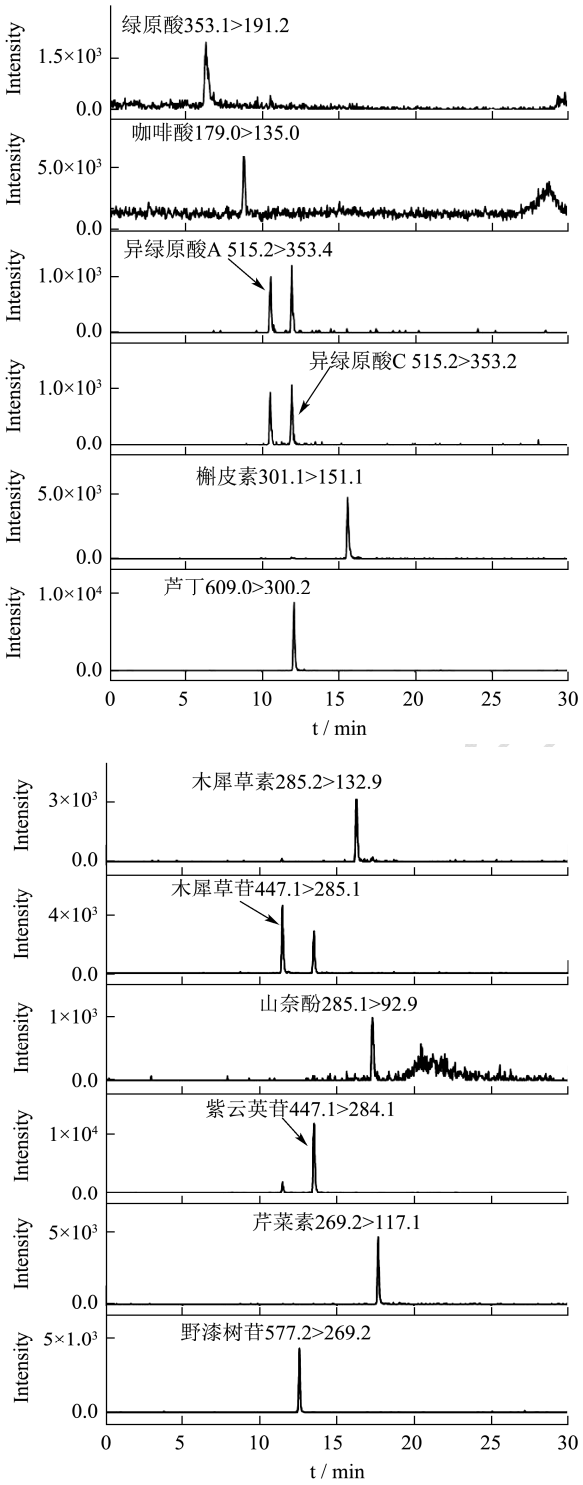
Fig.2 The results of different HCl concentrations in HLB solid phase extraction columns

2.3 色谱条件的考察

实验对比 Mightysil RP-18，3 μm，4.6×150 mm 或 Inertsil ODS-3，3 μm，4.6×150 mm 色谱柱，甲醇或乙腈为有机相，0.15%甲酸溶液或水为水相对目标化合物进行分离情况。结果表明，相同色谱条件下，绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 在 Mightysil RP-18 的分离效果好于 Inertsil ODS-3，黄芩苷在 Mightysil RP-18 为分离柱时谱峰峰形更好，信号提升约 4 倍。因此采用 Mightysil RP-18 为分离柱对目标化合物进行分析。在相同色谱柱和流动相梯度洗脱程序下，甲醇为有机相时大部分化合物的信号响应和峰形好于乙腈有机相（其中野漆树苷、芦丁、木犀草苷在甲醇为流动相时信号响应提升 3~5 倍），综合考虑前处理采用甲醇进行洗脱净化，因此采用甲醇为有机相对目标化合物进行分离。对比相同色谱柱下甲醇为有机相，水和 0.15%甲酸溶液为水相的分离情况，以 Mightysil RP-18 色谱柱为例，在 0.15%甲酸溶液中信号的峰形和响应好于水（其中绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 和黄芩素在含 0.15%甲酸时信号提升 5 倍以上）。综上情况，实验以 Mightysil RP-18 为分离柱，甲醇和 0.15%甲酸溶液为流动相，分析结果如图 3 所示，该条件下相近离子对的化合物如异绿原酸 A 和异绿原酸 C，山奈素和香叶木素可以实现很好的分离。

2.4 质谱条件的考察

实验采用流动注射的方式在负离子模式下进行母离子全扫描获得准分子离子峰，再以准分子离子峰为母离子，对其子离子进行全扫描。按照欧盟 EC/657 指令和《质谱分析方法通则》的要求，选择两个特征子离子对目标化合物定量确证，以信噪比高、峰形好、干扰小的离子对作为定量离子对。多反应监测负离子模式下优化的各质谱参数和最佳质谱条件参见表 1。



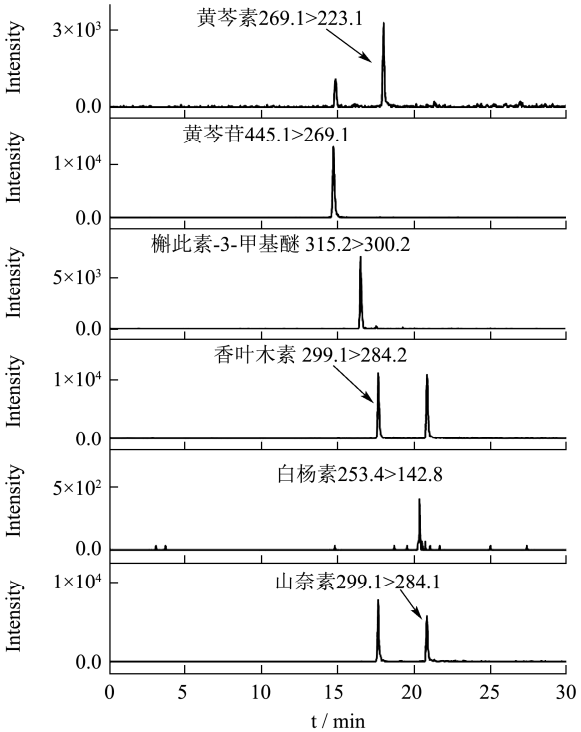


图 3 液相色谱-质谱/质谱法分离结果（2 ng/mL）

Fig.3 The separation result of LC-MS/MS

2.5 基质效应的考察

试验通过计算离子抑制率的方式来考察基质效应情况[21]。[离子抑制率/%=（溶剂工作液中响应强度-基质加标溶液响应强度）×100%/溶剂工作液中响应强度]。测试相同浓度（40 ng/mL）的溶剂工作液和基质加标溶液中各化合物的信号响应强度，如表 2 所示，各化合物离子抑制率均小于 15%，即试验条件下获得的基质溶液无明显的基质效应，因此采用甲醇-0.15%甲酸溶液（体积比 4:6）稀释获得线性工作曲线溶液进行定量计算。

2.6 方法的线性关系，定量限和回收率实验

在确定实验条件下进行检测，方法定量限（以 *S/N*>10 计）0.005 g/kg（槲皮素、芦丁、木犀草苷、紫云英苷、芹菜素、黄芩苷和槲皮素-3-甲基醚），0.025 g/kg（木犀草素、野漆树苷、香叶木素和山奈素）和 0.05 g/kg（绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、山奈酚、黄芩素和白杨素）。对浓度 0.05、0.10、0.20、0.50 和 1.00 g/kg 的线性工作曲线溶液进行测试，以标准品峰面积 Y 为纵坐标，以待测物质量浓度 X（g/kg）为横坐标绘制标准工作曲线如表 3 所示，线性方程的相关系数 r^2 大于 0.993。

表 2 山银花基质对各化合物的基质效应情况

Table 2 The matrix effect of *Lonicerae flos* on the investigated compounds (*n*=3)

化合物	离子对 Q1/Q3/(*m*/*z*)	浓度/(ng/mL)	溶剂工作液中响应强度/cps	基质加标溶液响应强度/cps	离子抑制率/%
绿原酸	353.1/191.2	40	122000	115000[a]	5.7
咖啡酸	179.0/135.0	40	298000	280000[a]	6.0
异绿原酸 A	515.2/353.4	40	46200	49000[a]	-6.1
异绿原酸 C	515.2/353.2	40	34300	32000[a]	6.7
槲皮素	301.1/151.1	40	586000	648000	-10.6
芦丁	609.2/300.2	40	420000	429000	-2.1
木犀草素	285.2/132.9	40	249000	274000	-10.0
木犀草苷	447.1/285.1	40	213000	214700	-0.8
山奈酚	285.1/92.9	40	66500	71100	-6.9
紫云英苷	447.1/284.1	40	699000	744000	-6.4
芹菜素	269.2/117.1	40	266000	287590	-8.1
野漆树苷	577.2/269.2	40	180000	176970	1.7
黄芩素	269.1/223.1	40	53000	57530	-8.5
黄芩苷	445.1/269.1	40	419000	477000	-13.8
槲皮素-3-甲基醚	315.2/300.2	40	360000	389000	-8.1
香叶木素	299.1/284.2	40	383000	389990	-1.8
白杨素	253.4/142.8	40	18300	20100	-9.8
山奈素	299.1/284.1	40	626000	641720	-2.5

注：[a]基质溶液再稀释 10 倍后加标测定，响应强度已扣除空白。

表 3 待测化合物的线性方程及相关系数

Table 3 The linear equation and correlation coefficients (r^2) of compounds

化合物	离子对 Q1/Q3/(*m*/*z*)	线性方程	相关系数(r^2)
绿原酸	353.1/191.2	$Y=5.84e^5x+351$	0.9995
咖啡酸	179.0/135.0	$Y=1.07e^6x+4420$	0.9978
异绿原酸 A	515.2/353.4	$Y=2.25e^5x-0.345$	0.9979
异绿原酸 C	515.2/353.2	$Y=7.36e^5x+0.386$	0.9973
槲皮素	301.1/151.1	$Y=2.07e^5x-0.427$	0.9974
芦丁	609.2/300.2	$Y=1.27e^6x-0.451$	0.9995
木犀草素	285.2/132.9	$Y=5.55e^5x+69.3$	0.9990
木犀草苷	447.1/285.1	$Y=1.97e^6x+1$	0.9982
山奈酚	285.1/92.9	$Y=3.17e^6x-4.9$	0.9960
紫云英苷	447.1/284.1	$Y=1.39e^6x-5.25$	0.9932
芹菜素	269.2/117.1	$Y=6.45e^5x+0.127$	0.9988
野漆树苷	577.2/269.2	$Y=1.05e^6x-0.311$	0.9975
黄芩素	269.1/223.1	$Y=1.95e^5x-0.171$	0.9975
黄芩苷	445.1/269.1	$Y=1.09e^6x+0.493$	0.9961
槲皮素-3-甲基醚	315.2/300.2	$Y=7.29e^5x-0.591$	0.9977
香叶木素	299.1/284.2	$Y=1.31e^5x-0.443$	0.9943
白杨素	253.4/142.8	$Y=1.77e^4x+0.0568$	0.9956
山奈素	299.1/284.1	$Y=1.29e^6x+3.92$	0.9958

表 4 山银花中 3 个水平下的加标回收率和相对标准偏差

Table 4 The results of recoveries and correlation coefficients (*n*=6)

化合物	空白/(g/kg)	添加浓度/(g/kg)	测定结果/(g/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%
绿原酸	21.0	10.0	29.2~31.5	82.0~105	8.1
		20.0	37.4~42.6	82.0~108	11.4
		40.0	52.4~62.5	78.5~104	10.1
咖啡酸	1.50	1.0	2.30~2.51	79.8~101	9.9
		2.0	3.14~3.71	82.2~111	12.0
		4.0	4.36~5.23	71.4~93.3	9.8
异绿原酸 A	11.2	5.0	15.2~16.7	80.0~110	11.3
		10.0	19.3~21.6	81.0~104	11.4
		20.0	27.7~31.7	82.5~102	9.5
异绿原酸 C	10.3	5.0	14.5~15.8	84.0~110	10.3
		10.0	18.3~20.9	80.0~106	11.6
		20.0	26.6~30.7	81.5~102	7.9
槲皮素	0	0.05	0.035~0.048	69.2~95.2	10.7
		0.10	0.082~0.096	82.2~96.4	6.4
		0.20	0.175~0.211	87.7~106	7.1
芦丁	0	0.05	0.040~0.048	79.8~95.6	7.1
		0.10	0.084~0.108	83.7~108	9.0
		0.20	0.166~0.194	83.0~97.0	5.3
木犀草素	0	0.05	0.046~0.058	92.0~116	9.5
		0.10	0.103~0.112	103~112	3.8
		0.20	0.184~0.216	92.0~108	6.0
木犀草苷	0.08	0.05	0.119~0.123	77.8~86.4	4.3
		0.10	0.159~0.170	78.8~89.6	4.6
		0.20	0.249~0.270	84.6~95.1	4.3
山奈酚	0	0.05	0.041~0.051	81.6~102	7.9
		0.10	0.083~0.111	83.3~111	10.3
		0.20	0.156~0.202	77.9~101	9.7
紫云英苷	0	0.05	0.039~0.044	77.4~88.6	5.0
		0.10	0.077~0.101	77.1~101	10.8
		0.20	0.154~0.180	76.9~90.2	6.5
芹菜素	0	0.05	0.045~0.052	90.8~104	4.7
		0.10	0.088~0.108	87.8~108	8.0
		0.20	0.163~0.198	81.5~99.0	7.3
野漆树苷	0	0.05	0.040~0.049	80.4~97.4	6.5
		0.10	0.089~0.106	88.6~106	5.8
		0.20	0.183~0.212	91.5~106	6.0
黄芩素	0	0.05	0.038~0.050	75.4~99.6	10.4
		0.10	0.074~0.094	73.5~93.7	8.6
		0.20	0.155~0.202	77.6~101	9.6

转下页

接上页

黄芩苷	0	0.05	0.037~0.048	73.0~95.8	10.6
		0.10	0.073~0.095	73.3~94.7	9.6
		0.20	0.160~0.194	80.8~96.8	7.3
槲皮素-3-甲基醚	0	0.05	0.043~0.052	86.4~104	7.1
		0.10	0.089~0.101	88.7~101	4.9
		0.20	0.177~0.202	88.7~101	5.1
香叶木素	0	0.05	0.043~0.054	85.6~108	8.9
		0.10	0.090~0.100	89.8~100	4.2
		0.20	0.177~0.201	88.3~101	4.6
白杨素	0	0.05	0.041~0.051	81.0~101	8.4
		0.10	0.079~0.093	79.2~93.2	6.0
		0.20	0.180~0.197	89.9~98.7	3.3
山奈素	0	0.05	0.037~0.045	73.0~89.6	8.2
		0.10	0.080~0.100	79.5~100	9.2
		0.20	0.169~0.198	84.3~99.2	5.7

注：回收率=（测定结果-空白值）/添加浓度×100%。

表 5 山银花中有机酸和黄铜类化合物含量测定结果

Table 5 The contents of organic acid and flavonoids in *Lonicerae flos*

样品	含量/(g/kg)									
	绿原酸	咖啡酸	异绿原酸 A	异绿原酸 C	槲皮素	芦丁	木犀草素	木犀草苷	紫云英苷	芹菜素
1	28.8	0.15	12.0	2.41	/	0.39	/	0.17	0.02	/
2	28.1	/	13.5	3.1	/	0.22	/	0.42	/	/
3	29.3	0.20	12.4	1.5	0.01	0.04	/	0.65	0.01	/
4	24.7	/	10.6	2.90	/	0.31	/	0.31	0.03	/
5	21.0	1.50	11.2	10.3	/	/	/	0.08	/	/
6	24.9	1.10	10.2	7.60	/	0.20	/	0.27	0.02	0.01
7	24.8	/	10.2	7.01	/	0.37	/	0.37	0.14	/
8	24.3	/	8.20	1.21	/	0.45	/	0.43	0.01	/
9	31.6	/	0.81	3.8	/	0.38	/	0.21	0.01	/
10	26.6	0.06	2.13	1.90	/	0.42	0.04	0.41	0.02	0.01
11	23.3	/	7.25	4.85	/	0.51	/	0.50	0.01	/

对山银花样品（样品含绿原酸 21.0 g/kg，咖啡酸 1.50 g/kg，异绿原酸 A 11.2 g/kg，异绿原酸 C 10.3 g/kg），进行 3 个浓度水平的添加回收实验（添加水平绿原酸 10.0、20.0 和 40.0 g/kg，咖啡酸 1.0、2.0 和 4.0 g/kg，异绿原酸 A 和异绿原酸 C 5.0、10.0 和 20.0 g/kg，其他化合物 0.05、0.10 和 0.20 g/kg），每个浓度水平取 6 个平行样。测定绿原酸，咖啡酸，异绿原酸 A 和异绿原酸 C 时，将测试溶液进行稀释至溶液浓度在线性范围内。结果如表 4 所示，采用外标法定量，方法总体回收率 69.2%~116%，相对标准偏差：3.3%~12.0%。

2.7 实际样品测试

应用实验方法对 11 个山银花进行检测，结果如表 5 所示，山银花中绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的含量最高，其次是木犀草苷和紫云英苷。样品中有 8 个化合物（山奈酚、野漆树苷、黄芩素、黄芩苷、槲皮素-3-甲基醚、香叶木素、白杨素和山奈素）含量低于方法定量限。

3 结论

本试验通过甲醇溶液超声提取，酸性溶液上样，HLB 固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法检测，外标法定量，实现了对山银花中 18 种主要有机酸和黄酮类化合物（绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、芦丁、木犀草素、木犀草苷、山奈酚、

紫云英苷、芹菜素、野漆树苷、黄芩素、黄芩苷、槲皮素-3-甲基醚、香叶木素、白杨素和山奈素）含量的测定。对 11 个山银花样品的测定结果显示绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、木犀草苷和紫云英苷是其主要成分。研究结果对后续分析各化合物含量与药物活性关系，山银花品质和品种研究具有重要的辅助作用。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中国药典第 1 部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:30-31
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part 1) [M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2015: 30-31

[2] 徐望龙,李云贵,孙林军,等.山银花黄酮类化合物药理作用的研究进展[J].广州化工,2014,42(6):37-39
XU Wang-long, LI Yun-gui, SUN Lin-jun, et al. Advances in studies on pharmacological effects of flavonoids from *Flos lonicerae* Confusae [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2014, 42(6): 37-39

[3] 肖作为,谢梦洲,甘龙,等.山银花、金银花中绿原酸和总黄酮含量及抗氧化活性测定[J].中草药,2019,50(1):210-216
XIAO Zuo-wei, XIE Meng-zhou, GAN Long, et al. Determination of chlorogenic acid, total flavones, and anti-oxidant activity of *Flos lonicerae* Japonicae and *Flos lonicerae* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(1): 210-216

[4] 徐望龙,李云贵,孙林军,等.山银花黄酮粗提物抗氧化活性的体外观察[J].中成药,2014,36(6):1292-1294
XU Wang-long, LI Yun-gui, SUN Lin-jun, et al. *In vitro* observation of antioxidant activity of crude extracts from *Flos lonicerae* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2014, 36(6): 1292-1294

[5] 王林青,崔保安,张红英.金银花、山银花黄酮类提取物体外抗伪狂犬病病毒作用研究[J].中国畜牧兽医,2011,38(3): 183-188
WANG Lin-qing, CUI Bao-an, ZHANG Hong-ying. Antiviral effect of *Flos lonicerae* Japonica and *Flos lonicerae* flavonoids ingredients to PRV *in vitro* [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2011, 38(3): 183-188

[6] 国家卫生计生委办公厅.国家卫生计生委办公厅关于征求《按照传统既是食品又是中药材物质目录管理办法》（征求意见稿）意见的函[OL].2014-11-06.http://www.nhc.gov.cn/sps/s3585/201411/67ac54fb05ed46929adc63f2db31d4bf.shtml?from=singlemessage
General Office of National Health and Family Planning Commission of PRC. The general office of the national health and family planning commission on soliciting opinions on the "Administrative measures for the catalogue of the substances traditionally considered as both food and chinese medicine" (draft for solicitation of comments) [OL]. 2014-11-06. http://www.nhc.gov.cn/sps/s3585/201411/67ac54fb05ed46929adc63f2db31d4bf.shtml?from=singlemessage

[7] 阙灵,杨光,李颖,等.既是食品又是药品的物品名单修订概况[J].中国药学杂志,2017,52(7):521-524
QUE Ling, YANG Guang, LI Ying, et al. Overview of revision of the catalogue of the substances traditionally considered as both food and Chinese medicine [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2017, 52(7): 521-524

[8] 梅玉丹,李海波,王振中,等.灰毡毛忍冬花蕾中苷类化学成分研究[J].中草药,2020,51(2):287-292
MEI Yu-dan, LI Hai-bo, WANG Zhen-zhong, et al. Glycosides from flower buds of *Lonicera macranthoides* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(2): 287-292

[9] TANG Yan-Ran, ZENG Ting, Salman Zafar, et al. *Lonicerae flos*: a review of chemical constituents and biological activities [J]. Digital Chinese Medicine, 2018, 1: 173-188

[10] 李锦燊,吴洪文.山银花化学成分与药理活性研究进展[J].北方药学,2014,11(2):71-73
LI Jin-shen, WU Hong-wen. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Flos lonicerae* [J]. Journal of North Pharmacy, 2014, 11(2): 71-73

[11] 王志萍,邓家刚,王勤,等.山银花研究的最新进展[J].广西中医学院学报,2008,11(4):59-61
WANG Zhi-ping, DENG Jia-gang, WANG Qin, et al. Recent advances in the study of *Flos lonicerae* [J]. Journal of Guangxi Traditional Chinese Medical University, 2008, 11(4): 59-61

[12] 银胜高,辛宁.山银花的研究概况[J].时珍国医国药,2007, 18(12):2920-2922
YING Sheng-gao, XIN Ning. The general research situation of *Flos lonicerae* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2007, 18(12): 2920-2922

[13] 王亚丹,何轶,戴忠,等.HPLC-MS-MS 同时测定山银花中 10 种活性成分的含量[J].中国中药杂志,2016,41(10):1870-1875
WANG Ya-dan, HE Yi, Dai Zhong, et al. Simultaneous determination of ten bioactive constituents in *Lonicerae flos* by HPLC-MS-MS [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(10): 1870-1875

[14] 占永良,程志娟,吾小芬.UPLC-MS/MS 法同时测定山银花药材中 10 种有效成分的含量[J].中药材,2017,40(9):2112-2115
ZHAN Yong-liang, CHENG Zhi-juan, WU Xiao-fen.

Simultaneous determination of ten active components in *Flos lonicerae* by UPLC-MS/MS [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2017, 40(9): 2112-2115

[15] 柴兴云,王林,宋越,等.山银花中黄酮类成分的研究[J].中国医科大学学报,2004,35(4):299-302
CHAI Xing-yun, WANG Lin, SONG Yue, et al. Study on the flavonoids from *Lonicera confuse* DC [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2004, 35(4): 299-302

[16] 黄玉娟,舒一崧,孔静,等.基于特征图谱的金银花与山银花(灰毡毛忍冬)质量表征比较研究[J].环球中医药,2020,13(4): 600-610
HUANG Yu-juan, SHU Yi-song, KONG Jing, et al. Comparative study on quality characterization of *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos (*Lon-icera macranthoides* Hand.-Mazz.) based on specific chromatogram [J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2020, 13(4): 600-610

[17] 王莹,郝江波,陈佳佶,等.基于主要化学成分差异的金银花与山银花种质资源系统评价研究[J].中南药学,2020,18(5): 825-831
WANG Ying, HAO Jiang-bo, CHEN Jia-ji, et al. Systematic evaluation of germplasm resources of *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae* based on difference in main chemical compositions [J]. Central South Pharmacy, 2020, 18(5): 825-831

[18] CAI Zhi-chen, WANG Cheng-cheng, CHEN Cui-hua, et al. Quality evaluation of *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos based on simultaneous determination of multiple bioactive constituents combined with multivariate statistical analysis [J]. Phytochemical Analysis, 2019, 15(5): 1-12

[19] LIU Zi-Han, WANG Yu-Qi, MEI Xiao-Dan, et al. Comprehensive analysis of the chemical constituents in sulfur-fumigated *Lonicerae japonicae* Flos using UHPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(2): 148-160

[20] 刘亚楠,石典花,雷留成.金银花与山银花的 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J].中草药,2017,48(4):773-776
LIU Ya-nan, SHI Dian-hua, LEI Liu-cheng. HPLC fingerprint identification of *Lonicera japonica* Flos and *Lonicera* Flos [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(4): 773-776

[21] Helen Stahnke, Stefan Kittlaus, Gunther Kempe, et al. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray lionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed [J]. American Chemical Society, 2012, 84(3): 1474-1482

（上接第 114 页）

[25] 吕常江.生理工程策略提升乳酸菌 γ-氨基丁酸合成效率的研究[D].杭州:浙江大学,2017
LYU Chang-jiang. Physiology engineering strategy to improve gamma-aminobutyrate production in lactic acid bacteria [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017

[26] 孙敏,袁凤霞,曹晓虹,等.传统发酵食品中耐肠胃道环境乳酸菌的筛选及其在酸乳发酵中的应用[J].食品与发酵工业,2018,44(3):114-120
SUN Min, YUAN Feng-xia, CAO Xiao-hong, et al. Screening of lactic acid bacteria strains with resistance to gastrointestinal environment isolated from traditional foods and their application in fermented yoghurt [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(3): 114-120

[27] Chou L S, Weimer B. Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 82(1): 23-31

[28] 赵小茜,魏旭丹,陈戴玲,等.乳酸菌耐酸耐胆盐机制研究进展[J].乳业科学与技术,2017,40(3):33-36
ZHAO Xiao-xi, WEI Xu-dan, CHEN Dai-ling, et al. A review on the mechanism of acid and bile salt resistance of lactic acid bacteria [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2017, 40(3): 33-36

[29] 杨振泉,靳彩娟,张咪,等.高粘附性戊糖片球菌的筛选、标记及其表面疏水与自凝聚性特征[J].食品与生物技术学报,2015,34(9):926-934
YANG Zhen-quan, JIN Cai-juan, ZHANG Mi, et al. Screening and molecular marking of highly adhesive *Pediococcus pentosaceus* and the characteristics of their surface hydrophobicities and autoaggregation abilities [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(9): 926-934

[30] 夏海燕,周思多,张明喆,等.酢辣椒中益生乳酸菌的筛选及其功能特性研究[J].食品科学,2019,40(6):93-99
XIA Hai-yan, ZHOU Si-duo, ZHANG Ming-zhe, et al. Screening and functional characteristics of probiotics from Zuolajiao, a traditional fermented hot pepper product [J]. Food Science, 2019, 40(6): 93-99