

· 中药工业 ·

不同加工方法对贯叶连翘中黄酮类成分的影响[△]史鑫波¹, 唐伟博², 白宏博¹, 沈昕¹, 唐宝全², 杨春宁², 孙晓春¹, 唐志书¹, 刘妍如^{1*}

(1. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西省中药

基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712083;

2. 陕西省咸阳市实验中学, 陕西 咸阳 712000)

[摘要] 目的: 研究不同加工方法对贯叶连翘中5种主要黄酮类成分的影响及变化规律, 以寻找适宜的干燥方法和条件。方法: 贯叶连翘全草洗净泥土, 分别经4、-20、-80℃储存48 h后阴干, 直接阴干和晒干方法进行加工后, 剪切后得到5组样本。采用超高效液相色谱(UPLC-PDA)测定贯叶连翘中5种主要的黄酮类成分含量。将5种不同加工方法处理样品的数据标准化处理, 以主成分分析法(PCA)综合评价贯叶连翘经不同加工方法处理后其中的黄酮类成分的含量变化规律, 并对不同加工方法进行多元比较。结果: 经UPLC分析, 贯叶连翘5种黄酮类化合物均可在10 min内出峰, 且在各自的线性范围内线性关系良好($r > 0.9991$), 检出限范围为0.020~0.107 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量限范围为0.133~0.667 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均加样回收率为95.05%~102.47%, 相对标准偏差(RSD)值为0.13%~1.99%。PCA结果显示, 不同处理方法对贯叶连翘成分含量影响综合评分依次为: 晒干 > -80℃ > -20℃ > 阴干 > 4℃。结论: 建立的UPLC方法快捷、灵敏、准确, 适用于5种主要黄酮类成分的同时测定。PCA结果说明, 不同加工方法对贯叶连翘中黄酮类活性成分有一定影响, 综合主要成分的变化规律, 选择-20℃冷冻48 h后晾干作为优化的加工方法。

[关键词] 贯叶连翘; 药材初加工; 超高效液相色谱法; 主成分分析; 黄酮类

Effect of Different Processing Approaches on Flavonoids in *Hypericum perforatum*SHI Xinbo¹, TANG Weibo², BAI Hongbo¹, SHEN Xin¹, TANG Baoquan², YANG Chunning²,SUN Xiaochun¹, TANG Zhishu¹, LIU Yanru^{1*}

(1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi province key laboratory of new drugs and Chinese medicine foundation research, Shaanxi University of Chinese Medicine,

Xianyang, 712083, Shaanxi, China;

2. Xianyang Shiyan Middle School, Xianyang, 712000, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To study the main effect of different processing approach on five flavonoids from *Hypericum perforatum* for providing suitable drying methods. **Methods:** The whole plants of *H. perforatum* were cleaned and divided into five processing groups: 4℃, -20℃, -80℃, shade and sun drying. An ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method was adopted to determine the content of 5 flavonoids. The collect data were standardized and principal component analysis (PCA) was performed on the five processing groups data for differentiation analysis. **Results:** By using the optimized UPLC method, all the compounds eluted within 10 min. The correlation coefficients (r) were greater than 0.9991 in the linear ranges of the 5 compounds. The limits of detection (LODs) were 0.020-0.107 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the limits of quantitation (LOQs) were 0.133-0.667 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the recoveries were between 95.05% to 102.47% at three spiked levels with the relative standard deviations (RSD, $n=3$) ranging 0.13%-1.99%. Based on the PCA results, the integral scores of 5 flavonoids from *H. perforatum* with various processing approach in the order from high to low, sun-drying > -80℃ > -20℃ > shade drying > 4℃. **Conclusion:** The established UPLC method is sensitive, accurate and efficient, which suitable for 5 flavonoids of *H. perforatum* simultaneous determination. Meanwhile, the PCA results indicated that different processing method have certain impacts on *H. perforatum* flavonoids contents. Then, the processing method of -20℃ storage-shade drying is considered as the better method.

[Keywords] *Hypericum perforatum*; herbal medicine pre-processing; UPLC; PCA; flavonoids

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.5.025

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目(81501229); 陕西省教育厅专项计划项目(320104-203010012); 陕西省教育厅“春笋计划”项目(2011K16-03-02)

* [通信作者] 刘妍如, 讲师, 研究方向: 药物分析; Tel: (029)38182207, E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 为藤黄科金丝桃属植物贯叶连翘的全草或带根全草, 又称贯叶金丝桃、圣约翰草。味辛, 性寒, 归肝经, 始载于《南京民间药草》。《贵州草药》有载: 贯叶连翘能“清热、解毒、通乳、利湿”, 具有疏肝解郁、清热、除湿、消肿通乳等功能^[1]。研究显示, 贯叶连翘中的黄酮类化合物是其主要的活性成分和主要药效基础之一, 具有抗抑郁、抗焦虑、抗菌抗炎、调节更年期代谢紊乱等生物学功能^[2-5]。

药材的初加工技术具有悠久的历史 and 充分的中医药理论依据, 不同方法加工的药材在化学成分和含量方面具有明显的差异, 这也是导致同种药材出现药效不同的原因之一。随着对中药材加工技术、分析技术和数据处理技术的深入研究, 其加工条件也得到不断提高^[6-8]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC 型超高效液相色谱仪, 配备四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、PAD 检测器, 以及 Empower 2 工作站; KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); GeneVac miVac 低温离心浓缩仪。

1.2 试药

金丝桃苷、槲皮苷和芦丁(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 111521-201406, 111538-200504, 10080-201408); 槲皮素、异槲皮素(宝鸡市辰光生物科技有限公司, 批号分别为 6151-25-3, 21637-25-2); 贯叶连翘药材采自陕西太白山县, 经陕西中医药大学、陕西省中药资源产业化协同创新中心刘世军副教授鉴定为藤黄科植物贯叶连翘 *Hypericum Perforatum* L. 的全草; 实验用甲醇、乙腈均为色谱纯; 其余为分析纯; 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 方法学建立

2.1.1 对照品储备液的制备 分别取金丝桃苷、槲皮素、异槲皮素、槲皮苷、芦丁对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇超声溶解, 再定容至刻度线, 再取 0.25 mL 置于 5 mL 容量瓶中, 加甲醇溶液制成金丝桃苷、槲皮素、异槲皮素、槲

皮苷、芦丁质量浓度分别为 142.50、133.75、151.25、127.50、122.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取贯叶连翘不同干燥方法: 4 $^{\circ}\text{C}$ (4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 48 h 后晾干)、-20 $^{\circ}\text{C}$ (-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 48 h 后晾干)、-80 $^{\circ}\text{C}$ (-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 48 h 后晾干)、直接阴干、直接晒干的药材粉末(过三号筛)各 0.4 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 50 mL, 称定重量, 加热回流 1 h, 静置至室温, 再称定重量, 用 80% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔有机滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

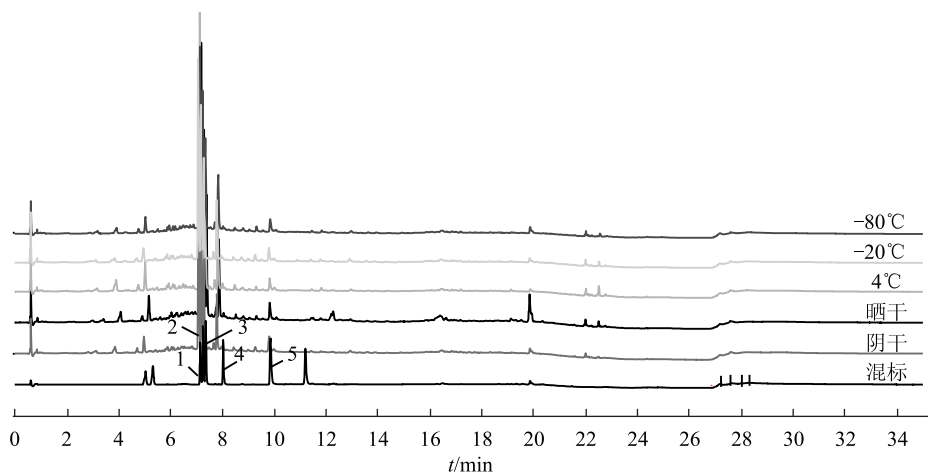
2.1.3 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 流动相 A 为水(含 0.2% 的甲酸), B 为乙腈, 梯度洗脱, 洗脱条件为: 0~10 min, 2%~35% B; 10~13 min, 35% B; 13~14 min, 35%~2% B; 14~16 min, 2% B; 流速为 0.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 2 μL ; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 254 nm。

2.1.4 系统适应性试验 按 2.1.3 项下设定色谱条件, 将混合对照品溶液、供试品溶液分别进样 2 μL , 进行色谱分析。混合对照品溶液、各供试品溶液对比色谱图见图 1。结果显示, 各成分分离度符合测定要求, 且空白溶液在相应位置未见干扰。

2.1.5 标准曲线 按 2.1.3 项下设定色谱条件, 精密吸取 2.1.1 项下混合对照品溶液, 按 6 个梯度体积稀释, 同体积进样, 进样量为 2 μL , 进行色谱分析, 以色谱峰峰面积(Y)为纵坐标, 以对照品溶液中化合物质量浓度(X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标, 绘制标准曲线, 计算各成分的回归方程, 结果见表 1。

2.1.6 定量限和检出限 以空白样品为检测对象, 添加不同体积的混合对照品溶液, 按 2.1.3 项下设定色谱条件, 进样量为 2 μL , 以各对照品信噪比(S/N)10:1 为定量限(LOQ), 信噪比(S/N)3:1 为检测限(LOD), 结果见表 1。

2.1.7 精密度试验 精密吸取 2.1.1 项下混合对照品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 进样量为 2 μL , 测得金丝桃苷、芦丁、槲皮素、槲皮苷、异槲皮素各色谱的峰面积, 计算相对标准偏差(RSD)值为 0.31%~0.91%, 表明仪器精密度良好。



注：1. 芦丁(7.216 min)；2. 金丝桃苷(7.346 min)；3. 异槲皮素(7.448 min)；
4. 槲皮苷(8.122 min)；5. 槲皮素(10.027 min)。

图 1 不同加工方法贯叶连翘 UPLC 图

表 1 贯叶连翘中 5 种黄酮类化合物的线性范围、相关系数、检测限和定量限

成分	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	标准曲线方程	相关系数 r	最低检测限 LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	最低定量限 LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
槲皮素	1.07 ~ 22.29	$Y = 13\ 100X - 10\ 183$	0.999 8	0.107	0.167
芦丁	3.83 ~ 122.50	$Y = 7020X - 1541$	0.999 8	0.050	0.250
金丝桃苷	4.45 ~ 142.50	$Y = 9070X - 2486$	0.999 5	0.057	0.133
异槲皮素	5.90 ~ 151.25	$Y = 9080X - 3614$	0.999 2	0.067	0.200
槲皮苷	1.05 ~ 21.25	$Y = 61\ 200X - 4747$	0.999 1	0.020	0.667

2.1.8 重复性试验 取同一供试品溶液，按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按 2.1.3 项下设定色谱条件，进样量为 2 μL ，测出金丝桃苷、芦丁、槲皮素、槲皮苷、异槲皮素各峰的峰面积，计算 RSD 值。不同处理方法下，5 种黄酮类化合物的重复性 RSD 值为 0.19% ~ 1.86%，说明方法重复性良好。

2.1.9 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、6、8、10、24 h，按 2.1.3 项下设定色谱条件，进样量为 2 μL ，测定金丝桃苷、芦丁、槲皮素、槲皮苷、异槲皮素各峰的峰面积，计算 RSD 值，不同处理方法下，5 种黄酮类化合物的重复性 RSD 值为 0.24% ~ 1.76%，表明样品中各成分在 24 h 内稳定。

2.1.10 加样回收率试验 分别精密称取已知不同加工方法处理的贯叶连翘黄酮类成分含量的药材 0.2 g，按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液，精密称取金丝桃苷、芦丁、槲皮素、槲皮苷、异槲皮苷对照品适量，根据供试品中已知各成分含量的 80%、100%、120%，加入上述供试品溶液中。按 2.1.3 项下设定色谱条件，进样量为 2 μL ，计算回收率和

RSD 值。5 种黄酮类化合物的回收率为 95.05% ~ 102.47%，见表 2。说明该方法回收率高，适用于贯叶连翘中黄酮类成分的测定要求。

表 2 5 种黄酮类成分的加样回收率和相对标准偏差 ($n = 3$) %

加工方法	芦丁	金丝桃苷	异槲皮素	槲皮苷	槲皮素
4 $^{\circ}\text{C}$	95.56	102.2	99.00	101.10	98.80
	96.75	102.3	98.12	99.12	97.19
	97.16	99.87	98.74	98.80	98.18
均值	96.49	101.45	98.62	99.67	98.05
RSD(%)	0.13	1.3	0.45	1.24	1.24
-20 $^{\circ}\text{C}$	101.49	96.35	100.40	95.05	102.00
	99.54	95.43	99.15	96.34	97.87
	98.85	96.47	98.32	96.21	98.15
均值	99.96	96.08	98.32	96.21	98.67
RSD(%)	1.36	0.59	1.06	0.74	1.17
-80 $^{\circ}\text{C}$	97.10	101.40	100.04	检测限下	101.90
	98.14	98.17	101.23		98.04
	96.36	98.45	98.17		99.12

表 2(续)

加工方法	芦丁	金丝桃苷	异槲皮素	槲皮苷	槲皮素
均值	97.20	99.34	99.81		99.68
RSD(%)	0.91	1.80	1.54		1.99
阴干样品	101.23	97.71	97.00	检测限下	96.04
	101.01	98.00	98.00		97.00
	98.78	97.89	100.01		98.12
均值	100.45	97.85	98.33		97.05
RSD(%)	1.44	0.14	1.55		1.07
晒干样品	101.00	101.31	101.92	检测限下	100.12
	98.00	101.44	102.47		100.60
	98.26	99.15	101.69		99.45
均值	99.08	100.63	102.02		100.05
RSD(%)	1.67	1.27	0.39		0.57

2.1.11 样品含量测定 按 2.1.2 项下供试品溶液制备方法,将不同加工的贯叶连翘分别平行制样 6 份,0.22 μm 有机微孔滤膜滤过,按 2.1.3 项下设定色谱条件,进样量 2 μL,按外标法计算各成分含量,见图 2。

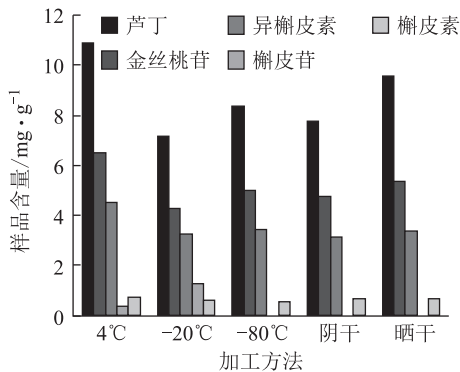


图 2 不同加工方法贯叶连翘中 5 种黄酮类化合物的含量(n=6)

2.2 不同处理方法对贯叶连翘中黄酮类化合物的影响分析

对贯叶连翘不同加工方法测定的色谱数据(n=6)进行数据对齐、积分、标准化处理后,采用 simca-p 13.0 分析软件对数据进行主成分分析(PCA)。从得到的数据矩阵中提取携带差异变量最多的主成分,并将各成分作为观测变量,分析变异最大的成分,最后找到因加工方法的不同而产生的差异成分信息^[9-10]。

贯叶连翘不同加工方法得到的数据经中心化处理后,进行 PCA 模型拟合。由相关系数矩阵 R 得到

特征值、方差贡献率(R²X)和累计贡献率(Q²cum)结果。系统根据交叉有效性指标(>0.097 5)提取前 3 个主成分,正交验证值为 87.3%,说明模型拟合良好(见表 3)。通过各成分关系的载荷矩阵,可以找到造成两组差异的成分信息(见表 4)。由载荷计算回归系数值,可以看出造成两组差异的成分峰(保留时间)主要为 7.269、7.415、7.29、7.533、7.507、7.404、7.436、4.964、5.462、7.144、10.126 min 处。根据色谱行为鉴定出咖啡酸、绿原酸、异槲皮素、金丝桃苷、芦丁、槲皮素、槲皮苷。其中,异槲皮素、金丝桃苷、芦丁、槲皮素、槲皮苷的峰与第一主成分高度正相关,咖啡酸和绿原酸的色谱峰信息与第二主成分正相关。根据 PCA 载荷图,从不同加工样本的 UPLC 指纹图谱保留时间及对应的峰面积得到差异成分的相关信息结果。从中指认了 3 个特征峰,分别为芦丁(7.144 min)、金丝桃苷(7.269 min)和异槲皮素(7.436 min)。说明第一主成分主要包括了黄酮类的主要差异信息。

表 3 主成分特征值及累积贡献率表

主成分	方差贡献率(%)	累积方差贡献率(%)	本征值	贡献率(%)	累积贡献率(%)
1	0.569 0	0.569	15.9	0.408 00	0.408
2	0.236 0	0.805	6.61	0.205 00	0.529
3	0.068 3	0.873	1.91	0.009 35	0.534

表 4 差异成分载荷指标

化合物	主成分		
	1	2	3
咖啡酸	0.017 4	0.025 1	0.011 9
绿原酸	-0.000 9	0.003 9	-0.005 4
芦丁	0.004 1	0.016 0	-0.009 6
金丝桃苷	-0.518 9	0.001 0	0.307 4
异槲皮素	0.357 9	-0.414 3	0.624 0
槲皮素	0.005 1	0.004 0	0.012 6
槲皮苷	0.008 8	-0.011 5	-0.010 8

以 3 个主成分对不同加工方法进行综合评价,以各主成分对应的方差贡献率为权重计算综合的分值: $F=\frac{P_1}{P_2+P_2+P_3}F_1+\frac{P_2}{P_2+P_2+P_3}F_2+\frac{P_3}{P_2+P_2+P_3}F_3$, $P_1=0.569$; $P_2=0.236$; $P_3=0.068 3$ 。

计算得到 5 种加工方法得分值分别为: $F_{4℃}=$

-551.512、 $F_{-20^{\circ}\text{C}} = -151.974$ 、 $F_{-80^{\circ}\text{C}} = 439.425$ 、 $F_{\text{阴干}} = -368.874$ 、 $F_{\text{晒干}} = 779.4097$ 。由结果可知,晒干加工得分最高, -80°C 冷冻48 h后晾干加工得分次之,但结合各成分含量测定结果, -80°C 、晒干和阴干加工后贯叶连翘样品无法检测到槲皮苷的含量。因此,综合含量测定和主成分分析结果得到贯叶连翘加工的方法以 -20°C 冷冻48 h后晾干为宜,其次为 4°C 冷藏48 h后晾干。

3 讨论

贯叶连翘是临床治疗抑郁症、阿尔兹海默症、更年期综合征的有效药材,不论其提取物还是活性成分提取物都具有良好的药理活性。现代研究报道,贯叶连翘的加工方法主要为室温避光阴干、 $60\sim 100^{\circ}\text{C}$ 烘干等,这些加工方法对贯叶连翘药材质量影响较大,其中 60°C 烘干的贯叶连翘中芦丁和金丝桃苷含量最高,并在一定温度范围内呈现先高后低的含量变化。但是,鲜有文献对其加工的方法进行优化和探索,或者采用的检测指标暂无法充分反映加工方法对主要成分的影响^[11-12]。

本文借助超高效液相色谱技术,建立了贯叶连翘药材经不同干燥方法处理后黄酮类化合物的UPLC测定方法,采用主成分分析法分析不同温度加工处理对贯叶连翘中多个黄酮类成分的影响规律。结果发现,贯叶连翘加工的方法以 -20°C 冷冻48 h后晾干的综合得分最好,其次为 4°C 冷藏48 h后晾干,这与传统的加工方式不同。在实验中发现,温度是对黄酮类含量影响最大的因素,从结果来看,呈现非线性的变化趋势,这与以往的研究报道一致。进一步说明,在储存干燥过程还应该考虑到光照、湿度等因素的影响。

4 结论

综合研究结果表明,通过对贯叶连翘不同加工方法的优化,可以提升贯叶连翘干燥效率,保证活性成分含量,为有效地控制贯叶连翘内在质量标准提供依据。

参考文献

- [1] Liu Y R, Xiao B K, Yang J Y, et al. $^1\text{H-NMR}$ and HPLC-MS/MS-based global/targeted metabolomic evaluation of *Hypericum perforatum* L. intervention for menopause[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 17(7): 722-741.
- [2] 韩霖,刘妍如,杨建云,等.贯叶连翘提取物中金丝桃苷含量的RP-HPLC法测定[J].时珍国医国药,2012,23(10):2432-2434.
- [3] 肖炳坤,杨建云,黄荣清,等.贯叶金丝桃挥发油成分的GC-MS分析[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(11): 64-67.
- [4] Liu Y R, Jiang Y L, Huang R Q, et al. *Hypericum perforatum* L. preparations for menopause: a meta-analysis of efficacy and safety[J]. Climacteric the Journal of the International Menopause Society, 2014, 17(4): 325-335.
- [5] Liu Y R, Li W G, Chen L F, et al. ABTS + , scavenging potency of selected flavonols from *Hypericum perforatum*, L. by HPLC-ESI/MS QQQ: Reaction observation, adduct characterization and scavenging activity determination[J]. Food Research International, 2014, 58(4): 47-58.
- [6] 严宝飞,朱邵晴,李会伟,等.多指标综合评价优选玄参药材干燥工艺[J].中国中药杂志,2016,41(16): 3002-3008.
- [7] 周冰,刘培,鲁学军,等.禹白芷适宜干燥加工方式的优选研究[J].中药材,2016,39(7):1509-1515.
- [8] 段金彪,宿树兰,吕洁丽,等.药材产地加工传统经验与现代科学认识[J].中国中药杂志,2009,34(24): 3151-3157.
- [9] 刘培,陈京,周冰,等.不同干燥加工方法及其条件对抗白芷中香豆素及挥发油类化学成分的影响[J].中国中药杂志,2014,39(14):2653-2659.
- [10] 刘妍如,宋忠兴,张严磊,等.固肠止泻丸及中间体的多波长HPLC-DAD指纹图谱质量评价[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(15):65-70.
- [11] 钱秋霞,丛晓东. HPLC法测定不同干燥方法的贯叶连翘中黄酮类化合物的含量[J].中草药,2001,32(5): 407-409.
- [12] 张卫.急性干燥应激环境和收割时间对贯叶连翘叶和花的植物化学及干重的影响[J].国际中医中药杂志,2005,27(1):62.

(收稿日期 2017-02-24)