

不同发育时期金银花颜色与活性成分的相关性分析

王玲娜¹, 孙希芳², 张芳¹, 张永清^{1*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东医药技师学院, 山东 泰安 271016

摘要: 目的 通过探索不同发育时期金银花颜色和每个花蕾活性成分量的相关性, 为金银花药材的质量评价提供参考依据。

方法 采用色度计测量不同发育时期金银花的颜色; HPLC 法测定金银花样品中酚酸类、黄酮类、环烯醚萜类等 14 种化合物的量; 采用 SPSS 17.0 软件分析金银花颜色与化学成分之间的相关性。**结果** 随着花蕾的发育, 酚酸类、黄酮类化合物量在二白期、大白期最高, 环烯醚萜类化合物量在大白期、银花期最高, 从活性成分量结果考虑, 金银花的最佳采收期为大白期; 金银花发育过程中酚酸类、黄酮类化合物量与亮度 (L^*) 呈显著正相关, 酚酸类、黄酮类和环烯醚萜类成分量均与褐变指数 (BI) 呈极显著负相关。**结论** 金银花的颜色与活性成分量密切相关, L^* 与 BI 可以更好地将外观指标与内在质量联系起来。

关键词: 金银花; 发育时期; 颜色; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 马钱苷; 芦丁; 木犀草苷; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 槲皮素

中图分类号: R282.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)15-3182-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.026

Research on correlation between color and active compounds of *Lonicerae Japonicae Flos* in different development periods

WANG Ling-na¹, SUN Xi-fang², ZHANG Fang¹, ZHANG Yong-qing¹

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Shandong Medicine Technician College, Taian 271016, China

Abstract: Objective To provide references for quality evaluation of *Lonicera Japonicae Flos* (LJF) through exploring correlation between color and contents of active ingredients of LJF in different development periods. **Methods** The colorimeter was used to measure the color of LJF in different development periods; HPLC was applied to determine the contents of phenolic acids, flavonoids and iridoids. SPSS 17.0 software was used to analyze the correlation between color and chemical composition of LJF. **Results** With the development of flower buds, the contents of phenolic acids, flavonoids compounds achieved the highest in two white stages and the contents of iridoids came to the highest in big white stage and silver flower stage. Therefore, only taking the consideration of the content of active ingredient, the best harvest time of LJF might be the big white stage. There was a significant positive correlation among contents of phenolic acids, flavonoids and brightness (L^*) of LJF in different development periods, and there was a very significant negative correlation among contents of phenolic acids, flavonoids, iridoids, and browning index (BI). **Conclusion** The color of LJF is closely related to the content of active ingredients, L^* and BI can better link appearance and inner quality of LJF.

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; development periods; color; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; loganin; rutin; cynaroside; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; quercetin

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^[1], 具有清热解毒、疏散风热的功效^[2-3]。实际生产中, 我国学者将金银花从花蕾发育到花凋谢分为 7 个时期, 分别为米蕾期 (花蕾绿色, 幼小似米粒状)、三青期 (花蕾青绿色, 棒状)、二白期 (花蕾为绿白色, 棒状)、

大白期 (花蕾为白色, 棒状)、银花期 (花初开, 白色)、金花期 (开放的花, 黄色)、凋花期 (花枯萎, 脱落), 因此, 发育过程中花的颜色变化是金银花花期划分的重要依据之一。有研究试图阐明金银花颜色与成分之间的关系, 熊吟等^[2]研究了绿原酸、木犀草苷与颜色值的相关性, 结果表明亮度 (L^*) 在一定程

收稿日期: 2017-01-26

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划 (2011BAI06B01); 山东省自主创新专项“金银花资源高值产品开发与质量控制技术研究”课题 (2013CXC20401); 国家中药标准化项目: 金银花标准化建设 (2YB2H-Y-SD-32)

作者简介: 王玲娜, 女, 博士在读。Tel: 13583190126 E-mail: wanglingna88@163.com

*通信作者 张永清 (1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源及其质量控制。Tel: (0531)89628085 E-mail: zzyq622003@126.com

度上受绿原酸、木犀草苷和总黄酮影响。杨晓芸^[3]研究表明金银花颜色的 L^* 值与绿原酸量呈显著负相关, 相关系数为 0.461, 而侯爽^[4]在金银花热风干燥中研究表明绿原酸量与 L^* 值呈显著正相关, 相关系数 0.972, 可见金银花颜色与活性的成分关系还不明确, 有待进一步研究。加之, 中药材临床疗效的发挥应是其活性成分药理活性的综合体现, 故以单指标或少数指标成分评价中药材质量高低有一定局限性, 难以体现中药材的整体质量, 且目前有关不同发育时期金银花的颜色与活性成分的关系还未见报道。为解决以上问题, 本研究使用精密色差仪测定不同发育时期金银花颜色的相关参数, 采用 HPLC 测定金银花中 14 种活性成分的量, 并对所得数据进行统计分析, 探讨金银花花蕾发育过程中颜色与活性成分变化之间的相关性, 为金银花药材的质量评价提供参考。

1 仪器与材料

Agilent1260 HPLC 系统 (包括 G1311C 四元泵、G1329B 自动进样器、G1315D 二极管阵列检测器、G1316A 柱温箱和 Agilent Chem Station 工作站, 美国安捷伦公司), WF30 色差仪 (深圳 iWAVE 公司), KQ-500DE 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

对照品新绿原酸 (批号 PA0819RA13)、绿原酸 (批号 20130415)、隐绿原酸 (批号 ZS0922BA13)、木犀草苷 (批号 20120521)、异绿原酸 B (批号 20131021)、异绿原酸 A (批号 20130816)、异绿原酸 C (批号 20130924)、咖啡酸 (批号 20121029)、马钱苷 (批号 20120427)、芦丁 (批号 YM0316SA13) 均购自上海源叶生物科技有限责任公司; 槲皮素 (批号 100081-200406) 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均大于 98%。乙腈 (色谱纯, 天津市四友精细化学品有限公司), 甲酸 (色谱纯, 莱阳化工实验厂), 甲醇 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司), 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

材料为 2013 年 7 月采自山东中医药大学药用植物园种植的忍冬植株不同发育时期 (三青期、二白期、大白期、银花期、金花期、凋花期) 的花蕾或花, 统一置硅胶盒中干燥, 备用。样品经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera jaпонica* Thunb. 的干燥花蕾。

2 方法

2.1 金银花颜色的测定

2.1.1 测定条件 光源 D65, 标准观察角度 10° , 波长扫描范围 780~380 nm, 照明口径 $\Phi 50$ mm, 扫描速度 600 nm/min。数据用 L^* 、 a^* 、 b^* 色空间法表示, 其中 L^* 为亮度值, L^* 越大亮度越高; a^* 为红-绿色轴, a^* 值越大越红, 越小则越绿; b^* 为黄-蓝色轴, b^* 值越大越黄, 越小则越蓝。

2.1.2 测量方法 取不同发育时期金银花样品, 平铺于色彩色差仪测试口处, 测定其表面的颜色, 随机扫描 10 次, 取平均值。花蕾褐变程度用褐变指数 (BI) 表示^[5]。

$$BI = 100 \times (X - 0.31) / 0.17$$

$$X = (a^* + 1.75 L^*) / (5.645 L^* + a^* - 3.012 b^*)$$

2.2 金银花活性成分测定^[6-7]

2.2.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAXSB C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^\circ$ C; 进样量 20 μ L; 检测波长 240 nm (环烯醚萜类)、325 nm (酚酸类)、350 nm (黄酮类)。流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B), 线性梯度洗脱, 0~10 min, 8%~10% A; 10~20 min, 10%~15% A; 20~30 min, 15% A; 30~40 min, 15%~25% A; 40~60 min, 25%~100% A。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 1 000。在此条件下, 对照品和供试品溶液的色谱图见图 1、2。12~14 号峰 3 种成分在金银花 HPLC 色谱图中峰面积很大, 根据文献中^[9]环烯醚萜苷类的性质及三者的紫外吸收图谱 (图 3), 确认该色谱峰为环烯醚萜苷类成分。

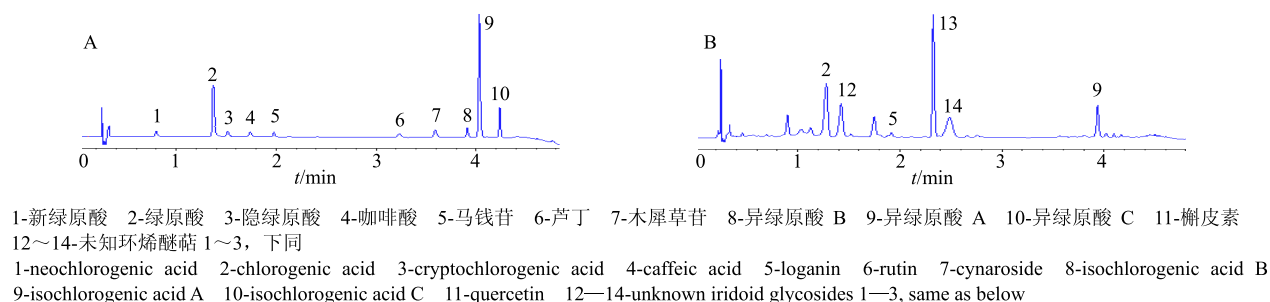


图 1 对照品 (A) 和供试品 (B) 240 nm 下 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixtures reference substances (A) and sample (B) at 240 nm

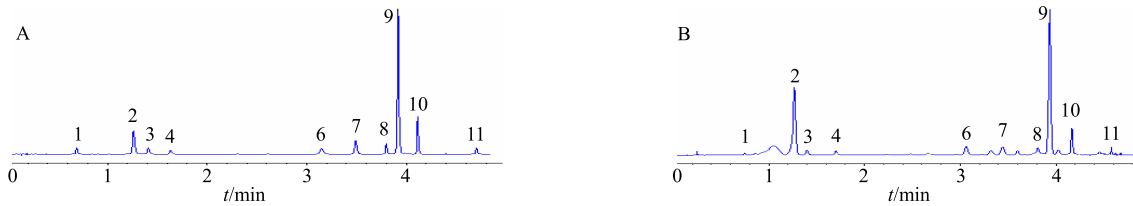


图 2 对照品 (A) 和供试品 (B) 350 nm 下 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixtures reference substances (A) and sample (B) at 350 nm

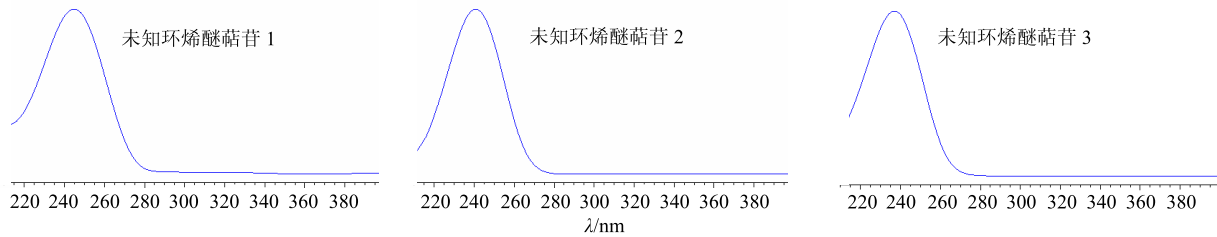


图 3 3 个未知环烯醚萜苷的紫外吸收图谱

Fig. 3 Ultraviolet absorption spectrum of three unknown iridoid glycosides

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取对照品适量, 加 50% 甲醇制成质量浓度分别为新绿原酸 15.0 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 57.4 $\mu\text{g/mL}$ 、隐绿原酸 19.8 $\mu\text{g/mL}$ 、咖啡酸 9.72 $\mu\text{g/mL}$ 、马钱苷 14.4 $\mu\text{g/mL}$ 、芦丁 26.6 $\mu\text{g/mL}$ 、木犀草苷 28.5 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 B 25.76 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 A 289.2 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 C 54.4 $\mu\text{g/mL}$ 、槲皮素 1.7 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 随机取 30 个完整花蕾或花, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 100 W, 频率 100 Hz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系的考察 吸取上述混合对照品溶液 2、5、10、20、40 μL , 按上述色谱条件进样, 测定峰面积, 以对照品进样量为横坐标 (X), 其峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 结果见表 1。

2.2.5 样品测定 分别精密吸取供试品溶液各 10 μL , 按已定色谱条件测定 11 种活性成分峰面积, 以外标法计算质量分数。

在对金银花中环烯醚萜苷类成分的质量评价中, 以三青期样品为参照, 马钱苷为内标物, 通过下述公式, 计算环烯醚萜苷类成分与参照药材中的相对浓度比值 (已有对照品的成分按绝对量计算其在参照药材中的相对浓度比值)。

表 1 11 种活性成分线性回归方程

Table 1 Linear relationship of 11 ingredients

对照品	回归方程	R^2	线性范围/ μg
新绿原酸	$Y=3\,073.1X+7.009\,5$	0.999 7	0.030 0~0.600 0
绿原酸	$Y=3\,131.7X+54.228$	0.999 8	1.148 0~11.480 0
隐绿原酸	$Y=2\,258.3X+6.544\,3$	0.999 6	0.039 6~0.792 0
咖啡酸	$Y=7\,411.2X-4.492\,6$	0.999 9	0.019 4~0.388 8
马钱苷	$Y=1\,746.8X+5.484\,7$	0.999 9	0.028 8~0.576 0
芦丁	$Y=1\,639.7X-0.526\,8$	0.999 9	0.053 2~1.064 0
木犀草苷	$Y=1\,956.4X-6.640\,9$	0.999 8	0.057 0~1.139 2
异绿原酸 B	$Y=4\,119.8X-7.840\,5$	0.999 9	0.051 5~1.030 4
异绿原酸 A	$Y=3\,908.5X-65.593$	0.999 8	0.578 4~11.568 0
异绿原酸 C	$Y=1\,807.7X+1.277\,7$	0.999 7	0.108 8~2.176 0
槲皮素	$Y=3\,205.6X-2.078\,0$	0.999 6	0.003 4~0.067 2

$$f_X = (A_{\text{马参照}}/C_{\text{马参照}})/(A_X/C_X)$$

$$C_{X\text{样品}} = f_X \times A_{X\text{样品}}/(A_{\text{马样品}}/C_{\text{马样品}})$$

$$C_{X\text{样品}}/C_{X\text{参照}} = (A_{\text{马参照}} \times A_{X\text{样品}} \times C_{\text{绿马样品}})/(C_{\text{马参照}} \times A_X \times A_{\text{马样品}})$$

f_X 为待测成分的校正因子, $A_{\text{马参照}}$ 为参照样品中马钱苷的峰面积, A_X 为参照样品中的待测成分峰面积, $A_{X\text{样品}}$ 为待测样品中待测成分的峰面积, $A_{\text{马样品}}$ 为待测样品中马钱苷的峰面积, $C_{\text{马参照}}$ 为参照样品中马钱苷的浓度, C_X 为参照样品中待测成分的浓度, $C_{\text{马样品}}$ 为待测样品中马钱苷的浓度

3 结果与分析

3.1 不同发育时期金银花的颜色变化

金银花不同发育时期颜色测定参数结果表明, L^*

自三青期逐渐升高,至银花期达到最高,而后降低,凋花期最低,银花期约是凋花期亮度的 2 倍;红度 a^* 随金银花发育程度逐渐升高,凋花期红度达到最高 11.11;黄度 b^* 呈先升高后降低趋势,金花期最高达到 29.63;褐变指数 BI 自二白期至凋花期逐渐升高,至凋花期达到最高,为 166.74。测定结果见图 4。

3.2 不同发育时期金银花活性成分的测定

3.2.1 酚酸类成分动态变化 金银花不同发育时期酚酸类成分测定结果(图 5)表明,以每个花蕾

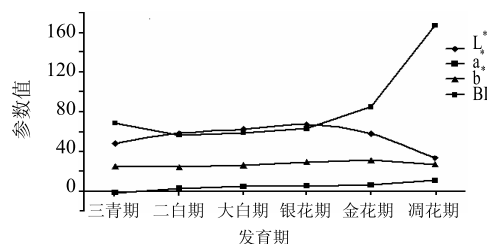
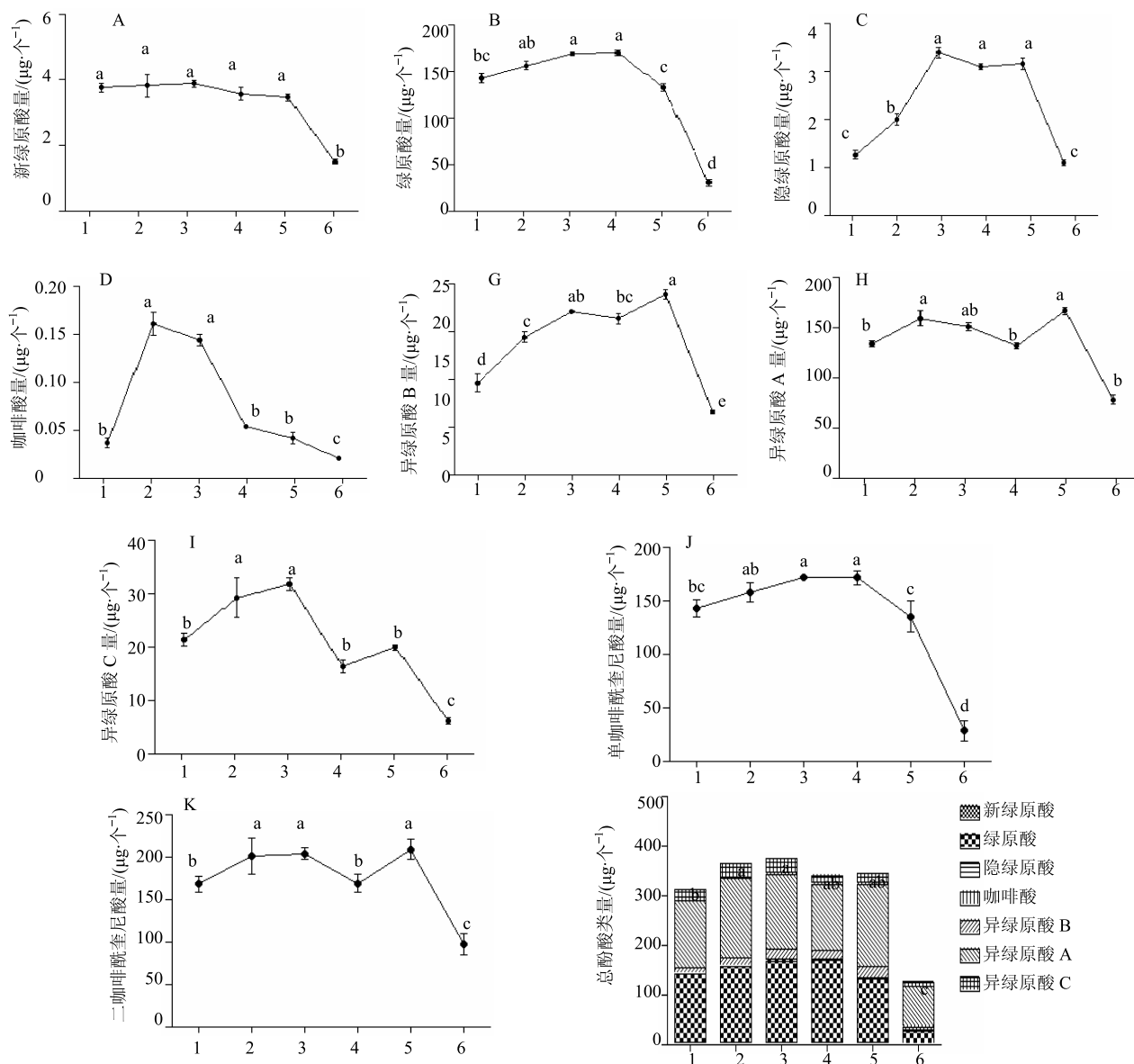


图 4 不同发育时期金银花颜色参数的动态变化

Fig. 4 Dynamic changes of color parameters of LJF in different development periods



1-三青期 2-二白期 3-大白期 4-银花期 5-金花期 6-凋花期,下同; A-新绿原酸 B-绿原酸 C-隐绿原酸 D-咖啡酸 G-异绿原酸 B H-异绿原酸 A I-异绿原酸 C J-单咖啡酰奎尼酸 K-二咖啡酰奎尼酸 不同字母间表示有显著性差异 ($P < 0.01$)

1-three green stage 2-two white stage 3-big white stage 4-silver flower stage 5-golden flower stage 6-withering flower stage, same as below
A-neochlorogenic acid B-chlorogenic acid C-cryptochlorogenic acid D-caffeic acid G-isochlorogenic acid B H-isochlorogenic acid A I-isochlorogenic acid C J-CQA K-diCQA There is a significant difference between different letters ($P < 0.01$)

图 5 金银花在不同发育时期酚酸类成分量的动态变化

Fig. 5 Dynamic changes of contents of phenolic acids of LJF in different development periods

的量表示时,随着花蕾发育,各分量总体上呈现先增加后降低的趋势,新绿原酸量三青期至金花期无显著性差异,凋花期降低;绿原酸量先升高后降低,二白、大白、银花期最高,无显著性差异;隐绿原酸量在大白、银花、金花期最高;咖啡酸量在二白和大白期最高;异绿原酸 B 在大白金花期最高;异绿原酸 A 量在二白、大白、金花期最高;异绿原酸 C 在二白、大白期最高。单咖啡酰奎尼酸在二白、大白、银花期量无显著性差异,达到最高值;二咖啡酰奎尼酸在二白、大

白、金花期最高。酚酸类成分均在大白期的量较高。总酚酸量在凋花期量最低,二白、大白、银花、金花期期间无显著性差异。

3.2.2 黄酮类成分动态变化 金银花花蕾黄酮类量随着金银花的发育呈现先上升后下降的趋势(图 6),其中芦丁量在大白期最高,二白、银花、金花与大白期无显著性差异;每个花蕾木犀草苷量大白期最高,二白与大白期无显著性差异;槲皮素量二白期最高,二白与大白期无显著性差异。3 种黄酮的总量二白期和大白期最高,以凋花期量最低。

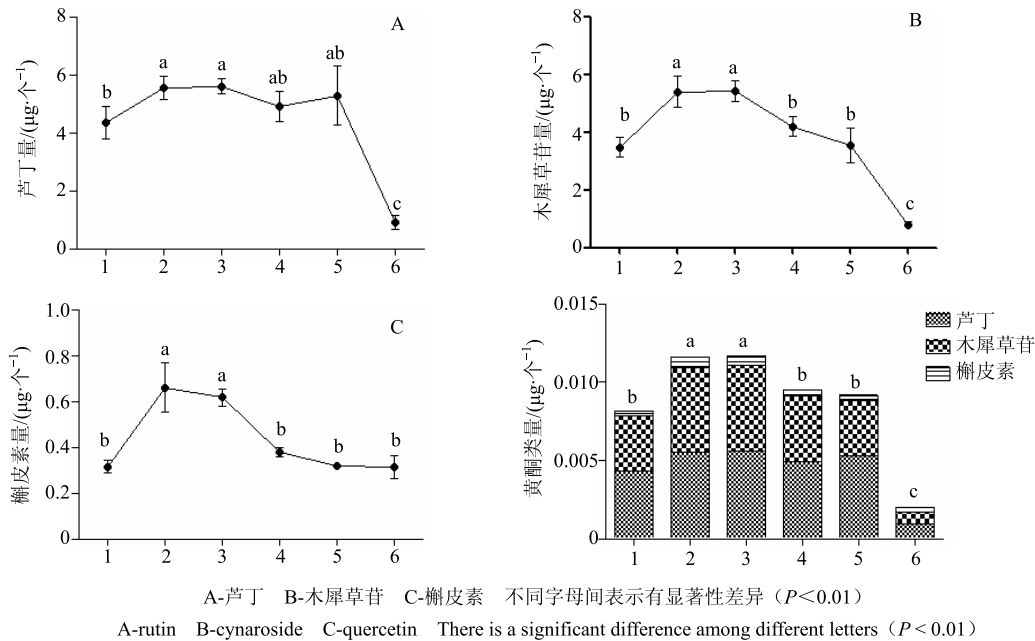


图 6 金银花在不同发育时期黄酮类成分量的动态变化

Fig. 6 Dynamic changes of contents of flavonoids of LJJ in different development periods

3.2.3 环烯醚萜苷类成分动态变化 随着金银花的发育,马钱苷和环烯醚萜苷 1 呈先上升后下降的趋势,而环烯醚萜苷 2 和 3 先下降后上升,最后降低的 S 型变化趋势。其中,马钱苷和环烯醚萜苷 1 量均在大白期达到最高,与其他发育时期有显著性差异;环烯醚萜苷 2 金花期量最高;环烯醚萜苷 3 三青期最高。四者之和为大白期、银花期最高,且无显著性差异,结果参见图 7。

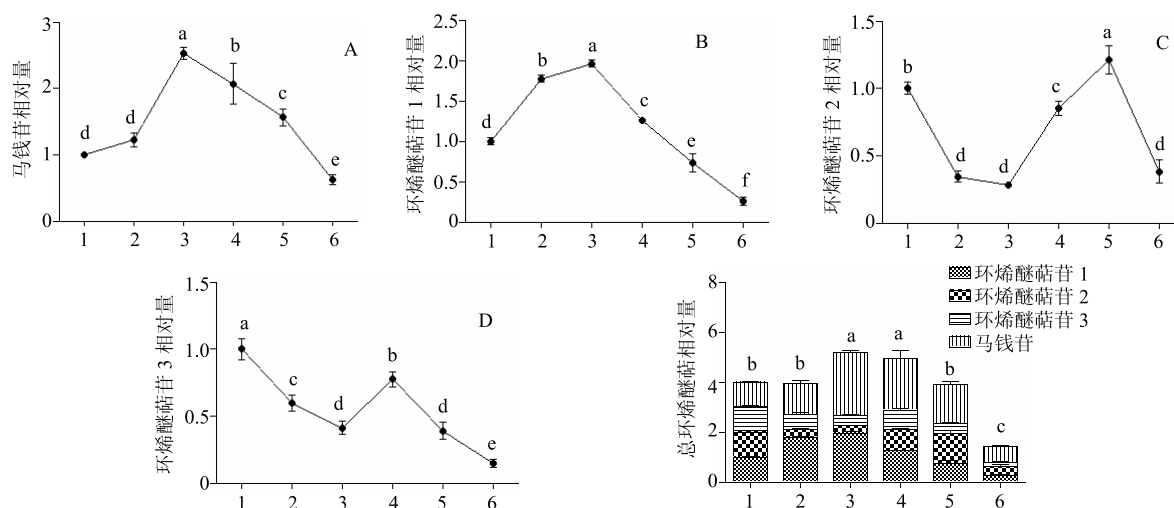
3.3 不同发育时期金银花颜色与色素及活性成分量相关性分析

表 2 结果显示,在金银花花蕾或花发育过程中, b^* 与所测活性成分量间均无显著相关; a^* 除与环烯醚萜苷 3 及总环烯醚萜苷呈显著负相关外,与其他成分间均无显著相关; L^* 与绿原酸、单咖啡酰奎尼酸极显著正相关,相关系数分别为 0.923、0.926,

与新绿原酸、隐绿原酸、芦丁、木犀草苷、马钱苷、总酚酸类、总黄酮类显著正相关;BI 与各成分呈显著或极显著负相关,其中与单咖啡酰奎尼酸、新绿原酸、绿原酸、芦丁、木犀草苷、总酚酸类、总黄酮类、总环烯醚萜类极显著负相关。

4 讨论

研究药材的活性成分的量通常是取一定质量的粉末,其结果以单位质量的药材表示,但以药材产量为出发点此种表示方法尚有一些不足之处。以金银花为例,在花蕾发育过程中,细胞在进行旺盛的分裂活动,细胞数量在增加,如果此时活性成分产生的次生代谢反应减慢或停止,每个花蕾中活性成分总量不变,而每个细胞中势必减少。而单位面积生产的花蕾数量是一定的,因此本研究中以每个花蕾的活性成分量表示更合理科学。



A-马钱苷 B-环烯醚萜苷 1 C-环烯醚萜苷 2 D-环烯醚萜苷 3 不同字母间表示有显著性差异 ($P < 0.01$)

A-loganin B-unknown iridoid glycoside 1 C-unknown iridoid glycoside 2 D-unknown iridoid glycoside 3 There is a significant difference between different letters ($P < 0.01$)

图 7 金银花在不同发育时期环烯醚萜苷类成分动态变化

Fig. 7 Dynamic changes of contents of iridoids of LJF in different development periods

表 2 不同发育时期金银花颜色与活性成分相关性分析

Table 2 Correlation analysis between color and active components of LJF in different development periods

活性成分	L*	a*	b*	BI
新绿原酸	0.813*	-0.767	-0.151	-0.981**
绿原酸	0.923**	-0.679	-0.074	-0.987**
隐绿原酸	0.856*	0.043	0.509	-0.565
咖啡酸	0.516	-0.299	-0.520	-0.594
芦丁	0.894*	-0.604	0.006	-0.952**
木犀草苷	0.856*	-0.590	-0.259	-0.935**
异绿原酸 B	0.599	-0.262	-0.165	-0.611
异绿原酸 A	0.774	-0.528	0.083	-0.846*
异绿原酸 C	0.648	-0.627	-0.420	-0.841*
槲皮素	0.468	-0.240	-0.546	-0.529
环烯醚萜苷 1	0.736	-0.522	-0.450	-0.826*
环烯醚萜苷 2	0.153	-0.237	0.617	-0.162
环烯醚萜苷 3	0.384	-0.876*	-0.280	-0.669
马钱苷	0.841*	-0.113	0.226	-0.636
单咖啡酰奎尼酸	0.926**	-0.672	-0.065	-0.986**
二咖啡酰奎尼酸	0.765	-0.525	-0.062	-0.852*
所测酚酸成分总量	0.892*	-0.633	-0.067	-0.968**
3 种黄酮成分总量	0.884*	-0.599	-0.147	-0.954**
4 种环烯醚萜苷总量	0.729	-0.873*	-0.139	-0.934**

*表示有显著相关性 ($P < 0.05$), **表示有极显著相关性 ($P < 0.01$)

*indicates a significant correlation ($P < 0.05$), **indicates a significant correlation ($P < 0.01$)

研究表明,金银花在不同发育时期酚酸类、黄酮类化合物量在二白期、大白期最高,环烯醚萜苷类化合物量在大白期、银花期最高,从活性成分结果考虑,金银花的最佳采收期为大白期。从而为确定金银花的最佳采收期提供理论依据。

周洁等^[8]发现金银花的褐变程度与绿原酸、木犀草苷量呈显著负相关。本实验结果表明,金银花发育过程中酚酸类、黄酮类化合物量与亮度 L^* 呈显著正相关,酚酸类、黄酮类和环烯醚萜苷类成分量均与褐变指数 BI 呈极显著负相关。从而进一步证明在

金银花干燥或储存过程中, 随着褐变程度的增加, 各活性成分量显著降低。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 熊 吟, 肖 潇, 闫永红, 等. 基于色度分析原理的金银花有效成分含量与颜色值相关性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(3): 667-670.
- [3] 杨晓芸. 金银花颜色气味与化学成分的相关性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [4] 侯爽爽. 金银花热风干燥过程中颜色劣变机理及抑制研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2011.
- [5] Gao M, Feng, Jiang T. Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment [J]. *Food Chem*, 2014, 149: 107-113.
- [6] 王玲娜, 刘红燕, 张 金, 等. “一测多评法”与外标法测定金银花中 8 种活性成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 57-61.
- [7] Qi L W, Chen C Y, Li P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in *Flos Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(19): 3227-3242.
- [8] 周 洁, 邹 琳, 刘 伟, 等. 金银花商品规格等级标准研究 [J]. 中药材, 2015, 38(4): 701-705.