

# 金银花颜色与有效成分含量的相关性分析

杨晓芸<sup>1</sup>, 肖潇<sup>2</sup>, 熊吟<sup>1</sup>, 林辉<sup>1</sup>, 邹慧琴<sup>1</sup>, 闫永红<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830001)

**[摘要]** 目的: 通过测定金银花的颜色及其有效成分绿原酸和木犀草苷的含量, 将代表颜色的指标值与代表质量的指标值相联系, 探索颜色与有效成分之间的相关性。方法: 采用高效液相色谱法测定 18 批不同产地、采收期、加工方法的金银花样品中绿原酸、木犀草苷的含量, 利用电子感观分析方法(色度计)测量金银花的颜色。结果: 绿原酸的含量与色度测量值 L\* 值呈负相关, 木犀草苷的含量与颜色值之间不存在显著相关关系。结论: 通过该方法对颜色的测量, 快速地判断或预测绿原酸的含量, 其具体机制有待进一步研究。

**[关键词]** 金银花; 绿原酸; 木犀草苷; 颜色; 色度计

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0092-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1734.007.html>

**[网络出版时间]** 2012-07-04 17:34

## Correlation Analysis between Color and Effective Constituents' Contents of *Lonicera japonica*

YANG Xiao-yun<sup>1</sup>, XIAO Xiao<sup>2</sup>, XIONG Yin<sup>1</sup>, LIN Hui<sup>1</sup>, ZOU Hui-qin<sup>1</sup>, YAN Yong-hong<sup>1\*</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Urumqi 830001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the correlation between the color and the contents of effective constituents, including chlorogenic acid and galuteolin, in *Lonicera japonica*. **Method:** High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was applied to determine the contents of chlorogenic acid and galuteolin in *L. japonica*

**[收稿日期]** 20120330(011)

**[第一作者]** 杨晓芸, 在读硕士, 从事中药质量评价与标准研究, Tel: 15901116336, E-mail: yangxiaoyun870608@163.com

**[通讯作者]** \* 闫永红, 教授, 从事中药材品种鉴定、中药质量评价与标准研究. Tel: 010-64286447, E-mail: lxdyyh@yeah.net

[2] Kayoko A, Kazuko Y, Shigenobu A. Triterpenoid saponins of aquifoliaceous plants [J]. Chem Pharm Bull, 1993, 41(1): 77.

[3] Nargis A, Abdul M. Oleanene type triterpenes from *Plumeria rubra* [J]. Phytochemistry, 1993, 32(6): 1523.

[4] Shashi B M, Asish P K. <sup>13</sup>C-NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a complication and some salient features [J]. Phytochemistry, 1994, 37(6): 1517.

[5] 卢汝梅, 廖彭莹, 陆桂枝, 等. 茶藨蒽化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 104

[6] Antonio Z. Synthesis and reactivity of vinyl quinine methides [J]. J Org Chem, 1985, 50: 941.

[7] 徐丹洋, 陈佩东, 张丽, 等. 黄芩的化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 78.

[8] David R L, Milne G W A Milne. Hand book of data on common organic compound (Volume I) [M]. US: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, CRC PRESS, 1995: 573, 571.

[9] 李寅珊, 李冬梅, 蒋凌云, 等. 云南松塔的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 119.

[10] Jakupovic J, Zdero C. Sesquiterpene glycosides and other constituents from *Osteospermum* species [J]. Phytochemistry, 1983, 22(3): 782.

[责任编辑 邹晓翠]

from different habitats, collecting periods and processing methods. The colorimeter was applied to determine the color of *L. japonica*. **Result:** The color index  $L^*$  of *L. japonica* mainly showed a negative correlation with chlorogenic acid while no correlation with galuteolin. **Conclusion:** The obtained method in this study may give insight to quickly estimate and predict the content of chlorogenic acid.

[**Key words**] *Lonicera japonica*; chlorogenic acid; galuteolin; color; colorimeter

金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开的花<sup>[1]</sup>,具有宣散风热、清热解毒等功效,自古被誉为清热解毒的良药。金银花是常用的大宗药材,在我国资源丰富、分布广泛<sup>[2]</sup>,主产于河南、河北、山东等地,现代药理研究表明其具有抗病原微生物、抗病毒、抗炎解热等药理作用。金银花的化学成分主要为有机酸类、黄酮类、挥发油类、皂苷类等<sup>[3]</sup>,目前对金银花质量的评价主要以绿原酸和木犀草苷<sup>[1]</sup>为指标。市售金银花由于产地、加工方法和采收期等因素不同,导致其质量参差不齐,在外观上主要表现为颜色差异大<sup>[4]</sup>,故传统经验鉴别根据金银花外表颜色来判定其质量优劣,这说明颜色是评价其质量优劣的重要指标之一。本文从有效成分含量和颜色两方面研究金银花的质量,应用现代理化手段和仪器测定金银花的有效成分含量,利用色度计测定金银花的颜色,基于研究结果挖掘颜色与内在成分的相关性,并按照2005年版《中国药典》用高效液相色谱法对绿原酸、木犀草苷进行含量测定。

## 1 绿原酸木犀草苷的含量测定

**1.1 材料** Agilent 1100型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),四元泵,DAD检测器,自动进样器,柱温箱,Agilent 1100色谱工作站,Dikma Platisil ODS色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),0.45 μm针筒式微孔滤膜过滤器,BP211D型1/10万电子分析天平(德国赛多利斯开发有限公司),KQ-500DE型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇、磷酸、冰醋酸等(北京化工厂)为分析纯,水为屈臣氏纯净水,绿原酸对照品购自中国药品生物制品检定所,木犀草苷对照品购自北京市药检所,批号分别为11075-200413,111720-200603,收集河南、河北、山东3个金银花GAP基地的样品,包括青花、二白、大白3个采收期以及烘干、晒干、阴干、蒸后烘干、硫磺熏后阴干、微波杀青干燥及滚筒杀青烘干等加工方法共18批(表1),经北京中医药大学闫永红教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花。

表1 河南、河北、山东3个金银花GAP基地样品信息

No.	产地	采收期	产地加工方法	颜色	气味
1	河北巨鹿	青花	烤房烘干	绿色	气清香
2	河北巨鹿	青花	晒干	土黄色、黄棕色且微发红	气清香
3	河北巨鹿	青花	蒙布晒干	绿色	气清香
4	河北巨鹿	青花	阴干	绿色	气清香
5	河北巨鹿	青花	硫磺熏后阴干	黄白色,微发绿	清香并有淡淡的硫磺味道,嚼之发酸
6	河北巨鹿	青花	蒸1 min 烘干	绿色或深绿色	有浓郁的清香味
7	河北巨鹿	青花	蒸3 min 烘干	绿色或深绿色	有浓郁的清香味
8	河北巨鹿	青花	蒸5 min 烘干	绿色或深绿色	有浓郁的清香味
9	河北巨鹿	青花	蒸7 min 烘干	绿色或深绿色	有浓郁的清香味
10	河北巨鹿	青花	蒸10 min 烘干	绿色或深绿色	有浓郁的清香味
11	河北巨鹿	大白	烤房烘干	黄白色、淡黄白色	淡淡的清香
12	河北巨鹿	二白	烤房烘干	绿白色、黄绿色	淡淡的清香
13	山东平邑	二白	微波杀青烘干	绿色	气清香
14	山东平邑	二白	滚筒杀青烘干	绿色	气清香
15	山东平邑	二白	烤房烘干	黄白色	气清香,有淡淡的硫磺味,嚼之发酸
16	山东平邑	二白	硫磺熏后烘干	黄绿色	气清香
17	河南封丘	二白	烤房烘干	黄绿色	气清香
18	河北巨鹿	三茬青花	烤房烘干	绿色	气清香

## 1.2 方法

### 1.2.1 色谱条件 测定绿原酸时以乙腈-0.4%磷

酸溶液(13:87)为流动相,流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长  $327 \text{ nm}$ ,进样量  $10 \text{ } \mu\text{L}$ ,柱温  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ 。测定木犀草苷时以乙腈为流动相 A,以 0.5% 冰醋酸溶液为流动相 B,(0~30 min,从 10%~30% A),流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长  $350 \text{ nm}$ ,进样量  $10 \text{ } \mu\text{L}$ ,柱温  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ 。每份样品重复测定 3 次,取平均值。

**1.2.2 供试品溶液的制备** 精密称取金银花样品粉末 0.5 g,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加 50% 的甲醇 50 mL,超声处理(250 W)30 min,放冷后称定补重,摇匀后过滤,精密量取续滤液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀即得绿原酸供试品溶液。另精密称取金银花粉末 3 g,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 50 mL,超声处理(250 W)1 h,提取液放冷称定补重,摇匀后过滤,取续滤液即得木犀草苷供试品溶液。

**1.2.3 对照品溶液的配制** 精密称取绿原酸、木犀草苷对照品 2.55, 2.03 mg,分别加入 50% 甲醇、70% 乙醇配制成质量浓度为  $0.051, 0.040 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。

**1.2.4 线性关系的考察** 按照 1.2.1 项下的色谱条件,将配制的绿原酸品分别进样 4, 7, 10, 13, 17,  $20 \text{ } \mu\text{L}$ ,记录峰面积,以进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ ),绘制标准曲线,得回归方程  $Y = 1547.3X - 3.1868 (R = 1)$ 。表明绿原酸在  $0.2 \sim 1.0 \text{ } \mu\text{g}$  线性关系良好。

**1.3 结果** 见表 2。

表 2 18 批金银花绿原酸、木犀草苷含量测定 %

No.	绿原酸	木犀草苷	No.	绿原酸	木犀草苷
1	2.52	0.046	10	3.97	0.047
2	2.25	0.053	11	1.42	0.05
3	2.38	0.055	12	1.98	0.06
4	2.21	0.052	13	3.58	0.043
5	3.72	0.044	14	3.44	0.042
6	4.21	0.046	15	2.93	0.048
7	4.51	0.053	16	3.31	0.033
8	4.00	0.050	17	2.81	0.040
9	4.39	0.048	18	1.92	0.03

注:含量测定均按 2005 年版《中国药典》要求测定,绿原酸含量不得低于 1.5%,木犀草苷含量不得低于 0.10%。11 号样品的绿原酸含量低于药典规定。

## 2 颜色的测定

**2.1 材料** U-3010 型紫外分光光度计(带有积分球及色度分析软件),自制测色皿,BP211D 型 1/100 电子分析天平(德国赛多利斯),18 批不同来源的金

银花样品(同表 1)。

**2.2 供试品的制备** 取金银花样品粉末,过 4 号筛,称取约 2 g 样品,装入自制的测色皿中,直至把测色皿装满为标准,盖上玻片用自封膜封口,备用。

**2.3 色度测量条件** 起止波长  $780 \sim 380 \text{ nm}$ ,扫描速度  $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ,狭缝宽度  $1 \text{ nm}$ ,照明光源  $D_{65}$ ,视场选择 10 度视角。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度考察** 取河北青花烘干样品约 2 g,装入自制测色皿中,照供试品的制备方法制备供试品,并按照色度测量方法进行样品颜色测量,连续测量 6 次,分别得出颜色  $L^*, a^*, b^*$  值,3 个值的 RSD 均  $< 3\%$ ,表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性考察** 取河北青花烘干样品,按照供试品的制备方法制备供试品 6 份,并按照色度测量方法进行样品颜色测量,6 次测量分别得出的颜色  $L^*, a^*, b^*$  值的 RSD 均  $< 3\%$ ,表明方法重复性良好。

**2.5 结果分析** 见表 3。 $L^*$  代表明度, $L^*$  值越大,说明明度越高,感觉越白, $L^*$  值越小则感觉越黑。 $a^*$  为红绿色品值, $a^*$  值有两个方向, $+a^*$  是红方向, $-a^*$  是绿方向, $-a^*$  的值越小,颜色越绿,从  $a^*$  值的大小就可以大致判断金银花偏绿的程度。 $b^*$  值也有两个方向, $+b^*$  是黄方向, $-b^*$  是蓝方向。通过方差分析可知, $L^*, a^*$  的  $P < 0.0001$ ,按照  $\alpha = 0.05$  的区间,统计结果显示不同组  $L^*$  值和  $a^*$  值都有显著性差别,说明  $L^*, a^*$  对颜色分类结果贡献多,意义较大;而  $b^*$  值方差分析结果  $P = 0.2876$ ,按照  $\alpha = 0.05$  的区间,统计结果说明不同组之间  $b^*$  值差异不显著,说明颜色分类和  $b^*$  值无明显相关性。因此,选用与颜色相关性较大的  $L^*, a^*$  作为判断金银花颜色类别的指标,

表 3 18 批金银花样品颜色测量值

No.	$L^*$	$a^*$	$b^*$	No.	$L^*$	$a^*$	$b^*$
1	81.2463	-3.4460	21.6894	10	82.0448	-2.6719	20.1108
2	85.2590	-1.0488	21.5274	11	89.6309	-0.7707	21.4291
3	83.6144	-4.1898	23.1893	12	86.1000	-2.1970	21.0711
4	83.6930	-5.0731	22.8940	13	81.0269	-4.1802	23.5964
5	85.3808	-2.4486	20.6380	14	81.9375	-4.3281	23.2611
6	81.0072	-3.4371	23.0539	15	81.4836	-1.5237	22.7447
7	81.4596	-3.1790	22.0524	16	85.4254	-2.0164	22.5071
8	81.7790	-3.4742	21.6235	17	80.2149	-0.9333	20.6005
9	82.0256	-2.8447	19.6739	18	82.2270	-4.6835	22.3992

对 18 批金银花颜色再次进行聚类分析。另外根据人眼对 18 批金银花颜色的观察评价,初步将 18 批金银花分成 5 类颜色,分别是深绿色、绿色、黄绿色、黄白色、淡黄白色。结果显示按  $L^*$ ,  $a^*$  值为聚类特征值进行的颜色聚类结果和视觉感受将样品按不同颜色分类结果基本一致,故结合人工目测对颜色感觉的差异将描述样品颜色的  $L^*$ ,  $a^*$  值进行分类,结果见表 4。

表 4 金银花视觉颜色与  $L^*$ ,  $a^*$  的对比

颜色	$L^*$	$a^*$
深绿色	81.00 ~ 82.04	-3.47 ~ -2.67
绿色	82.22 ~ 83.93	-5.07 ~ -4.18
黄绿色	80.21 ~ 81.48	-1.52 ~ -0.93
黄白色	85.25 ~ 86.10	-2.44 ~ -1.04
淡黄白色	≈89.63	≈ -0.77

### 3 金银花有效成分含量与颜色值相关性分析

将金银花有效成分绿原酸、木犀草苷的含量(表 1)分别与颜色指标值  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  相关联,用 SPSS 软件做相关分析,各成分与  $L^*$  相关结果见表 5。说明绿原酸含量与明度值  $L^*$  的相关系数为 -0.564,双尾检验的概率  $P = 0.015 < 0.05$ ,说明绿原酸含量与  $L^*$  值在 0.05 水平上有显著的相关关系,不相关几率为 0.015。从相关系数可以看出,  $L^*$  值与绿原酸含量呈负相关,说明在一定程度上  $L^*$  值越小,绿原酸含量越高。而木犀草苷与明度值  $L^*$  的相关系数为 0.396,双尾检验概率  $P = 0.103 > 0.05$ ,说明木犀草苷和  $L^*$  值不存在显著相关关系。经分析绿原酸与  $a^*$ ,  $b^*$  均无显著相关性,因此这里略去绿原酸与  $a^*$ ,  $b^*$  的相关系数表。

表 5 绿原酸、木犀草苷与  $L^*$  值相关系数

成分	相关性	绿原酸	$L^*$ 值	成分	相关性	木犀草苷	$L^*$ 值
绿原酸	皮尔逊相关	1	-0.564(*)	木犀草苷	皮尔逊相关	1	0.396
	双尾检验率		0.015		双尾检验率		0.103
	N	18	18		N	18	18
$L^*$ 值	皮尔逊相关	-0.564(*)	1	$L^*$ 值	皮尔逊相关	0.396	1
	双尾检验率		0.015		双尾检验率		0.103
	N	18	18		N*	18	18

注: \* 相关检验显著性在 0.05 水平(双尾检验)。

### 4 讨论

通过测定 18 批金银花有效成分绿原酸、木犀草苷的含量及颜色  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  值,将有效成分的含量与颜色值做相关分析,得出金银花中绿原酸的含量与  $L^*$  值存在显著的相关关系,且为负相关,说明在所取样品中  $L^*$  值越小则绿原酸含量越高。但通过结果分析,木犀草苷的含量与颜色值之间不存在显著性相关关系,故  $L^*$  值仅限于预测绿原酸的含量范围。所测样品当中,11 号样品的绿原酸含量最低且低于药典规定,其  $L^*$  值为最大,即为淡黄白色,传统鉴别也认为其质量最差。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010.
- [2] 中国科学院北京植物研究所.中国高等植物图鉴.第 4 册[M].北京:科学出版社,1975:296,758.
- [3] 张守平,辛宁,王柳萍.金银花化学成分及质量控制研究进展[J].中国中医药信息杂志,2007,14(3):84.
- [4] 邵林,郭庆梅,冉蓉.山东金银花 HPLC 指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):222.

[责任编辑 邹晓翠]