

玫瑰花醇提部位荧光特性研究

蒋朝辉^{1,2}, 石振萍¹, 邵士俊^{2*}, 杨扶德^{1*}, 冯金梁³

(1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000;
3. 甘肃康乐药业有限责任公司, 兰州 730300)

摘要: 目的 建立荧光光谱法测定玫瑰花醇提部位荧光特性的研究方法。**方法** 采用荧光分析法结合紫外光谱测定玫瑰花醇提部位的光谱特征, 并对浓度、温度以及放置时间等因素对荧光特性的影响进行研究。

结果 玫瑰醇提部位在 Ex 287 nm/ Em 364 nm 存在一荧光特征峰, 其荧光强度受浓度影响较大, 在 0.1~0.4 mg/mL 浓度范围内, 荧光强度随浓度的增大而增强; 玫瑰花醇提部位荧光强度随温度的升高而降低; 此外, 在 48 h 内, 其荧光强度较为稳定。**结论** 玫瑰花醇提部位存在明显的荧光特征峰, 且甘肃、山东及贵州 3 个不同产地荧光特征峰在强度上存在一定差异, 为进一步完善玫瑰花药材质量评价系统提供了理论基础。

关键词: 玫瑰花; 三维荧光光谱; 荧光特性; 质量评价

Study on fluorescence characteristics of ethanol extract from rosae rugosae flos

JIANG Zhao-Hui^{1,2}, SHI Zhen-Ping¹, SHAO Shi-Jun^{2*}, YANG Fu-De^{1*}, FENG Jin-Liang³

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;
2. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;
3. Gansu Kangle Pharmaceutical Co., Ltd, Lanzhou 730300, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determining the fluorescence characteristics of rosae rugosae flos ethanol extract by fluorescence spectrometry. **Methods** The spectral characteristics of rosae rugosae flos ethanol extract were determined by fluorescence analysis combined with ultraviolet spectroscopy, and the effects of concentration, temperature and placing time on the fluorescence characteristics were studied. **Results** There was a characteristic fluorescence peak at Ex 287 nm/ Em 364 nm at the ethanol extract site of rosae rugosae flos. The fluorescence intensity was greatly affected by the concentration. In the concentration range of 0.1–0.4 mg/mL, the fluorescence intensity was enhanced with the increase of concentration. The fluorescence intensity of rosae rugosae flos ethanol extract decreased with the increase of temperature. In addition, the fluorescence intensity was relatively stable within 48 h. **Conclusion** There are significant fluorescence characteristic peaks in the ethanol extract part of

基金项目: 甘肃省科技小巨人企业培育计划项目(17CXIJA084)、2018年度甘肃省委组织部人才发展专项资金项目[甘组(2018)23号]、2018年兰州市人才创新创业科技计划项目(2017-RC-112)、中科院兰州化物所“十三五”135重大突破项目(2016-2020)

Fund: Supported by the Gansu Province Science and Technology Small Giant Enterprise Cultivation Program Project (17CXIJA084), 2018 Gansu Provincial Committee Organization Department Talent Development Special Fund Project [Gan Group (2018)23], Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Technology Programme 2018 (2017-RC-112), and "13th Five-Year Plan" 135 Major Breakthrough Project of Lanzhou Institute of Chemical Physics, CAS (2016-2020)

*通信作者: 邵士俊, 研究员, 主要研究方向为分子识别与分离分析方法。E-mail: sjshao@licp.cas.cn

杨扶德, 教授, 主要研究方向为中药品质及中药材规范化栽培。E-mail: gszyyfd@163.com

*Corresponding author: SHAO Shi-Jun, Professor, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, 18 Tianshui Middle Road, Chengguan District, Lanzhou City 730000, China. E-mail: sjshao@licp.cas.cn

YANG Fu-De, Professor, Gansu University of Chinese Medicine, 35 Dingxi East road, Chengguan District, Lanzhou City 730000, China. E-mail: gszyyfd@163.com

rosae rugosae flos, and there are some differences in fluorescence characteristic peaks from 3 different origins, Gansu, Shandong and Guizhou. It provides a theoretical basis for further improving the quality evaluation system of rose.

KEY WORDS: rosae rugosae flos; three-dimensional fluorescence spectrum; fluorescence characteristics; quality evaluation

0 引言

玫瑰花药材来源于蔷薇科植物玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.), 于春末夏初花将开放时分批采摘, 经低温干燥即得。本品味甘、微苦、性温; 具有行气解郁、和血、止痛的功效; 常用于治疗肝胃气痛、食少呕恶、月经不调、跌扑伤痛等症^[1]。研究表明, 玫瑰花中含有挥发油^[2]、黄酮^[3]、酚酸^[4]、色素^[5]、氨基酸以及微量元素^[6]等多种人体新陈代谢所需的营养物质。其中, 部分黄酮^[7]、色素^[8]及氨基酸^[9]等成分具有良好的荧光特性。三维荧光光谱可以同时反映荧光强度随发射波长与激发波长变化的情况, 能够提供更加完整的被测样品荧光光谱信息^[10]。目前, 三维荧光技术主要应用于中药材真伪鉴别、成分分析及指纹图谱^[11-15]等研究。本研究利用三维荧光光谱结合紫外光谱技术, 对玫瑰花醇提部位的荧光特性及其影响因素进行考察, 并对其荧光成分进行初步推断, 以期对玫瑰花质量评价方法的完善提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Fluorolog-3 稳态/瞬态荧光光谱仪(日本 HORIBA 公司); Lambda 35 紫外可见分光光度计(美国 PerkinElmer 公司); 元素型 1860 d 超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司); WB-2000 型恒温水浴锅(郑州长城科工贸有限公司); FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

玫瑰花样品经甘肃中医药大学杨扶德教授鉴定为蔷薇科植物玫瑰 *Rosa rugosa* Thunb. 的干燥花蕾; 无水乙醇(分析纯, 天津医药化学有限公司); 水为超纯水。

1.2 供试品溶液制备

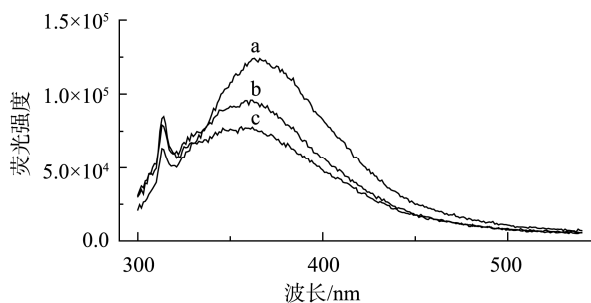
将不同产地玫瑰花样品粉碎后过 65 目筛, 分别称取 1.0 g 于三角瓶中, 加入 50 mL 无水乙醇, 超声提取 30 min(超声功率 240 W, 频率 40 kHz), 抽滤, 收集滤液, 用无水乙醇定容于 100 mL 容量瓶中, 所得溶液即为每毫升含 10 mg 原药材的母液(质量浓度 10 mg/mL), 用时适当稀释。

2 方法与结果

2.1 激发与发射波长确定

取 1.2 项下样品溶液适量, 稀释至一定浓度, 利用

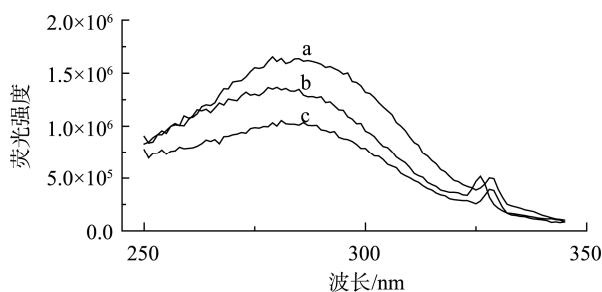
Fluorolog-3 稳态/瞬态荧光光谱仪进行测定, 三维荧光光谱测试条件为: 激发波长(λ_{Ex}): 250~550 nm、发射波长(λ_{Em}): 300~580 nm、采样间隔 10 nm、狭缝 2 nm、积分时间 0.2 s。结果如图 1、2 所示。最终确定其最佳发射波长 E_m 为 364 nm, 最佳激发波长 E_x 为 287 nm。



注: a.甘肃; b.山东; c.贵州。

图1 不同产地玫瑰花发射光谱

Fig.1 Emission spectra of rosae rugosae flos from different habitats



注: a.甘肃; b.山东; c.贵州。

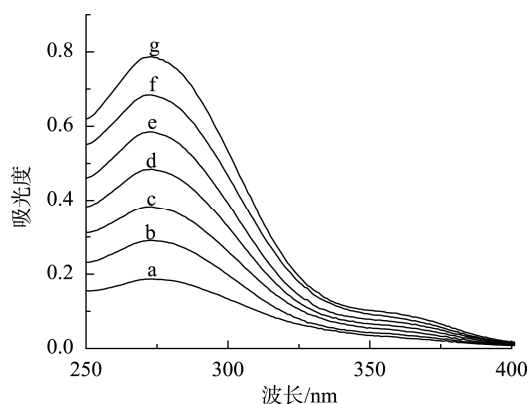
图2 不同产地玫瑰花激发光谱

Fig.2 Excitation spectra of rosae rugosae flos from different habitats

2.2 影响因素考察

2.2.1 浓度对荧光特性的影响

溶液浓度是影响其荧光特性的重要因素之一, 以苦水玫瑰花醇提液为例, 考察浓度对其荧光特性的影响。取 1.2 中母液适量, 分别配制质量浓度为 0.0、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 mg/mL 的溶液, 对其进行紫外光谱及三维荧光扫描。结果见图 3、图 4。



注: a. 0.1 mg/mL; b. 0.15 mg/mL; c. 0.2 mg/mL; d. 0.25 mg/mL; e. 0.3 mg/mL; f. 0.35 mg/mL; g. 0.4 mg/mL。

图3 不同质量浓度玫瑰醇提液紫外光谱图

Fig.3 UV spectra of rosae rugosae flos ethanol extracts at different mass concentrations

由图3可知,不同质量浓度苦水玫瑰醇提液紫外吸收强度在0.1~0.4 mg/mL质量浓度范围内与样品溶液浓度成正比,且在275 nm处有较强的紫外吸收。三维荧光光谱图如图4所示,在0.1~0.4 mg/mL范围内,其荧光强度随浓度的增大而增强;当浓度小于0.1 mg/mL时,溶液中具有荧光的物质含量过低,不利于其荧光强度的测定;而当浓度大于0.4 mg/mL时,由于溶液浓度过大会产生内滤效应,苦水玫瑰醇提液的荧光强度急速减小,导致实验数据存在一定的误差。因此,实验选用质量浓度为0.25 mg/mL的溶液对后续条件进行考察。

2.2.2 温度对荧光特性的影响

将1.2中供试品母液稀释至0.25 mg/mL,平行配制3份,分别在30、40、50、60、70、80、90℃水浴锅中静置5 min后于 Em 364 nm/ Ex 287 nm测定其荧光强度。结果表明,随着温度的升高,样品溶液的荧光强度逐渐降低,因此,选用30℃为最佳测试温度,实验结果见图5。

2.2.3 放置时间对荧光特性的影响

将新配制的苦水玫瑰醇提液稀释至0.25 mg/mL,平行配制3份,分别于0、1、2、4、8、24、48 h测定其荧光强度,由于荧光光谱仪灵敏度较高,使得实验结果存在一定的误差。实验数据表明,其荧光强度变化值相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.26%,小于2.0%,故苦水玫瑰醇提液荧光强度在48 h内比较稳定,结果见表1。

2.3 不同产地玫瑰花醇提部位光谱特征

将不同产地玫瑰花醇提液分别稀释为每毫升含0.25 mg原药材的溶液,在 Ex 250~550 nm/ Em 300~580 nm范围内进行三维荧光扫描,得不同产地玫瑰花醇提部位三维荧光图,见图6。图中横坐标为发射波长 λ_{Em} ,纵坐标为

激发波长 λ_{Ex} ,不同颜色表示荧光强度。结果表明:甘肃永登、山东平阴及贵州兴仁地区玫瑰药材醇提液在本研究条件下具有1个荧光峰,且其荧光特征峰均位于 Em 364 nm/ Ex 287 nm处,荧光峰强度顺序如下:甘肃永登>山东平阴>贵州兴仁。不同产地玫瑰花药材化学成分相近,因此其荧光特性也存在一定的相似性,但因为栽培产地的不同,同种化学成分在含量上存在一定的差异,可直接从三维荧光图谱的荧光强度上反映出来。为利用三维荧光技术对不同产地玫瑰花样品鉴别的初步研究提供理论依据。

表1 不同放置时间苦水玫瑰醇提液荧光强度
Table 1 Fluorescence intensity of bitter water rosae rugosae flos ethanol tinge at different placement times

时间/h	荧光强度			平均值	RSD/%
	1	2	3		
0	94604.92	90246.67	94953.06	93268.21	
1	97183.76	93483.12	97583.48	96083.45	
2	100033.40	93122.08	94411.50	95855.66	
4	100433.10	90607.71	96590.63	95877.15	1.26
8	100458.90	97970.31	98692.38	99040.53	
24	99517.61	93715.21	96809.83	96680.89	
48	102367.20	93160.76	98163.72	97897.24	

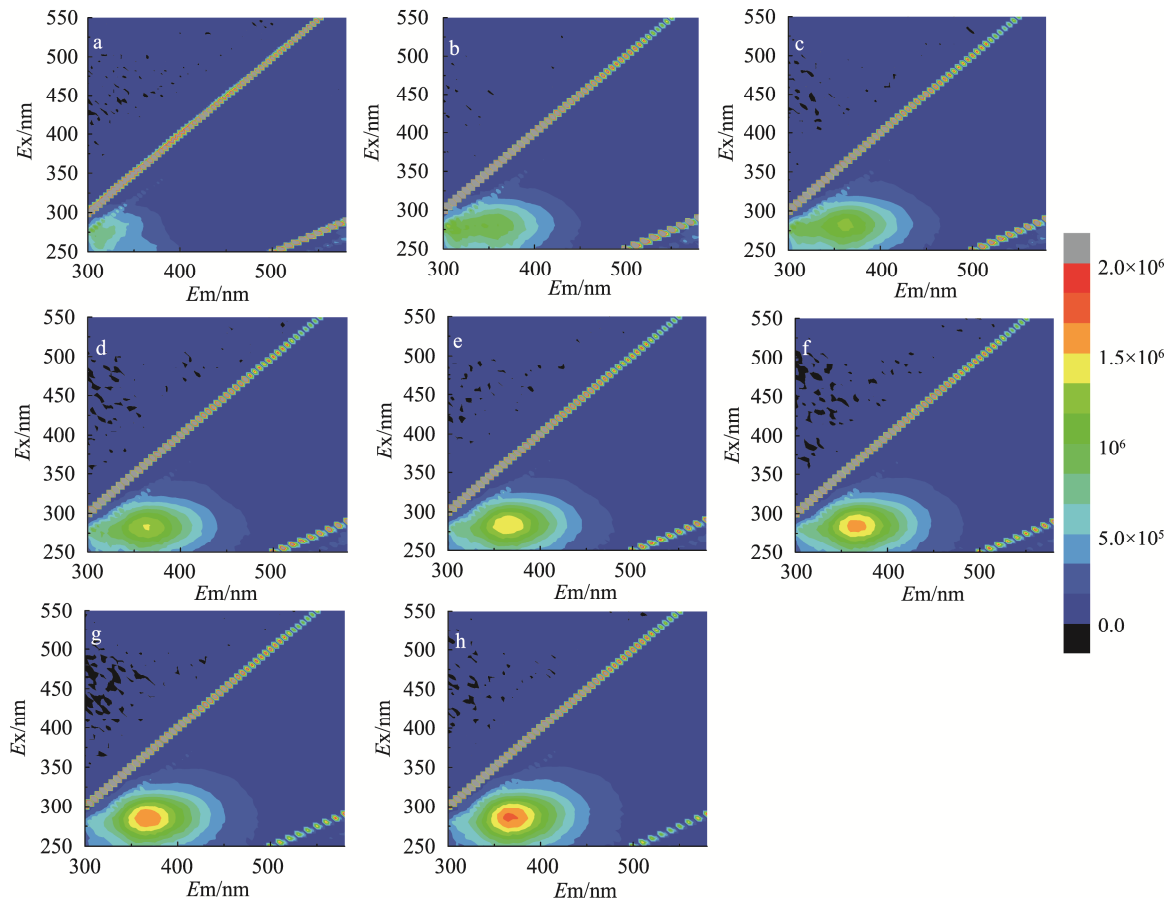
2.4 荧光峰初步推断

根据文献^[16-17]可知,氨基酸类物质在 Ex 250~300 nm/ Em 300~350 nm左右出峰,其中酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸是目前发现的具有荧光性能的天然氨基酸。戴迪等^[18]研究发现,酪氨酸在 Ex 240~280 nm/ Em 300~325 nm处出峰,与苦水玫瑰醇提液的峰位置 Em 320 nm/ Ex 280 nm接近,初步推断玫瑰花醇提液中荧光成分为酪氨酸。

3 分析与讨论

本研究利用三维荧光光谱技术对不同产地玫瑰花荧光特性进行探究,发现甘肃永登、山东平阴及贵州兴仁三大产区样品荧光特征峰均位于 $Ex/Em=280$ nm/320 nm附近,且荧光强度甘肃永登>山东平阴>贵州兴仁,表明不同产区玫瑰花样品化学物质基础一致,但各成分含量差异较大。

物质产生荧光的能力主要取决于其分子结构,但环境因素对分子荧光可能产生强烈的影响^[10]。本研究结果表明,玫瑰花醇提液在0.1~0.4 mg/mL质量浓度范围内具有良好的荧光特性,且其荧光强度与浓度之间表现出正相关。研究中,当溶液质量浓度小于0.1 mg/mL或大于0.4 mg/mL时,其荧光强度都会产生明显减弱的现象,是由于浓度过小时,溶液中荧光物质含量低,使检测到的荧



注: a. 0 mg/mL; b. 0.1 mg/mL; c. 0.15 mg/mL; d. 0.2 mg/mL; e. 0.25 mg/mL; f. 0.3 mg/mL; g. 0.35 mg/mL; h. 0.4 mg/mL。

图 4 不同浓度玫瑰醇提液三维荧光光谱图

Fig.4 Three-dimensional fluorescence spectra of rosae rugosae flos ethanol extracts at different concentrations

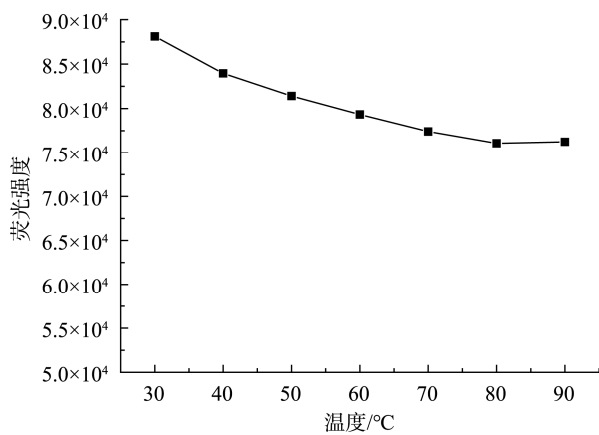
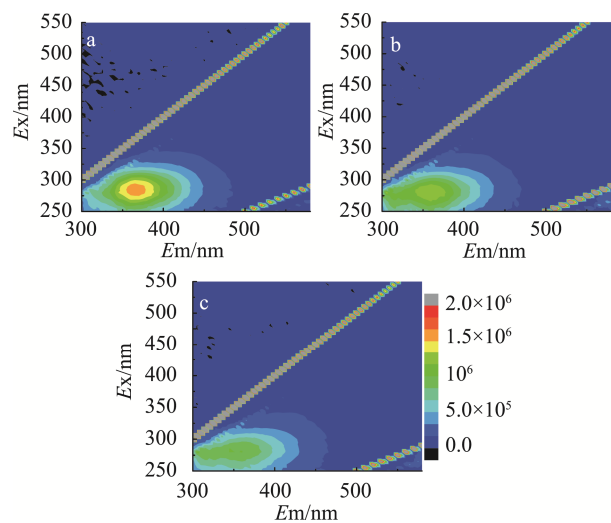


图 5 不同温度玫瑰醇提液荧光强度

Fig.5 Fluorescence intensity of ethanol extract of rosae rugosae flos at different temperature



注: a. 甘肃永登; b. 山东平阴; c. 贵州兴仁。

图 6 不同产地玫瑰花三维荧光图

Fig.6 Three-dimensional fluorescence of rosae rugosae flos from different habitats

光强度减弱;而溶液浓度过大时,则会产生内滤效应,从而导致其荧光强度的急速衰减,即当溶液浓度过高时,入射光被样品池前部荧光物质强烈吸收后,会使得样品池中后部的荧光物质受到的入射光大幅减弱,从而导致荧光强度下降,或溶液浓度过高时,溶液中的杂质对入射光吸收作用增大,使得用于激发荧光物质的发光强度降低。

荧光强度对温度的变化比较敏感,一般情况下,溶液的荧光强度随温度的降低而增强^[10]。本研究结果表明,在 30~90 °C 范围内,玫瑰花醇提液荧光强度与温度呈负相关。出现该现象的主要原因是分子内部能量发生转化,当激发态分子接受额外热能时,使激发能转化为基态的振动能,随后迅速产生振动弛豫而丧失振动能量,从而导致荧光强度的降低;另外,随着温度升高,溶液介质粘度减小,荧光物质与溶剂分子间的碰撞频率也随之增加,增大了外转换的去活几率,因而出现荧光强度随温度降低的现象^[19]。

4 结 论

中药材质量控制是保证药物疗效与用药安全性的关键,目前,玫瑰花药材尚缺乏系统完整的质量评价方法。经三维荧光光谱测试发现,不同产地玫瑰花药材醇提液均在 $Ex/Em=280\text{ nm}/320\text{ nm}$ 附近有一荧光特征峰,荧光强度甘肃永登>山东平阴>贵州兴仁,表明不同产地玫瑰花具有相同的物质基础,但各成分含量存在一定的差异;研究通过测定不同影响因素对苦水玫瑰醇提部位荧光强度的影响,发现在 0.1~0.4 mg/mL 浓度范围内,其荧光强度随浓度的增大而增强;由于温度是影响分子内部能量转化的主要作用,一般情况下,荧光强度随温度的升高而降低,与本研究所得结果一致。本研究建立了荧光光谱法测定玫瑰花醇提部位荧光特性的研究方法,该方法选择性好、灵敏度高、操作简单,为进一步完善玫瑰花药材质量评价系统提供了理论基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2015.
- [2] 宋佳, 孟庆华, 潘仙华. 玫瑰精油化学成分与香型特征的相关性研究[J]. 香料香精化妆品, 2018, (1): 5-12, 19.
SONG J, MENG QH, PAN XH. Study on the correlation between chemical constituents and aromatic characteristics of rose oil [J]. Flavour Frag Cosmet, 2018, (1): 5-12, 19.
- [3] 王刚, 姚雷, 李正娟. 利用苦水玫瑰花渣提取总黄酮可行性分析[J]. 上海农业科技, 2019, (2): 35-37, 45.
WANG G, YAO L, LI ZJ. Feasibility analysis of extracting total flavonoids from rose dregs [J]. Shanghai Agric Sci Technol, 2019, (2): 35-37, 45.
- [4] 何佳, 张波, 陆秀云, 等. 超高效液相色谱法测定苦水玫瑰 10 种酚酸化合物[J]. 食品与发酵科技, 2019, 55(3): 100-105.
HE J, ZHANG B, LU XY, *et al.* Determination of 10 phenolic acid compounds in *Rosa rugosa* by high-performance liquid chromatography [J]. Food Ferment Sci Technol, 2019, 55(3): 100-105.
- [5] 杨盛鑫. 中国苦水玫瑰精油加工过程废水中玫瑰红色素的回收工艺研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2015.
YANG SX. Study on the recovery of rose red pigment from the wastewater of the Chinese bitter water rose essential oil processing [D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2015.
- [6] 马学毅, 陈耀祖. 苦水玫瑰化学成分的研究(第四报)-氨基酸和微量元素的分析[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1986, 22(3): 96-99.
MA XY, CHEN YZ. Studies on the chemical constituents of *Rosa rugosa* (IV)-analysis of amino acids and micronutrient [J]. J Lanzhou Univ (Nat Sci Ed), 1986, 22(3): 96-99.
- [7] 赵进洲. 荧光法快速检测氨基酸的含量及应用[D]. 新乡: 河南师范大学, 2016.
ZHAO JZ. Determination of amino acids by fluorescence spectrophotometry and its application [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2016.
- [8] 李文红. 黄酮类化合物荧光性质与分析方法研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2016.
LI WH. A study on the fluorescent properties and analytical methods of flavonoid [D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2016.
- [9] 刘松, 杨莉, 李福成, 等. pH 对玫瑰红色素紫外和荧光光谱的影响[J]. 化学研究与应用, 2009, 21(1): 127-130.
LIU S, YANG L, LI FC, *et al.* Effect of pH on UV and fluorescence spectra of rose pigment [J]. Chem Res Appl, 2009, 21(1): 127-130.
- [10] 陈国珍. 荧光分析法(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
CHEN GZ. Fluorescence analysis (second edition) [M]. Beijing: Science Press, 1990.
- [11] 姚杰, 魏永巨, 孙体健. 三维荧光指纹图谱用于鉴别真伪厚朴的研究[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(12): 1521-1522.
YAO J, WEI YJ, SUN TJ. Study on identification of genuine magnolia officinalis by three-dimensional fluorescence fingerprint [J]. Chin Remed Clin, 2013, 13(12): 1521-1522.
- [12] 白燕, 林玉婷, 孙宏元, 等. 大飞扬草的三维荧光光谱研究[J]. 农产品加工, 2019, (1): 11-12, 17.
BAI Y, LIN YT, SUN HY, *et al.* Three-dimensional fluorescence spectrums of *euphorbia hirta* lim water extracts [J]. Farm Prod Process, 2019, (1): 11-12, 17.
- [13] 张举成, 陶汝同, 封永珍, 等. 固体三维荧光指纹图谱在三七品质鉴定中的应用[J]. 中药材, 2014, 37(8): 1364-1368.
ZHANG JC, TAO RT, FENG YZ, *et al.* Solid 3D fluorescent fingerprint map in the application of three or seven quality identification [J]. J Chin Med Mater, 2014, 37(8): 1364-1368.
- [14] 樊凤杰, 轩凤来, 白洋, 等. 基于三维荧光光谱特征的中药药性模式识别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(6): 1763-1768.
FAN FJ, XUAN FL, BAI Y, *et al.* Research on the identification of Chinese medicine patterns based on the characteristics of three-dimensional fluorescence spectroscopy [J]. Spectrosc Spectral Anal, 2020, 40(6): 1763-1768.
- [15] 杨莉, 刘德龙, 魏永巨. 三维荧光结合二阶校正法测定绞股蓝中槲皮

素含量[J]. 分析测试学报, 2014, 33(9): 1038–1043, 1049.

YANG L, LIU DL, WEI YJ. Three-dimensional fluorescence combined with second-order correction to determine the content of quercetin in strand blue [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(9): 1038–1043, 1049.

- [16] 白雪梅, 田嘉铭, 王德宝. 高效液相色谱法测定枸杞子中氨基酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(8): 742–743.

BAI XM, TIAN JM, WANG DB. High-efficiency liquid chromatography determines the amount of amino acids in tweezers [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2005, 16(8): 742–743.

- [17] 赵方方. 几种非芳香族氨基酸荧光性质及其影响因素的研究[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2015.

ZHAO FF. Study on the fluorescence properties of several non-aromatic amino acids and their influencing factors [D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science and Technology, 2015.

- [18] 戴迪, 靳贵林, 崔治家, 等. 枸杞子水提部位荧光特性研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(7): 79–83.

DAI D, JIN GL, CUI ZJ, *et al.* Study on the fluorescence characteristics of water-extracted parts of Chinese wolfberry [J]. Chin J Inform Tradit Chin Med, 2019, 26(7): 79–83.

- [19] 李红军, 何雄奎, 曾爱军, 等. 环境因素对荧光素钠溶液荧光强度的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2008, (1): 49–51, 63.

LI HJ, HE XK, ZENG AJ, *et al.* The influence of environmental factors on the fluorescence intensity of sodium fluorescein solution [J]. J Jilin Agric Univ, 2008, (1): 49–51, 63.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



蒋朝辉, 硕士, 主要研究方向为中药品质。

E-mail: 429437205@qq.com



杨扶德, 教授, 主要研究方向为中药品质及中药材规范化栽培。

E-mail: gszyyfd@163.com



邵士俊, 研究员, 主要研究方向为分子识别与分离分析方法。

E-mail: sjshao@licp.cas.cn