

# UPLC-QE-MS 结合 UPLC 表征绿萼梅不同发育时期的成分差异及抗氧化活性研究

吴瑞<sup>1</sup>, 杨亚滢<sup>1</sup>, 钱程程<sup>1</sup>, 张伟<sup>1,2</sup>, 欧金梅<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>安徽中医药大学药学院; <sup>2</sup>中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 合肥 230012;

<sup>3</sup>道地药材国家重点实验室, 北京 100700

**摘要:**梅花为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 绿萼梅为临床入药的主要品种。该研究为明确不同发育时期绿萼梅的化学组成及差异, 采用超高效液相色谱-四级杆静电场轨道阱质谱 (UPLC-QE-MS) 检测其化学组成, 共检测得到 328 个化合物, 包含 67 个黄酮、50 个苯丙素、104 个萜类、26 个酚类、24 个生物碱、11 个有机酸及其衍生物、8 个氨基酸衍生物及其他 38 个化合物。半定量结果显示绿萼梅中主要化学成分的含量随发育时期呈逐渐下降趋势。采用紫外-可见分光光度法对不同发育时期绿萼梅样品中总黄酮和总苯丙素含量进行测定, 采用 UPLC 法测定不同发育时期 8 个指标性成分 (新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸 B、槲皮苷) 含量, 分析结果表明花蕾期与全开期之间成分含量差异显著, 绿原酸可作为不同发育时期之间的差异质量标志物。DPPH 自由基清除法检测不同发育时期绿萼梅的抗氧化活性, 结果表明抗氧化能力与其成分含量密切相关, 且随着花的发育逐渐减弱。该文结果可为梅花的化学成分动态变化规律和最佳采收期的确定提供分析方法和数据支撑。

**关键词:** 绿萼梅; 发育时期; 黄酮; 苯丙素; 抗氧化活性; 绿原酸

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)11-1915-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.11.010

## Compositional differences of Mume Flos at different developmental periods by UPLC-QE-MS and UPLC and their antioxidant activity

WU Rui<sup>1</sup>, YANG Ya-tian<sup>1</sup>, QIAN Cheng-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1,2</sup>, OU Jin-mei<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine;

<sup>2</sup>Anhui Key Laboratory of New Manufacturing Technology of Chinese Medicine Pieces, Hefei 230012, China;

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China

**Abstract:** Mume Flos is the dried flower bud of *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. in the Rosaceae family, and the *Prunus mume* "Lve" is the main species used in clinical medicine. In this study, the chemical composition of Mume Flos was determined by ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole electrostatic field orbitrap mass spectrometry (UPLC-QE-MS) at different developmental periods. A total of 328 compounds were detected, including 67 flavonoids, 50 phenylpropanoids, 104 terpenoids, 26 phenols, 24 alkaloids, 11 organic acids and their derivatives, 8 amino acid derivatives and 38 others. The semi-quantitative results showed a gradual decrease in the content of the main chemical constituents in Mume Flos with the developmental period. The content of the total flavonoid and phenylpropanoid was determined by UV-Vis spectrophotometry in Mume Flos samples at different developmental periods. The content of eight indicator components (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, hyperoside, isoquercitrin, isochlorogenic acid B and quercitrin) at different developmental periods was determined by UPLC, the results of the analysis showed significant differences in the content of components between the bud period (HL) and the full-opening period (QK) and that chlorogenic acid could be used as a marker

收稿日期: 2023-03-29 接受日期: 2023-07-24

基金项目: 名贵中药资源可持续利用能力建设项目 (2060302); 安徽道地主产药材药效物质基础研究 (RZ2100000757); 安徽中医药大学人才项目 (2021rcyb011)

\* 通信作者 E-mail: toojm9319@163.com

of differential quality between the different developmental periods. The results of the DPPH radical scavenging assay on the antioxidant activity of Mume Flos at different developmental periods showed that the antioxidant capacity was closely related to the content of its components and gradually decreased with the development of flowers. The results of this paper can provide analytical methods and data support for the dynamics of the chemical constituents and the determination of the optimum harvesting period of Mume Flos.

**Key words:** Mume Flos; developmental periods; flavonoids; phenylpropanoids; antioxidant activity; chlorogenic acid

绿萼梅为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 作为常用中药收录于 2020 年版《中国药典》<sup>[1]</sup> 中, 具有疏肝和中、化痰散结的功效, 常用于治疗肝胃气痛、郁闷心烦、瘰疬疮毒等病症。古籍记载和现代研究均认为梅花以“绿萼”入药优良<sup>[2,3]</sup>, 其特点是花萼灰绿色、花瓣黄白色, 气味清香, 临床疗效较好。作为药食同源药材<sup>[4]</sup>, 绿萼梅还可用来做茶叶、糕点等食品, 且其凛冬开放, 清新淡雅, 被列为名花之首, 具有很高的观赏价值, 绿萼梅的综合应用越来越受到关注<sup>[5]</sup>。

国内外学者对梅花的化学成分和药理作用开展大量研究<sup>[6,7]</sup>。以绿原酸为代表的苯丙素类成分及黄酮类成分为梅花药理活性的主要物质基础<sup>[8,9]</sup>, 其抗氧化<sup>[10]</sup>、抗血小板凝集<sup>[11]</sup>、抗黑色素生成<sup>[12]</sup>及抗抑郁<sup>[8]</sup>等作用被广泛报道。近年来, 梅花中的类黄酮因具有抗氧化、抗抑郁等作用而受到越来越多的关注<sup>[13-15]</sup>。绿原酸及异鼠李素、槲皮素、异槲皮苷、金丝桃苷、芦丁等黄酮类化合物已从梅花中分离鉴定<sup>[16]</sup>。然而, 关于绿萼梅中的整体化学成分组成鲜有报道, 阻碍了其次生代谢产物的深入研究与开发。

药用植物的次生代谢产物具有多种生物活性, 是药材发挥药效的重要物质基础<sup>[17]</sup>。研究发现, 植物的不同生长和发育阶段是影响植物中次生代谢产物积累的重要因素<sup>[18]</sup>。尤其对于花类药材来说, 采收时期可显著影响其次生代谢产物的积累<sup>[19-21]</sup>。为研究不同发育时期绿萼梅花器官中化学成分的动态变化规律及抗氧化活性差异, 首先采用超高效液相色谱-四级杆静电场轨道阱质谱法 (UPLC-QE-MS) 进行定性分析, 明确绿萼梅的化学组成; 通过紫外-可见分光光度法对 3 个发育时期共 18 批绿萼梅样品的总黄酮和总苯丙素含量进行测定; 进一步采用超高效液相色谱法 (UPLC) 对绿萼梅样品中 8 个指标性成分 (新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸 B、槲皮苷) 进行含量测定, 比较不同发育时期中 8 个成分的含量差异; 采用 DPPH 法测定抗氧化活性, 将总成分及指标性成分含量与抗氧化活性进行相关性分析。研究结果为明

确不同发育时期绿萼梅化学成分及活性的差异, 确定绿萼梅药材的最佳采收期提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Vanquish 超高效液相色谱、Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ACQUITY H-CLASS 型超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); METASH UV-8000 紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); LGJ-10 真空冷冻干燥机 (北京松源华兴科技发展有限公司); JXFSTPRP-24 研磨仪 (上海净信科技有限公司); AB135-S 型十万分之一天平 (梅特勒-托利多有限公司); AS20500BDT 超声波清洗机 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司); Heraeus Fresco17 离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 明澈 D24 UV 纯水仪 (Merck Millipore)。

对照品新绿原酸 (批号 MUST-21030108)、绿原酸 (批号 MUST-21070910)、咖啡酸 (批号 MUST-18032003)、芦丁 (批号 MUST-21011510)、异绿原酸 B (批号 MUST-21030602)、槲皮苷 (批号 MUST-17120503) 均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 金丝桃苷 (批号 DST201013-023) 购自成都乐美天医药科技有限公司; 异槲皮苷 (批号 CFN9875) 购自武汉天植生物技术有限公司, 质量分数均  $\geq 98\%$ 。抗坏血酸 (批号 20150617, 国药集团化学试剂有限公司); DPPH 试剂 (批号 C11753367, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 甲醇和乙腈为质谱级 (CNW Technologies); 甲酸为质谱级 (美国 Sigma 公司); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 试验材料

本研究样品采自安徽省庐江县金盆山梅花种植基地, 由欧金梅教授鉴定为蔷薇科李属绿萼梅的花。根据梅花的不同发育时期, 分别于 2022 年 1 月 15 日 (花蕾期, HL)、2022 年 1 月 20 日 (半开期, BK)、2022 年 1 月 25 日 (全开期, QK) 采集新鲜样品。将不同批次绿萼梅样品真空冷冻干燥, 放入干燥器中保存备用。来源信息见表 1。

表 1 18 批绿萼梅样品信息  
Table 1 Information of 18 batches of Mume Flos

批次 Batch	编号 Number	发育时期 Developmental period	来源 Source
S1	HL-1	花蕾期 Bud period	安徽庐江
S2	HL-2		安徽庐江
S3	HL-3		安徽庐江
S4	HL-4		安徽庐江
S5	HL-5		安徽庐江
S6	HL-6		安徽庐江
S7	BK-1	半开期 Half-opening period	安徽庐江
S8	BK-2		安徽庐江
S9	BK-3		安徽庐江
S10	BK-4		安徽庐江
S11	BK-5		安徽庐江
S12	BK-6		安徽庐江
S13	QK-1	全开期 Full-opening period	安徽庐江
S14	QK-2		安徽庐江
S15	QK-3		安徽庐江
S16	QK-4		安徽庐江
S17	QK-5		安徽庐江
S18	QK-6		安徽庐江

### 1.3 UPLC-QE-MS 定性分析

#### 1.3.1 供试品溶液的制备

将绿萼梅样品真空冷冻干燥,用研磨仪研磨至粉末状。称取 100 mg 粉末,加入 500  $\mu$ L 提取液(80% 甲醇)溶解,涡旋 30 s,45 Hz 匀浆 4 min,冰水浴超声 1 h,静置后离心(12 000 r/min,4  $^{\circ}$ C) 15 min,取上清液,过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜,即得。每个样本各取 100  $\mu$ L 混合成质控样本(quality control, QC)。

#### 1.3.2 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC BEH  $C_{18}$ (100 mm  $\times$  2.1 mm,1.7  $\mu$ m) 色谱柱,流动相 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B),流动相梯度洗脱程序为 0~11 min,85%  $\rightarrow$  25% A;11~12 min,25%  $\rightarrow$  2% A;12~14 min,2% A。体积流量 0.5 mL/min;柱温 30  $^{\circ}$ C;进样量 5  $\mu$ L。

#### 1.3.3 质谱条件

Orbitrap Exploris 120 质谱仪能够在控制软件(Xcalibur, Thermo Fisher Scientific)控制下基于 FullScan-ddMS2 功能进行一级、二级质谱数据采集。

详细参数如下:鞘气流量:35 Arb,辅助气体流量:15 Arb,离子传输管温度:350  $^{\circ}$ C,蒸发器温度:350  $^{\circ}$ C,全 MS 分辨率:60 000,MS/MS 分辨率:15 000,碰撞能量:16/32/48(在 NCE 模式下)喷雾电压:5.5 kV(正离子)或-4 kV(负离子)。

#### 1.3.4 数据处理

将采集所得数据导入 Compound Discoverer 3.1 软件,获取匹配和对齐的峰值数据,Excel 软件将数据进行归一化后导入 SIMCA-P 14.1,再进行主成分分析(principal component analysis,PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。根据变量投影重要性指标(variable importance in projection, VIP)  $\geq 1$ ,  $P < 0.05$  筛选潜在的差异代谢物。通过 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,采用单因素方差分析和  $t$  检验将各组数据进行统计比较, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

### 1.4 总黄酮及总苯丙素的含量测定

#### 1.4.1 供试品溶液的制备

精密称取绿萼梅样品粉末约 0.5 g(过四号

筛),置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 mL,密塞,称定重量,超声处理(250 W,40 kHz)45 min,放冷,再称定重量,用50%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

#### 1.4.2 总黄酮的含量测定

以芦丁为对照品,采用亚硝酸钠-三氯化铝法<sup>[22]</sup>,510 nm处测定吸光值,绘制芦丁标准曲线。取2 mL供试品溶液,同法显色,由芦丁标准曲线回归方程( $Y=0.011X-0.0073$ , $r=0.9990$ )计算供试品溶液中总黄酮含量。绿萼梅样品中总黄酮的含量按公式(1)计算。

含量 =

$$[(c_1 \times n \times V_1) / (c_2 \times V_2 \times 10^3)] \times 100\% \quad (1)$$

式中, $n$ :稀释倍数; $c_1$ :供试品溶液中活性成分(总黄酮、总苯丙素)的浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; $c_2$ :供试品溶液的浓度, $\text{mg}/\text{mL}$ ; $V_1$ :反应体系总体积, $\text{mL}$ ; $V_2$ :测定含量时所需供试品溶液的体积, $\text{mL}$ 。

#### 1.4.3 总苯丙素的含量测定

以绿原酸为对照品,参照文献测定方法<sup>[23]</sup>,330 nm处测定吸光值,绘制绿原酸标准曲线。取1 mL供试品溶液,同法显色,由绿原酸标准曲线回归方程( $Y=0.0516X+0.0003$ , $r=0.9999$ )计算供试品溶液中总苯丙素含量。

### 1.5 UPLC 定量分析指标性成分

#### 1.5.1 色谱条件

色谱柱选用 Waters-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.7  $\mu\text{m}$ ),流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~6 min,10%→17% A;6~12 min,17% A;12~20 min,17%→40% A),流速0.2 mL/min,进样量2  $\mu\text{L}$ ,柱温30  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长355 nm。

#### 1.5.2 对照品储备液的制备

准确称取新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸B、槲皮苷对照品适量,加50%甲醇制成质量浓度分别为0.404、1.256、0.316、0.692、0.432、0.524、0.390、0.354 mg/mL的混合对照品溶液。

#### 1.5.3 供试品溶液的制备

精密称取绿萼梅样品粉末约0.5 g(过四号筛),置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 mL,密塞,称定重量,超声处理(250 W,40 kHz)45 min,放冷,再称定重量,用50%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

#### 1.5.4 方法学验证

##### 1.5.4.1 线性关系考察

将混合对照品溶液用50%甲醇稀释成一系列的梯度浓度溶液后,按“1.5.1”项下条件进样分析,以待测化合物峰面积对浓度进行线性回归,得到各成分标准曲线。

##### 1.5.4.2 精密度的试验

取混合对照品,按“1.5.1”项色谱条件重复进样6次,记录新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸B、槲皮苷的色谱峰面积并计算RSD值。

##### 1.5.4.3 重复性试验

精密称取绿萼梅(HL-1)样品粉末6份,每份0.5 g,按“1.5.3”项下方法平行制备供试品溶液,按“1.5.1”项下方法分别进样测定,记录新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸B、槲皮苷的色谱峰面积,计算各成分的质量分数及其RSD值。

##### 1.5.4.4 稳定性试验

取同一绿萼梅供试品(HL-1)溶液,分别于配制后0,2,4,8,12,24 h进样测定,按“1.5.1”项色谱条件重复进样6次,记录新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸B、槲皮苷的色谱峰面积并计算RSD值。

##### 1.5.4.5 加样回收率试验

精密称定已知含量的绿萼梅(HL-1)样品粉末0.05 g,平行6份,分别加入适量的新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸B、槲皮苷对照品溶液,按“1.5.3”项下方法制备样品溶液,进样分析,记录各化合物的峰面积,计算各成分的含量。

#### 1.5.5 样品含量测定

按照“1.5.3”项下方法制备18批绿萼梅样品溶液,按“1.5.1”项下条件进样测定,分别测定新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸B、槲皮苷的含量。

### 1.6 DPPH 法测定不同发育时期绿萼梅的抗氧化活性

#### 1.6.1 DPPH·乙醇溶液的制备

精密称取DPPH粉末3.94 mg,置于100 mL量瓶中,加95%乙醇定容至刻度,摇匀,超声30 min,即得0.10 mmol/L DPPH·乙醇溶液。避光,备用。

### 1.6.2 供试品溶液的制备

按照“1.5.3”项下方法制备 18 批绿萼梅样品母液(10 mg/mL),加入 50% 甲醇依次稀释制成药材浓度分别为 5.00、2.50、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039、0.020 mg/mL 的待测溶液。

### 1.6.3 阳性对照溶液的制备

精密称取抗坏血酸(Vc)粉末 0.1 g,加入 50% 甲醇 10 mL,制得 Vc 母液(10 mg/mL),加入 50% 甲醇依次稀释制成质量浓度分别为 5.00、2.50、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039、0.020 mg/mL 的 Vc 50% 甲醇溶液。避光,备用。

### 1.6.4 测定方法

取 0.10 mmol/L DPPH·乙醇溶液 3 mL,置 10 mL 具塞试管中,分别加入不同浓度的样品溶液 0.5 mL,摇匀,充分反应 60 min,置紫外-可见分光光度计中,于 517 nm 波长处测定吸光度,按下列公式计算清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中, $A_i$  为样品组的吸光度; $A_j$  为空白组的吸光度(以 3 mL 95% 乙醇与 0.5 mL 50% 甲醇溶液混合物为空白组); $A_0$  为对照组的吸光度(以 50% 甲醇溶液代替样品溶液)。

## 2 结果与分析

### 2.1 代谢物的统计分析

分别从正负离子模式的 QC 样本中随机选取 6 个特征离子,计算保留时间和峰面积的相对标准偏差(relative standard deviations, RSD),对分析方法与仪器的稳定性和重复性进行评估,结果显示保留时间的 RSD 为 0.11% ~ 0.47%,峰面积的 RSD 为 0.96% ~ 3.25%,表明仪器的稳定性和重复性良好,所采集数据可用于进一步分析。共检测了 328 种代谢物,包括 67 种黄酮类化合物、50 种苯丙素类化合物、104 种萜类化合物、26 种酚类化合物、24 种生物碱、11 种有机酸及其衍生物、8 种氨基酸衍生物及其他 38 种代谢物(见图 1A)。绿原酸及某些黄酮类物质(如金丝桃苷、异槲皮苷)是评价梅花是否达到中药材标准最基本指标<sup>[1]</sup>,且在所鉴定的代谢物中,类黄酮含量较高,因此对检测到的类黄酮代谢物的类型进行归类分析。在 67 种黄酮类化合物中,共有黄酮醇 27 种,黄酮 19 种,二氢黄酮 12 种,异黄酮 4 种,二氢查尔酮 3 种,黄烷醇 1 种,花色苷 1 种(见图 1B)。为了进一步分析不同发育时期梅花黄酮类成分与苯丙素类成分的含量变化,通过半定量方法对其进行相对含量测定(见图 1C)。由图可明显看出

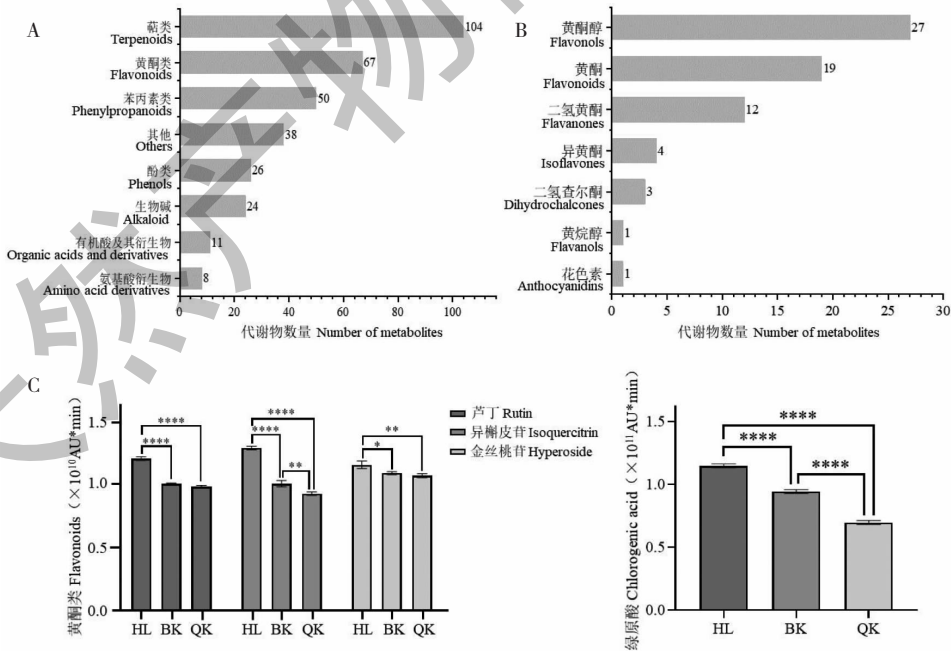


图 1 不同发育时期绿萼梅代谢物数量统计(A)、黄酮类化合物分类(B)及相对含量变化(C)

Fig. 1 Quantitative statistics of metabolites (A), classification of flavonoids (B) and changes in relative content (C) of Mume Flos at different developmental periods

注: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

各类成分的变化趋势,以绿原酸为代表的苯丙素类成分及黄酮类成分的含量在3个发育时期中均呈下降趋势。利用 GraphPad Prism 8 对图 1C 中 4 种成分进行单因素方差分析,结果表明 4 种成分在花蕾期与半开期、花蕾期与全开期两个比较组中均具有显著性差异,除金丝桃苷外,其余 3 种成分差异极其显著( $P < 0.0001$ )。

## 2.2 总成分的含量测定

不同发育时期绿萼梅总黄酮的含量变化情况见

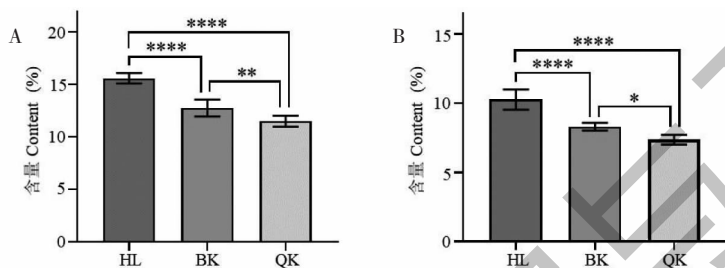


图 2 不同发育时期绿萼梅总黄酮(A)及总苯丙素(B)的含量差异分析

Fig. 2 Difference analysis of the total flavonoid (A) and phenylpropanoid (B) content of Mume Flos in different developmental periods

注: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

## 2.3 指标性成分的含量测定

### 2.3.1 方法学验证

#### 2.3.1.1 线性关系考察

各对照品的线性关系及相关系数见表 2。 $r$  值

均大于 0.999 0,表明各回归方程的线性关系良好。

表 2 对照品的线性方程、相关系数及线性范围

Table 2 Linear equation, correlation coefficient and linear range of reference substance

对照品 Reference substance	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient ( $r$ )	线性范围 Linear range (mg/mL)
新绿原酸 Neochlorogenic acid	$Y = 9\,497.3X - 18\,587$	0.999 3	0.006 ~ 0.404
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y = 9\,497.8X - 57\,362$	0.999 4	0.010 ~ 0.628
咖啡酸 Caffeic acid	$Y = 13\,442X - 7\,499.8$	1.000 0	0.005 ~ 0.316
芦丁 Rutin	$Y = 14\,945X - 3\,767$	0.999 9	0.011 ~ 0.692
金丝桃苷 Hyperoside	$Y = 22\,101X - 53\,812$	0.999 6	0.007 ~ 0.432
异槲皮苷 Isoquercitrin	$Y = 18\,685X - 46\,276$	0.999 7	0.008 ~ 0.524
异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	$Y = 10\,832X - 298\,979$	0.999 6	0.006 ~ 0.390
槲皮苷 Quercitrin	$Y = 21\,429X - 49\,904$	0.999 6	0.006 ~ 0.354

#### 2.3.1.2 精密度试验

结果显示各成分峰面积的 RSD 值分别为 0.88%、0.38%、1.30%、0.26%、0.15%、0.17%、0.16%、0.13%,结果表明仪器精密度良好。

#### 2.3.1.3 重复性试验

结果显示各成分质量分数的 RSD 值分别为

2.66%、1.67%、1.92%、1.14%、1.26%、1.08%、0.45%、0.85%,表明该方法的重复性良好。

#### 2.3.1.4 稳定性试验

结果显示各成分峰面积的 RSD 值分别为 0.95%、1.76%、1.43%、0.13%、0.07%、0.13%、0.07%、0.15%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性

良好。

### 2.3.1.5 加样回收率试验

结果见表 3,新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸 B、槲皮苷的平均加

样回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 100.97%、98.07%、98.10%、100.76%、102.47%、94.68%、102.21%、95.02%, RSD 分别为 0.67%、2.28%、1.72%、1.51%、1.40%、2.44%、1.41%、1.44%。

表 3 加样回收率试验 ( $n = 6$ )  
Table 3 Sample recovery test ( $n = 6$ )

成分 Component	称样量 Sample weight (mg)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Found amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均值 Average (%)	RSD (%)
新绿原酸 Neochlorogenic acid	50.25	0.241 2	0.236 0	0.480 6	101.44	100.97	0.67
	49.87	0.239 4	0.236 0	0.479 5	101.74		
	50.39	0.241 9	0.236 0	0.478 9	100.42		
	49.82	0.239 1	0.236 0	0.476 8	100.72		
	50.13	0.240 6	0.236 0	0.476 7	100.04		
	49.96	0.239 8	0.236 0	0.479 2	101.44		
绿原酸 Chlorogenic acid	50.25	3.728 6	3.691 7	7.368 4	98.59	98.07	2.28
	49.87	3.700 4	3.691 7	7.265 9	96.58		
	50.39	3.738 9	3.691 7	7.247 5	95.04		
	49.82	3.696 6	3.691 7	7.309 2	97.86		
	50.13	3.719 6	3.691 7	7.472 0	101.64		
	49.96	3.707 0	3.691 7	7.351 8	98.73		
咖啡酸 Caffic acid	50.25	0.050 3	0.048 3	0.096 5	95.65	98.10	1.72
	49.87	0.049 9	0.048 3	0.098 4	100.41		
	50.39	0.050 4	0.048 3	0.098 3	99.17		
	49.82	0.049 8	0.048 3	0.097 1	97.93		
	50.13	0.050 1	0.048 3	0.096 9	96.89		
	49.96	0.050 0	0.048 3	0.097 6	98.55		
芦丁 Rutin	50.25	0.467 3	0.458 3	0.922 0	99.21	100.76	1.51
	49.87	0.463 8	0.458 3	0.925 8	100.81		
	50.39	0.468 6	0.458 3	0.940 7	103.01		
	49.82	0.463 3	0.458 3	0.922 5	100.20		
	50.13	0.466 2	0.458 3	0.921 3	99.30		
	49.96	0.464 6	0.458 3	0.932 2	102.03		
金丝桃苷 Hyperoside	50.25	0.196 0	0.213 3	0.417 0	103.61	102.47	1.40
	49.87	0.194 5	0.213 3	0.409 6	100.84		
	50.39	0.196 5	0.213 3	0.413 8	101.88		
	49.82	0.194 3	0.213 3	0.415 5	103.70		
	50.13	0.195 5	0.213 3	0.410 7	100.89		
	49.96	0.194 8	0.213 3	0.416 4	103.89		
异槲皮苷 Isoquercitrin	50.25	0.276 4	0.266 7	0.522 3	92.20	94.68	2.44
	49.87	0.274 3	0.266 7	0.522 0	92.88		
	50.39	0.277 1	0.266 7	0.531 1	95.24		
	49.82	0.274 0	0.266 7	0.525 9	94.45		
	50.13	0.275 7	0.266 7	0.539 2	98.80		
	49.96	0.274 8	0.266 7	0.526 9	94.53		

续表 3 (Continued Tab. 3)

成分 Component	称样量 Sample weight (mg)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Found amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均值 Average (%)	RSD (%)
异绿原酸 B	50.25	0.226 1	0.241 7	0.469 2	100.58	102.21	1.41
Isochlorogenic acid B	49.87	0.224 4	0.241 7	0.475 9	104.06		
	50.39	0.226 8	0.241 7	0.476 3	103.23		
	49.82	0.224 2	0.241 7	0.470 9	102.07		
	50.13	0.225 6	0.241 7	0.468 5	100.50		
	49.96	0.224 8	0.241 7	0.473 3	102.81		
槲皮苷	50.25	0.090 5	0.088 3	0.172 8	93.21	95.02	1.44
Quercitrin	49.87	0.089 8	0.088 3	0.175 4	96.94		
	50.39	0.090 7	0.088 3	0.173 9	94.22		
	49.82	0.089 7	0.088 3	0.173 4	94.79		
	50.13	0.090 2	0.088 3	0.175 2	96.26		
	49.96	0.089 9	0.088 3	0.173 5	94.68		

## 2.3.2 不同发育时期绿萼梅指标性成分的含量

三个发育时期共 18 批绿萼梅样品的含量以平均值  $\pm$  标准差表示, 结果见表 4。18 批样品的叠加

色谱图见图 3, 绿萼梅样品的对照图谱及混合对照品色谱图见图 4。

表 4 不同发育时期绿萼梅药材中 8 个指标性成分含量 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 4 The content of eight indicative components of Mume Flos in different developmental stages ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品 Sample	含量 Content (%)							
	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	咖啡酸 Caffeic acid	芦丁 Rutin	金丝桃苷 Hyperoside	异槲皮苷 Isoquercitrin	异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	槲皮苷 Quercitrin
HL-1	0.479 $\pm$ 0.030	7.423 $\pm$ 0.015	0.103 $\pm$ 0.008	0.926 $\pm$ 0.005	0.388 $\pm$ 0.003	0.553 $\pm$ 0.003	0.447 $\pm$ 0.001	0.175 $\pm$ 0.004
HL-2	0.430 $\pm$ 0.012	7.864 $\pm$ 0.046	0.095 $\pm$ 0.010	1.025 $\pm$ 0.001	0.581 $\pm$ 0.001	0.701 $\pm$ 0.001	0.483 $\pm$ 0.002	0.182 $\pm$ 0.001
HL-3	0.391 $\pm$ 0.009	6.678 $\pm$ 0.076	0.079 $\pm$ 0.015	0.980 $\pm$ 0.011	0.564 $\pm$ 0.006	0.680 $\pm$ 0.008	0.488 $\pm$ 0.002	0.175 $\pm$ 0.001
HL-4	0.384 $\pm$ 0.006	6.155 $\pm$ 0.091	0.073 $\pm$ 0.001	0.974 $\pm$ 0.007	0.540 $\pm$ 0.002	0.647 $\pm$ 0.003	0.496 $\pm$ 0.001	0.177 $\pm$ 0.001
HL-5	0.381 $\pm$ 0.005	7.065 $\pm$ 0.054	0.070 $\pm$ 0.003	0.978 $\pm$ 0.002	0.606 $\pm$ 0.001	0.715 $\pm$ 0.001	0.487 $\pm$ 0.004	0.175 $\pm$ 0.001
HL-6	0.393 $\pm$ 0.013	6.899 $\pm$ 0.007	0.072 $\pm$ 0.001	1.004 $\pm$ 0.003	0.527 $\pm$ 0.027	0.657 $\pm$ 0.001	0.480 $\pm$ 0.001	0.181 $\pm$ 0.001
BK-1	0.306 $\pm$ 0.008	5.259 $\pm$ 0.008	0.058 $\pm$ 0.004	0.862 $\pm$ 0.002	0.533 $\pm$ 0.002	0.591 $\pm$ 0.003	0.495 $\pm$ 0.004	0.162 $\pm$ 0.001
BK-2	0.336 $\pm$ 0.012	5.270 $\pm$ 0.085	0.056 $\pm$ 0.002	0.911 $\pm$ 0.002	0.529 $\pm$ 0.005	0.608 $\pm$ 0.002	0.510 $\pm$ 0.002	0.175 $\pm$ 0.001
BK-3	0.309 $\pm$ 0.017	5.132 $\pm$ 0.059	0.054 $\pm$ 0.004	0.954 $\pm$ 0.002	0.522 $\pm$ 0.002	0.633 $\pm$ 0.003	0.500 $\pm$ 0.001	0.173 $\pm$ 0.003
BK-4	0.295 $\pm$ 0.014	5.660 $\pm$ 0.055	0.055 $\pm$ 0.002	0.815 $\pm$ 0.001	0.536 $\pm$ 0.002	0.594 $\pm$ 0.002	0.473 $\pm$ 0.003	0.147 $\pm$ 0.001
BK-5	0.351 $\pm$ 0.011	5.202 $\pm$ 0.055	0.060 $\pm$ 0.004	0.886 $\pm$ 0.001	0.479 $\pm$ 0.001	0.587 $\pm$ 0.002	0.478 $\pm$ 0.001	0.160 $\pm$ 0.004
BK-6	0.339 $\pm$ 0.007	5.424 $\pm$ 0.064	0.056 $\pm$ 0.002	0.828 $\pm$ 0.001	0.498 $\pm$ 0.001	0.583 $\pm$ 0.002	0.468 $\pm$ 0.002	0.149 $\pm$ 0.004
QK-1	0.268 $\pm$ 0.002	5.058 $\pm$ 0.006	0.054 $\pm$ 0.002	0.740 $\pm$ 0.001	0.463 $\pm$ 0.002	0.540 $\pm$ 0.002	0.443 $\pm$ 0.001	0.140 $\pm$ 0.001
QK-2	0.270 $\pm$ 0.008	4.604 $\pm$ 0.044	0.047 $\pm$ 0.005	0.715 $\pm$ 0.001	0.469 $\pm$ 0.002	0.536 $\pm$ 0.015	0.449 $\pm$ 0.004	0.141 $\pm$ 0.002
QK-3	0.264 $\pm$ 0.008	4.728 $\pm$ 0.074	0.054 $\pm$ 0.009	0.695 $\pm$ 0.001	0.477 $\pm$ 0.001	0.529 $\pm$ 0.001	0.439 $\pm$ 0.003	0.130 $\pm$ 0.001
QK-4	0.290 $\pm$ 0.003	4.738 $\pm$ 0.020	0.053 $\pm$ 0.007	0.732 $\pm$ 0.001	0.463 $\pm$ 0.001	0.526 $\pm$ 0.001	0.450 $\pm$ 0.003	0.137 $\pm$ 0.001
QK-5	0.271 $\pm$ 0.010	5.001 $\pm$ 0.025	0.057 $\pm$ 0.004	0.724 $\pm$ 0.002	0.448 $\pm$ 0.016	0.514 $\pm$ 0.003	0.454 $\pm$ 0.006	0.135 $\pm$ 0.001
QK-6	0.261 $\pm$ 0.011	4.201 $\pm$ 0.002	0.043 $\pm$ 0.001	0.748 $\pm$ 0.001	0.439 $\pm$ 0.001	0.528 $\pm$ 0.001	0.440 $\pm$ 0.003	0.138 $\pm$ 0.002



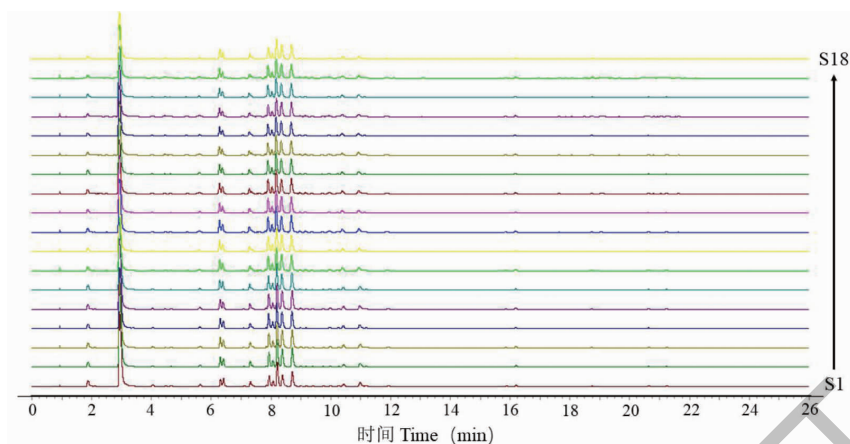


图 3 18 批绿萼梅样品 UPLC 叠加色谱图

Fig. 3 UPLC overlay chromatogram of 18 batches of Mume Flos

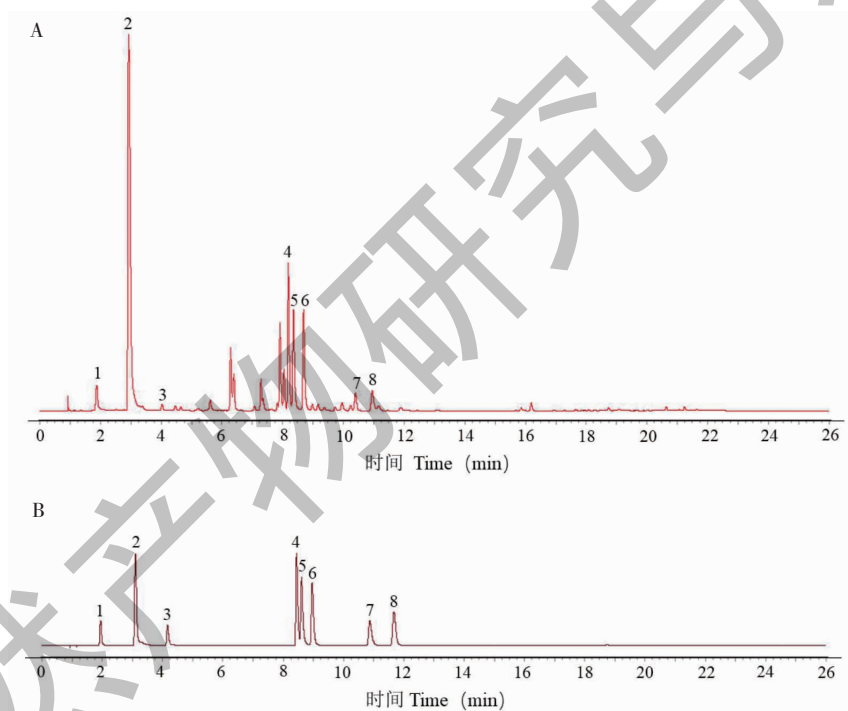


图 4 绿萼梅样品 (A) 及混合对照品 (B) 色谱图

Fig. 4 Chromatograms of Mume Flos (A) and mixed reference solution (B)

注 1. 新绿原酸; 2. 绿原酸; 3. 咖啡酸; 4. 芦丁; 5. 金丝桃苷; 6. 异槲皮苷; 7. 异绿原酸 B; 8. 槲皮苷。Note: 1. Neochlorogenic acid; 2. Chlorogenic acid; 3. Caffeic acid; 4. Rutin; 5. Hyperoside; 6. Isoquercitrin; 7. Isochlorogenic acid B; 8. Quercitrin.

### 2.3.3 不同发育时期绿萼梅标志性成分的比较分析

为进一步比较不同发育时期绿萼梅化学成分的差异,采用主成分分析方法,以所测定的 8 种标志性成分的含量作为变量,对 3 个发育时期共 18 批绿萼梅样品进行分析。结果显示 KMO 值为 0.669,代表各变量相关性较好,以特征值  $> 1$  为提取标准,可提取出两个主成分,累计方差贡献率达 96.712%,能

基本反映出样本的主要信息。主成分分析得分图见图 5,由得分图可知,不同发育时期绿萼梅样品分别集中于相应区域,提示不同发育时期绿萼梅样品在化学成分的量上存在一些差异性。在主成分分析提取到的两个主成分的基础上,建立监督模式偏最小二乘判别分析模型,进一步寻找不同发育时期绿萼梅的差异标志物。正交偏最小二乘判别分析得分图

见图 6, 18 批绿萼梅样品被分为 3 组, 与主成分分析结果一致, 说明不同发育时期绿萼梅化学成分的含量存在一定差异。变量重要性投影值 (VIP) 图见图 7, 筛选出贡献率较大的 1 个变量 (VIP > 1) 为绿原酸, 说明不同发育时期绿萼梅的化学成分差异是由

该成分引起的, 绿原酸可以作为不同发育时期绿萼梅之间的差异标志物。

进一步分析与比较不同发育时期绿萼梅样品中黄酮类和苯丙素类成分含量变化及差异性, 利用 GraphPadPrism8 对 8 种指标性成分进行单因素方

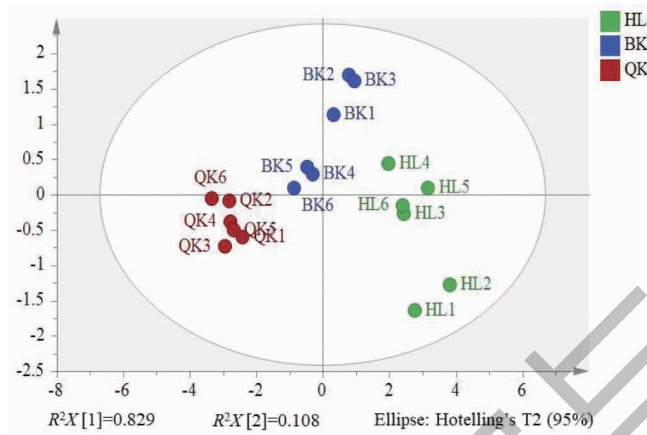


图 5 18 批绿萼梅样品主成分分析得分图

Fig. 5 The PCA score plot of 18 batches of Mume Flos

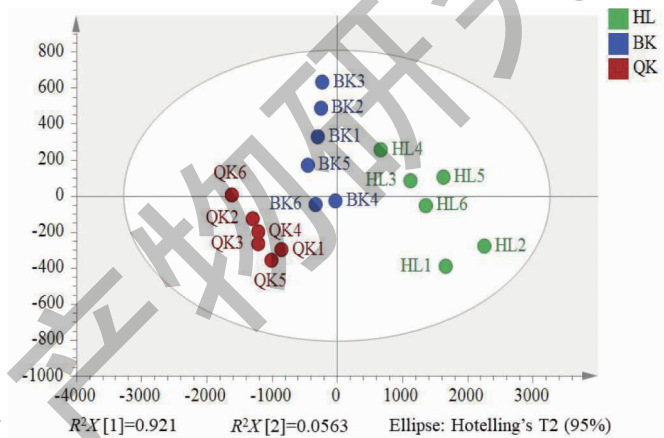


图 6 18 批绿萼梅样品 OPLS-DA 得分分布图

Fig. 6 The OPLS-DA score plot of 18 batches of Mume Flos

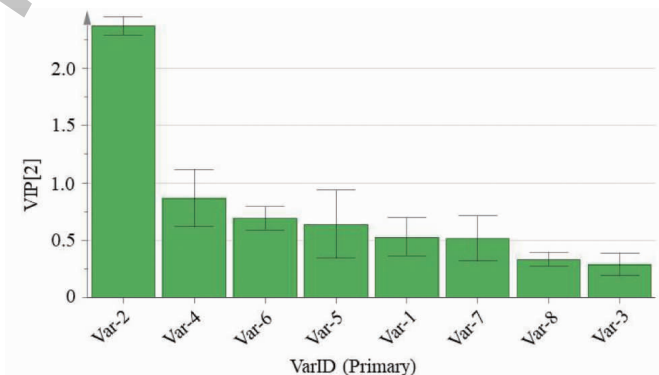


图 7 18 批绿萼梅样品 OPLS-DA 的 VIP 图

Fig. 7 VIP value from OPLS-DA load diagram of 18 batches of Mume Flos

差分析,见图 8。花蕾期和全开期中 8 种成分均具有显著性差异,值得注意的是,除金丝桃苷和异绿原酸 B 之外,其余 6 种成分差异极显著( $P < 0.001$ )。对于花蕾期与半开期,除金丝桃苷和异绿原酸 B 之外,其余 6 种成分均具有显著性差异。咖啡酸和金

丝桃苷在半开期与全开期之间无差异性,其余成分均具有显著性差异,其中芦丁差异极显著。可以看出,花蕾期与全开期之间具有显著的差异性,成分含量差异较大,与总黄酮和总苯丙素的含量变化趋势一致,提示绿萼梅药材应该在开花以前采收。

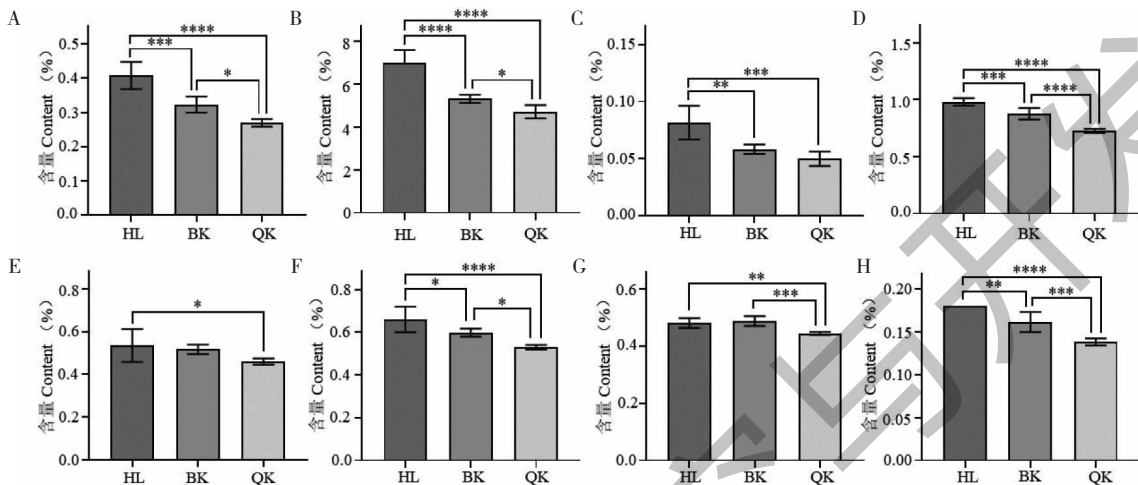


图 8 不同发育时期绿萼梅黄酮类和苯丙素类成分的含量差异分析

Fig. 8 Difference analysis of the content of flavonoids and phenylpropanoids in different developmental periods of Mume Flos

注: A. 新绿原酸; B. 绿原酸; C. 咖啡酸; D. 芦丁; E. 金丝桃苷; F. 异槲皮苷; G. 异绿原酸 B; H. 槲皮苷; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。Note: A. Neochlorogenic acid; B. Chlorogenic acid; C. Caffeic acid; D. Rutin; E. Hyperoside; F. Isoquercitrin; G. Isochlorogenic acid B; H. Quercitrin; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

## 2.4 不同发育时期绿萼梅的抗氧化活性

不同发育时期绿萼梅样品的 DPPH 清除率见图 9,各发育时期的抗氧化活性呈浓度依赖性,随着浓度的增大,绿萼梅各时期样品对 DPPH 自由基的清除能力随之增强。将计算结果导入 SPSS 26.0 计算自由基清除率的半最大效应浓度 ( $EC_{50}$ ),结果表明抗坏血酸的  $EC_{50}$  为  $0.020 \text{ mg/mL}$ ,与文献报道  $EC_{50}$  值接近<sup>[24]</sup>。各样品抗氧化活性  $EC_{50}$  见表 5。将各

发育时期  $EC_{50}$  进行单因素方差分析,比较各时期抗氧化差异,结果表明不同发育时期中全开期的抗氧化活性最低,与总成分及指标性成分含量测定结果一致。三个发育时期之间的抗氧化活性具有显著性差异,其中花蕾期与全开期的抗氧化活性差异极显著( $P < 0.001$ )。

将 18 批样品抗氧化活性  $EC_{50}$  值、总黄酮、总苯丙素及 8 个指标性成分的含量导入 TBtools 软件进

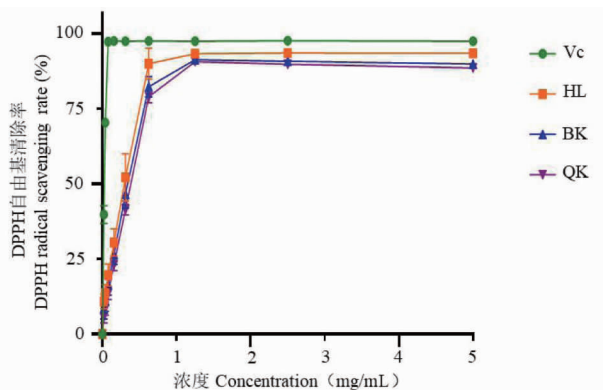


图 9 不同质量浓度样品与抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 9 Scavenging of DPPH free radicals by samples of different mass concentrations and vitamin C

表5 绿萼梅不同发育时期 DPPH 自由基清除能力的  $EC_{50}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 5  $EC_{50}$  value of different developmental periods of Mume Flos on DPPH radical scavenging capacity ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

发育时期 Developmental period	样品 Sample	$EC_{50}$ (mg/mL)
花蕾期 <sup>c</sup> Bud period	HL-1	0.301 ± 0.004
	HL-2	0.186 ± 0.004
	HL-3	0.225 ± 0.002
	HL-4	0.272 ± 0.004
	HL-5	0.201 ± 0.001
半开期 <sup>b</sup> Half-opening period	HL-6	0.215 ± 0.003
	BK-1	0.380 ± 0.001
	BK-2	0.264 ± 0.004
	BK-3	0.275 ± 0.001
	BK-4	0.241 ± 0.005
	BK-5	0.323 ± 0.004
全开期 <sup>a</sup> Full-opening period	BK-6	0.327 ± 0.002
	QK-1	0.356 ± 0.001
	QK-2	0.355 ± 0.003
	QK-3	0.335 ± 0.003
	QK-4	0.336 ± 0.002
	QK-5	0.388 ± 0.003
	QK-6	0.391 ± 0.002

注:不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

行 Pearson 相关性分析,结果见图 10。由图可知, DPPH 自由基清除率  $EC_{50}$  值与总黄酮、总苯丙素及 8 个指标性成分存在明显的负相关( $P < 0.05$ ), 相关系数分别为 -0.69、-0.81、-0.66、0.80、-0.62、-0.82、

-0.75、-0.88、-0.56、-0.77。结果表明,绿萼梅中总黄酮、总苯丙素及 8 个指标性成分可作为评价其抗氧化活性的指标。

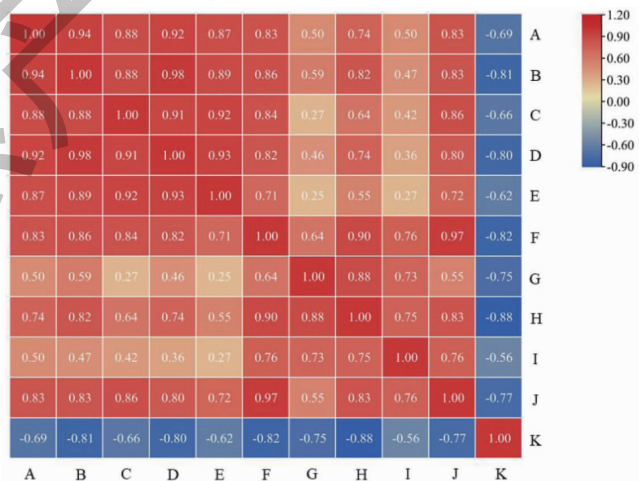


图 10 绿萼梅主要成分与抗氧化活性相关性

Fig. 10 Correlation between the main components and antioxidant activity of Mume Flos

注: A. 总黄酮; B. 总苯丙素; C. 新绿原酸; D. 绿原酸; E. 咖啡酸; F. 芦丁; G. 金丝桃苷; H. 异槲皮苷; I. 异绿原酸 B; J. 槲皮苷; K. DPPH  $EC_{50}$ 。 Note: A. Total flavonoids; B. Total phenylpropanoids; C. Neochlorogenic acid; D. Chlorogenic acid; E. Caffeic acid; F. Rutin; G. Hyperoside; H. Isoquercitrin; I. Isochlorogenic acid B; J. Quercitrin; K. DPPH  $EC_{50}$ .

### 3 讨论与结论

本实验通过 UPLC-QE-MS 法共检测出绿萼梅中的 328 种次生代谢产物,以黄酮类和苯丙素类成分占比较高,分别有 67.50 种化合物,其中黄酮类化合物中以黄酮醇类占比最高,作为梅花质量标准的金丝桃苷、异槲皮苷等成分均属于该类物质,且有研究发现黄酮醇在花器官发育中起着重要的调节作用<sup>[25,26]</sup>;花色素类仅检测出一种成分,可能与绿萼梅花色白有关<sup>[27]</sup>。

进一步比较不同发育时期绿萼梅的成分变化,结果显示总黄酮、总苯丙素成分在花蕾期含量最高,并随着花的开放程度呈逐渐下降趋势。8 个指标性成分(新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸 B、槲皮苷)的含量测定结果表明,花蕾期与全开期之间成分具有显著差异性,以新绿原酸、绿原酸、芦丁、异槲皮苷、槲皮苷差异极其显著( $P < 0.0001$ );化学计量学分析表明 3 个时期绿萼梅的化学成分含量具有一定差异性,绿原酸可作为其差异质量标志物。综合来看,花蕾期的绿萼梅在化学成分含量与抗氧化活性方面均占优势,与半开期和全开期差异显著,药材的采收时期应尽量控制在花蕾期。

综上,本实验通过 UPLC-QE-MS 结合 UPLC 法对不同发育时期绿萼梅进行定性定量分析,表征不同发育时期绿萼梅的化学成分组成及差异,并通过 DPPH 法比较其抗氧化活性差异,为绿萼梅化学成分的动态变化规律及药材最佳采收时期提供科学依据。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 324.
- 2 Zhao XM. A Supplement to Compendium of Materia Medica (本草纲目拾遗)[M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 1998: 245-250.
- 3 Zhang ZY, Yan H, Guo S, et al. Herbal textual research on Mume Flos[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 117-125.
- 4 Chen AR, Ding MJ, Wang BG. An exploration on Mei flower dietary culture[J]. Chin Land Arch(中国园林), 2020, 36: S33-S35.
- 5 Tang JM, Huang GL, Zeng B, et al. Research progress of

- germplasm resources of *Prunus mume*[J]. Hunan Agri Sci(湖南农业科学), 2020, 5: 108-111.
- 6 Gong XP, Tang Y, Song YY, et al. Comprehensive review of phytochemical constituents, pharmacological properties, and clinical applications of *Prunus mume*[J]. Front Pharm, 2021, 12: 679378.
- 7 Yan H, Lan JS, Pu ZJ, et al. Advances in studies on chemical compositions and pharmacological activities of *Mume Flos*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52: 3453-3461.
- 8 Wang CC, Zhang W, Wu DL, et al. Chemical constituents from ethyl acetate extraction of *Prunus mume*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45: 347-351.
- 9 Fujimoto K, Nakamura S, Matsumoto T, et al. Medicinal flowers. XXXVIII. Structures of acylated sucroses and inhibitory effects of constituents on aldose reductase from the flower buds of *Prunus mume*[J]. Chem Pharm Bull, 2013, 61: 445-451.
- 10 Matsuda H, Morikawa T, Ishiwada T, et al. Medicinal flowers. VIII. Radical scavenging constituents from the flowers of *Prunus mume*: structure of prunose III [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51: 440-443.
- 11 Yoshikawa M, Murakami T, Ishiwada T, et al. New flavonol oligoglycosides and polyclated sucroses with inhibitory effects on aldose reductase and platelet aggregation from the flowers of *Prunus mume*[J]. J Nat Prod, 2002, 65: 1151-1155.
- 12 Nakamura S, Fujimoto K, Matsumoto T, et al. Acylated sucroses and acylated quinic acids analogs from the flower buds of *Prunus mume* and their inhibitory effect on melanogenesis [J]. Phytochemistry, 2013, 92: 128-136.
- 13 Chen MJ, Chen J, Huang YX, et al. Study on the effects and mechanism of total flavonoids from *Armeniaca mume* on depression in chronic stress depression model rats [J]. China Pharm(中国药房), 2017, 28: 1758-1762.
- 14 Chen MJ, Chen J, Huang YX, et al. Improvement of total flavonoids from *Armeniaca mume* var. *mume* f. *viridicalyx* on depressive mice [J]. Drugs Clin(现代药物临床), 2017, 32: 170-174.
- 15 Gan YJ, Zhang W, Ou JM, et al. Screening for the active parts of Flos Mume and analysis of their chemical constituents against a cell model of alzheimer's disease caused by  $\beta$ -amyloid [J]. J Anhui Univ Chin Med(安徽中医药大学学报), 2022, 41: 92-96.
- 16 Zhang QY, Zhang L, Shang LX, et al. Studies on the chemical constituents of flowers of *Prunus mume*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2008, 31: 1666-1668.

- 17 Lu Y, Gao W, Huang LQ. Synthesis and regulation of secondary metabolites by microRNA in medicinal plants[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43:1806-1811.
- 18 Verma N, Shukla S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites[J]. J Appl Res Med Arom Plants, 2015, 2:105-113.
- 19 Pan Y, Zhao X, Chen DX. Different development phase of transcription proteomics and metabolomics of flower of *Lonicera macranthoides*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46:2798-2805.
- 20 Pu JJ, Liu Q, Li J, et al. Analyses of volatile components in *Lonicerae Japonicae Flos* at different growth stages by HS-SPME-GC-MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2022, 53:2818-2824.
- 21 Liu H, Chen XX, Chen HX, et al. Transcriptome and metabolome analyses of the flowers and leaves of *Chrysanthemum di-chrum*[J]. Front Gene, 2021, 12:716163.
- 22 Xue ZJ, Guo LX, Guo M, et al. Study on difference of chemical constituents of Qiai in different harvest periods[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44:5433-5440.
- 23 Zhang WP, Zhu W, Zhang L, et al. Contents of main active ingredients and correlation with different ages and parts of *Eucommia ulmoides* Oliv[J]. Non-wood Forest Res(经济林研究), 2020, 38:46-57.
- 24 Bao LM, Bao XH, Bai YC, et al. Comparative study based on antioxidant activity of 16 kinds of mongolian medicine[J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2017, 13:9-11.
- 25 Mo Y, Nagel C, Taylor LP. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen[J]. Proc Nat Acad USA, 1992, 89:7213-7217.
- 26 Napoli CA, Fahy D, Wang HY, et al. White anther: A petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene[J]. Plant Physiol, 1999, 120:615-622.
- 27 Zhang TX, Bao F, Yang YJ, et al. A Comparative analysis of floral scent compounds in intraspecific cultivars of *Prunus mume* with different corolla colours[J]. Molecules, 2019, 25:145.

(上接第 1914 页)

- 15 Guo SN, Li HJ, Wang XY, et al. Changes of volatile components of *Ligustrum lucidum* before and after wine preparation by solid-phase microextraction/gas-mass spectrometry[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2018, 38:92-95.
- 16 Zhao SH, Li JJ. The regulatory mechanism of liposomal prostaglandin E1 on inflammatory mediators in rats with severe pneumonia[J]. Northwest J Pharm(西北药学杂志), 2022, 37:67-71.
- 17 Jiang ZJ, Zhang WJ, Zhou HY, et al. RP-HPLC determination of the active ingredients and pharmacological analysis of Anru Xiaotong Pill[J]. West Chin Med(西部中医药), 2020, 33:48-51.
- 18 Li YH, Li HY, Wang YN, et al. Analysis of volatile oil components of Radix Bupleurum by four methods[J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med(黑龙江畜牧兽医), 2021, 2:117-122.