

不同种质金银花发育过程中黄酮类成分含量变化规律研究

黄文静¹, 熊乐文¹, 张龙霏^{1,2}, 张芳^{1,2}, 韩翔宇¹, 张永清^{1,2*}, 张利³, 杨寒冰³

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东省高等学校中药资源学重点实验室, 山东 济南 250355

3. 山东中平药业有限公司, 山东 平邑 273300

摘要:目的 建立一种同时测定金银花 *Lonicerae Japonicae* Flos 20种黄酮类成分含量的方法, 并对含量结果进行多元统计分析, 探讨不同种质金银花发育过程中黄酮类成分的含量变化规律, 为优良品种选育与金银花药材质量控制提供技术支撑。方法 建立基于 HPLC-ESI-MS/MS 同时测定金银花 20种黄酮类成分含量的方法, 测定5种种质金银花不同发育时期黄酮类成分含量, 利用主成分分析 (principal components analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 研究其变化规律, 并筛选差异性活性成分。结果 建立的 HPLC-ESI-MS/MS 方法重复性好、稳定性好, 5种种质金银花总黄酮含量: 华金6号>九丰一号>四季花>红白忍冬>华金3号, 木犀草苷含量: 华金6号>红白忍冬>九丰一号>四季花>华金3号; 在各种质金银花发育过程中, 木犀草苷和总黄酮含量在二白期或大白期最高; 通过多元统计分析确定了不同种质间存在9个潜在差异性黄酮标志物 (野漆树苷、似梨木双黄酮、忍冬苷、水仙苷、芦丁、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、圣草酚-7-O-葡萄糖苷、芹菜素和山柰酚-3-O-芸香糖苷), 不同发育时期有7个差异性黄酮标志物 (苜蓿素、野漆树苷、香叶木素、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、金圣草黄素、紫云英苷和圣草酚-7-O-葡萄糖苷)。结论 金银花黄酮类成分组成与含量既决定于种质又受发育程度的影响, 选育优良品种、确定合理采收时期是提高金银花药材黄酮类成分含量的有效途径。

关键词: 金银花; 黄酮; HPLC-ESI-MS/MS; 木犀草苷; 红白忍冬; 野漆树苷; 似梨木双黄酮; 忍冬苷; 水仙苷; 芦丁; 异鼠李素-3-O-葡萄糖苷; 圣草酚-7-O-葡萄糖苷; 芹菜素; 山柰酚-3-O-芸香糖苷; 苜蓿素; 香叶木素; 芹菜素-7-O-葡萄糖苷; 金圣草黄素; 紫云英苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)10-3156-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.026

Study on content variation of flavonoids in different germplasm during development of *Lonicerae Japonicae* Flos

HUANG Wen-jing¹, XIONG Le-wen¹, ZHANG Long-fei^{1, 2}, ZHANG Fang^{1, 2}, HAN Xiang-yu¹, ZHANG Yong-qing^{1,2}, ZHANG Li³, YANG Han-bing³

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

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources, Jinan 250355, China

3. Shandong Zhongping Pharmaceutical Co. Ltd., Pingyi 273300, China

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of 20 flavonoids in *Lonicerae Japonicae* Flos (LJF), and multivariate statistical analysis of the content results was carried out to explore the content changes of flavonoids in different germplasm during the development of LJF, providing technical support for the breeding of superior varieties and quality control of LJF. **Methods** To establish a method for simultaneous determination of 20 flavonoids in LJF based on HPLC-ESI-MS/MS, and to determine the content of flavonoids in five germplasm LJF at different development stages. Principal components analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares discrimination analysis (OPLS-DA) were used to analyze the change rule, and the different active components were screened. **Results** The established HPLC-ESI-MS/MS method has good repeatability and stability. The contents of total flavonoids in LJF of five germplasms were as follows: "Huajin No. 6" > "Jiufeng No.1" > "Sijihua" > "Hongbairendong" > "Huajin No.3", and luteoloside content was as follows:

收稿日期: 2021-11-09

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目 (2019JZZY011020); 山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心 (CYLXTCX2020); 国家重点研发计划项目 (2017YFC1701503); 山东省重点研发计划“中医经方精准化关键技术示范研究”课题 (2016CYJS08A01); 国家自然科学基金资助项目 (81903750)

作者简介: 黄文静, 在读硕士, 从事中药资源与质量控制研究。E-mail: hwj19862146665@163.com

*通信作者: 张永清, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药资源与质量控制研究。E-mail: zyzq622003@126.com

“Hua jin No.6” > “Hongbairdong” > “Jiufeng No.1” > “Sijihua” > “Hua jin No.3”; The contents of luteoloside and total flavonoids were the highest in the second white stage or big white stage. Through multivariate statistical analysis, it was determined that there were nine potential differential flavonoid markers (rhoifolin, ochnaflavone, lonicerin, narcissoside, rutin, isorhamnetin-3-O-glucoside, eriodictyol-7-O-glucoside, apigenin, and kaempferol-3-O-rutinoside) among different germplasm and seven differential flavonoid markers (tricin, rhoifolin, diosmetin, apigenin-7-O-glucoside, chrysoeriol, astragaloside, and eriodictyol-7-O-glucoside) at different development stages. **Conclusion** The composition and content of flavonoids in LJF are determined by germplasm and development period. Breeding excellent varieties and determining reasonable harvest time are effective ways to improve the content of flavonoids in LJF.

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; flavonoids; HPLC-ESI-MS/MS; luteolin; *Lonicera japonica* var. *Chinensis* (P. Watson) Baker; rhoifolin; arachinoside; ochnaflavone; lonicerin; narcissoside; rutin; isorhamnetin-3-O-glucoside; eriodictyol-7-O-glucoside; apigenin; kaempferol-3-O-rutinoside; triclin; diosmetin; apigenin-7-O-glucoside; chrysoeriol; astragaloside

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,属大宗常用中药材。可清热解毒、疏散风热,用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等病症^[1]。现代研究证明,金银花含有挥发油、黄酮、三萜、有机酸及无机元素等成分^[2],具有抗炎、抗肿瘤、保肝、抗病毒等药理活性,防治常见病、多发病、传染性疾病等功效卓著^[3-5]。

由于金银花用途广泛,目前主要依靠人工栽培满足需求,山东、河南、河北等地均有大面积种植。经长期栽培后,金银花植株的遗传特性发生明显变异,形成了不同的变种变型、生态型、农家品种、林木良种、农作物品种及植物新品种等种质^[6-9]。种质作为影响中药材质量和产量的最重要因素,历来备受关注,选育优良品种也是目前提高金银花药材产量与质量的有效途径,选育出的一些品种已经在生产中进行了推广种植^[10]。药用器官发育程度对药材质量也有显著影响,确定合理采收期是药用植物栽培重要任务之一,在不同发育时期采收的金银花药材无论性状还是活性成分含量均有明显差异^[11]。

黄酮类是金银花主要活性成分之一,其中木犀草苷含量被《中国药典》作为金银花药材质量控制指标^[1]。但在实际生产中,金银花木犀草苷含量常有达不到药典标准要求的情况发生^[12]。探讨不同种质金银花各发育期黄酮类成分含量变化规律及其差异标志物,对于选择优良种质、确定合理采收期、提高金银花药材质量具有重要的参考价值。为此,本实验在山东省平邑县金银花道地产区,比较分析了华金3号、华金6号、九丰一号、四季花和红白忍冬5个种质金银花各发育期中20种黄酮类成分的含量,并分析了其差异标志物。

1 材料与仪器

1.1 仪器

Agilent 1260 HPLC/6420型串联四极杆质谱仪

(美国 Agilent 公司); LE204E 型、XS105DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); 5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); GLF-04 密封型手提式粉碎机(江阴市康和机械制造有限公司); BAG-9246A 型电热鼓风干燥箱(上海市齐欣科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

芦丁(批号 Y16M9S61523,质量分数≥98%)、圣草酚-7-O-葡萄糖苷(批号 Z25J10H88478,质量分数≥95%)、金丝桃苷(批号 Y05J8X39277,质量分数≥98%)、异槲皮苷(批号 P25J9F65872,质量分数≥98%)、木犀草苷(批号 Y13J10H93050,质量分数≥98%)、忍冬苷(批号 P05J8F39278,质量分数≥98%)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(批号 Y22J11H119335,质量分数≥98%)、紫云英苷(批号 Y15S9H70466,质量分数≥98%)、水仙苷(批号 S08A8D33447,质量分数≥98%)、野漆树苷(批号 Z13M10X82680,质量分数≥98%)、芹菜素-7-O-葡萄糖苷(批号 Y29M10H84489,质量分数≥98%)、苜蓿苷(批号 X27A11L122499,质量分数≥92%)、木犀草素(批号 C29N10Q104574,质量分数≥98%)、槲皮素(批号 C09S8Y43412,质量分数≥98%)、金圣草黄素(批号 Y10J11W118163,质量分数≥98%)、香叶木素(批号 T22F7X9844,质量分数≥98%)、芹菜素(批号 Y27A6C1,质量分数≥98%)、苜蓿素(批号 P26O9S73550,质量分数≥96%)、似梨木双黄酮(批号 X27A11L122500,质量分数≥98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;异鼠李素-3-O-葡萄糖苷(批号 CFN99757,质量分数≥98%)购自 Chemfaces 公司;乙腈、甲醇、甲酸,均为色谱纯,购自美国 Fisher Scientific 公司。

1.3 材料

不同种质各发育时期金银花于2020年5月21日,采集平邑方圆药业有限公司忍冬种植基地(平

邑县郑城镇)种植的不同种质金银花各发育时期花蕾或花。种质有忍冬华金3号(山东省中草药新品种)、华金6号(国家植物新品种)、九丰一号(国家林木良种)、四季花(农家品种)、红白忍冬(忍冬变种等5种;发育时期分为米蕾期、三青期、二白期、大白期、银花期和金花期。采摘后的花蕾或花,晒干,各样品以粉碎机粉碎,过60目筛,置干燥器中备用。

不同种质金银花原植物均经山东中医药大学张永清教授鉴定,为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* Thunb.及红白忍冬 *L. japonica* var. *chinensis* (P. Watson) Baker。忍冬(华金3号)和红白忍冬各发育时期花的形态变化如图1所示。

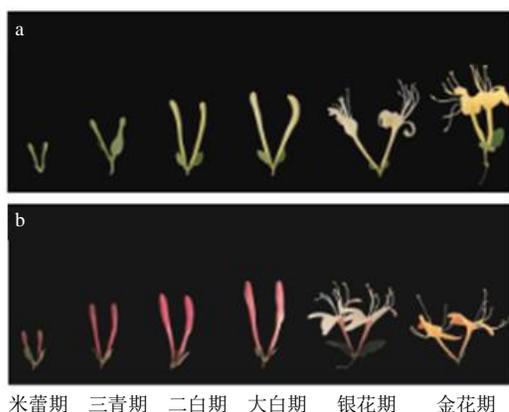


图1 忍冬(华金3号, a)和红白忍冬(b)各发育时期花部形态

Fig. 1 Flower morphology of *L. japonica* (Huajin No.3, a) and *L. japonica* var. *Chinensis* (b) at different developmental stages

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取20种黄酮类成分对照品适量,用甲醇溶解配制成对照品溶液。分别取对照品溶液适量,配制成混合对照品溶液,各成分质量浓度分别为芦丁49.0 $\mu\text{g/mL}$, 圣草酚-7-*O*-葡萄糖苷5.2 $\mu\text{g/mL}$, 金丝桃苷6.9 $\mu\text{g/mL}$, 异槲皮苷24.6 $\mu\text{g/mL}$, 木犀草苷23.7 $\mu\text{g/mL}$, 忍冬苷42.7 $\mu\text{g/mL}$, 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷10.7 $\mu\text{g/mL}$, 紫云英苷2.0 $\mu\text{g/mL}$, 水仙苷24.4 $\mu\text{g/mL}$, 野漆树苷21.0 $\mu\text{g/mL}$, 异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷1.9 $\mu\text{g/mL}$, 芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷7.2 $\mu\text{g/mL}$, 苜蓿苷2.7 $\mu\text{g/mL}$, 木犀草素19.9 $\mu\text{g/mL}$, 槲皮素0.9 $\mu\text{g/mL}$, 金圣草黄素1.3 $\mu\text{g/mL}$, 香叶木素0.3 $\mu\text{g/mL}$, 芹菜素1.3 $\mu\text{g/mL}$, 苜蓿素0.9 $\mu\text{g/mL}$,

似梨木双黄酮13.6 $\mu\text{g/mL}$ 。以上溶液储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,备用。

2.2 供试品溶液的制备

精密称定金银花药材粉末0.2 g,精密加入80%甲醇溶液6 mL,密塞,称定质量,超声(温度50 $^{\circ}\text{C}$ 、功率250 W、40 kHz)处理80 min,然后放置于工作台上冷却至室温,补足损失质量,14 000 r/min离心10 min,取上清液,过0.22 μm 有机滤膜即得。

2.3 色谱和质谱条件

2.3.1 色谱条件 Holo C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μm);进样量2 μL ;流动相A相为0.08%甲酸水,B相为0.08%甲酸乙腈;洗脱梯度为0~5 min,10%~23% B;5~25 min,23%~31% B;25~35 min,31%~80% B;35~40 min,80% B;体积流量0.3 mL/min;柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI源),采用MRM正、负离子模式切换检测;毛细管电压:正负离子模式均为4000 V;干燥气温度为300 $^{\circ}\text{C}$;干燥气体积流量为11.0 L/min;雾化气压力为15.0 psi(103.4 kPa);扫描范围 m/z 100~1200。在此质谱条件下,20种黄酮类成分的保留时间和质谱参数等特征详见表1。

在上述质谱条件下,各黄酮类成分对照品的MRM色谱如图2所示。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性方程的绘制 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液,用甲醇连续稀释,以确定建立标准曲线所需的浓度。按“2.3.1”项下条件进行测定,以对照品峰面积(y)和相对应浓度(x)为纵、横坐标,绘制标准曲线。分别以信噪比(S/N)为3和10倍计算对照品检测限(LOD)和定量限(LOQ),结果见表2。

2.4.2 精密度试验 取已知浓度混合对照品溶液,在1 d内连续进样6次计算日内精密度,连续3 d进样计算日间精密度,以RSD值评估精密度。20种黄酮类成分的精密度RSD \leq 3.26%。

2.4.3 重复性试验 配制同一样品的6个重复样本进行分析,以质量分数RSD评估重复性。20种黄酮类成分的重复性RSD \leq 3.71%。

2.4.4 稳定性试验 取同一样品溶液,分别在室温下放置0、2、4、8、12、24、48 h后进行分析,以RSD值评估样品溶液的稳定性。待测成分稳定性RSD \leq 3.47%,表明样品溶液在48 h内基本稳定。

表1 金银花20种黄酮类成分特征
Table 1 Characteristics of 20 flavonoids of LJJ

峰号	成分	分子式	<i>t_R</i> /min	母离子	子离子	碰撞电压/V	碰撞能/eV	离子模式
1	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	7.138	609.50	299.90	235	46	—
2	圣草酚-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	7.250	449.00	287.00	200	15	—
3	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	7.255	463.00	299.80	175	38	—
4	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	7.380	463.00	299.90	180	27	—
5	木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	7.508	447.00	284.90	193	35	—
6	忍冬苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	7.569	593.50	285.00	270	53	—
7	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	7.926	593.00	284.00	230	48	—
8	紫云英苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	8.329	447.10	284.00	167	30	—
9	水仙苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	8.401	623.00	315.00	240	40	—
10	野漆树苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	8.455	577.50	269.00	270	43	—
11	异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	8.475	477.00	314.00	200	40	—
12	芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	8.582	433.00	271.10	120	40	+
13	苜蓿苷	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	8.808	491.10	312.90	203	45	—
14	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	11.294	285.20	133.00	180	36	—
15	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	11.995	301.20	151.00	155	35	—
16	金圣草黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	14.118	299.00	283.90	133	27	—
17	香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	14.429	299.00	283.90	157	20	—
18	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	14.795	269.20	150.50	150	35	—
19	苜蓿素	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	15.478	329.00	298.90	140	30	—
20	似梨木双黄酮	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	32.495	537.10	384.90	270	48	—

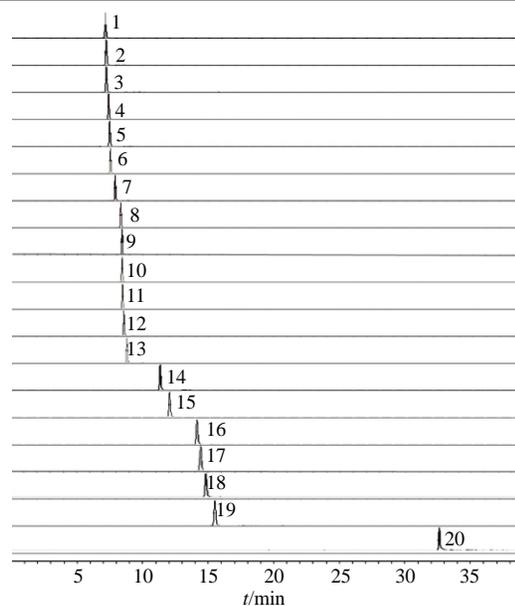
2.4.5 加样回收率试验 称取已测定各黄酮类成分含量的金银花样品粉末6份,分别加入已知浓度的对照品溶液进行分析,计算各成分的平均回收率及RSD值。结果见表2。20种黄酮类成分的加样回收率在92.8%~107.4%,回收率RSD在0.46%~3.05%。

2.4.6 样品含量测定 取不同种质各发育期金银花粉末,按“2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“2.3”项下条件对供试品溶液进行成分含量测定,每组样品平行测定3次。

3 结果与分析

3.1 不同种质金银花各发育期黄酮成分含量状况

华金3号、华金6号、九丰一号、四季花、红白忍冬等不同种质金银花各发育时期中的黄酮类成分含量如图3所示。不同种质金银花所含黄酮类成分差异较大,不同生长发育时期也有明显差异。对5个种质而言,黄酮类成分均以芦丁含量最高,香叶木素含量最低,华金3号、华金6号、九丰一号和四季花含量最高的5种黄酮类成分种类与顺序完全相同,从高到低依次为芦丁、木犀草苷、异槲皮苷、忍冬苷和水仙苷;红白忍冬与之相比具有较大差异,其中芦丁、木犀草苷、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和木犀草素含量排在前5位。总黄酮含量结果显示:华金6号>九丰一号>四季花>红



1-芦丁 2-圣草酚-7-*O*-葡萄糖苷 3-金丝桃苷 4-异槲皮苷 5-木犀草苷 6-忍冬苷 7-山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 8-紫云英苷 9-水仙苷 10-野漆树苷 11-异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷 12-芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷 13-苜蓿苷 14-木犀草素 15-槲皮素 16-金圣草黄素 17-香叶木素 18-芹菜素 19-苜蓿素 20-似梨木双黄酮

1-rutin 2-eriodictyol-7-*O*-glucuronide 3-hyperoside 4-isoquercitrin 5-luteoloside 6-lonicerin 7-kaempferol-3-*O*-rutinoside 8-astragaln 9-narcissin 10-rhoifolin 11-isorhamnetin-3-*O*-glucoside 12-apigenin-7-*O*-glucoside 13-tricin-7-*O*-glucoside 14-luteolin 15-quercetin 16-chrysoeriol 17-diosmetin 18-apigenin 19-tricin 20-ochnaflavone

图2 金银花20种黄酮类成分MRM色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of 20 flavonoids of LJJ

表2 金银花20种黄酮类成分方法学考察结果

Table 2 Results of methodology investigation on 20 flavonoids from LJJ

成分	回归方程	R ²	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
芦丁	$Y=3\ 269.9 X+1928.8$	0.999 0	0.245 2~49.044 7	0.57	1.91
圣草酚-7-O-葡萄糖苷	$Y=5\ 365.8 X+135.23$	0.999 9	0.026 1~ 5.210 7	0.11	0.37
金丝桃苷	$Y=10\ 869 X+569.38$	0.999 7	0.033 9~ 6.783 0	0.10	0.34
异槲皮苷	$Y=6\ 888.2 X+4\ 159.7$	0.999 4	0.122 8~24.556 8	0.33	1.10
木犀草苷	$Y=5\ 228.3 X+4\ 981.8$	0.999 4	0.118 5~23.709 2	0.13	0.45
忍冬苷	$Y=2\ 404.9 X+2\ 990.9$	0.999 5	0.213 6~42.721 7	0.38	1.26
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$Y=6\ 499.5 X+81.474$	1.000 0	0.053 3~10.651 8	0.09	0.28
紫云英苷	$Y=23\ 410 X+21.278$	1.000 0	0.009 9~ 1.980 3	0.02	0.06
水仙苷	$Y=2\ 702.9 X+11.3$	1.000 0	0.122 2~24.444 2	0.16	0.53
野漆树苷	$Y=6\ 100.7 X+1\ 137.6$	0.999 5	0.105 1~21.025 7	0.21	0.69
异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	$Y=4\ 099 X+55.215$	0.999 7	0.009 5~ 1.905 0	0.06	0.21
芹菜素-7-O-葡萄糖苷	$Y=10\ 296 X+541.59$	0.999 7	0.035 8~ 7.169 0	0.27	0.90
苜蓿苷	$Y=3\ 363.5 X+41.835$	0.999 9	0.013 7~ 2.736 7	0.08	0.26
木犀草素	$Y=7\ 915.4 X+2129.1$	0.999 3	0.099 7~19.936 7	0.16	0.55
槲皮素	$Y=2\ 694.1 X+19.246$	0.999 4	0.004 4~ 0.889 1	0.03	0.11
金圣草黄素	$Y=35\ 035 X+52.589$	0.999 9	0.006 7~ 1.348 3	0.05	0.16
香叶木素	$Y=32\ 037 X-27.074$	1.000 0	0.001 7~ 0.348 1	0.01	0.04
芹菜素	$Y=579.2 X-3.490 8$	1.000 0	0.006 4~ 1.271 7	0.09	0.29
苜蓿素	$Y=15\ 697 X+34.838$	0.999 9	0.004 5~ 0.897 5	0.04	0.12
似梨木双黄酮	$Y=183.46 X+15.326$	0.999 8	0.068 1~13.626 5	0.28	0.92

白忍冬>华金3号,木犀草苷含量显示:华金6号>红白忍冬>九丰一号>四季花>华金3号。

金银花不同生长发育时期木犀草苷含量变化范围:华金3号385.86~843.12 $\mu\text{g/g}$,华金6号490.66~967.96 $\mu\text{g/g}$,九丰一号466.78~932.46 $\mu\text{g/g}$,四季花420.65~885.42 $\mu\text{g/g}$,红白忍冬476.43~942.21 $\mu\text{g/g}$,含量变化趋势均是先升高后降低,米蕾期含量最低,大白期含量最高(图4-a)。总黄酮含量变化范围:华金3号1976.24~3267.38 $\mu\text{g/g}$,华金6号3063.03~4483.34 $\mu\text{g/g}$,九丰一号3164.62~4534.84 $\mu\text{g/g}$,四季花2277.26~4196.21 $\mu\text{g/g}$,红白忍冬2563.56~3461.03 $\mu\text{g/g}$,也呈现先升高后降低的变化规律,华金3号和九丰一号于大白期达到最大值,四季花和红白忍冬于二白期达到峰值,其次为大白期,华金6号总黄酮含量在二白期至银花期之间变化趋势相对平缓(图4-b)。

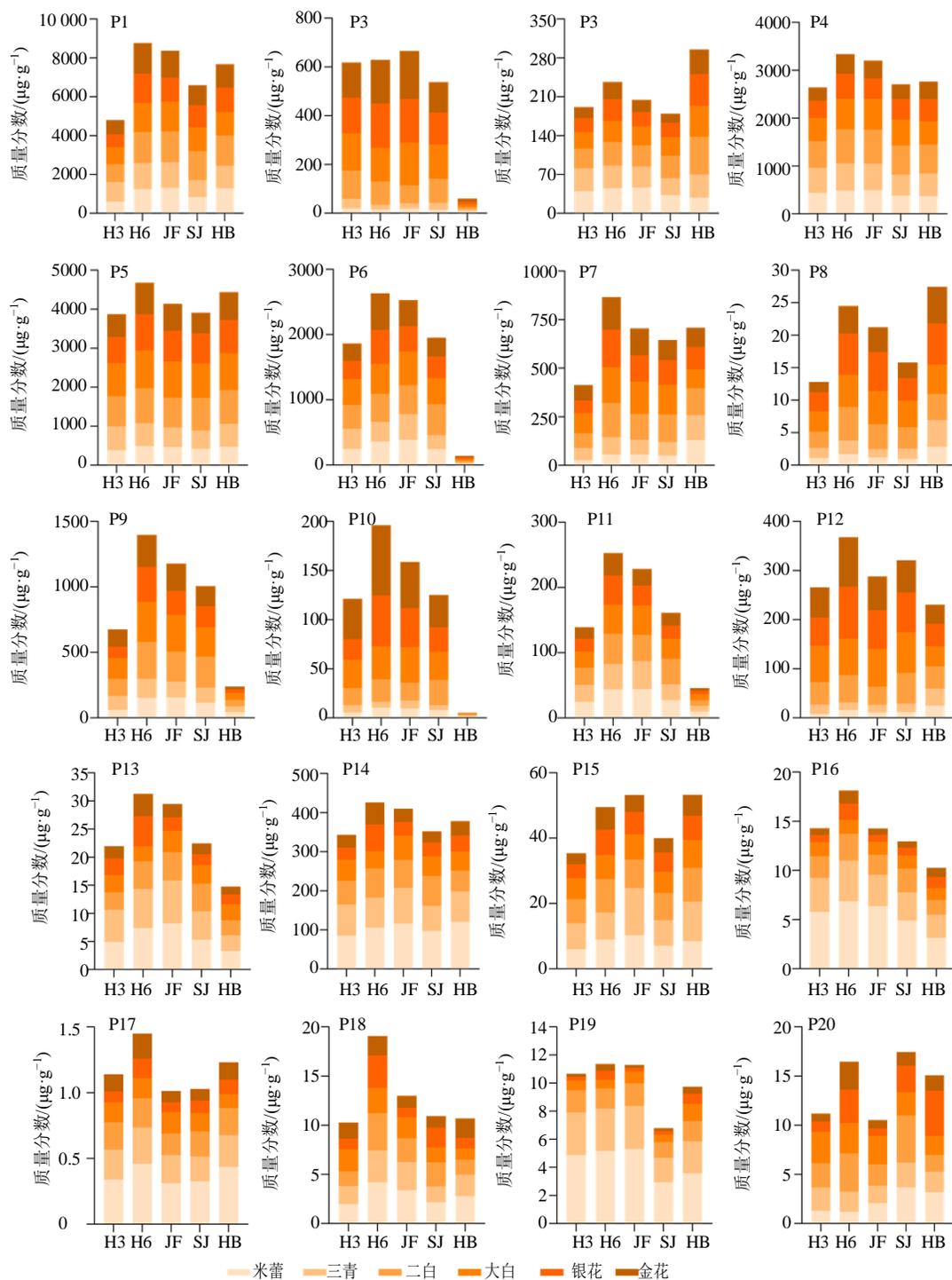
同时,经研究发现,所测苷元类成分(P14~P20)随着花器官发育,含量均不断降低,且金银花中所含苷类成分明显高于苷元类,推测在花的发育过程中,苷元不断结合糖苷基形成苷类成分。此外,木犀草苷和紫云英苷、忍冬苷和山柰酚-3-O-芸香糖苷、金丝桃苷和异槲皮苷以及金圣草黄素和香叶木素等同分异构体在发育期间含量变化规律大致相同,说明异构体之间在代谢过程中存在一定的

相互依存、相互促进或抑制的关系。

3.2 多变量统计分析

3.2.1 主成分分析(principal component analysis, PCA)分析 将不同种质金银花各发育期黄酮类成分含量进行PCA分析,结果见图5。

图5中点代表样品,颜色表示分组,箭头代表20种黄酮类成分,其方向代表黄酮与主成分的相关性,长度代表原始数据对主成分的贡献度。由图5-a可知,红白忍冬与其他种质明显分离,说明红白忍冬所含黄酮类成分与其他种质有明显差异。芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、苜蓿苷、木犀草素、槲皮素、金圣草黄素、香叶木素和芹菜素对主成分1有较高贡献度,且均呈正相关;圣草酚-7-O-葡萄糖苷、金丝桃苷、忍冬苷、野漆树苷和芹菜素-7-O-葡萄糖苷对主成分2贡献较高。图5-b显示,各发育期中大白期、银花期和金花期之间有重叠,而米蕾期、三青期和二白期则明显分离,说明大白期至金花期的黄酮类成分相似性大,而米蕾期至二白期则有明显差异。圣草酚-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素、金圣草黄素、香叶木素和苜蓿素对主成分1贡献度较高,芦丁、异槲皮苷、忍冬苷、水仙苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷和芹菜素对主成分2贡献度较高。



H3-华金3号 H6-华金6号 JF-九丰一号 SJ-四季花 HB-红白忍冬 P1-芦丁 P2-圣草酚-7-O-葡萄糖苷 P3-金丝桃苷 P4-异槲皮苷 P5-木犀草苷 P6-忍冬苷 P7-山柰酚-3-O-芸香糖苷 P8-紫云英苷 P9-水仙苷 P10-野漆树苷 P11-异鼠李素-3-O-葡萄糖苷 P12-芹菜素-7-O-葡萄糖苷 P13-苜蓿苷 P14-木犀草素 P15-槲皮素 P16-金圣草黄素 P17-香叶木素 P18-芹菜素 P19-苜蓿素 P20-似梨木双黄酮
 H3-Huajin3 H6-Huajin6 JF-Jiufeng1 SJ-Sijihua HB-Hongbairendong P1-rutin P2-eriodictyol-7-O-glucuronide P3-hyperoside P4-isoquercitrin P5-luteoloside P6-lonicerin P7-kaempferol-3-O-rutinoside P8-astragaln P9-narcissin P10-rhoifolin P11-isorhamnetin-3-O-glucoside P12-apigenin-7-O-glucoside P13-tricin-7-O-glucoside P14-luteolin P15-queretin P16-chrysoeriol P17-diosmetin P18-apigenin P19-tricin P20-ochnaflavone

图3 不同种质金银花各发育期 20 种黄酮类成分含量
 Fig. 3 Contents of 20 flavonoids of LJF at different development stages in different germplasm

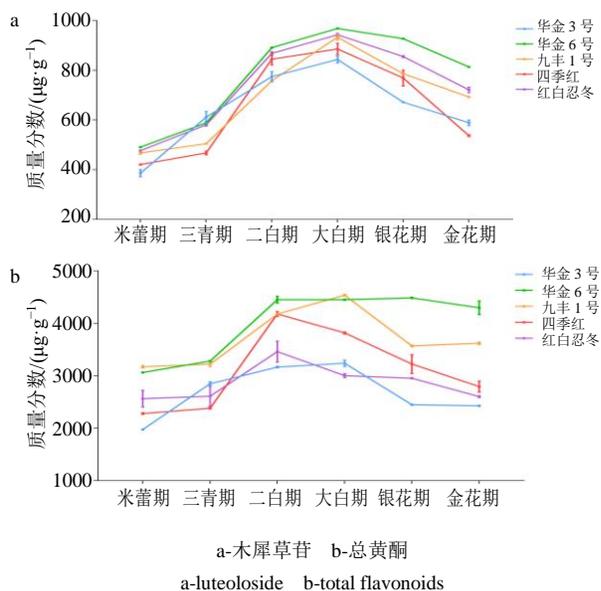


图4 不同种质金银花各发育期木犀草苷和总黄酮含量变化
Fig. 4 Contents of luteoloside and total flavonoids in different germplasm and different development stages of LjF

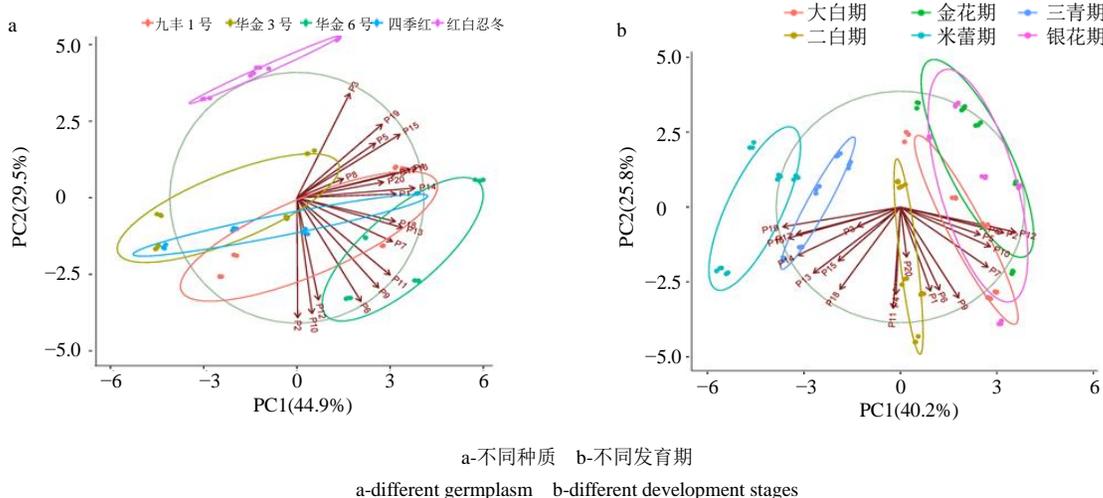


图5 不同种质金银花各发育期黄酮类成分含量 PCA 分析图

Fig. 5 PCA analysis of LjF in different germplasm and different development stages

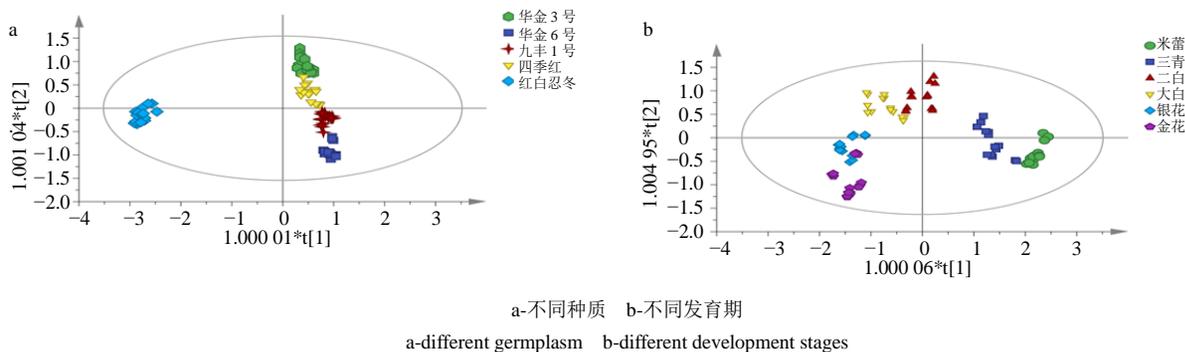


图6 不同种质金银花各发育期黄酮类成分含量 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 Score plot generated by OPLS-DA analysis of LjF in different germplasm and different development stages

3.2.2 正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 分析 将不同种质金银花各发育期黄酮类成分含量数据归一化、标准化处理后, 进行 OPLS-DA 分析, 以确定导致组间差异的黄酮类成分。OPLS-DA 得分图如图 6 所示。

图 6 显示, 模型 (图 6-a) 的 R^2_X 、 R^2_Y 和 Q^2 分别为 0.989、0.853 和 0.816, 模型 (图 6-b) 的 R^2_X 、 R^2_Y 和 Q^2 分别为 0.981、0.597 和 0.545, 表明模型稳定性和可靠性较好。同时, 由图 6-a 可知, 各个种质均可划分为不同组别, 说明不同种质金银花所含黄酮类成分存在较大差异, 且红白忍冬与其他种质分布在不同侧, 进一步说明了红白忍冬作为忍冬变种与其他种质差异显著。不同发育期得分图显示, 各时期均能被明显分开, 说明金银花在生长发育过程中黄酮类成分的代谢情况发生了明显变化, 存在差异性成分。利用所建 OPLS-DA 模型进行了 200 次随机排列测试, 以评估其有效性, 结果如图 7 所示。

图 7 显示, 原始模型的 R^2 和 Q^2 值 (右端) 均

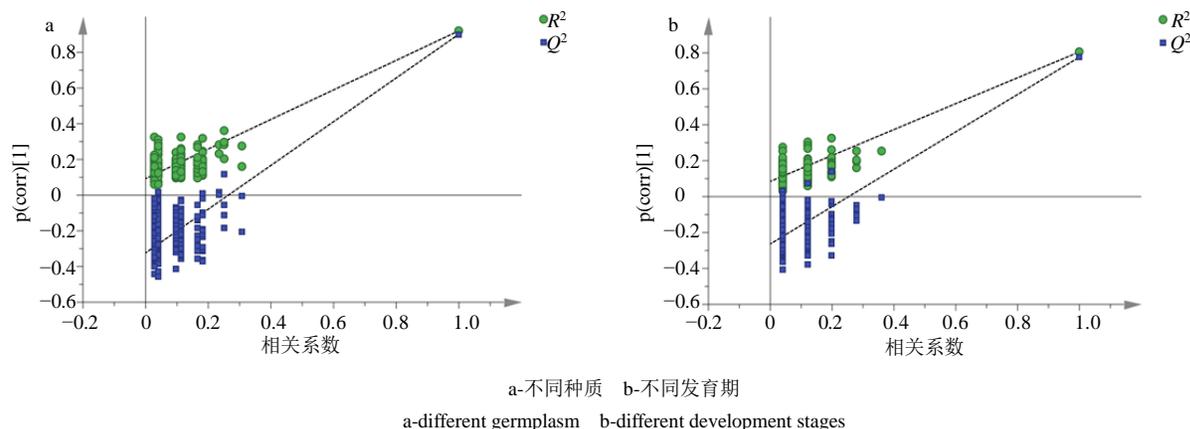


图7 不同种质金银花各发育期黄酮类成分含量 OPLS-DA 置换检验结果

Fig. 7 OPLS-DA permutation tests of LJF in different germplasm and different development stages

高于置换模型中的 R^2 和 Q^2 值 (左端), 并且置换的 Q^2 点的回归直线与垂直轴相交, 低于零, 表明所建立的 OPLS-DA 模型具有较高的拟合优度和可预测性。根据变量重要性投影, 得到变量权重重要性排序 (variable importance in projection, VIP) 预测值, 筛选出 $VIP > 1.0$ 的成分并进行 t 检验 ($P > 0.05$), 获得不同种质金银花黄酮类成分差异标志物共 9 个 (图 8-a),

分别是野漆树苷、似梨木双黄酮、忍冬苷、水仙苷、芦丁、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、圣草酚-7-O-葡萄糖苷、芹菜素和山柰酚-3-O-芸香糖苷。此外还获得 7 个差异性成分, 分别为苜蓿素、野漆树苷、香叶木素、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、金圣草黄素、紫云英苷和圣草酚-7-O-葡萄糖苷, 用来识别金银花不同生长发育期 (图 8-b)。

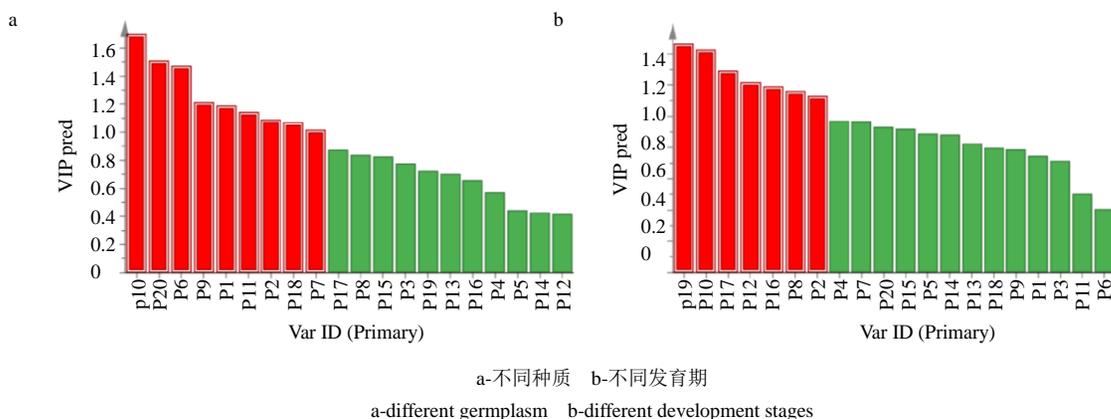


图8 不同种质金银花各发育期黄酮类成分含量 OPLS-DA 模型的 VIP 值

Fig. 8 VIP predictive generated by OPLS-DA analysis of LJF in different germplasm and different development stages

4 讨论

前期实验优化了金银花黄酮类成分的提取条件, 确定最佳提取工艺为 80% 甲醇与液料比 30:1 (mL/g)、温度 50 °C、时间 80 min。在此工艺的基础上采用 HPLC-ESI-MS/MS 分析方法, 系统研究了 5 个金银花种质在不同生长发育阶段所含黄酮类成分含量变化规律。发现金银花黄酮类成分含量既决定于种质, 也受发育时期的影响。含量测定结果表明, 不同种质金银花黄酮类成分存在较大差异, 总黄酮含量显示: 华金 6 号 > 九丰一号 > 四季花 > 红

白忍冬 > 华金 3 号, 木犀草苷含量显示: 华金 6 号 > 红白忍冬 > 九丰一号 > 四季花 > 华金 3 号。上述结果提示, 华金 6 号金银花黄酮类成分含量高, 尤其是在木犀草苷含量方面具有显著优势, 未来开发利用前景广阔。此外, 随着药用器官的生长发育, 其内在次生代谢产物也处于动态变化中。金银花植株花期短, 不同生长发育阶段花中所含黄酮类成分含量差异较大。总黄酮和木犀草苷含量的变化规律基本相同, 均是先升高后降低, 于二白期或大白期达到峰值, 此时采收的金银花木犀草苷含量均可达到

国家药典 0.05%的要求,这与“摘将开花蕾”的传统经验基本相符。

木犀草苷是金银花中主要的黄酮类成分,因其具有邻二酚羟基特殊结构而被赋予了明显的药理活性,已被证明的有抗菌、抗病毒、抗氧化、解热抗炎、抗肿瘤^[13-16]等,这些活性与金银花清热解毒的传统功效契合度很高,因此从《中国药典》2005年版开始,就将其作为评价金银花质量的指标之一,但在《中国药典》2020年版修订过程中,有人曾建议将该指标取消^[17],主要原因是其含量较低且不达标的金银花药材数量较多。但木犀草苷含量与金银花传统功效密切相关,并且是区分金银花与山银花的有效指标,因此国家药典最终没有将该指标取消。国家药典是药材质量的指挥棒,设立的质量控制指标具有很强的导向作用。药典要求金银花绿原酸含量不得低于1.5%、总酸含量不得低于3.8%,容易被误解为绿原酸含量越高越好,而金银花花蕾越幼嫩绿原酸、总酸含量越高,结果实际生产中金银花采收时间越来越早,致使木犀草苷含量越来越低。本研究结果提示,为有效控制金银花药材质量,采收期不能盲目提前。另一方面,许多药用植物同一器官因发育程度不同,所含药效物质不同,而被分列为不同的药材,如槐米与槐花、枳实与枳壳等。研究发现,开放后的金银花中野漆树苷、圣草酚-7-O-葡萄糖苷、紫云英苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷等成分含量较高,但木犀草苷含量降低,后续应考虑开放金银花的开发利用问题。

本实验首次建立了HPLC-ESI-MS/MS同时测定金银花中20种黄酮类成分含量的方法,远超前人同时测定金银花黄酮类成分的种类^[18-19],为全面表征金银花黄酮类成分变化规律、评价金银花药材质量建立了实用、可行的技术平台。金银花黄酮类成分种类众多,在其生物合成过程中存在着千丝万缕的联系,通过含量测定可以帮助了解其合成积累规律,为金银花种质资源评价、良种选育及确定适宜采收期提供参考,对于控制金银花药材质量具有重大意义。后续本课题组还要结合基因组学、转录组学和代谢组学等技术与方法,研究金银花黄酮类成分合成与代谢机制,为金银花道地基因保护、次生代谢调控提供技术支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 237-239.
[2] Wang L N, Jiang Q, Hu J H, et al. Research progress on

chemical constituents of *Lonicerae japonicae Flos* [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016(3): 1-18.

- [3] 吴娇, 王聪, 于海川. 金银花中的化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4): 225-234.
[4] 赵爱英. 浅析金银花的药理作用与临床应用 [J]. 当代医药论丛, 2018, 16(4): 53-54.
[5] Miao H, Zhang Y, Huang Z L, et al. *Lonicera japonica* attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice: Molecular mechanisms of action [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(2): 351-367.
[6] 杨娟, 于晓涛, 郭丽娜, 等. 金银花抗肺癌作用机制的网络药理学研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(2): 213-220.
[7] 周凤琴, 李佳, 冉蓉, 等. 我国金银花主产区种质资源调查 [J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(3): 21-25.
[8] 何平, 郭晔红, 李欠, 等. 3个品种金银花不同器官中3种有效成分的比较 [J]. 中成药, 2019, 41(4): 862-867.
[9] 沈娟, 崔培超, 王永香, 等. 不同种质金银花中有机酸类及苷类成分的测定 [J]. 中草药, 2014, 45(20): 2993-2996.
[10] 王玲娜, 张芳, 李佳, 等. 金银花新品种“华金6号”药材品质比较研究 [J]. 中药材, 2019, 42(9): 2030-2035.
[11] 刘天亮, 杨林林, 董诚明, 等. 金银花不同采收期指纹图谱及成分变化情况研究 [J]. 中药材, 2021, 44(10): 2366-2370.
[12] 郑国成, 李汉天, 庞丽华, 等. 不同产地、采收期及加工方法金银花中木犀草苷含量分析 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(6): 97-99.
[13] 张永欣, 张启伟, 李春, 等. 忍冬叶中抗氧化化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2372-2377.
[14] Xiong J, Li S, Wang W, et al. Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves [J]. *Food Chem*, 2013, 138(1): 327-333.
[15] 马双成, 刘燕, 毕培曦, 等. 金银花药材中抗呼吸道感染感染的黄酮类成分的定量研究 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(4): 426-430.
[16] Shao J L, Wang C X, Li L Q, et al. Luteoloside inhibits proliferation and promotes intrinsic and extrinsic pathway-mediated apoptosis involving MAPK and mTOR signaling pathways in human cervical cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): E1664.
[17] 靳光乾. 对2020年《中国药典》中金银花国家标准修改稿的商榷 [J]. 山东林业科技, 2020, 50(2): 98-99.
[18] Cai Z C, Wang C C, Zou L S, et al. Comparison of multiple bioactive constituents in the flower and the caulis of *Lonicera japonica* based on UFLC-QTRAP-MS/MS combined with multivariate statistical analysis [J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1936.
[19] Wang Y D, He Y, Dai Z, et al. A comparative study on bioactive constituents in different parts of *Lonicera japonica* determined by HPLC-ESI-MS(n). [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18(10): 988-1003.

[责任编辑 时圣明]