

基于指纹图谱对金银花与山银花的区分及各品种金银花质量评价

齐大明¹, 董诚明^{1,2*}, 刘天亮¹, 高启国³, 杨林林¹, 侯文川¹

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046

3. 河南太龙药业股份有限公司, 河南 郑州 450001

摘要: 目的 建立金银花和山银花指纹图谱, 对河南封丘金银花与湖南不同基原山银花进行区别比较, 并对封丘不同品种金银花进行质量评价。方法 利用 HPLC 法构建金银花和山银花药材的指纹图谱; 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”进行相似度评价、以“SIMCA13.0”软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)分析; 通过 HPLC 法测定河南封丘不同品种金银花成分含量。结果 河南封丘产金银花相似度均在 0.95 以上, 湖南各基原山银花相似度在 0.97 以上, 金银花和山银花相似度在 0.57~0.79, 豫金二号与金银花及山银花药材相似度均在 0.6 以下, 共有多成分 PCA 分析也能显著区分金银花和山银花。金银花各品种中北花 1 号酚酸类以绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 之和为 5.1%, 比其他品种高约 15%; 木犀草苷豫金 1 号含 0.062%、北花 1 号 0.064%, 比四季花高约 25%、比羊角花高约 50%。结论 该化学指纹图谱方法能显著区分金银花和山银花, 二者间的化学成分差异亦能为金银花指标性成分的选择提供参考。金银花不同栽培品种成分含量差异明显, 豫金 1 号和北花 1 号药材质量较优, 是具有进一步开发利用的潜在优质种质资源。

关键词: 金银花; 品种; 山银花; HPLC 指纹图谱; 质量评价; 绿原酸; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 质量标志物

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)06-1946-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.027

Identification of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* based on fingerprint and quality evaluation of different varieties of *Lonicerae Japonicae Flos*

QI Da-ming¹, DONG Cheng-ming^{1,2}, LIU Tian-liang¹, GAO Qi-guo³, YANG Lin-lin¹, HOU Wen-chuan¹

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China

3. Taloph Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Jinyinhua (*Lonicerae Japonicae Flos*) and Shanyinhua (*Lonicerae Flos*). The differences of *Lonicerae Japonicae Flos* in Fengqiu of Henan Province and *Lonicerae Flos* in Hunan Province were compared based on the HPLC fingerprint and the quality of different varieties of *Lonicerae Japonicae Flos* in Fengqiu was evaluated. **Methods** Fingerprints of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* were established by HPLC. The Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 version) was used for similarity evaluation, and the PCA analysis was performed by (SIMCA13.0). HPLC was used to detect the content of different varieties of *Lonicerae Japonicae Flos* in Henan. **Results** The similarity of all varieties of *Lonicerae Japonicae Flos* in Fengqiu was above 0.95, similarity of *Lonicerae Flos* from different origins was above 0.97. The similarity of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* was 0.57–0.79. The similarity between the Yujin No.2 and *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* were less than 0.6. PCA analysis can distinguish *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* significantly. The total contents of chlorogenic acid, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C in the Beihua No.1 was 5.1%, which was 15% higher than other varieties of *Lonicerae Japonicae Flos*. The content of luteoloside in the Yujin No.1 was 0.062% and in

收稿日期: 2022-09-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81603232)

作者简介: 齐大明(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。Tel: 18838963870 E-mail: 809735897@qq.com

*通信作者: 董诚明, 教授, 主要从事药用植物学、中药资源学研究。Tel: 13592508163 E-mail: dcm371@sohu.com

the Beihua No. 1 was 0.064%, which were about 25% higher than that in the Sijihua and about 50% higher than that in the Yangjiaohua.

Conclusion The HPLC fingerprint can significantly distinguish *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos*, and the difference of chemical components between them could also provide reference for the selection of Q-markers of *Lonicerae Japonicae Flos*. The content of components in different varieties of *Lonicera japonicae Flos* was significantly different. The Yujin No.1 and the Beihua No.1 have better quality, which were potential germplasm resources for further development and utilization.

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; variety; *Lonicerae Flos*; HPLC fingerprint; chlorogenic acid; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; Q-Markers

金银花是忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.的花蕾或带初开的花。山银花为灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand.-Mazz.、红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq.、华南忍冬 *L. confusa* DC.或黄褐毛忍冬 *L. fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng 的干燥花蕾或带初开的花。自《中国药典》2005 年版起,金银花与山银花分开单列。

中药材质量及临床疗效的物质基础是化学成分^[1],化学成分种类及含量的差异会造成疗效的差异。中药材多靶点、多成分的整体性表明以某一种或者几种化学成分来判定品质优劣是不科学的^[2]。中药化学指纹图谱是一种能够全面体现化学成分的方法,能够全面清晰地表现出中药材成分种类差异及成分间的量比关系。现有金银花及山银花化学指纹图谱区别的研究^[3]。

遗传物质对中药材品质影响巨大,种质种源是遗传物质的体现,遗传物质是药用植物品种的内在特性,它决定了中药品种的基本品质^[4]。种质种源对中药材规范化种植意义重大,优质种源是药材品质及临床疗效的基本保证^[5]。金银花种质资源丰富、栽培品种繁多,且各品种间成分含量差异明显^[6]。金银花品种间质量评价对金银花的品种改良、生产实践和引种等均具有重要意义^[7]。

本课题组建立金银花和山银花的指纹图谱,全面比较金银花与山银花二者间成分种类及含量的差异,为金银花及山银花的鉴别及成分差异研究提供依据。也能为金银花的质量标志物研究提供部分参考。此外课题组还对当前河南封丘具有一定栽培面积的各忍冬栽培品种进行质量评价,为金银花的优质育种和金银花规范化种植基地选种提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),IMS105DU 型半微量天平(瑞士梅特勒-托利多集团),KQ-500DV 型超声波清洗机(昆山市超声

波清洗器)等。

1.2 材料

绿原酸(批号 140322),中国食品药品检定研究院;香豆酸(批号 wkq17110212)、芦丁(批号 wkq16101104)、新绿原酸(批号 wkq18030107)、獐牙菜苷(批号 wkq18042610)、异绿原酸 A(批号 wkq18041207)、异绿原酸 C(批号 wkq18050905)、异绿原酸 B(批号 wkq19012301)均购于维克奇生物科技有限公司;断马钱子酸(批号 DST190719-136)、异槲皮苷(批号 DST191012-006)、忍冬苷(批号 DST190708-048)均购于德思特生物科技有限公司;幼枝含断氧化马钱子苷(批号 P27N8L49194)、木犀草苷(批号 Y26A9H59973)均购于源叶生物科技有限公司;咖啡酸(批号 MUST-16060613)、莫诺苷(批号 MUST-15102911)均购于成都曼斯特生物科技有限公司。所用对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。色谱甲酸(北京迈瑞达公司),色谱甲醇、色谱乙腈(Fisher Scientific 公司),甲醇(分析纯,天津富宇公司),超纯水等。

供试样品经由河南中医药大学药学科董诚明教授鉴定,样品 1~4 为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* Thunb., 5 为忍冬变种(不做药用),6~7 为红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq., 8 为华南忍冬 *L. confusa* DC., 9 为灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand.-Mazz.。信息详见表 1。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 以 Symmetry C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱,以乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱:0~10 min, 8%~9% A; 10~15 min, 9% A; 15~20 min, 9%~10% A; 20~25 min, 10%~11% A; 25~30 min, 11%~14% A; 30~50 min, 14%~16% A; 50~60 min, 16%~20% A; 60~65 min, 20%~22% A; 65~70 min, 22%~24% A; 70~80 min, 24%~40% A。进样体积 10 μ L, 检测波长 245 nm, 体积流量 0.6 mL/min,

表 1 金银花及山银花采集信息及性状描述

Table 1 *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* collection information and character description

样品编号	品名	种名	外观性状描述	产地
1	四季花	忍冬	色绿, 棒状, 上粗下细, 略弯曲, 膨大部分宽度普遍在 3.0 mm 左右, 密被柔毛	新乡封丘
2	豫金 1 号忍冬		色绿, 棒状, 上粗下细, 略弯曲, 膨大部分较四季花宽, 密被柔毛, 柔毛较四季花也更密更长	新乡封丘
3	北花 1 号忍冬		黄绿色, 棒状, 上粗下细, 略弯曲, 密被柔毛, 较四季花少, 多开裂	新乡封丘
4	羊角花	忍冬	色绿, 棒状, 上粗下细, 略弯曲, 密被柔毛, 较四季花少, 偶见开裂	新乡封丘
5	豫金 2 号忍冬 (变种)		上部色紫红, 下部紫绿相间, 棒状, 上粗下细, 略弯曲, 较短, 密被柔毛	新乡封丘
6	白米花	红腺忍冬	黄白色至黄棕色, 表面偶见棕斑块, 质地硬, 上端膨大较金银花不明显, 萼筒无毛, 萼齿被柔毛, 花柱无毛	湖南桃源
7	青米花	红腺忍冬	色绿, 棒状弯曲, 质硬, 较白米花短, 上端膨大亦不明显, 萼筒无毛, 萼齿被柔毛, 花柱无毛	湖南桃源
8	五彩花	华南忍冬	灰棕色, 棒状弯曲, 质硬, 细短, 上部旋转状, 有开裂, 萼筒、萼齿均被毛	湖南桃源
9	山白花	灰毡毛忍冬	黄白色, 棒状弯曲, 有弹性, 纤维性强, 有开裂, 无毛或上半部或全部有毛	湖南隆回

柱温 38 ℃。

表 2 成分线性关系

Table 2 Linear relationship of components

成分	线性方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
绿原酸	$Y=0.000\ 1\ X+0.051\ 4$	0.999 7	129.25~646.25
异绿原酸 A	$Y=0.000\ 1\ X+0.037\ 4$	0.999 6	69.45~463.00
异绿原酸 C	$Y=0.133\ 8\ X+5.095\ 9$	0.999 5	18.38~73.50
木犀草苷	$Y=33\ 418\ X-65\ 818$	0.999 8	14.08~70.40

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称定香豆酸、新绿原酸、莫诺苷、绿原酸、断马钱子酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱苷、芦丁、异槲皮素、木犀草苷、忍冬苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C, 以 50% 甲醇溶解, 配制成质量浓度分别为 0.570、0.252、0.966、0.480、0.460、0.420、0.825、0.550、0.954、0.271、0.373、0.284、0.448、0.430、0.672 mg/mL 的贮备液, 再分别精密量取各贮备液 200 μL, 即得混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取金银花粉末 1 g 置具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 50 mL, 称定记录质量, 室温超声提取 30 min (功率 250 W、频率 35 kHz), 冷却后以 50% 甲醇补足减失质量, 摇匀过滤, 即得。

2.1.4 精密度试验 取混合对照品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下, 连续进样 6 次, 15 个峰面积的相对保留时间 RSD 均小于 2%, 相对峰面积 RSD 均小于 3%, 证明该法精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取四季花粉末 6 份, 按“2.1.3”项下制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下测定。15 个峰面积的相对保留时间 RSD 均小于 2%, 相对峰面积 RSD 均小于 3%, 证明该法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取四季花供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样, 15 个峰面积的相对保留时间 RSD 均小于 2%, 相对峰面积 RSD 均小于 3%。

2.2 金银花含量测定

参照《中国药典》2020 年版金银花项下含量测定并进行线性关系考察, 线性关系见表 2。

2.3 结果与分析

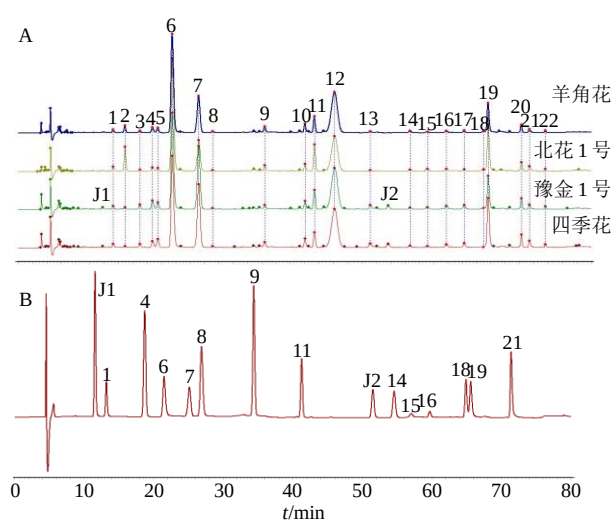
2.3.1 金银花及山银花指纹图谱相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版)”对样品图谱进行相似度评价, 相似度数据见表 3。但是为了清晰看出样品间差别, 将金银花和山银花重叠图谱放在了不同图上, 见图 1~3。

由图 1、2 可知, 不同品种金银花药材共有峰 22 个, 已知化合物 15 个; 不同基原山银花共有峰 16 个, 与金银花共有峰 15 个, 共有已知化合物 9 个, 分别为新绿原酸、绿原酸、断马钱子酸、当药苷、断氧化马钱子苷、异槲皮素、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C。由图 3 可知金银花有而山银花没有的峰有 5、10、13、15 (木犀草苷)、16 (忍冬苷)、17、22 号峰。金银花含量较山银花较高的有 7 号峰 (断马钱子酸) 和 12 号峰, 山银花较金银花含量高的有 1 (新绿原酸)、6 (绿原酸)、11 (断氧化马钱苷)、14 (异槲皮素)、19 (异绿原酸 A) 和 21 (异绿原酸 C) 号峰。

四季花、豫金 1 号、北花 1 号和羊角花相似度超 0.95; 但豫金 1 号、四季花含有少量香豆酸及芦丁, 相似度达 0.994, 北花 1 号和羊角花则不含有。山银花样品相似度均在 0.97 以上, 白米花和青米花 (同属红腺忍冬) 相似度达 0.993, 其中山白花 (灰

表 3 各样品间相似度
Table 3 Similarity between samples

样品	相似度								
	白米花	北花 1 号	青米花	山白花	四季花	五彩花	羊角花	豫金 1 号	豫金 2 号
白米花	1.000	0.774	0.993	0.973	0.648	0.974	0.658	0.613	0.599
北花 1 号		1.000	0.765	0.787	0.955	0.729	0.981	0.954	0.550
青米花			1.000	0.987	0.647	0.985	0.649	0.607	0.581
山白花				1.000	0.680	0.979	0.678	0.639	0.579
四季花					1.000	0.625	0.973	0.994	0.424
五彩花						1.000	0.610	0.575	0.564
羊角花							1.000	0.983	0.461
豫金 1 号								1.000	0.434
豫金 2 号									1.000



1-新绿原酸 4-莫诺昔 6-绿原酸 7-断马钱子酸 8-咖啡酸 9-当药昔 11-断氧化马钱昔 14-异槲皮素 15-木犀草昔 16-忍冬昔 18-异绿原酸 B 19-异绿原酸 A 21-异绿原酸 C J1-香豆酸 J2-芦丁
1-neochlorogenic acid 4-morroniside 6-chlorogenic acid 7-secologaninsaeure 8-caffeic acid 7-sweroside 9-secoxyloganin 11-ferulic acid 14-isoquercetin 15-cynaroside 16-xylostein 18-isochlorogenic acid B 19-isochlorogenic acid A 21-isochlorogenic acid C J1-cumalic acid J2-troxerutin

图 1 金银花样品 HPLC 指纹图谱叠加图 (A) 和混合对照品 (B) 图
Fig. 1 HPLC fingerprint overlay of *Lonicerae Japonicae Flos* sample (A) and mixed reference (B)

毡毛忍冬)与红腺忍冬及华南忍冬峰有些许差异,尤其以 4 号峰(莫诺昔)和 J2 号峰(芦丁)含量较高。

豫金 2 号与药用的金银花和山银花两者差别较

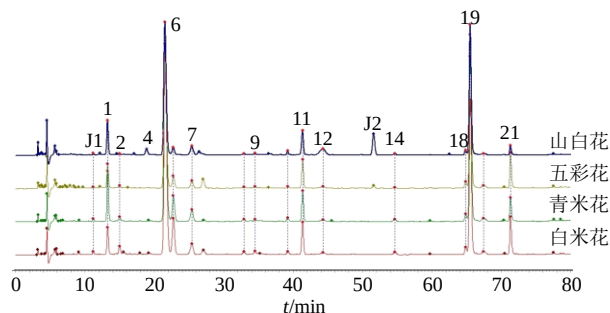


图 2 山银花样品 HPLC 指纹图谱叠加图
Fig. 2 Overlay of HPLC fingerprints of *Lonicerae Flos* samples

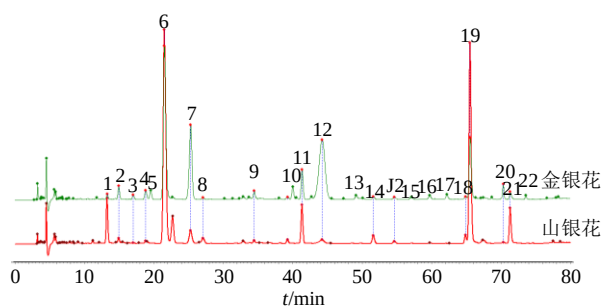


图 3 金银花与山银花对照指纹图谱
Fig. 3 Fingerprints of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos*

大,和每个样品相似度都低于 0.60,可以完全独立出来,故而该忍冬变种在产地不做药用。由图 4 可知豫金 2 号环烯醚萜类中 11 号峰断氧化马钱昔含量较金银花与山银花高。

2.3.2 金银花及山银花已知共有化学成分主成分

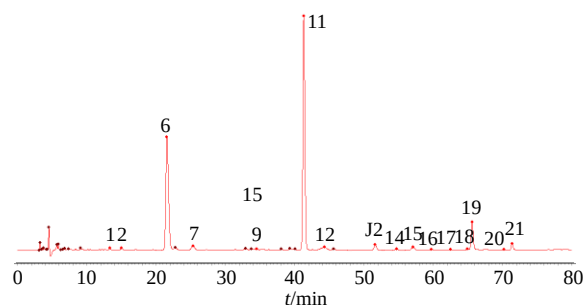


图 4 豫金 2 号 HPLC 指纹图谱

Fig. 4 Yujin NO 2 HPLC fingerprint

分析 (principal component analysis, PCA) 就样品中已知的 9 个共有峰面积 (表 4), 分别为新绿原酸、绿原酸、断马钱子酸、当药苷、断氧化马钱子苷、异槲皮素、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C, 采用 SIMCA13.0 对样品进行 PCA 分析, 模型检验 $R^2_X=0.95$ 、 $Q^2=0.654$, 表明该模型预测信度很好。结果如图 5 所示, 与相似度评价结果一致, 金银花与山银花各聚为一类, 且四季花与豫

金 1 号相似度高, 白米花与青米花相似度高。

2.3.3 金银花及山银花已知共有化学成分含量差异分析 以封丘种植历史较久的四季花中 9 个共有已知成分作为参照, 比较各药材间化学成分差异, 用各药材对应峰面积除以四季花对应峰面积, 数值大于 1 表示含量高, 小于 1 表示含量低。由表 5 可知山银花中新绿原酸峰面积是金银花的 5.05~14.16 倍, 山银花较金银花中绿原酸偏高、异绿原酸 B 是金银花的 2.00~5.06 倍、异绿原酸 A 是金银花的 2.29~4.85 倍、异绿原酸 C 是四季花的 1.29~7.86 倍。金银花是山银花中断马钱子酸峰面积的 3.33~10 倍, 金银花是山银花中当药苷峰面积的 1.14~5.24 倍。豫金 2 号断氧化马钱子苷较其他样品高 15 倍左右。由图 6 可知金银花聚为一类时起主要作用的成分为当药苷和断马钱子酸; 山银花聚为一类的成分有异槲皮素和有机酸类成分; 豫金 2 号与其他样品差异性大的主要原因就是断氧化马钱子苷。

表 4 金银花和山银花已知共有化合物峰面积

Table 4 Known compound peak area of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos*

样品	峰面积								
	新绿原酸	绿原酸	断马钱子酸	当药苷	断氧化马钱子苷	异槲皮素	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
白米花	1 903.41	24 462.99	1 412.30	360.08	2 778.91	351.90	700.52	15 131.29	3 076.69
青米花	3 700.81	22 184.98	1 455.04	136.66	2 625.18	310.33	693.13	16 226.58	1 970.53
五彩花	1 841.07	16 038.52	907.78	116.09	2 467.31	120.62	549.62	14 993.04	2 863.35
山白花	2 557.63	15 939.82	1 157.37	120.76	2 196.73	230.29	439.40	12 781.65	802.05
四季花	278.12	12 490.09	9 500.93	545.37	1 484.79	222.93	219.38	5 581.05	624.04
豫金 1 号	260.45	13 111.18	9 490.94	408.14	1 868.05	192.85	138.80	3 767.58	434.15
北花 1 号	365.11	15 647.77	4 772.15	544.58	2 632.61	231.10	208.26	5 373.31	483.06
羊角花	268.06	13 418.46	5 623.15	598.95	1 634.10	261.24	188.26	3 349.40	391.44
豫金 2 号	210.35	19 518.76	818.95	103.047	29 153.07	239.18	124.03	3 735.50	761.49

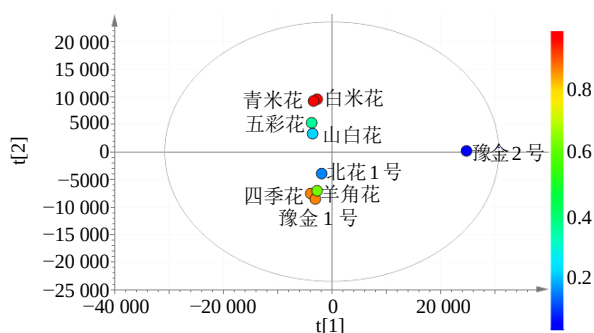


图 5 样品 PCA 得分分布图

Fig. 5 Score distribution chart of sample PCA

2.3.4 不同品种金银花质量评价 由表 6 可知, 不同品种金银花间成分量存在显著性差异, 含酚酸类以绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 三者之和计北花 1 号较高; 就木犀草苷而言, 豫金 1 号和北花 1 号量较高。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法及色谱条件考察

指纹图谱的建立过程中, 本课题组对提取溶剂种类: 水及不同浓度的甲醇和乙醇进行比较, 最后发现 50% 甲醇提取出的化学成分种类较多。课题组也对提取方式 (回流及超声) 进行比较, 因差异性不大, 故选择了超声提取。而后对料液比、超声功

表 5 金银花和山银花已知共有化合物峰面积比

Table 5 Peak area ratios of known compounds in *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos*

样品	峰面积比								
	新绿原酸	绿原酸	断马钱子酸	当药苷	断氧化马钱子苷	异槲皮素	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
白米花	6.84	1.96	0.15	0.66	1.87	1.58	3.19	2.71	4.93
青米花	13.31	1.78	0.15	0.25	1.77	1.39	3.16	2.91	3.16
五彩花	6.62	1.28	0.10	0.21	1.66	0.54	2.51	2.69	4.59
山白花	9.20	1.28	0.12	0.22	1.48	1.03	2.00	2.29	1.29
四季花	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
豫金 1 号	0.94	1.05	1.00	0.75	1.26	0.87	0.63	0.68	0.70
北花 1 号	1.31	1.25	0.50	1.00	1.77	1.04	0.95	0.96	0.77
羊角花	0.96	1.07	0.59	1.10	1.10	1.17	0.86	0.60	0.63
豫金 2 号	0.81	1.49	0.09	0.25	15.61	1.24	0.89	0.99	1.75

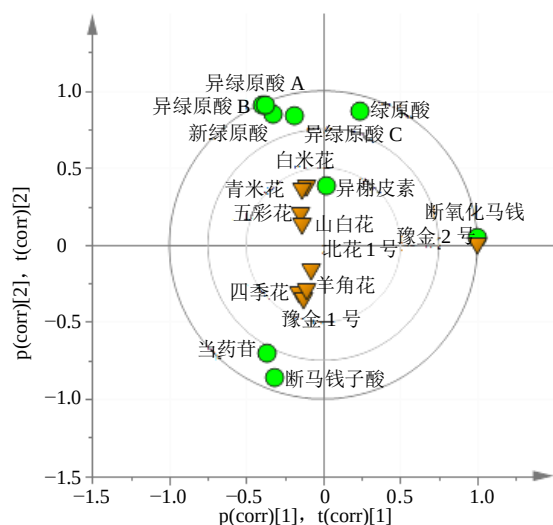


图 6 样品 PCA 品名、成分双标图

Fig. 6 Name and composition double labeling of sample PCA

率、提取时间、都进行过考察；确定了供试品的提取方法。同时对流动相梯度变化、检测波长、色谱柱温、体积流量等参数进行优化，最终确定了该色谱指纹图谱条件。该色谱条件在能较全面分离金银花化学成分的同时较现有金银花指纹图谱时间也有所缩减。

3.2 化学成分与指标性成分

在化学指纹图谱相似度计算时，将大面积峰对应的高含量的化学成分进行严格的控制，次要峰和小峰则允许有较大变化或直接忽略不计，这对评价有效成分不明确的中药并不合适。有研究称指纹图谱间的细微差异可能才是质量评价的关键^[8]。刘昌孝院士^[9-10]提出的质量标志物其具有“有效性”“特有性”“传递与溯源性”“可测性”及“相关配伍”等特点。而实际情况下标志物的选择很难兼顾所有特性。以金银花中绿原酸为例，现代药理研究表明

表 6 不同品种金银花含量测定

Table 6 Content determination of different varieties of *Lonicerae Japonicae Flos*

品种	绿原酸/%	异绿原酸 A/%	异绿原酸 C/%	酚酸类/%	木犀草苷/%
豫金 1 号	2.94±0.070 ^c	1.35±0.030 ^b	0.20±0.010 ^b	4.49±0.108 ^b	0.062±0.001 ^a
四季花	2.61±0.020 ^d	1.55±0.060 ^a	0.23±0.020 ^a	4.39±0.092 ^b	0.048±0.003 ^b
北花 1 号	3.30±0.046 ^a	1.60±0.020 ^a	0.20±0.006 ^b	5.10±0.046 ^a	0.064±0.004 ^a
羊角花	3.05±0.067 ^b	1.21±0.015 ^c	0.15±0.010 ^c	4.41±0.044 ^b	0.029±0.001 ^c

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

绿原酸具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化和抗炎的作用，这就是有效性的体现，可测性是质量标志物的基础，但绿原酸大多数中药材中都含有，比如山银花、菊花、苍耳等，相对于金银花绿原酸的专属性就不强。通过对比金银花及山银花指纹图谱，可以发现 5、10、13、15（木犀草苷）、16（忍冬苷）、17 和 22 号峰，均是金银花有而山银花没有的峰，现代研究表明木犀草苷具有抑菌、抗炎、抗病毒、

抗肿瘤、抗皮肤老化、抗局部缺血的生物活性^[11]。相对于绿原酸来说木犀草苷在有效性的基础之上专属性也更强一些。而除木犀草苷和忍冬苷外，5、10、13、17 和 22 这 5 个未知峰或许也能够为金银花的质量标志物提供参考。

3.3 化学指纹图谱与基因相关性

基因是指通过有性繁殖或无性繁殖在亲代与子代间传递的遗传物质，不同药用植物栽培品种来源

的药材可能具有各自相对稳定的核酸序列,也具有各自独特的蛋白表达。生物指纹图谱是从基因水平上对药用植物进行种质亲缘关系检测的有效工具^[12]。在产地调查中了解到豫金 1 号是四季花芽变选育出的新品种,故而这 2 个品种相似度达 0.994,而且相对于北花 1 号及羊角花都多含有 J1 号峰(香豆酸)、J2 号峰(芦丁)。白米花和青米花虽然颜色性状差异较大,但是同属红腺忍冬,可能是采收花期及干燥方式不同造就了颜色的差异,但后期的这些因素并不会对基因序列造成影响,而两者化学指纹图谱相似度达 0.993,在一定程度上也表现了基因序列的信息。化学指纹图谱与 DNA 指纹图谱必然存在一定相关性,故而采用 DNA 指纹图谱表征药效组分含量及化学指纹图谱特征,挑选忍冬优良品种也不失为一条研究路线。

3.4 忍冬品种探讨

忍冬各品种间成分含量有明显差异,据本课题组调研,现河南封丘确实存在部分金银花木犀草苷含量低于药典要求的情况,排除金银花花期和茬期的影响,其中品种是一个不可忽视的问题。本课题组前期研究表明,不同生长期金银花中木犀草苷含量由高到低依次为大白期>二白期>三青期>银花期>金花期^[8]。金银花采花时期一般分为四茬,木犀草苷含量与金银花茬期的关系也表现为头茬含量最高。为了避免金银花茬期间差异的影响,这 4 个忍冬品种均采收于同一时期。排除前面这些因素,化学成分含量偏低的原因可能就是品种退化,封丘产地现栽培面积最大的就是四季花,多年的无性繁殖很可能引起品种退化。4 个品种中四季花和豫金 1 号直立性好、花期长、产量稳定;羊角花稍次之;北花 1 号的特点是花期持续时间短,长时间不开花,采摘较为方便,但是花期短也就造成产量偏低,而且烘干后的花蕾多开裂,市场认可度不高。而在木犀草苷含量上占据优势的有豫金 1 号和北花 1 号。本课题组对忍冬品种间质量评价的研究能够为金银花的优质育种和金银花规范化种植基地选种提供理论依据。

综上所述本实验成功构建的金银花和山银花的化学指纹图谱可对二者进行显著区分,且指纹图谱相似度的结果与共有化学成分 PCA 分析结果一致,由金银花及山银花已知共有化学成分 PCA 分析及

指纹图谱相似度联合分析,可知多成分同时测定也能在一定程度上反映药材的整体性,多指标定量评价模式较适合于中药的质量控制^[13]。木犀草苷、忍冬苷、5、10、13、17 和 22 这 7 个峰或许能为金银花的质量标志物提供参考。河南封丘现种植忍冬品种中豫金 1 号和北花 1 号质量较优,四季花产量占些许优势,虽各有部分缺陷,但仍是具有进一步开发利用的潜在种质资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 路俊仙,吕凌,张才波.金银花和灰毡毛忍冬多成分定性的指纹图谱比较[J].中华中医药杂志,2019,34(7):3215-3219.
- [2] 王智民.中药药效物质基础的系统研究是中药现代化的关键[J].中国中药杂志,2003,28(12):1111-1113.
- [3] 刘亚楠,石典花,雷留成.金银花与山银花的 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J].中草药,2017,48(4):773-776.
- [4] 索风梅,宋经元,陈士林,等.AFLP 分析唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄的亲缘关系研究[J].中草药,2010,41(2):292-296.
- [5] 王彩云,侯俊,王永,等.黔西北优质半夏种源筛选[J].北方园艺,2019(7):127-132.
- [6] 雷华平,秦韦,刘纯一,等.不同品种金银花中绿原酸和木犀草苷的含量测定[J].中国野生植物资源,2015,34(5):30-32.
- [7] 王湘莹,何钢,王晓明,等.金银花不同品种间遗传变异的 ISSR 分析[J].中南林业科技大学学报,2013,33(11):77-82.
- [8] 詹雪艳,史新元,段天璇,等.色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):248-251.
- [9] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等.中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J].中草药,2016,47(9):1443-1457.
- [10] 刘天亮,董诚明,齐大明.基于中药质量标志物(Q-marker)的金银花指纹图谱体系的构建思路[J].中草药,2020,51(1):229-235.
- [11] 杨丽军,王丹丹,张允菲,等.金银花中木犀草苷的研究进展[J].中国医药导报,2017,14(24):58-61.
- [12] 杨飞,张敏,彭兴扬,等.金银花五个品系的 RAPD 分析及 DNA 指纹图谱的建立[J].武汉植物学研究,2007,25(3):235-238.
- [13] 熊艳,王智民,林丽美,等.金银花质量控制方法研究进展[J].中国中医药信息杂志,2009,16(4):103-105.

[责任编辑 时圣明]