

· 质量分析研究 ·

金银花和山银花的薄层色谱指纹图谱分析

陆顺瑶¹, 谢培山¹, 梁育珍¹, 曾名德¹, 张奕尧¹, 肖辉彬², 李泳雪³, 郭隆钢¹(1. 广州科曼生物科技有限公司, 广东 广州 510663; 2. 广州万正药业有限公司, 广东 广州 510663; 3. 广东省药品检验所, 广东 广州 510663)

摘要: **目的** 建立高效薄层指纹图谱定性鉴别方法, 使用金银花对照提取物(JYH ERS)直接比较金银花和山银花药材的异同。**方法** 使用高效薄层色谱法、硅胶 G60 薄层板, 分别以乙酸丁酯-丙酮-甲酸-水(10:1:4:4)和三氯甲烷-甲醇-水(12:4:1)为展开剂, 用绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、断氧化马钱子苷和断马钱子酸对金银花及山银花进行定性鉴别。**结果** 高效薄层色谱显示 JYH ERS 与金银花药材在整体图谱上具有一致性。与山银花药材比较, 金银花及 JYH ERS 中的断马钱子酸斑点明显, 两种不同的展开剂均能有效鉴别出金银花和山银花药材。**结论** 金银花与山银花药材容易混淆, 使用所建立的高效薄层指纹图谱鉴别方法及 JYH ERS 可快速、有效地区分金银花与山银花。

关键词: 金银花对照提取物; 金银花; 山银花; 鉴别; 薄层色谱; 断氧化马钱子苷; 断马钱子酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)01-0103-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.01.015

Fingerprint Analysis of *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos

LU Shun Yao¹, XIE Pei Shan¹, LIANG Yu Zhen¹, ZENG Ming De¹, ZHANG Yi Yao¹, XIAO Hui Bin², LI Yong Xue³, GUO Long Gang¹(1. Guangzhou Chromap Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510663 Guangdong, China; 2. Guangzhou Imvin Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510663 Guangdong, China; 3. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510663 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** Our study assessed the application of JYH ERS in HPTLC identification of *Lonicerae japonicae* flos and *Lonicerae* flos. **Methods** TLC was conducted on pre-coated silica gel 60 HPTLC plate, developing with the solvent system of butyl acetate-acetone-formic acid-water(10:1:4:4) and trichloromethane-methanol-water(12:4:1) respectively. The contents of chlorogenic acid and isochlorogenic acid A were determined by external standard method using chlorogenic acid reference substance and isochlorogenic acid A reference substance, and the components in *Lonicerae japonicae* flos were identified by isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C, luteolin 7-O-glucuronide, secoxyloganin and secologanic acid. **Results** JYH ERS and *Lonicerae japonicae* flos are consistent in whole chromatograms. Compared with *Lonicerae* flos, the bands of secoxyloganin and secologanic acid were obvious in JYH ERS and *Lonicerae japonicae* flos, which could effectively distinguish *Lonicerae japonicae* flos and *Lonicerae* flos. **Conclusion** *Lonicerae japonicae* flos and *Lonicerae* flos are easily confused and can be identified effectively by HPTLC. Using the current HPTLC method and JYH ERS can identify *Lonicerae japonicae* flos quickly and effectively.

Keywords: *Lonicerae japonicae* flos extract reference substance(ERS); *Lonicerae japonicae* flos; *Lonicerae* flos; identification; TLC; secoxyloganin; secologanic

收稿日期: 2020-05-20

作者简介: 陆顺瑶, 女, 研究员, 研究方向: 中药质量控制及中药对照提取物的研发。Email: 1259119306@qq.com。通信作者: 郭隆钢, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量控制。Email: 1799213797@qq.com。

基金项目: 十七种特色药材美国和欧洲药典质量标准建立项目(192019082420900003)。

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。山银花为忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.、华南忍冬 *Lonicera confuse* DC. 或黄褐毛忍冬 *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng 的干燥花蕾或带初开的花^[1]。“金银花”一名始见于李时珍《本草纲目》，在“忍冬”项下提及。因近代文献沿用已久，现已公认为该药材的正名，并收入《中国药典》。金银花与山银花均来源于忍冬科植物，两者外观形状特征比较相似，但从 2005 年版《中国药典》开始，金银花的植物来源只为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花，因为这一改变减少了山银花的需求，使得其价格远低于金银花，造成金银花和山银花的市场商品混乱。由于没有很好的鉴别检测手段，根本无法区分投料的药材来源^[2-3]。现代研究^[4-6]表明金银花与忍冬藤及叶存在药理作用差异。金银花和山银花都有疏散风热、清热解毒的功效，但是，由于所含成分差异，其功效也有偏重，将金银花与山银花辨别清楚十分必要。在药效学方面，高剂量的山银花提取物会引起小鼠的超敏反应，而高剂量的金银花并未引起过敏^[7]。另外，有研究^[8]表明，金银花的体内免疫增强作用优于山银花；在抗菌、抗禽流感病毒、抗氧化方面，忍冬叶的活性强于金银花和忍冬藤。根据 2015 年版《中国药典》金银花与山银花鉴别项目下的薄层色谱 (TLC) 方法只是鉴定绿原酸，而且金银花与山银花 TLC 方法也不能直观简单地分辨两者，因此，建立能同时明显区别金银花与山银花的指纹图谱分析方法是很有必要的。本研究建立了同时适用于金银花及山银花的 TLC 指纹图谱分离方法，研究比较了相同薄层条件下金银花及山银花的指纹图谱差异，以区别两者。

1 仪器、药品与试剂

1.1 仪器 Linomat 5 薄层色谱半自动点样仪、ATS 4 薄层色谱全自动点样仪、ADC2 全自动展开仪、TLC visualizer 薄层色谱摄影仪、TLC-MS Interface 2 薄层色谱质谱接口仪，瑞士 CAMAG 公司；LTQ 质谱仪，赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 药品与试剂 乙酸丁酯、丙酮、甲酸、甲醇、硫酸、乙醇、三氯甲烷均为分析纯，广州化学试剂厂；纯化水为实验室自制。绿原酸(批号：110753-201817；纯度：96.8%)对照品，中国食品药品鉴定

研究院；异绿原酸 A(批号：H0071672198；纯度：≥98%)、异绿原酸 B(批号：H1021136198；纯度：≥98%)、异绿原酸 C(批号：HN021138198；纯度：≥98%)木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷(批号：HA061507198；纯度：≥98%)对照品，宝鸡辰光生物科技有限公司；断马钱子酸(批号：6719；纯度：99.3%)对照品，上海诗丹德标准技术服务有限公司；断氧化马钱子苷(批号：YP-19050905；纯度：>98%)对照品，宝鸡市翊瑞生物科技有限公司；金银花对照提取物(JYH ERS，批号：JYH-20190101)，广州科曼生物科技有限公司自制。

金银花对照药材(批号：121060-201608)、山银花对照药材(批号：121595-201202)，中国食品药品鉴定研究院。12 批金银花药材、6 批山银花药材，均为广州科曼生物科技有限公司收集。样品信息见表 1。

表 1 金银花与山银花的样品信息

Table 1 Information of samples

批号	品种	购买地	产地	性状
1	金银花	安徽亳州	-	花蕾，黄褐色
2	金银花	安徽亳州	-	花蕾，黄褐色
3	金银花	北京	-	初开的花和花蕾，黄褐色
4	金银花	北京	河北	花蕾，黄绿色
5	金银花	北京	河南	花蕾，黄绿色
6	金银花	北京	湖南	花蕾，黄绿色
7	金银花	安徽亳州	河南	花蕾，黄绿色
8	金银花	安徽亳州	河北	花蕾，黄绿色
9	金银花	安徽亳州	河南	花蕾，黄绿色
10	金银花	安徽亳州	-	已开的花，黄褐色
11	金银花	安徽亳州	-	已开的花，黄褐色
12	金银花	广东佛山	河南	花蕾，黄褐色
13	山银花	安徽亳州	湖南	初开的花和花蕾，质脆，黄色
14	山银花	安徽亳州	湖南	花蕾，质脆，黄绿色
15	山银花	安徽亳州	湖南	花蕾，质脆，黄绿色
16	山银花	安徽亳州	湖南	花蕾，质脆，黄绿色
17	山银花	安徽亳州	湖南	花蕾，质脆，黄色
18	山银花	安徽亳州	湖南	花蕾，质脆，绿色

2 方法与结果

2.1 绿原酸类薄层鉴别

2.1.1 供试品制备

2.1.1.1 药材供试品溶液制备 药材粉碎后过 3 号筛，取 0.2 g，加入甲醇 5 mL，超声 30 min，离心 (10 min, 4 000 r·min⁻¹)，取上清液，作为供试品溶液。

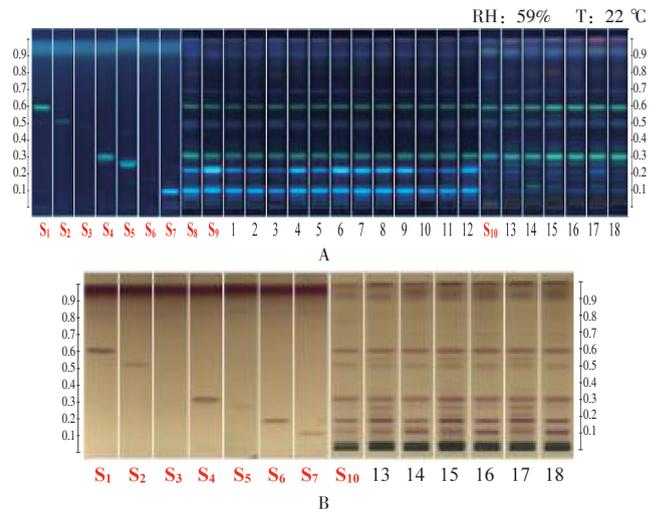
2.1.1.2 对照品溶液制备 称取异绿原酸 A、异绿原酸 C、异绿原酸 B、绿原酸、木犀草素-7-O-葡萄糖

醛酸苷、断马钱子酸、断氧化马钱子苷适量，分别溶于甲醇溶液，配成各对照品储备液。

2.1.1.3 对照提取物溶液制备 取 JYH ERS 适量，加甲醇超声 15 min 制成每 1 mL 含 20 mg 的溶液，即得。

2.1.2 薄层条件 薄层板：TLC G60 高效预制板(德国 Merck 公司)；供试品溶液点样体积 4 μ L，条带状点样宽 8 mm，点样后的薄层板放于放有五氧化二磷的真空干燥箱中干燥 30 min；展开剂：乙酸丁酯-丙酮-甲酸-水(10 : 1 : 4 : 4)静置分层后取上层；展开方式：上行展开，展距 8.5 cm；检视：展开后将薄层板放于 50 $^{\circ}$ C 加热板中干燥 10 min，放冷后喷以 10 % 硫酸乙醇溶液，于 105 $^{\circ}$ C 加热 2 min，在荧光 366 nm 下观察，拍照记录。再将薄层板喷以含 5 % 香草醛的 10 % 硫酸乙醇溶液，于 105 $^{\circ}$ C 加热 2 min，在可见光下观察，拍照记录。为方便对比观察，将 2 张薄层板拼接在一起并用自编软件扫描得到薄层色谱轮廓图。

2.1.3 结果 JYH ERS 与药材薄层色谱图见图 1，将图 1-A 进行扫描得到薄层扫描图谱，见图 2。



注：A. 荧光 366 nm 薄层图谱；B. 可见光薄层图谱。S₁. 异绿原酸 A；S₂. 异绿原酸 C；S₃. 异绿原酸 B；S₄. 绿原酸；S₅. 木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷；S₆. 断氧化马钱子苷；S₇. 断马钱子酸；S₈. JYH ERS；S₉. 金银花对照药材；S₁₀. 山银花对照药材；1~12 分别为批号 1~12 的金银花药材；13~18 分别为批号 13~18 的山银花药材

图 1 金银花与山银花的薄层色谱图谱
Figure 1 TLC chromatograph of samples

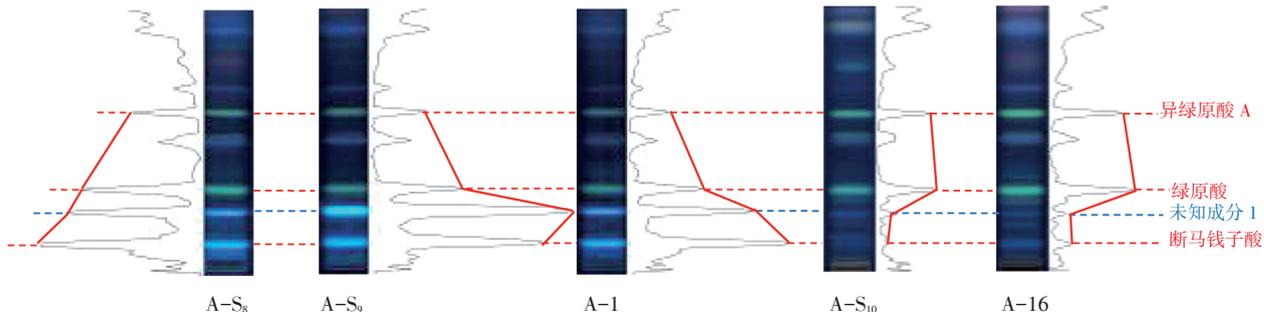


图 2 金银花与山银花样品薄层扫描图谱
Figure 2 TLC digital scanning images(fingerprints) of samples

根据 TLC 图谱结果，绿原酸类薄层鉴别方法可以很明显地区分出金银花与山银花。图 1 中样品 1~12 均为收集的金银花药材，12 批药材的图谱差异不大，均与金银花对照药材和 JYH ERS 的图谱基本一致，均为金银花正品。取金银花、山银花对照药材与 JYH ERS 薄层数码扫描轮廓图进行比对，见图 2。山银花(A-S₁₀、A-16)中的化学成分异绿原酸 A 和绿原酸对应的斑点亮度明显高于金银花；而在金银花中断马钱子酸对应的斑点明显亮于山银花；除此之外，在金银花图谱中 R_f 值约为 0.22 处(图 2 蓝色虚线所指)，有一明显蓝色荧光斑点，为未知成分 1，而在山银花中不明显，可区分金银花与山银花。在金银花中，断马钱子酸和未知成分 1 两者之间比例在不同金银花样品中是不一致的，这与金银花产地、

采收时间、存放年限等都有关系，需进一步研究确定，找寻规律。

将图 1-B 进行扫描得到薄层扫描图谱，见图 3。样品 13~18 均为收集的山银花药材，按 TLC 图谱可分为两种，山银花对照药材(S₁₀)与样品 14、16、18 图谱相近，为一种类型；而样品 13、15、17 图谱相近，化学成分稍微多点(图 3 中蓝色虚线标记)，应为另一种类型，两种类型可能是来源不同的山银花。

2.2 环烯醚萜苷类薄层鉴别

2.2.1 供试品制备 同 2.1.1 项下。

2.2.2 薄层条件 薄层板：TLC G60 高效预制板(德国 Merck 公司)；供试品溶液点样体积 4 μ L，条带状点样宽 8 mm，点样后的薄层板放于放有五氧化二磷

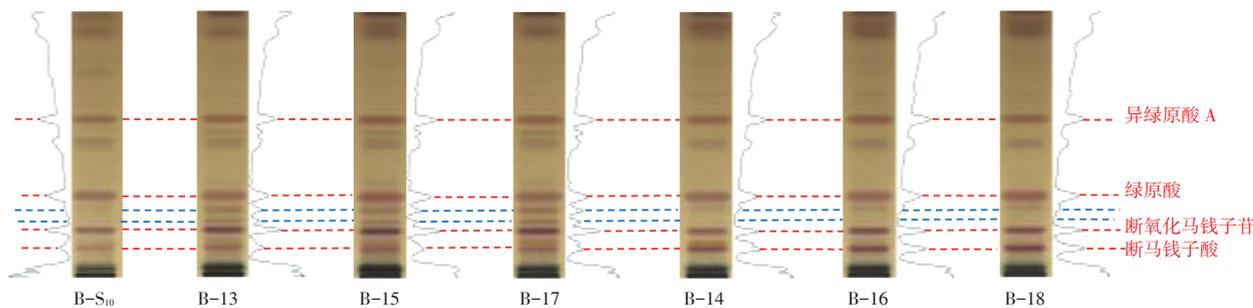


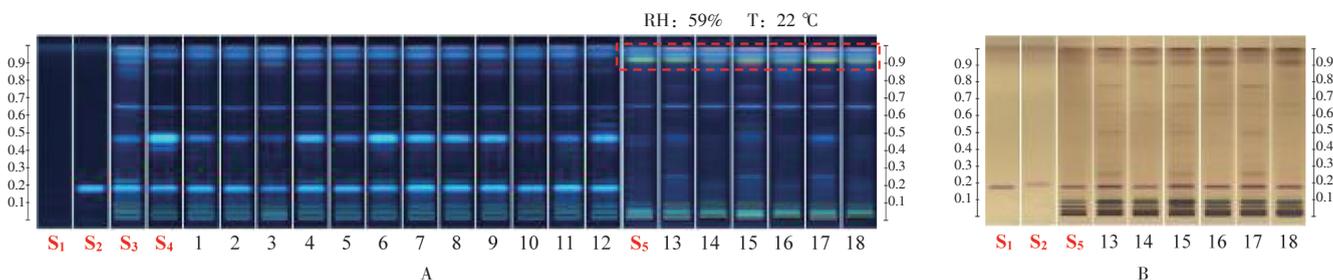
图3 山银花药材薄层扫描图谱

Figure 3 TLC digital scanning images(fingerprints) of Lonicerae Flos

的真空干燥箱中干燥 30 min；展开剂：三氯甲烷-甲醇-水(12 : 4 : 1)下层；展开方式：上行展开，展距 8.5 cm；检视：展开后将薄层板放于 50 ℃加热板中干燥 10 min，放冷后喷以 10 %硫酸乙醇溶液，于 105 ℃加热 2~3 min，在荧光 366 nm 下观察，拍照记录。再将薄层板喷以含 5%香草醛的

10%硫酸乙醇溶液，于 105 ℃加热 2~3 min，在可见光下观察，拍照记录。为方便对比观察，将 3 张薄层板拼接在一起并用自编软件扫描得到薄层色谱轮廓图。

2.2.3 结果 JYH ERS 与药材薄层色谱图见图 4，将图 4-A 进行扫描，得到薄层扫描图谱，见图 5。



注：A. 荧光 366 nm 薄层图谱；B. 可见光薄层图谱。S₁ 断氧化马钱子苷；S₂ 断马钱子酸；S₅ JYH ERS；S₄ 金银花对照药材；S₅ 山银花对照药材；1~12 分别为批号 1~12 的金银花药材；13~18 分别为批号 13~18 的山银花药材

图4 金银花与山银花样品薄层色谱图谱

Figure 4 TLC chromatograph of samples

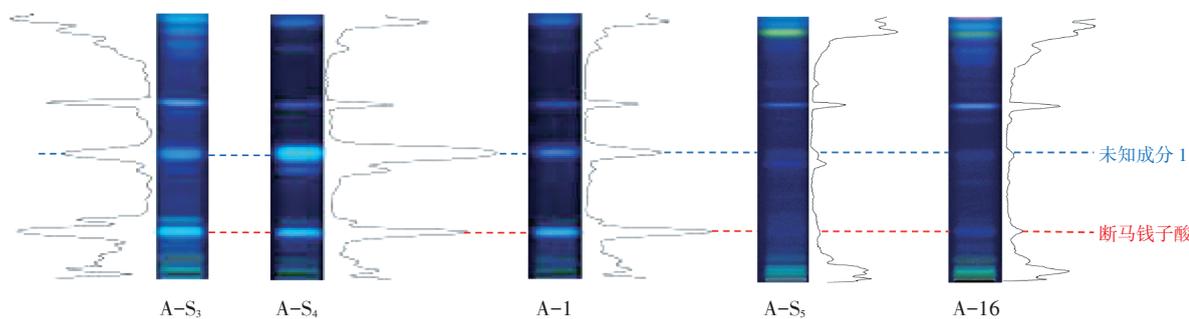


图5 金银花与山银花样品薄层扫描图谱

Figure 5 TLC digital scanning images(fingerprints) of samples.

据 TLC 图谱结果，环烯醚萜类薄层鉴别方法也可以很明显地区分出金银花与山银花药材。除在含量上存在差异，12 批金银花药材的图谱整体上均与金银花对照药材和 JYH ERS 图谱相似，为金银花正品。图 4-A 中红色框内的黄色斑点只在山银花样品中含有，而在金银花没有。取金银花、山银花对照药材与 JYH ERS 薄层数码扫描轮廓图进行比对，见

图 5。在荧光 366 nm 扫描图中，Rf 值 0.5 附近处有一蓝色斑点(蓝色虚线标记处，未知成分 1)和 Rf 值为 0.19 的蓝色荧光斑点，为断马钱子酸成分，两者均在金银花样品中明显存在，而山银花样品肉眼无法观察到，以上均可明显区分金银花与山银花样品。此外在图 4-B 中 Rf 值为 0.17 为断氧化马钱子苷，该成分在可见光下可观察，而无荧光。

根据山银花环烯醚萜类薄层鉴别结果，6 批山银花药材的细微区别同样也分为两类。取来源于图 4-A、图 4-B 的山银花样品与山银花对照药材薄层数码扫描轮廓图进行比对(见图 6)。与图 3 分析结果一

致，山银花对照药材(S5)与样品 14、16、18 图谱相近，为一种类型，而样品 13、15、17 图谱相近，化学成分稍微多点(图 6 红色星号和绿色星号标记处)，应为另一种类型，分析结论与图 3 一致。

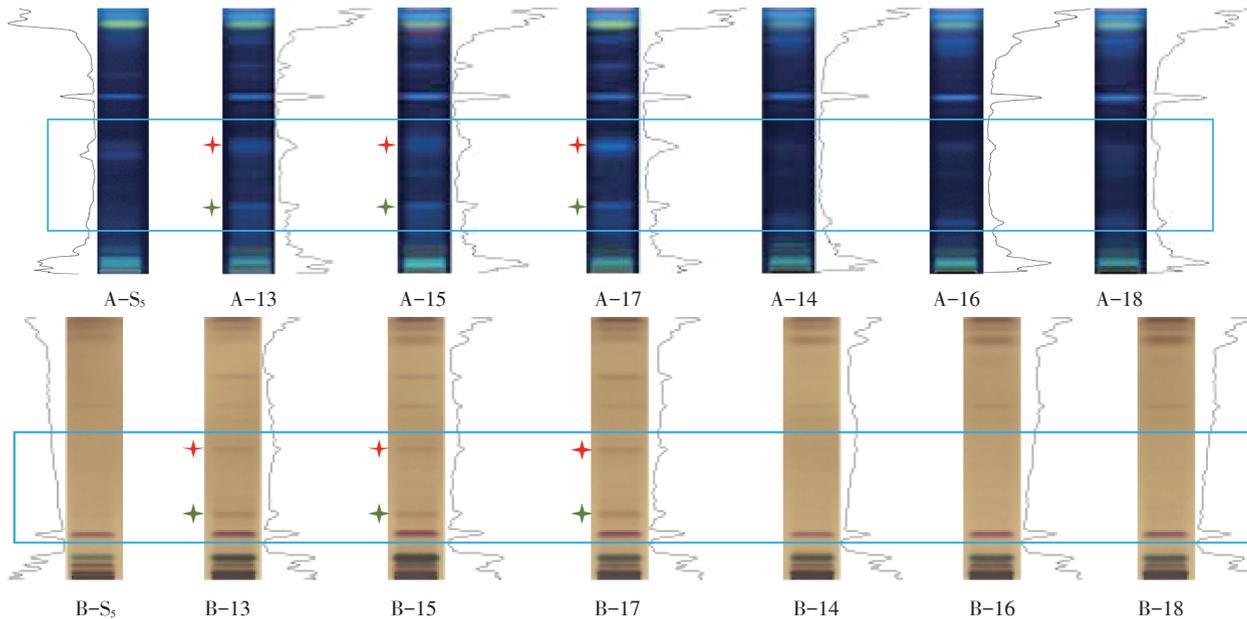


图 6 山银花药材薄层扫描图谱

Figure 6 TLC digital scanning images(fingerprints) of Lonicerae flos

2.3 质谱鉴别

2.3.1 供试品制备 同 2.1.1.1 项下。

2.3.2 薄层条件 同 2.1.2 项下。

2.3.3 质谱条件 经 CAMAG TLC-MS Interface 2 薄层色谱质谱接口仪进入质谱，甲醇流速 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。负离子模式，毛细管喷雾电压 3.50 kV，干燥温度 $325 \text{ }^\circ\text{C}$ ，锥孔电压 -65 V，裂解电压 -120 V，鞘气体积流量 54 arb，辅助气体积流量 0 arb，反吹气体积流量 0 arb。

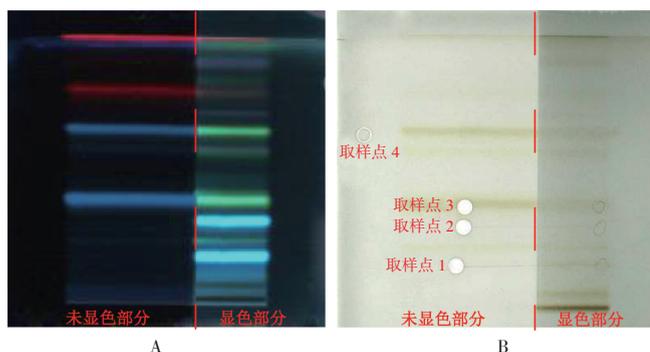
2.3.4 结果 薄层色谱图见图 7，对应质谱图见图 8。

取样点 3 为绿原酸，对应质谱总离子流图谱中， $[\text{M}-\text{H}]^{-}=353$ ，符合绿原酸分子量 354；取样点 1、2 分别是未知成分，对应质谱总离子流图谱中，质荷比分别是 373、433 和 465。首先考虑两个未知成分仅在失去氢的情况下，那么对应的分子量可能为 374、434 和 466。据朱姮等^[10]报道，分子量为 374 的化合物为断马钱子酸，结合断马钱子酸化学对照品在前文 TLC 的定位，初步判断取样点 1 处的化学成分为断马钱子酸。分子量为 434 和 466 的化合物有待进一步研究。

3 讨论

本研究所建立的 TLC 指纹图谱方法，可以明显区分金银花与山银花样品，方法具有很好的鉴别意义。

由 TLC 指纹图谱可以明显看出，单以绿原酸作为金银花 TLC 鉴别指标是不够的，因为在金银花药材和山银花药材中均含有绿原酸成分，而且，金银花与山银花药材在外观上相似度比较高，非专业人士不容易鉴别。JYH ERS 是通过不同产地金银花药材以及市场上的主流商品进行检测与筛选，挑选出合格的药材作为金银花原料药材提取得到，最后 JYH ERS 应满足以下 4 个基本条件：药源可靠，具



注：A. 荧光 366 nm 薄层图谱；B. 可见光薄层图谱

图 7 金银花药材薄层图谱

Figure 7 TLC images of Lonicera japonicae flos

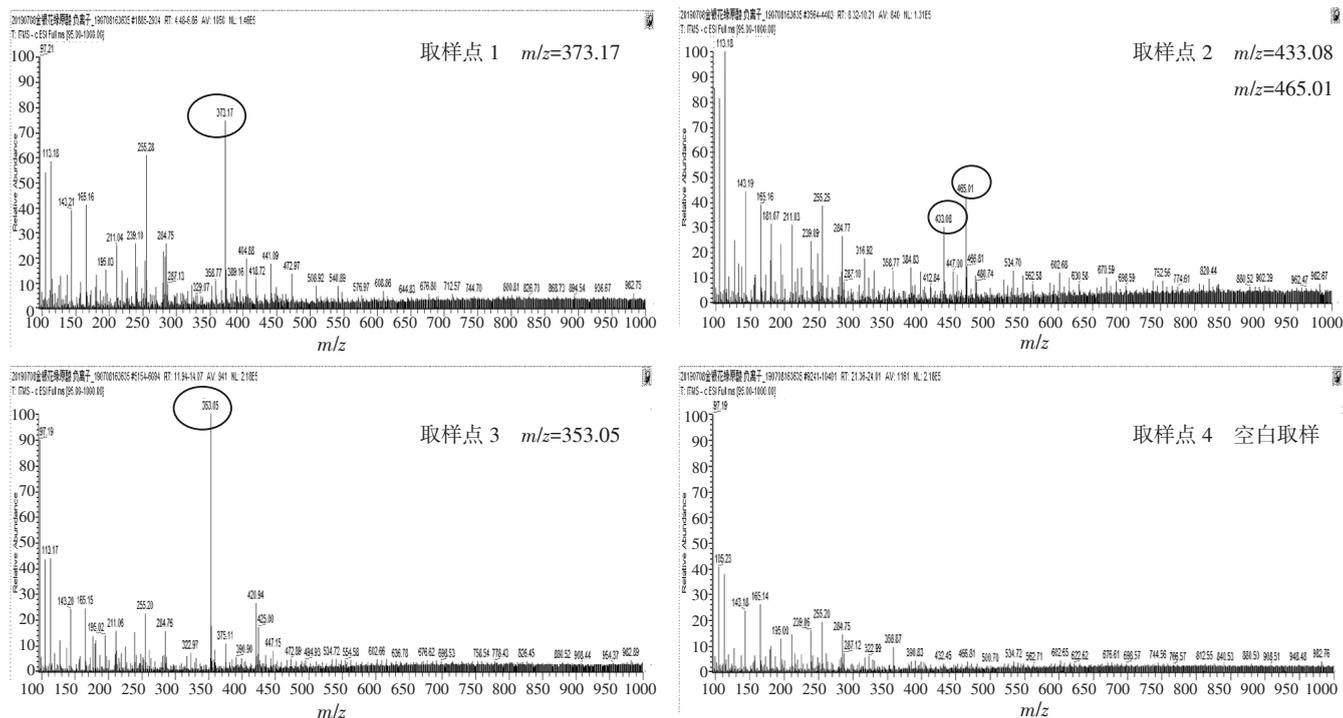


图 8 金银花药材质谱图谱

Figure 8 MS chromatograph of Lonicerae japonicae flos

有代表性；JHY ERS 应用于金银花和山银花药材薄层鉴别具有专属性；不同批次的对照提取物具有一致性；对照提取物成分与性状具有稳定性^[11]。

根据金银花 TLC 指纹图谱，JYH ERS 与忍冬样品的绿原酸类成分在相应 Rf 值上显示相同颜色的斑点，同时 JYH ERS 与 13 批金银花药材(包括金银花对照药材)在整体上图谱是一致的，而在图谱细微鉴别中可以发现，不同批次的金银花药材还是存在有迹可循的差别，这是因为不同批次的金银花存在着不同采收时期、采收产地或是存放年限的外界因素^[12]，使得金银花中化学成分存在一定的差异，这更突出了 JYH ERS 鉴别忍冬样品中金银花药材的作用。本研究中两个 TLC 鉴别方法均可以通过 10%硫酸乙醇显色后观察 366 nm 荧光中两个蓝色斑点(其中一个已确定为断马钱子酸)以明显区别金银花与山银花，提高了鉴别的专属性^[13]。山银花的基原品种有 4 个，不同的基原有不一样的特点，但是由于本实验所收集的山银花药材数量较少，对山银花的分类有局限性。另外，山银花对照提取物有待研制，以满足鉴别需要。

综上，在合适的分析方法下，使用 JYH ERS 对金银花和山银花样品进行薄层鉴别分析可提供更直观和全面的结果，且有进一步研究应用的必要，如在 HPLC 色谱峰定位、多成分含量测定等方面。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医学科技出版社, 2015: 221.
- [2] 林永强, 王淑华, 徐丽华, 等. 金银花和山银花的鉴别方法研究[J]. 药学研究, 2013, 32(02): 69-71.
- [3] 侯士良, 赵晶, 杨国营, 等. 金银花最早出处及药用部位考证[J]. 中药材, 1997, 20(11): 583-585.
- [4] 张静, 许保海, 潘旭. 金银花和山银花的鉴别要点研究[J]. 北京中医药, 2019, 38(1): 73-76.
- [5] 赵媛媛, 杨倩茹, 郝江波, 等. 金银花与忍冬藤及叶药理作用差异的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2422-2427.
- [6] XU Y B, OLIVERSON BRYANT G, SIMMONS DANIEL L. Trifunctional inhibition of COX-2 by extracts of Lonicera japonica: direct inhibition, transcriptional and post-transcriptional down regulation[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111(3): 667.
- [7] 李文沛, 俸婷婷, 周英. 金银花、山银花药效与安全性研究[J]. 山地农业生物学报, 2018, 37(4): 89-94.
- [8] 何云. 黔产金银花和山银花抗炎、免疫和保肝作用药理学对比研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- [9] 尚庆文, 于盱, 梁呈元, 等. 加工方法对金银花质量的影响[J]. 中国现代中药, 2019, 21(1): 76-81.
- [10] 朱姮, 崔莉, 刘倩, 等. HPLC-DAD-ESI-Q-TOF/MS法测定金银忍冬花中的化学成分[J]. 中草药, 2017, 48(11): 2300-2305.
- [11] XIE P S, MA S C, TU P F, et al. The prospect of application of extractive reference substance of Chinese Herbal Medicines[J]. Chinese Medicine, 2013, 4(4): 125-136.
- [12] 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.
- [13] 谢培山, 颜玉贞. 中药色谱指纹图谱精细分析图集[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2015: 52-61.

(编辑: 梁进权)