

HPLC 含量测定和 DNA 分子标记技术 对不同产地金银花的鉴定

宋雯舒¹, 张晨², 甘亮², 黎新银¹, 严群超^{3*}

(1. 广州蓝韵医药研究有限公司, 广州 510663; 2. 无限极(中国)有限公司, 广州 510405;
3. 暨南大学医学院, 广州 510632)

[摘要] 目的:通过指标成分含量测定及 DNA 分子标记技术对不同产地金银花样品进行鉴定,探讨 DNA 分子鉴定技术在中草药鉴别领域的应用前景。方法:以绿原酸、木犀草苷、灰毡毛忍冬皂苷乙为指标成分,利用 HPLC 测定指标成分含量。提取金银花、山银花对照药材及河北和山东产地金银花样品 DNA,检测 DNA 浓度和纯度,采用基于聚合酶链式反应(PCR)方法的 DNA 分子标记技术鉴别样品。结果:河北和山东产地金银花中绿原酸质量分数 3.1%~3.3%,河北、山东产地金银花中木犀草苷质量分数分别为 0.049%~0.050%,0.069%~0.078%,2 个产地样品中均未检出灰毡毛忍冬皂苷乙成分。采用基于 PCR 方法鉴定出河北和山东产地各 3 批样品均为金银花。结论:DNA 分子鉴定技术作为含量测定常规方法的补充,具有准确可靠、重复性高等优点,可用于金银花药材的鉴定。

[关键词] 金银花; 山银花; 绿原酸; 灰毡毛忍冬皂苷乙; DNA 分子鉴定

[中图分类号] R282.5;R284.1;R931.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0059-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015170059

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150713.1446.008.html>

[网络出版时间] 2015-07-13 14:46

Identification of Lonicerae Japonicae Flos from Different Areas by HPLC Assay and DNA Molecular Markers SONG Wen-shu¹, ZHANG Chen², GAN Liang², LI Xin-yin¹, YAN Qun-chao^{3*} (1. Guangzhou Lanyun Medicine Research Co. Ltd., Guangzhou 510663, China; 2. Infinitus Co. Ltd., Guangzhou 510405, China; 3. School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Objective:** To identify Lonicerae Japonicae Flos from different areas by determination of index ingredients and DNA molecular markers. **Method:** High performance liquid chromatography method was used for determination of chlorogenic acid, galuteolin and macranthoidin B. Genomic DNA was extracted from control medicinal material of Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos, as well as samples of Lonicerae Japonicae Flos from Hebei and Shandong, samples were identified by allele-specific diagnostic polymerase chain reaction (PCR) based on sequences of internal transcribed spacer. **Result:** The content of chlorogenic acid in samples from Hebei and Shandong was 3.1%-3.3%. The content of galuteolin in samples from Hebei and Shandong were 0.049%-0.050% and 0.069%-0.078%, respectively. Macranthoidin B was not detected in samples from both areas. Samples from both areas were identified as Lonicerae Japonicae Flos by diagnostic PCR. **Conclusion:** As a supplement to conventional methods, for identification of Lonicerae Japonicae Flos, DNA molecular technology has a great advantage in accuracy and good reliability.

[Key words] Lonicerae Japonicae Flos; Lonicerae Flos; chlorogenic acid; macranthoidin B; DNA molecular identification

2010年版《中国药典》记载金银花来源为忍冬科植物忍冬,山银花来源为忍冬科植物灰毡毛忍冬、

[收稿日期] 20141225(003)

[第一作者] 宋雯舒,在读硕士,从事中药活性成分、药理研究,Tel:13602428058,E-mail:songwenshu0817@126.com

[通讯作者] *严群超,教授,硕士生导师,从事中药新药研究与开发,Tel:020-85220250,E-mail:jnyqc163@163.com

红腺忍冬、华南忍冬和黄褐毛忍冬^[1]。金银花与山银花在植物形态和药材性状上非常相似,很难区分,民间混用情况非常普遍;同时由于金银花和山银花价格相差较大,很多不良商贩用山银花冒充金银花,但二者的药效和药性却存在明显差别。建立金银花质量标准体系、快速有效鉴定金银花与山银花药材的方法非常有必要^[2]。

常规的性状和显微方法鉴别金银花和山银花时,虽具有方便、简单、有效等优点,但仍有一定局限性,主要靠经验鉴别。2010 年版《中国药典》中仅对药材的性状、鉴别、检查和含量测定等方面进行了规定。金银花含绿原酸和木犀草苷,而山银花含绿原酸但木犀草苷甚少,且还含有灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙。研究表明金银花不含灰毡毛忍冬皂苷乙,该成分可作为山银花的特征成分用于鉴别金银花和山银花^[3]。另有研究发现不同产地不同批次山银花中均含有灰毡毛忍冬皂苷甲、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙 3 种成分,且含量较高,而不同产地不同批次金银花中几乎不含这 3 种成分,提示这 3 种成分可作为区别金银花与山银花的指标成分^[4]。

分子生物学技术的迅猛发展促进了 DNA 分子标记鉴定技术的诞生、发展和推广,多年来结合聚合酶链式反应(PCR)技术鉴别中药的研究得到了极大发展,并已成为中药鉴定的一种新方法^[5],具有技术重复性好、鉴定准确等特点^[6]。本实验选取河北和山东 2 个产地各 3 批金银花样品,依照 2010 年版《中国药典》方法对绿原酸、木犀草苷含量进行常规检验,同时测定灰毡毛忍冬皂苷乙以排除药材为山银花或掺杂山银花的可能;采用基于 PCR 从 DNA 分子水平对药材进行鉴定研究^[7]。通过不同方法对样品进行协同分析,增加药材鉴定结果的准确性,建立金银花质量标准体系,为金银花和山银花资源的合理开发与利用提供参考。

1 材料

IQ5 型荧光定量 PCR 仪,SmartSpec plus 型核酸蛋白测定仪和 PowerPac Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);LC-15C 型高效液相色谱仪(日本岛津),FA2004N 型电子天平(常州市衡正电子仪器有限公司),JM-B1002 型电子天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司),FS100S-3 型手提式粉碎机(广州雷迈机械设备有限公司),AlphaImager HP 型凝胶成像系统(美国 Alpha 公司)。

河北产地金银花药材 3 批(安国一方中药材有

限公司,批号 1310010,1311002,1311004)和山东产地金银花药材 3 批(广东广弘药材有限公司,批号 JYH20130518001, JYH20130518002, JYH20130518003),均经南方医科大学中医药学院罗佳波教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的干燥花蕾。绿原酸、木犀草苷、灰毡毛忍冬皂苷乙对照品和金银花、山银花对照药材(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110753-201314, 111720-201307, 111814-201303, 121060-201107, 121595-201202),植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司),三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱,美国 Sigma-Aldrich,批号 W × BB2380V),2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs(北京全式金生物科技有限公司,批号 H20130),两对特异性引物(上海英潍捷基贸易有限公司),甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。6 × DNA 核酸染料(批号 00146079),GeneRuler 100 bp DNA ladder(批号 00146079),PCR 酶预混液(批号 00210820),10 × Long PCR 缓冲液(含 15 mmol·L⁻¹ MgCl₂,批号 00192676),FastDigest 限制性内切酶 Eco52I(批号 00188813),10 × FastDigest Green 缓冲液(批号 00200201)均购自美国 Thermo 公司。

2 方法与结果

2.1 指标成分的含量测定 参照 2010 年版《中国药典》一部“金银花”项下方法测定金银花中绿原酸、木犀草苷和灰毡毛忍冬皂苷乙的含量^[1],见表 1。结果显示 2 个产地金银花药材中绿原酸含量相差不大,山东产地金银花中木犀草苷含量约比河北产地金银花的高 0.5 倍,2 个产地金银花样品中均未检出灰毡毛忍冬皂苷乙成分,初步判定药材不是或不掺杂山银花。

表 1 金银花中指标成分的含量

Table 1 Contents of index ingredients in *Lonicerae Japonicae* Flos

样品	产地	绿原酸	木犀草苷
1	河北	3.1	0.049
2	河北	3.1	0.050
3	河北	3.2	0.049
4	山东	3.2	0.073
5	山东	3.2	0.078
6	山东	3.3	0.069

注:灰毡毛忍冬皂苷乙均未检出。

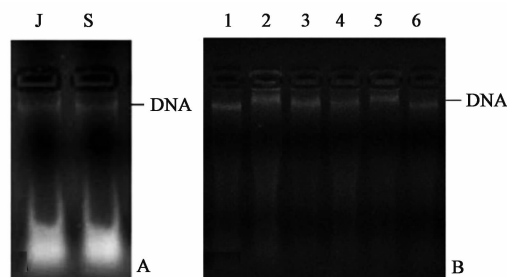
2.2 金银花 DNA 鉴定试验

2.2.1 DNA 的提取 参考植物基因组 DNA 提取

试剂盒的方法并做少许改进。称取金银花样品、金银花和山银花对照药材各 50 mg, 分别将样品放入研磨器中, 加液氮充分研磨成细粉, 转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 65 °C 预热的缓冲液 GP1 (用前分别加入终体积 0.1% 的巯基乙醇) 800 μ L, 颠倒混匀, 置于 65 °C 水浴 30 min, 期间颠倒混匀数次。样品恢复至室温后, 离心 (13 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 下同), 取上清液加入等体积苯酚-三氯甲烷-异戊醇试剂 (25:24:1) 抽提, 颠倒混匀, 离心, 取上清液置于新的 1.5 mL 离心管中。加入等体积苯酚-三氯甲烷-异戊醇试剂 (25:24:1) 抽提, 颠倒混匀后离心, 取上清液至新的 1.5 mL 离心管中。加入三氯甲烷 400 μ L, 充分混匀, 离心 5 min, 取上清液转移至已灭菌的 1.5 mL 离心管中。向离心管中加入预冷的异丙醇 400 μ L, 颠倒混匀后于 1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃掉上清液, 分别用 75% 乙醇 500 μ L 清洗沉淀 2 次, 吸干液体, 沉淀干燥 10 min, 用水 60 μ L 溶解沉淀, 即得。

2.2.2 DNA 的鉴定^[7] 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和核酸蛋白测定仪检测 DNA 的质量。将水 16.5 μ L, 10 \times Long PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, 特异性引物 F1 和 R1 (终浓度均为 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μ L, DNA 1 μ L, PCR 酶预混液 1 μ L 混合后共 25 μ L 放入定量 PCR 仪进行扩增。其中引物 F1, R1 序列分别为 5'-TCGCCCCCGCCCCGCC-3', 5'-TCAGGGTCACTCGGTCGCCCGG-3'。PCR 步骤为 94 °C 预热变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s (10 个循环, 每经过 1 个循环退火温度降低 0.5 度, 从 68 °C 开始下降); 94 °C 变性 30 s, 63 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s (30 个循环); 72 °C 延伸 10 min。制备 1% 琼脂糖凝胶, 电泳检测 PCR 产物 10 μ L, 见图 1, 2 和表 2。结果显示提取的 DNA 在凝胶上无明显的拖带现象, 说明提取的 DNA 降解现象均较轻, 完整性较好。推断已成功提取了金银花和山银花对照药材及 6 个样品的基因组 DNA, 且纯度较好。

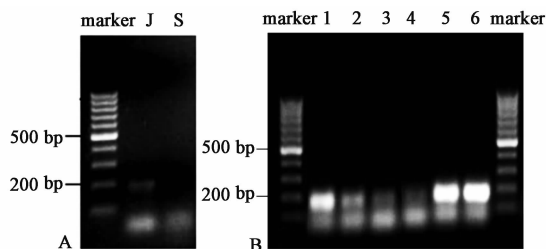
由图 2A 可知, 采用特异性引物 F1 和 R1 对 DNA 进行直接扩增的 PCR 产物中, 金银花对照药材的 PCR 产物明显有一条约 190 bp 的条带, 和文献报道一致^[7]。而山银花对照药材 PCR 产物无条带, 和文献报道一致^[7]。表明该鉴定方法可以区分金银花和山银花。由图 2B 可知, 采用特异性引物 F1 和 R1 对 DNA 进行直接扩增的 PCR 产物中, 河北、山东产地样品的 PCR 产物均明显有一条约 190 bp 的



A. 对照药材; B. 样品; J. 金银花; S. 山银花; 1~3. 河北产地样品; 4~6. 山东产地样品

图 1 金银花 DNA 电泳

Fig. 1 DNA electrophoretogram of Lonicerae Japonicae Flos



A. 对照药材; B. 样品; J. 金银花; S. 山银花; 1~3. 河北产地样品; 4~6. 山东产地样品

图 2 金银花 PCR 产物电泳

Fig. 2 PCR products electrophoretogram of Lonicerae Japonicae Flos

表 2 金银花和山银花的 DNA 质量分析

Table 2 DNA quality analysis of Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos

样品	$A_{260 \text{ nm}}$	$A_{280 \text{ nm}}$	$A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$
J	0.234	0.129	1.81
S	0.235	0.132	1.78
1	0.406	0.229	1.77
2	0.392	0.225	1.74
3	0.372	0.211	1.76
4	0.326	0.185	1.76
5	0.324	0.181	1.79
6	0.363	0.198	1.83

注: J. 金银花对照药材; S. 山银花对照药材; 1~3. 河北产地样品; 4~6. 山东产地样品。

条带, 与金银花对照药材及文献报道结果一致^[7]。判断样品均为金银花。但 2 个产地金银花的特异基因扩增产物浓度有明显差异: 山东产地样品的平均产物浓度要高于河北产地样品的, 表明两地产金银花在分子水平存在差异。

3 讨论

在2010年版《中国药典》一部“金银花”项下^[1],规定样品中绿原酸质量分数应 $\geq 1.5\%$,木犀草苷应 $\geq 0.05\%$ 。本文通过测定表明河北和山东2个产地样品中绿原酸含量均符合规定,且含量相差不大;山东产地药材中木犀草苷含量均高于河北产地药材,而河北产地有2批药材中木犀草苷含量略低于2010年版《中国药典》规定。由于金银花和山银花性状差异不大,常规的性状鉴别很难区分。本文通过测定灰毡毛忍冬皂苷乙含量可知,河北和山东产地样品中均未检出灰毡毛忍冬皂苷乙成分,排除了药材为山银花或掺杂山银花的可能性。同时,本文通过DNA分子鉴定技术进一步确认了上述结果。

核糖体DNA(rDNA)中内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列的进化速率较快,且与植物生活型呈相关性,近年来已被广泛用于植物种内、种间变异及近源属间的分子系统学研究^[7]。尽管金银花与山银花在形态学上差异甚微,但两者的ITS序列差异明显。给本文选择金银花的ITS特异序列作为金银花的DNA标记物,应用PCR技术对山东产和河北产金银花样品进行鉴别。结果显示金银花ITS特异序列仅在金银花样品中被扩增出来,而山银花则无扩增产物;山东和河北产地样品中均有目标条带被扩增出来,但产物浓度有明显差别,这与两者木犀草苷含量差异的结果相一致^[8]。

虽然采用基于PCR对金银花的鉴定还未列入2010年版《中国药典》标准,但DNA分子技术作为一种中药材品质鉴定新技术,具有微量、快速、特异

性强、准确可靠,且不受药材生长发育阶段、供试部位等因素的影响,对样本要求较低等优势。该方法用于地道药材的鉴别和质量评价拥有较好的应用前景。此外,利用ITS序列的种属特异性也用于中草药DNA分子指纹图谱的构建,可为中药现代化的推进提供新思路。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:28-29,205-206.
- [2] 李建军,李军芳,李景原,等. 金银花与山银花的性状差异及鉴别方法[J]. 河南农业科学,2011,40(4):134-137.
- [3] 林永强,王淑华,徐丽化,等. 金银花与山银花的鉴别方法研究[J]. 药学研究,2013,32(2):69-71.
- [4] 刘婧慧. 金银花与山银花质量评价及安全性对比研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [5] 李玥,周天华,赵桦. 开口箭ISSR-PCR实验反应体系条件的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):149-153.
- [6] 陈士林,郭宝林,张贵君,等. 中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(8):1043-1050.
- [7] Peng X, Li W, Wang W, et al. Identification of *Lonicera japonica* by PCR-RFLP and allele-specific diagnostic PCR based on sequences of internal transcribed spacer regions[J]. *Planta Med*, 2010,76(5):497-499.
- [8] 傅荣昭,邵鹏柱,高文远,等. DNA分子标记技术及其在药用植物研究上的应用前景[J]. 生物工程进展,1998,18(4):14-18.

[责任编辑 刘德文]