

不同基原忍冬属药材指纹图谱的建立

王闽予, 李国卫, 索彩仙, 潘礼业, 魏 梅, 孙冬梅*, 何嘉莹

广东一方制药有限公司, 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244

摘要:目的 对比不同基原忍冬属药材的差异性。方法 UPLC 建立忍冬属药材指纹图谱, 采用 Waters BEH Phenyl (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%磷酸为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 240 nm, 建立 47 批次不同基原忍冬属药材的指纹图谱, 同时对 10 个指标成分进行同法测定, 并采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 进行多变量统计分析。结果 建立了忍冬属药材 UPLC 指纹图谱, 其中忍冬确定 15 个共有峰、灰毡毛忍冬确定 8 个共有峰、黄褐毛忍冬确定 9 个共有峰、淡红忍冬确定 11 个共有峰, 聚类分析可将 47 个样本按基原聚为 4 类; 通过主成分分析可将不同基原的忍冬属药材进行区别; OPLS-DA 分析可用于忍冬属的基原识别, 并筛选出 5 个差异性成分。结论 建立的方法简便、快捷、可靠, 为不同基原忍冬属药材的质量控制和基原鉴别提供可靠的分析方法。

关键词: 忍冬属; 指纹图谱; 多指标含量测定; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 马钱苷; 獐牙菜苷; 芦丁; 木犀草苷; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)14-4353-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.028

Establishment of fingerprints of *Lonicera* from different origins

WANG Min-yu, LI Guo-wei, SUO Cai-xian, PAN Li-ye, WEI Mei, SUN Do-mei, HE Jia-ying

Guangdong Yi Fang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan 528244, China

Abstract: **Objective** Comparison of the differences of different primordial *Lonicera*. **Methods** The fingerprint of *Lonicera* was established by UPLC, the chromatographic column was Waters BEH Phenyl chromatographic column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), and acetonitrile-0.1%phosphoric formic acid solution was used as the mobile phase with the gradient elution, the flow rate was 0.3mL/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 240 nm. The fingerprints and 10 index components of 47 batches of *Lonicera* from different origins were determined by the same method. Meanwhile, multivariate analysis was carried out by PCA and OPLS-DA. **Results** UPLC method was used to establish the fingerprint of *Lonicera*, There are 15 common peaks in *Lonicera japonica* Thunb., 8 common peaks in *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz., 9 common peaks in *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S.C.Cheng, and 10 common peaks in *Lonicera hypoglaucula* Miq. Cluster analysis was divided 47 samples into four group, at the same time, and the results of principal component scores can distinguish the different origins of *Lonicera*; besides, OPLS-DA analysis can be used to identify the different origins of *Lonicera* and screen out five different components. **Conclusion** The method is simple, efficient and reliable, which can be used for the quality control and identification among different *Lonicera* medicinal plants.

Key words: *Lonicera* L.; fingerprint; multi-index content determination; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; loganin; sagerin; rutin; luteolin; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C

《中国药典》2015年版收载的忍冬属 *Lonicera* L. 花类药材共 2 种, 分别为金银花 (基原为忍冬属植物忍冬 *L. japonica* Thunb.) 及山银花 (灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand.-Mazz.、红腺忍冬 *L.*

hypoglaucula Miq、华南忍冬 *L. confusa* DC. 和黄褐毛忍冬 *L. fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng^[1]。而川银花则是列入《四川省中药材标准》2010 年版, 为忍冬属植物细毡毛忍冬 *L. similis* Hemsl.、淡红忍冬 *L.*

收稿日期: 2020-12-03

基金项目: 广东省科技计划项目 (2018B030323004); 东省重点领域研发计划项目 (2019B110209005)

作者简介: 王闽予 (1987—), 女, 主管药师, 从事中药质量评价研究。Tel: (0757)85128602 E-mail: 452048107@qq.com

*通信作者: 孙冬梅 (1969—), 女, 教授, 博士生导师。Tel: (0757)85128602 E-mail: 10268667@qq.com

acuminata Wall. 的干燥花蕾或带初开的花, 前者习称“南江银花”, 后者习称“肚子银花”或“沐川银花”^[2]。忍冬始载于《名医别录》, 后《新修本草》《证类本草》均有收录^[3]。《中国植物志》中记载了忍冬属植物在我国有 98 种之多, 广泛分布于全国各省区, 其中以金银花、山银花为主要商品在市场上流通, 金银花以山东平邑、河南封丘为主要产区; 山银花主产于湖北、云南、贵州、广西等地区; 川银花则主产于四川。上述三者均具有清热解毒、疏散风热、抑菌抗菌、抗病毒的功效, 主治痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等病症^[4-5]。

由于金银花一直作为药食同源使用, 虽然目前人工种植已成规模, 但仍供不应求, 加上忍冬属植物种类繁多且形态相近、功效相似, 所以药材市场存在掺伪混淆等现象, 因此, 开展金银花与同属其它基原品种鉴别研究十分必要。目前采用 HPLC 指纹图谱鉴别金银花和山银花的文献较多, 且鉴别多数为金银花和山银花^[6-12]。本实验对忍冬、灰毡毛忍冬、黄褐毛忍冬以及淡红忍冬 4 个基原共 47 批药材进行研究, 建立同时进行 UPLC 指纹图谱与多指标含量测定方法的基础上, 结合聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别 (partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 分析, 比较不同基原忍冬属药材的差异性, 为忍冬属药材鉴别和检验提供数据参考。

1 仪器与材料

Waters H-Class 型超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Waters BEH Phenyl (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; Mettler XP-26 型百万分之一天平, ME204E 型万分之一天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q 型超纯水净化系统 (美国 Millipore 公司); KQ-500DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯 (Merk 公司); 水为 Milli-Q 纯化水; 其余试剂为分析纯。

绿原酸 (批号 110753-201817, 质量分数 96.8%)、马钱苷 (批号 111640-201808, 质量分数 99%)、芦丁 (批号 10080-201811, 质量分数 91.7%)、木犀草苷 (批号 111720-201609, 质量分数 94.9%), 由中国食品药品检定研究院提供; 异绿原酸 A (批号 wkq18041207)、异绿原酸 B (批号 wkq17060705)、异绿原酸 C (批号 wkq18050905)、隐绿原酸 (批号 wkq16081903)、新绿原酸 (批号 wkq16050805)、獐牙菜苷 (批号 wkq17092203) 质量分数均为 98%, 由四川省维克奇生物科技有限公司提供; 实验所用药材经广东一方制药有限公司魏梅主任中药师鉴定, JYH1~JYH12 号样品为忍冬 *L. japonica* Thunb., HZ1~HZ11 号样品为灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand.-Mazz.; HH1~HH12 号样品为黄褐毛忍冬 *L. fulvotomentosa* Hsu et S.C.Cheng; DH1~DH12 号样品为淡红忍冬 *L. acuminata* Wall.。药材具体信息见表 1。

表 1 药材信息

Table 1 Details of *Lonicera*

序号	编号	基原	来源	序号	编号	基原	来源
1	JYH1	忍冬	广州清平	25	HH2	黄褐毛忍冬	贵州遵义
2	JYH2	忍冬	广州清平	26	HH3	黄褐毛忍冬	贵州遵义
3	JYH3	忍冬	广州清平	27	HH4	黄褐毛忍冬	贵州遵义
4	JYH4	忍冬	山东中平	28	HH5	黄褐毛忍冬	湖北襄阳
5	JYH5	忍冬	山东保利	29	HH6	黄褐毛忍冬	湖北襄阳
6	JYH6	忍冬	山东保利	30	HH7	黄褐毛忍冬	湖北襄阳
7	JYH7	忍冬	山东保利	31	HH8	黄褐毛忍冬	广西玉林
8	JYH8	忍冬	山东冯了性	32	HH9	黄褐毛忍冬	广西玉林
9	JYH9	忍冬	山东冯了性	33	HH10	黄褐毛忍冬	广西玉林
10	JYH10	忍冬	山东中平	34	HH11	黄褐毛忍冬	广西玉林
11	JYH11	忍冬	山东冯了性	35	HH12	黄褐毛忍冬	广西玉林
12	JYH12	忍冬	山东中平	36	DH1	淡红忍冬	成都荷花池
13	HZ1	灰毡毛忍冬	河北安国	37	DH2	淡红忍冬	四川宜宾
14	HZ2	灰毡毛忍冬	河北安国	38	DH3	淡红忍冬	四川宜宾
15	HZ3	灰毡毛忍冬	河北安国	39	DH4	淡红忍冬	四川宜宾
16	HZ4	灰毡毛忍冬	成都荷花池	40	DH5	淡红忍冬	四川屏山
17	HZ5	灰毡毛忍冬	成都荷花池	41	DH6	淡红忍冬	四川屏山
18	HZ6	灰毡毛忍冬	成都荷花池	42	DH7	淡红忍冬	四川屏山
19	HZ7	灰毡毛忍冬	广州清平	43	DH8	淡红忍冬	四川沐川
20	HZ8	灰毡毛忍冬	湖南怀化	44	DH9	淡红忍冬	四川沐川
21	HZ9	灰毡毛忍冬	湖南怀化	45	DH10	淡红忍冬	四川沐川
22	HZ10	灰毡毛忍冬	湖南怀化	46	DH11	淡红忍冬	成都荷花池
23	HZ11	灰毡毛忍冬	湖南怀化	47	DH12	淡红忍冬	成都荷花池
24	HH1	黄褐毛忍冬	广州清平				

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters BEH Phenyl 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 体积流量 0.3 mL/min; 柱温为 30 ℃; 检测波长为 240 nm; 以乙腈(A)-0.1%磷酸(B)为流动相, 梯度洗脱, 0~1 min, 4%~5% A; 1~9 min, 5%~6% A; 9~13 min, 6%~10% A; 13~15 min, 10%~14% A; 15~30 min, 14%~25% A。

2.2 对照品溶液制备

取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、獐牙菜苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 12.201、456.609、7.901、7.790、14.906、17.916、11.851、8.129、270.480、30.679 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取样品粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇 50 mL, 超声处理(功率 300 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 用 70%甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次, 以绿原酸为参照峰, 计算 15 个共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD<2%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按“2.1”项下的的色谱条件, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定, 以绿原酸为参照峰, 计算 15 个共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD<2%, 表明供试品溶液稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取样品粉末约 0.5 g, 平行 6 份, 按“2.3”项下确定的方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件测定, 以绿原酸为参照峰, 计算 15 个共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD<2%, 表明方法重复性良好。

2.5 指纹图谱分析及评价

2.5.1 指纹图谱的建立及共有峰归属 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.0 版)”对 47 批药材样品 UPLC 指纹图谱进行分析, 其中忍冬的色谱峰信息最丰富, 确定 15 个共有峰(图 1); 灰毡毛忍冬确定 8 个共有峰(图 2); 黄褐毛忍冬确定 9 个共有峰(图 3); 淡红忍冬

确定 11 个共有峰(图 4)。4 者共有峰个数为 8, 其中 2 号峰(绿原酸)分离度好, 峰形对称, 为药材中清热、抗菌、抗病毒的主要成分之一, 故以 2 号绿原酸峰为参照峰(S)。通过各对照品保留时间和

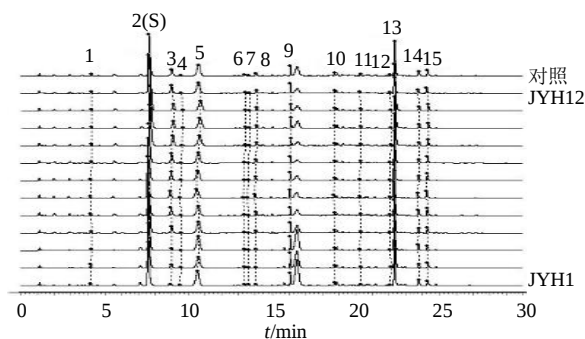


图 1 12 批忍冬药材 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of 12 batches of *L. japonica* Thunb.

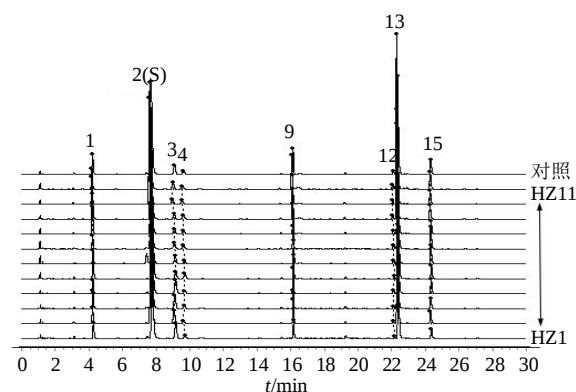


图 2 11 批灰毡毛忍冬药材 UPLC 指纹图谱

Fig. 2 UPLC fingerprints of 11 batches of *L. macranthoides* Hand.-Mazz.

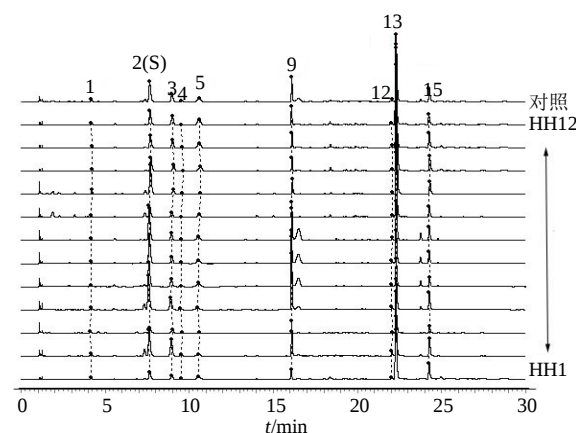


图 3 12 批黄褐毛忍冬药材 UPLC 指纹图谱

Fig. 3 UPLC fingerprints of 12 batches of *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng

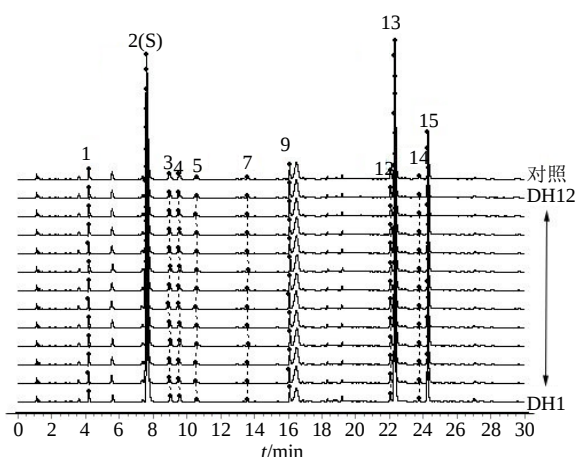


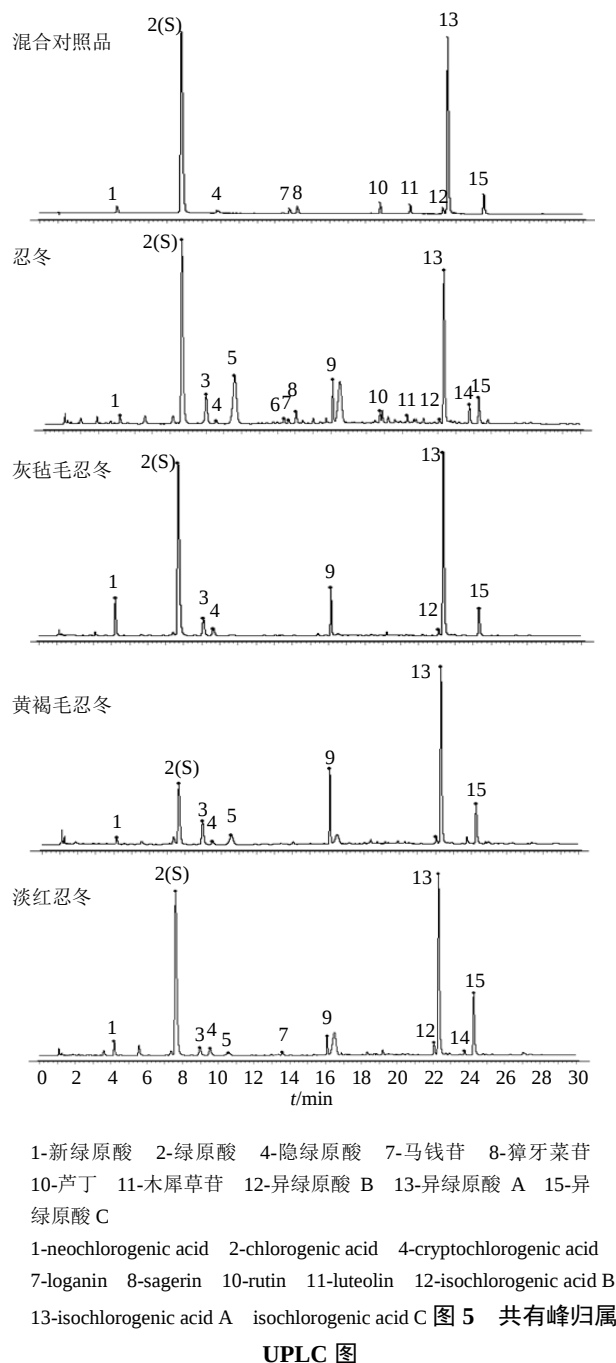
图 4 12 批淡红忍冬药材 UPLC 指纹图谱

Fig. 4 UPLC fingerprints of 12 batches of *L. acuminata*

紫外吸收光谱对药材中共有峰的化学成分进行归属, 峰 1 为新绿原酸, 峰 2 为绿原酸, 峰 4 为隐绿原酸, 峰 7 为马钱苷, 峰 8 为獐牙菜苷, 峰 10 为芦丁, 峰 11 为木犀草苷, 峰 12 为异绿原酸 B, 峰 13 为异绿原酸 A, 峰 15 为异绿原酸 C (图 5)。

2.5.2 相似度评价结果 采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.0 版本)”分别对 JYH1~JYH12、HZ1~HZ11、HH1~HH12、RD1~RD12 共 47 批药材样品 UPLC 指纹图谱进行数据处理, 以峰 2 (绿原酸) 为参照峰, 采用平均数, 时间窗口为 1, 自动匹配, 计算相似度系数, 12 批忍冬药材的相似度均在 0.980 以上, 11 批灰毡毛忍冬药材的相似度均在 0.986~0.999, 12 批黄褐毛忍冬药材的相似度均在 0.791~0.981, 12 批淡红忍冬药材相似度均为 1.000, 样品相似度最高。相似度结果说明不同来源、同一基原的忍冬属药材化学成分具有较好的一致性, 结果见表 2。

2.5.3 不同品种药材 UPLC 指纹图谱和相似度比较 通过 UPLC 指纹图谱结果显示, 忍冬、灰毡毛忍冬、黄褐毛忍冬和淡红忍冬药材样品共有峰个数分别为 15、8、9 及 11 个, 四者共有峰有 8 个。分别将上述 4 个基原样品的对照图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.0 版本)”软件, 两两对比, 其中忍冬与灰毡毛忍冬、黄褐毛忍冬、淡红忍冬的相似度分别为 0.856、0.575、0.880; 灰毡毛忍冬与黄褐毛忍冬、淡红忍冬的相似度分别为 0.800、0.979; 黄褐毛忍冬与淡红忍冬的相似度为 0.723。结果表明, 不同基原样品间的指纹图谱共有峰信息



UPLC 图

Fig. 5 Attribution graph of UPLC fingerprint common peaks

和相似度均有差异, 说明即便是同属药材, 其化学成分亦存在着差异。

2.6 聚类分类

运用 SPSS 软件对 47 批药材样品进行系统聚类, 采用组间平均数联结法, 以余弦距离作为样品相似度的距离公式, 样品聚为 4 类 (图 6)。JYH1~JYH12 为忍冬聚为一类, HZ1~HZ11 为灰毡毛忍冬聚为一类, HH1~HH12 为黄褐毛忍冬聚为一类,

表 2 不同基原药材样品相似度评价结果
Table 2 Results of similarity evaluation of samples from different origins

编号	相似度	编号	相似度
JYH1	0.989	HH1	0.932
JYH2	0.990	HH2	0.843
JYH3	0.989	HH3	0.961
JYH4	0.999	HH4	0.791
JYH5	0.998	HH5	0.896
JYH6	0.998	HH6	0.905
JYH7	0.998	HH7	0.907
JYH8	0.996	HH8	0.961
JYH9	0.997	HH9	0.981
JYH10	0.998	HH10	0.952
JYH11	0.998	HH11	0.955
JYH12	0.998	HH12	0.968
DH1	1.000	HZ1	0.993
DH2	1.000	HZ2	0.999
DH3	1.000	HZ3	0.998
DH4	1.000	HZ4	0.992
DH5	1.000	HZ5	0.991
DH6	1.000	HZ6	0.997
DH7	1.000	HZ7	0.998
DH8	1.000	HZ8	0.998
DH9	1.000	HZ9	0.994
DH10	1.000	HZ10	0.996
DH11	1.000	HZ11	0.986
DH12	1.000		

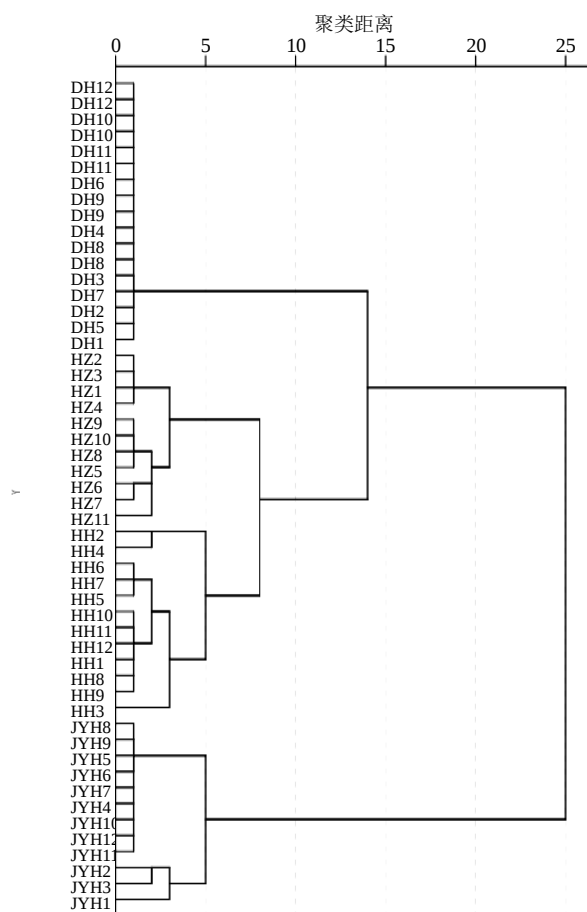


图 6 47 批药材样品聚类分析结果
Fig. 6 Cluster analysis result of 47 batches of samples

DH1~DH12 为淡红忍冬聚为一类。从总体数据来看,不同品种的药材样品具有明显差异。

2.7 样品含量测定

基于上述研究结果,为了进一步评价 4 个基原忍冬属药材的质量,本研究对已进行归属的 10 个化学成分进行含量测定,并对结果进行多元统计分析,以区分不同基原忍冬属药材之间的差异。

2.7.1 线性范围 取“2.2”项下的对照品储备液,加甲醇稀释制得 6 个不同质量浓度的对照品溶液,以峰面积为纵坐标 (Y),质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归,各对照品的线性关系良好,结果见表 3。

表 3 回归方程及线性范围

Table 3 Regression equation and linear line

名称	回归方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
新绿原酸	$Y=6\,022.80\,X-254.42$	1.000 0	0.813~12.201
绿原酸	$Y=6\,023.10\,X-22\,435.00$	0.999 9	30.434~456.509
隐绿原酸	$Y=5\,470.70\,X-316.16$	0.999 9	0.527~7.901
马钱苷	$Y=5\,491.80\,X-10.313$	0.999 9	0.519~7.790
獐牙菜苷	$Y=4\,644.60\,X-303.70$	1.000 0	0.994~14.906
芦丁	$Y=4\,656.97\,X-510.95$	0.999 7	1.194~17.916
木犀草苷	$Y=6\,507.30\,X-737.08$	1.000 0	0.790~11.851
异绿原酸 B	$Y=6\,198.90\,X-237.11$	0.999 7	0.542~8.129
异绿原酸 A	$Y=6\,516.70\,X-15667.00$	0.999 9	18.032~270.480
异绿原酸 C	$Y=6\,395.00\,X-2357.30$	1.000 0	2.045~30.679

2.7.2 精密度试验 取同一供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次,计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、獐牙菜苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 均小于 2%,表明仪器精密度良好。

2.7.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,按“2.1”项下的的色谱条件,分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定,计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、獐牙菜苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 均小于 2%,表明供试品溶液稳定性良好。

2.7.4 重复性试验 取样品粉末约 0.5 g,平行 6 份,按“2.3”项下确定的方法制备供试品溶液,按“2.1”项下的的色谱条件测定,计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、獐牙菜苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 质量分数的 RSD 均小于 2%,表明方法重复性良好。

2.7.5 加样回收率试验 精密称取已知含量的忍冬药材 (JYH3) 0.25 g,平行 6 份,加入与样品中

含量等量的对照品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算加样回收率。测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、獐牙菜苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、绿原酸 A、异绿原酸 C 平均加样回收率分别为 94.15%、95.56%、98.19%、96.57%、98.90%、106.79%、96.40%、

96.92%、98.55%、97.93%,RSD 分别为 2.32%、0.53%、2.57%、1.68%、1.04%、0.62%、1.84%、1.80%、1.96%、1.80%。

2.7.6 含量测定 精密称取 47 批样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,得到含量测定结果,见表 4。结果显示,

表 4 含量测定结果

Table 4 Content determination results

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)									
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	马钱苷	獐牙菜苷	芦丁	木犀草苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
JYH1	0.722	28.534	0.261	0.604	0.704	0.439	0.416	0.331	14.588	1.744
JYH2	1.445	29.668	0.417	0.291	0.477	0.380	0.535	0.469	18.614	1.999
JYH3	0.696	27.967	0.418	0.345	1.522	0.457	0.502	0.420	15.684	2.231
JYH4	0.587	25.881	0.356	0.240	1.340	0.480	0.614	0.345	13.007	2.182
JYH5	0.670	27.329	0.497	0.199	2.001	0.401	0.518	0.474	13.621	2.990
JYH6	0.658	26.824	0.472	0.237	1.985	0.433	0.564	0.434	13.350	2.828
JYH7	0.655	26.894	0.453	0.217	1.938	0.422	0.551	0.421	13.580	2.674
JYH8	0.597	25.881	0.437	0.214	2.017	0.332	0.629	0.376	12.859	2.625
JYH9	0.641	26.832	0.493	0.267	1.742	0.372	0.607	0.427	12.666	2.533
JYH10	0.572	27.806	0.355	0.285	1.356	0.442	0.563	0.330	12.418	2.032
JYH11	0.641	27.670	0.446	0.196	1.591	0.419	0.641	0.396	12.986	2.535
JYH12	0.595	25.299	0.361	0.225	1.444	0.407	0.627	0.325	11.692	2.067
HZ1	4.267	40.596	1.494	—	—	—	—	0.591	21.439	2.717
HZ2	4.481	45.144	1.542	—	—	—	—	0.804	28.301	3.572
HZ3	4.903	42.620	1.594	—	—	—	—	0.665	25.671	3.124
HZ4	3.802	38.503	1.593	—	—	—	—	0.963	30.208	4.292
HZ5	7.776	48.043	2.724	—	—	—	—	0.987	23.400	3.925
HZ6	3.756	44.165	1.585	—	—	—	—	1.069	32.074	5.420
HZ7	3.607	45.959	1.791	—	—	—	—	1.213	30.022	6.264
HZ8	7.424	51.031	1.969	—	—	—	—	1.150	30.895	3.757
HZ9	6.928	57.056	2.122	—	—	—	—	1.190	28.998	4.154
HZ10	7.414	55.319	2.178	—	—	—	—	1.229	29.138	4.221
HZ11	5.360	53.531	1.521	—	—	—	—	1.482	46.706	5.033
HH1	0.443	3.233	0.224	—	—	—	—	0.542	26.650	4.653
HH2	0.734	12.333	0.782	—	—	—	—	1.609	7.791	5.335
HH3	0.420	2.443	0.181	—	—	—	—	0.293	5.052	2.204
HH4	0.724	16.051	0.555	—	—	—	—	1.125	9.347	5.396
HH5	0.468	11.857	0.428	—	—	—	—	0.634	8.244	2.850
HH6	0.563	14.356	0.570	—	—	—	—	0.828	9.845	3.663
HH7	0.614	16.647	0.565	—	—	—	—	0.884	11.546	3.857
HH8	0.425	4.314	0.217	—	—	—	—	0.354	19.483	3.282
HH9	1.253	14.311	0.626	—	—	—	—	0.400	22.112	3.846
HH10	0.622	6.808	0.272	—	—	—	—	0.571	33.954	4.867
HH11	0.571	6.044	0.258	—	—	—	—	0.524	30.727	4.591
HH12	0.522	6.806	0.194	—	—	—	—	0.498	27.225	3.186
DH1	2.277	49.803	2.157	0.550	—	—	—	1.930	33.082	10.754
DH2	2.245	47.857	2.062	0.587	—	—	—	2.194	33.213	11.125
DH3	2.248	47.790	2.068	0.588	—	—	—	2.192	33.089	11.014
DH4	2.294	49.275	2.125	0.596	—	—	—	2.253	33.954	11.356
DH5	2.244	48.253	2.085	0.587	—	—	—	2.213	33.357	11.240
DH6	2.257	48.211	2.087	0.577	—	—	—	2.219	33.528	11.267
DH7	2.263	48.768	2.110	0.588	—	—	—	2.237	33.781	11.332
DH8	2.259	48.450	2.084	0.590	—	—	—	2.220	33.459	11.183
DH9	2.267	48.540	2.095	0.587	—	—	—	2.227	33.568	11.330
DH10	2.243	48.020	2.107	0.586	—	—	—	2.210	33.219	11.084
DH11	2.305	49.267	2.133	0.591	—	—	—	2.261	34.083	11.445
DH12	2.268	48.441	2.091	0.586	—	—	—	2.230	33.531	11.322

“—”-未检出

“—”-not detected

不同基原忍冬属药材的 10 个成分含量差异显著。经过分析多批次样品,发现獐牙菜苷、芦丁、木犀草苷为忍冬基原的差异成分;马钱苷在忍冬及淡红忍冬与其他 2 个基原的样品能检出;新绿原酸为 4 个基原样品的共有成分,但在灰毡毛忍冬中的含量明显高于其他基原,质量分数均值为 5.429 mg/g,淡红忍冬次之,含量均值为 2.264 mg/g,忍冬与黄褐毛忍冬中的新绿原酸质量分数较低,分别为 0.707、0.613 mg/g。

2.8 多元统计分析

2.8.1 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 以 10 个成分含量测定结果为变量,采用 SPSS 22.0 软件进行主成分分析,由表 5 可知,共提取了 3 个特征值大于 1 的主成分,累积方差贡献率达 94.026%,表明可以用 3 个主成分反映不同基原忍冬属药材主要的质量特征。从表 6 可以看出,在第 1

主成分有较高载荷的包括马钱苷、异绿原酸 C; 在第 2 主成分有较高载荷的包括獐牙菜苷、芦丁、木犀草苷,主要为黄酮类成分;第 3 主成分有较高载荷的包括新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸,主要为酚酸类成分(载荷值>0.90)。以降维得到的 3 个主成分得分作为 X、Y、Z 轴,得到 47 个样品的散点分布图,结果显示,4 种不同基原忍冬属样品能实现明显区分,同基原样品能较好的聚在同一区域,说明 4 种不同基原忍冬属药材之间的成分存在一定差异,结果见图 7。从不同样品的 3 个主成分得分可以看出,忍冬基原的样品主成分 2 评分均为正值,可以较好的与其他基原的样品实现分离;淡红忍冬基原的样品主成分 1 评分均为正值,可以较好的与其他成分实现分离;而灰毡毛忍冬与黄褐毛忍冬的差异主要体现在主成分 3,灰毡毛忍冬的主成分 3 评分均为正值,结果见表 7。

表 5 特征根、各主成分的贡献率

Table 5 Contribution rate of characteristic roots and principal components

成分	初始特征值			提取平方和载入			旋转平方和载入
	合计	方差/%	累积方差贡献率/%	合计	方差/%	累积方差贡献率/%	
1	5.803	58.032	58.032	5.803	58.032	58.032	3.515
2	2.217	22.173	80.204	2.217	22.173	80.204	4.332
3	1.382	13.822	94.026	1.382	13.822	94.026	3.944

表 6 各因子初始因子载荷矩阵

Table 6 Initial factor load matrix of each factor

成分	载荷		
	主成分 1	主成分 2	主成分 3
新绿原酸	-0.055	-0.416	0.923
绿原酸	0.563	-0.197	0.923
隐绿原酸	0.599	-0.536	0.900
马钱苷	0.929	0.122	0.164
獐牙菜苷	-0.165	0.964	-0.366
芦丁	-0.165	0.989	-0.387
木犀草苷	-0.173	0.992	-0.385
异绿原酸 B	0.868	-0.551	0.557
异绿原酸 A	0.536	-0.597	0.698
异绿原酸 C	0.921	-0.518	0.417

2.8.2 OPLS-DA 依据 PCA 结果,对不同基原的 4 组样品进行 OPLS-DA 分析。OPLS-DA 模型, $R^2_X=0.94$, $R^2_Y=0.955$, $Q^2=0.95$, 均大于 0.5, 说明模型稳定可靠,可用于不同基原忍冬属样品的区分。结果显示,数据的分类算法中 OPLS-DA 的效果较好,可使 4 种样本点完全被分开,相互

之间没有样品出现交叉的情况,且全部样品均位于 95%可信区间之内,结果见图 8。采用变量重要性投影值(variable importance in project, VIP)

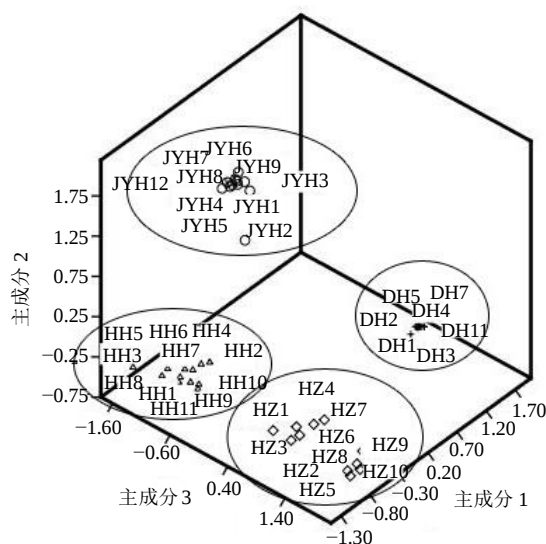


图 7 PCA 得分分布图

Fig. 7 Scatter diagram of principal component score

表 7 主成分得分

Table 7 Principal component score

编号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	编号	主成分 1	主成分 2	主成分 3
JYH1	0.087	1.396	-0.785	HH2	-0.338	-0.618	-1.055
JYH2	-0.350	1.149	-0.428	HH3	-1.172	-0.438	-1.545
JYH3	-0.159	1.698	-0.627	HH4	-0.496	-0.556	-1.043
JYH4	-0.367	1.764	-0.719	HH5	-0.907	-0.463	-1.213
JYH5	-0.295	1.742	-0.610	HH6	-0.739	-0.503	-1.080
JYH6	-0.259	1.866	-0.634	HH7	-0.683	-0.513	-0.999
JYH7	-0.313	1.809	-0.634	HH8	-0.923	-0.575	-1.294
JYH8	-0.349	1.794	-0.682	HH9	-0.835	-0.572	-0.756
JYH9	-0.261	1.747	-0.658	HH10	-0.589	-0.737	-0.988
JYH10	-0.326	1.692	-0.711	HH11	-0.657	-0.704	-1.064
JYH11	-0.372	1.774	-0.630	HH12	-0.816	-0.635	-1.109
JYH12	-0.430	1.709	-0.746	DH1	1.455	-0.545	0.634
HZ1	-0.977	-0.449	0.694	DH2	1.624	-0.571	0.551
HZ2	-0.765	-0.519	0.943	DH3	1.615	-0.568	0.552
HZ3	-0.924	-0.494	0.956	DH4	1.693	-0.578	0.617
HZ4	-0.586	-0.603	0.704	DH5	1.647	-0.575	0.567
HZ5	-0.915	-0.544	1.974	DH6	1.636	-0.583	0.575
HZ6	-0.405	-0.619	0.823	DH7	1.671	-0.580	0.595
HZ7	-0.254	-0.630	0.855	DH8	1.649	-0.573	0.576
HZ8	-0.834	-0.573	1.844	DH9	1.661	-0.579	0.583
HZ9	-0.710	-0.537	1.885	DH10	1.630	-0.573	0.570
HZ10	-0.740	-0.558	1.967	DH11	1.697	-0.584	0.624
HZ11	-0.296	-0.721	1.560	DH12	1.659	-0.580	0.580
HH1	-0.682	-0.689	-1.221				

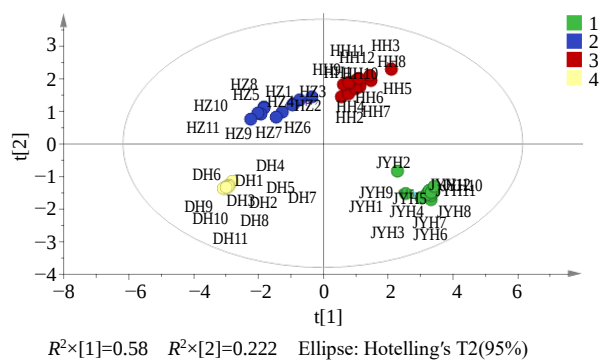


图 8 OPLS-DA 得分图

Fig. 8 Chart of OPLS-DA score

筛选造成 4 种基原忍冬属样品差异性的标志物, 其中 VIP 值大于 1 的成分包括 5 个, 分别为新绿原酸、马钱苷、绿原酸、芦丁、木犀草苷, 这些成分是造成 4 种不同基原忍冬属样品间成分差异的主要标志性成分, 其余峰 VIP 值小于 1, 对区分样品影响较小, 结果见图 9。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

通过全波长扫描, 着重考察 350 nm 及 240 nm 2 个检测波长, 通过 2 个检测波长的对比, 发现 240 nm 检测波长所得到的色谱峰较 350 nm 检测波长的色谱峰信息多, 且峰形较好, 故选用 240 nm 作为检

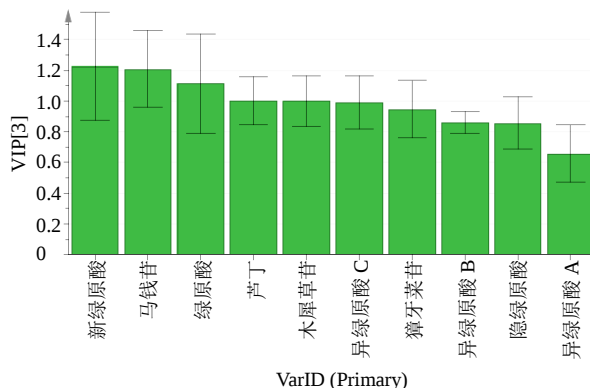


图 9 10 个化学成分的 VIP 值

Fig. 9 VIP chart of 10 ingredients

测波长。考察了不同色谱柱, 最终确定以 WatersBEH Phenyl 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 所得到的色谱图峰形最好, 峰数最多。

3.2 指纹图谱结果分析

本研究建立了忍冬属药材 UPLC 指纹图谱, 在更短的分析时间下, 分离度良好, 提高了分析效率。建立的指纹图谱基线平稳, 共有峰数目多, 忍冬药材共有峰 15 个, 灰毡毛忍冬药材有 8 个, 黄褐毛忍冬药材有 9 个, 淡红忍冬药材有 11 个, 4 种忍冬的共有峰有 8 个, 通过直观分析可以对 4 个基原的忍冬属药材进行区分。相似度评价结果显示不同基原

之间的存在一定差异,通过聚类分析可以将同基原的样品聚为一类,说明同基原间的样品质量稳定,具有一定的共性,同时也说明不同基原间的样品其化学成分成分及含量均存在差异。

3.3 多指标含量测定结果分析

本研究在已建立 UPLC 指纹图谱方法的基础上,对已进行归属的 10 个化学成分进行定量分析,结果显示不同基原忍冬属药材的质量存在一定差异,与指纹图谱分析结果一致。其中,直观结果分析显示,金银花化学成分最丰富,含有 3 个差异成分(獐牙菜苷、芦丁、木犀草苷),而新绿原酸为最直观反映 4 种药材差异的共有成分,其含量大小为:灰毡毛忍冬>淡红忍冬>忍冬>黄褐毛忍冬;主成分分析降维得到 3 个主成分,可以将 47 个样本分为基原一致的 4 类,其中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、马钱苷、獐牙菜苷、芦丁、木犀草苷和异绿原酸 C 8 个成分为区别不同基原药材的关键因素;OPLS-DA 分析同样将 47 个样本分为 3 类,分类效果显著,与聚类分析、主成分分析结果一致,OPLS-DA 分析显示区分不同基原样品的标志性成分分别为新绿原酸、马钱苷、绿原酸、芦丁、木犀草苷,说明 OPLS-DA 分析与主成分分析的评价结果一致,进一步说明不同基原忍冬属药材之间存在差异的科学性。

本研究建立了同时测定忍冬属药材的 UPLC 特征图谱及 10 个特征性成分含量的方法,采用聚类分析、PCA 分析与 OPLS-DA,对不同来源的 47 个不同基原的样本进行了分析,结果显示忍冬属 4 个不

同基原药材存在一定差异,为忍冬属药材的质量控制提供了可靠的分析方法与参考依据。

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. 2015: 221.
- [2] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准: 2010 年版 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2011.
- [3] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [4] 张家燕. 中药金银花的药用成分及药理作用分析 [J]. 中国医药指南, 2019, 17(17): 177-178.
- [5] 鲍桂枝. 金银花与山银花的性状鉴别和药理作用的鉴别 [J]. 北方药学, 2014, 11(3): 12.
- [6] 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.
- [7] 熊艳, 朱晶晶, 王智民, 等. 金银花与山银花 HPLC 指纹图谱比较研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9): 90-92.
- [8] 宋九华, 张艳明, 成英. 不同产地金银花药材 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 化学研究与应用, 2018, 30(5): 823-827.
- [9] 胡律江, 罗江南, 郭慧玲, 等. 金银花和山银花差异性比较 [J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(5): 120-124.
- [10] 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.
- [11] 王立伟, 徐达, 安丽娜, 等. 金银花及其制剂中掺伪山银花的快速鉴别研究 [J]. 中国药业, 2019, 28(1): 39-44.
- [12] 王浩兵, 邓力, 马元春, 等. 基于 UHPLC 的金银花和山银花的鉴别及测定研究 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2516-2521.

[责任编辑 时圣明]