

HPLC 指纹图谱结合化学模式识别分析不同产地款冬花生品与蜜炙品

杨冰月¹, 彭亮^{1*}, 颜永刚¹, 沈霞¹, 李依民¹, 韩翠², 陈国良², 胡本祥^{1*}

1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 西安 712046

2. 陕西广济堂医药集团, 陕西 榆林 719000

摘要: 目的 建立不同产地款冬花生品与蜜炙品的 HPLC 指纹图谱, 为不同来源款冬花药材鉴别和质量评价提供依据。

方法 基于高效液相色谱法对 36 批不同产地款冬花生品与蜜炙品进行测定, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)计算相似度, 运用聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和最小偏二乘法-判别分析(PLS-DA)对款冬花生品与蜜炙品进行模式识别研究。**结果** 建立了不同产地款冬花生品与蜜炙品的 HPLC 指纹图谱, 标定了 20 个共有峰, 并指认了其中 10 个共有峰; 36 批样品与对照指纹图谱的相似度在 0.723~0.984, 16 批款冬花生品相似度在 0.862~0.998, 20 批蜜炙品相似度在 0.687~0.993; 通过 HCA、PCA 和 PLS-DA 可将款冬花生品与蜜炙品完全区分开来, 没食子酸、绿原酸、异绿原酸 A、款冬酮等 10 个成分是导致二者差异性的主要标志物。**结论** HPLC 指纹图谱结合化学模式识别为款冬花生品与蜜炙品的质量控制和品质评价提供了更全面的参考。

关键词: 款冬花; 生品; 蜜炙品; HPLC 指纹图谱; 化学模式识别

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)21-4991-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.006

Discriminant analysis of raw and honey baked *Farfarae Flos* from different regions by HPLC fingerprint analysis combined with chemical pattern recognition

YANG Bing-yue¹, PENG Liang¹, YAN Yong-gang¹, SHEN Xia¹, LI Yi-min¹, HAN Cui², CHEN Guo-liang², HU Ben-xiang¹

1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Shaanxi Guangjitang Pharmaceutical Group, Yulin 719000, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of raw and honey baked *Farfarae Flos* for its quality control and samples differentiation. **Methods** An HPLC method has been developed for the fingerprinting and evaluation of 36 batches of raw and honey baked *Farfarae Flos* collected from different locations. The Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (2012A edition) was used to evaluate the similarity of 36 batches. The difference between raw and honey baked *Farfarae Flos* was identified by chemical pattern recognition methods including hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and partial least squares discriminate analysis (PLS-DA). **Results** A standard fingerprint containing 20 common peaks was constructed from 36 batches of raw and honey baked *Farfarae Flos*, and identified 10 of them. The similarity of all batches with reference fingerprint was between 0.723—0.984. The similarity of 16 batches of raw *Farfarae Flos* was between 0.862—0.998, and the similarity of 20 batches of honey baked *Farfarae Flos* was between 0.687—0.993. HCA, PCA and PLS-DA results demonstrated that there were obvious distinction between raw and honey baked *Farfarae Flos*. According to the VIP plot, ten constituents including gallic acid, chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, and tussilagone were primarily response for the discrimination. **Conclusion** The combination of HPLC fingerprint and chemical pattern recognition could provide a comprehensive reference for the quality control and quality evaluation of raw and honey baked *Farfarae Flos*.

Key words: *Farfarae Flos*; raw *Farfarae Flos*; honey baked *Farfarae Flos*; HPLC fingerprint; chemical pattern recognition

收稿日期: 2018-06-22

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-QIN-36; 202410001); 公益性行业(中医药)科研专项经费项目(201507002-1-08); 陕西省高校青年杰出人才支持计划项目; 咸阳市中青年科技领军人才项目

作者简介: 杨冰月(1983—), 博士, 研究方向为中药品种、质量及资源开发研究。E-mail: 304951774@qq.com

*通信作者 彭亮(1985—), 博士, 研究方向为中药资源评价与开发利用、中药材质量控制研究。E-mail: ppengliang@126.com

胡本祥(1960—), 教授, 研究方向为中药品种、质量及资源开发研究。E-mail: hubenxiang@tom.com

款冬花为菊科款冬属植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 本属仅款冬一种, 具有润肺下气、止咳化痰之功效^[1], 其主要活性成分为萜类、酚类、黄酮类、生物碱类和挥发油类等^[2-3], 表现出止咳祛痰、升压、抗血小板聚集、抗肿瘤等多种药理作用^[4-5]。款冬花主产于我国陕西、河北、甘肃、重庆等地, 不同产地间存在质量差异^[6]。

《中国药典》2015 年版一部收载的款冬花饮片有生品(除去杂质及残梗)和蜜炙品(取净款冬花, 照《中国药典》四部通则 0213 中蜜炙法, 用蜜水炒至不粘手)。蜜炙作为中药炮制加工的重要方法之一, 可提高款冬花疗效, 保证临床用药。相关研究报道表明, 款冬花蜜炙后可增强润肺止咳的作用, 李红军等^[7]发现蜜炙款冬花中款冬酮含量高于生品; 凌珊等^[8]对款冬花生品与蜜炙品不同溶媒提取物的镇咳作用研究表明, 蜜炙款冬花醇提物低剂量组镇咳效果最佳; 李娟等^[9]采用 NMR 代谢组学技术比较了款冬花生品与蜜炙品的化学成分, 显示二者初级与次生代谢产物的量发生了变化, 蜜炙后芦丁、款冬酮的含量增加。款冬花 HPLC 指纹图谱研究不多, 多为单独构建款冬花生品或炮制品的指纹图谱及对照指纹图谱, 且未对指纹图谱数据进行充分挖掘^[10-12]。

目前, 指纹图谱结合模式识别方法已广泛应用于中药材的质量控制、来源分析及差异标志物筛选等方面, 可有效对中药材炮制前后的生品及制品进行判别分析和质量评价^[13]。基于此, 本实验采用 HPLC 建立不同产地款冬花生品与蜜炙品的指纹图谱, 通过相似度、聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)等模式识别技术评价款冬花生品与蜜炙品的指纹图谱, 分析共有峰特征及识别归类, 并寻找二者主要的差异性成分, 为款冬花生品与蜜炙品的质量控制和品质评价提供更全面的参考。

1 仪器与材料

电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); Waters-2695 高效液相色谱仪; Waters-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱; Waters 2998 PDA Detector 检测器; KQ-200DE 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司); XS-02 型多功能高速粉碎机(上海兆申科技有限公司); Waters-CERTIFIED 液相小瓶; FA2104 型十万分之一电子分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); 没食子酸(批号 201502, 质量分数≥98%)、绿原酸(批号 201606,

质量分数≥98%); 芦丁(批号 201509, 质量分数≥98%)、金丝桃苷(批号 201710, 质量分数≥98%), 购于中国食品药品检定研究院; 异绿原酸 A(批号 170113, 质量分数≥98%)、异绿原酸 B(批号 161218, 质量分数≥98%)、异绿原酸 C(批号 170220, 质量分数≥98%)、款冬酮(批号 170801, 质量分数≥98%)购于北京北纳创联生物技术研究院; 色谱级乙腈、甲醇、磷酸、甲酸(赛默飞世尔科技有限公司); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 其他试剂均为分析纯(天津市天力化学试剂有限公司)。

款冬花生品与蜜炙品来源见表 1, 实地或委托购买每批次药材约 1 kg, 由陕西中医药大学中药鉴定教研室胡本祥教授鉴定为菊科植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾或蜜炙品, 标本凭证保存于陕西中医药大学药实验中心。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 4 号筛)约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 200 W 频率 4 kHz)1 h, 放冷, 再称定质量, 用乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 定量转移 5 mL 滤液至蒸发皿中, 水浴蒸干, 再用 5 mL(定量)甲醇溶解, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 取续滤液进行 HPLC 分析。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥 24 h 的没食子酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、山柰素、款冬酮对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。分别加甲醇配成质量浓度为 1.240、1.540、0.285、0.531、3.202、0.391、0.235、0.330、0.240、0.335 mg/mL 的对照品储备液, 取 10 种对照品储备液适量配成混合对照品储备液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Waters-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 240 nm; 柱温 30 °C; 进样体积 10 μL; 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱系统(0~14 min, 15%~25% A; 14~20 min, 25%~35% A; 20~23 min, 35%~75% A; 23~24 min, 75%~85% A; 24~30 min, 85%~93% A; 30~40 min, 90%~100% A)。

表 1 款冬花生品与蜜炙品来源信息
Table 1 Sample information of raw and honey baked *Farfarae Flos*

编号	名称	来源	收集时间
S1	款冬花	河北安国药材市场	2018-04
S2	款冬花	河北安国药材市场	2018-04
S3	款冬花	安徽亳州药材市场	2018-04
S4	款冬花	安徽亳州药材市场	2018-04
S5	款冬花	四川荷花池药材市场	2018-04
S6	款冬花	四川荷花池药材市场	2018-04
S7	款冬花	内蒙古通辽市秦曼旗	2018-04
S8	款冬花	陕西省铜川市耀州区	2018-04
S9	款冬花	西安万寿路药材市场	2018-04
S10	款冬花	西安万寿路药材市场	2018-04
S11	款冬花	陕西省榆林市榆阳区	2017-11
S12	款冬花	重庆市巫溪县	2018-04
S13	款冬花	河北安国药材市场	2018-04
S14	款冬花	河北安国药材市场	2017-12
S15	款冬花	陕西省宝鸡市太白县	2017-12
S16	款冬花	甘肃省天水市	2017-12
S17	蜜炙款冬花	河北安国药材市场	2018-04
S18	蜜炙款冬花	安国市旭芳中药材经营有限公司	2018-04
S19	蜜炙款冬花	河北华龙中药有限公司	2018-04
S20	蜜炙款冬花	安徽亳州药材市场	2018-04
S21	蜜炙款冬花	安徽亳州药材市场	2018-04
S22	蜜炙款冬花	安徽亳州药材市场	2018-04
S23	蜜炙款冬花	亳州市永刚饮片厂有限公司	2018-04
S24	蜜炙款冬花	甘肃铎耀中药饮片有限公司	2018-04
S25	蜜炙款冬花	北京同仁堂咸阳分店	2018-04
S26	蜜炙款冬花	重庆市万州区江南大药房	2018-04
S27	蜜炙款冬花	西安万寿路药材市场	2018-04
S28	蜜炙款冬花	西安万寿路药材市场	2018-04
S29	蜜炙款冬花	西安万寿路药材市场	2018-04
S30	蜜炙款冬花	广东天诚中药饮片有限公司	2018-04
S31	蜜炙款冬花	北京同仁堂广州分店	2018-04
S32	蜜炙款冬花	四川荷花池药材市场	2018-04
S33	蜜炙款冬花	四川荷花池药材市场	2018-04
S34	蜜炙款冬花	四川荷花池药材市场	2018-04
S35	蜜炙款冬花	四川荷花池药材市场	2018-04
S36	蜜炙款冬花	陕西科兴药业有限公司	2018-04

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取款冬花样品, 按“2.1”项下方法进行制备, 按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 检测指纹图谱, 以异绿原酸 B 为参照峰, 计算

共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果表明, 各共有峰的相对保留时间的 $RSD < 1.25\%$, 相对峰面积的 $RSD < 1.63\%$, 说明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 10 μL , 分

别在 0、2、4、8、12、24 h 进样,按“2.3”项下色谱条件检测指纹图谱,以异绿原酸 B 为参照峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明,各共有峰的相对保留时间的 $RSD < 0.96\%$,相对峰面积的 $RSD < 1.03\%$,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一样品 6 份,按“2.1”项下方法进行制备,按“2.3”项下色谱条件检测指纹图谱,以异绿原酸 B 为参照峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明,各共有峰的相对保留时间的 $RSD < 0.88\%$,相对峰面积的 $RSD < 1.19\%$,说明该方法重复性良好。

2.5 数据分析

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 A)分析款冬 HPLC 指纹图谱数据,确定共有峰,生成对照图谱并进行相似度计算。以相对共有峰峰面积为变量,将数据导入 SIMCA-P13.0 软件进行 PCA、PLS-DA 和变量投影重要性(variable importance plot, VIP)分析,SPSS 19.0 统计软件进行 HCA 分析,分析款冬花生品与蜜炙品的差异性,筛选导致样品间差异的化学成分。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱的构建及共有峰的确定

取 36 批不同来源款冬样品,按“2.1”项下方法制备各供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样,进行 HPLC 测定与分析,记录色谱图,导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 A),设置 S1 分析得到的图谱为参照指纹图谱,叠加图及对照指纹图谱见图 1、2。

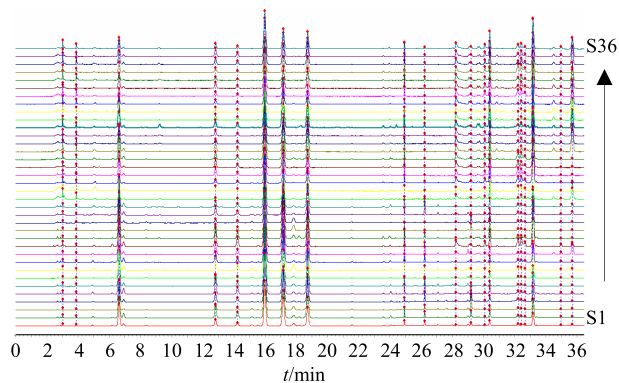


图 1 36 批款冬花样品的指纹图谱叠加图

Fig. 1 Fingerprint overlay of 36 batches of raw and honey baked *Farfarae Flos*

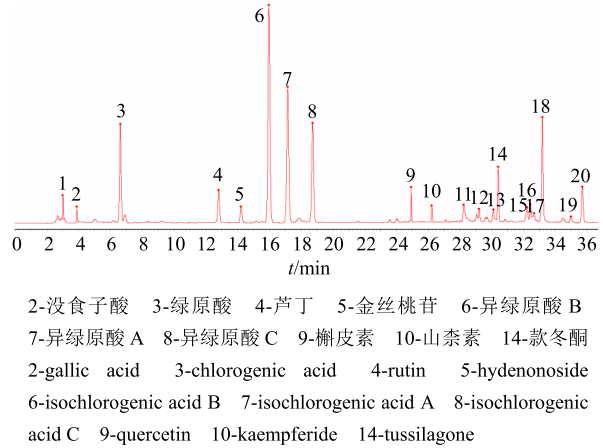


图 2 款冬花对照指纹图谱

Fig. 2 Control fingerprint of raw and honey baked *Farfarae Flos*

36 批不同来源款冬花样品共得到 20 个共有峰,共有峰面积占总峰面积的 95%以上,符合指纹图谱的相关规定,并指认了其中的 10 个共有峰,分别为没食子酸(峰 2)、绿原酸(峰 3)、芦丁(峰 4)、金丝桃苷(峰 5)、异绿原酸 B(峰 6)、异绿原酸 A(峰 7)、异绿原酸 C(峰 8)、槲皮素(峰 9)、山柰素(峰 10)、款冬酮(峰 14)。以分离度良好,且含量较高的化合物异绿原酸 B(峰 6)为参照峰。

3.2 款冬花样品的指纹图谱相似度分析

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版”,以款冬花的对照指纹图谱为参照,计算相似度,结果见表 2。由表 2 可知,16 批款冬花生品与对照指纹图谱的相似度在 0.923~0.984,样品之间的相似度在 0.862~0.998,表明各批次款冬生药材质量相对稳定;20 批蜜炙品与对照指纹图谱的相似度在 0.723~0.983,蜜炙品之间的相似度在 0.687~0.993,说明款冬花在蜜炙过程中因厂家、操作人员或操作工艺不同而产生了一定的差异性,造成质量不稳定。

3.3 化学模式识别研究

3.3.1 HCA 将 36 批款冬花样品的 20 个共有色谱峰峰面积数据导入 SPSS 19.0 统计软件,Z 标准化后选用组内联接聚类法,以欧式平方距离度量标准,计算样品相似度。聚类分析结果表明,当欧式平方距离为 17 时,36 批样品可以按处理方式分成 2 类,S1~S16 号款冬花生品聚为一类,S17~S36 号蜜炙品聚为一类,见图 3。

表 2 不同款冬花样品 HPLC 指纹图谱相似度评价
Table 2 Similarity evaluation of HPLC fingerprint of 36 batches of *Farfarae Flos*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.983	S19	0.723
S2	0.972	S20	0.943
S3	0.971	S21	0.867
S4	0.979	S22	0.943
S5	0.968	S23	0.960
S6	0.971	S24	0.982
S7	0.929	S25	0.971
S8	0.976	S26	0.973
S9	0.969	S27	0.958
S10	0.977	S28	0.941
S11	0.984	S29	0.917
S12	0.940	S30	0.871
S13	0.923	S31	0.870
S14	0.974	S32	0.825
S15	0.982	S33	0.952
S16	0.957	S34	0.823
S17	0.983	S35	0.863
S18	0.972	S36	0.969

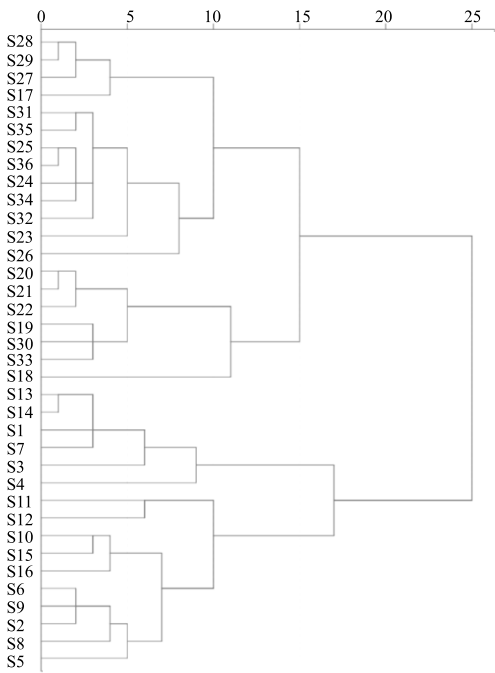


图 3 款冬花样品聚类分析
Fig. 3 Results of hierarchical cluster analysis of 36 batches of *Farfarae Flos*

3.3.2 PCA 将 36 批款冬花样品中 20 个共有峰的峰面积相对于参照峰（6 号峰）的峰面积量化为变量，得到 36×20 阶数据矩阵，导入 SIMCA-P13.0 统计软件进行 PCA，前 4 个主成分的累积贡献率达到 84.68%，说明前 4 个因子在反映款冬花炮制前后与 20 个共有成分的相互关系中起主导作用，能够评价款冬花生品与蜜炙品的品质（表 3）。其中，第 1 主成分（PC1）独立贡献率为 44.03%，主要反映来自峰 13（0.898）、峰 11（0.867）、峰 16（0.864）、峰 3（-0.844）和峰 21（-0.807）的信息；第 2 主成分（PC2）独立贡献率为 23.41%，主要反映的是来自峰 9（0.869）和峰 18（0.738）的信息；第 3 主成分（PC3）独立贡献率为 11.42%，主要反映的是来自峰 20（0.794）的信息；第 4 主成分（PC4）独立贡献率为 5.82%，主要反映的是来自峰 1（-0.649）和峰 2（-0.641）的信息。上述结果表明，通过 PCA 分析降维处理后所提取的主成分能够代表款冬花指纹图谱中 20 个共有峰的主要信息。

根据 PCA 结果，提取前 2 个主成分做得分图，结果见图 4。由图 4 可知，款冬花生品与蜜炙品沿着 PC1 轴方向具有明显的区分趋势，款冬花生品位于得分图的左边，蜜炙品位于得分图的右边，完全按照各自的来源进行归类。

表 3 主成分载荷				
Table 3 Loadings in four principal components				
峰号	PC1	PC2	PC3	PC4
1	0.668	0.235	0.112	-0.649
2	0.672	0.229	0.138	-0.641
3	-0.844	0.428	0.062	-0.075
4	-0.718	0.558	0.174	0.003
5	-0.689	0.582	0.120	0.067
6	-0.731	0.492	0.144	-0.146
7	-0.807	0.471	0.056	-0.019
8	-0.725	0.588	0.198	-0.101
9	0.032	0.869	0.212	0.222
10	-0.679	0.278	0.215	0.055
11	0.867	0.198	0.332	0.143
12	-0.080	-0.393	-0.269	0.297
13	0.898	0.296	0.209	0.181
14	0.635	0.588	0.063	0.156
15	0.489	0.555	-0.573	0.059
16	0.864	0.448	-0.028	0.089
17	0.513	0.597	-0.551	-0.006
18	0.347	0.738	-0.534	0.095
19	0.637	0.241	0.523	0.157
20	0.540	-0.065	0.794	0.160
特征值	8.807	4.682	2.284	1.164
贡献率/%	44.030	23.410	11.420	5.820
累积贡献率/%	44.030	67.440	78.860	84.680

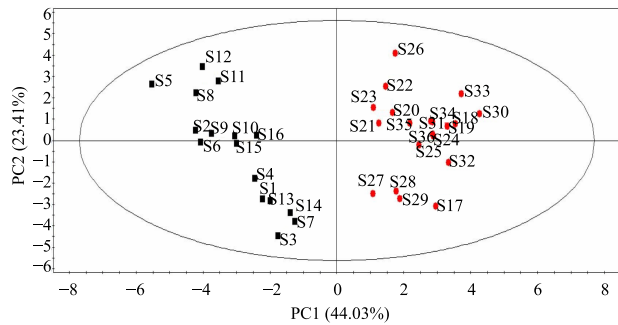


图 4 PCA 得分图

Fig. 4 Score plot of PCA

3.3.3 PLS-DA PLS-DA 建模分析后, 得分矩阵图见图 5。结果表明, 模型中 2 组不同来源样品聚类良好, 区分明显, 蜜炙品位于得分图的左侧, 款冬花生品位于得分图的右侧, 证实款冬花蜜炙后与生药材在化学成分上存在一定差异, 且有趋势性; 模型的主成分回归系数 $Q^2_Y = 0.931 > 0.5$, 说明模型的预测能力较强, 反映两组样本具明确分离的趋势; $R^2_Y = 0.956$, 说明模型对因变量变异贡献的百分比为 95.60%, 即自变量 (共有峰) 的变化能够解释导致 95.60% 不同分类 (因变量) 的发生, 模型的拟合度较好。对建立的模型进行 20 次的置换检验, 结果见图 6。由图 6 可知, 位于最右边的 R^2 和 Q^2 值均

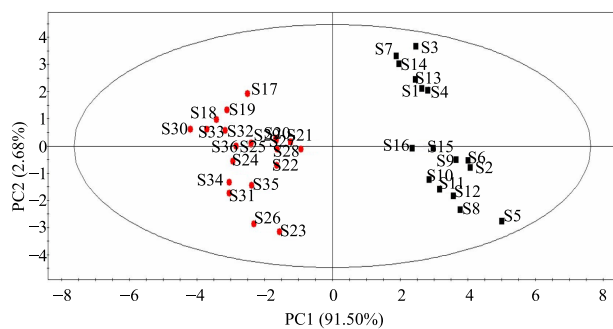


图 5 PLS-DA 得分图

Fig. 5 Score plot of PLS-DA

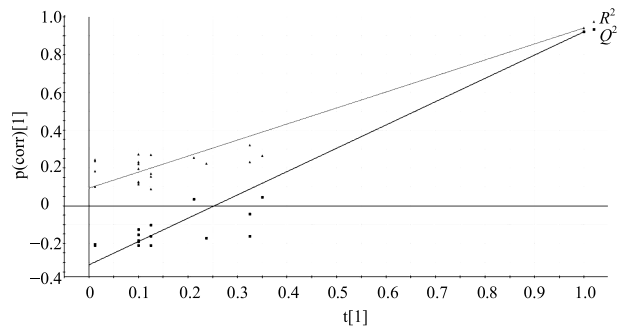
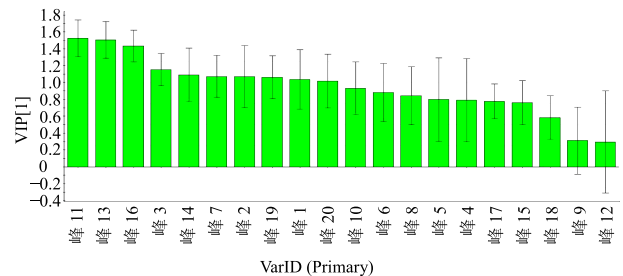


图 6 PLS-DA 模型的排列检验图

Fig. 6 Permutation test result of PLS-DA

超过 0.9, 远高于左边的 R^2 和 Q^2 值, 且 Q^2 回归线的截距为负值, 表明所构建的 PLS-DA 模型没有出现拟合, 具有较好的预测能力及有效可用, 能够对款冬花生品和蜜炙品进行判别分析。

提取 PLS-DA 模型中 20 个变量的 VIP 图 (图 7), 对 20 个共有峰峰面积 VIP 值大小进行排列, 选择 VIP 值大于 1 的共有峰, 结果显示 11 号峰 (VIP 值 1.475 8)、13 号峰 (VIP 值 1.379 1)、16 号峰 (VIP 值 1.340 3)、3 号峰 (VIP 值 1.308 4)、14 号峰 (VIP 值 1.307 5)、7 号峰 (VIP 值 1.288 5)、2 号峰 (VIP 值 1.213 5)、19 号峰 (VIP 值 1.183 9)、1 号峰 (VIP 值 1.171 9) 和 20 号峰 (VIP 值 1.036 5) 均大于 1, 说明以上化学成分对款冬花生品与蜜炙品分类具有显著的影响, 这些成分是引起款冬花生品与蜜炙品成分差异的主要标志性成分, 并指出其中 4 个已知成分, 分别为 2 号峰没食子酸、3 号峰绿原酸、7 号峰异绿原酸 A、14 号峰款冬酮。其余色谱峰 VIP 值小于 1, 对样品的区分影响较小。

图 7 差异标志物的 VIP ($\bar{x} \pm s, n = 20$)Fig. 7 VIP of differential markers ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

4 讨论

4.1 供试品制备方法的考察

比较了无水乙醇、50%乙醇、70%乙醇、甲醇、70%甲醇等提取溶剂, 加热回流、超声等提取方法, 不同提取时间及提取后直接进样, 提取后蒸干用乙腈、无水乙醇、甲醇溶解等方式, 结果以无水乙醇超声提取 (功率 200 W, 频率 4 kHz) 1 h, 水浴蒸干, 再用甲醇溶解的提取方法提取率最佳。

4.2 色谱条件的考察

比较了甲醇-0.05%甲酸水、甲醇-0.05%磷酸水、乙腈-0.05%甲酸水、乙腈-0.05%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水溶液等流动相及多个梯度洗脱条件, 结果表明, 以乙腈-0.1%磷酸水为流动相, 按“2.3 项”下的梯度条件, 获得的色谱峰多且分离度好。考察了 210~400 nm (全波长) 及 220、240、256、326 nm, 显示 240 nm 波长下样品中各色谱峰峰形好、吸收

值较大,选定为检测波长。

4.3 相似度分析

结果显示,36批样品与对照指纹图谱的相似度在0.723~0.984,16批款冬花生品内的相似度在0.862~0.998,20批蜜炙品内的相似度在0.687~0.993,表明不同产地款冬花生品与蜜炙品质量存在差异,款冬花生品质量相对蜜炙品而言要更为稳定。结合指纹图谱分析可知,款冬花生品化学成分组成相似度高,各共有峰峰面积存在差异,这和不同地区的气候、土壤、水分、种源及采收期等因素有关^[14];部分款冬花蜜炙品相似度较低,与款冬花蜜炙过程中的加工工艺、设备、蜜的种类及炼蜜手段等因素有关^[15]。

化学模式识别方法中的HCA、PCA和PLS-DA分析结合高效液相色谱的指纹性,能够对不同产地、不同部位和炮制处理的中药材之间进行快速聚类鉴别和判别分析^[10]。HCA是基于“相似度”来分析样品间的亲疏度,进行归类,并依据相似度来反映样品之间的稳定性;PCA是利用方差最大原则,对多变量降维后组合成少数几个新的变量,以便于反映原有变量的绝大部分信息,通过得分图实现可视化的分类效果;PLS-DA的优势在于其强大的解释能力,可以对多重相关性的自变量进行回归建模,适用于区分多类别样品且具有线性判别分析能力^[16]。本文通过模式识别分析,建立了款冬花生品与蜜炙品的HCA、PCA和PLS-DA分类模型,明确了样品之间的归类情况,3种化学模式识别方法结果一致,都可以将款冬花生品与蜜炙品完全区分开来,聚为两类。表明款冬花生品与蜜炙品存在差异,并筛选得到了10个主要差异性物质,指认出了其中4个成分,分别为没食子酸、绿原酸、异绿原酸A和款冬酮。同时,分别对款冬花生品和蜜炙品进行主成分分析后,均以贡献率最大的第一主成分中的相关成分系数高于0.8为评价指标,表明款冬花生品的差异性主要体现在绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、槲皮素和16号峰等成分;款冬花蜜炙品的差异性主要体现在绿原酸、金丝桃苷、异绿原酸A、异绿原酸C和槲皮素等成分。

综上,本实验通过对不同产地16批款冬花生品,20批款冬花蜜炙品共计36批样品指纹图谱的研究,建立了款冬花生品与蜜炙品的对照指纹图谱,共得到20个共有峰,并通过标准品指认了其中的10个峰,

可反映款冬花生品与蜜炙品的化学特征。建立的款冬花生品与蜜炙品指纹图谱共有模式较为理想,能真实反映款冬花蜜炙前后的药材状况,结合化学模式识别技术可用于款冬花的质量控制,为中药材炮制前后的识别和化学成分的比较提供了参考。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2015.
- [2] 李静,秦雪梅,李震宇. 款冬花中倍半萜类成分的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(14): 2964-2971.
- [3] 程晓叶,张霞,廖曼,等. UPLC-Q-TOF-MS法分析款冬花的化学成分[J]. 中草药, 2017, 48(12): 2390-2400.
- [4] Xu J, Sun X, Kang J, et al. Chemical and biological profiles of *Tussilago farfara*: Structures, nitric oxide inhibitory activities, and interactions with iNOS protein[J]. *J Funct Foods*, 2017, 32: 37-45.
- [5] 张燕. 款冬花毒性、活性部位及药理作用的研究进展[J]. 中国实用医药, 2015, 10(35): 287-288.
- [6] 厉姐,张静,梁鹏,等. 不同产地、不同采收期款冬花的质量评价[J]. 中药材, 2015, 38(4): 720-722.
- [7] 李红军,王增绘,李文涛,等. UPLC-Q-TOF/MS法分析款冬花蜜炙前后的化学成分变化[J]. 中国药房, 2015, 16(6): 792-794.
- [8] 凌珊,易炳学,龚千锋,等. 生品和蜜炙款冬花不同提取物的镇咳祛痰作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 187-190.
- [9] 李娟,张松,秦雪梅,等. 基于NMR代谢组学技术的款冬花生品与蜜炙品化学成分比较[J]. 中草药, 2015, 46(20): 3009-3016.
- [10] 曹娟,王福刚,刘克,等. 蜜炙款冬花HPLC指纹图谱研究[J]. 中药材, 2012, 35(1): 33-36.
- [11] 马致洁,董红红,李振宇,等. 不同款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量分析及HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1305-1308.
- [12] 刘玉峰,杨秀伟. 款冬花药材的HPLC化学成分指纹图谱研究[J]. 药学报, 2009, 44(5): 510-514.
- [13] 肖榕,林艳,雷思敏,等. UPLC指纹图谱结合模式识别分析不同产地生/制何首乌[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(12): 2305-2310.
- [14] 姚超,辛华,陆逸林,等. 不同产地栀子的超高效液相色谱指纹图谱及模式识别研究[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(1): 63-67.
- [15] 刘效栓,高小恒,李喜香. 正交试验法优选蜜炙款冬花的炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 56-58.
- [16] 孙立丽,王萌,任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.