

基于多波长 HPLC 指纹图谱结合化学计量分析的金花葵质量评价研究

张迪文, 马 开*, 田 萍, 郭晓燕

河南省中医药研究院, 河南 郑州 450003

摘 要: **目的** 建立不同批次金花葵的多波长 HPLC 指纹图谱, 并结合定量分析、相似度评价、聚类分析及主成分分析对金花葵进行质量评价研究。**方法** 采用 Phenomenex Kinetex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.08%磷酸水为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 波长切换 (0~8 min, 260 nm, 检测原儿茶酸; 8~15 min, 324 nm, 检测咖啡酸; 15~60 min, 360 nm, 检测芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷、杨梅素、槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷、槲皮素), 柱温为 30 °C。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版及 SPSS 19.0 软件建立金花葵 HPLC 指纹图谱, 并进行相似度评价、聚类分析及主成分分析。**结果** 金花葵 HPLC 指纹图谱确认了 25 个共有峰, 指认 9 个共有峰, 并对指认共有峰进行了含量测定。16 批金花葵样品相似度在 0.879~0.983, 相似度良好; 聚类分析结果将金花葵聚为 2 类, 表明不同产地金花葵在相似中存在差异性; 根据主成分综合得分对金花葵质量进行了排名。**结论** 该方法简便准确, 可用于金花葵药材的综合质量评价。

关键词: 金花葵; 多波长 HPLC 指纹图谱; 化学计量分析; 定量分析; 聚类分析; 主成分分析; 芦丁; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 棉皮素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷; 杨梅素; 槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)14-3426-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.024

Quality evaluation of *Aurea helianthus* by multiwavelength HPLC fingerprint and chemometrics methods

ZHANG Di-wen, MA Kai, TIAN Ping, GUO Xiao-yan

Henan Province Institute of Chinese Medicine Research, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To establish multiwavelength HPLC fingerprint of *Aurea helianthus* from different batches, and combine quantitative analysis, similarity evaluation, cluster analysis, and principal component analysis to evaluate the quality of *A. helianthus*.

Methods The chromatographic column was Phenomenex Kinetex C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of 0.08% phosphoric acid water (A) and acetonitrile (B) in gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 260 nm for protocatechuic acid during 0—8 min, 324 nm for caffeic acid during 8—15 min, 360 nm for rutin, hyperin, isoquercitrin, gossypetin-8-*O*-β-*D*-glucuronide, myricetin, quercetin-3'-*O*-glucoside, and quercetin during 15—60 min. The column temperature was set at 30 °C. And the HPLC fingerprint of *A. helianthus* was established by the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2004A) and SPSS19.0, which was used for similarity evaluation, cluster analysis, and principal component analysis. **Results** A total of 25 common peaks were confirmed of *A. helianthus* HPLC fingerprint, and nine peaks were identified which were determined. The similarity of 16 batches of samples was between 0.879 and 0.983; The results of cluster analysis showed that *A. helianthus* was clustered into two groups, indicating that there were differences in the similarity; Ranked the quality of *A. helianthus* based on the main component composite score. **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be used for the comprehensive quality evaluation research of the medicinal materials of *A. helianthus*.

Key words: *Aurea helianthus* L.; multiwavelength HPLC fingerprint; chemometrics methods; quantitative analysis; cluster analysis; principal component analysis; rutin; hyperin; isoquercitrin; gossypetin-8-*O*-β-*D*-glucuronide; myricetin; quercetin-3'-*O*-glucoside

金花葵 *Aurea helianthus* L. 又名金芙蓉、菜芙蓉、野芙蓉, 为锦葵科秋葵属 1 年生草本植物, 是

2003 年中国农科院在河北省邢台地区发现的濒危绝种植物, 药理研究表明金花葵具有良好的解热抗

收稿日期: 2019-01-09

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究项目 (112300410063)

作者简介: 张迪文 (1990—), 女, 研究实习员, 主要从事药物分析、天然产物化学研究。Tel: 13526405082 E-mail: 908625387@qq.com

*通信作者 马 开 (1968—), 男, 副研究员, 主要从事天然活性成分研究与新药开发研究。Tel: 13613713552 E-mail: zzm1968@126.com

炎、镇痛、调血脂、抑制肿瘤细胞、免疫调节、抗氧化等作用,具有较高的药用价值^[1-2]。根据文献报道^[2-3]及本课题前期研究表明,金花葵主要含有总黄酮、不饱和脂肪酸、酚酸及多种微量元素等成分。金花葵总黄酮具有镇痛、抗心脑血管缺血、调血脂、调节机体免疫力等功效,其中,金丝桃苷具有较好的抗氧化能力及保护心血管系统作用^[4];芦丁和槲皮素互为苷和苷元,具有调血脂、清除自由基等药理作用^[5];异槲皮苷具有降压、抗炎、抗氧化、抗癌等药理作用^[6];棉皮素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖醛酸苷具有抗炎、抗癌、抗血管增生和保肝等作用^[7];槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷具有治疗心肌缺血、缺氧的生理活性^[8];杨梅素具有抗炎镇痛、抗肿瘤、抗心肌缺血再灌注损伤等多种药理作用^[9]。金花葵含有的酚酸类成分中,原儿茶酸具有抑菌镇痛、抗氧化和神经保护等药理作用^[10];咖啡酸具有抗血小板凝集、抗肿瘤和脑保护等药理作用^[11]。以上成分均为金花葵药效相关成分,其含量差异与金花葵药理活性直接相关,本研究将这些成分作为金花葵含量测定的指标性成分,用于金花葵药材的综合质量评价,对于金花葵规范化种植研究、产地加工、质量评价及资源开发等具有积极意义。

中药指纹图谱是评价中药优劣、鉴别真伪、区分物种及确保其一致性和稳定性的综合定性定量方法,具有信息量大、特征性强、整体性等特点^[12-13]。主成分分析利用降维方式将复杂问题变得简单直观,有效地避免了综合评价时主观加权的弊端^[14-15]。目前,关于金花葵的研究主要集中于总黄酮类的含量测定及相关药理作用研究,而从指纹图谱结合化学计量分析角度对金花葵质量评价研究鲜有报道。本研究采用波长切换 HPLC 法,建立金花葵 HPLC 指纹图谱,结合定量分析、相似度分析、聚类分析及主成分分析,为金花葵整体质量评价研究打下基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Waters 自动进样器, Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司); METTLER AE240 十万分之一分析天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司); Shimadzu LIBROR L-160DTP 万分之一分析天平(日本岛津公司); SB-5200DT 型数控超声波清洗器(宁波新芝生物科

技股份有限公司)。

1.2 试药

对照品原儿茶酸(批号 MUST-16032112)、咖啡酸(批号 MUST-16060613)、金丝桃苷(批号 MUST-16102605)购于成都曼思特生物科技有限公司,质量分数均大于 98%;芦丁(批号 wkq16031602)、异槲皮苷(批号 wkq16040703)、槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷(批号 wkq17030704)、槲皮素(批号 wkq16063005)均购于四川维克奇生物科技有限公司,质量分数均大于 98%;棉皮素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖醛酸苷(批号 Z21N8H47448)、杨梅素(批号 YM0311YA13)购于上海源叶生物科技有限公司,质量分数均大于 98%。乙腈为色谱纯(美国 Fisher Scientific 公司),甲醇、磷酸为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水。

16 批不同批次的金花葵药材,经河南省中医药研究院副研究员马开鉴定为锦葵科秋葵属植物金花葵 *Aurea helianthus* L. 的花,信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	产地	编号	产地
S1	河南唐河县	S9	江苏睢宁县
S2	河南延津县	S10	江苏睢宁县
S3	河南南乐县	S11	四川仪陇县
S4	河南新乡七里营镇	S12	四川绵阳市
S5	河南鲁山县	S13	安徽涡阳县
S6	河南宝丰县	S14	河南内黄县
S7	河南内乡县	S15	河南滑县王庄镇
S8	江苏睢宁县	S16	河南滑县老庙乡

2 方法

2.1 色谱条件

Phenomenex Kinetex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱;流动相为乙腈(A)-0.08%磷酸水溶液(B);梯度洗脱:0~10 min, 10%~15% A; 10~38 min, 15%~19% A; 38~47 min, 19%~23% A; 47~55 min, 23%~25% A; 55~60 min, 25%~70% A; 体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 30 $^{\circ}$ C;分段变波长 0~8 min, 260 nm, 检测原儿茶酸; 8~15 min, 324 nm, 检测咖啡酸; 15~60 min, 360 nm, 检测芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素-8-*O*-葡萄糖醛酸苷、杨梅素、槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷、槲皮素;进样量为 10 μ L。

2.2 供试品溶液制备

取样品粉末(过 4 号筛) 0.2 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 加甲醇 40 mL, 称定总质量, 超声提取 30 min, 放置至室温称定总质量, 补足减失质量, 滤过, 取续滤液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 对照品溶液制备

取原儿茶酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素-8-*O*-葡萄糖醛酸苷、杨梅素、槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷、槲皮素对照品适量, 精密称定, 用甲醇配制成单一对照品储备液; 再精密吸取各对照品储备液适量, 加甲醇配制成质量浓度分别为 4.02、23.70、30.48、117.12、61.12、103.68、28.80、62.08、17.40 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取金花葵样品(S7), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 精密吸取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录 HPLC 色谱图, 以金丝桃苷色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中各色谱峰相对保留时间的 RSD 小于 0.74%, 相对峰面积的 RSD 小于 2.63%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(S7) 10 μL , 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行测定, 记录 HPLC 色谱图, 以金丝桃苷色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中各色谱峰相对保留时间的 RSD 小于 0.93%, 相对峰面积的 RSD 小于 2.86%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批金花葵样品(S7) 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录 HPLC 色谱图, 以金丝桃苷色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中各色谱峰相对保留时间的 RSD 小于 0.86%, 相对峰面积的 RSD 小于 2.74%, 表明该方法重复性良好。

2.5 金花葵指纹图谱的建立及相似度分析

对 16 批金花葵药材进行测定, 记录 HPLC 色谱图, 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版对图谱数据结果进行分析, 设置 S1 为参照指纹图谱, 采用中位数法, 多点校正后自动匹配, 得到 16 批金花葵样品的 HPLC 色谱叠加图, 并生成对照图谱, 见图 1 和图 2, 确定共有峰为 25 个。根据对照品的色谱图和保留时间, 与样品色谱图进行比对, 指认 9 个共有峰, 分别为 6 号色谱峰为原儿茶酸, 10 号色谱峰为咖啡酸, 17 号

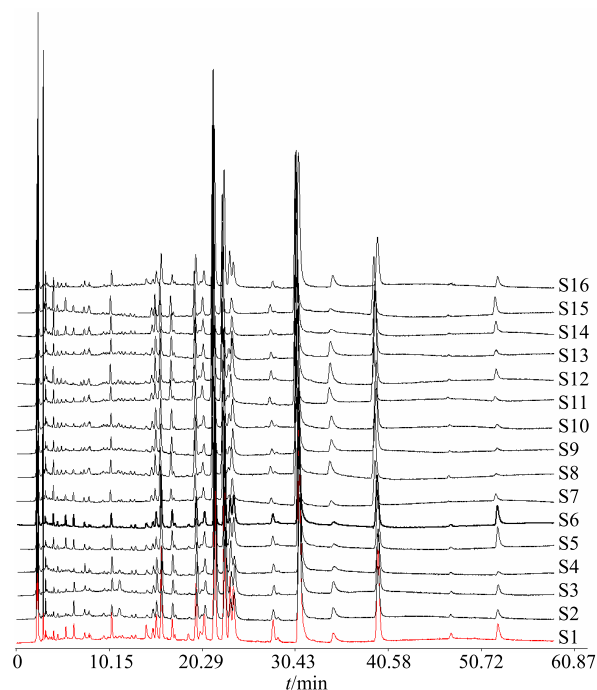


图 1 16 批样品 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 1 HPLC fingerprint of 16 batches of samples

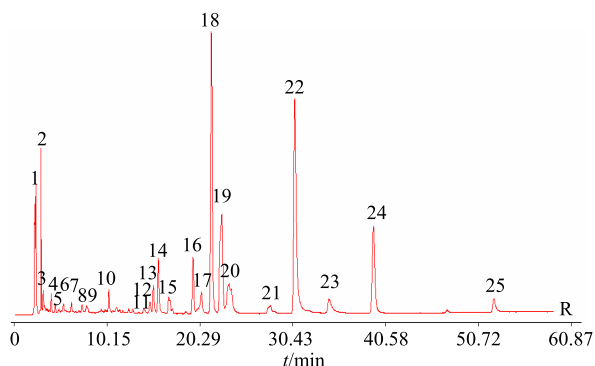


图 2 金花葵对照指纹图谱

Fig. 2 Control fingerprint of *A. helianthus*

色谱峰为芦丁, 18 号色谱峰为金丝桃苷, 19 号色谱峰为异槲皮苷, 22 号色谱峰为棉皮素-8-*O*-葡萄糖醛酸苷, 23 号色谱峰为杨梅素, 24 号色谱峰为槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷, 25 号色谱峰为槲皮素, 并将第 18 号含量较高且稳定的金丝桃苷指定为参照峰。16 批金花葵药材供试品色谱图与对照指纹图谱相似度见表 2, 除了 S11、S15, 其余均大于 0.9, 表明 16 批金花葵相似度良好, 化学成分较稳定。

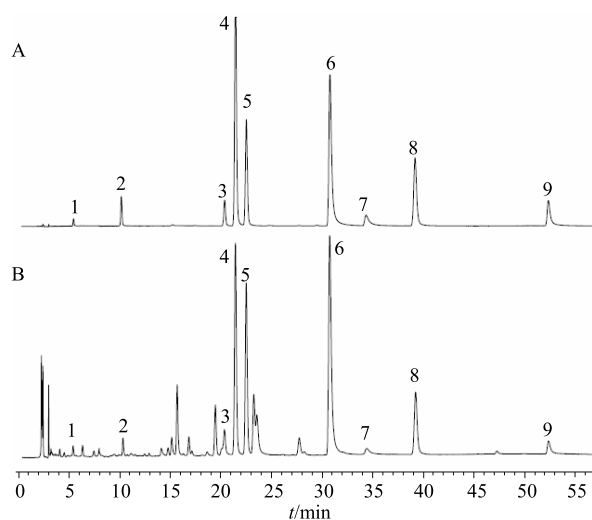
2.6 多指标成分测定

2.6.1 色谱条件 色谱条件同“2.1”项下, 色谱图见图 3。

表 2 16 批金花葵样品相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of 16 batches of *A. helianthus* samples

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.935	S9	0.983
S2	0.962	S10	0.963
S3	0.971	S11	0.879
S4	0.956	S12	0.924
S5	0.928	S13	0.927
S6	0.938	S14	0.907
S7	0.903	S15	0.884
S8	0.919	S16	0.906



1-原儿茶酸 2-咖啡酸 3-芦丁 4-金丝桃苷 5-异槲皮苷 6-棉皮素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷 7-杨梅素 8-槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷 9-槲皮素
1-protocatechuic acid 2-caffeic acid 3-rutin 4-hyperin 5-isoquercitrin 6-gossypetin-8-*O*- β -D-glucuronide 7-myricetin 8-quercetin-3'-*O*-glucoside 9-quercetin

图 3 对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC for reference substance (A) and samples (B)

2.6.2 供试品溶液制备及混合对照品溶液制备 溶液制备方法同“2.2”及“2.3”项。

2.6.3 线性关系考察 精密吸取“2.3”项下的混合对照品溶液适量，加甲醇配制成不同质量浓度的混合对照品溶液，按“2.1”项下的色谱条件进样，测定各成分的峰面积，以各成分的质量浓度为横坐标 (X)，峰面积均值为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得各成分的回归方程、相关系数 (r^2) 和线性范围，结果见表 3。

2.6.4 精密度试验 取金花葵样品 (S7)，精密称定，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次，记录各成分峰面积，原儿茶酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素-8-*O*-葡萄糖醛酸苷、杨梅素、槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 1.16%、0.68%、0.54%、0.86%、0.95%、0.85%、1.27%、1.31%、0.98%，说明仪器精密度良好。

2.6.5 稳定性试验 取同一批次金花葵样品 (S7)，精密称定，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项下的色谱条件进行测定，记录各成分峰面积，原儿茶酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素-8-*O*-葡萄糖醛酸苷、杨梅素、槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 1.04%、0.92%、0.88%、1.91%、1.74%、0.83%、0.97%、0.54%、0.88%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.6 重复性试验 取同一批次金花葵样品 (S7) 6 份，精密称定，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下的色谱条件进样，记录各成分峰面积，原儿茶酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素-8-*O*-葡萄糖醛酸苷、杨梅素、槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷和槲皮素的质量分数 RSD 分别为 1.60%、0.84%、

表 3 金花葵中 9 个成分的线性关系

Table 3 Linear regression equations of nine constituents

成分	回归方程	r^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
原儿茶酸	$Y=8.98\times 10^6 X-5.76\times 10^3$	0.999 4	0.201~ 4.024
咖啡酸	$Y=8.18\times 10^6 X-7.77\times 10^4$	0.999 4	1.185~ 23.700
芦丁	$Y=2.24\times 10^6 X-2.74\times 10^4$	0.999 4	1.524~ 30.480
金丝桃苷	$Y=2.59\times 10^6 X-1.33\times 10^5$	0.999 3	5.856~117.120
异槲皮苷	$Y=4.35\times 10^6 X-1.10\times 10^5$	0.999 4	3.056~ 61.120
棉皮素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖醛酸苷	$Y=3.24\times 10^6 X-1.82\times 10^5$	0.999 5	5.184~103.680
杨梅素	$Y=3.10\times 10^6 X-2.86\times 10^4$	0.999 7	1.440~ 28.800
槲皮素-3'- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=2.59\times 10^6 X-7.52\times 10^4$	0.999 6	3.104~ 62.080
槲皮素	$Y=4.60\times 10^6 X-5.67\times 10^4$	0.999 2	0.870~ 17.400

0.40%、0.28%、0.17%、0.33%、0.23%、0.48%、1.36%，说明该方法重复性良好。

2.6.7 加样回收率试验 取已测知含量的同一批次金花葵样品 (S7) 6 份，约 0.1 g，精密称定，分别精密加入混合对照品溶液适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下的色谱条件进样测定，计算原儿茶酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素-8-*O*-葡萄糖醛酸苷、杨梅素、槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷和槲皮素的平均回收

率分别为 96.20%、97.66%、98.12%、99.50%、98.42%、97.90%、97.77%、99.11%、96.37%，RSD 值分别为 2.06%、1.64%、1.95%、1.78%、1.09%、1.06%、1.55%、1.70%、1.76%，说明该方法加样回收率试验结果良好。

2.6.8 样品的测定 取金花葵样品粉末(过 4 号筛) 0.2 g，精密称定，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下的色谱条件测定，计算样品中各成分的质量分数，结果见表 4。

表 4 16 批金花葵测定结果 ($n = 3$)

Table 4 Determination results of 16 batches of samples ($n = 3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								
	原儿茶酸	咖啡酸	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮素-8- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	杨梅素	槲皮素-3'- <i>O</i> -葡萄糖苷	槲皮素
S1	0.096	0.337	1.270	8.993	4.308	10.481	0.854	4.069	0.576
S2	0.067	0.273	0.820	6.110	2.440	6.384	0.918	2.518	0.429
S3	0.059	0.297	0.891	6.670	2.632	6.294	0.792	2.395	0.356
S4	0.087	0.296	0.849	5.032	2.723	6.769	0.730	2.704	0.710
S5	0.059	0.278	0.855	7.097	2.744	7.276	1.014	2.903	0.457
S6	0.084	0.290	0.831	5.549	2.726	6.612	0.754	2.610	0.657
S7	0.070	0.298	0.875	6.425	2.904	6.584	0.935	2.506	0.457
S8	0.057	0.295	0.807	7.614	2.755	6.257	1.102	2.873	0.354
S9	0.059	0.333	1.038	11.205	3.741	9.305	1.312	4.133	0.470
S10	0.065	0.290	0.811	7.900	2.685	6.721	1.024	2.936	0.367
S11	0.062	0.285	0.855	9.491	2.627	7.556	1.059	3.360	0.346
S12	0.070	0.280	0.739	9.151	2.517	6.973	0.939	3.057	0.340
S13	0.068	0.296	0.808	9.143	2.562	7.448	1.005	3.153	0.335
S14	0.083	0.317	0.891	7.996	2.613	8.511	0.811	2.771	0.554
S15	0.065	0.273	0.741	5.093	2.361	5.561	0.761	2.283	0.410
S16	0.100	0.317	0.990	7.363	2.989	7.561	0.772	2.791	0.673

2.7 聚类分析

以 16 批金花葵药材中 9 个化学成分含量为变量，运用 SPSS 19.0 数据统计软件，采用最小方差聚类方法，欧氏距离平方测度方法进行聚类分析，结果见图 4。结果表明，16 批金花葵药材可以聚为 2 类，S8~S13 聚为 1 类，其余聚为 1 类。

2.8 主成分分析

2.8.1 KMO 和 Bartlett's 检验 KMO 检验的统计量为 0.651，符合统计要求；Bartlett's 球形检验统计量为 0.000，适合主成分分析。

2.8.2 特征值和方差贡献率 相关系数的特征值和方差贡献率见表 5，碎石图见图 5，以特征值 > 1 为提取标准，不同批次金花葵有 2 个主成分，其特

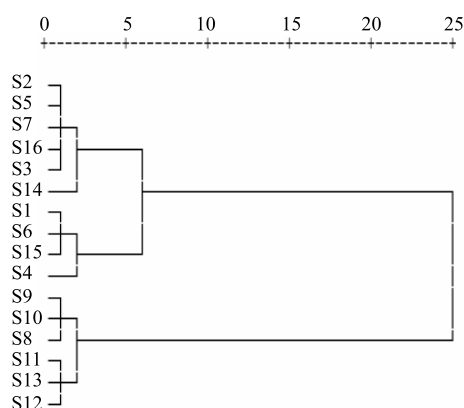


图 4 聚类分析结果

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis

表 5 特征值和方差贡献率

成分	初始特征值		
	合计	方差百分比/%	方差积累/%
1	5.056	56.180	56.180
2	2.867	31.853	88.034
3	0.394	4.374	92.408
4	0.304	3.374	95.782
5	0.208	2.308	98.090
6	0.088	0.977	99.067
7	0.047	0.519	99.586
8	0.025	0.281	99.868
9	0.012	0.132	100.000

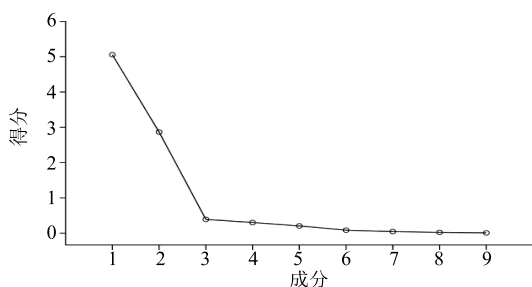


图 5 碎石图

Fig. 5 Scree plot

征值 $\lambda_1=5.056$, $\lambda_2=2.867$, 特征值 λ_1 的贡献率为 56.180%, λ_2 的贡献率为 31.853%, 累积贡献率为 88.034% > 85%, 故选取前 2 个主成分进行评价, 其代表金花葵中 9 个成分含量 88.034% 的信息量, 具有良好的代表性。

初始因子载荷矩阵见表 6, 以主成分为变量得到的载荷图见图 6, 可以看出, 第 1 主成分主要反映 6、5、3、2、8、4 成分的信息, 第 2 主成分主要反映 9、1、7 成分的信息。

表 6 因子载荷矩阵

成分	主因子	
	1	2
6	0.961	-0.005
5	0.936	0.070
3	0.914	0.236
2	0.907	0.180
8	0.889	-0.366
4	0.672	-0.647
7	0.321	-0.878
9	0.309	0.858
1	0.398	0.846

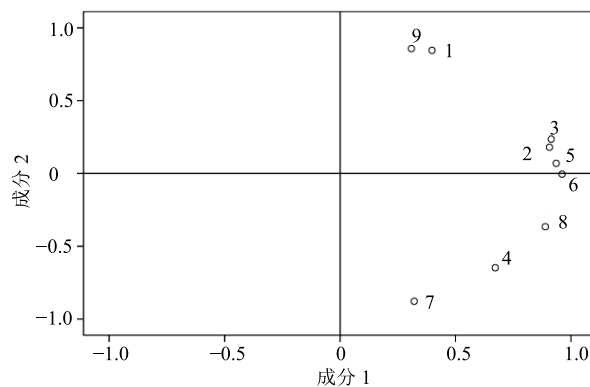


图 6 因子载荷图

Fig. 6 Load diagram

2.8.3 不同批次金花葵的综合评价 以选取的主成分方差贡献率为权重系数, 对不同批次金花葵主成分得分、综合得分进行分析, 并对其质量进行排名, 结果见表 7。

3 讨论

3.1 提取条件的选择

实验考察了加热回流提取和超声提取, 结果超声提取出峰较多, 比较了甲醇、无水乙醇的提取效率, 结果甲醇提取效率更好, 又考察了甲醇体积分数、超声时间、超声次数, 结果确定提取方法为纯甲醇超声 30 min, 1 次。

3.2 检测波长的选择

本实验通过 3D 紫外光谱图发现, 原儿茶酸在 260 nm 有吸收峰; 咖啡酸在 324 nm 有吸收峰; 芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素-8-O-葡萄糖醛酸苷、杨梅素、槲皮素-3'-O-葡萄糖苷、槲皮素在 360 nm 有吸收峰, 因此选择波长切换法, 0~8 min, 260 nm; 8~15 min, 324 nm; 15~60 min, 360 nm。

3.3 流动相系统的选择

本实验考察了甲醇-水、甲醇-0.08%磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.08%磷酸水溶液等流动相系统, 结果表明, 乙腈-0.08%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱时色谱峰峰形较好, 分离度较高, 因此选用乙腈-0.08%磷酸水溶液。

3.4 主成分分析

由主成分分析, 选择出对金花葵质量相关系数影响较大的几个成分, 通过特征值和方差贡献率表结合碎石图, 提取 2 个主成分, 其中第 1 主成分具有最大特征值, 其变量的权重值可以最大程度地反映化学成分与金花葵质量的相关性。结合因子载荷矩阵表与图, 第 1 主成分前 6 个权重最大变量为成

表 7 不同批次金花葵主成分得分、综合得分及排名

Table 7 Principal component score, composite score, and ranking of 16 batches of samples

编号	主成分 1	主成分 2	综合得分	排名
S1	5.828 0	1.511 4	3.755 6	1
S9	4.385 6	-2.581 8	1.641 4	2
S16	1.272 5	2.655 0	1.560 6	3
S14	0.764 2	1.183 6	0.806 3	4
S4	-0.711 7	2.746 7	0.475 1	5
S6	-0.999 1	2.214 0	0.143 9	6
S7	-0.704 5	0.293 2	-0.302 4	7
S13	-0.110 8	-1.476 5	-0.532 6	8
S11	0.107 4	-2.001 0	-0.577 0	9
S5	-0.746 5	-0.842 7	-0.687 8	10
S10	-0.733 1	-1.185 2	-0.789 4	11
S3	-1.431 3	-0.061 3	-0.823 6	12
S12	-0.948 4	-1.290 5	-0.943 9	13
S8	-0.882 4	-1.672 3	-1.028 4	14
S2	-1.979 6	-0.045 5	-1.126 6	15
S15	-3.110 2	0.553 0	-1.571 2	16

分 6、5、3、2、8、4，分别对应棉皮素-8-*O*-葡萄糖醛酸苷、异槲皮苷、芦丁、咖啡酸、槲皮素-3'-*O*-葡萄糖苷、金丝桃苷，说明这些成分对金花葵质量影响较大。

4 结论

本实验采用多波长切换 HPLC 法建立了不同批次金花葵指纹图谱，并对 9 个活性成分进行定量分析，从含量结果可以看出，不同产地金花葵中酚酸类含量均较低，黄酮类含量均较高。由相似度评价结果看出 16 批金花葵相似度良好，说明不同产地金花葵质量较稳定。由聚类分析结果可知，16 批金花葵聚成 2 类，S8~S13 聚为 1 类，为江苏、四川、安徽产地，其余聚为 1 类，为河南产地，说明不同产地金花葵在相似中存在一定差异性。运用主成分分析由综合得分对金花葵质量进行排名，由结果可知，河南唐河县所产金花葵综合得分较高，总体排名靠前。该研究采用的多波长 HPLC 指纹图谱结合化学计量分析法能够较全面地反映金花葵的整体质量。

参考文献

- [1] 张 建. 金花葵花总黄酮解热抗炎作用的实验研究 [J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(8): 763-764.
- [2] 卢 丹, 贾瑞波. 中药金花葵的研究进展 [J]. 中国药物评价, 2015, 32(2): 90-93.
- [3] 曹利华, 苗明三. 金花葵的现代研究与综合利用分析 [J]. 中医学报, 2016, 31(12): 1966-1968.
- [4] 张春燕, 杨 倩. 金丝桃苷预处理对心肌缺血再灌注性心律失常大鼠心肌 ATP 酶活性和 Cx43、Kir2.1 表达

的影响 [J]. 中成药, 2018, 40(2): 254-260.

- [5] 宋 雨, 胡一晨, 李 维, 等. 芦丁与槲皮素不同配比对大鼠体内芦丁药动学的影响 [J]. 中国药房, 2016, 28(7): 902-905.
- [6] 雷 鸣, 徐应淑, 孙静波, 等. 异槲皮素对叔丁基过氧化氢诱导的 L-02 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(6): 563-568.
- [7] 吕 娜, 刘 露, 李思蒙, 等. 棉皮素和棉皮苷体外抗氧化、保护 DNA 及阻断亚硝胺合成作用的比较 [J]. 毒理学杂志, 2016, 30(4): 292-296.
- [8] 林治鑫, 顾雪竹, 刘 珺. 高速逆流色谱结合 UNIFAC 数学模型分离纯化淡竹叶中的槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 23-28.
- [9] 王 博, 李德芳, 韩吉春, 等. 杨梅素对离体大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(12): 1455-1461.
- [10] 陈家全, 王 慧, 李冬玉, 等. 原儿茶酸在大鼠体内代谢产物的分析 [J]. 中成药, 2017, 39(3): 561-565.
- [11] 孙皓熠, 郝宝燕, 张浩超, 等. 咖啡酸研究概况 [J]. 食品与药品, 2017, 19(2): 151-155.
- [12] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [13] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [14] 邵镔钎, 李 丹, 蒋 攀, 等. 基于主成分及聚类分析的川明参的综合评价 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3389-3396.
- [15] 汪露露, 何丹丹, 王 满, 等. 基于指纹图谱与主成分分析相结合的复方虎杖方提取工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 278-282.