

基于指纹图谱结合化学模式识别绿萼梅质量标志物的评价研究

赵宏苏^{1,2,3}, 赵茹^{1#}, 乔金为⁴, 金传山^{1,2,3}, 王灿灿¹, 张伟^{1,2,3*}, 吴德玲^{1,2,3*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012
2. 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230012
3. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012
4. 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥 230061

摘要: 目的 利用化学模式识别技术对绿萼梅药材指纹图谱数据进行分析, 筛选特征性指标成分从而建立绿萼梅 Q-Marker 的定量分析策略, 为绿萼梅质量评价提供科学依据。方法 采用超高压液相色谱法建立 3 个产地绿萼梅的指纹图谱, 运用相似度分析、聚类分析、主成分分析和偏最小二乘判别分析等化学模式识别技术筛选出不同产地绿萼梅化学成分的特征成分作为绿萼梅 Q-Marker, 并定量分析。结果 30 批绿萼梅 UPLC 指纹图谱标定 8 个共有峰, 相似度在 0.816~0.969; 通过聚类分析、主成分分析和偏最小二乘判别分析较好的区分各产地绿萼梅, 综合分析筛选绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷作为绿萼梅 Q-Marker, 质量分数分别在 3.08%~4.71%、0.41%~0.71%、0.13%~0.25%、0.25%~0.38%。结论 通过指纹图谱结合化学模式识别技术的分析策略可快速有效的筛选绿萼梅 Q-Marker, 为绿萼梅质量评价提供参考。

关键词: 绿萼梅; 质量标志物; 定量指纹图谱; 化学模式识别技术; 绿原酸; 芦丁; 金丝桃苷; 异槲皮苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)05-1345-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.008

Evaluation of quality markers of *Mume Flos* based on fingerprint and chemical pattern recognition

ZHAO Hong-su^{1,2,3}, ZHAO Ru¹, QIAO Jin-wei⁴, JIN Chuan-shan^{1,2,3}, WANG Can-can¹, ZHANG Wei^{1,2,3}, WU De-ling^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Hefei 230012, China
3. Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology, Hefei 230012, China
4. Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China

Abstract: Objective To analyze the UPLC fingerprints data of *Mume Flos* using chemical pattern recognition technology, screen the characteristic components and perform quantitative analysis, so as to provide scientific basis for the quality evaluation of *Mume Flos*. **Methods** A total of 30 batches of *Mume Flos* samples from three production areas were collected, and the UPLC fingerprint of *Mume Flos* was established. The main characteristic peaks were identified by comparison with reference materials, and similarity analysis, cluster analysis, principal component analysis (PCA) and discriminant analysis by partial least square method (PLS-DA) were used to identify and analyze the characteristic components in *Mume Flos* from three producing areas, and the quantitative analysis was carried out. **Results** Eight common peaks were calibrated from UPLC fingerprints of 30 batches of *Mume Flos*, and the similarity was between 0.816—0.969. Through clustering analysis, PCA and PLS-DA, each producing area of *Mume Flos* was better distinguished. Chlorogenic acid, rutin, hyperin and isoquercitrin were screened as Q-Markers by comprehensive analysis, and the mass fractions were 3.08%—4.71%, 0.41%—0.71%, 0.13%—0.25% and 0.25%—0.38%, respectively. **Conclusion** The

收稿日期: 2021-07-09

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1707004); 安徽省自然科学基金资助项目 (2008085QH394)

作者简介: 赵宏苏, 女, 讲师, 从事中药质量评价及物质基础研究。E-mail: hongszhao@ahtcm.edu.cn

*通信作者: 张伟, 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: zhangwei@ahtcm.edu.cn

吴德玲, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事天然药物化学及中药物质基础研究。E-mail: dlwu7373@ahtcm.edu.cn

#并列第一作者: 赵茹, 女, 中药学专业, 从事中药质量评价研究。E-mail: 3473170553@qq.com

method of fingerprint combined with chemical pattern recognition technology can effectively screen the quality markers of *Mume Flos* from different producing areas, and provide a reference for the quality evaluation of *Mume Flos*.

Key words: *Mume Flos*; quality marker; quantitative fingerprint; chemical pattern recognition technology; chlorogenic acid; rutin; hyperoside; isoquercitrin

梅花为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾。《中国药典》2020 年版收录药用梅花分别有红梅花和白梅花^[1], 其中花萼灰绿色花瓣为黄白色者为白梅花, 又称绿萼梅, 主产于安徽各地, 为新安著名医家常用中药, 收录于《全国中草药汇编》《中药大辞典》, 为临床入药主要品种, 具有疏肝和中、化痰散结之功效, 主要用于唇上生疮、月经不调、肝胃气痛、郁闷心烦等症状^[2-4]。近年来国内外学者对绿萼梅化学成分研究表明其化学成分包括挥发油类、黄酮类、酚苷类、酯苷类、苯丙素类, 其中以绿原酸为代表的苯丙素类和以金丝桃苷为代表的黄酮类成分含量较高^[5-6]。有关绿萼梅质量评价研究, 目前文献报道较多的是多成分的含量测定, 而筛选的定量指标成分依据并未说明^[7-10]。因此如何获得区分不同产地绿萼梅质量差异、反映药材品质的质量标志物作为绿萼梅多指标成分含量的质量评价方法显得尤为重要^[11-12]。本实验以绿萼梅为研究对象, 通过 UPLC 指纹图谱对绿萼梅主要化学成分进行宏观整体表征, 采用化学模式识别技术对指纹图谱中提取共有峰的面积进行整合分析, 从而得到影响不同产地质量的特征化学成分并含量测定, 从而建立绿萼梅质量标志物 (Q-Marker) 以期为绿萼梅的质量标准研究和资源开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY H-CLASS UPLC (美国 Waters 公司, 真空脱气机、包括四元高压梯度泵、柱温箱、自动进样器、二极管阵列检测器、Empower2 色谱工作站); Milli-Q Advantage A10 一体式超纯水机 (美国 Milipore 公司); WL-100 型打粉机 (瑞安市威力制药机械厂); AB135-S 型十万分之一天平 (梅特勒-托利多有限公司); KQ-400KED 型高功率数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品绿原酸 (批号 CFN99116)、芦丁 (批号 CFN99642)、异槲皮苷 (批号 CFN9875) 均购自武汉天植生物技术有限公司; 金丝桃苷 (批号为 MUST-20052210) 购自成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$ 。分析纯甲醇购自上海苏懿化学试剂有限公司, 色谱纯甲醇、色谱纯乙腈均购自德国 Merck 公司, 甲酸 (色谱纯, 美国 Sigma 公司), 水为超纯水。

1.3 药材

绿萼梅药材采自安徽休宁、安徽庐江和安徽歙县, 共 30 批次。经安徽省食品药品检验研究院刘军玲中药师鉴定为蔷薇科植物梅 *P. mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾。绿萼梅样品来源见表 1。

表 1 绿萼梅样品信息

Table 1 Sample information of *Mume Flos*

| 批次 | 编号 | 产地 | 批次 | 编号 | 产地 |
|-----|----------|------|-----|----------|------|
| S1 | PM-XN-01 | 安徽休宁 | S16 | PM-LJ-16 | 安徽庐江 |
| S2 | PM-XN-02 | 安徽休宁 | S17 | PM-LJ-17 | 安徽庐江 |
| S3 | PM-XN-03 | 安徽休宁 | S18 | PM-LJ-18 | 安徽庐江 |
| S4 | PM-XN-04 | 安徽休宁 | S19 | PM-LJ-19 | 安徽庐江 |
| S5 | PM-XN-05 | 安徽休宁 | S20 | PM-LJ-20 | 安徽庐江 |
| S6 | PM-XN-06 | 安徽休宁 | S21 | PM-SX-21 | 安徽歙县 |
| S7 | PM-XN-07 | 安徽休宁 | S22 | PM-SX-22 | 安徽歙县 |
| S8 | PM-XN-08 | 安徽休宁 | S23 | PM-SX-23 | 安徽歙县 |
| S9 | PM-XN-09 | 安徽休宁 | S24 | PM-SX-24 | 安徽歙县 |
| S10 | PM-XN-10 | 安徽休宁 | S25 | PM-SX-25 | 安徽歙县 |
| S11 | PM-LJ-11 | 安徽庐江 | S26 | PM-SX-26 | 安徽歙县 |
| S12 | PM-LJ-12 | 安徽庐江 | S27 | PM-SX-27 | 安徽歙县 |
| S13 | PM-LJ-13 | 安徽庐江 | S28 | PM-SX-28 | 安徽歙县 |
| S14 | PM-LJ-14 | 安徽庐江 | S29 | PM-SX-29 | 安徽歙县 |
| S15 | PM-LJ-15 | 安徽庐江 | S30 | PM-SX-30 | 安徽歙县 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相 0.1%甲酸水溶液 (A)-0.1%甲酸乙腈溶液 (B), 流动相梯度洗脱程序为 0~5 min, 90%~85% A; 5~15 min, 85%~80% A; 15~20 min, 80%~75% A; 20~21 min, 75%~20% A; 21~25 min, 20%~20% A; 25~26 min, 20%~10% A; 26~32 min, 10%~90% A。体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 2 μL; 检测波长 355 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液制备 取绿萼梅样品粉末 (过四号筛) 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (250 W, 40 kHz) 30 min, 静置冷却, 称定质量, 加 50%甲醇补足失重, 混匀后过 0.22 μm 的微孔滤膜, 得续滤液作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液制备 分别取对照品绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷适量, 精密称定, 置量瓶中, 加入 50%的甲醇制成含绿原酸 71.2 μg/mL、芦丁 42.4 μg/mL、金丝桃苷 61.6 μg/mL、异槲皮苷 67.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一绿萼梅供试品 (S1) 溶液, 连续进样 6 次, 进样量 2 μL, 以绿原酸为参照峰 S, 计算其他各个特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 考察仪器的精密度, 各特征峰相对保留时间的 RSD 值分别为 0.14%、0.37%、0.38%、0.50%、0.43%、0.42%、0.45%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD 值分别为 0.25%、1.29%、0.13%、0.99%、1.47%、0.65%、1.33%, 均小于 2.0%。

2.3.2 重复性试验 取同一绿萼梅供试品 (S1), 按“2.2.1”项下制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样测定, 进样量 2 μL, 以绿原酸为参照峰 S, 计算其他特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 考察方法的重复性。各特征峰相对保留时间的 RSD 值分别为 0.18%、1.43%、0.64%、0.59%、0.69%、1.68%、0.89%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD 值分别为 0.16%、1.57%、0.36%、1.04%、0.92%、1.36%、1.24%, 均小于 2.0%。

2.3.3 稳定性试验 取同一绿萼梅供试品 (S1) 溶液, 分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 进样量 2 μL, 以绿原酸为参照峰, 计算其他特征峰

的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 考察供试品溶液的稳定性, 各特征峰相对保留时间的 RSD 值分别为 0.17%、0.72%、0.97%、1.01%、1.02%、1.12%、1.25%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD 值分别为 0.22%、0.27%、0.15%、0.62%、1.31%、0.57%、1.21%, 均小于 2.0%。

2.4 绿萼梅指纹图谱的建立

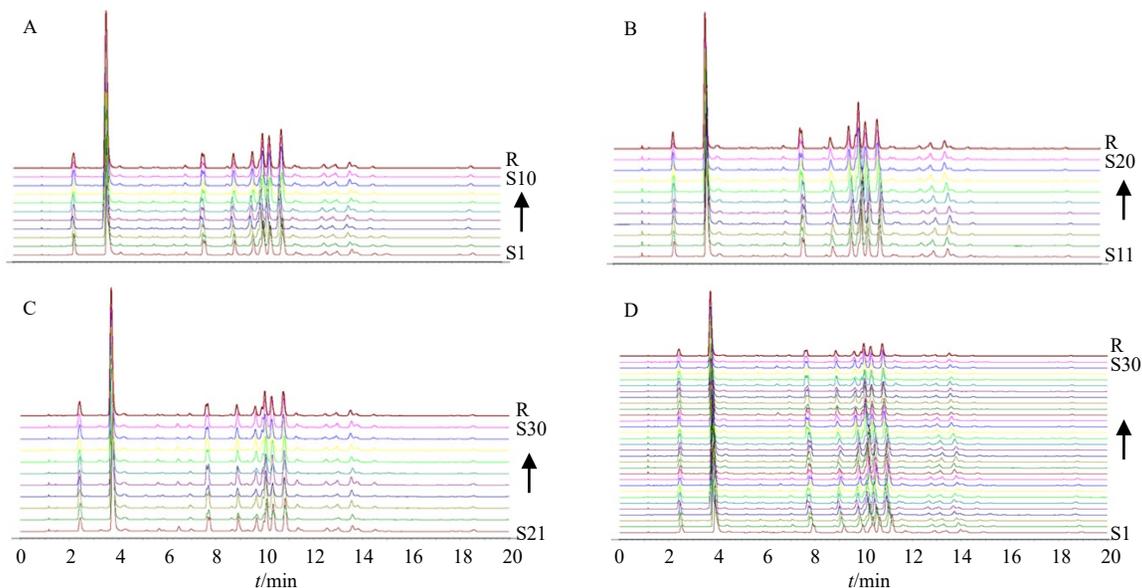
2.4.1 绿萼梅对照指纹图谱的生成 分别取 30 批绿萼梅样品约 0.5 g, 精密称定, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 将所得的 30 批绿萼梅样品 UPLC 图谱以 AIA 格式按产地分别导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版) 软件”, 以 S1 为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗的宽度默认为 0.1 min, 经过多点校正之后进行自动匹配, 生成 30 批绿萼梅药材的 UPLC 指纹图谱和对照图谱 (R), 见图 1、2。

2.4.2 特征峰的指认 30 批绿萼梅药材指纹图谱的共有峰有 8 个, 经与混合对照品色谱图镜像比对 (图 3), 指认其中 4 个主要特征峰: 2 号峰为绿原酸, 6 号峰为芦丁, 7 号峰为金丝桃苷, 8 号峰为异槲皮苷。

2.4.3 相似度评价 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本) 软件”对 30 批绿萼梅样品的指纹图谱进行相似度计算分析, 绿萼梅样品中绿原酸的出峰时间比较稳定, 且分离度较好, 因此选择绿原酸峰作为参照峰 (S), 其保留时间和峰面积为 1, 计算 30 批绿萼梅样品的共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 2.0%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 45%, 说明不同批次样品中各成分含量差异较大, 相对峰面积结果见表 2。30 批绿萼梅样品色谱图与对照指纹图谱的相似度在 0.816~0.969, 主要相似度小于 0.9 的样品为 S4、S6、S8、S16、S24, 表明各个产地绿萼梅质量具有不稳定现象, 这可能与绿萼梅半野生状态种植有关。相似度结果见表 3。

2.5 化学模式识别分析

2.5.1 聚类分析 以 30 批不同产地绿萼梅药材 UPLC 指纹图谱的 8 个共有峰的峰面积为原始数据, 生成 30×8 的阶数据矩阵, 运用 IBM SPSS Statistics 24.0 软件进行系统聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA), 采用组间连接的聚类方法, 以平方欧式距离作为测度, 结果见图 4。当分类距离 10 时, 显示 30 批样品共聚为 3 类, 其中来自休宁产地



A-休宁绿萼梅指纹图谱 B-庐江绿萼梅指纹图谱 C-歙县绿萼梅指纹图谱 D-30批绿萼梅指纹图谱, 下同
A-fingerprint of Xiuning *Mume Flos* B-fingerprint of Lujiang *Mume Flos* C-fingerprint of Shexian *Mume Flos* D-fingerprint of 30 batches of *Mume Flos*, same as below

图1 绿萼梅 UPLC 指纹图谱
Fig. 1 UPLC fingerprints of *Mume Flos*

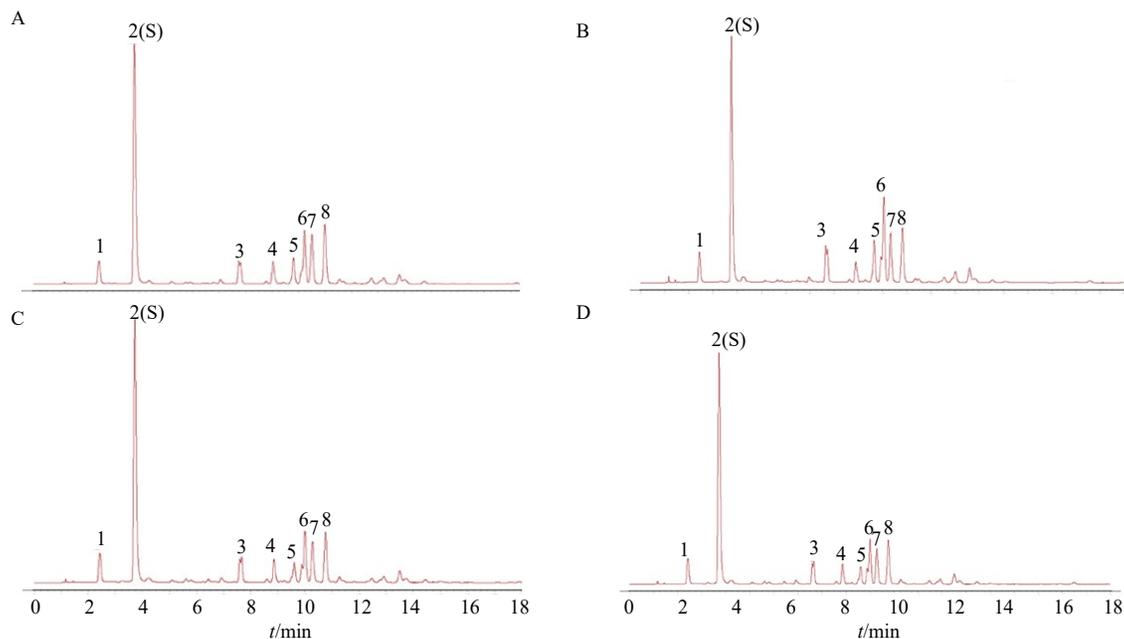


图2 绿萼梅 UPLC 对照图谱
Fig.2 UPLC reference spectrum of *Mume Flos*

的 S2、S7、S10 单独聚为一类，其余休宁产地和庐江地产的绿萼梅可大致聚为一类，歙县绿萼梅样品单独聚为一类，说明通过聚类分析可大致区分产地。
2.5.2 主成分分析 为了更好地将各不同产地绿萼梅进行区分，另采用主成分分析（principal component analysis, PCA）方法进行进一步分析，PCA 可实现高维数据的降维处理，少数几个主成分

（综合变量）即可代原始数据的大部分信息。同样以 30 批不同产地绿萼梅药材 UPLC 指纹图谱的 8 个共有峰的峰面积为原始数据，生成 30×8 的阶数据矩阵，运用 IBM SPSS Statistics 24.0 软件进行标准化处理，通过降维因子分析，计算特征值和累计方差贡献率，结果显示 KMO 值为 0.754，大于 0.5，代表各变量相关性较好，提取到 2 个主要成分，特征

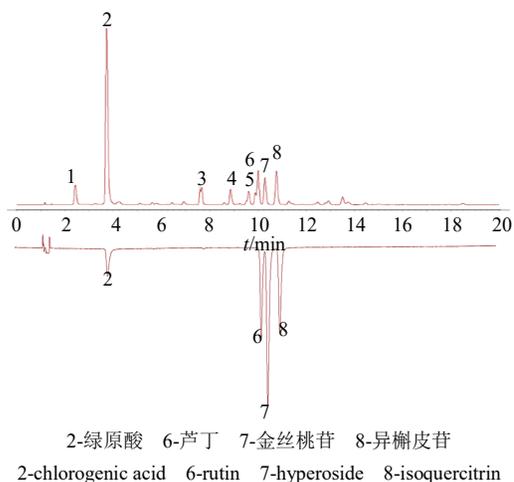


图3 样品色谱图与对照品色谱图镜像比对

Fig.3 Mirror comparison of sample chromatogram with reference chromatogram

值均大于 1，累积方差贡献率为 80.569%，能基本反映出样品的主要信息；以主成分因子变量绘制公因子碎石图，结果显示特征值较高的 2 个主成分因子的斜率更大，说明所提取的 2 个主成分可以最大程度地代表绿萼梅药材的整体质量特征。因此 2 个主成分因子可以作为绿萼梅药材的评价指标。将得到的成分矩阵进行正交旋转得到 8 个共有峰成分在 2 个主成分中的旋转矩阵，权重值越大表明该成分在决定样品区分中的作用越大。结果显示第 1 个主成分信息主要来自 1 号峰、2 号峰（绿原酸）、7 号峰（金丝桃苷）、8 号峰（异槲皮苷），第 2 个主成分信息主要来自 5 号峰、6 号峰（芦丁）。将绿萼梅样品的 8 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件绘制 30 批不同产地绿萼梅样品的主成分得分图，见图 5，

表 2 绿萼梅样品指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks in fingerprints of *Mume Flos*

| 批次 | 相对峰面积 | | | | | | | |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 1 号峰 | 2 号峰 | 3 号峰 | 4 号峰 | 5 号峰 | 6 号峰 | 7 号峰 | 8 号峰 |
| S1 | 0.120 379 | 1.000 000 | 0.198 749 | 0.175 754 | 0.113 448 | 0.349 682 | 0.223 206 | 0.350 424 |
| S2 | 0.102 026 | 1.000 000 | 0.112 313 | 0.095 539 | 0.077 590 | 0.258 613 | 0.161 991 | 0.258 819 |
| S3 | 0.100 270 | 1.000 000 | 0.145 350 | 0.134 607 | 0.100 392 | 0.304 202 | 0.210 175 | 0.282 370 |
| S4 | 0.123 324 | 1.000 000 | 0.160 865 | 0.105 779 | 0.052 276 | 0.324 510 | 0.133 445 | 0.254 722 |
| S5 | 0.112 127 | 1.000 000 | 0.165 567 | 0.115 730 | 0.079 845 | 0.219 451 | 0.199 588 | 0.317 605 |
| S6 | 0.115 265 | 1.000 000 | 0.152 000 | 0.111 282 | 0.075 683 | 0.281 750 | 0.197 009 | 0.290 778 |
| S7 | 0.114 632 | 1.000 000 | 0.114 254 | 0.105 252 | 0.082 131 | 0.204 324 | 0.175 590 | 0.323 007 |
| S8 | 0.102 166 | 1.000 000 | 0.191 745 | 0.133 278 | 0.090 776 | 0.328 833 | 0.201 332 | 0.326 286 |
| S9 | 0.110 010 | 1.000 000 | 0.155 924 | 0.143 630 | 0.155 658 | 0.258 821 | 0.239 840 | 0.349 099 |
| S10 | 0.102 015 | 1.000 000 | 0.154 253 | 0.111 183 | 0.088 983 | 0.278 424 | 0.178 428 | 0.296 527 |
| S11 | 0.112 342 | 1.000 000 | 0.267 230 | 0.108 744 | 0.154 625 | 0.444 330 | 0.186 389 | 0.278 700 |
| S12 | 0.112 110 | 1.000 000 | 0.252 120 | 0.107 692 | 0.137 473 | 0.514 099 | 0.188 503 | 0.210 497 |
| S13 | 0.113 518 | 1.000 000 | 0.156 307 | 0.078 973 | 0.130 189 | 0.449 440 | 0.165 321 | 0.259 834 |
| S14 | 0.111 664 | 1.000 000 | 0.177 302 | 0.106 033 | 0.139 793 | 0.434 214 | 0.185 017 | 0.275 645 |
| S15 | 0.100 964 | 1.000 000 | 0.222 262 | 0.056 640 | 0.150 201 | 0.508 541 | 0.129 994 | 0.220 062 |
| S16 | 0.118 514 | 1.000 000 | 0.252 600 | 0.101 350 | 0.140 040 | 0.448 395 | 0.172 217 | 0.274 273 |
| S17 | 0.119 845 | 1.000 000 | 0.222 703 | 0.114 736 | 0.131 093 | 0.502 763 | 0.204 123 | 0.215 658 |
| S18 | 0.118 119 | 1.000 000 | 0.231 653 | 0.115 857 | 0.152 520 | 0.502 034 | 0.148 249 | 0.286 745 |
| S19 | 0.113 225 | 1.000 000 | 0.194 050 | 0.102 607 | 0.126 182 | 0.390 306 | 0.161 062 | 0.252 531 |
| S20 | 0.121 261 | 1.000 000 | 0.315059 | 0.128 322 | 0.170 001 | 0.521 289 | 0.161 283 | 0.259 005 |
| S21 | 0.114 935 | 1.000 000 | 0.145 885 | 0.143 506 | 0.042 282 | 0.373 115 | 0.177 518 | 0.320 709 |
| S22 | 0.123 712 | 1.000 000 | 0.078 839 | 0.098 004 | 0.012 737 | 0.182 354 | 0.059 374 | 0.126 391 |
| S23 | 0.114 681 | 1.000 000 | 0.118 635 | 0.100 790 | 0.061 831 | 0.306 048 | 0.136 968 | 0.257 057 |
| S24 | 0.104 807 | 1.000 000 | 0.125 102 | 0.085 643 | 0.068 919 | 0.228 024 | 0.122 342 | 0.205 365 |
| S25 | 0.126 401 | 1.000 000 | 0.080 711 | 0.061 451 | 0.041 134 | 0.200 921 | 0.075 924 | 0.183 703 |
| S26 | 0.115 683 | 1.000 000 | 0.155 199 | 0.140 231 | 0.090 572 | 0.335 828 | 0.222 045 | 0.329 942 |
| S27 | 0.131 705 | 1.000 000 | 0.079 973 | 0.030 934 | 0.033 493 | 0.225 291 | 0.061 309 | 0.134 786 |
| S28 | 0.110 077 | 1.000 000 | 0.145 895 | 0.128 558 | 0.090 371 | 0.303 782 | 0.184 022 | 0.303 297 |
| S29 | 0.107 021 | 1.000 000 | 0.129 725 | 0.122 102 | 0.107 488 | 0.307 149 | 0.200 200 | 0.325 376 |
| S30 | 0.106 503 | 1.000 000 | 0.112 231 | 0.096 900 | 0.068 887 | 0.241 357 | 0.132 499 | 0.223 826 |
| RSD/% | 7.006 287 | 0 | 34.87 508 | 26.08 737 | 42.12 622 | 31.27 389 | 27.05 503 | 21.51 891 |

表 3 30批绿萼梅指纹图谱相似度评价结果

Table 3 Results of similarity evaluation of 30 batches of *Mume Flos* fingerprints

| 批次 | 相似度 | 批次 | 相似度 |
|-----|-------|-----|-------|
| S1 | 0.968 | S16 | 0.834 |
| S2 | 0.955 | S17 | 0.956 |
| S3 | 0.969 | S18 | 0.918 |
| S4 | 0.816 | S19 | 0.948 |
| S5 | 0.962 | S20 | 0.906 |
| S6 | 0.821 | S21 | 0.924 |
| S7 | 0.952 | S22 | 0.917 |
| S8 | 0.839 | S23 | 0.921 |
| S9 | 0.960 | S24 | 0.873 |
| S10 | 0.936 | S25 | 0.933 |
| S11 | 0.932 | S26 | 0.911 |
| S12 | 0.926 | S27 | 0.912 |
| S13 | 0.918 | S28 | 0.904 |
| S14 | 0.935 | S29 | 0.923 |
| S15 | 0.930 | S30 | 0.961 |

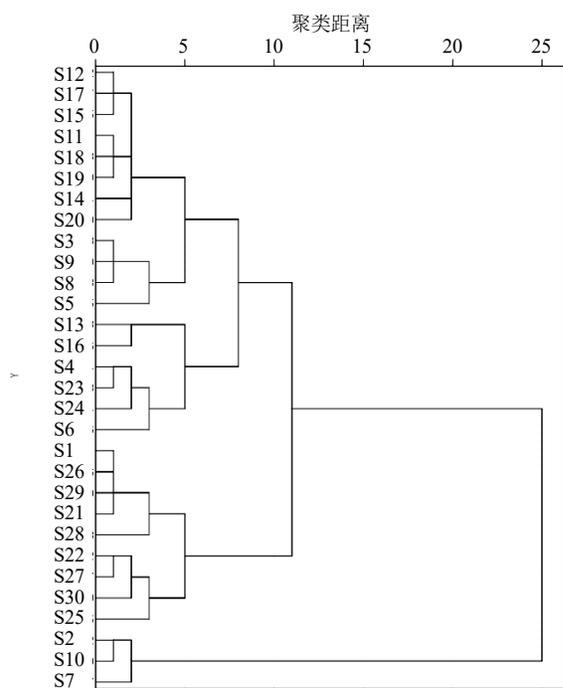


图 4 绿萼梅样品聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis diagram of *Mume Flos* samples

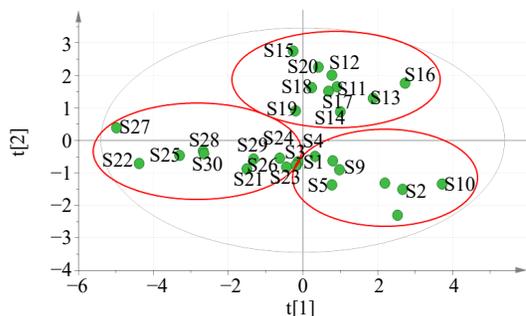


图 5 绿萼梅 PCA 得分图

Fig.5 PCA scores of of *Mume Flos*

结果显示 2 个主成分能反映不同产地绿萼梅的主要特征, 提示不同产地在化学成分含量上存在差异。

2.5.3 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 为了更好地观察不同产地样本间的组内差异, 在 PCA 分析的基础上进一步采用 SIMCA 14.1 软件进行 PLS-DA 方法进一步分析。在建立的偏最小二乘判别分析模型中 $R_{2X}(\text{cum})=8.847$, $R_{2Y}(\text{cum})=0.737$, $Q^2(\text{cum})=0.721$, 均大于 0.5, 说明建立的 PLS-DA 模型解释率和预测力可靠、良好。PLS-DA 得分图及 3D 图见图 6、7。结果结果显示 30 批样品分为 3 组, 3 个产地各为一组, 结合变量重要性投影值(variable importance in projection, VIP) (图 8) 可知 $VIP>1$ 的色谱峰有 1、5 号峰 (未知), 说明 1、5 号峰代表的化学成分是不同产地绿萼梅样品的差异性标志物。

2.6 绿萼梅 Q-Marker 的含量测定

通过化学模式识别技术客观量化分析, 由 PCA 分析得知指纹图谱中 1、2 (绿原酸)、7 (金丝桃苷)、

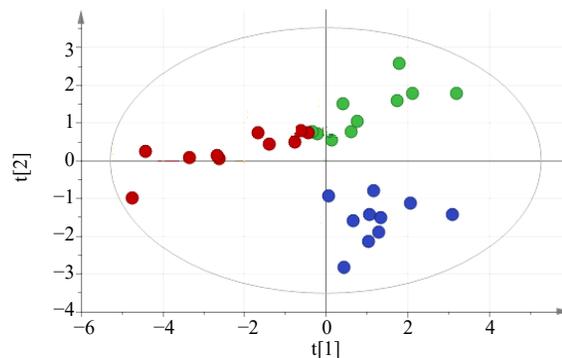


图 6 绿萼梅样品 PLS-DA 得分图

Fig. 6 PLS-DA scores of *Mume Flos*

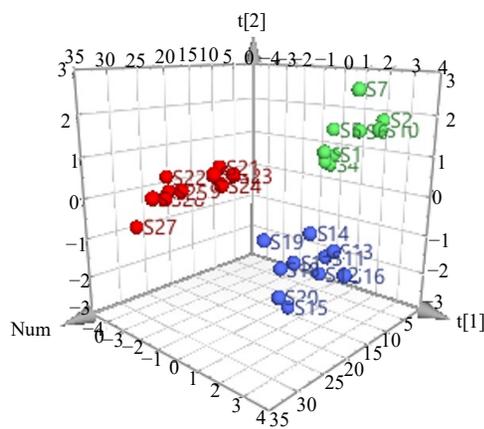


图 7 绿萼梅样品 PLS-DA 分析 3D 图

Fig. 7 3D image of *Mume Flos* by PLS-DA

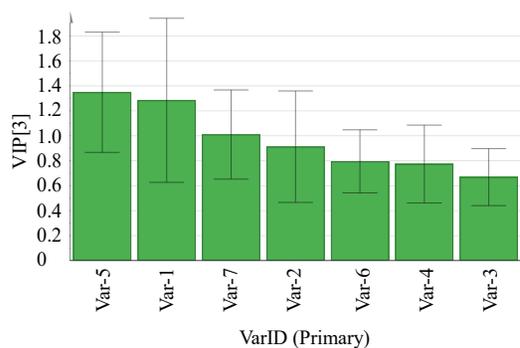


图 8 30 批绿萼梅样品的 PLS-DA 的 VIP 图

Fig. 8 VIP value from PLS-DA load diagram of 30 batches of *Mume Flos*

8 (异槲皮苷) 以及 5、6 号峰 (芦丁) 是影响不同产地绿萼梅质量的特征化学成分。PLS-DA 结果指示 1、5 号峰的 VIP > 1, 说明不同产地该含量差异较大, 是产地的差异性特征 Q-Marker, 根据 Q-Marker 的“五要素”要求, 为体现中药成分的专属性、传递性^[13-14], 1、5 号峰不适合作为绿萼梅质量标准控制的特征指标。再结合绿萼梅样品相对峰面积结果 (表 2) 得知, 绿原酸 (2 号峰)、芦丁 (6 号峰)、金丝桃苷 (7 号峰)、异槲皮苷 (8 号峰) 在各产地绿萼梅样品中含量较高且稳定。综上, 本实验筛选绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷作为绿萼梅特征 Q-Marker 进行含量测定。

2.6.1 线性关系考察 精密吸取各对照品储备液适量, 使用 50% 甲醇逐级稀释配制成 6 个对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算线性回归方程和相关系数。结果见表 4。

2.6.2 精密度试验 取混合对照品, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 测得绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷峰面积的 RSD 值分别为 1.7%、2.9%、1.8%、0.73%, 结果表明仪器精密度良好。

表 4 对照品的线性方程、相关系数和线性范围

Table 4 Linear equation, correlation coefficient and linear range of reference substance

| 对照品 | 线性方程 | r | 线性范围/(mg·mL ⁻¹) |
|------|---------------------|---------|-----------------------------|
| 绿原酸 | Y=104 498 X+6 707.9 | 0.999 7 | 0.014~0.712 |
| 芦丁 | Y=22 049 X-624.7 | 0.999 1 | 0.008~0.424 |
| 金丝桃苷 | Y=127 276 X-1 871.4 | 0.999 3 | 0.012~0.616 |
| 异槲皮苷 | Y=238 816 X+1 467.9 | 0.999 8 | 0.013~0.670 |

2.6.3 重复性试验 取 S1 样品共 6 份, 按“2.2.1”项下制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样测定, 测得绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷质量分数的 RSD 值分别为 1.6%、2.6%、2.2%、1.0%, 表明该方法的重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 取混合对照品, 分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 测得绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷峰面积的 RSD 值分别为 1.9%、2.9%、1.8%、0.73%, 结果表明仪器精密度良好。

2.6.5 加样回收率试验 取测定的 S1 号梅花样品粉末 6 份各 0.2 g, 精密称定, 分别加入等量的绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷对照品溶液, 按“2.2.2”项制备供试液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷加样回收率分别为 88.73%、109.1%、87.34%、97.15%, RSD 分别为 3.1%、4.7%、4.3%、1.9%。

2.6.6 样品含量测定 根据“2.2.2”项下方法制备绿萼梅药材供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录数据, 测得绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的百分含量, 具体结果见表 5。由结果可知, 30 批绿萼梅样品中绿原酸 (大于 3.0%) 及金丝桃苷和异槲皮苷总量 (大于 0.35%) 达到《中国药典》2020 年版要求, 通过比较 3 个产地绿萼梅样品中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷含量无显著性差异, 说明这 4 种特征成分在绿萼梅中含量较高且稳定。

3 讨论

本实验在《中国药典》2020 年版和文献的梯度洗脱方法^[15]的基础上进行优化, 考察了 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈、0.05% 磷酸水-0.05% 磷酸乙腈、0.1% 甲酸水-乙腈 3 种流动相体系, 结果发现以 0.1% 甲酸水 (A) -0.1% 甲酸乙腈 (B) 为流动相时, 样品的分离效果较好, 因此选择 0.1% 甲酸水 (A) -0.1% 甲酸乙腈 (B) 作为流动相。实验参考文献对 254、300、355 nm 这 3 种波长进行考察, 结果发现在 355 nm 波长下图谱的目标成分分离较好且较小峰金丝桃苷的响应值较高, 因此选择 355 nm 作为检测波长。

近些年利用中药指纹图谱结合化学计量学方法分析中药样品的差异, 在中药质量评价研究较为广泛应用^[16-20]。本实验运用相似度评价、PCA、HCA 和 PLS-DA 的化学计量学方法对不同产地绿萼梅质

表5 30批绿萼梅样品中质量标志物的含量
Table 5 Contents of Q-Markers in *Mume Flos*

| 批次 | 绿原酸/% | 芦丁/% | 金丝桃苷/% | 异槲皮苷/% |
|-----|-------|------|--------|--------|
| S1 | 3.65 | 0.47 | 0.15 | 0.28 |
| S2 | 3.44 | 0.36 | 0.17 | 0.33 |
| S3 | 3.75 | 0.49 | 0.2 | 0.29 |
| S4 | 4.25 | 0.45 | 0.21 | 0.38 |
| S5 | 4.53 | 0.43 | 0.19 | 0.35 |
| S6 | 4.32 | 0.51 | 0.24 | 0.31 |
| S7 | 3.28 | 0.41 | 0.22 | 0.32 |
| S8 | 4.63 | 0.59 | 0.16 | 0.22 |
| S9 | 4.16 | 0.48 | 0.23 | 0.27 |
| S10 | 3.71 | 0.46 | 0.18 | 0.25 |
| S11 | 3.72 | 0.42 | 0.13 | 0.33 |
| S12 | 4.29 | 0.57 | 0.14 | 0.35 |
| S13 | 3.51 | 0.66 | 0.23 | 0.29 |
| S14 | 3.55 | 0.58 | 0.19 | 0.37 |
| S15 | 3.39 | 0.69 | 0.22 | 0.29 |
| S16 | 3.88 | 0.51 | 0.18 | 0.31 |
| S17 | 4.26 | 0.60 | 0.25 | 0.36 |
| S18 | 4.03 | 0.57 | 0.23 | 0.34 |
| S19 | 4.71 | 0.54 | 0.21 | 0.28 |
| S20 | 3.69 | 0.52 | 0.19 | 0.27 |
| S21 | 3.38 | 0.61 | 0.24 | 0.35 |
| S22 | 4.07 | 0.33 | 0.16 | 0.30 |
| S23 | 3.66 | 0.48 | 0.19 | 0.37 |
| S24 | 3.49 | 0.55 | 0.25 | 0.35 |
| S25 | 4.16 | 0.42 | 0.18 | 0.36 |
| S26 | 3.95 | 0.45 | 0.22 | 0.31 |
| S27 | 3.72 | 0.49 | 0.21 | 0.27 |
| S28 | 3.08 | 0.46 | 0.17 | 0.34 |
| S29 | 3.53 | 0.57 | 0.19 | 0.29 |
| S30 | 3.61 | 0.41 | 0.22 | 0.31 |

量进行研究。所建立的 30 批绿萼梅样品 UPLC 指纹图谱有 8 个共有峰, 指认了绿原酸、芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷 4 个特征峰。相似度评价结果显示 30 批样品的相似度在 0.816~0.969, 其中休宁有 3 个批次的样品相似度低于 0.9, 休宁的绿萼梅为半野生种植, 存在地理分布差异, 导致休宁绿萼梅质量不太稳定, 部分相似度偏低。在聚类分析中, 3 个产地绿萼梅样品聚为 3 类, 其中庐江绿萼梅大部分聚为一类, 歙县绿萼梅大部分聚为一类, 休宁的较为分散, 质量不稳定, 表明 3 个产地绿萼梅样品化学成分既有相似性又有差异性, 造成差异性的原因可能与产地、环境、地理位置有关, 与相似度结果一致。在 PCA 和 PLS-DA 分析中可看出 3 个产地的绿萼梅样品均位于空间的不同位置, 表明不同产地绿萼梅化学成分存在一定的差异, 同时筛选出绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷作为绿萼梅药材的

Q-Marker, 其中绿原酸及金丝桃苷和异槲皮苷也是《中国药典》2020 年版中梅花的含量测定检测指标, 说明研究建立的筛选中药特征性标志物的方法比较全面科学, 由含量检测结果可知绿萼梅中芦丁的含量比金丝桃苷、异槲皮苷黄酮总量高, 可以将芦丁引入梅花的质量控制指标。

4 小结

通过 UPLC 指纹图谱对绿萼梅主要化学成分进行宏观整体表征, 可较为全面的反映绿萼梅化学信息, 采用化学模式识别技术对指纹图谱中提取共有峰峰面积进行整合分析, 同时结合中药 Q-Marker “五要素” 要求, 筛选可作为绿萼梅质量评价的 Q-Marker, 为绿萼梅质量评价标准研究和资源开发利用提供参考, 同时该分析策略可为中药质量标准研究提供研究思路。

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. 2020: 324.
- [2] 张清华. 白梅花化学成分研究及生物活性预试 [D]. 济南: 山东大学, 2008.
- [3] 王灿灿, 张伟, 吴德玲, 等. 白梅花化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 广州化工, 2017, 45(24): 40-42.
- [4] 陈明珠, 陈静, 黄幼霞, 等. 绿萼梅总黄酮对小鼠抑郁的改善作用 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(2): 120-124.
- [5] 王灿灿, 张伟, 吴德玲, 等. 绿萼梅乙酸乙酯部位的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 347-351.
- [6] Fujimoto K, Nakamura S, Matsumoto T, *et al.* Medicinal flowers. XXXVIII. structures of acylated sucroses and inhibitory effects of constituents on aldose reductase from the flower buds of *Prunus mume* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2013, 61(4): 445-451.
- [7] 张伟, 郭晶晶, 郑太华, 等. 不同产地梅花中绿原酸含量测定 [J]. 安徽中医学院学报, 2013, 32(6): 89-91.
- [8] 李国卫, 吴文平, 何民友, 等. 一测多评法用于梅花多成分含量测定的适用性研究 [J]. 中医药导报, 2020, 26(11): 42-45.
- [9] 张晓霞, 房经贵, 陈世忠, 等. 高效液相色谱法测定中药梅花中绿原酸、芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(2): 107-109, 156.
- [10] 魏梅, 朱德全, 陈向东, 等. 梅花配方颗粒中 4 种黄酮类成分含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 49-51.
- [11] 赵鸿鹏, 许浚, 张洪兵, 等. 基于质量传递与溯源的中药质量标志物 (Q-Marker) 的发现策略及应用 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2557-2565.

- [12] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3669-3676.
- [13] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, et al. A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [14] 刘耀晨, 许浚, 张洪兵, 等. 基于化学成分特有性的质量标志物发现策略及应用 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2548-2556.
- [15] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 187-196, 186.
- [16] 王灿灿, 杨沫, 吴德玲, 等. 绿萼梅药材超高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38(1): 93-96.
- [17] 陶晓赛, 龚海燕, 谢彩侠, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地盾叶薯蓣药材质量 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 227-233.
- [18] 戚华文, 徐鑫, 温柔, 等. 基于化学模式识别技术的枳实 HPLC 定量指纹图谱研究 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 72-78.
- [19] 林丽, 李欢欢, 谢辉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的旋覆花药材质量评价研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1751-1758.
- [20] Meng Z, Huang Y, Wang L J, et al. Quality evaluation of *Panax notoginseng* using high-performance liquid chromatography with chemical pattern recognition [J]. *Sep Sci Plus*, 2020, 3(6): 200-206.

[责任编辑 时圣明]