

基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究

刘天亮^{1,2}, 杨林林^{1,2*}, 董诚明^{1,2*}, 高启国³, 齐大明^{1,2}, 徐晓丽³, 李江华³

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 河南省道地药材生态种植工程技术研究中心, 河南 郑州 450046

3. 河南太龙药业股份有限公司, 河南 郑州 450001

摘要: **目的** 建立道地产区及不同主产区金银花 HPLC 指纹图谱, 结合化学计量学评价为金银花质评质控体系的构建及其潜在质量标志物的探索提供参考和依据。**方法** 采集河南、山东、河北产区的金银花样品, 优化提取与检测方法, 建立最佳 HPLC 指纹图谱条件。色谱柱: Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-0.2%甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱条件, 进样体积 10 μL; 检测波长 245 nm; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 38 °C。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723) 对 HPLC 图谱数据进行共有峰确定、相似度评价。采用 SIMCA-P 14.1 软件进行聚类分析 (cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。**结果** 3 个产地金银花 HPLC 指纹图谱共匹配 45 个共有峰成分, 标示出 16 个色谱峰。HCA 与 PCA 结果可将河南产区与山东、河北产区金银花样品完全区分。OPLS-DA 分析结果表明异绿原酸 B、香豆酸、莫诺苷、芦丁、新绿原酸、断氧化马钱苷等物质含量在河南产金银花样品中普遍高于山东、河北产金银花; 绿原酸、异绿原酸 C、木犀草苷在山东产金银花样品中普遍高于河南、河北产金银花; 忍冬苷在河北产金银花样品中普遍高于河南、山东产金银花。**结论** 所建立的金银花 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的方法, 可应用于金银花质量标准的研究与开发及其潜在质量标志物和道地因子的探索。

关键词: 金银花; 指纹图谱; 主成分分析; 正交偏最小二乘法判别分析; 异绿原酸 B; 香豆酸; 莫诺苷; 芦丁; 新绿原酸; 忍冬苷; 断氧化马钱苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4833-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.027

Study on HPLC fingerprint of *Lonicera Japonica Flos* from different areas based on chemical pattern recognition

LIU Tian-liang^{1,2}, YANG Lin-lin^{1,2}, DONG Cheng-ming^{1,2}, GAO Qi-guo³, QI Da-ming^{1,2}, XU Xiao-li³, LI Jiang-hua³

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Henan Provincial Ecological Planting Engineering Technology Research Center of Authentic Medicinal Materials, Zhengzhou 450046, China

3. Taloph Pharmaceutical Co., Ltd, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints of *Lonicera Japonica Flos* from different producing areas, in order to provide reference and basis for the construction of quality evaluation system and the exploration of potential quality markers of *Lonicera Japonica Flos* combined with chemometrics. **Methods** The extraction and detection methods of *Lonicera Japonica Flos* from Henan, Shandong and Hebei were optimized, and the optimal HPLC fingerprint conditions were established. Chromatographic column: symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); mobile phase: acetonitrile (a)-0.2% formic acid aqueous solution (b); gradient elution conditions; injection volume: 10 μL; detection wavelength: 245 nm; flow rate: 0.5%. The column temperature was 38 °C. HPLC fingerprint similarity evaluation system (2012.130723) was used to determine common peaks and evaluate similarity. Cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were performed by SIMCA-P 14.1 software. **Results** The HPLC fingerprints of *Lonicera Japonica Flos* from three regions matched 45 common peaks and 16 peaks were identified. The results of HCA and PCA can completely distinguish the samples from Shandong and Hebei provinces. The results of OPLS-DA showed that the samples from Henan Province contained the most isochlorogenic acid B, cumalic acid, morroniside; troxerutin, neochlorogenic acid and secoxyloganin; The samples from Shandong Province contained the most chlorogenic acid,

收稿日期: 2021-12-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603232); 河南中医药大学博士科研基金资助项目 (BSJJ2015-13)

作者简介: 刘天亮, 在读硕士, 专业方向为中药材规范化种植、中药资源与质量评价。E-mail: 974809832@qq.com

*通信作者: 杨林林, 讲师, 主要从事药用植物栽培生理与生态学研究。Tel: 13180883352 E-mail: yangll-hatcm@hactcm.edu.cn

董诚明, 教授, 主要从事药用植物学、中药资源学研究。Tel/Fax: (0371)86535313 E-mail: dcm663@sina.com

isochlorogenic acid C and cynaroside; the samples from Hebei Province contained the most xylostein. **Conclusion** The HPLC fingerprint of *Lonicera Japonica Flos* combined with chemometrics can be applied to the research and development of the quality standard of *Lonicera Japonica Flos* and the exploration of its potential Q-Markers and daodi factors.

Key words: *Lonicera Japonica Flos*; fingerprint; PCA; OPLS-DA; isochlorogenic acid B; cumalic acid; morroniside; troxerutin; neochlorogenic acid; secoxyloganin; cynaroside

金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 因其临床疗效显著、使用范围较广, 素有“植物抗生素”的美誉, 具有较高的药用价值和经济价值, 且收录于国家卫健委发布的药食同源目录。在“保健养生”的消费需求和国家政策的共同推动下, 作为特殊农业范畴的中药生态农业, 成为了中药 GAP 的未来趋势, 加之农业部农业供给侧结构性改革规划, 我国政府愈发重视传统道地药材生产技术和中药材产地、品质、市场等相关问题^[1-3]。

中药材大多是药用植物, 易受生长环境、土壤、气候等资源禀赋的影响。中医历来十分重视道地药材, 对道地药材的研究不仅推动了中药鉴定学和生药学的发展, 更是促进了中药材优质优价、高产高效的发展^[4-5]。近 20 年, 我国中药材种植面积稳中有升, 中药的质量控制和评价也逐渐演变成为制约中药现代化发展的关键因素之一, “产-学-研”等关键角色的联系不够紧密甚至脱节, 导致市场部分中药材存在着产量、品质、价格等方面良莠不齐的现象, 不同程度上影响了中医临床使用的疗效。另外, 以中药材为原料的食品、保健品、化妆品消费快速增长, 生产安全面临严峻挑战。

中药质控的现行目标是保证中药材或制剂的一致性和稳定性, 而指纹图谱技术可分析中药中有效成分和无效成分的种类和含量分布的信息, 符合中医中药整体性和模糊性的特点, 是实现鉴别中药真实性、评价质量一致性和产品稳定性的可行模式。至今, 色谱指纹图谱在中药质量控制体系的各个方面物尽其用, 包括真实性鉴定(化学指纹图谱)、有效性评价(谱效学、生物指纹图谱、代谢指纹图谱)和安全性评价^[6-8]。同时, 模式识别技术是化学计量学的重要组成部分, 也是筛选中药质量标志物的重要数学方法, 而指纹图谱结合模式识别方法在中药鉴别、定性表征、质量控制、组效关系等研究中均具有广泛应用^[9-10]。

目前, 已建立的金银花色谱指纹图谱多存在着样本单一不具有代表性、色谱基线漂移、分离峰数较少甚至错误指认等方面的缺点, 样品提取方法及色谱检测方法仍有极大的优化空间^[11-15]。因此, 建立一种重

现性良好、稳定性可靠、分辨率清晰, 同时适用于不同产地金银花的品质评价或不同种属真伪鉴别的指纹图谱分析方法迫在眉睫。

本研究采集了河南、河北、山东 3 大产区的 65 个批次的金银花样品, 优化了提取与检测方法, 建立了基线平稳、稳定性好、分辨率高的 HPLC 指纹图谱, 并对金银花中有机酸类、环烯醚萜类、黄酮类等共 16 种化学成分进行归属, 结合化学模式识别技术, 客观地反映了药材品质的整体性与差异性, 为金银花道地因子的研究、评价体系的构建, 市场真伪的鉴别提供了基础手段, 同时对金银花质量标志物的探索提供了新的思路与方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695-2489 型高效液相; Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱, 美国沃特斯公司; IMS105DU 型万分之一天平, 瑞士梅特勒-托利多集团; KQ-500DV 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FW135 型粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司等。

1.2 材料

绿原酸(批号 PS0131-0025) 成都普思生物科技股份有限公司; 咖啡酸(批号 MUST-16060613)、莫诺昔(批号 MUST-15102911), 成都曼思特生物科技有限公司; 断马钱子酸(批号 DST190719-136)、忍冬昔(批号 DST190708-048)、异槲皮素(批号 DST191012-006), 成都德思特生物技术有限公司; 断氧化马钱昔(批号 P27N8L49194)、木犀草昔(批号 Y26A9H59973), 上海源叶生物科技有限公司; 新绿原酸(批号 wkq18030107)、异绿原酸 A(批号 wkq18041207)、异绿原酸 B(批号 wkq19012301)、异绿原酸 C(批号 wkq18050905)、阿魏酸(批号 wkq18042309)、芦丁(批号 wkq16101104)、当药昔(批号 wkq18042610), 四川省维克奇生物科技有限公司。所用对照品质量分数均≥98%; 甲醇、乙腈为色谱级, 水为超纯水, 其余均为分析纯。

65 批金银花样品取自于河南、山东、河北各地, 详细信息见表 1, 经河南中医药大学药学科董诚明教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* Thunb.。

表 1 金银花样品来源信息
Table 1 Source information of *Lonicerae Japonicae* Flos samples

序号	编号	采集地	东经	北纬
1	HN1	新乡市封丘县陈固镇李马台村	114°18'54.367"	35°8'6.007"
2	HN2	新乡市封丘县陈固镇付固村	114°20'7.343"	35°9'5.195"
3	HN3	新乡市封丘县陈固镇东守宫村	114°21'21.776"	35°8'5.348"
4	HN4	新乡市封丘县陈固镇后河村	114°21'44.298"	35°10'11.114"
5	HN5	新乡市封丘县陈固镇梅口村	114°19'59.376"	35°10'11.143"
6	HN6	新乡市封丘县陈固镇西守宫村	114°21'21.776"	35°8'5.348"
7	HN7	新乡市封丘县陈固镇北邢庄村	114°19'27.599"	35°9'24.588"
8	HN8	新乡市封丘县居厢镇冉固村	114°28'2.996"	35°8'0.172"
9	HN9	新乡市封丘县居厢镇西辛安村	114°27'38.441"	35°7'3.22"
10	HN10	新乡市封丘县居厢镇安上集村	114°23'8.344"	35°9'20.812"
11	HN11	新乡市封丘县荆隆宫乡东大宫村	114°22'26.155"	34°57'1.663"
12	HN12	新乡市封丘县荆隆宫乡西大宫村	114°21'49.792"	34°56'55.799"
13	HN13	新乡市封丘县陈桥镇李七寨村	114°23'18.586"	34°57'1.336"
14	HN14	新乡市封丘县城关乡前大章村	114°22'43.788"	35°0'21.287"
15	HN15	新乡市封丘县王村乡前方庄村	114°23'34.159"	35°3'10.379"
16	HN16	新乡市封丘县王村乡火王庄村	114°23'20.346"	35°3'41.112"
17	HN17	新乡市封丘县黄德镇贾庄村	114°28'25.684"	35°11'59.784"
18	HN18	新乡市封丘县黄德镇贾庄村	114°28'25.684"	35°11'59.784"
19	HN19	新乡市封丘县黄德镇贾庄村	114°28'25.684"	35°11'59.784"
20	HN20	新乡市封丘县黄德镇西于村	114°27'50.8"	35°12'20.408"
21	HN21	新乡市封丘县黄德镇西于村	114°27'50.8"	35°12'20.408"
22	HN22	新乡市封丘县黄德镇大张庄村	114°27'9.986"	35°12'28.332"
23	HN23	新乡市封丘县黄德镇大张庄村	114°27'9.986"	35°10'29.752"
24	HN24	新乡市封丘县黄德镇后老岸村	114°23'48.332"	35°11'57.311"
25	HN25	新乡市封丘县黄德镇后老岸村	114°23'48.332"	35°11'57.311"
26	HN26	新乡市封丘县黄德镇梁庄	114°27'4.025"	35°11'14.532"
27	HN27	新乡市封丘县黄德镇小石桥村	114°28'48.698"	35°11'45.143"
28	HN28	新乡市封丘县黄德镇梁古寺村	114°28'45.347"	35°12'28.332"
29	HN29	郑州市新密市五指岭	113°23'25.584"	34°32'22.272"
30	HN30	新乡市原阳县齐街镇瓜李村	114°13'30.295"	35°2'58.279"
31	HN31	辉县市西平罗乡梨园沟村	113°42'30.064"	35°42'43.096"
32	SD1	临沂市平邑县铜石镇金银坡村	117°39'42.851"	35°19'41.675"
33	SD2	临沂市平邑县流峪镇车庄村	117°36'46.055"	35°20'23.327"
34	SD3	临沂市平邑县流峪镇车庄村	117°36'46.055"	35°20'23.327"
35	SD4	临沂市平邑县流峪镇车庄村	117°36'46.055"	35°20'23.327"
36	SD5	临沂市平邑县流峪镇车庄村	117°36'46.055"	35°20'23.327"
37	SD6	临沂市平邑县郑城镇郑城村	117°39'53.042"	35°15'53.352"
38	SD7	临沂市平邑县郑城镇小魏庄村	117°38'35.92"	35°11'48.631"
39	SD8	临沂市平邑县郑城镇后水湾村	117°39'5.087"	35°18'8.568"
40	SD9	临沂市平邑县郑城镇四合村	117°39'52.052"	35°15'54.616"
41	SD10	临沂市平邑县郑城镇南杨庄村	117°40'42.672"	35°14'35.088"
42	SD11	临沂市平邑县郑城镇北杨庄村	117°40'59.948"	35°19'12.259"
43	SD12	临沂市平邑县郑城镇上崇圣村	117°39'9.864"	35°14'15.367"
44	SD13	临沂市平邑县郑城镇下崇圣村	117°39'34.639"	35°14'8.02"
45	SD14	临沂市平邑县郑城镇桃峪村	117°41'51.968"	35°18'8.183"
46	SD15	临沂市平邑县郑城镇桃峪村	117°41'51.968"	35°18'8.183"
47	SD16	临沂市平邑县郑城镇桃峪村	117°41'51.968"	35°18'8.183"
48	SD17	临沂市费县上冶镇沿河庄村	117°54'58.975"	35°20'10.788"
49	SD18	临沂市费县梁邱镇油房村	117°42'42.397"	35°10'4.332"
50	SD19	临沂市费县朱田镇知方村	117°49'34.219"	35°16'37.132"
51	HB1	邢台市巨鹿县巨鹿镇上疃村	115°2'35.21"	37°14'59.971"
52	HB2	邢台市巨鹿县巨鹿镇西张庄村	115°0'33.563"	37°13'54.563"
53	HB3	邢台市巨鹿县堤村乡李庄村	115°0'40.428"	37°9'45.104"
54	HB4	邢台市巨鹿县堤村乡薄庄村	115°1'10.448"	37°10'22.512"
55	HB5	邢台市巨鹿县堤村乡纪家寨村	115°2'2.692"	37°10'27.527"
56	HB6	邢台市巨鹿县西郭城镇小韩寨村	114°55'45.912"	37°16'38.244"
57	HB7	邢台市巨鹿县西郭城镇西郭城村	114°53'45.283"	37°14'31.6"
58	HB8	邢台市巨鹿县官亭镇樊家村	115°3'47.855"	37°18'26.942"
59	HB9	邢台市巨鹿县阎疃镇于庄村	115°9'56.585"	37°18'54.475"
60	HB10	邢台市巨鹿县贾庄乡乔庄村	115°1'1.412"	37°10'33.679"
61	HB11	邢台市巨鹿县王虎寨镇枣园村	114°57'35.968"	37°10'21.799"
62	HB12	邢台市巨鹿县苏营乡苏二村	115°7'59.992"	37°20'36.071"
63	HB13	邢台市巨鹿县苏家营镇团城村	115°10'47.287"	37°21'47.66"
64	HB14	邢台市巨鹿县小吕寨镇小吕寨村	114°57'13.284"	37°14'58.751"
65	HB15	邢台市巨鹿县张王疃乡苗庄村	115°8'44.322"	37°14'54.604"

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-0.2%甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱条件: 0~10 min, 8%~9% A; 10~25 min, 9%~11% A; 25~35 min, 11%~15% A; 35~50 min, 15%~16% A; 50~65 min, 16%~20% A; 65~75 min, 20%~24% A; 75~80 min, 24%~38% A; 进样体积 10 μL; 检测波长 245 nm; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 38 ℃。

2.2 提取工艺优化

2.2.1 提取料液比对结果的影响 采用 50%甲醇为提取液, 超声提取 (功率 250 W、频率 35 kHz), 提取时间 30 min, 提取料液比分别为 1:10、1:25、1:50、1:75、1:100、1:200 共 6 份样品, 提取后在 245 nm, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 38 ℃色谱条件下测定结果, 考察不同料液比对金银花 HPLC 指纹图谱的影响, 得最佳提取料液比为 1:50, 结果见图 1。

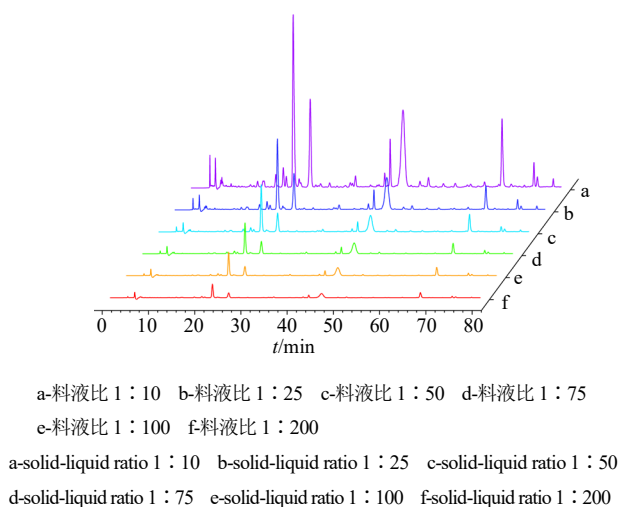


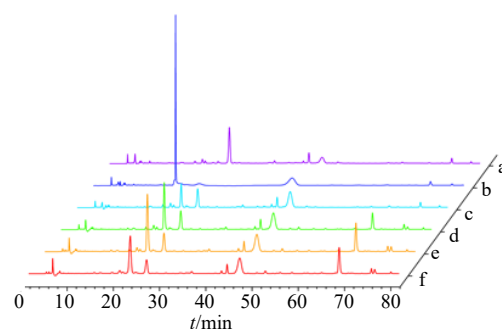
图 1 提取料液比对金银花 HPLC 指纹图谱的影响

Fig. 1 Effect of extracting material-liquid ratio on HPLC fingerprint

2.2.2 提取液甲醇体积分数对结果的影响 采用超声提取 (功率 250 W, 频率 35 kHz), 提取时间 30 min, 料液比 1:50, 提取液水及甲醇浓度分别为 10%、25%、50%、75%、100% 共 6 份样品, 提取后在 245 nm, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 38 ℃色谱条件下测定结果, 考察不同甲醇体积分数对金银花 HPLC 指纹图谱的影响, 得最佳提取溶剂为 50% 甲醇, 结果见图 2。

2.2.3 提取时间对结果的影响 采用超声提取 (功

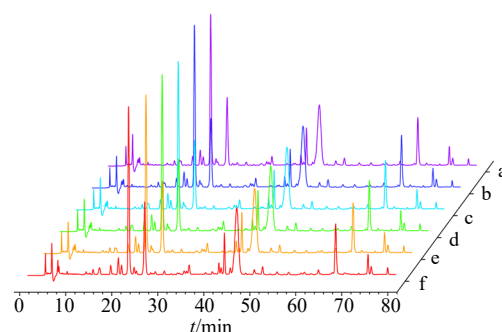
率 250 W、频率 35 kHz), 料液比 1:50, 提取液甲醇体积分数为 50%, 提取时间分别为 10、20、30、40、50、60 min 共 6 份样品, 提取后在 245 nm, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 38 ℃色谱条件下测定结果, 考察不同提取时间对金银花 HPLC 指纹图谱的影响, 得最佳提取时间为 30 min, 结果见图 3。



a-水 b-10% 甲醇 c-25% 甲醇 d-50% 甲醇 e-75% 甲醇 f-100% 甲醇
a-H₂O b-10% methanol c-25% methanol d-50% methanol e-75% methanol f-100% methanol

图 2 提取液甲醇浓度对金银花 HPLC 指纹图谱的影响

Fig. 2 Effect of extract methanol concentration on HPLC fingerprint



a-10 min b-20 min c-30 min d-40 min e-50 min f-60 min

图 3 提取时间对金银花 HPLC 指纹图谱的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on HPLC fingerprint

综上, 由图 1~3 可知, 最佳提取工艺为采用 50% 甲醇为提取液, 料液比 1:50, 超声提取 (功率 250 W, 频率 35 kHz), 提取时间 30 min。

2.3 检测方法优化

2.3.1 检测波长对结果的影响 采用 50% 甲醇为提取液, 料液比 1:50, 超声提取 (功率 250 W、频率 35 kHz), 提取时间 30 min, 提取后分别在 260 nm (a)、255 nm (b)、250 nm (c)、245 nm (d)、240 nm (e)、235 nm (f)、230 nm (g)、225 nm (h)、220 nm

(i)、215 nm (j), 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 38 °C 色谱条件下测定结果, 考察不同检测波长对金银花 HPLC 指纹图谱的影响, 得最佳检测波长为 245 nm, 结果见图 4。

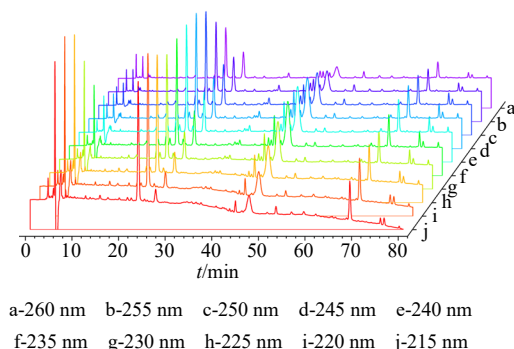


图 4 检测波长对金银花 HPLC 指纹图谱的影响

Fig. 4 Effect of detection wavelength on HPLC fingerprint

2.3.2 色谱柱温对结果的影响 采用 50%甲醇为提取液, 料液比 1 : 50, 超声提取 (功率 250 W, 频率 35 kHz), 提取时间 30 min, 提取后在 245 nm, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温分别为 30 °C (a)、32 °C (b)、34 °C (c)、36 °C (d)、38 °C (e)、40 °C (f) 色谱条件下测定结果, 考察不同色谱柱温对金银花 HPLC 指纹图谱的影响, 得最佳检测柱温为 38 °C, 结果见图 5。

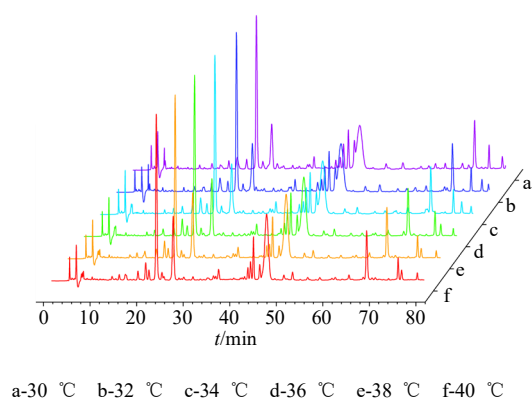


图 5 色谱柱温对金银花 HPLC 指纹图谱的影响

Fig. 5 Influence of chromatographic column temperature on HPLC fingerprint

2.3.3 进样体积流量对结果的影响 采用 50%甲醇为提取液, 料液比 1 : 50, 超声提取 (功率 250 W, 频率 35 kHz), 提取时间 30 min, 提取后分别在 245 nm, 柱温 38 °C, 体积流量分别为 0.1 mL/min (a)、0.2 mL/min (b)、0.3 mL/min (c)、0.4 mL/min (d)、0.5 mL/min (e)、0.6 mL/min (f)、0.7 mL/min (g)、

0.8 mL/min (h)、0.9 mL/min (i)、1.0 mL/min (j) 色谱条件下测定结果, 考察不同进样体积流量对金银花 HPLC 指纹图谱的影响, 得最佳体积流量为 0.5 mL/min, 结果见图 6。

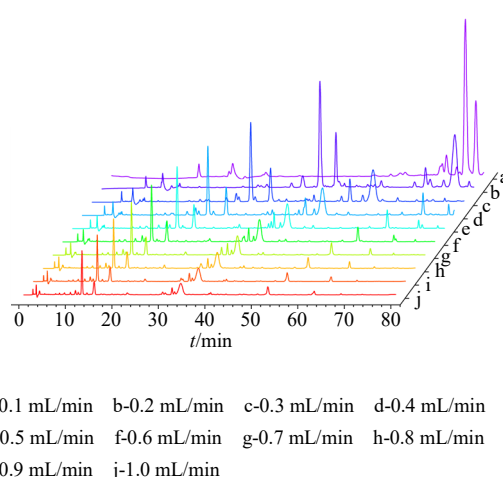


图 6 进样体积流量对金银花 HPLC 指纹图谱的影响

Fig. 6 Influence of injection flow rate on HPLC fingerprint

综上, 由图 4~6 可知, 最佳检测方法为: 检测波长 245 nm, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 38 °C。

2.4 溶液的制备

2.4.1 对照品溶液 分别精密称定香豆酸、新绿原酸、莫诺苷、绿原酸、断马钱子酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱苷、阿魏酸、芦丁、异槲皮素、木犀草苷、忍冬苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C, 以 50%甲醇溶解配制成质量浓度分别为 0.590、0.252、0.966、0.480、0.396、0.420、1.172、0.314、0.352、0.954、0.271、0.373、0.284、0.448、0.430、0.672 mg/mL 的储备液, 另分别取各储备液适量, 以 50%甲醇定容至 5 mL 作为混合对照品溶液。

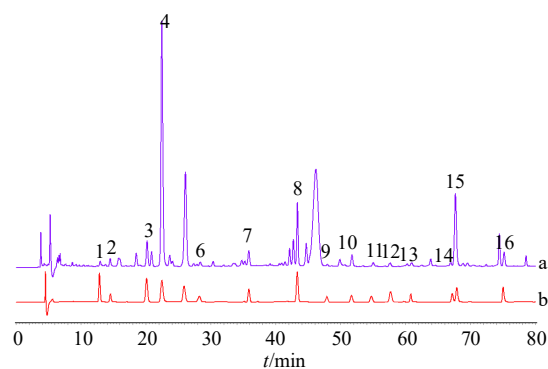
2.4.2 供试品溶液 根据“2.2 提取工艺优化”项下结果, 精密称取金银花粉 1 g 置锥形瓶中, 加入 50%甲醇 50 mL, 称定并记录重量, 超声提取 30 min (功率 250 W, 频率 35 kHz), 冷却后以 50%甲醇补足失重, 摇匀过滤, 即得。

2.5 样品测定

根据“2.3”项下结果, 取 65 批金银花, 按“2.4.2”项制备供试品溶液, 在检测波长 245 nm, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 38 °C 色谱条件下, 进样 10 μL 进行测定, 得金银花混合对照品图谱及样品指纹图谱见图 7。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取金银花供试品溶液, 在“2.1”



1-香豆酸 2-新绿原酸 3-莫诺苷 4-绿原酸 5-断马钱子酸
6-咖啡酸 7-当药苷 8-断氧化马钱苷 9-阿魏酸 10-芦丁
11-异槲皮素 12-木犀草苷 13-忍冬苷 14-异绿原酸 B
15-异绿原酸 A 16-异绿原酸 C
1-cumalic acid 2-neochlorogenic acid 3-morroniside
4-chlorogenic acid 5-secologaninsaeure 6-caffeic acid
7-sweroside 8-secoxyloganin 9-ferulic acid 10-troxerutin
11-isoquercetin 12-cynaroside 13-xylostein 14-isochlorogenic
acid B 15-isochlorogenic acid A 16-isochlorogenic acid C

图 7 金银花样品 (a) 及混合对照品 (b) HPLC 图谱

Fig. 7 HPLC profile of *Lonicerae Japonicae Flos* sample (a) and mixed reference substance (b)

项色谱条件下,连续进样 6 次,以 8 号峰断氧化马钱苷为参照峰,计算相对保留时间及相对峰面积 RSD 值,结果表明 16 个共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.06%~0.25%,相对峰面积 RSD 为 0.16%~1.93%。

2.6.2 重复性试验 按“2.4.2”项下平行称取 6 份金银花样品,分别制备成供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定。以 8 号峰断氧化马钱苷为参照峰,计算相对保留时间及相对峰面积 RSD 值,结果表明 16 个共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.17%~0.58%,相对峰面积 RSD 为 1.52%~4.02%。

2.6.3 稳定性试验 取金银花供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下,分别在 0、4、8、16、20、24、48 h 进样,以断氧化马钱苷为参照峰,计算相对保留时间及相对峰面积 RSD 值,结果表明 16 个共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.13%~0.82%,相对峰面积 RSD 为 0.75%~4.62%。

2.7 数据处理

利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723) 对 HPLC 图谱数据进行共有峰确定、相似度评价;用 SIMCA-P 14.1 软件进行聚类分析 (Hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小

二乘判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)。

2.8 化学计量学分析

2.8.1 不同产地金银花 HPLC 指纹图谱的建立 采用 ChemPattern_v1.0 绘制各产地金银花样品叠加图谱,见图 8~10;采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723) 分别对各产地金银花 HPLC 指纹图谱进行共有峰确定及相似度评价,以平均数法生成对照图谱,时间窗宽度 0.5。经全谱峰匹配后生成对照图谱,见图 11,各产地不同批次金银花样品 HPLC 图谱与对照图谱相似度结果见表 2。

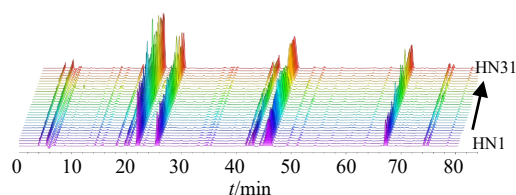


图 8 31 批河南产区金银花 HPLC 指纹图谱

Fig. 8 HPLC fingerprints of 31 batches of *Lonicerae Japonicae Flos* produced in Henan

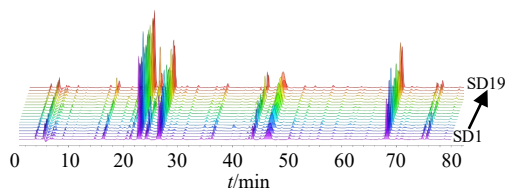


图 9 19 批山东产区金银花 HPLC 指纹图谱

Fig. 9 HPLC fingerprints of 19 batches of *Lonicerae Japonicae Flos* produced in Shandong

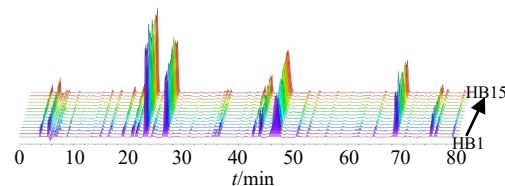


图 10 15 批河北产区金银花 HPLC 指纹图谱

Fig. 10 HPLC fingerprint of 15 batches of *Lonicerae Japonicae Flos* produced in Hebei

由结果可知,31 批河南产区金银花 HPLC 指纹图谱匹配共有峰 67 个,其中第 11、13、16、19、21、22、29、37、40、44、47、48、51、55、56、65 号峰分别对应为香豆酸、新绿原酸、莫诺苷、绿原酸、断马钱子酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱苷、

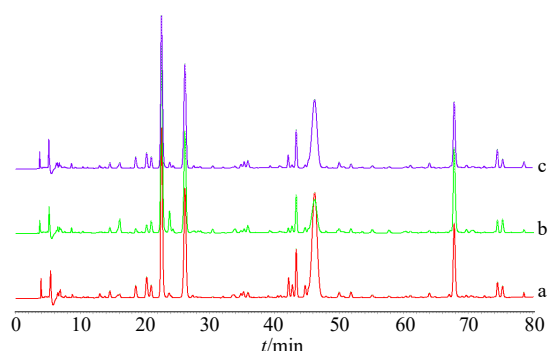


图 11 河南 (a)、山东 (b)、河北 (c) 产区金银花 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 11 HPLC comparison fingerprints in Henan (a), Shandong (b) and Hebei (c) production areas

阿魏酸、芦丁、异槲皮素、木犀草苷、忍冬苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C，与对照图谱相似度范围在 0.883~0.995，除 HN9、HN7 之外相似度范围在 0.963~0.995；19 批山东产区金银花 HPLC 指纹图谱匹配共有峰 52 个，其中第 8、9、14、17、20、21、25、29、32、35、38、39、40、43、44、48 号峰分别对应为香豆酸、新绿原酸、莫诺苷、绿原酸、断马钱子酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱苷、阿魏酸、芦丁、异槲皮素、木犀草苷、忍冬苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C，与对照图谱相似度范围在 0.905~0.997；15 批河北产区金银花 HPLC 指纹图谱匹配共有峰 61 个，其中第 12、15、18、20、24、25、33、38、41、44、45、47、49、55、56、60 号峰分别对应

表 2 金银花 HPLC 指纹图谱相似度结果

Table 2 HPLC fingerprint similarity results of *Lonicerae Japonicae Flos*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
HN1	0.991	HN14	0.976	HN27	0.994	SD9	0.986	HB3	0.998
HN2	0.989	HN15	0.993	HN28	0.993	SD10	0.989	HB4	0.998
HN3	0.988	HN16	0.992	HN29	0.979	SD11	0.991	HB5	0.983
HN4	0.991	HN17	0.980	HN30	0.994	SD12	0.997	HB6	0.998
HN5	0.991	HN18	0.991	HN31	0.995	SD13	0.973	HB7	0.993
HN6	0.975	HN19	0.993	SD1	0.993	SD14	0.953	HB8	0.998
HN7	0.893	HN20	0.992	SD2	0.974	SD15	0.972	HB9	0.999
HN8	0.965	HN21	0.995	SD3	0.932	SD16	0.963	HB10	0.999
HN9	0.883	HN22	0.989	SD4	0.950	SD17	0.995	HB11	0.940
HN10	0.963	HN23	0.988	SD5	0.905	SD18	0.982	HB12	0.993
HN11	0.989	HN24	0.993	SD6	0.990	SD19	0.997	HB13	0.978
HN12	0.990	HN25	0.978	SD7	0.945	HB1	0.993	HB14	0.996
HN13	0.993	HN26	0.988	SD8	0.992	HB2	0.990	HB15	0.996

为香豆酸、新绿原酸、莫诺苷、绿原酸、断马钱子酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱苷、阿魏酸、芦丁、异槲皮素、木犀草苷、忍冬苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C，与对照图谱相似度范围在 0.993~0.995。

2.8.2 HCA 及 PCA 采用 SIMCA-P 14.1 软件对河南、山东、河北 3 个产地的金银花样品 HPLC

图谱结果进行 HCA、PCA，为了使结果能够最大程度地反映样本信息，数据分析时，选用各产地间所匹配的全部共有峰进行计算，包括 16 个已标示出的共有峰，各产地金银花样本聚类分析结果见图 12，主成分分析得分图见图 13，各产地金银花样本主成分分析特征值及方差贡献率见表 3~5。

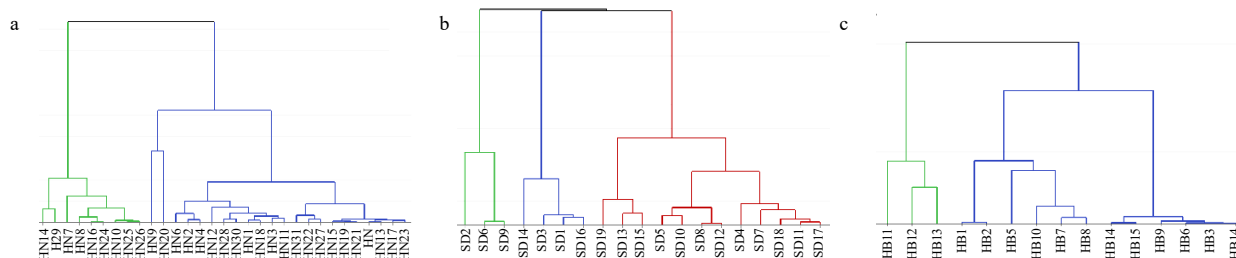


图 12 河南 (a)、山东 (b)、河北 (c) 各产区金银花 HPLC 指纹图谱 HCA 结果

Fig. 12 HCA results in each production area in Henan (a), Shandong (b), and Hebei (c)

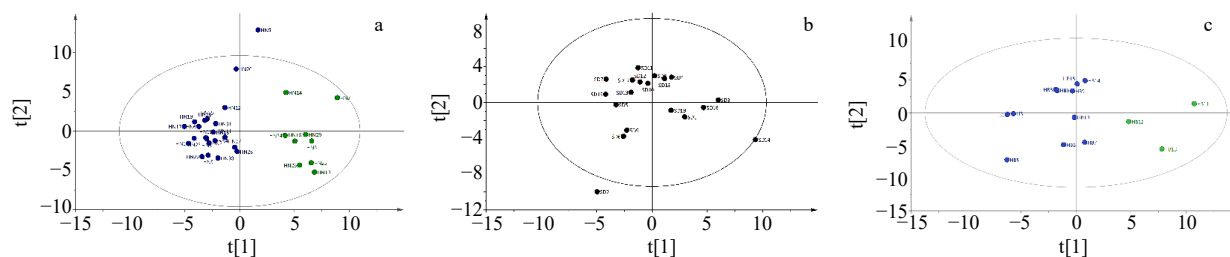


图 13 河南 (a)、山东 (b)、河北 (c) 各产区金银花 HPLC 指纹图谱 PCA 结果

Fig. 13 PCA results in each production area in Henan (a), Shandong (b), and Hebei (c)

表 3 河南产区金银花样品主成分分析特征值及方差贡献率
Table 3 PCA Eigenvalue and R²X of *Lonicerae Japonicae* Flos from Henan producing areas

成分	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征值
1	26.2	26.2	8.11
2	20.1	46.3	6.23
3	12.9	59.2	4.01
4	8.5	67.7	2.64
5	6.8	74.5	2.11

表 4 山东产区金银花样品主成分分析特征值及方差贡献率
Table 4 PCA Eigenvalue and R²X of *Lonicerae Japonicae* Flos from Shandong producing areas

成分	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征值
1	27.0	27.0	5.13
2	22.2	49.2	4.22
3	15.2	64.5	2.89
4	8.1	72.6	1.54

表 5 河北产区金银花样品主成分分析特征值及方差贡献率
Table 5 PCA Eigenvalue and R²X of *Lonicerae Japonicae* Flos from Hebei producing areas

成分	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征值
1	37.8	37.8	5.67
2	25.9	63.7	3.89
3	12.6	76.3	1.90
4	9.9	86.3	1.49
5	5.6	91.8	0.84

由结果可知, 31 批河南产金银花样本聚类结果分为 2 类, 且 2 类样本整体分布集中, 主成分分析自动拟合 5 个主成分, 特征值均大于 1, 累积方差贡献率 74.5%; 19 批山东产金银花聚类结果整体分为 3 类, 其中 1 类分布较为集中, 其余 2 类较为离散, 主成分分析自动拟合 4 个主成分, 特征值均大于 1, 累积方差贡献率 72.6%; 15 批河北产金银花聚类结果整体分为 2 类, 但 2 类样本均分布较为离散, 主成分分析自动拟合 5 个主成分, 其中前 4 个

主成分特征值大于 1, 累积方差贡献率 86.3%。

为更好地区分不同产地金银花样品之间的差异, 根据 HCA 及 PCA 结果, 在各产地不同批次样本中分别筛选出 10 批相似度接近, 综合得分分布集中的样品, 使其更能代表其产地信息, 进行更为细致深入的分析, 以 3 个产地共有峰交集数据 (共计匹配 45 个共有峰, 包括 16 个已标示的共有峰), 导入 IBM SPSS Statistics 20.0 软件进行聚类分析, 聚类方法采用组间连接法, 聚类距离为欧氏平方距离, 结果见图 14, 绘制 3 个产区金银花 HPLC 指纹图谱 PCA 得分图, 见图 15。

由图 14 可知, 当聚类距离等于 20 时, 3 个产地 30 批次样品整体分为 2 类, 其中河南产地 10 批样品聚为 1 类, 山东产地与河北产地 20 批样品聚为 1 类; 当聚类距离等于 10 时, 山东与河北产地金银

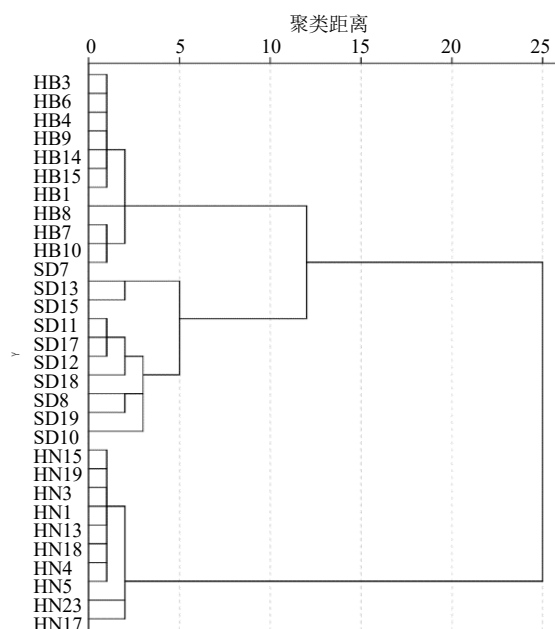


图 14 3 个产区金银花 HCA 结果

Fig. 14 HCA results in three producing areas

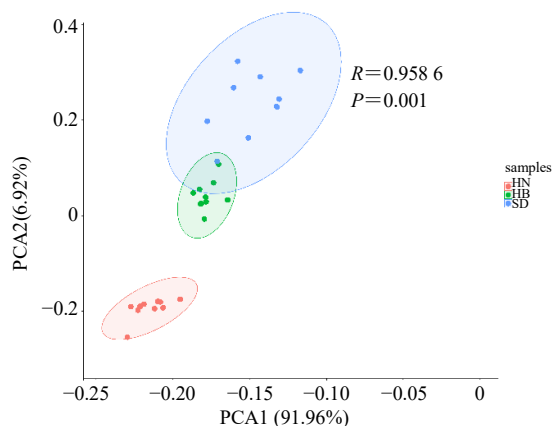


图 15 3 个产区金银花 PCA 结果

Fig. 15 PCA results in three producing areas

花样品分为 2 类，其中 SD7 与河北 10 批样品聚为 1 类，剩余山东 9 个批次样品聚为 1 类；主成分分析结果与聚类结果基本一致，可以看出河南产金银花样品综合得分整体分布集中，且可与山东、河北金银花样品完全区分，山东产金银花样品综合得分分布相对离散，河北产金银花样品综合得分分布较为集中但与山东产金银花有部分重叠，无法完全区分。

2.8.3 OPLS-DA 不同于 PCA，OPLS-DA 是一种有监督的判别分析统计方法，该方法基于 OPLS，使分类信息主要集中在主成分上，建立样品类别之间的关系模型，并且使模型易于解释，其判别效果及主成分得分图的可视化效果更加明显。近年来，这种方法在理论和应用方面得到了迅速地发展，并在计量化学中有大量的应用，而在其相关的中药领域应用更加广泛，常作为生药质量评价、中药炮制前后成分差异研究、中药药理代谢组学及中药潜在质量标志物探索的基础方法之一[16-18]。

断氧化马钱苷为金银花中环烯醚萜苷类成分之一，现代药理研究表明其作用较绿原酸及木犀草苷而言，更贴合金银花传统临床应用功效，且具有保肝利胆等作用^[19]，因其色谱峰位置居中，在各批次样品中的稳定性最好且具有良好的分离度，故选取其为参照峰。以河南产金银花样品为对照组，将 30 批样品 16 个共有峰数据导入 SIMCA-P 14.1 软件分别建立两两两组比较的 OPLS-DA 模型。模型参数 R^2X 和 R^2Y 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率， Q^2 表示模型的预测能力，变量投影重要度 (variable importance for the projection, VIP) 表示差异成分对各组样本分类判别的影响强度和解释能力

(通常以 VIP 值 >1 作为筛选标准)，OPLS-DA 得分图的横坐标表示组间的差异，纵坐标表示组内的差异。河南-山东产金银花判别模型 (M1) 与河南-河北产金银花判别模型 (M2) 见图 16、17，VIP 值见图 18、19。

由结果可知，河南-山东产金银花判别模型 (M1)， $R^2X=0.813$ ， $R^2Y=0.984$ ， $Q^2=0.975$ ，表明所建立的模型解释率和预测力良好、可靠，结合

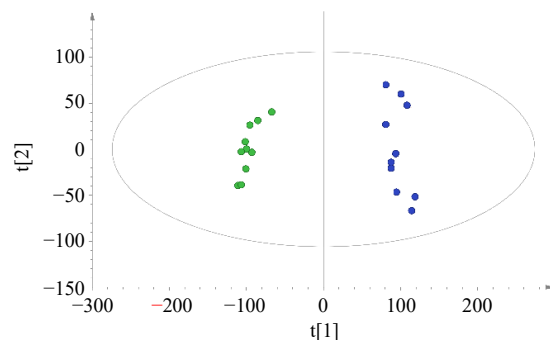


图 16 河南-山东金银花 OPLS-DA 分析得分图

Fig. 16 Henan-Shandong OPLS-DA analysis results

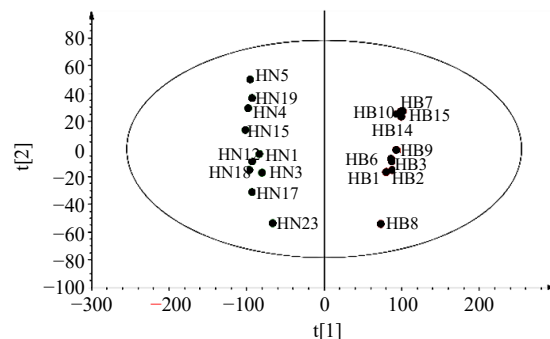


图 17 河南-河北金银花 OPLS-DA 分析得分图

Fig. 17 Henan-Hebei OPLS-DA analysis results

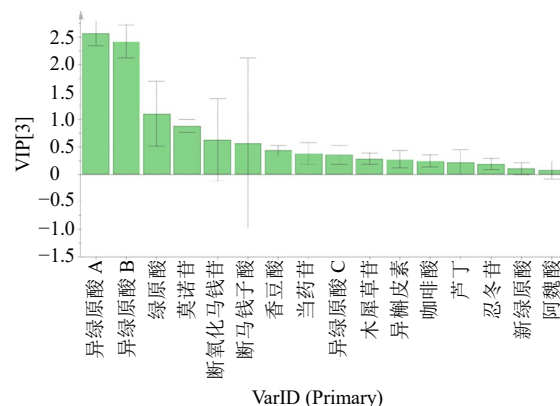


图 18 河南-山东金银花变量 VIP

Fig. 18 VIP of Henan-Shandong OPLS-DA analysis

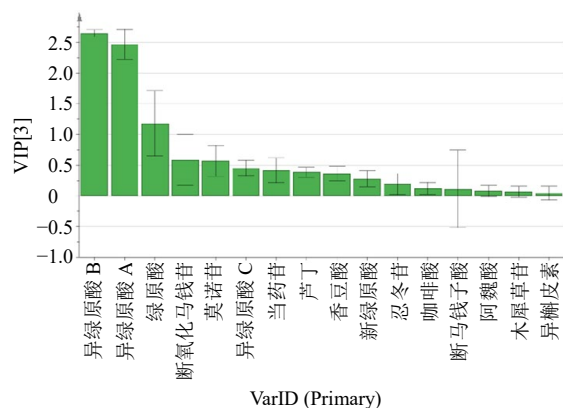


图 19 河南与河北金银花变量 VIP

Fig. 19 VIP of Henan-Hebei OPLS-DA analysis

VIP 值可知, VIP 大于 1 的成分有异绿原酸 A、异绿原酸 B 和绿原酸; 河南-河北产金银花判别模型 (M_2), $R_2X=0.855$, $R_2Y=0.990$, $Q^2=0.980$, 表明所建立的模型解释率良好, 预测力可靠, 结合 VIP 可知, 异绿原酸 B > 异绿原酸 A > 绿原酸 > 1。

另外, 研究或比较 2 个 OPLS 模型之间所共同的或独特的差异化合物, 可以通过共享与特有化合物结构分析图 (Shared and unique structure-plot, SUS-plot) 来实现, 将 2 个 OPLS 模型进行对比分析, 研究其中化合物在 2 个模型中的变化趋势的异同性^[20]。在 2 个模型中变化趋势一致或者相反的化合物, 2 个模型所特有的化合物分别出现在平面坐标轴不同象限的特定区域, 便于发现、归类和分析。以河南-山东产金银花判别模型 (M_1) 为纵坐标 (Y), 以河南-河北产金银花判别模型 (M_2) 为横坐标 (X), 绘制 3 个产区金银花样品共享与特有化合物结构分析图 (SUS-plot), 见图 20。

由图 20 可知, 其第 1、2 象限对应河南-山东产金银花判别模型 (M_1) 正方向, 结合图 16 “河南与山东金银花判别 OPLS-DA 分析得分图” 可知山东产金银花样品分布于模型 (M_1) 的正方向, 因此图 20 中第 1、2 象限中所示化合物成分在山东产金银花样品中普遍高于河南产金银花样品, 第 3、4 象限所标示化合物成分普遍低于河南产金银花样品; 同理可得, 结合图 17 “河南-河北金银花判别 OPLS-DA 分析得分图” 可知河北产金银花样品分布于模型 (M_2) 的正方向, 其第 1、4 象限对应河南-河北产金银花判别模型 (M_2) 正方向, 因此图 20 中第 1、4 象限中所示化合物成分在河北产金银花样品中普遍高于河南产金银花样品, 第 2、3 象限所标

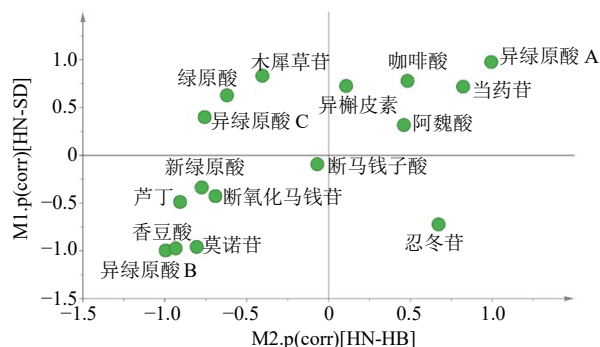


图 20 3 个产区金银花样品共享与特有化合物结构分析图 (SUS-plot)

Fig. 20 SUS-plot of *Lonicerae Japonicae Flos* samples from three producing areas

示化合物成分普遍低于河南产金银花样品。综上所述, 即在图 20 中第 1 象限所示成分 (异绿原酸 A、当药苷、咖啡酸、阿魏酸) 在河南产金银花样品中普遍低于山东、河北产金银花; 第 2 象限所示成分 (绿原酸、异绿原酸 C、木犀草苷) 在山东产金银花样品中普遍高于河南产金银花, 河南产金银花普遍高于河北产金银花; 第 3 象限所示成分 (异绿原酸 B、香豆酸、莫诺苷、芦丁、新绿原酸、断氧化马钱苷) 在河南产金银花样品中普遍高于山东、河北产金银花; 第 4 象限所示成分 (忍冬苷) 在河北产金银花样品中普遍高于河南产金银花, 河南产金银花普遍高于山东产金银花。

3 讨论

本研究根据市场调研, 依据产地种植面积、种植密度, 采集了河南、山东、河北 3 个主产区的 65 批金银花样品, 使取样具有真实性、代表性; 系统考察了提取溶液甲醇体积分数、料液比、提取时间、检测波长、体积流量、柱温等条件, 建立了重现性良好、稳定性可靠、分辨率清晰的适用于不同产地金银花品质评价的 HPLC 指纹图谱条件, 并结合化学识别模式建立了拟合信息丰富、预测能力优良、判别能力精准的不同产地的数学模型。

在对不同产地批次的金银花 HPLC 指纹图谱结果进行分析的过程中, 根据研究目的采取了逐步分析的方法, 首先建立起不同产地 HPLC 指纹图谱, 对产地内不同批次的样品, 以匹配到的全部共有峰作为数据源进行聚类分析及主成分分析, 使其分析结果在极大程度上反映了样本的真实信息及产地内金银花商品品质的稳定性, 可以看出河南产金银花品质相

对来说更加稳定集中,而山东和河北产金银花品质相对分布离散。然后,根据产地内初步的分析结果,进行了样本的筛选,每个产地之中选出 10 个分布最为集中的批次,目的是在保证数据具有统计学意义及样本代表性的前提下,使所筛选出的金银花样品最能代表产地特征,再进行产地间的判别分析,在对产地间金银花 HPLC 指纹图谱进行分析时,通过共享与特有化合物结构分析,数据选用已标示的 16 个共有峰成分,使结果具有可行性及可验证性。

HPLC 指纹图谱技术与化学模式识别技术结合起来能体现出更多的样本信息,并且在评价药材质量和质量控制上显示了此法的适用性。通过对指纹图谱进行化学计量学分析,可以客观地反映了药材品质的整体性与差异性,且本研究所建立的方法与模型,同样可以应用于金银花不同品种、不同部位、不同采收时期及不同加工方式的品质研究,为其种质种源评价、综合开发利用、原料药稳定性及加工方式优化提供研究基础和方法,为优质金银花规范化生产基地建设及其潜在中药质量标志物的探索提供参考和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王雨田,何玉成,闫桂权,等.我国中药材产地市场整合研究:以金银花、枸杞子、板蓝根和太子参为例[J].中草药,2020,51(6):1669-1676.
- [2] 郭兰萍,周良云,莫歌,等.中药生态农业:中药材 GAP 的未来[J].中国中药杂志,2015,40(17):3360-3366.
- [3] 魏建和,屠鹏飞,李刚,等.我国中药农业现状分析与发展趋势思考[J].中国现代中药,2015,17(2):94-98,104.
- [4] 肖小河,金城,赵中振,等.论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J].中国中药杂志,2007,32(14):1377-1381.
- [5] 肖小河,陈士林,黄璐琦,等.中国道地药材研究 20 年概论[J].中国中药杂志,2009,34(5):519-523.
- [6] 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.
- [7] 任德权.中药指纹图谱质控技术的意义与作用[J].中药新药与临床药理,2001,12(3):135-140.
- [8] 周建良,齐炼文,李萍.色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用[J].色谱,2008,26(2):153-159.
- [9] 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.
- [10] 杨冰月,胡本祥,张琳,等.野生与栽培太白米 HPLC 指纹图谱及化学模式识别[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(5):187-191.
- [11] 甄亚钦,冯玉,田伟,等.忍冬不同部位 UPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J].中草药,2019,50(18):4449-4454.
- [12] 路俊仙,吕凌,张才波.金银花和灰毡毛忍冬多成分定性的指纹图谱比较[J].中华中医药杂志,2019,34(7):3215-3219.
- [13] 刘惠,杨姣,朱志飞,等.基于总量统计矩分析法的金银花、山银花 HPLC 指纹图谱评价[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(21):132-139.
- [14] 范毅,陈玲,李晓,等.不同产地金银花提取物的指纹图谱及绿原酸、木犀草苷含量测定[J].河南科学,2019,37(1):53-59.
- [15] 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.
- [16] 潘宏春,阳勇,秦伟瀚,等.基于多元统计学方法的亚香棒虫草与冬虫夏草化学差异研究[J].中草药,2020,51(16):4316-4324.
- [17] 李明雨,孙娥,徐凤娟,等.基于 UPLC-Q/TOF-MS 分析淫羊藿炮制前后黄酮组分的变化规律[J].中草药,2020,51(11):2900-2907.
- [18] 王健,孙瑜,陈莉莉,等.基于¹H-NMR 代谢组学技术评价何首乌炮制品中差异代谢物的研究[J].现代药物与临床,2020,35(8):1537-1543.
- [19] 陈静娴,张敏敏,崔莉,等.分散固相萃取-HPLC 法测定金银花及其成药连花清瘟胶囊中的环烯醚萜苷类成分[J].中草药,2016,47(16):2850-2856.
- [20] Wiklund S, Johansson E, Sjostrom L, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models[J].Anal Chem,2008,80:115-122.

[责任编辑 时圣明]