

基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的白及与黄花白及辨识研究

范雪花¹, 王艳丽², 侯富国¹, 李涵¹, 李海洋¹, 姚静^{2,3,5}, 施钧瀚^{2,3,5}, 桂新景^{1,2,5*}, 刘瑞新^{2,4,5*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000

3. 河南省中药临床应用评价与转化工程研究中心, 河南 郑州 450000

4. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046

5. 河南省中药临床药学中医药重点实验室, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 通过指纹图谱结合化学计量学方法对白及 *Bletilla striata* 与黄花白及 *Bletilla ochracea* 进行辨识研究。方法 采用 Shim-pack GIST C₁₈-AQ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1%磷酸水溶液-乙腈梯度洗脱, 检测波长 280 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。采用 ChemPattern™ 软件对白及、黄花白及的指纹图谱数据进行分析, 并对其相似度评价; 采用 SIMCA14.1 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA), 对二者进行定性辨识研究。**结果** 在相似度分析中, 45 批白及的相似度为 0.74~0.97, 相似度较好, 29 批黄花白及的相似度为 0.44~0.83, 部分黄花白及与白及较为相似; 聚类分析与 PCA 分析结果较为一致, 部分样品可分为 2 类; PLS-DA 分析分类效果显著, 模型参数 Q^2 为 0.80, R^2Y 为 0.85, 完全能将两者区分开。通过 PLS-DA 分析结合 VIP 值筛选出了影响白及与黄花白及质量差异的 8 个共有峰, 对这 8 个共有峰进行分析, 二者之间除 15 号峰 (militarine) 峰面积没有显著性差异外 ($P>0.05$), 其余 7 个共有峰峰面积白及均显著小于黄花白及 ($P<0.01$)。**结论** HPLC 指纹图谱结合化学计量学方法能够实现白及与黄花白及的鉴别, 可为白及饮片的质量辨识提供参考。

关键词: 白及; 黄花白及; 指纹图谱; 化学计量学; 1,4-二[4-(葡萄糖氧)-苄基]-2-异丁基苹果酸酯; 天麻素; 质量辨识

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)12-3990-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.025

Identification of *Bletilla striata* and *Bletilla ochracea* by HPLC coupled with chemometrics

FAN Xue-hua¹, WANG Yan-li², HOU Fu-guo¹, LI Han¹, LI Hai-yang¹, YAO Jing^{2,3,5}, SHI Jun-han^{2,3,5}, GUI Xin-jing^{1,2,5}, LIU Rui-xin^{2,4,5}

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

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

3. Henan Province Engineering Research Center for Clinical Application, Evaluation and Transformation of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

4. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

5. Henan Key Laboratory for Clinical Pharmacy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To identify Baiji (*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.) and Huanghuabaiji (*Bletilla ochracea* Schltr.) by

收稿日期: 2022-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81773892); 国家重点研发计划中医药现代化重点专项 (2017YFC1703400); 河南省卫生健康委员会国家中医临床研究基地科研专项课题 (2021JDZY104); 河南省中医药拔尖人才培养项目 (重点项目) (2019ZYBJ07); 河南省高层次人才特殊支持“中原千人计划”——“中原青年拔尖人才”项目 (ZYQR201912158); 河南省卫生健康中青年学科带头人专项 (HNSWJW-2020014); 河南省科技攻关项目 (222102310377)

作者简介: 范雪花 (1999—), 女, 河南开封, 硕士在读, 研究方向为中药质量评价及临床应用研究。E-mail: fan_jingjing@163.com。

***通信作者:** 刘瑞新 (1980—), 男, 主任药师, 研究方向为中药饮片临床应用现代化关键技术研究。E-mail: liuruixin7@163.com

桂新景 (1991—), 男, 主管药师, 研究方向为中药质量评价及临床应用研究。E-mail: guixinjing1991@126.com

fingerprint combined with chemometrics method. **Methods** Shim-pack GIST C₁₈-AQ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase was 0.1 % phosphoric acid-acetonitrile. The detection wavelength was 280 nm. Flow rate was 1.0 mL/min. Column temperature was 30 °C. Injection volume was 10 μL. ChemPattern™ software was used to analyze the fingerprint data of *B. striata* and *B. ochracea*, and the similarity was evaluated. SIMCA14.1 software was used for principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to study the qualitative identification of the two. **Results** In the similarity analysis, the similarity of 45 batches of *B. striata* was 0.74—0.97, and the similarity was good. The similarity of 29 batches of *B. ochracea* was 0.44—0.83, and some *B. striata* were similar to *B. ochracea*. The results of principal component analysis and cluster analysis were consistent, and most samples could be divided into two categories. The partial least squares discriminant analysis had obvious classification effect, and the model parameters Q^2 and R^2Y were 0.80, 0.85, respectively, which can distinguish the two. Eight common peaks affecting the quality difference of *B. striata* and *B. ochracea* were screened by PLS-DA analysis combined with VIP value, and the eight common peaks were analyzed. Except for the peak area of peak 15 (militarine), there was no significant difference between them ($P > 0.05$), the area of seven common peaks of *B. striata* was significantly smaller than that of *B. ochracea* ($P < 0.01$). **Conclusion** HPLC fingerprint combined with chemometrics method can realize the identification of *B. striata* and *B. ochracea*, which can provide reference for the quality identification of *B. striata* decoction pieces.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.; *Bletilla ochracea* Schltr.; fingerprint; chemometrics; militarine; gastrodine; quality identification

白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.的干燥块茎, 具有收敛止血、消肿生肌的功效, 临床上常用于治疗咯血、吐血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂等症^[1]。现代药理研究表明, 白及对于常见疑难疾病如肿瘤^[2,3]、矽肺^[4]、肺结核^[5]、胃溃疡^[6]等具有良好的治疗作用; 因其在皮肤皲裂、美白方面有良好的疗效, 也被广泛用于医药美容领域^[7,8]。黄花白及 *B. ochracea* Schltr.与白及同为白及属植物, 在我国南方大部分地区被用作民间药物或白及的替代品, 其黄花白及被收录于 2010 年版《四川省中药材标准》^[9]、小白及(实为黄花白及)收录于 2009 年版《甘肃省中药材标准》^[10]和黔白及(实为黄花白及)收录于 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》^[11], 其归经及功效记载几乎与《中国药典》2020 年版记载等同, 但《中国药典》2020 年版只收录了白及。鉴于此, 有学者研究白及与黄花白及的化成成分指纹图谱后提出二者具有相同或相似化学成分^[12,13], 将黄花白及充当正品使用有其合理性和必然性。但在药典尚未纳入黄花白及前, 其仍是白及的伪品, 且市场上多有黄花白及掺入白及中充当正品使用的情况^[14], 而性状、显微、薄层方法难以分辨二者^[15], 因此基于其化学成分探讨建立一种定性辨识二者的方法尤为重要。

中药指纹图谱技术能从整体上对中药进行研究, 可以全面反映中药中所含的复杂化学成分及相互关系, 被广泛用于中药的辨识研究^[16-18]。但指纹图谱包含的信息量庞大, 需要借助多元统计分析方法来进行更深入的分析^[19]。化学计量学是一种通

过分析数据, 最大限度地提供可用的化学信息的方法, 聚类分析、主成分分析、判别分析等化学计量学方法被普遍用于中药的质量评价和鉴定^[20]。指纹图谱结合化学计量学的方法可对指纹图谱的数据进行矩阵式整合, 对中药的质量差异进行整体描述与合理评价。基于此, 本研究利用 HPLC 法建立白及与黄花白及的指纹图谱, 结合化学计量学方法对其指纹图谱进行综合分析, 探讨该法用于定性鉴别白及与黄花白及的可行性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UltiMate-3000 型高效液相色谱仪, 包括紫外检测器等(中国赛默飞世尔科技有限公司); BSA2245-CW 型万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司); HHS 恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); HK250 型科导式超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司); JW-2018H 型高速离心机; FW-100 型高速万能粉碎机(60~180 目, 北京科伟永兴仪器有限公司); 药典筛(四号筛, 0.25 μm 孔径, 浙江上虞市道墟五四仪器厂); 0.45 μm 微孔滤膜。

1.2 材料

1,4-二[4-(葡萄糖氧)-苄基]-2-异丁基苹果酸酯(militarine)对照品(质量分数 ≥ 98%, K1809B72711, 上海源叶生物科技有限公司); 天麻素(批号 110807-201809, 国家食品药品检定研究院), 质量分数大于 98%; 白及对对照药材(批号 121261-201706, 国家食品药品检定研究所)。超纯水、稀乙醇、甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯。

购买白及饮片 45 批、黄花白及饮片 29 批，经河南中医药大学第一附属医院施钧瀚副主任医师鉴定白及为兰科植物白及 *B. striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎，符合《中国药典》2020

年版规定；黄花白及为兰科植物黄花白及 *B. ochracea* Schltr. 的干燥块茎。白及、黄花白及样品信息见表 1，其中白及饮片编号 S1~S45；黄花白及饮片编号 S46~S74。

表 1 白及、黄花白及样品信息

Table 1 Information of *B. striata* and *B. ochracea*

样品编号	批号	产地	购买地点	样品编号	批号	产地	购买地点
S1	180311	贵州	河南中医药大学第一附属医院	S38	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S2	181001	贵州	河南中医药大学第一附属医院	S39	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S3	181202	贵州	河南中医药大学第一附属医院	S40	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S4	180707	贵州	河南中医药大学第一附属医院	S41	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S5	190101	贵州	河南中医药大学第一附属医院	S42	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S6	180715	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药中心	S43	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S7	180903	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S44	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S8	190213	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S45	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S9	181125	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S46	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S10	181216	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S47	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S11	190113	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S48	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S12	180520	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S49	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S13	190120	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S50	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S14	181110	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S51	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S15	181005	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S52	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S16	190214	贵州	河南中医药大学第一附属医院煎药	S53	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S17	20181201	贵州	河南中医药大学第三附属医院	S54	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S18	18030102	贵州	河南省中医研究院附属医院	S55	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S19	18030101	贵州	河南省中医研究院附属医院	S56	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S20	1901191	云南	河南省中医院	S57	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S21	1808061	贵州	河南省中医院	S58	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S22	18051001	云南	郑州市中医院	S59	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S23	18072501	云南	郑州市中医院	S60	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S24	170801	贵州	郑州中医骨伤病医院	S61	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S25	20181001	贵州	张仲景大药房	S62	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S26	D1812074	云南	张仲景大药房	S63	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S27	1812131	云南	天津市中医药研究院附属医院	S64	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S28	1812230102	湖北	天津市中医药研究院附属医院	S65	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S29	181219	贵州	天津市中医药研究院附属医院	S66	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S30	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂	S67	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S31	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂	S68	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S32	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂	S69	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S33	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂	S70	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S34	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂	S71	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S35	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂	S72	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S36	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂	S73	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂
S37	散装饮片	云南	成都荷花池中药材专业市场益康堂	S74	散装饮片	四川	成都荷花池中药材专业市场益康堂

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST C₁₈-AQ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为 0.1%磷酸水溶液（A）-乙腈（B）；梯度洗脱（0~5 min，5%~20% A；5~10 min，20%~24% A；10~20 min，24%~31.5% A；20~25 min，31.5%~35% A；25~30 min，35%~42% A；

30~45min，42%~60% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 10 μL；检测波长 280 nm。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取 militarine、天麻素对照品适量，置于 10 mL 棕色量瓶中，加乙腈-水（3：97）溶解并定容，制成含 militarine 0.906 mg/mL、天麻素 1.066 mg/mL 的混

合溶液，摇匀，即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取饮片适量，粉碎过 4 号筛，精密称定 2.0 g，置于 50 mL 具塞瓶中，加稀乙醇 40 mL，称定质量，超声提取 30 min（功率：200 W，频率：40 kHz），取出，放冷，用稀乙醇补足减失的质量，滤过，滤液浓缩至无醇味，残渣加乙腈-水（3：97）溶解，转移至 25 mL 量瓶中，用乙腈-水（3：97）稀释至刻度，摇匀，离心，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 重复性试验 精密称定 S14 号供试品 6 份，按照“2.2.2”项下方法处理，吸取 10 μL，按“2.1”项下色谱条件进样，以 *militarine* 为参照峰计算各共有峰的平均相对保留时间和平均相对峰面积 RSD 值，分别为 0.05%、0.27%。

2.2.4 精密度试验 精密称定 S14 号供试品，按照“2.2.2”项下方法处理，吸取 10 μL，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，以 *militarine* 为参照峰计算各共有峰的平均相对保留时间和平均相对峰面积 RSD 值，分别为 0.04%、0.13%，说明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 称定 S2 号供试品，按照“2.2.2”项下方法处理，吸取 10 μL，按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，以 *militarine* 为参照峰计算各共有峰的平均相对保留时间和平均相对峰面积的 RSD 值，分别为 0.07 %、0.33 %，说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 指纹图谱的建立和共有峰的指认 采用 ChemPattern™ 化学指纹图谱分析软件对 74 批样品进行 HPLC 指纹图谱分析，见图 1。经对比，45 批白及样品中共指认出 8 个共有峰，45 批白及样品与 29 批黄花白及样品共指认出 4 个共有峰。选取白及饮片中具有代表性的 17 批饮片的特征峰导入 ChemPattern™ 软件进行处理，生成白及饮片共有模式特征图谱（图 2），结果共提取出 19 个共有峰。取“2.2.1”项下混合对照品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样所得混合对照品色谱图（图 3）。通过与混合对照品色谱图比对，指认出 2 个共有峰，峰 4 为天麻素，峰 15 为 *militarine*。

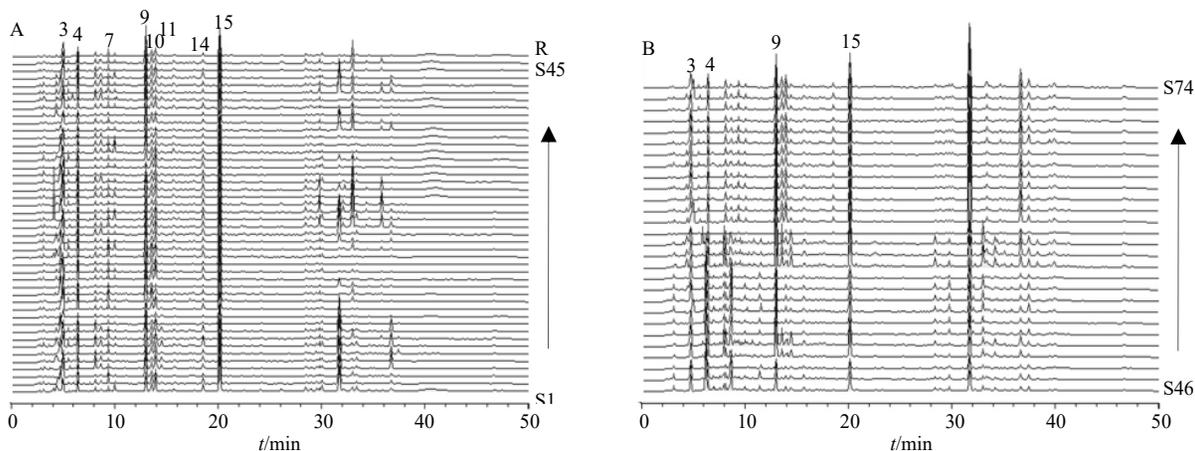


图 1 白及 (A) 和黄花白及 (B) 的叠加指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprint of *B. striata* (A) and *B. ochracea* (B)

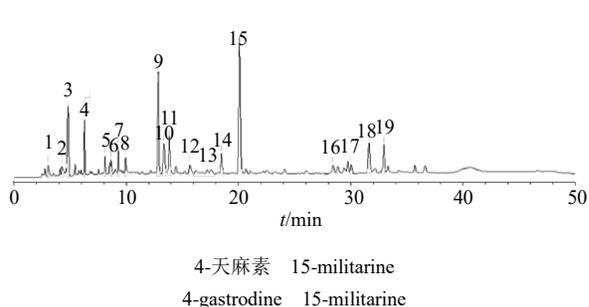


图 2 白及指纹图谱共有模式
Fig. 2 Common patterns in fingerprints of *B. striata*

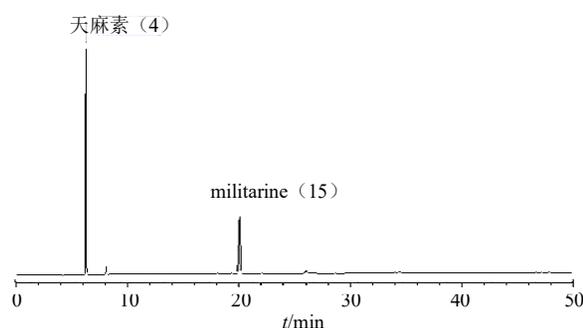


图 3 混合对照品指纹图谱
Fig. 3 Fingerprint of mixed reference of *B. striata*

2.3.2 相似度评价 将白及、黄花白及样品的cdf格式指纹图谱数据导入 ChemPattern™ 软件,采用夹角余弦算法对数据进行处理分析后计算其相似度,利用 Origin2022 软件将白及和黄花白及相似度结果分别与白及共有模式特征图谱两两比较进行相似度分析,如图 4 所示。以共有模式特

征图谱为参照,从图 4 中可以直观看到每类样本的相似度分布范围,45 批白及与共有模式相似度较高,相似度在 0.74~0.97(均值 0.89);29 批黄花白及的相似度在 0.44~0.83(均值 0.67),仅个别样品(S61、S62、S63、S70)与白及相似度较高,不易区分。

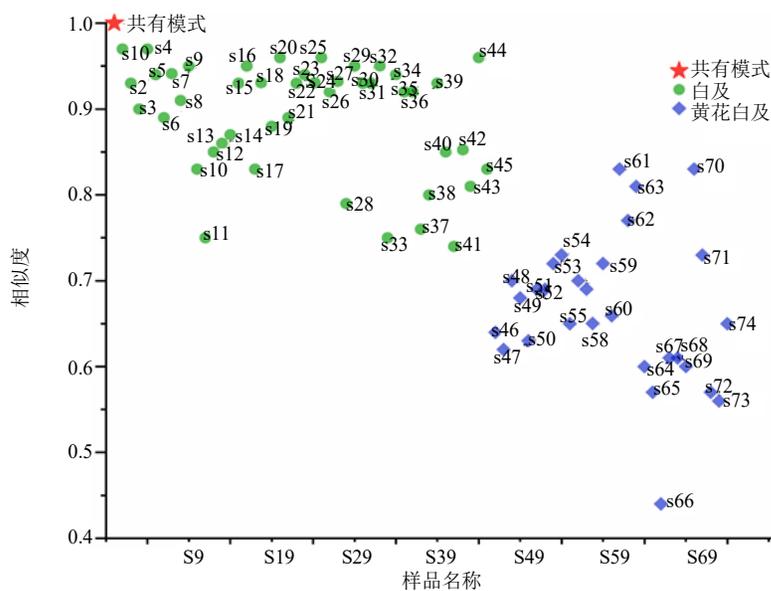


图 4 白及、黄花白及相似度分析散点图

Fig. 4 Scatter plot of similarity analysis of *B. striata* and *B. ochracea*

2.4 化学计量学分析

2.4.1 聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 以指纹图谱中得到的 19 个共有峰峰面积为变量,以 Euclidean 为测度,最长距离为聚类方法,采用夹角余弦算法对白及和黄花白及进行聚类分

析,结果见图 5。当距离为 0.5 时,74 批样品可聚为 2 类,35 批白及、5 批黄花白及(S61、S62、S63、S70、S71)聚为一类,剩余的 24 批黄花白及与 10 批白及(S14、S17、S28、S37、S38、S40、S41、S42、S43、S45)聚为一类。对其深入分析发现,

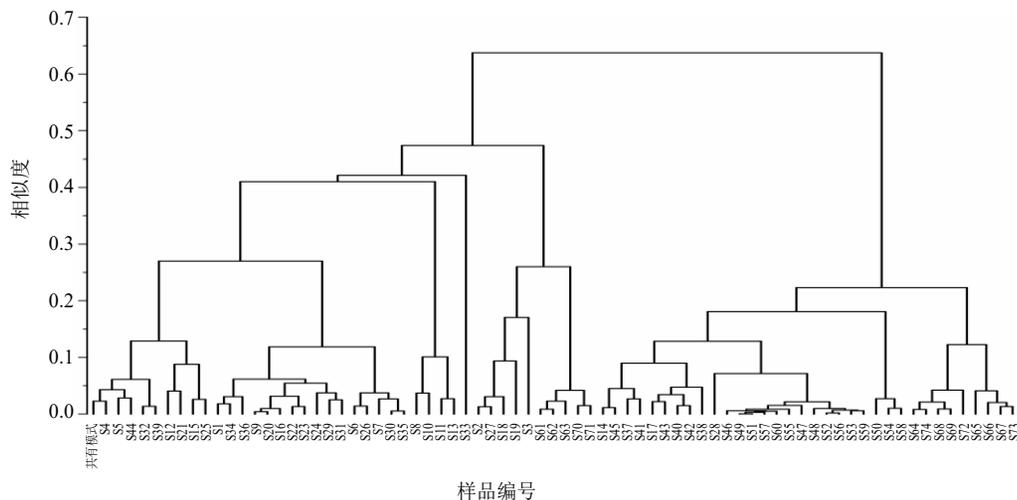


图 5 白及、黄花白及的聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of *B. striata* and *B. ochracea*

10批聚错类白及中的18号峰的平均峰面积显著大于其余36批白及 ($P < 0.01$), 而在变量重要性投影(variable importance projection, VIP)图中, 18号峰又是对白及与黄花白及分类影响最大的峰, 这可能是其聚错类的原因, 聚类分析方法不能将白及与黄花白及区分开。

2.4.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 将74批样品的19个共有峰峰面积经归一化处理后导入到SIMCA14.1软件建立PCA模型, 采用等方差法(UV)法进行缩放, 提取3个主成分, 得到模型解释参数 R^2_X 为0.71, 预测能力参数 Q^2 为0.40, PCA得分图如图6所示。根据主成分结果分析, 对2类样品具有重要鉴别的变量PC1得分50.10%、PC2得分12.60%、PC3得分8.39%, 三者之和为71.09%, 表明提取的3个主成分可以解释71.09%的原始变量, 可解释样品大部分样品信息。虽然模型的预测能力稍低, 且白及、黄花白及样品有部分重叠, 但大部分样品可基本分为2类, 与聚类结果较为一致。

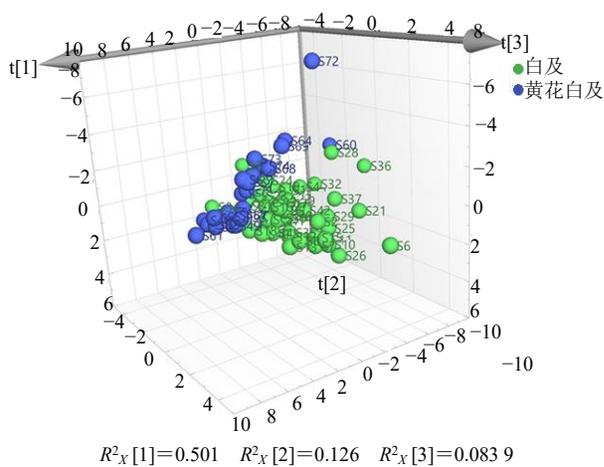


图6 白及、黄花白及的PCA得分图

Fig. 6 Principal component score chart of *B. striata* and *B. ochracea*

2.4.3 偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 将74批样品的共有峰峰面积经归一化处理后组成 19×74 阶矩阵导入SIMCA14.1软件进行PLS-DA分析, 结果见图7。前三个潜变量可以解释样本57.70%的变异信息, 模型参数 R^2_Y 为0.85, Q^2 为0.80, 均大于0.5, 说明模型有较好的稳定性和预测能力^[21]。从图7中可以看出, 与PCA模型相比, 白及、黄花

白及样品可以明显分为2类, 分类效果显著, 表明该方法分类效果较好。为验证该模型是否过度拟合, 利用SIMCA14.1软件对其进行了200次置换检验, 结果如图8所示, 左端随机排列的 R^2 、 Q^2 均小于右端的原始值, 且 Q^2 的回归曲线是相交于Y轴的负轴^[22], 表明模型拟合良好, 没有过拟合。PLS-DA模型中的VIP图见图9, VIP值越大

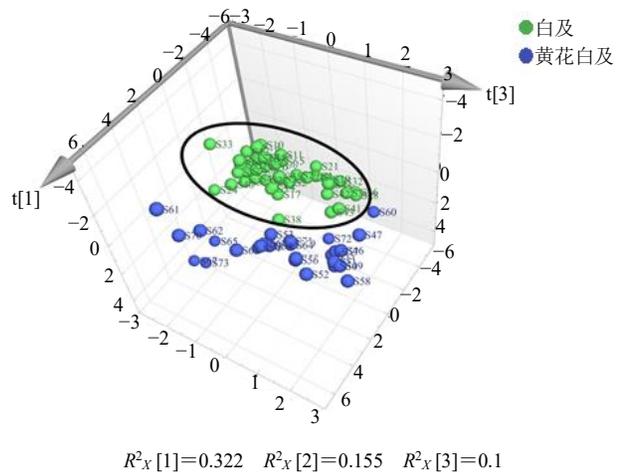


图7 白及、黄花白及的PLS-DA分析

Fig. 7 PLS-DA analysis of *B. striata* and *B. ochracea*

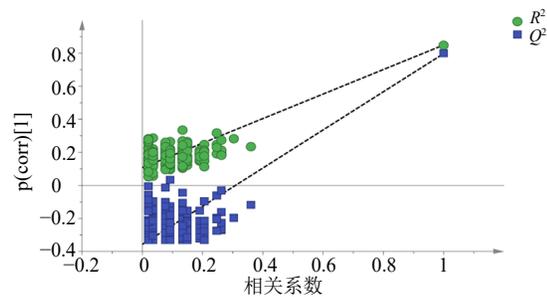


图8 PLS-DA模型的置换检验结果 (n=200)

Fig. 8 Permutation test results of PLS-DA model (n=200)

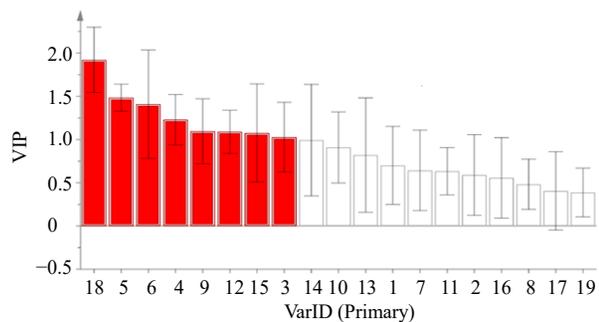


图9 白及、黄花白及19个共有峰的的VIP值图

Fig. 9 VIP values of 19 common peaks of *B. striata* and *B. ochracea*

表明该峰的差异对白及与黄花白及分类的贡献越高,一般以 $VIP > 1$ 表示对样品质量影响有统计学意义。以 $VIP > 1$ 为阈值,共筛选出了 8 个共有峰,从图中可以看出,对样品质量影响较大的峰依次是峰 18 > 峰 5 > 峰 6 > 峰 4 (天麻素) > 峰 9 > 峰 12 > 峰 15 (militarine) > 峰 3,提示这 8 个共有峰是引起白及与黄花白及饮片质量差异的主要变量。

通过 PLA-DA 分析结合 VIP 值筛选出了对白及、黄花白及样品质量影响较大的 8 个峰,平均峰面积占比 69.74%。利用 Graphpad 软件对这 8 个共有峰峰面积进行对比分析,结果见图 10。发现影响白及与黄花白及饮片质量差异的这 8 个共有峰,

在白及中的平均峰面积均小于黄花白及,二者除了在 militarine 成分上没有显著性差异外 ($P > 0.05$),其余 7 个峰的峰面积均有极显著性差异 ($P < 0.01$)。在本研究中,白及与黄花白及中的 militarine 成分没有显著差异,这可能与不同生长环境以及不同栽培方式的化学成分累积的差异有关。野生白及极为稀少,现多为栽培白及,有研究表明栽培白及中的 militarine 含量整体低于野生白及 ($P < 0.05$) [23],这就提醒研究者在人工培育白及时应注意其指标成分含量的变化是否与栽培品有较大差异,在发展人工栽培技术的同时兼顾药材质量,保证白及质量与临床疗效的一致性。

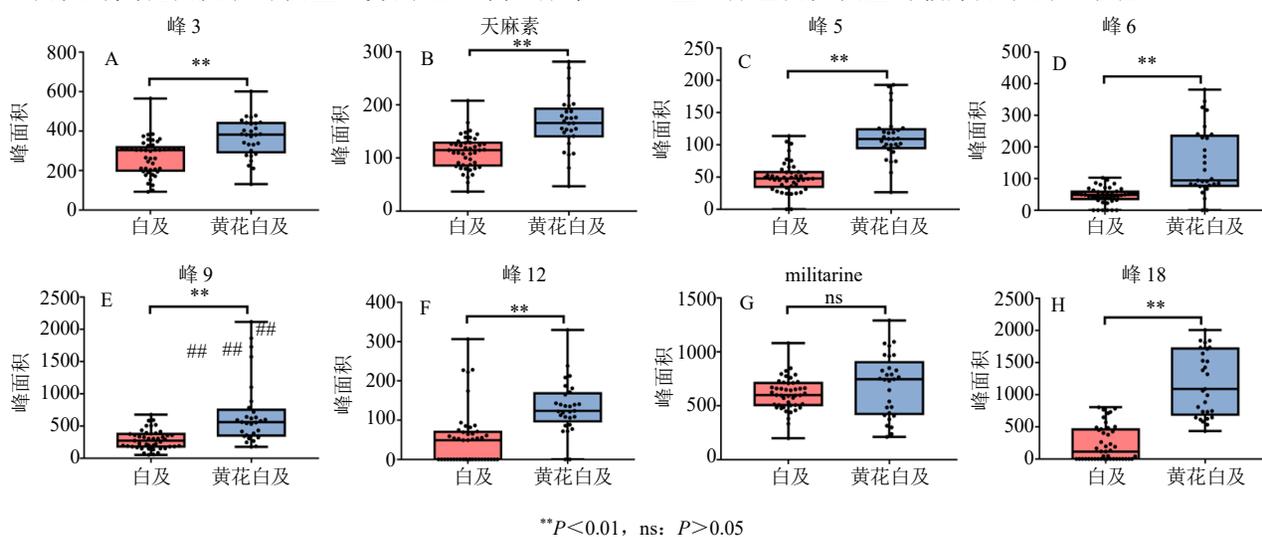


图 10 白及、黄花白及 8 个共有峰峰面积箱形图

Fig. 10 Box diagram of eight common peak areas of *B. striata* and *B. ochracea*

3 讨论

3.1 样品的采集

为了深入了解白及目前真实的市场情况,本研究从药材市场、医院、药店等多渠道采集实验样品,包含了白及的道地产区贵州以及主产区云南,确保采集样品的代表性。

3.2 指标成分的选择

相比于《中国药典》2015 年版,《中国药典》2020 年版新增了 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯 (militarine) 的含量测定项目,考虑到中药活性成分的复杂多样性,仅单一成分作为测定指标不够全面,因此又增选了白及化学成分研究中常用的成分天麻素[23,24]作为测量指标,探讨其是否可以用于白及与黄花白及的质量评价研究。从 PLS-DA 分析结果中可以看出,白及与黄花白及中的天麻素具有极显著差异 ($P < 0.01$),这表明将天

麻素用于二者的质量评价研究是可行的。另一方面,天麻素具有抗惊厥、镇痛、降血压及保护神经细胞等作用[25],在白及发挥中枢神经系统药理作用方面起着重要作用,因此建议加大对白及中该成分的研究力度,进一步完善白及的质量控制。

3.3 色谱条件的选择

由于药典中还未收录白及的指纹图谱方法,因此本实验基于文献方法开展了白及的指纹图谱研究:①预实验参照文献报道[23, 26]中白及供试品溶液的制备方法进行了研究,发现以甲醇为溶剂提取的供试品溶液色谱中不含有天麻素成分,以 50%乙醇为溶剂制备的供试品溶液色谱中可检测到天麻素[36]成分。②实验针对供试品溶液的进样量进行预试,比较了进样量为 2、5、10、20 μL 时,色谱峰的峰形、峰面积大小以及分离度变化,结果显示进样量 10 μL 时,峰形最优,峰面积适

中, 分离度较好。③考察了不同流速、不同柱温对色谱峰的影响, 发现体积流量为 1.0 mL/min、柱温为 30 °C 时色谱峰的分离效果较好。④比较了白及液相色谱在紫外检测器 220、230、270、280 nm 波长下的紫外吸收情况, 发现其在 280 nm 波长下色谱峰的响应值最佳, 检出的色谱信息较多, 能够较全面地反映样品的图谱特征。

3.4 化学计量学方法特点分析

本研究所采用的化学计量学方法包括无监督的分类模型 (HCA、PCA) 和有监督的分类模型 (PLS-DA)。聚类分析、PCA 分析结果大致能将样品区分为 2 类, 个别样品不能区分; PLS-DA 分析能明确的将样品区分为白及和黄花白及。其中聚类分析^[27]是对数据的初步探索, 具有直观、结论形式简明的优点, 但当样品量过大时, 聚类分析就无法对分类结果的准确性进行预测。PCA 是在力求数据信息丢失最少的原则下, 对高维的变量进行降维, 使大部分数据信息包含在较少的新变量上, 新生成的变量相互正交, 彼此独立^[28]。因此常利用 PCA 的降维功能, 来评估测量的重复性并检测出明显的离群值, 发现其潜在的组间区分趋势, 为后续的分类或预测的多元统计分析作基础^[29]。而 PLS-DA 分析是一种潜在的变量分类指向, 有利于数据模型指导样本分类和寻找组间的差异^[30], 因而可将样品明确区分。

4 讨论

综上, 本研究基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学方法对白及和黄花白及进行定性辨识研究, 建立了白及、黄花白及指纹图谱, 对二者进行了相似度评价、HCA、PCA 和 PLS-DA 分析。相似度评价结果与 HCA、PCA 分析结果较为一致, 样品能大致被分为 2 类, 但存在一定偏差; PLS-DA 分析能将白及与黄花白及样品完全分开, 并筛选了 8 个影响白及、黄花白及质量差异的共有峰, 二者除 *militarine* 峰无显著性差异外, 其余 7 个共有峰峰面积均存在极显著差异。本研究建立的白及与黄花白及的定性辨识方法具有较高的可行性, 可为白及等易掺伪中药的质量评价方法的建立提供一定的参考。

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: 106.

[2] Niu J F, Wang S P, Wang B L, *et al.* Structure and anti-tumor activity of a polysaccharide from *Bletilla ochracea*

schltr [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 1548-1555.

[3] 陈思思, 吴蓓, 谭婷, 等. 白及多糖 BSP-1 的分离纯化、结构表征及抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(8): 1921-1926.

[4] 李浩宇, 史珍珍, 舒立峰, 等. 白及多糖抗矽肺大鼠肺纤维化活性研究 [J]. *中药材*, 2016, 39(7): 1638-1642.

[5] 刘媛, 陈洁, 孙辉, 等. 中药治疗肺结核的用药规律及其核心药物作用机制的探讨 [J]. *中国防痨杂志*, 2022, 44(2): 131-140.

[6] 高俊, 丁兴红, 丁志山, 等. 白及对阿司匹林致大鼠胃溃疡的治疗作用研究 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43(2): 182-187.

[7] 蒋俊, 陈红霞, 汤兴利, 等. 基于中医药美白理论的白及研发思考 [J]. *中草药*, 2017, 48(11): 2313-2320.

[8] 李萌, 刘方舟, 杜昱, 等. 运用数据挖掘技术分析中医美容外用方剂配伍规律 [J]. *新中医*, 2022, 54(12): 16-22.

[9] 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: 583.

[10] 甘肃省药品监督管理局. 甘肃省中药材标准: 2020 年版 [M]. 兰州: 兰州大学出版社, 2021.

[11] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准: 2003 年版 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 421.

[12] 陈美君, 李峰庆, 陈鸿平, 等. 中药白及与黄花白及的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. *中药与临床*, 2017, 8(5): 8-14.

[13] 杨丽云, 程远辉, 苏泽春, 等. 3 种白及属植物化学成分分析 [J]. *安徽农业科学*, 2021, 49(19): 173-176.

[14] 陈美君, 李峰庆, 吕蒙, 等. 白及与其混伪品 ITS2 序列二级结构比较与鉴别 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(15): 46-52.

[15] 李明华, 程显隆, 李宁新, 等. 白及的质量问题及真伪鉴别方法 [J]. *中国药事*, 2018, 32(11): 1490-1499.

[16] 李灿, 曾娟, 龙雨青, 等. HPLC 指纹图谱结合多模式化学计量学方法评价枳壳药材质量 [J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(4): 665-676.

[17] 刘天亮, 杨林林, 董诚明, 等. 基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(15): 4833-4843.

[18] 谢苏梦, 季巧遇, 吕尚, 等. 不同产地野菊花 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(24): 7616-7623.

[19] 张艳欣, 吴佩颖, 王丹丹. 中药指纹图谱中常用的数理统计方法 [J]. *上海医药*, 2019, 40(9): 74-77.

[20] Rebiai A, Hemmami H, Zeghoud S, *et al.* Current application of chemometrics analysis in authentication of natural products: A review [J]. *Comb Chem High*

- Throughput Screen*, 2022, 25(6): 945-972.
- [21] 闫凯莉, 尹程程, 刘梦瑶, 等. 芩连润肺汤的 HPLC 指纹图谱建立、含量测定及多元统计分析 [J]. 中国药房, 2021, 32(16): 1956-1963.
- [22] 蒋勋, 陶会, 宋杰玉, 等. 不同等级普安红茶的成分差异及其品质特征 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(13): 4235-4241.
- [23] 周海婷, 陈志敏, 李文兵, 等. 野生与栽培白及 HPLC 指纹图谱建立及天麻素与 militarine 含量测定 [J]. 中药材, 2018, 41(11): 2527-2533.
- [24] 秦亚东, 汪荣斌, 方凤满, 等. 化学模式识别分析白及不同采收期次生代谢产物动态变化特征 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(1): 11-17.
- [25] Wang Y, Wu Z, Liu X, *et al.* Gastrodin ameliorates parkinson's disease by downregulating connexin 43 [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(2): 585-590.
- [26] 刘刚, 丁志山, 刘育辰, 等. 白及药材的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析 [J]. 中国药房, 2018, 29(22): 3050-3053.
- [27] 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.
- [28] 相倩倩, 张云权, 王小花, 等. 化学计量学方法在蜂蜜鉴别中的应用研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48(8): 32-40.
- [29] Se K W, Ghoshal S K, Wahab R A, *et al.* A simple approach for rapid detection and quantification of adulterants in stingless bees (*Heterotrigona itama*) honey [J]. *Food Res Int*, 2018, 105: 453-460.
- [30] Lennart E, Johan T, Wold S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models [J]. *J Chemomet*, 2008, 22(11/12): 594-600.

[责任编辑 时圣明]