

基于指纹图谱结合化学模式识别对接骨草的质量评价

文 阳¹, 海来约布^{2, 3, 4#}, 蔡晓霞⁵, 地久此呷¹, 兰建龙¹, 曲别军长¹, 马 权¹, 刘 圆^{1, 3, 4}, 李文兵^{1, 3, 4*}

1. 西南民族大学, 四川 成都 610041

2. 四川中医药高等专科学校, 四川 绵阳 621000

3. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225

4. 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川 成都 610225

5. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830054

摘要: **目的** 建立接骨草 *Sambucus javanica* 的 HPLC 指纹图谱, 并结合化学模式识别为接骨草药材质量评价及临床应用提供参考。**方法** 采用 HPLC-DAD 法, 以乙腈-0.2%磷酸溶液梯度洗脱, 建立接骨草指纹图谱, 同时测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸的含量; 采用相似度评价、聚类分析 (cluster analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 等化学模式识别对差异性特征成分进行筛选。**结果** 建立的指纹图谱方法符合方法学要求, 17 批接骨草药材 HPLC 指纹图谱共标定 9 个共有峰, 相似度均大于 0.9, 通过聚类分析将不同产地接骨草分为 3 类, 聚类分析与主成分分析结果一致; 综合分析筛选绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸作为接骨草有效成分, 质量分数分别在 0.060%~1.007%、0.014%~0.074%、0.004%~0.151%。**结论** 采用指纹图谱结合化学模式识别技术可快速、有效地筛选出接骨草的差异性特征成分, 为接骨草药材质量评价及临床应用提供参考。

关键词: 接骨草; 指纹图谱; 差异特征成分; 化学模式识别; 绿原酸; 新绿原酸; 隐绿原酸

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)24-8206-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.025

Evaluation of quality markers of *Sambucus javanica* based on fingerprint and chemical pattern recognition

WEN Yang¹, HAILAI Yue-bu^{2, 3, 4}, CAI Xiao-xia⁵, DIJIU Ci-ga¹, LAN Jian-long¹, QUBIE Jun-zhang¹, MA Quan¹, LIU Yuan^{1, 3, 4}, LI Wen-bing^{1, 3, 4}

1. Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang 621000, China

3. Sichuan Provincial Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering Laboratory, Chengdu 610225, China

4. Tibetan Plateau Ethnic Medicinal Resources Protection and Utilization Key Laboratory of National Ethnic Affairs Commission of China, Chengdu 610225, China

5. College of pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint of *Sambucus javanica*, combined with chemical pattern recognition, screening quality markers, to provide reference for the quality evaluation and clinical application of *S. javanica*. **Methods** HPLC-DAD was used to establish the fingerprint of *S. javanica* by gradient elutablon with acetonitrile 0.2% phosphoric acid solution, and the contents of neochloric acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid were determined at the same time. Chemical pattern recognition such as similarity evaluation,

收稿日期: 2023-05-06

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1708005); 四川省药品监督管理局中药 (民族药) 标准提升 (510201202102305); 国家民委领军人才支持计划 (2021 年); 西南民族大学研究生创新型科研项目 (ZD2022662)

作者简介: 文 阳 (1999—), 男, 彝族, 贵州威宁县人, 硕士研究生, 主要从事中药炮制学研究。Tel: 18485779481 E-mail: 2483239049@qq.com

***通信作者:** 李文兵 (1988—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为民族药炮制工艺及质量标准。

Tel: (028)89165778 E-mail: 285892232@qq.com

#共同第一作者: 海来约布 (1994—), 男, 彝族, 四川越西县人, 硕士研究生, 主要从事民族药资源与鉴定。

Tel: 13880436653 E-mail: 1157820560@qq.com

cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used to screen quality markers.

Results The established fingerprint method meets the requirements of methodology. A total of nine common peaks are calibrated in the HPLC fingerprint of 17 batches of *S. javanica*, and the similarity is greater than 0.9. Elderberry from different producing areas are divided into three categories through cluster analysis. The results of cluster analysis with principal component analysis. Chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and neochlorogenic acid are selected as the Q-marker of *S. javanica* by comprehensive analysis, and the mass fraction are 0.060%—1.007%, 0.014%—0.074% and 0.004%—0.151% respectively. **Conclusion** Using fingerprint combined with chemical pattern recognition technology can quickly and effectively screen *S. javanica* Q-marker, which provides a reference for the quality evaluation and clinical application of *S. javanica*.

Key words: *Sambucus javanica* Blume.; fingerprint; Q-Marker; chemical pattern recognition; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; neochlorogenic acid

接骨草又名陆英,为忍冬科接骨木属植物接骨草 *Sambucus javanica* Blume. 的干燥全草,具有疏肝健脾、活血化瘀、利尿消肿的功效,用于急性病毒性肝炎,肾炎水肿,跌扑损伤,骨折^[1]。接骨草最早以陆英之名在《神农本草经》中记载:“主骨间诸痹,四肢拘挛疼痛,膝寒痛”^[2]。说明其最早用于治疗骨科疾病,与现代羌医临床用于治疗骨伤骨病一致。其资源非常丰富,广泛分布于我国各地山坡、林下、沟边和草丛中^[3]。

近年来,国内外学者对接骨草开展了较为广泛的研究,但多集中在化学成分和药理活性,对于其质量评价研究较少。现代研究表明,接骨草化学成分主要有黄酮类、苯丙素类、甾体类、酚酸类及挥发油类成分^[4-8]。《卫生部药品标准中药材第一册》(1992 年版)收载接骨草标准(陆英),但仅有简单的性状描述,缺乏含量测定项,难以全面控制和评价药材的质量。本研究以不同产地 17 批接骨草为研究对象,通过 HPLC 指纹图谱对接骨草主要化学成分进行宏观整体表征,并结合化学模式识别谱对指纹图谱中提取共有峰的面积进行分析,从而得到影响不同产地质量的特征化学成分并进行含量测定,拟为接骨草质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司), ME-104/02 型万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), ME-55/02 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), XP26 型百万分之一电子天平(Mettler Toledo 公司), KQ300DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), HWS-26 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司), 1810D 型摩尔超纯水器(重庆摩尔

水处理设备有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸(批号 MUST-21070910, 质量分数 $\geq 99.60\%$)、新绿原酸(批号 MUST-21030108, 质量分数 $\geq 99.67\%$)、隐绿原酸(批号 MUST-21082610, 质量分数 $\geq 99.88\%$), 均购于成都曼思特生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

17 批接骨草药材分别采自于四川省成都市、阿坝州和西藏自治区林芝市,经西南民族大学青藏高原研究院刘圆教授鉴定为忍冬科接骨木属植物接骨草 *S. javanica* Blume. 的干燥全草,信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 4 μ m) 色谱柱,流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱, 0~11 min, 90%~82% B; 11~30 min, 82%~80% B; 30~35 min, 80%~90% B; 检测波长为 327 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 进样体积为 10 μ L。

2.2 供试品溶液的制备

取接骨草粉末(过三号筛)0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇 20 mL, 密塞,称定质量,回流提取 30 min, 放冷,再称定质量,用 50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备

分别取新绿原酸 5.09 mg、绿原酸 5.04 mg、隐绿原酸 5.30 mg 对照品,精密称定,置于 5 mL 量瓶,用 50%甲醇稀释至刻度,得混合对照品母液,质量浓度分别为 1.018、1.008、1.060 mg/mL;再精密量取母液 1 mL,置于 5 mL 量瓶,用 50%甲醇稀释至刻度,制

表 1 接骨草样品来源信息

Table 1 Sample information of *S. javanica*

编号	地点	东经 (E)	北纬 (N)	海拔/m	采收时间
S1	茂县赤不苏镇雅都村	103°19'40.04"	31°53'12.46"	2 798.60	2021-05-14
S2	茂县九鼎山	103°53'23.16"	31°42'50.19"	2 882.10	2021-05-15
S3	茂县九鼎山	103°53'09.78"	31°42'20.86"	2 683.80	2021-05-15
S4	茂县九鼎山	103°52'48.13"	31°41'54.85"	2 487.60	2021-05-15
S5	汶川县耿达镇黄草坪	103°53'23.16"	31°42'50.19"	2 299.64	2021-05-20
S6	汶川县卧龙镇三圣沟	103°53'17.78"	31°42'50.86"	2 522.10	2021-05-21
S7	汶川县卧龙镇新店子	103°54'20.53"	31°41'23.30"	2 262.20	2021-05-22
S8	汶川县卧龙镇银龙峡谷	103°54'21.90"	31°41'19.68"	2 257.23	2021-05-22
S9	汶川县卧龙镇三家寨	103°54'26.54"	31°41'13.21"	2 372.05	2021-05-22
S10	成都市双流区黄甲镇	103°19'40.19"	31°51'31.07"	517.20	2021-05-31
S11	成都市龙泉驿区山泉镇大佛村	103°19'52.12"	31°50'17.64"	819.90	2021-05-31
S12	成都市都江堰玉堂镇	103°19'52.65"	31°49'27.97"	724.80	2021-06-01
S13	黑水县达古冰川	103°20'23.59"	31°08'13.81"	2 721.00	2021-06-21
S14	黑水县多吉之家	103°00'56.65"	30°54'29.08"	2 363.40	2021-06-19
S15	茂县凤仪镇南庄村下南庄组	103°04'48.98"	30°57'07.08"	1 714.00	2021-06-19
S16	茂县赤不苏镇后村	103°04'48.85"	30°57'06.53"	2 414.90	2021-06-20
S17	西藏自治区林芝市	103°03'56.23"	30°56'07.59"	3 760.00	2021-07-21

得含新绿原酸 0.203 6 mg/mL、绿原酸 0.201 6 mg/mL、隐绿原酸 0.212 0 mg/mL 的混合对照品。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取同一接骨草供试品 (S1), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液一份, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以绿原酸 (3 号峰) 为参照峰 (S), 计算各特征峰的相对保留时间与相对峰面积。各特征峰的相对保留时间 RSD 值分别为 0.06%、0.05%、0.08%、0.10%、0.07%、0.09%、0.12%、0.07%, 各特征峰的相对保留峰面积分别为 0.25%、0.96%、0.32%, 1.43%、1.23%、0.79%、1.86%、0.88% 均小于 2%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性考察 取同一接骨草供试品 (S1), 按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 以绿原酸 (3 号峰) 为参照峰 (S), 计算各特征峰的相对保留时间与相对峰面积。各特征峰的相对保留时间 RSD 值分别为 0.09%、0.07%、0.03%、0.06%、0.08%、0.08%、0.09%、0.10%, 各特征峰的相对峰面积 RSD 值分别为 0.35%、0.89%、0.11%、0.81%、1.01%、1.89%、1.42%、1.43% 均小于 2%, 表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一接骨草供试品 (S1), 按“2.2”项下方法制备供试品一份, 按“2.1”项下色谱条件分别于配制后 0、4、10、14、24 h 进样, 以绿原酸 (3 号峰) 为参照峰 (S), 计算各特征峰的

相对保留时间与相对峰面积。各特征峰的相对保留时间 RSD 值分别为 0.06%、0.06%、0.03%、0.03%、0.03%、0.04%、0.04%、0.04%, 各特征峰相对峰面积 RSD 值分别为 0.88%、1.14%、1.19%、0.69%、1.11%、1.26%、1.36%、1.85%, 均小于 2%, 表明稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立及相似度评价

取 17 批不同产地接骨草药材按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件进样并记录色谱数据, 将所得的 17 批接骨草色谱图以 AIA 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.1 版本)”, 设 S6 为参照峰多点校正得到接骨草样品的指纹图谱 (图 1), 并进行相似度评价。17 批接骨草指纹图谱的共有峰有 9 个, 通过对照品图谱对比, 指认其中 3 个色谱峰, 见图 2, 即 1 号峰为新绿原酸、2 号峰为绿原酸及 3 号峰为隐绿原酸。2 号峰峰面积较大, 峰形与分离度较好, 故选择 2 号峰 (绿原酸) 为参照峰 (S), 计算共有峰相对保留时间 RSD% 均小于 0.5%, 但共有峰相对峰面积为 44.68%~136.11%, 差异较大, 表明 17 批接骨草药材中 9 个化合物之间含量差异较大, 相对峰面积结果见表 2。以接骨草药材指纹图谱为对照, 17 批接骨草药材的相似度为 0.926~0.998, 相似度均大于 0.9, 说明不同接骨草药材批次整体相似度较高, 相似度评价见表 3。

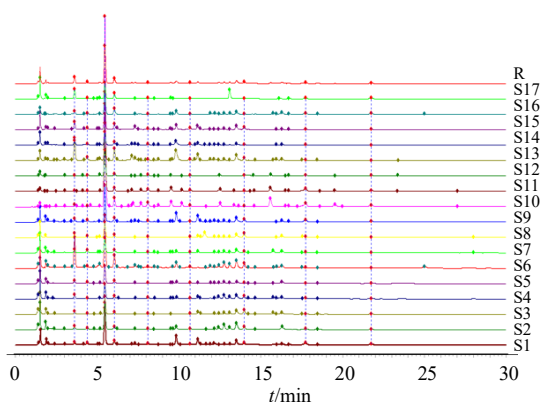


图 1 17 批接骨草药材的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of 17 batches of *S. javanica*

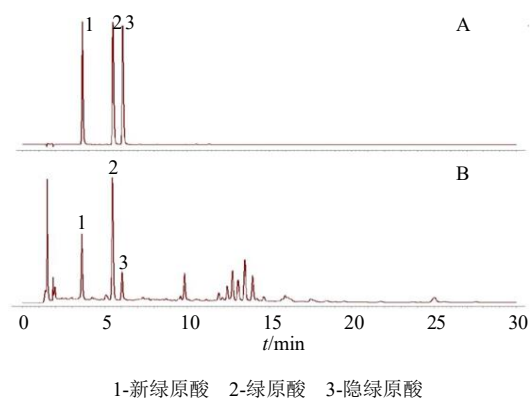


图 2 混合对照品 (A) 和样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC of reference substance (A) and samples (B)

表 2 接骨草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 *S. javanica*

批次	相对峰面积								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S1	0.069 3	0.047 5	1.000 0	0.125 0	0.045 5	0.037 6	0.090 4	0.138 2	0.080 0
S2	0.124 9	0.072 5	1.000 0	0.124 4	0.030 8	0.052 9	0.146 2	0.084 0	0.047 5
S3	0.142 3	0.059 5	1.000 0	0.140 1	0.044 5	0.045 0	0.226 3	0.057 0	0.050 7
S4	0.255 1	0.094 4	1.000 0	0.221 7	0.113 8	0.076 8	0.209 3	0.121 2	0.060 8
S5	0.129 2	0.086 2	1.000 0	0.180 2	0.026 6	0.054 0	0.049 8	0.069 1	0.059 3
S6	0.541 4	0.031 6	1.000 0	0.244 6	0.023 6	0.038 7	0.095 7	0.021 4	0.013 6
S7	0.205 4	0.198 5	1.000 0	0.223 9	0.042 9	0.049 3	0.115 0	0.125 2	0.059 9
S8	0.243 7	0.107 7	1.000 0	0.199 9	0.033 9	0.037 4	0.329 4	0.795 8	0.059 2
S9	0.246 3	0.108 9	1.000 0	0.180 2	0.047 0	0.072 5	0.204 6	0.088 1	0.039 2
S10	0.011 1	0.005 0	1.000 0	0.045 1	0.027 9	0.012 1	0.004 5	0.043 0	0.030 1
S11	0.014 0	0.015 2	1.000 0	0.046 9	0.038 1	0.029 7	0.017 6	0.085 7	0.043 9
S12	0.029 1	0.056 3	1.000 0	0.096 9	0.051 7	0.052 8	0.125 6	0.122 3	0.067 5
S13	0.562 0	0.099 3	1.000 0	0.320 5	0.039 6	0.046 7	0.077 0	0.023 4	0.189 3
S14	0.336 2	0.142 7	1.000 0	0.272 8	0.100 7	0.144 4	0.062 3	0.085 1	0.050 1
S15	0.264 3	0.065 4	1.000 0	0.217 4	0.064 6	0.099 8	0.115 7	0.052 1	0.051 9
S16	0.139 0	0.071 9	1.000 0	0.278 6	0.023 0	0.031 2	0.028 4	0.113 7	0.109 4
S17	0.555 3	0.073 3	1.000 0	0.353 6	0.072 9	0.044 3	0.043 1	0.111 2	0.156 0
RSD/%	77.231 7	57.536 7	0	44.683 8	51.816 3	54.630 3	73.653 8	136.114 3	62.802 6

表 3 17 批接骨草药材相似度评价结果

Table 3 Results of similarity evaluation of 17 batches of *S. javanica* fingerprints

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.994	S7	0.983	S13	0.929
S2	0.996	S8	0.968	S14	0.975
S3	0.980	S9	0.993	S15	0.989
S4	0.981	S10	0.982	S16	0.988
S5	0.998	S11	0.984	S17	0.926
S6	0.940	S12	0.988		

2.6 基于化学模式识别对接骨草药材的分析

2.6.1 聚类分析 (cluster analysis, CA) 利用 SPSS.26.0 软件以接骨草指纹图谱标定的 9 个共有峰的峰面积为变量, 对 17 批接骨草药材数据进行聚类分析, 采用最远邻元素的聚类方法, 以平方欧式距离为样品间距离进行聚类分析, 结果见图 3。当分类距离 15 时, 显示 17 批样品共聚为 3 类, 其中来自成都市双流区黄甲镇产地的 S10 单独聚为一类为, S6 (汶川县卧龙镇三圣沟)、S9 (汶川县卧

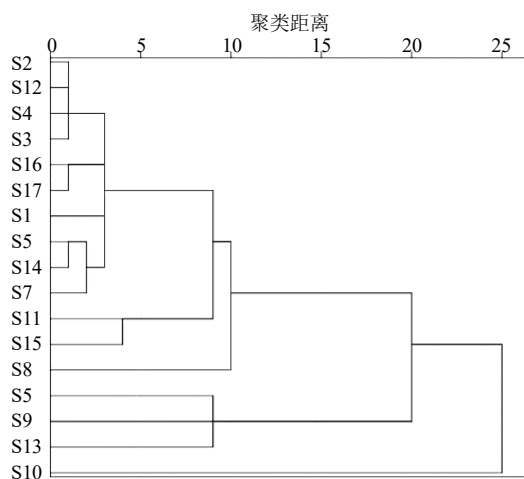


图 3 17 批接骨草药材聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis of 17 batches of *S. javanica*

龙镇三家寨)、S13(黑水县达古冰川)聚为一类,其余成都产地、汶川产地、黑水产地、全部茂县产地和西藏产地聚为一类。

2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 采用 SPSS.26.0 软件对 17 批接骨草的 9 个共有峰峰面积进行降维标准化处理,计算相关系数载荷矩阵、特征值和累积方差贡献率,结果显示 KMO 值为 $0.533 > 0.5$,代表各变量相关性较好,以主成分特征值 > 1 为提取标准,提取得到 3 个主成分 (L1、L2 和 L3),主成分累积方差贡献率为 77.643%,结果见表 4,能基本反映样品共有峰的信息,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 3 个主成分因子的斜率更大,说明所提取的 3 个主成分可以最大程度地代表接骨草药材的整体质量特征。因此可将这 3 个主成分作为接骨草药材的评价指标。初始因子载荷矩阵,见表 5,将其进行正交旋转,旋转后得到的 9 个共有峰成分在 3 个主成分中的旋转矩阵,反映了各变量对主成分的贡献大小,其绝对值越大对该成分在决定样品区分中的作用越大。载荷矩阵结果表明主成分 1 信息主要来自 3 号峰 (绿原酸)、5 号峰、9 号峰,

表 4 特征值及累积方差贡献率

Table 4 Eigenvalue and cumulative variance contribution rate

成分	初始特征值		
	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
L1	3.330	37.004	37.004
L2	2.461	27.346	64.351
L3	1.196	13.292	77.643

表 5 初始因子载荷矩阵

Table 5 Initial factor load matrix

共有峰	载荷		
	L1	L2	L3
1	0.278	0.866	-0.061
2	-0.032	0.713	0.068
3	0.912	-0.302	0.073
4	0.655	0.656	-0.153
5	0.897	-0.351	0.069
6	0.688	0.225	0.221
7	-0.138	0.502	0.812
8	0.310	-0.506	0.595
9	0.774	0.018	-0.302

主成分 2 信息主要来自 1 号峰 (新绿原酸)、4 号峰 (隐绿原酸),主成分 3 信息主要来自 7 号峰。并根据主成分载荷矩阵,计算 3 个主成分得分,3 个主成分得分表达式: $L1 = -0.079 X_1 + 0.023 X_2 + 0.546 X_3 + 0.157 X_4 + 0.518 X_5 + 0.197 X_6 + 0.119 X_7 - 0.075 X_8 + 0.315 X_9$; $L2 = 0.716 X_1 + 0.454 X_2 + 0.190 X_3 + 0.371 X_4 + 0.242 X_5 + 0.006 X_6 + 0.187 X_7 + 0.447 X_8 - 0.004 X_9$; $L3 = 0.033 X_1 - 0.014 X_2 - 0.014 X_3 + 0.119 X_4 - 0.014 X_5 + 0.042 X_6 + 1.396 X_7 + 0.689 X_8 + 0.350 X_9$ 。将 17 批样品各特征向量标准化,代入主成分得分表达式中计算主成分得分,再以每个主成分所对应的贡献率占所提取主成分总的贡献率之和的比例作为权重计算主成分综合模型^[9]: $L_{综} = 0.220 X_1 + 0.098 X_2 + 0.325 X_3 + 0.226 X_4 + 0.330 X_5 + 0.103 X_6 + 0.362 X_7 + 0.240 X_8 + 0.209 X_9$,3 个主成分得分及综合得分情况见表 6,其中 S10 综合

表 6 主成分得分和综合得分

Table 6 Principal component score and comprehensive score table

编号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	综合得分	排名
S10	4.547	1.541	0.452	2.866	1
S6	0.411	3.024	1.579	1.541	2
S13	1.158	2.815	0.739	1.507	3
S9	0.375	1.531	2.773	1.041	4
S11	1.338	-0.293	-0.197	0.561	5
S8	-1.286	0.707	3.537	0.254	6
S1	0.168	-0.159	0.906	0.188	7
S15	0.215	-0.199	-0.265	-0.003	8
S12	-0.335	-1.074	0.210	-0.471	9
S2	-0.661	-0.833	0.166	-0.579	10
S4	-0.538	-0.958	-0.396	-0.623	11
S17	-0.633	-0.569	-1.791	-0.755	12
S16	-0.764	-0.792	-1.667	-0.916	13
S3	-0.983	-1.607	-0.003	-0.963	14
S14	-0.711	-1.085	-2.337	-1.120	15
S7	-1.180	-0.563	-1.557	-1.121	16
S5	-1.120	-1.486	-2.149	-1.406	17

得分为 2.866 远高于其他批次,可单独聚为一类; S6、S9 和 S13 综合得分均大于 1 而小于 2,将该 3 批聚为一类; S2~S5、S7~S9、S11~S12、S14~S17 综合得分均为小于 1,因此将该 13 批样品聚为一类,这与聚类分析结果一致。根据综合得分可知,其值越大表明峰面积相对越大,说明药材含量相对含量越高^[10],可知 S10 批次含量最高, S6、S9 和 S13 批次次之,然后为 S1、S8、S11 批次, S2~S5、S7、S9、S12、S14~S17 样品批次排最后。

用 SIMAC14.1 软件对 17 批接骨草药材样品进行主成分分析,以指纹图谱中的 9 个共有峰峰面积为变量,以此构建 17×9 的原始数据矩阵,绘制 17 批不同产地接骨草样品的 PCA 得分图,见图 4,结果显示 3 个主成分能反映不同产地接骨草的主要特征,说明不同产地接骨草在化学成分含量上存在一定差异。

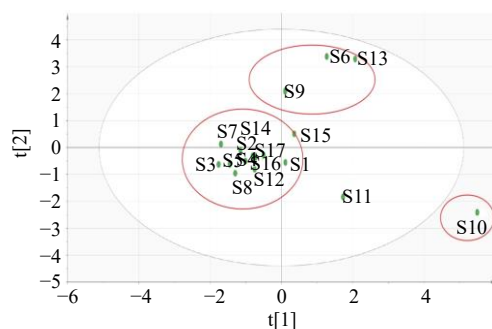


图 4 接骨草 PCA 得分散点图
Fig. 4 PCA scores of *S. javanica*

2.6.3 正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 为了进一步区分不同产地的接骨草组内质量差异,将 17 批样品 9 个共有峰峰面积导入 SIMAC14.1 软件进行 OPLS-DA 方法分析,建立 OPLS-DA 模型,见图 5,结果显示 17 批接骨草样品被分为 3 类,与聚类分析和主成分分析结果一致,结合 OPLS-DA 模型中变量重要性投影值(variable importance in the projection, VIP)(图 6)进行分析,以 $VIP > 1$ 为条件筛选出差异标志物,筛选出 4 个差异标志物,对接骨草样品的影响程度依次为 3 号峰(绿原酸) > 4 号峰(隐绿原酸) > 5 号峰(未知) > 1 号峰(新绿原酸),其对应的 VIP 值依次为 1.155、1.152、1.093、1.086,见表 7,说明绿原酸(3 号峰)、隐绿原酸(4 号峰)、5 号峰及新绿原酸(1 号峰)是不同产地的接骨草有的差异标志物。

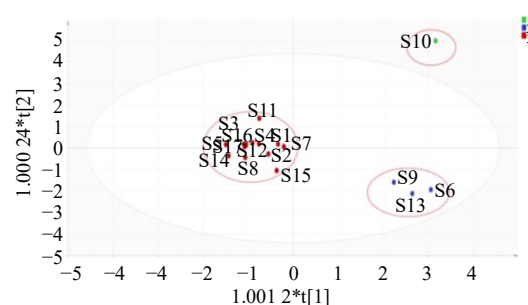


图 5 接骨草样品 OPLS-DA 得分图
Fig. 5 OPLS-DA scores of *S. javanica*

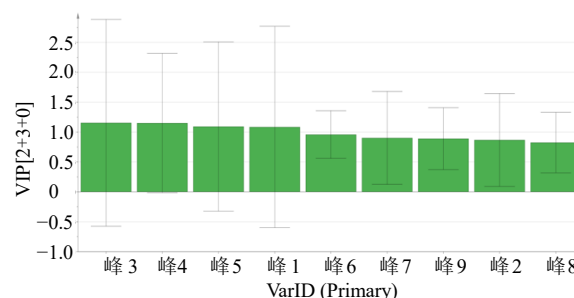


图 6 17 批接骨草样品的 OPLS-DA 的 VIP 图
Fig. 6 VIP value from OPLS-DA load diagram of 17 batches of *S. javanica*

表 7 接骨草各成分 VIP 值

Table 7 VIP values of each component of *S. javanica*

峰号	VIP 值
3	1.155
4	1.152
5	1.093
1	1.086
6	0.959
7	0.903
9	0.891
2	0.869
8	0.825

2.7 接骨草差异特征成分的含量测定

采用指纹图谱结合 CA、PCA 及 PLS-DA 对不同批次的接骨草样品进行研究分析,通过 PCA 可知 3 号峰(绿原酸)、5 号峰、9 号峰,1 号峰(新绿原酸)、4 号峰(隐绿原酸)以及 7 号峰是影响不同批次接骨草样品质量的特征化学成分。由 PLS-DA 结果可知 $VIP > 1$ 的有 3 号峰(绿原酸)、4 号峰(隐绿原酸)、5 号峰及 1 号峰(新绿原酸),表明不同批次间的含量差异较大,是接骨草的差异性特征成分,基于刘昌孝院士^[11-13]提出的于质量标志物(quality marker, Q-Marker)的五大原则既有效性、特有性、传递性与溯源性、可测性,推测 5 号峰不

适合作为接骨草质量标准控制的特征指标。综上，本实验以绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸作为接骨草差异特征成分进行含量测定。

2.7.1 线性关系考察 取新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸混合对照品 5 mL，用 50%甲醇逐级稀释 2 倍成 6 个对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的峰面积，绘制标准曲线，计算线性回归方程及相关系数 (r)，结果见表 8。

表 8 对照品的线性方程、相关系数和线性范围

Table 8 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)
新绿原酸	$Y=26\,481\,X+9\,597\,4$	0.999 6	0.012 7~0.203 6
绿原酸	$Y=29\,328\,X+4\,899\,6$	0.999 9	0.012 6~0.201 6
隐绿原酸	$Y=22\,611\,X+3\,870\,0$	0.999 8	0.013 3~0.212 0

2.7.2 精密度试验 取混合对照品一份，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸峰面积的 RSD 值分别为 1.07%、0.26%、0.27%，结果显示仪器精密度良好。

2.7.3 重复性试验 取接骨草 (S1) 样品按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸质量分数的 RSD 值分别为 0.54%、0.43%、0.44%，结果表明该方法的重复性良好。

2.7.4 稳定性试验 按“2.2”项下方法制备供试品一份，按“2.1”项下色谱条件分别在 0、4、10、14、24 h 进样，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸峰面积的 RSD 值分别为 0.73%、2.23%、1.01%，表明供试品 24 h 内稳定。

2.7.5 加样回收率试验 精密称 S1 样品 0.25 g，共 6 份，分别加入一定量的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸对照品溶液，按“2.2”项下方法制备供试品，按“2.1”项下色谱条件进样，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸的加样回收率分别为 95.26%、96.68%、98.07%，RSD 分别为 1.52%、1.31%、0.99%。

2.7.6 样品含量测定 取 17 批接骨草样品，按“2.2”项下方法制备供试品，按“2.1”项下色谱条件，进样分析，测定 17 批样品新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸含量，结果见表 9，接骨草药材中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸平均质量分数分别为 0.034%、0.190%、0.036%。

表 9 17 批接骨草样品中差异特征成分的含量

Table 9 Contents of Q-Markers in *S. javanica*

批次	绿原酸/%	隐绿原酸/%	新绿原酸/%
S1	0.224	0.031	0.014
S2	0.126	0.021	0.017
S3	0.081	0.017	0.013
S4	0.070	0.022	0.021
S5	0.088	0.023	0.013
S6	0.252	0.090	0.162
S7	0.069	0.023	0.017
S8	0.075	0.022	0.021
S9	0.168	0.035	0.030
S10	1.007	0.062	0.012
S11	0.396	0.025	0.005
S12	0.117	0.016	0.003
S13	0.186	0.083	0.122
S14	0.060	0.023	0.024
S15	0.129	0.039	0.039
S16	0.105	0.041	0.017
S17	0.080	0.042	0.055

3 讨论

本实验考察了不同提取溶剂（水、乙醇、甲醇、70%甲醇、50%甲醇和 30%甲醇）、不同提取时间（15、30、45、60 min）、不同提取方法（超声、回流）、不同料液比（1:20、1:40、1:60）对接骨草药材指纹图谱色谱图及含量测定的影响，结果发现：提取时间、提取方法及料液比对接骨草指纹图谱色谱图及含量测定无明显改变，而 50%甲醇提取的色谱峰较多新绿原酸、绿原酸及隐绿原酸含量较高。故选择料液比为 1:20，50%甲醇超声提取 30 min 为最佳提取方法。同时在《中国药典》2020 年版和文献的洗脱方法基础上进行优化，考察了甲醇-纯水、乙腈-0.2%磷酸水梯度洗脱 2 种流动相体系，结果发现以乙腈-0.2%磷酸水为流动相时，样品的分离度最佳，故选择乙腈-0.2%磷酸水作为流动相；通过全波长扫描，比较不同波长色谱图，发现在 327 nm 处色谱峰目标成分分离度最佳，故选择 327 nm 作为接骨草药材指纹图谱的检测波长。

综上，本实验采用指纹图谱结合相似度评价、CA、PCA、PLS-DA 分析对不同产地接骨草药材进行质量评价研究，筛选出特征性指标成分并进行定量分析。利用 HPLC 建立了 17 批接骨草药材指纹图谱有 9 个共有峰，指认了其中 3 个

特征峰, 分别为新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸。相似度表明 17 批接骨草药材的相似度均大于 0.9, 说明不同接骨草药材批次整体相似度较高。在聚类分析中, 将 17 批样品聚成 3 类, 既 S10 为单独一类, S6、S9、S13 聚为一类, 其余 13 批次聚为一类。PCA 和 OPLS-DA 与 CA 结果一致, 表明 17 批接骨草样品化学成分既有相似性又有差异性, 采用 OPLS-DA 模型 VIP 值筛选出绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸是接骨草的差异性特征成分。研究表明绿原酸具有调控成骨细胞增殖和分化的能力, 也可促进成骨细胞的增殖, 抑制成骨细胞碱性磷酸酶活性, 从而具有一定的成骨活性, 是接骨草的成骨活性成分之一^[14], 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸具有治疗免疫性关节炎的作用^[15], 与接骨草的接骨功效有一定关联性。结合化学模式识别对指纹图谱中提取共有峰的面积进行分析, 并基于中药 Q-Marker 的“五大原则”, 推测绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸为接骨草药材的 Q-Markers, 为接骨草药材质量评价及临床应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 卫生部药品标准: 中药材第一册 [S]. 1992: 23.
- [2] 尚志钧校注. 神农本草经校注 [M]. 北京: 学苑出版社, 2008: 98.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第六十二卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 253.
- [4] 姚元枝, 伍贤进, 黎晓英, 等. 接骨草的化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中成药, 2015, 37(12): 2726-2732.
- [5] 李胜华, 李爱民, 伍贤进. 接骨草化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1502-1504.
- [6] 黄国文, 管天球, 赵雨云, 等. 接骨草总黄酮提取工艺及其抑菌作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(13): 36-41.
- [7] 姚元枝, 李爱民, 全妙华, 等. 接骨草的绿原酸含量测定及方法学考察 [J]. 怀化学院学报, 2013, 32(11): 9-11.
- [8] 黄雅. 接骨草质量控制研究 [D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2017.
- [9] 张文霖. 主成分分析在 SPSS 中的操作应用 [J]. 市场研究, 2005(12): 31-34.
- [10] 朱星宇, 陈勇强. SPSS 多元统计分析及方法应用 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2011.
- [11] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [12] 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.
- [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] 王朝元, 易继凌, 宋超, 等. 绿原酸对体外培养成骨细胞活性的影响 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2013, 32(2): 46-50.
- [15] 李琪, 王博, 李晨阳, 等. 黑骨藤 LC-MS 定性分析及 4 种绿原酸一测多评分析方法 [J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2021, 44(5): 666-673.

[责任编辑 时圣明]