

基于 UPLC 多指标含量测定和指纹图谱的不同种质金银花药材质量评价研究

王 淑¹, 张翠翠¹, 郭凤丹¹, 孙新茹¹, 李圣波², 林慧彬^{1*}, 管仁伟^{1*}

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 山东亚特生态技术股份有限公司, 山东 临沂 276017

摘要: **目的** 建立金银花药材超高效液相色谱 (UPLC) 指纹图谱, 并对有效成分新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、马钱苷、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的含量进行测定, 为不同种质金银花药材的质量评价提供参考。 **方法** 采用超高效液相色谱仪, Thermo Accucore™ C₁₈ 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 体积流量为 0.3 mL/min, 梯度洗脱, 分段检测波长 324 nm (0~13.5 min)、238 nm (13.5~18 min)、354 nm (18~27 min)、324 nm (27~40 min), 柱温 30 ℃, 进样量 2 μL; 通过对照品比对, 对共有峰进行鉴定, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》软件构建指纹图谱, 进行相似度评价; 通过主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 比较不同种质金银花药材的质量差异; 并对不同种质金银花药材 12 种成分的含量进行测定。 **结果** 建立 10 种不同种质金银花指纹图谱, 标定共有峰 11 个, 并指认了 9 个化学成分, 分别为新绿原酸 (1 号峰)、绿原酸 (2 号峰)、隐绿原酸 (3 号峰)、马钱苷 (4 号峰)、断氧化马钱子苷 (5 号峰)、木犀草苷 (7 号峰)、异绿原酸 B (8 号峰)、异绿原酸 A (9 号峰)、异绿原酸 C (11 号峰); 相似度评价结果显示, 10 种金银花指纹图谱相似度在 0.723~0.996, 除 S23 的相似度为 0.723 以外, 其余金银花相似度均大于 0.91; 运用 PCA 和 OPLS-DA 将 6 批金银花明显区分, OPLS-DA 筛选出 4 个差异性标志物, 根据 VIP 值排序, 分别为断氧化马钱子苷>新绿原酸>马钱苷>隐绿原酸; 含量测定结果显示, 不同种质金银花的各发育期成分含量变化不同。 **结论** 通过金银花 UPLC 指纹图谱与多成分化学模式识别研究相结合, 可有效评价不同种质金银花药材的质量差异性, 为不同种质金银花药材的质量控制提供参考。

关键词: 金银花; UPLC 指纹图谱; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 马钱苷; 断氧化马钱子苷; 木犀草苷; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 模式识别; 质量评价

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)03-0947-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.025

Quality evaluation of *Lonicerae Japonicae Flos* with different germplasm based on UPLC content determination and fingerprint

WANG Shu¹, ZHANG Cuicui¹, GUO Fengdan¹, SUN Xinru¹, LI Shengbo², LIN Huibin¹, GUAN Renwei¹

1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

2. Shandong Yate Ecological Technology Co., Ltd., Linyi 276017, China

Abstract: **Objective** To establish ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of Jinyinhua (*Lonicerae Japonicae Flos*), and to determine the contents of effective components such as neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, loganin, sweroside, secoxyloganin, rutin, luteoloside, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, in order to provide reference for quality evaluation of different germplasm of *Lonicerae Japonicae Flos*. **Methods** The analysis was performed on an UPLC (Agilent 1290) with Thermo Accucore™ C₁₈ column (100 mm×4.6 mm, 2.6

收稿日期: 2023-09-06

基金项目: 山东省科技型中小企业创新能力提升工程 (2023TSGC0444); 山东省中医药高层次人才培育项目专项经费资助 (2023143); 全国中药特色技术传承人才培养项目 (202396); 中药资源保障能力提升工程 (202319); 临沂市重点研发计划项目 (2022026); 国家重点研发计划 (2017YFC1701500); 中央本级重大增减支项目 (2060302); 济南市农业应用技术创新计划项目 (CX202112)

作者简介: 王 淑 (1996—), 女, 研究实习生, 研究方向为中药资源与质量控制。Tel: (0531)82949822 E-mail: 2896815226@qq.com

***通信作者:** 林慧彬, 研究员, 博士研究生导师, 从事中药资源与质量控制研究。Tel: (0531)82949822 E-mail: linhuibin68@163.com

管仁伟, 副研究员, 硕士研究生导师, 从事中药资源与质量控制研究。Tel: (0531)82949822 E-mail: guan369happy@163.com

μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution for gradient elution, with flow rate of 0.3 mL/min, detection wavelength of 324 nm (0—13.5 min), 238nm (13.5—18 min), 354 nm (18—27 min), 324 nm (27—40 min), column temperature of 30 °C, and injection volume of 2 μL. The common peaks were identified by comparison of reference materials. The software "TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 Edition)" was used to construct the fingerprint and evaluate the similarity. Through principal component analysis (principal component analysis, PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to compare the quality of *Lonicerae Japonicae Flos* with different germplasm. The contents of 12 components in different germplasm of *Lonicerae Japonicae Flos* were determined. **Results** The fingerprints of 10 different germplasm *Lonicerae Japonicae Flos* were established, 11 peaks were identified, and nine chemical components were identified. They were neochlorogenic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), cryptochlorogenic acid (peak 3), loganin (peak 4), secoxyloganin (peak 5), luteoloside (peak 7), isochlorogenic acid B (peak 8), isochlorogenic acid A (peak 9), and isochlorogenic acid C (peak 11). The similarity evaluation results showed that the similarity of 10 kinds of honeysuckle fingerprints ranged from 0.723 to 0.996, except for the similarity of S23 which was 0.723, the similarity of other kinds of honeysuckle was greater than 0.91. Six batches of *Lonicerae Japonicae Flos* were distinguished by PCA and OPLS-DA. Four different markers were selected by OPLS-DA. According to the VIP value, they were secoxyloganin > neochlorogenic acid > loganin > cryptochlorogenic acid. The results of content determination showed that the content of *Lonicerae Japonicae Flos* varied in different germplasm at different development stages. **Conclusion** The combination of UPLC fingerprint and multi-component chemical pattern recognition of *Lonicerae Japonicae Flos* can effectively evaluate the quality difference of different germplasm of *Lonicerae Japonicae Flos*, and provide reference for quality control of different germplasm of *Lonicerae Japonicae Flos*.

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; UPLC fingerprint; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; loganin; secoxyloganin; luteoloside; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; content determination; pattern recognition; quality evaluation

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 属临床常用大宗中药材^[1], 具有清热解毒、疏散风热的功效, 可用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等症。金银花原植物分布广泛, 在长期的驯化栽培过程中, 形成许多不同类型的地方品种, 而且引进一些国外品种, 其外观性状、活性成分等方面存在差异^[2], 是影响其品质的重要因素。与性状鉴别相比, 活性成分分析能更客观、精准的揭示种间、种内的差异, 近年来在金银花质量评价研究中得到广泛应用^[3]。本实验采用超高效液相色谱仪, 建立一种指纹图谱和含量测定分析方法, 对 41 批不同种质不同发育期金银花进行指纹图谱分析、化学模式识别分析及含量测定, 从化学成分方面系统整体研究不同种质金银花之间的质量差异, 为金银花药材质量评价提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); ME204E 型万分之一分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); XS205DU 型十万分之一分析天平(梅特勒-托利多国际有限公司); JM-30D-40 型液晶单频超声波清洗仪(深圳市洁盟清洗设备

有限公司); WGH201 型纯水机(日本 YAMATO 科学株式会社)。

1.2 材料

新绿原酸(批号 D23GB172337)、异绿原酸 A(批号 P11D11L134209)、隐绿原酸(批号 M06GB147634)、马钱苷(批号 20120427)、咖啡酸(批号 M27GB143417)、芦丁(批号 T20N11Z131674)、当药苷(批号 P31M7F12286)、木犀草苷(批号 Y19A8H34394), 以上对照品均购自上海源叶生物科技有限公司; 断氧化马钱子苷(批号 ST20380110)、异绿原酸 B(批号 ST06590120)、异绿原酸 C(批号 ST06600120), 质量分数均大于 98%, 以上对照品均购自上海诗丹德标准技术有限公司; 绿原酸(质量分数 99.3%, 批号 110753-201716), 对照品购自中国食品药品检定研究院。

41 批不同种质金银花药材于 2022 年 5 月 27 日采自山东亚特药用植物生态园, 经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为忍冬 *L. japonica* Thunb.。对 10 个种质金银花不同发育期(三青期、二白期、大白期、银花期、金花期)药材进行采集, 共采集到 41 个样品, 烘干备用。药材来源信息见表 1。

甲醇、乙腈(product of DNK, 美国, 色谱纯);

表 1 金银花样品来源

Table 1 Source of *Lonicerae Japonicae Flos* samples

编号	基原	品种	发育期	原产地	编号	基原	品种	发育期	原产地
S1	忍冬	亚特 2 号	三青	山东临沂	S22	忍冬	亚特 7 号	金花	美国
S2	忍冬	亚特 2 号	二白	山东临沂	S23	忍冬	亚特 8 号	三青	美国
S3	忍冬	亚特 2 号	大白	山东临沂	S24	忍冬	亚特 8 号	二白	美国
S4	忍冬	亚特 2 号	银花	山东临沂	S25	忍冬	亚特 8 号	大白	美国
S5	忍冬	亚特 2 号	金花	山东临沂	S26	忍冬	亚特 8 号	银花	美国
S6	忍冬	亚特立本	二白	山东临沂	S27	忍冬	亚特 8 号	金花	美国
S7	忍冬	亚特立本	大白	山东临沂	S28	忍冬	鸡爪花	三青	平邑
S8	忍冬	亚特立本	银花	山东临沂	S29	忍冬	鸡爪花	二白	山东平邑
S9	忍冬	亚特立本	金花	山东临沂	S30	忍冬	鸡爪花	大白	山东平邑
S10	忍冬	亚特 4 号	三青	意大利	S31	忍冬	鸡爪花	银花	山东平邑
S11	忍冬	亚特 4 号	二白	意大利	S32	忍冬	鸡爪花	金花	山东平邑
S12	忍冬	亚特 4 号	大白	意大利	S33	忍冬	小毛花	三青	山东平邑
S13	忍冬	亚特 4 号	银花	意大利	S34	忍冬	小毛花	二白	山东平邑
S14	忍冬	亚特 4 号	金花	意大利	S35	忍冬	小毛花	银花	山东平邑
S15	忍冬	亚特 5 号	银花	美国	S36	忍冬	小毛花	金花	山东平邑
S16	忍冬	亚特 5 号	金花	美国	S37	忍冬	北花 1 号	三青	山东平邑
S17	忍冬	亚特 6 号	三青	新西兰	S38	忍冬	北花 1 号	二白	山东平邑
S18	忍冬	亚特 6 号	大白	新西兰	S39	忍冬	北花 1 号	大白	山东平邑
S19	忍冬	亚特 6 号	金花	新西兰	S40	忍冬	北花 1 号	银花	山东平邑
S20	忍冬	亚特 7 号	三青	美国	S41	忍冬	北花 1 号	金花	山东平邑
S21	忍冬	亚特 7 号	大白	美国					

磷酸（天津市科密欧化学试剂有限公司，色谱纯）；超纯水（实验室自制）。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取金银花粉末（过四号筛）约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 75%甲醇 50 mL，称定质量，超声处理（功率 512 W、频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用 75%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，经 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.2 对照品溶液的制备

取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、马钱苷、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 对照品适量，精密称定，置量瓶中，加 75%甲醇制成含 0.92、2.08、1.46、1.44、2.14、1.12、2.04、2.06、0.09、0.88、0.96、2.64 mg/mL 的对照品储备液。取以上 12 种对照品储备液适量，加 75%甲醇配制成新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、马钱苷、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 分别为 29.01、211.22、

14.16、30.74、37.63、60.02、82.55、49.16、24.90、25.19、66.87、36.56 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪；Thermo Accucore™ C₁₈ 色谱柱（100 mm×4.6 mm，2.6 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1%磷酸水溶液（B），二元梯度洗脱程序：0~4 min，8%A；4~6 min，8%~10%A；6~7 min，10%A；7~10 min，10%~14%A；10~27 min，14%~15%A；27~35 min，15%~25%A；35~40 min，25%A；柱温 30℃；体积流量 0.3 mL/min；进样量 1 μL；检测波长 0~13.5 min，324 nm；13.5~18 min，238 nm；18~27 min，354 nm；27~40 min，324 nm。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取混合对照品溶液，按“2.3”项下建立的色谱条件进行测定，连续进样 6 次，记录 12 个对照品色谱峰的峰面积。峰面积的 RSD 为 0.06%~2.03%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取金银花药材粉末，按照“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进行测定，计算 12 个对照品的质量

分数。结果显示，各对照品质量分数的 RSD 为 0.69%~3.69%。

2.4.3 稳定性试验 取金银花供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录 12 个对照品色谱峰的峰面积。各对照品色谱峰峰面积 RSD 为 0.31%~1.72%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取新绿原酸、绿原

酸、隐绿原酸、咖啡酸、马钱苷、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 储备液适量，分别用 75%甲醇配制成 6 个质量浓度系列的对照品溶液，按“2.3”项下色谱条件测定。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，并进行线性回归，得 12 种成分的回归方程与线性范围，见表 2。

表 2 线性关系考察结果
Table 2 Linear relationship results

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R^2
新绿原酸	$Y=17.528 X-16.601$	1.25~311.55	0.999 9
绿原酸	$Y=18.651 X+60.482$	7.00~210 0	0.999 9
咖啡酸	$Y=27.828 X+1.494 9$	0.36~53.86	0.999 6
隐绿原酸	$Y=12.528 X-0.342 1$	0.51~15.38	0.999 7
马钱苷	$Y=10.969 X+4.705 7$	1.51~301.13	1.000 0
当药苷	$Y=10.981 X+1.832 9$	0.65~129.16	1.000 0
断氧化马钱子苷	$Y=9.453 5 X+11.071$	7.00~2 100.00	1.000 0
芦丁	$Y=10.469 X+2.394 5$	0.59~59.43	0.999 9
木犀草苷	$Y=17.879 X+5.476 9$	0.46~92.13	0.999 9
异绿原酸 B	$Y=21.197 X-3.684 7$	0.32~32.34	0.999 8
异绿原酸 A	$Y=21.992 X-26.575$	4.00~1 000.00	1.000 0
异绿原酸 C	$Y=23.288 X-3.217 5$	1.37~136.54	0.999 9

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已测定 12 种成分含量的金银花样品 6 份，每份约 0.25 g，按对照品与样品含量比为 1:1 的比例加入新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、马钱苷、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样测定，计算加样回收率，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、马钱苷、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的加样回收率分别为 101.8%、100.2%、101.7%、101.5%、100.8%、96.36%、98.99%、97.60%、98.79%、103.1%、98.12%、99.85%，RSD 值分别为 2.83%、2.44%、2.34%、1.29%、2.13%、2.07%、2.54%、2.69%、2.49%、2.78%、1.86%、2.62%。

2.5 样品含量测定

取 41 批不同种质金银花药材粉末，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样测定，测定结果见表 3。由表可知，41 批不同种质金银花的不同发育期药材中新绿原酸、绿原酸、隐绿原

酸、咖啡酸、马钱苷、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 12 种化学成分的含量变化范围分别为 0.35~1.20 mg/g、8.60~50.21 mg/g、0.16~1.01 mg/g、0.16~0.31 mg/g、0.50~2.58 mg/g、0.13~3.19 mg/g、1.4~45.57 mg/g、0.23~1.79 mg/g、0.18~1.23 mg/g、0.16~0.88 mg/g、3.78~30.62 mg/g、0.29~4.97 mg/g。表明 12 种化学成分的含量与不同种质金银花药材密切相关，随金银花不同发育期而明显变化，具有显著差异，见图 1。

2.6 指纹图谱的构建及相似度分析

2.6.1 方法学考察 精密度试验、重复性试验、稳定性试验方法参考“2.4.1”“2.4.2”“2.4.3”项。精密度试验各对照品色谱相对峰面积 RSD 在 0.61%~2.77%，重复性试验相对峰面积 RSD 为 0.46%~2.81%，稳定性试验相对峰面积 RSD 为 0.31%~1.72%，均符合要求。

2.6.2 指纹图谱的构建 取 41 批不同种质金银花的不同发育期药材粉末，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样测定，记录

表 3 不同种质金银花不同发育期药材的 12 种化学成分含量测定

Table 3 Determination of 12 chemical components in different germplasm of *Lonicerae Japonicae Flos* at different development stages

编号	发育期	质量分数/(mg·g ⁻¹)											
		新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	马钱苷	当药苷	断氧化马钱子苷	芦丁	木犀草苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
S1	三青	0.86	22.07	0.28	0.26	1.45	2.81	1.40	0.31	0.30	0.43	14.94	2.23
S2	二白	1.08	40.87	0.43	0.19	1.77	1.45	6.57	—	0.44	0.44	15.56	2.25
S3	大白	1.02	34.26	0.46	—	1.75	0.77	10.22	—	0.58	0.40	14.27	1.77
S4	银花	0.94	29.60	0.46	—	1.71	0.62	9.46	—	0.59	0.35	13.54	1.44
S5	金花	1.02	31.87	0.56	—	1.72	0.50	15.13	—	0.64	0.39	14.27	1.55
S6	二白	0.83	30.37	0.37	0.24	1.29	2.14	2.21	1.19	0.41	0.40	13.66	2.16
S7	大白	0.82	30.90	0.45	0.25	1.19	1.38	1.77	1.48	0.54	0.52	13.33	2.15
S8	银花	0.77	29.21	0.38	0.26	0.99	0.62	2.44	1.49	0.47	0.44	14.39	1.78
S9	金花	0.82	30.24	0.42	0.22	1.24	0.49	8.09	1.30	0.41	0.49	16.39	1.95
S10	三青	1.09	35.26	0.69	—	2.24	1.46	5.76	1.61	0.31	0.70	30.62	4.97
S11	二白	1.12	34.02	0.64	0.18	2.07	1.38	5.11	1.72	0.34	0.81	26.92	4.75
S12	大白	1.08	33.56	0.74	0.19	1.43	0.89	4.38	1.63	0.31	0.88	23.25	4.39
S13	银花	0.91	27.39	0.55	0.18	1.16	0.33	4.89	1.29	0.25	0.56	21.43	2.84
S14	金花	0.72	21.34	0.46	—	1.17	0.24	10.33	0.91	0.21	0.45	14.28	1.89
S15	银花	0.88	17.96	0.34	—	1.81	0.47	3.70	—	0.18	0.31	10.79	1.40
S16	金花	0.80	14.85	0.28	—	1.33	0.46	5.26	—	0.18	0.28	10.76	1.03
S17	三青	0.87	17.29	0.31	0.20	1.78	3.19	2.51	0.33	0.21	0.38	14.63	2.23
S18	大白	1.13	31.68	0.69	0.27	1.37	1.90	1.72	—	0.27	0.68	13.40	2.64
S19	金花	0.75	22.17	0.38	—	1.12	0.42	3.89	—	0.22	0.28	11.11	1.28
S20	三青	1.19	25.54	0.50	0.23	2.33	2.73	6.46	1.63	0.29	0.38	17.51	3.49
S21	大白	1.08	24.02	0.54	0.22	2.08	1.24	5.30	1.22	0.28	0.38	10.29	2.38
S22	金花	1.03	23.75	0.47	—	1.56	0.45	26.79	1.07	0.29	0.31	10.28	1.63
S23	三青	0.46	14.08	0.17	—	1.17	0.41	42.71	—	0.76	0.23	8.78	1.31
S24	二白	0.77	31.82	0.36	—	1.15	0.31	45.57	—	1.23	0.51	15.29	2.58
S25	大白	0.61	23.48	0.34	—	0.75	0.28	24.56	—	1.04	0.45	10.19	1.75
S26	银花	0.65	25.20	0.23	0.16	0.65	0.13	20.53	—	1.06	0.25	12.30	1.37
S27	金花	0.50	17.74	0.21	—	0.50	0.33	20.10	—	0.85	0.28	9.72	1.03
S28	三青	0.72	20.76	0.47	0.17	2.22	2.46	5.28	0.30	0.36	0.40	11.22	2.42
S29	二白	0.68	21.60	0.47	0.20	1.81	2.18	4.93	0.24	0.48	0.41	10.32	2.45
S30	大白	0.73	21.86	0.51	—	1.74	1.69	3.71	—	0.50	0.44	9.48	2.28
S31	银花	1.20	45.91	1.01	0.16	2.13	1.33	6.21	0.31	0.70	0.71	18.70	4.27
S32	金花	0.77	25.28	0.65	—	1.55	0.99	6.64	—	0.44	0.44	9.82	2.17
S33	三青	0.74	26.41	0.41	0.17	1.58	1.66	4.07	0.59	0.39	0.36	13.09	2.69
S34	二白	0.70	28.46	0.45	0.24	1.72	1.66	3.77	0.67	0.64	0.34	11.16	2.57
S35	银花	0.64	20.32	0.38	—	1.74	0.99	2.95	0.85	0.62	0.16	7.85	1.71
S36	金花	0.75	27.30	0.52	—	1.49	0.67	8.76	0.75	0.60	0.40	10.07	2.40
S37	三青	1.11	50.21	0.41	0.18	2.18	1.17	4.51	0.23	0.40	0.52	22.14	2.81
S38	二白	0.73	25.40	0.32	0.18	1.82	1.50	4.53	0.24	0.50	0.34	9.11	1.22
S39	大白	0.79	30.39	0.40	—	2.58	1.17	6.73	—	0.57	0.34	9.76	1.26
S40	银花	0.66	19.86	0.31	—	1.57	0.99	5.12	—	0.59	0.27	7.89	0.76
S41	金花	0.45	8.60	0.17	—	1.48	0.68	8.92	—	0.60	0.16	3.78	0.29

“—”表示未检测到。

“—” indicates not detected.

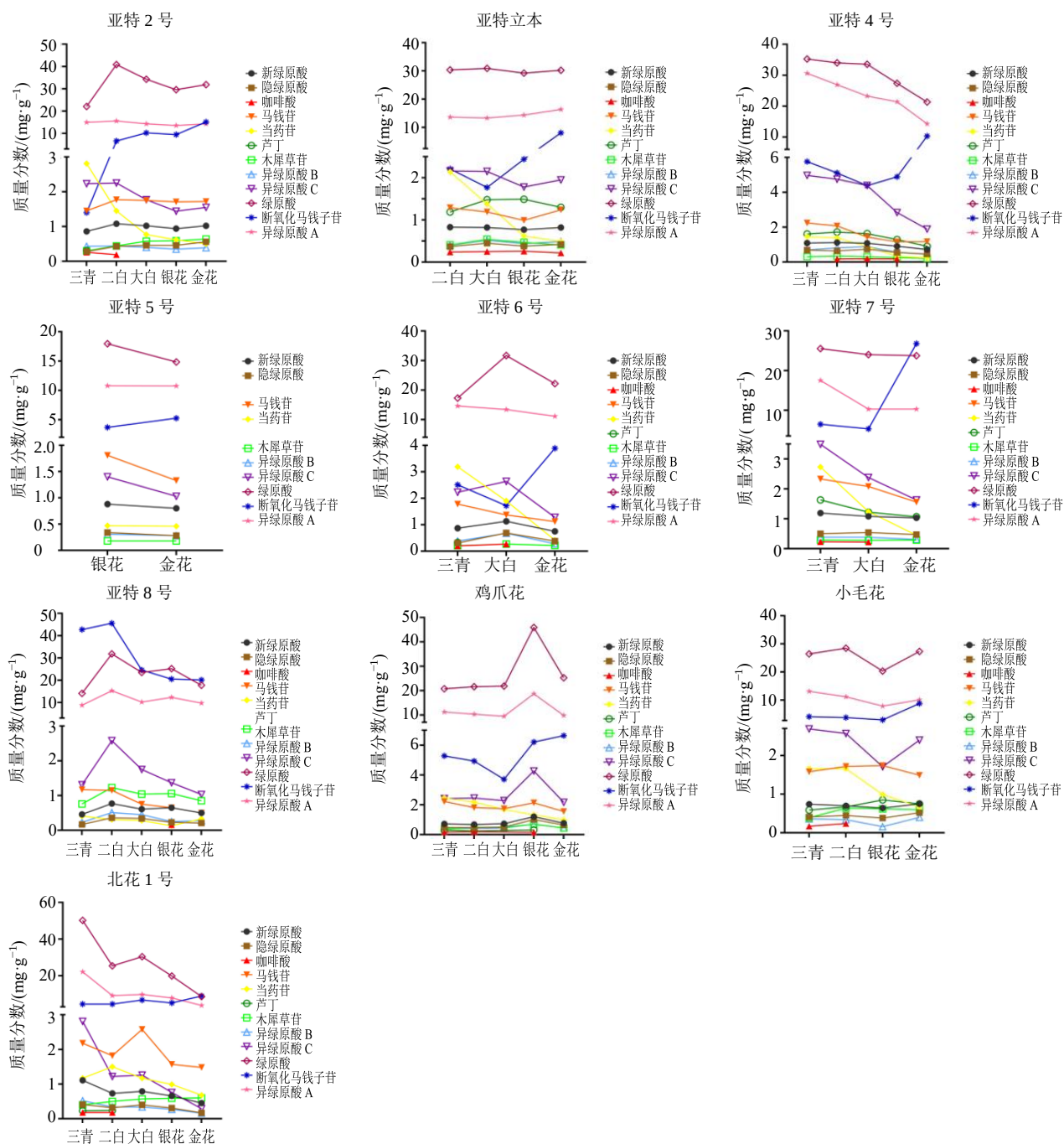


图 1 不同种质金银花不同发育期药材的 12 种化学成分含量测定折线图

Fig. 1 Line chart for determination of 12 chemical components of different germplasm of *Lonicerae Japonicae Flos* at different development stages

UPLC 色谱图, 并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》软件, 以 S1 样品色谱图参照图谱, 对 41 批样品色谱峰进行多点校正和全峰匹配, 设定时间窗宽度为 0.1 min, 以平均数法生成对照图谱, 41 批不同种质金银花的不同发育期药材指纹图谱共有模式见图 2。

指纹图谱中共标定共有峰 11 个, 其中指认化学成分 9 个, 分别为新绿原酸 (1 号峰)、绿原酸 (2 号峰)、隐绿原酸 (3 号峰)、马钱苷 (4 号峰)、断氧化马钱子苷 (5 号峰)、木犀草苷 (7 号峰)、异绿原酸 B (8 号峰)、异绿原酸 A (9 号峰)、异绿原酸 C (11 号峰)。

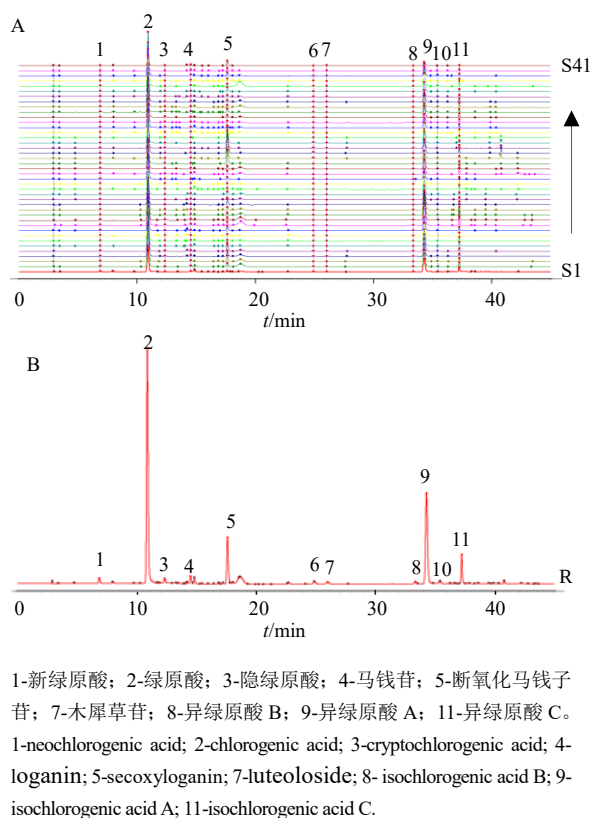


图 2 不同种质金银花药材指纹图谱 (A) 和共有模式 (B)

Fig. 2 Fingerprint of different germplasm (A) and common pattern (B) of *Loniceræ Japonicæ Flos*

2.6.3 指纹图谱的相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件, 计算金银花指纹图谱的相似度, 结果见表 4。结果显示, 41 批不同种质不同发育期金银花的相似度在 0.723~0.996, 除 S23 的相似度为 0.723 以外, 其余金银花相似度均大于 0.91。结果表明相同种质金银花不同发育期的药材之间化学成分存在差异; 除极少数发育期外, 不同种质金银花相同发育期的药材存在一定差异, 但质量相对稳定。

2.7 化学模式识别研究

2.7.1 主成分分析 (principal component analysis, PCA) PCA 是一种无监督化学模式识别, 可使数据矩阵简化, 降低维数, 通过少数几个主成分揭示数据结构特征^[4]。由于 41 批不同种质不同发育期金银花的样品中超过一半未检测到咖啡酸, 因此将 41 批样品中除咖啡酸外的 11 个化学成分峰面积数据进行 PCA, 结果见图 3-A, 亚特 8 号美国忍冬、亚特 4 号意大利忍冬与其他样品显著区分, 表明不同种质金银花之间存在一定差异。不同发育期金银花样品也相互区分明显, 表明不同发育期金银花药材

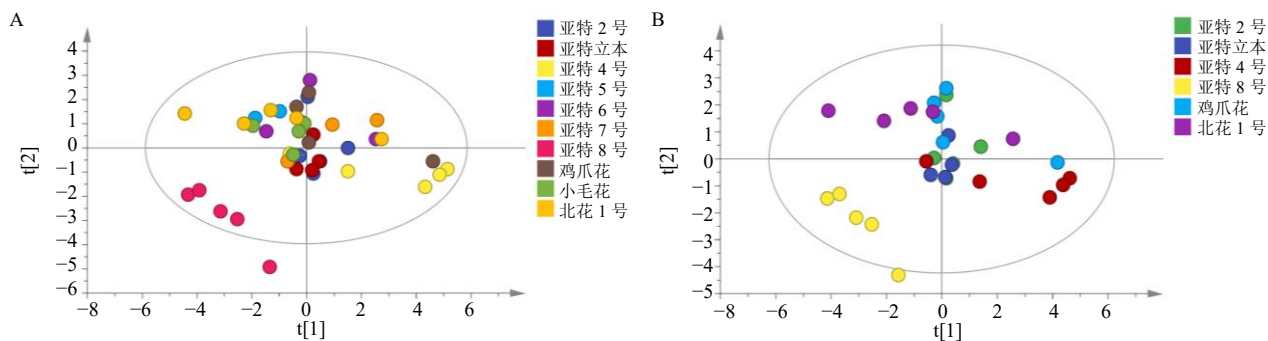
表 4 不同种质金银花不同发育期药材指纹图谱相似度评价

Table 4 Similarity of fingerprint of different germplasm of *Loniceræ Japonicæ Flos* at different development stages

编号	发育期	相似度	编号	发育期	相似度
S1	三青	0.978	S22	金花	0.948
S2	二白	0.986	S23	三青	0.723
S3	大白	0.993	S24	二白	0.910
S4	银花	0.996	S25	大白	0.949
S5	金花	0.996	S26	银花	0.974
S6	二白	0.990	S27	金花	0.947
S7	大白	0.989	S28	三青	0.996
S8	银花	0.990	S29	二白	0.996
S9	金花	0.996	S30	大白	0.993
S10	三青	0.958	S31	银花	0.994
S11	二白	0.972	S32	金花	0.993
S13	银花	0.980	S34	二白	0.990
S14	金花	0.992	S35	银花	0.989
S15	银花	0.992	S36	金花	0.994
S16	金花	0.989	S37	三青	0.977
S17	三青	0.967	S38	二白	0.987
S18	大白	0.988	S39	大白	0.984
S19	金花	0.994	S40	银花	0.990
S20	三青	0.985	S41	金花	0.947
S21	大白	0.994			

之间质量存在差异。根据 41 批不同种质金银花 PCA 分析结果、指纹图谱分析结果、预实验结果及样品来源特点, 从 41 批不同种质金银花药材中筛选区别较大且比较有研究意义的 6 批金银花亚特 2 号、亚特立本、亚特 4 号、亚特 8 号、鸡爪花、北花 1 号样品进一步进行重点分析。将 6 批不同种质不同发育期金银花的 11 个化学成分峰面积数据进行 PCA 分析, 结果见图 3-B, 6 批不同种质金银花样品可以被区分。

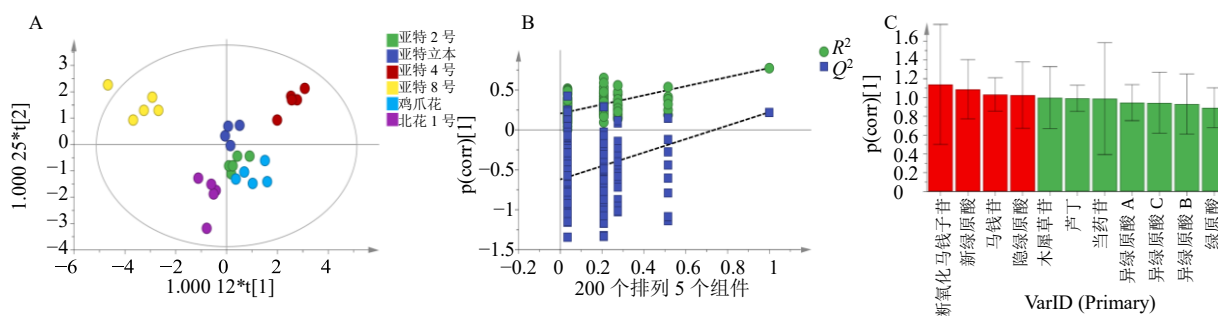
2.7.2 正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 进一步采用 OPLS-DA 对 6 批不同种质金银花样品进行分析。将 6 批不同种质金银花各发育期 11 种化学成分含量进行 OPLS-DA, 相同种质金银花样品作为 1 组, 筛选不同种质金银花药材的差异标志物。结果如图 4-A 所示, OPLS-DA 得分图表明各种质被区分, 并对模型进行验证, 设定检验数为 200 次, 如图 4-B 所示, 左边的 R^2 点和 Q^2 点均低于右边, Q^2 点的回归线与纵轴相交于原点以下, 表明未产生过分拟合, 模型可靠。如图 4-C 所示, 根据 VIP 值 > 1 筛选出 4 种差异标志物, 分别为断氧化马钱子苷、新绿原酸、马钱苷、隐绿原酸。



A-10 种金银花; B-筛选后的 6 种金银花。
A-10 batches of honeysuckle; B-6 batches of honeysuckle.

图 3 PCA 得分图

Fig. 3 PCA Score chart



A-得分图; B-模型验证图; C-VIP 图。
A-the score chart; B-model verification diagram; C-VIP picture.

图 4 6 批不同种质金银花的 OPLS-DA 图

Fig.4 OPLS-DA maps of six batches of *Lonicerae Japonicae Flos* with different germplasm

可以认为这 4 种差异标志物是不同种质金银花质量评价的重要指标性成分。另外, 木犀草苷、芦丁、当药苷的 VIP 值分别为 0.999、0.991、0.988, 均接近于 1, 可作为不同种质金银花质量评价的参考指标性成分。

3 讨论

3.1 UPLC 含量测定条件的优化

超高效液相色谱分析法是一种高效的液相技术^[5], 具有分析速度快、分离度好、检验准确率高等优点^[6], 对中药的成分分析、中药鉴定等具有重要意义^[7]。金银花成分含量多以普通高效液相色谱仪单波长检测为主^[8-9], 本实验通过超高效液相色谱仪全波长扫描, 选择 12 种化学成分的最大吸收波长, 分波段检测, 可有效避免杂质峰的影响, 提高有效成分含量测定结果的准确性。

3.2 不同发育期化学成分含量变化分析

本实验首次通过 UPLC 分段波长测得亚特 2 号、亚特立本、亚特 4 号、亚特 5 号、亚特 6 号、亚特 7 号、亚特 8 号、鸡爪花、小毛花、北花 1 号不同发育

期中 12 种成分的含量。结果发现不同种质不同发育期的化学成分含量存在较大变化。首先绿原酸含量变化特点为, 亚特 2 号、亚特 4 号、亚特 6 号、亚特 8 号、小毛花、北花 1 号在未开花期含量较高, 鸡爪花在开花期含量较高, 亚特立本、亚特 7 号各发育期的绿原酸含量相差不大; 其次, 酚酸类成分绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的总含量变化特点为, 亚特 2 号、亚特 4 号、亚特 6 号、亚特 7 号、亚特 8 号、小毛花、北花 1 号未开花期酚酸类成分含量较高, 鸡爪花开花期酚酸类成分含量较高, 亚特立本各发育期酚酸类成分含量相差不大。

3.3 指纹图谱的建立与相似度分析

中药指纹图谱是一种综合的、量化的鉴定手段, 它是建立在中药化学成分系统研究的基础上, 可以反映中药的整体化学特征^[10]。目前, 金银花指纹图谱主要是不同产地^[11]、不同采收期^[12]的研究, 不同种质金银花的研究种类多为 2~5 种。本实验首次建立了对 10 种不同种质金银花不同发育期药材的指纹图谱, 种质丰富, 且涵盖了

国外引进的品种。

相似度分析结果显示,除亚特 8 号三青时期的相似度为 0.723 外,其余金银花样品相似度均大于 0.91,表明不同种质金银花存在差异,但质量相对稳定。亚特 8 号原产地为美国,该品种金银花具有特殊香气,且一年开花茬数较多,表明该种质具有一定的特殊性。

3.4 化学模式识别研究

化学模式识别将中药的复杂成分转变为对数据的解析,更有利于从整体上对中药质量进行评价与控制,在中药质量控制中的运用越来越广泛^[13-14]。本实验对 10 种金银花进行 PCA,亚特 4 号、亚特 8 号被显著区分,且亚特 8 号的 PCA 结果与指纹图谱分析结果一致,均被明显区分。通过前期的 PCA 分析结果及预实验结果,从上述 10 种金银花中筛选出亚特 2 号、亚特立本、亚特 4 号、亚特 8 号、鸡爪花、北花 1 号 6 种,6 种不同种质不同发育期金银花通过 PCA、OPLS-DA 被明显区分,并根据 VIP 值>1 筛选获得断氧化马钱子苷、新绿原酸、马钱苷、隐绿原酸 4 种质量差异标志物。

本实验通过 UPLC 指纹图谱与多成分化学模式识别研究相结合的方式,可有效评价不同种质金银花药材的质量差异性,为不同种质金银花鉴别提供新思路,为不同种质不同发育期金银花的质量评价提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄文静,熊乐文,张龙霏,等.不同种质金银花发育过程中黄酮类成分含量变化规律研究[J].中草药,2022,53(10):3156-3164.
- [2] 李磊,谭政委,余永亮,等.金银花种质资源及品种

选育研究进展[J].安徽农业科学,2022,50(17):1-4.

- [3] 朱凤洁,杨健,袁媛,等.金银花种质资源化学指纹图谱及代谢物相似性分析[J].中国中药杂志,2018,43(12):2575-2579.
- [4] 蒲俊杰,刘谦,李佳,等.金银花不同发育时期挥发性成分的 HS-SPME-GC-MS 分析[J].中草药,2022,53(9):2818-2824.
- [5] 周鹏妹.高效液相色谱在药物分析中的应用研究进展[J].化学工程与装备,2022(8):249-250.
- [6] 咎丹娅.超高效液相色谱法在药物分析中的应用进展[J].临床医药文献电子杂志,2019,6(30):189-190.
- [7] 梁雨彤,戴临风,郭瑞怡,等.高效液相色谱法在中药成分定量分析中的研究进展[J].化学与粘合,2022,44(4):341-344.
- [8] 张浩,叶静,马长宏,等.不同产地金银花中酚酸类含量的测定[J].人参研究,2022,34(5):20-22.
- [9] 龚菊梅,胡晓妹,何晓丽,等.HPLC 测定金银花中绿原酸、新绿原酸和异绿原酸的含量[J].安徽科技学院学报,2020,34(4):53-57.
- [10] 陈静.新型指纹图谱技术在中药分析中的应用进展[J].黑龙江科学,2021,12(6):38-39.
- [11] 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.
- [12] 刘天亮,杨林林,董诚明,等.金银花不同采收期指纹图谱及成分变化情况研究[J].中药材,2021,44(10):2358-2362.
- [13] 张崇佩,张依欣,李潮,等.不同年份吴茱萸 UPLC 指纹图谱及多成分化学模式识别研究[J].中草药,2019,50(11):2700-2707.
- [14] 王宝林,丘海芯,甘金月,等.基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分定量的千斤拔质量评价研究[J].药物评价研究,2022,42(12):2464-2472.

[责任编辑 时圣明]