

HPLC 特征图谱结合多模式识别及熵权 TOPSIS 法的不同基原蒲黄药材质量评价

田芳^{1,2}, 张英^{2,3}, 吴孟华^{2,3}, 曹晖^{2,4}, 马志国^{2,4*}

1. 暨南大学药学院, 广东 广州 511400
2. 暨南大学岭南传统中药研究中心, 广东 广州 511400
3. 国家中药现代化工程技术研究中心岭南资源分中心, 广东 广州 511400
4. 广东省中医药信息化重点实验室, 广东 广州 510632

摘要: 目的 建立蒲黄 *Typhae Pollen* 的特征图谱分析方法, 结合熵权-优劣解距离 (TOPSIS) 法评价 2 种基原蒲黄质量, 采用化学模式识别分析方法进一步明确 2 种基原蒲黄的质量差异标志物。方法 采用 HPLC 法建立 24 批蒲黄不同基原药材的特征图谱, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件 (2012 版) 确定 2 种基原蒲黄各自的共有峰及其基原之间交叉共有峰, 均采用对照品进行色谱峰的指认。以峰面积为依据, 采用熵权 TOPSIS 法计算相对贴近程度, 得到 2 种基原蒲黄的综合质量排名及各特征峰的权重; 同时, 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析 (partial least square discriminate analysis, PLS-DA) 筛选并确认 2 种基原蒲黄的质量差异标志物。结果 水烛香蒲、东方香蒲特征图谱分别指认并确定了 13 个特征峰和 16 个特征峰, 其中峰 8、9、12 是东方香蒲的特有峰, 峰 7、11 与峰 13 之间的相对峰高可直观区分 2 种基原蒲黄。特征图谱对比分析发现, 东方香蒲的含量测定指标选择峰 13 (水仙苷) 更为合理。熵权 TOPSIS 法结果表明, 各基原蒲黄样品批次间的特征峰均可稳定传递, 东方香蒲的相对贴近程度 (C_i) 均高于水烛香蒲, 说明 2 种基原蒲黄质量有差异。PCA 提取出 4 个主成分, 累积方差贡献率可达 89.008%。PLS-DA 筛选出山柰酚-3-*O*-芸香糖苷等 9 个质量差异标志物, 其中山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷等 7 个质量差异标志物为首次提出。结论 建立的分析方法可对 2 种基原蒲黄进行区分, 并特异性识别两者的差异性成分, 为蒲黄不同基原之间的区分鉴别及其质量控制提供依据。

关键词: 水烛香蒲; 东方香蒲; 特征图谱; 熵权 TOPSIS 法; 化学模式识别; 质量评价; 原儿茶酸; 对羟基苯甲酸; 香草酸; 槲皮素-3-*O*-(2*G*- α -*L*-鼠李糖基)-芸香糖苷; 槲皮素-3-*O*-新橙皮苷; 山柰酚-3-*O*-(2*G*- α -*L*-鼠李糖基)-芸香糖苷; 香蒲新苷; 芦丁; 异槲皮苷; 山柰酚-3-*O*-新橙皮苷; 异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷; 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; 水仙苷; 异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷; 柚皮素; 异鼠李素

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)04-1377-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.04.025

Quality evaluation of *Typhae Pollen* from different origins by HPLC characteristic chromatogram combined with multipattern recognition and entropy-weighted TOPSIS method

TIAN Fang^{1,2}, ZHANG Ying^{2,3}, WU Menghua^{2,3}, CAO Hui^{2,4}, MA Zhiguo^{2,4}

1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 511400, China
2. Research Center for Traditional Chinese Medicine of Lingnan, Jinan University, Guangzhou 511400, China
3. National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine Lingnan Resources Branch, Guangzhou 511400, China
4. Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Informatization, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To establish the characteristic chromatograms analysis method of *Typhae Pollen* from two origins (*Typha angustifolia* and *Typha orientalis*), which combined with entropy-weighted TOPSIS method for the quality evaluation, and clearly

收稿日期: 2024-10-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFC3504200); 广东省中医药信息化重点实验室 (2021B1212040007); 全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2022] 75 号)

作者简介: 田芳, 博士研究生, 从事中药炮制机制研究。E-mail: 1287882739@qq.com

*通信作者: 马志国, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制机制与饮片质量标准研究。E-mail: mzg79@hotmail.com

identify the markers of the quality difference between the two origins by chemical pattern recognition. **Methods** HPLC method was used to establish the characteristic chromatograms of different origins of 24 batches of Puhuang (*Typhae Pollen*). The “similarity evaluation system for traditional Chinese medicine chromatographic fingerprints” software (2012 version) was used to determine the common peaks of the two origins and the cross common peaks between its two origins, whose peaks were accurately identified by chemical reference substances. Based on the peak area, the entropy-weight TOPSIS method was used to calculate the relative proximity degree to obtain the comprehensive quality ranking of the two origins and the weights of each characteristic peak. Meanwhile, principal component analysis (PCA) and partial least square discriminate analysis (PLS-DA) were employed to screen and confirm the quality difference markers of the two origins. **Results** A total of 13 and 16 characteristic peaks were recognized from the characteristic chromatogram of *T. angustifolia* and *T. orientalis*, respectively. Among them, peaks 8, 9 and 12 were unique to *T. orientalis*, and the relative peak heights between peak 7, 11 and 13 could visually distinguish the two origins. Comparative analysis of the characteristic chromatogram revealed that it was more reasonable to choose peak 13 (narcissin) for the index of content determination in *T. orientalis*. Entropy-weighted TOPSIS analysis showed that the characteristic peaks could be stably transferred between the sample batches in each origin, and the C_i of all the samples of *T. orientalis* were higher than that of *T. angustifolia*, which implied that the quality of the two origins varied. The four principal components were extracted by PCA, and the cumulative variance contribution could reach 89.008%. The nine quality difference markers, such as kaempferol-3-*O*-rutinoside, were screened by PLS-DA, among which seven quality difference markers, including kaempferol-3-*O*-rutinoside, isoquercitrin, and isorhamnetin-3-*O*-glucoside, and so on, were proposed for the first time. **Conclusion** The established analytical method could differentiate the two origins of *Typhae Pollen* and specifically identify the differential components between them, providing a basis for the differential identification of different origins and quality control of *Typhae Pollen*.

Key words: *Typha angustifolia* L.; *Typha orientalis* Presl; characteristic chromatogram; entropy-weighted TOPSIS method; chemical pattern recognition; quality evaluation; protocatechuic acid; *p*-hydroxybenzoic acid; vanillic acid; quercetin-3-*O*-(2*G*- α -*L*-rhamnosyl)-rutinoside; quercetin-3-*O*-neohesperidoside; kaempferol-3-*O*-(2*G*- α -*L*-rhamnosyl)-rutinoside; typhaneoside; rutin; isoquercetin; kaempferol-3-*O*-neohesperidoside; isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside; kaempferol-3-*O*-rutinoside; narcissin; isorhamnetin-3-*O*-glucoside; naringenin; isorhamnetin

中药蒲黄为香蒲科植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L.、东方香蒲 *T. orientalis* Presl 或同属植物的干燥花粉，具有止血、化瘀、通淋的功效，用于治疗吐血、衄血、咯血、崩漏、外伤出血、经闭痛经、血淋涩痛等症^[1]。其现代药理作用主要涉及心血管系统^[2]、抗动脉粥样硬化^[3]、改善糖代谢^[4]、调节免疫和抗炎^[5]、子宫兴奋^[6]和抗肿瘤等方面^[7]。黄酮、有机酸、多糖等是蒲黄的主要成分，已被证明具有抗血小板、抗凝、抗血栓、心脏保护和肾脏保护作用^[8-9]。我国有香蒲属植物 11 种，南北广泛分布，以温带地区种类较多^[10]。蒲黄作为多基原药材，来源复杂，不同基原蒲黄化学成分与质量的差异研究较少，目前已有将来源于水烛香蒲的蒲黄药材进行指纹图谱与多成分定量分析的文献报道^[11]，未见不同基原蒲黄进行质量评价和对比分析的文献报道。

本研究建立蒲黄的 HPLC 特征图谱，结合熵权-优劣解距离 (TOPSIS) 法对来源于水烛香蒲和东方香蒲 2 种基原的蒲黄样品进行特征图谱分析和质量评价，通过主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析 (partial least square discriminate analysis, PLS-DA) 等多模式识别法辨识 2 种基原蒲黄的差异化学成分，以期蒲

黄的质量研究提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Ultimate 3000 液相色谱 (DAD 检测器) (美国 Thermo 公司); FA 2204B 型万分之一电子天平 (上海佑科仪器仪表有限公司); XSR105/A 十万分之一天平 (美国梅特勒托利多公司); HH-2 型数显恒温水浴锅 (常州越新仪器制作有限公司); Milli-Q 型超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

1.2 材料

甲醇、乙腈 (色谱纯, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司); 甲酸 (色谱级, 天津科密欧化学试剂有限公司); 对照品原儿茶酸 (批号 RFS-Y03111812016)、对羟基苯甲酸 (批号 RFS-X03011803022)、香草酸 (批号 RFS-D06311812016)、香蒲新苷 (批号 RDD-X02002101014)、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷 (批号 RDD-Y07502106011)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 (批号 RDD-S0650240019)、水仙苷 (批号 RDD-S06311811015)、柚皮素 (批号 Y-030-181216)、异鼠李素 (批号 RDD-Y03911811015) 均购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 对照品槲皮素-3-*O*-(2*G*- α -*L*-鼠李糖基)-芸香糖苷 (批号 CFN91149)、

槲皮素-3-O-新橙皮苷(批号 CFN91148)、山柰酚-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷(批号 CFN93049)、山柰酚-3-O-新橙皮苷(批号 CFN98415)均购自武汉中标科技有限公司;对照品芦丁(批号 R22733889)、异槲皮苷(批号 Q29935CA0)均购自上海吉至生化科技有限公司;异鼠李素-3-O-葡萄糖苷(批号 WP24050908)购

自四川省维克奇生物科技有限公司;以上16个对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。

共收集24批蒲黄样品,经暨南大学马志国教授鉴定,有18批为水烛香蒲*T. angustifolia* L.的干燥花粉,6批为东方香蒲*T. orientalis* Presl的干燥花粉。样品来源信息见表1。自采样品均在40℃以下烘干,所有样品过120目筛。

表1 样品来源信息

Table 1 Sample source information

编号	产地	编号	产地	编号	产地
SZ-01	山东省枣庄市	SZ-09*	湖北省武汉市	SZ-17	宁夏回族自治区
SZ-02*	广东省广州市天河区	SZ-10	云南省西双版纳傣族自治州	SZ-18	内蒙古自治区
SZ-03	内蒙古自治区巴彦淖尔市临河区	SZ-11*	安徽省亳州市	DF-1*	广东省广州市天河区
SZ-04*	山西省长治市	SZ-12	湖北省	DF-2*	广东省广州市海珠区
SZ-05*	河南省郑州市	SZ-13	宁夏回族自治区	DF-3*	广东省广州市
SZ-06*	宁夏回族自治区石嘴山市平罗县	SZ-14	河北省	DF-4*	广东省广州市
SZ-07	江苏省	SZ-15	安徽省	DF-5*	贵州省贵阳市南明区
SZ-08*	湖南省长沙市	SZ-16	宁夏回族自治区	DF-6*	重庆市梁平区

SZ-水烛香蒲; DF-东方香蒲; *-自采样品。

SZ-*T. angustifolia*; DF-*T. orientalis*; *-Samples collected by self.

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kinetex EVO C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱;乙腈(B)-0.1%甲酸水(A)流动相,梯度洗脱(0~10 min, 6%~15% B; 10~25 min, 15% B; 25~40 min, 15%~35% B; 40~50 min, 35%~48% B);体积流量 1.0 mL/min;柱温 30℃;进样量 10 μ L;检测波长 254 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取原儿茶酸、对羟基苯甲酸、香草酸、槲皮素-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷、槲皮素-3-O-新橙皮苷、山柰酚-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷、香蒲新苷、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-新橙皮苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、柚皮素、异鼠李素对照品适量,精密称定,分别置于 2 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,配制上述 16 个成分质量浓度分别为 0.800 0、0.760 0、0.710 0、0.640 0、0.620 0、0.570 0、0.550 0、0.540 0、0.570 0、0.590 0、0.550 0、0.665 0、0.790 0、0.605 0、0.319 5、0.306 0 mg/mL 的对照品储备液。

分别精密量取原儿茶酸、对羟基苯甲酸、柚皮素对照品储备液各 1.0 mL,精密量取异鼠李素对照

品储备液 0.8 mL,其余 12 个对照品储备液分别精密量取 0.5 mL,置于 10 mL 棕色量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,配制成含原儿茶酸质量浓度为 80.00 μ g/mL、对羟基苯甲酸质量浓度为 76.00 μ g/mL、香草酸质量浓度为 35.50 μ g/mL、槲皮素-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷质量浓度为 32.00 μ g/mL、槲皮素-3-O-新橙皮苷质量浓度为 31.00 μ g/mL、山柰酚-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷质量浓度为 28.50 μ g/mL、香蒲新苷质量浓度为 27.50 μ g/mL、芦丁质量浓度为 27.00 μ g/mL、异槲皮苷质量浓度为 28.50 μ g/mL、山柰酚-3-O-新橙皮苷质量浓度为 29.50 μ g/mL、异鼠李素-3-O-新橙皮苷质量浓度为 27.50 μ g/mL、山柰酚-3-O-芸香糖苷质量浓度为 33.25 μ g/mL、水仙苷质量浓度为 39.50 μ g/mL、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷质量浓度为 30.25 μ g/mL、柚皮素质量浓度为 31.95 μ g/mL、异鼠李素质量浓度为 24.48 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取蒲黄粉末 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 70%甲醇 50 mL,密塞摇匀,称定质量,回流提取 1 h,放冷补足,取上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 蒲黄(DF-5)样品按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条

件连续进样6次,以香蒲新苷为参照峰,计算各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积。16个色谱峰的相对保留时间的RSD均 $<0.19\%$,相对峰面积的RSD均 $<1.80\%$,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 蒲黄(DF-5)样品按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后的0、2、4、8、12、16、20、24 h按照“2.1”项下色谱条件进样,以香蒲新苷为参照峰,16个色谱峰的相对保留时间RSD均 $<0.13\%$,相对峰面积RSD均 $<2.60\%$,表明供试品溶液在24 h内稳定。

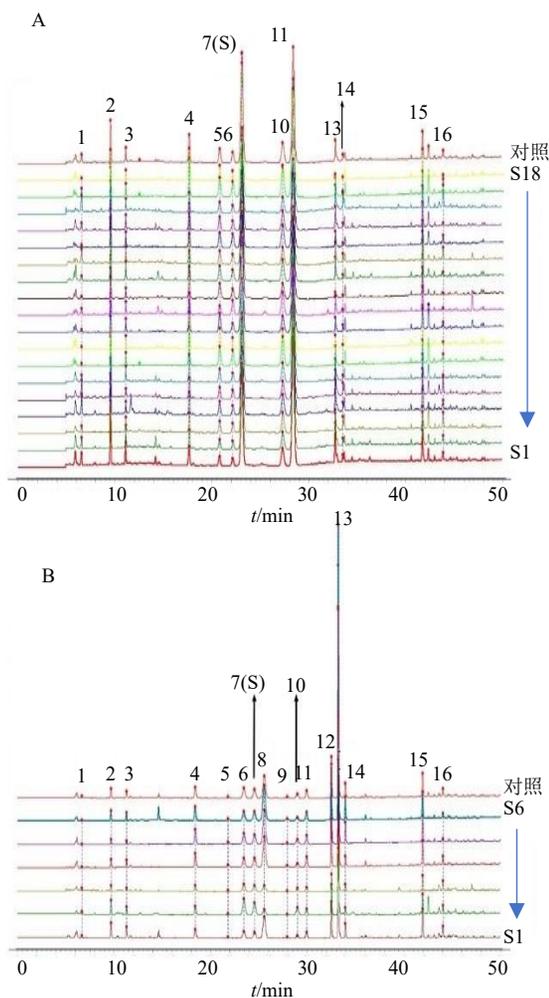
2.3.3 重复性试验 按照“2.2.2”项下方法各平行制备6份DF-5样品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样,以香蒲新苷为参照峰,16个色谱峰的相对保留时间RSD均 $<0.24\%$,相对峰面积RSD均 $<2.90\%$,表明该方法重复性良好。

2.4 特征图谱的建立及分析

2.4.1 特征图谱的建立 将24批次蒲黄样品按照“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,将原始数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”,分别以SZ-10、DF-4为参照图谱,中位数为基准,时间窗宽度0.1 min,采用多点校正法分别生成水烛香蒲与东方香蒲HPLC特征图谱及对照特征图谱(图1)。

2.4.2 共有峰的识别及确认 筛选出水烛香蒲特征峰13个、东方香蒲特征峰16个,从图1可知,水烛香蒲与东方香蒲共有峰13个,分别为峰1~7、10、11、13~16;峰8、9、12为东方香蒲的特有峰,可用于区分2种基原。通过对比各特征峰与对照品的保留时间、紫外光谱图,16个特征峰均被准确指认,见图2。

2.4.3 特征图谱的分析 通过特征图谱对比分析可知,峰7(香蒲新苷)、11(异鼠李素-3-O-新橙皮苷)、13(水仙苷)为2种基原蒲黄特征图谱差异最明显的3个色谱峰;其中香蒲新苷和异鼠李素-3-O-新橙皮苷是《中国药典》2020年版^[1]蒲黄药材规定的2个含量测定指标,在水烛香蒲特征图谱中的平均峰高分别为24.2、27.2,远高于东方香蒲(4.01、1.60),而水仙苷在东方香蒲特征图谱中的平均峰高为81.2,远高于水烛香蒲(5.90)。此外,水烛香蒲特征图谱中峰7、11与峰13平均峰高的比值分别是4.10、4.61,均 >1 ;东方香蒲特征图谱中峰7、11与峰13平均峰高的比值分别是0.05、0.02,均 <0.1 。以上结果说明2种基原蒲黄之间主要化学成分



1-原儿茶酸; 2-对羟基苯甲酸; 3-香草酸; 4-槲皮素-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷; 5-槲皮素-3-O-新橙皮苷; 6-山柰酚-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷; 7-香蒲新苷; 8-芦丁; 9-异槲皮苷; 10-山柰酚-3-O-新橙皮苷; 11-异鼠李素-3-O-新橙皮苷; 12-山柰酚-3-O-芸香糖苷; 13-水仙苷; 14-异鼠李素-3-O-葡萄糖苷; 15-柚皮素; 16-异鼠李素。

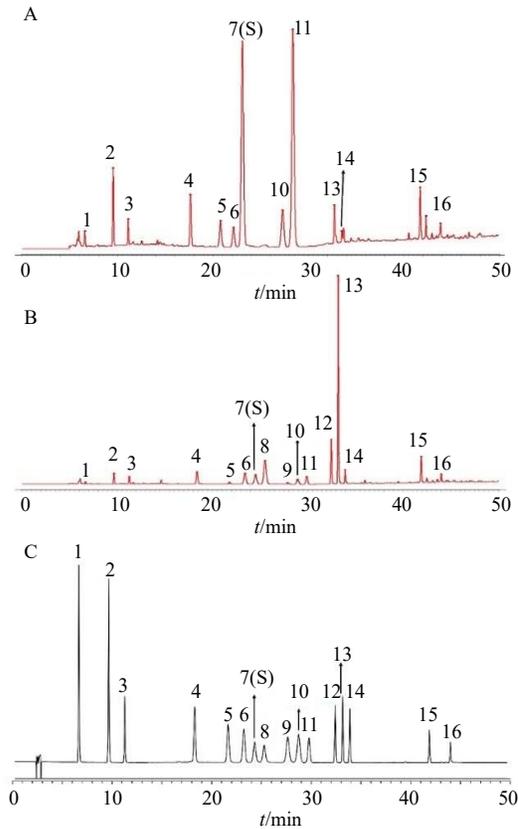
1-protocatechuic acid; 2-*p*-hydroxybenzoic acid; 3-vanillic acid; 4-quercetin-3-O-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside; 5-quercetin-3-O-neohesperidoside; 6-kaempferol-3-O-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside; 7-typhanoside; 8-rutin; 9-isoquercetin; 10-kaempferol-3-O-neohesperidoside; 11-isorhamnetin-3-O-neohesperidoside; 12-kaempferol-3-O-rutinoside; 13-narcissin; 14-isorhamnetin-3-O-glucoside; 15-naringenin; 16-isorhamnetin.

图1 水烛香蒲(A)和东方香蒲(B)的HPLC特征图谱

Fig. 1 HPLC characteristic chromatograms of *T. angustifolia* (A) and *T. orientalis* (B)

的含量存在差异性,峰7、11与峰13的相对峰高可以直观区分2种基原的蒲黄。

18批水烛香蒲的特征图谱中13个共有峰相对保留时间RSD为0.13%~0.67%,相对峰面积RSD为12.5%~98.0%;6批东方香蒲的特征图谱中16个共有峰相对保留时间RSD为0.04%~0.46%,相



1-原儿茶酸; 2-对羟基苯甲酸; 3-香草酸; 4-槲皮素-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷; 5-槲皮素-3-O-新橙皮苷; 6-山柰酚-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷; 7-香蒲新苷; 8-芦丁; 9-异槲皮苷; 10-山柰酚-3-O-新橙皮苷; 11-异鼠李素-3-O-新橙皮苷; 12-山柰酚-3-O-芸香糖苷; 13-水仙苷; 14-异鼠李素-3-O-葡萄糖苷; 15-柚皮素; 16-异鼠李素。

1-protocatechuic acid; 2-*p*-hydroxybenzoic acid; 3-vanillic acid; 4-quercetin-3-*O*-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside; 5-quercetin-3-*O*-neohesperidoside; 6-kaempferol-3-*O*-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside; 7-typhaneoside; 8-rutin; 9-isoquercetin; 10-kaempferol-3-*O*-neohesperidoside; 11-isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside; 12-kaempferol-3-*O*-rutinoside; 13-narcissin; 14-isorhamnetin-3-*O*-glucoside; 15-naringenin; 16-isorhamnetin.

图2 水烛香蒲 (A)、东方香蒲 (B) 及混合对照品 (C) HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of *T. angustifolia* (A), *T. orientalis* (B) and mixed reference substances (C)

对峰面积 RSD 为 17.2%~79.0%; 表明各特征峰保留时间对应良好, 各批次间共有峰所代表化合物较稳定, 但峰面积有明显差别, 即含量差异较大。因此以特征峰的峰面积为指标, 结合熵权 TOPSIS 法对水烛香蒲、东方香蒲进行质量评价, 并采用模式识别方法进一步明确 2 种基原蒲黄的质量差异标志物。

2.5 熵权 TOPSIS 法分析

2.5.1 熵权法计算权重 设有 m 个样品, 每个样品

n 个共有峰峰面积作为评价指标, 构建蒲黄质量评价矩阵 X_{ij} ($i=1, 2, \dots, m; j=1, 2, \dots, n$; 本研究中 $m=24, n=16$)。16 个特征峰均为正向指标, 但不同指标之间量纲不统一, 故将其峰面积 (缺失的峰面积以 0 计算), 根据公式 (1)、(2) 进行同向化及非负平移处理^[12], 得到处理后的矩阵 (Y'_{ij})。再根据公式 (3)、(4)、(5) 计算各指标信息熵 (E_j)、权重 (W_j), 结果见表 2。

表 2 蒲黄的信息熵及权重

Table 2 Information entropy and weights of *Typhae Pollen*

峰号	E_j	W_j	峰号	E_j	W_j
8	0.580	0.150	7	0.912	0.031
12	0.610	0.139	5	0.913	0.030
9	0.621	0.135	6	0.921	0.028
13	0.658	0.122	10	0.927	0.026
14	0.794	0.079	15	0.937	0.023
1	0.875	0.044	4	0.945	0.019
16	0.885	0.041	2	0.950	0.018
11	0.907	0.033	3	0.953	0.017

$$Y_{ij} = \frac{[X_{ij} - \min(X_j)]}{[\max(X_j) - \min(X_j)]} \quad (1)$$

$$Y'_{ij} = |\min(X_{sj})| + 0.01 \quad (2)$$

$$P_{ij} = -\frac{Y'_{ij}}{\sum_{i=1}^m Y'_{ij}} \quad (3)$$

$$E_j = -\frac{1}{\ln m} \sum_{i=1}^m P_{ij} \ln P_{ij} \quad (4)$$

$$W_j = \frac{1 - E_j}{\sum_{j=1}^n (1 - E_j)} \quad (5)$$

E_j 反映指标的离散程度, E_j 越大, 指标的离散程度越小, W_j 越小^[12]。表 2 显示 16 个特征峰的 W_j 大小依次为峰 8>峰 12≈峰 9>峰 13>峰 14>峰 1≈峰 16>峰 11≈峰 7≈峰 5>峰 6≈峰 10≈峰 15>峰 4≈峰 2≈峰 3, 前 3 个特征峰 (峰 8、12、9) 是东方香蒲的特有峰, 峰 13 也是区分 2 种基原蒲黄的显著指标之一。

2.5.2 TOPSIS 法计算相对贴近程度 将“2.5.1”矩阵 (Y'_{ij}) 归一化处理 (公式 6), 得到矩阵 (U_{ij}), 按公式 $U_j^+ = \max(U_{ij})$ 或 $U_j^- = \min(U_{ij})$ 确定标准矩阵 U_{ij} 的正理想解 (U_j^+) 和负理想解 (U_j^-), 按公式 (7)、(8) 计算评价对象与 U_j^+ 、 U_j^- 的欧氏距离 (D_i^+ 、 D_i^-), 按公式 $C_i = D_i^- / (D_i^+ + D_i^-)$ 计算评价对象与理想解的相对贴近程度 (C_i), 结果见表 3。

表3 蒲黄 D_i^+ 、 D_i^- 和 C_i
Table 3 D_i^+ , D_i^- and C_i of Typhae Pollen

样品	D_i^+	D_i^-	C_i	排序	样品	D_i^+	D_i^-	C_i	排序
DF-3	0.185	0.469	0.718	1	SZ-06	0.483	0.127	0.208	13
DF-2	0.220	0.414	0.653	2	SZ-13	0.480	0.120	0.200	14
DF-1	0.228	0.359	0.611	3	SZ-08	0.486	0.117	0.194	15
DF-4	0.264	0.297	0.529	4	SZ-14	0.482	0.113	0.190	16
DF-5	0.377	0.187	0.331	5	SZ-03	0.487	0.112	0.186	17
DF-6	0.395	0.155	0.281	6	SZ-18	0.490	0.110	0.184	18
SZ-12	0.466	0.168	0.265	7	SZ-15	0.479	0.106	0.181	19
SZ-16	0.476	0.144	0.232	8	SZ-05	0.496	0.099	0.166	20
SZ-07	0.471	0.138	0.227	9	SZ-09	0.490	0.093	0.159	21
SZ-01	0.487	0.139	0.222	10	SZ-04	0.492	0.088	0.152	22
SZ-02	0.491	0.134	0.215	11	SZ-10	0.495	0.079	0.138	23
SZ-17	0.473	0.125	0.210	12	SZ-11	0.503	0.054	0.097	24

$$U_{ij} = \frac{Y'_{ij}}{\sqrt{\sum_j Y'^2_{ij}}} \quad (6)$$

$$D_i^+ = \sqrt{\sum_{j=1}^n W_j \times (U_{ij} - U_j^+)^2} \quad (7)$$

$$D_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^n W_j \times (U_{ij} - U_j^-)^2} \quad (8)$$

C_i 越大,样品的质量评价越佳,排名越靠前^[23],结果显示东方香蒲的样品排名均靠前, C_i 在 0.28~0.72,均高于水烛香蒲(0.09~0.27),说明蒲黄不同基原之间的质量有所差异,可能与产地气候、花粉

采集时的成熟度^[13-14]、储存过程或收集的东方香蒲样品批次较少有关。

2.6 化学模式识别分析

2.6.1 PCA 将 16 个特征峰的峰面积导入 SPSS 26.0 软件, KMO 和 Bartlett 球形度检验的结果[0.531 (>0.5)、0.000 (<0.001)]说明特征峰之间存在极显著相关性,适用于 PCA^[15]。以特征值>1 为标准,PCA 提取前 4 个主成分的累积方差贡献率为 89.008%,可以反映蒲黄特征图谱大部分信息,故取前 4 个因子建立因子载荷值矩阵,并用最大方差法进行旋转,得到旋转后的因子载荷矩阵(表 4)。

表4 主成分因子载荷矩阵

Table 4 Load matrix of principal component factors

特征峰	FAC1	FAC2	FAC3	FAC4	特征峰	FAC1	FAC2	FAC3	FAC4
1	-0.394	0.042	0.491	0.608	9	0.852	-0.351	-0.315	-0.002
2	-0.457	0.194	0.827	0.054	10	-0.393	0.832	0.044	-0.031
3	0.052	-0.035	0.872	-0.055	11	-0.412	0.860	0.239	-0.047
4	0.281	0.892	-0.281	-0.132	12	0.872	-0.336	-0.338	-0.015
5	-0.334	0.914	0.065	-0.092	13	0.911	-0.276	-0.252	-0.041
6	0.501	-0.032	-0.584	0.135	14	0.841	-0.340	-0.173	0.087
7	-0.413	0.875	0.194	-0.083	15	0.905	-0.017	0.133	-0.019
8	0.904	-0.28	-0.248	-0.066	16	0.137	-0.238	-0.200	0.866

以因子载荷值>0.5的原则,主成分 1 包括 7 个特征峰(峰 13、15、8、12、9、14、6),方差贡献率 55.082%;主成分 2 包括 5 个特征峰(峰 5、4、7、11、10),方差贡献率 18.204%;主成分 3 包括峰 3、2,方差贡献率 9.258%;主成分 4 包括峰 16、1,方差贡献率 6.463%。以上成分可能是影响水烛香蒲、东方香蒲药材质量的重要因素,且主成分 1

对质量影响较大。

2.6.2 PLS-DA 为更好地体现组间差异,精准分析 2 种基原蒲黄质量的差异性,将峰面积导入 SIMCA 13 软件,进行 PLS-DA 识别分析。24 批样品明显分为 2 类(图 3-A、B),PLS-DA 模型 $R^2_X=0.782$, $R^2_Y=0.971$, $Q^2=0.892$,均>0.5,说明模型拟合良好,并具有良好的预测能力。模型验证(置换检验 $n=200$)

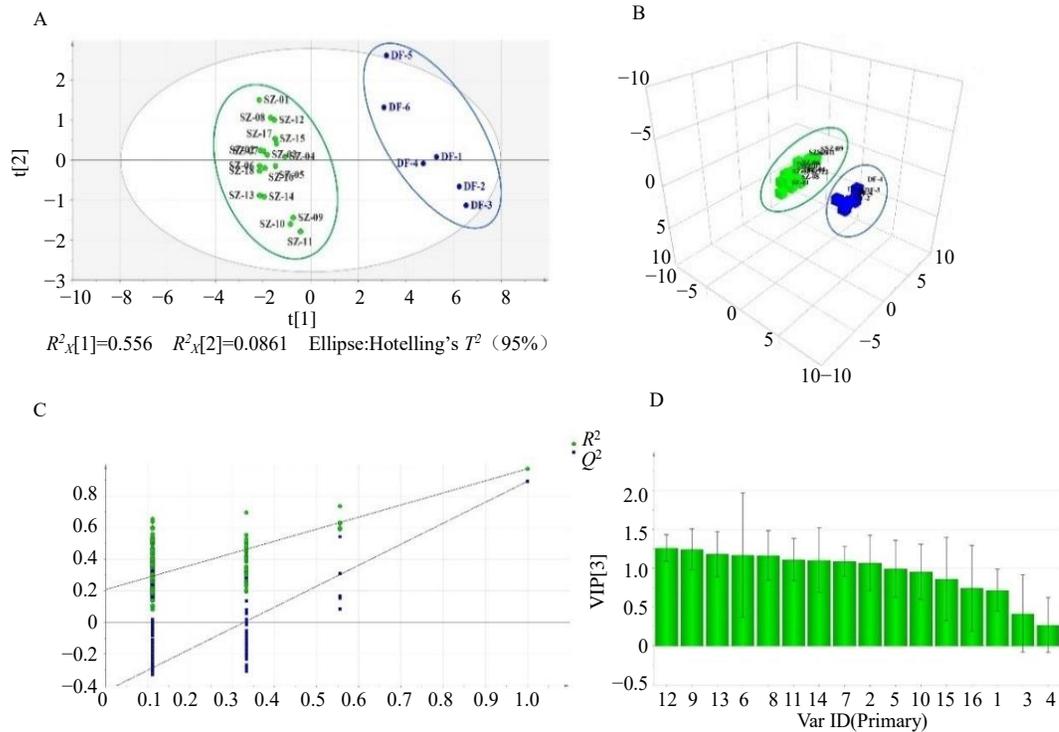


图3 PLS-DA 得分图 (A)、3D 图 (B)、置换检验图 (C) 和 VIP 值 (D)

Fig. 3 PLS-DA score plot (A), 3D plot (B), permutation test plot (C) and VIP value plot (D)

结果显示 R^2 拟合直线 Y 轴截距为 $0.201 < 0.3$, 表明所建立的 PLS-DA 模型结果可靠; Q^2 拟合直线 Y 轴截距为 $-0.449 < 0$, 说明模型不存在过度拟合现象, 预测能力好 (图 3-C)。

以 $VIP > 1$ 为阈值, 筛选出 9 个潜在质量差异标志物 (图 3-D), 分别为峰 12 (山柰酚-3- O -芸香糖苷, $VIP=1.261\ 92$)、峰 9 (异槲皮苷, $VIP=1.243\ 59$)、峰 13 (水仙苷, $VIP=1.181\ 61$)、峰 6 [山柰酚-3- O -(2 G - α - L -鼠李糖基)-芸香糖苷, $VIP=1.169\ 46$]、峰 8 (芦丁, $VIP=1.165\ 35$)、峰 11 (异鼠李素-3- O -新橙皮苷, $VIP=1.111\ 74$)、峰 14 (异鼠李素-3- O -葡萄糖苷, $VIP=1.104\ 22$)、峰 7 (香蒲新苷, $VIP=1.089\ 12$) 和峰 2 (对羟基苯甲酸, $VIP=1.066\ 69$)。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本研究考察了不同流动相体系 (甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水等), 不同检测波长 (210~400 nm), 不同色谱柱 [Kinetex EVO C₁₈ (250 mm×4.0 mm, 5 μ m)、Agilent Eclipse XDB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)] 等对色谱峰数量、峰型、分离情况的影响, 最终优选出“2.1”项下色谱条件。

3.2 提取条件的优化

考察了提取方式 (超声、回流)、提取溶剂 (70% 甲醇、甲醇、50% 甲醇)、提取时间 (1、2、3 h)、溶剂体积 (15、25、50、75、100 mL)、冷浸时间 (0、6、12、18、24 h)。根据“特征峰总峰面积/称样量”取值最大原则, 最终优选出“2.2.2”项下供试品溶液制备方法。

3.3 特征图谱的建立及分析

蒲黄具有止血功效, 现代研究表明其黄酮类成分的抗血小板、抗凝血活性与蒲黄传统功效“止血”一致^[16], 本研究建立的特征图谱可与蒲黄的药理药效对应, 对于评价其药材质量具有代表性。通过特征图谱对比分析发现, 7 号峰 (香蒲新苷) 和 11 号峰 (异鼠李素-3- O -新橙皮苷) 在水烛香蒲中的平均总峰面积是东方香蒲的 7.5 倍, 差异显著; 此外, 这 2 个成分是《中国药典》2020 年版蒲黄项下 2 个含量测定指标, 通过检测, 这 2 个指标成分在 18 批水烛香蒲中的总量均高于规定的 0.5% 限度值, 而在 6 批东方香蒲中的总量均低于 0.5%。进一步对比分析发现, 13 号峰 (水仙苷) 在东方香蒲中的平均峰面积是水烛香蒲的 20.3 倍, 水仙苷作为东方香蒲的含量测定指标更为合理。本课题组前期市场调研发

现水烛香蒲是市售蒲黄的主流基原, 暂未在市售蒲黄中收集到东方香蒲, 可能与其含量达不到《中国药典》的要求有关。因此, 应在充分研究不同基原蒲黄差异性成分的基础上, 对《中国药典》蒲黄项下的含量测定指标和限度进行修改和完善。

结合 PCA、PLS-DA 等化学模式识别可诠释造成质量差异的主要因素, 本研究建立的 PCA、PLS-DA 识别分析方法可将水烛香蒲与东方香蒲分为 2 类, 并筛选出 9 个质量差异标志物, 其中山柰酚-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷、芦丁、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、水仙苷、山柰酚-3-O-(2G- α -L-鼠李糖基)-芸香糖苷、对羟基苯甲酸这 7 个质量差异标志物为首次提出, 且前 3 个化合物是东方香蒲特有的。熵权 TOPSIS 法评价结果显示, 2 种基原蒲黄之间的质量差异较大, 但各基原蒲黄样品批次之间质量相对比较稳定, 特征峰可稳定传递。今后研究可引入性状、浸出物、总多糖、水分、杂质、总灰分等多元化考察指标, 增加蒲黄其他基原及其样品批次数, 结合外观质量和内在品质全方面评判蒲黄的质量, 以期蒲黄药材质量控制提供更加丰富的参考信息。

综上所述, 本研究建立了准确可靠的鉴别和分析蒲黄的 HPLC 方法, 并从所建立的特征图谱上指认了 16 个共有峰, 通过结合化学计量学分析发现不同基原蒲黄的主要化学成分的含量存在差异性, 且东方香蒲的含量测定指标选择峰 13(水仙苷)更为合理, 今后制定蒲黄质量标准时需要在充分研究不同基原蒲黄差异性成分的基础上, 选择专属性强的指标进一步完善《中国药典》蒲黄项下的含量测定指标及修改其限度值, 建立更为科学合理的蒲黄质量评价标准。

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: 368.
- [2] Lee J J, Yi H, Kim I S, *et al.* (2S)-naringenin from *Typha angustata* inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via a G₀/G₁ arrest [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(3): 873-878.
- [3] 姜利鲲, 黄文权. 蒲黄对高脂血症致动脉粥样硬化大鼠作用的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2009, 18(5): 770-773.
- [4] Feng X T, Duan H M, Wen R Y. Pollen typhae total flavone suppresses A7r5 cell proliferation promoted by insulin involving the MEK1/2-ERK1/2 cascades [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2022, 35(6): 1669-1676.
- [5] 代向东, 闫海峰, 张晗, 等. 生蒲黄与炒蒲黄、蒲黄炭提取物对正常 BALB/c 小鼠非特异性免疫功能的影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(9): 20-22.
- [6] 来小丹, 胥正敏, 袁斌. 蒲黄水煎剂对孕后期大鼠离体子宫平滑肌收缩活动的影响 [J]. *中国药房*, 2016, 27(1): 56-58.
- [7] 陈才法, 缪进, 李景辉, 等. 蒲黄水提物对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用 [J]. *解放军药学学报*, 2008, 24(3): 192-195.
- [8] Chen Y Q, Yu H L, Wu H, *et al.* Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in pollen typhae for transformation rule exploration [J]. *Molecules*, 2015, 20(10): 18352-18366.
- [9] Gao M L, Ge Z P, Deng R, *et al.* Evaluation of VEGF mediated pro-angiogenic and hemostatic effects and chemical marker investigation for Typhae Pollen and its processed product [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113591.
- [10] 陈佩东, 严辉, 陶伟伟, 等. 我国香蒲属水生药用植物资源及其资源化利用研究 [J]. *中国现代中药*, 2015, 17(7): 656-662.
- [11] 唐敏, 孙飞, 梁生旺, 等. 基于 UPLC 的蒲黄指纹图谱和多成分含量测定方法研究 [J]. *中药材*, 2022, 45(8): 1894-1898.
- [12] 石依娜, 万青, 汪秋兰, 等. 基于熵权 TOPSIS 法和灰色关联度分析的藤茶药材等级研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(17): 5504-5512.
- [13] 吕紫璇, 杜云, 唐瑜, 等. 不同成熟度蒲黄中异鼠李素-3-O-新橙皮苷、香蒲新苷的含量研究 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2018, 5(11): 172-174.
- [14] 巢蕾, 高明亮, 曹雨诞, 等. 水烛香蒲不同部位黄酮类化合物的动态分析 [J]. *广西植物*, 2021, 41(5): 831-842.
- [15] 何雨晴, 陈盛君, 周海琴, 等. 钩藤药材的特征图谱建立、化学模式识别分析及其与不同基原、混伪品的鉴别 [J]. *中国药房*, 2024, 35(5): 566-571.
- [16] 陈瑾, 郝二伟, 冯旭, 等. 蒲黄化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4729-4740.

[责任编辑 时圣明]