

基于 ITS 序列和 HPLC 指纹图谱法结合重金属元素定量评价忍冬茶藨子叶状层菌的质量

孙颖¹, 张龙霏¹, 邱荣英², 张欣², 熊乐文¹, 张贵民^{2*}, 张永清^{1*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276006

摘要: 目的 基于 ITS 序列进行分子鉴定, 采用指纹图谱、重金属元素定量与化学计量法相结合的方法, 评价不同产地忍冬茶藨子叶状层菌 *Phylloporia lonicerae* 的质量, 为其进一步开发利用提供依据。方法 分别提取来自 4 个不同产地的忍冬茶藨子叶状层菌的基因组 DNA, 扩增 ITS 序列后测序, 并构建系统发育树; 采用 HPLC 法, 流动相为 0.1% 冰乙酸-乙腈进行梯度洗脱, 柱温 30 °C, 体积流量 0.8 mL/min, 检测波长 280 nm, 对 12 批忍冬茶藨子叶状层菌建立指纹图谱及铜、砷、镉、汞、铅 5 种重金属元素含量测定, 运用聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 对忍冬茶藨子叶状层菌进行化学计量分析。结果 构建了基于 ITS 序列的系统发育树, 12 批忍冬茶藨子叶状层菌属于同一个种; 建立了 12 批忍冬茶藨子叶状层菌的指纹图谱, 相似度为 0.829~0.992, 共标定 15 个共有峰, 指认了 5 个成分, ICP-MS 测定结果表明不同产地忍冬茶藨子叶状层菌中重金属元素含量存在明显差异; HCA 分析 12 批忍冬茶藨子叶状层菌明显分为 2 类; PCA 得到 4 个主成分的累积方差贡献率为 86.751%; OPLS-DA 表明铜、砷可作为忍冬茶藨子叶状层菌的特征元素。忍冬茶藨子叶状层菌中共有峰 2、3 和 13 (原儿茶醛) 可能是影响药材质量的差异标志物。结论 建立的忍冬茶藨子叶状层菌 HPLC 指纹图谱及 5 个重金属元素含量测定方法的专属性强, 且准确、可靠, 结合化学计量法可用于忍冬茶藨子叶状层菌的药材鉴别和质量控制。

关键词: 忍冬茶藨子叶状层菌; ITS 序列; 指纹图谱; 重金属元素; 化学计量法; 质量评价; 鸟苷; 尿苷; 腺苷; 原儿茶醛; 原儿茶醛

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)13-4789-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.13.022

Quality evaluation of *Phylloporia lonicerae* based on ITS sequence, HPLC fingerprint and heavy metals quantitation

SUN Ying¹, ZHANG Longfei¹, QIU Rongying², ZHANG Xin², XIONG Lewen¹, ZHANG Guimin², ZHANG Yongqing¹

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formulas and Modern Chinese Medicine, Linyi 276006, China

Abstract: Objective Based on the method of ITS sequences, HPLC fingerprint, heavy metals quantitation and chemometric analysis, the quality of *Phylloporia lonicerae* from different regions was evaluated to provide a basis for its further development and utilization.

Methods Genomic DNA was extracted from samples collected in four different regions, and ITS sequences were amplified and sequenced to construct a phylogenetic tree. HPLC method was used with 0.1% glacial acetic acid-acetonitrile as mobile phase for gradient elution. The column temperature was 30 °C, the flow rate was 0.8 mL/min, and the detection wavelength was 280 nm. The fingerprint of 12 batches of *P. lonicerae* was established and the contents of five heavy metal elements including copper, arsenic, cadmium, mercury and lead were determined. Chemometrics analysis of *P. lonicerae* was performed by hierarchical cluster analysis

收稿日期: 2024-12-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1711200); 山东省重点研发计划项目 (2021CXGC010508)

作者简介: 孙颖 (1982—), 女, 博士, 高级工程师, 从事中药质量评价研究。Tel/Fax: (0539)8379029 E-mail: sunying1982@126.com

*通信作者: 张永清 (1962—), 男, 博士, 教授。Tel/Fax: (0531)89628080 E-mail: zyzq622003@126.com

张贵民 (1969—), 男, 研究员。Tel/Fax: (0539)8336101 E-mail: lunanzhangguimin@yeah.net

(HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** The phylogenetic tree based on ITS sequence was constructed, and the 12 batches of *P. loniceræ* were belong to the same species. The fingerprints of 12 batches of *P. loniceræ* were established. The similarity was 0.83—0.99, and a total of 15 common peaks were calibrated, and five components were identified. The results of ICP-MS determination showed that there were significant differences in the content of heavy metal elements in *P. loniceræ* from different regions. HCA analysis showed that 12 batches of *P. loniceræ* were obviously divided into two categories. PCA obtained a cumulative variance contribution rate of 86.751% for four principal components. OPLS-DA showed that copper and arsenic could be used as characteristic elements of *P. loniceræ*. The common peaks 2, 3 and 13 (protocatechuic aldehyde) in *P. loniceræ* may be the difference markers that affect the quality of medicinal materials. **Conclusion** The established HPLC fingerprint of *P. loniceræ* and the determination method of five heavy metal elements content have strong specificity, and are accurate and reliable. Combined with chemometric method, it can be used for the identification and quality control of *P. loniceræ*.

Key words: *Phylloporia loniceræ*; ITS sequencing; fingerprint; heavy metal element; chemometric method; quality evaluation; guanosine; uridine; adenosine; protocatechuic acid; protocatechualdehyde

忍冬茶藨子叶状层菌 *Phylloporia loniceræ* 属锈革孔菌科, 是一种寄生于忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 植株上的真菌子实体^[1], 俗称“银花蛾子”“金芝”“金银花菌”等^[2]。虽然未被历代本草记载, 但其在民间已有悠久的食用历史, 具有清热解毒、消肿利咽的功效, 2002 年被收录于《山东省中药材标准》^[3]。在山东临沂地区, 尤其是金银花主产区平邑和费县, 具有很高的认知度^[4]。该菌在增强免疫力^[5]、抗肿瘤^[6]、抗病毒^[7]、抗氧化^[8-9]、抗炎^[10]、降血糖^[11-12]等方面功效显著, 其发酵菌丝被列为新资源食品^[13], 主要化学成分包括有机酸类、多糖类、核苷类和甾醇类^[14]。

中药材质量的有效监控是中药成方制剂及相关产品的质量保障, 菌丝、孢子的特征和鉴定者的经验积累是常用的药用真菌的鉴定依据, 主观性较强, 并且多孔类真菌进化趋向复杂, 用传统方法鉴定重现性较差^[15]。《山东省中药材标准》2022 版以薄层色谱法和高效液相色谱法对忍冬茶藨子叶状层菌简单进行鉴别, 专属性不强。近年来, 化学模式识别在中药材产地来源、基原、真伪鉴别等方面应用广泛^[16-17]。重金属检测是中药材质量控制的核心环节, 直接决定其产业应用价值。重金属超标是中药出口受阻的主要原因之一, 《中国药典》2020 年版进一步强化了重金属限量要求, 将铅、镉、砷、汞、铜的统一限量标准纳入通则, 并扩大了适用药材范围。关于茶藨子叶状层菌的指纹图谱、重金属元素与化学计量方法相结合的质量评价方法尚未见报道。本研究在采用 ITS 序列对茶藨子叶状层菌分子鉴别的基础上, 建立 HPLC 指纹图谱, ICP-MS 检测重金属方法, 结合化学计量学分析茶藨子叶状层

菌的质量, 明确其重金属含量、成分特征与产地的关联性, 为忍冬茶藨子叶状层菌的质量控制和综合利用开发提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

MULTICUT 型轮转式切片机、HI 1210 型组织摊片机和 Tissue-TecVIP TM 5 Jr 型自动染色机均购于徕卡仪器有限公司, Tissue-Tec TECTM 5 型组织包埋机(日本樱花检验仪器株式会社), PCR-96 PCR 反应扩增仪(BBI), G 508009 型高速微量离心机(生工生物工程有限公司), DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂), FR980 型凝胶成像系统(上海复日科技有限公司), 3730 XL 型测序仪(ABI, Foster, CA, 美国), 安捷伦 7900 型电感耦合等离子体质谱仪(美国安捷伦科技有限公司); Muiwave PRO 型微波消解仪(奥地利安东帕有限公司); Waters 2998 高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司); XSR 105 DU/A 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); Milli-Q IQ 7000 型超纯水系统(密理博中国有限公司)。

1.2 试剂

Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(批号 B518259)、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(批号 B518131)均购自生工生物工程有限公司; 原儿茶醛(批号 110810-202210, 质量分数 $\geq 98\%$)、原儿茶酸(批号 110809-202207, 质量分数 $\geq 98\%$)、尿苷(批号 110887-201803, 质量分数 $\geq 98\%$)、鸟苷(批号 111977-202202, 质量分数 $\geq 98\%$)、腺苷(批号 110879-202204, 质量分数 $\geq 98\%$)均购自中国食品药品检定研究院。铜(Cu)批号 22A005-4、

砷 (As) 批号 228042-6、镉 (Cd) 批号 229019-3、汞 (Hg) 批号 220912-3、铅 (Pb) 批号 22A020-3、金 (Au) 批号 236032-2、锗 (Ge) 批号 233026、铟 (In) 批号 2205059-2 和铋 (Bi) 批号 225037-2 均购自国家有色金属及电子材料分析测试中心; ICPMS 调谐储备液 (批号 51-308CRY2) 购自 Agilent Technologies 公司, 氩气和氦气均为 99.999% 的高纯气体。硝酸 (批号 20220118)、盐酸 (批号 20211117) 均购自国药集团。

1.3 药材

2022 年 7 月集中采集山东不同产地 12 批忍冬茶藨子叶状层菌, 所有药材经山东中医药大学张永清教授鉴定为忍冬茶藨子叶状层菌 *Phylloporia lonicerae*, 样品信息见表 1。

表 1 忍冬茶藨子叶状层菌药材来源信息

Table 1 Source information of medicinal materials of *P. lonicerae*

样品编号	产地	来源	采集时间
S1	山东莒南涝坡	自采	2022-07
S2	山东莒南岭泉	自采	2022-07
S3	山东莒南相沟	自采	2022-07
S4	山东费县费城	自采	2022-07
S5	山东费县朱田	自采	2022-07
S6	山东费县探沂	自采	2022-07
S7	山东济南固云湖	自采	2022-07
S8	山东济南大明湖	自采	2022-07
S9	山东济南马山	自采	2022-07
S10	山东平邑郑城	自采	2022-07
S11	山东平邑流峪	自采	2022-07
S12	山东平邑铜石	自采	2022-07

2 方法与结果

2.1 基于 ITS 序列的分子鉴定

2.1.1 DNA 提取 取约 10 g 茶藨子叶状层菌, 先用 75% 乙醇浸泡 50 s, 再用无菌水冲洗 5 次, 每次 3 min, 滤纸吸干水分, 取适量中间部位的菌体, 液氮研磨后, 采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (B518255) 参照说明书提取 DNA, 并测定浓度。

2.1.2 PCR 扩增 采用真菌 ITS 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对忍冬茶藨子叶状层菌 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL, 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测^[18]。

2.1.3 测序及数据处理 PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行测序。将所获得的测序序列导入 NCBI 数据库进行 BLAST 比对。采用 MEGA7.0 软件分析并构建系统发育树。

2.1.4 基于 ITS 序列的系统发育分析 为明确遗传多样性, 根据 NCBI Blast 提供的序列一致性分析结果, 选取 NCBI 中登录的叶状层菌属 *Phylloporia ribis strain spzyc-01*、*Phylloporia lonicerae voucher Dai 17900*、*Phylloporia ephedrae 13690*、*Phylloporia perangusta BJFC Dai 18139*、*Phylloporia oreophila Dai 8233*、*Phylloporia oreophila voucher Cui2219*、*Phylloporia crataegi voucher Dai18133* 和 *Phylloporia chrysites voucher 13669* 序列进行参照, 使用 MEGA 软件, 以邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树 (图 1), Bootstrap 值设定初始值 1000 次。结果显示, 不同产地采摘的 12 批茶藨子叶状层菌属于同一种, 与 *Phylloporia ribis strain spzyc-01* 的相似性为 100%, 与 *Phylloporia lonicerae voucher Dai 17900* 为近缘种属。

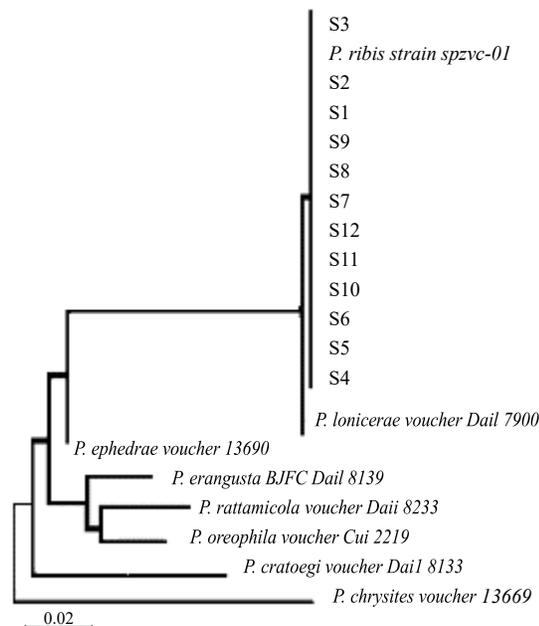


图 1 基于 ITS 序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on ITS sequence

2.2 HPLC 指纹图谱的建立与分析

2.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 冰乙酸 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~35 min, 97% A; 35~50 min, 97%~82% A; 50~60 min, 82% A); 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL; 波长 280 nm。

2.2.2 供试品溶液的制备 取忍冬茶藨子叶状层菌约 2g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入超纯水 20 mL, 回流提取 90 min, 滤过, 放冷, 用超纯水补足定容至 50 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 取鸟苷、尿苷、腺苷、原儿茶醛和原儿茶酸对照品适量, 精密称定, 置量瓶中, 加 5% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过得混合对照溶液。

2.2.4 精密度试验 精密称定同一批 (S1) 样品 2g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以原儿茶醛的保留时间和峰面积为参照, 计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%。

2.2.5 稳定性试验 精密称定同一批 (S1) 样品 2g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8、12、18、24 h, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 以原儿茶醛为参照峰, 记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积, 经计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%。

2.2.6 重复性试验 精密称定同一批 (S1) 样品 6 份, 每份 2g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 以原儿茶醛为参照峰, 记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。经计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%, 相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%。

2.2.7 指纹图谱的建立及相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》软件对 12 批样品的 HPLC 图谱特征峰相关数据进行分析。以 LP1 指纹图谱为基础, 采用中位数法自动匹配, 生成指纹图谱, 并根据峰面积大小和分离度, 确定 12 批样品中具有代表性的 15 个共有峰作为特征峰 (图 2)。13 号峰为原儿茶醛, 因其峰面积较大而稳定且分离度好, 故选择 13 号峰作为参照峰 (S), 计算其他特征峰相对于 13 号峰的相对保留时间, 依次为 0.095、0.107、0.113、0.137、0.142、0.181、0.258、0.268、0.297、0.445、0.580、0.597、1.000、1.448、1.499。通过与混合对照品比对指认其中的 5 个共有峰, 分别是鸟苷 (6 号峰)、尿苷 (7 号峰)、腺苷 (8 号峰)、原儿茶酸 (12 号峰) 和原儿茶醛 (13 号峰), 混合对照品 HPLC 图见图 3。12 批样品相似度为 0.829~0.992, 表明 12 批忍冬茶藨子叶状层菌样品在化学成分种类和含量上具有很

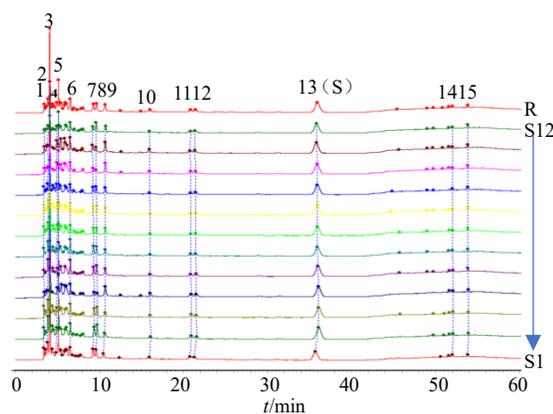
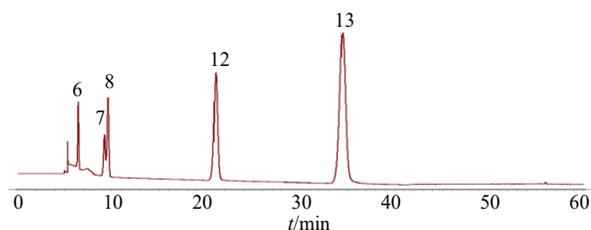


图 2 12 批茶藨子叶状层菌样品 HPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 2 HPLC superimposed fingerprint of 12 batches of *P. lonicerae* and control fingerprint (R)



6-鸟苷; 7-尿苷; 8-腺苷; 12-原儿茶酸; 13-原儿茶醛。

6-guanosine; 7-uridine; 8-adenosine; 12-protocatechuic acid; 13-protocatechualdehyde.

图 3 混合对照品 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chart of mixed reference substance

高的相似性。相似度评价结果见表 2。

2.2.8 聚类分析 利用 SPSS 22.0 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 提取出 3 个特征值大于 1 的主成分, 其方差贡献率依次为 57.507%、20.037% 和 12.990%, 累计方差贡献率为 90.534%。这 3 种主成分保留了忍冬茶藨子叶状层菌的绝大部分化学成分信息, 将 15 个化学成分评价指标降维成 3 个综合指标, 使品质评价更加方便简洁。忍冬茶藨子叶状层菌各共有峰峰面积数据导入 SPSS 22.0 分析软件, 采用组间联接法, 以平方欧氏距离为度量标准进行聚类分析 (图 4)。当欧氏距离介于 20~25 时, 12 批样品明显聚为 2 大类。

2.2.9 PCA 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 以忍冬茶藨子叶状层菌各共有峰峰面积为变量, 利用 SIMCA 14.1 软件进行 PCA 分析和 OPLS-DA 分析 (图 5-A 和 B)。

表 2 相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results

编号	相似度												R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
S1	1.000												
S2	0.920	1.000											
S3	0.939	0.989	1.000										
S4	0.834	0.909	0.904	1.000									
S5	0.920	0.965	0.969	0.858	1.000								
S6	0.936	0.974	0.987	0.880	0.972	1.000							
S7	0.941	0.964	0.983	0.884	0.969	0.985	1.000						
S8	0.934	0.970	0.986	0.885	0.977	0.986	0.992	1.000					
S9	0.948	0.973	0.980	0.898	0.972	0.976	0.985	0.991	1.000				
S10	0.887	0.921	0.923	0.934	0.937	0.904	0.919	0.929	0.946	1.000			
S11	0.897	0.931	0.939	0.956	0.930	0.924	0.930	0.940	0.947	0.988	1.000		
S12	0.829	0.939	0.901	0.872	0.927	0.894	0.878	0.906	0.923	0.910	0.901	1.000	
R	0.948	0.985	0.990	0.926	0.98	0.983	0.985	0.989	0.992	0.959	0.967	0.930	1.000

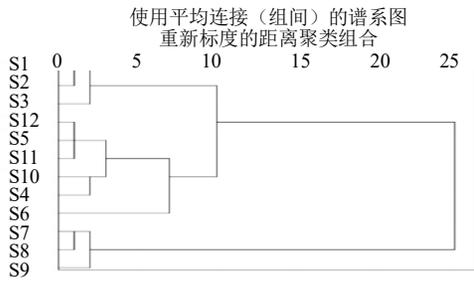
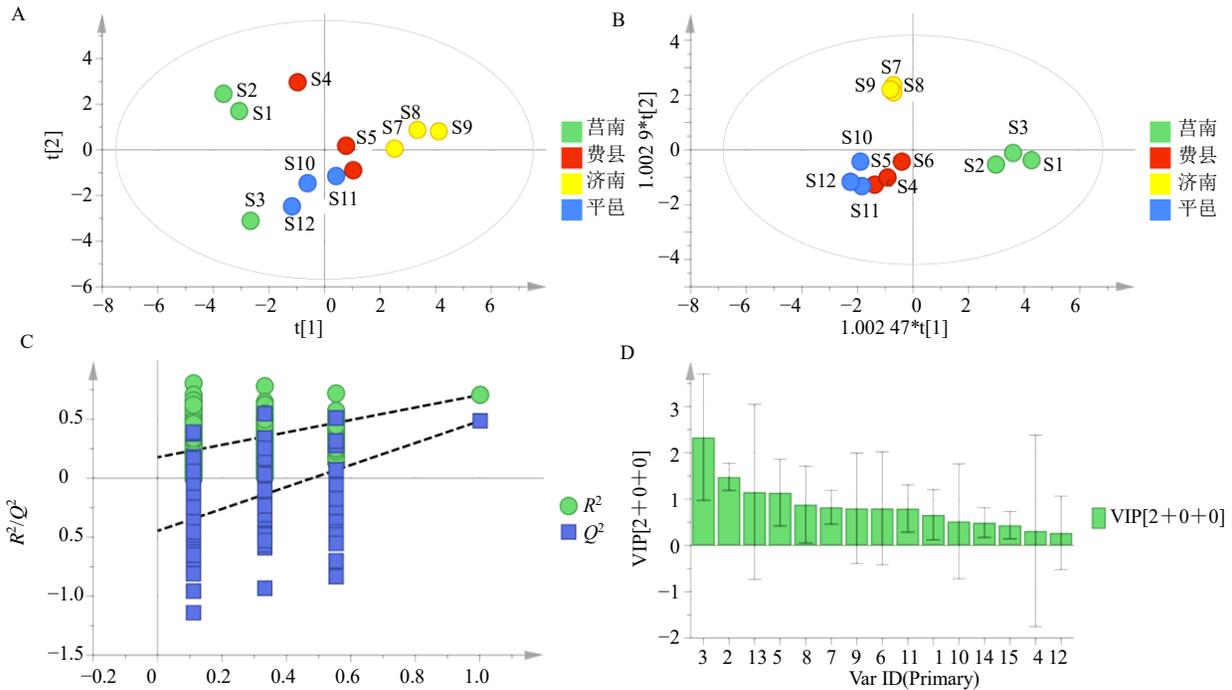


图 4 聚类树状图

Fig. 4 Cluster tree diagram

PCA 中, 15 个共有峰变量可拟合为 5 个主成分, 总预测能力 95.3%。说明模型中的 5 个主成分可以较好地代表 15 个变量的大部分信息。基于 PCA 的空间分布特征显示(图 5-A), 样本组间欧氏距离直观反映了不同组别的成分差异程度, 其中异质性较高的样本组间表现出更大的空间距离。具体而言, 济南产地样本(S7~S9)集中分布于第一象限, 形成独立聚类区域; 而其他产地样本(S1~S3、S4~S6、S10~S12)则呈现跨象限分布特征。



A-PCA; B-OPLS-DA; C-置换检验图; D-VIP 值图。

A-PCA; B-OPLS-DA; C-permutation test plot; D-VIP plot.

图 5 化学成分分析

Fig. 5 Chemical composition analysis

这种空间分布模式表明济南产地样本群内部化学成分组成具有较高的同源性,其组内变异程度显著低于其他3个产地。进一步通过 OPLS-DA 验证发现,4组产地样本的聚类分布相对集中,其中费县与平邑产地的样本在投影空间内呈现邻近分布趋势,提示这2个产地的成分存在相似性特征。

模型中累积解释能力参数 R^2_X 、 R^2_Y 分别为 0.870、0.655,均大于 0.5,预测能力参数 Q^2 为 0.542,表明模型拟合结果稳定可靠。为防止过拟合造成假阳性结果,设置分类 Y 矩阵变量随机排列 200 次做置换检验, R^2 回归线在 Y 轴截距为 0.177, Q^2 回归线在 Y 轴截距为 -0.447,且 2 条虚线均呈上升趋势,说明该模型没有出现拟合现象,可用于分析样品的组间差异,见图 5-C。以横坐标为共有峰编号,纵坐标为 VIP 值作图(图 5-D),VIP 值大于 1 的共有峰有 3、2 和 13(原儿茶醛),说明这 3 个共有峰对分类的贡献率较大,可作为忍冬茶藨子叶状层菌的质量标志物进行质量控制研究。

2.3 重金属元素 ICP-MS 含量测定

2.3.1 ICP-MS 仪器参数 样品引入时间 50 s,稳定时间 30 s,蠕动泵转速 0.50 r/s,冲洗时间 30 s,等离子体气体体积流量 15 L/min,辅助气体 1 L/min,雾化气 1 L/min,补偿/稀释气体 1 L/min,雾化室温度 2 °C,采集重复次数 3,以含 Ge、In、Bi 各 1 $\mu\text{g/mL}$ 的内标溶液在线实时校正,He 模式。

2.3.2 稀释液和内标溶液制备

(1) 稀释液:量取硝酸 20 mL,置 1 000 mL 量瓶中,加入 Au 单元素标准储备液 150 μL ,用超纯水稀释至刻度,摇匀。

(2) 内标溶液:精密量取 Ge 单元素标准溶液 50 μL 、In 单元素标准溶液 50 μL 、Bi 单元素标准溶液 50 μL ,置同一 50 mL 量瓶中,用稀释液稀释至刻度,摇匀。

2.3.3 供试品溶液制备 样品粉碎,取约 0.5 g,精密称定,置于聚四氟乙烯消解反应管中,加入硝酸 10 mL,盐酸 1 mL,加盖密封,放入微波消解罐中,按表 3 程序消解。消解结束后,放冷至室温,置于电热板,以 130 °C 敞口赶酸至剩余液体量约 1 mL,

表 3 微波消解条件

Table 3 Microwave digestion conditions

初温/°C	爬升/min	终温/°C	保持/min
室温	10	130	10
130	10	190	60

冷却,用稀释液转移至 50 mL 量瓶,稀释至刻度,摇匀,得供试品溶液。同法制得试剂空白溶液。

2.3.4 线性方程的绘制 取 Cu 标准液浓度为 0、50、100、200、300、500、800 ng/mL,As 标准液质量浓度为 0、5、10、20、30、50、80 ng/mL,Cd 标准液质量浓度为 0、2.5、5、10、15、25、40 ng/mL,Hg 标准液质量浓度为 0、0.5、1、2、3、5、8 ng/mL,Pb 标准液质量浓度为 0、12.5、25、50、75、125、200 ng/mL,以各元素的浓度为横坐标(X),以相应元素的响应为纵坐标(Y),绘制标准曲线方程。各元素线性方程为,Cu: $Y=0.1032X+1.668 \times 10^{-4}$, $R^2=0.9995$; As: $Y=8.489 \times 10^{-3}X-2.616 \times 10^{-6}$, $R^2=0.9996$; Cd: $Y=2.164 \times 10^{-3}X+3.372 \times 10^{-6}$, $R^2=0.9994$; Hg: $Y=2.061 \times 10^{-3}X+1.060 \times 10^{-6}$, $R^2=0.9993$; Pb: $Y=8.289 \times 10^{-3}X+4.204 \times 10^{-5}$, $R^2=0.9991$; 各元素线性与范围均符合验证要求。Cu、As、Cd、Hg、Pb 的线性范围分别为 0~800.000 ng/mL、0~80.000 ng/mL、0~40.000 ng/mL、0~8.000 ng/mL、0~200.000 ng/mL。Cu 的定量限为 5 mg/kg,As 的定量限为 0.5 mg/kg,Hg 的定量限为 0.05 mg/kg,Cd 的定量限为 0.25 mg/kg,铅的定量限为 1.25 mg/kg。

2.3.5 稳定性试验 按照“2.3.3”项下方法制备的供试品溶液于室温下放置,分别于配制后 0、1、2、4、6、8、10、12 h 取样测定。各元素的各时间点浓度值和 0 h 相比的变化率均在 96.40%~105.43%,说明在室温下放置 12 h 样品保持稳定。

2.3.6 精密度试验 按照“2.3.3”项方法平行制备 12 份样品,2 名分析人员于不同日期使用同一仪器,对同一个样品进行试验操作。结果显示各元素含量的 RSD 均小于 3.7%。说明仪器精密度良好。

2.3.7 加样回收率试验 按照“2.3.3”项方法分别制备准确度 50%、100%、150%加标溶液,消解程序同表 3。结果显示 3 个浓度 9 份加标溶液中,各元素的加标回收率均在 93.85%~110.03%,回收率的 RSD 均小于 5.1%,说明准确度良好。

2.3.8 忍冬茶藨子叶状层菌重金属含量分析 按照内标校正的标准曲线法计算各样品中重金属含量。5 种重金属元素在 12 批样品中的含量见图 6,各元素的富集程度因产地不同而不同。Cd、Hg、Pb、As 4 种元素含量均符合《中医药-中药材重金属限量》ISO 国际标准。Cd 元素,莒南产地的含量偏高(最高 1.097 mg/kg),济南最低(最低 0.226 mg/kg),

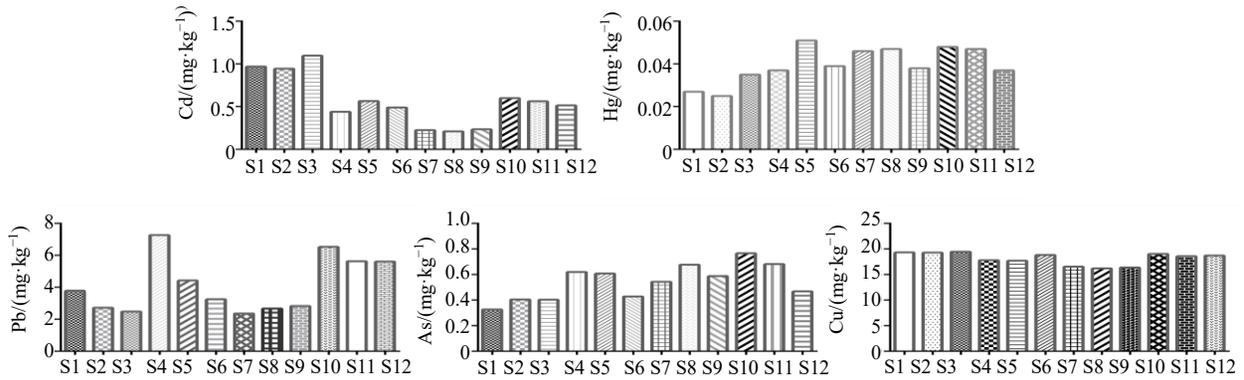


图6 5种重金属元素含量差异

Fig. 6 Differences in content of five heavy metal elements

平邑和费县产地相当。Hg元素，莒南产地的含量偏低（最低0.025 mg/kg），济南、平邑和费县3产地相当。Pb元素，莒南和济南产地含量偏低（最低2.364 mg/kg），平邑和费县产地含量偏高（最高7.268 mg/kg）。As元素，富集趋势和Hg元素相似，莒南产地的含量偏低（最低0.327 mg/kg），济南、平邑和费县3产地相当。12批样品对于Cu元素的富集具有相同趋势，接近《中国药典》2020年版中对于中药材规定的上限（20 mg/kg）。总体而言，12批样品中，5种元素在平邑和费县产地具有相同的富集趋势。

2.3.9 OPLS-DA 为了探寻忍冬茶藨子叶状层菌不同批次之间产生差异性的主要标志物，采用PCA

和OPLS-DA对样品进行分析。将12批样品的5种元素含量导入SIMCA 14.1软件，获得相关模型图，见图7-A、B。该模型中累积解释能力参数 R^2_X 、 R^2_Y 分别为0.972、0.579，均大于0.5，预测能力参数 Q^2 为0.506，说明模型具有一定的预测能力，解释能力尚可。为防止该模型过拟合造成假阳性结果，设置分类Y矩阵变量随机排列200次做置换检验，见图7-C， R^2 回归线在Y轴截距为-0.0228， Q^2 回归线在Y轴截距为-0.558，且2条虚线均呈上升趋势，说明该模型没有出现拟合现象，可用于分析样品的组间差异。PCA的空间分布特征表明了不同组别之间的成分差异程度，OPLS-DA验证发现，4产地样

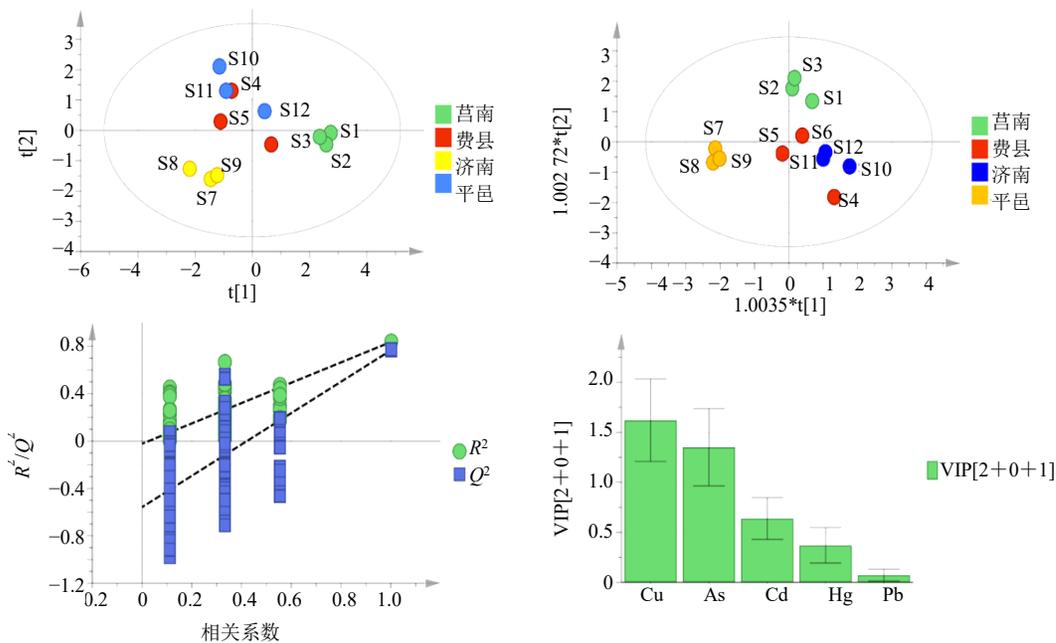


图7 5种重金属元素差异分析

Fig. 7 Analysis of differences in five heavy metal elements

本的聚类分布相对集中，其中费县与平邑产地的样本呈现邻近分布趋势，提示这2个产地的重金属元素存在相似性特征。在95%的置信区间内，VIP值>1的元素为Cu和As，可作为鉴别和区分忍冬茶藨子叶状层菌质量的标志物。

2.3.10 聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 采用多元统计分析软件SIMCA-P 14.1对12批样品中5种重金属元素的标准化峰面积HCA，结果见图8。样品被分2类：第1类为S7~S9，莒南产区；第2类为S1~S6和S10~S12。HCA结果表明济南和临沂茶藨子叶状层菌的质量存在一定地域差异性。

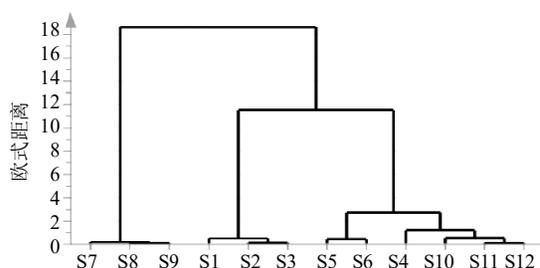


图8 聚类分析图

Fig. 8 Cluster analysis chart

2.4 相关性分析

以筛选到的2种重金属元素Cu、As的含量和“2.2.9”中分析到的贡献率比较大的3个共有峰2、3、13的峰面积做两变量相关性分析，结果见表4。Cu元素与共有峰2和3呈显著负相关，与共有峰13呈显著正相关；As元素与共有峰2和3呈正相关，与共有峰13呈负相关，As元素与共有峰3有显著相关性。

表4 金属元素含量与共有峰相关性分析

Table 4 Correlation analysis between metal element content and common peaks

□□ 共有峰	线性关系	相关系数	P值
Cu	2 $Y = -0.01895X + 20.73$	-0.778 1	0.002 9**
	3 $Y = -0.005961X + 21.12$	-0.602 5	0.038 1*
	13 $Y = 0.02139X + 10.61$	0.579 1	0.048 5*
As	2 $Y = 0.001085X + 0.3955$	0.395 6	0.203 0
	3 $Y = 0.00074X + 0.1749$	0.664 6	0.018 4*
	13 $Y = -0.001686X + 1.137$	-0.405 5	0.191 0

**P<0.01, *P<0.05.

3 讨论

3.1 ITS序列鉴定

真菌的分类较为复杂，传统鉴定方法主要依赖生长特性、形态学特征以及生理生化指标，存在一

定的局限性，尤其在分类时容易出现误判。DNA条形码技术作为一种分子鉴定技术，不受物种外部形态的影响，对能提取出DNA的各类型样品均能进行鉴定，ITS序列可作为潜在的多孔菌通用条形码序列^[19]。本研究从12批茶藨子叶状层菌中提取DNA并获得了稳定的ITS序列，利用NJ树分析，结果表明，ITS序列能准确鉴定忍冬茶藨子叶状层菌的种类，为后续质量评估奠定了分子基础。

3.2 HPLC指纹图谱

本研究在样品处理过程中，根据忍冬茶藨子叶状层菌的传统食用方法，通过单因素法优化了提取溶剂，料液比和回流时间等条件。以峰面积、指纹图谱中色谱峰数量和分离度为考察指标，最终确定了水为提取溶剂，料液比1:10，回流提取时间90 min为最佳提取条件。

在色谱条件优化方面，通过紫外吸收光谱全波长扫描，发现280 nm检测波长下色谱峰数目较多，且分离度良好，基线平稳，因此选择280 nm作为检测波长。同时，对流动相体系（如甲醇-磷酸水、冰乙酸-乙腈、乙腈-磷酸水）、柱温及洗脱程序等进行了筛选优化。实验结果表明，采用0.1%冰乙酸-乙腈体系，柱温30℃，梯度洗脱的条件下，峰形和分离效果最佳。

本研究通过HPLC指纹图谱，结合CA、PCA、OPLS-DA等化学计量学方法，对来自不同产地的12批忍冬茶藨子叶状层菌样品进行了系统评价。聚类分析结果表明，12批样品可分为2类，共有峰2、3和13可作为忍冬茶藨子叶状层菌的质量标志物，其中原儿茶醛（峰13）是一种常见的植物次生代谢产物，广泛存在于多种中药材中。已有研究表明，原儿茶醛不仅具有显著的抗氧化活性，还对炎症、免疫反应等生理过程具有调节作用^[20]，此外，原儿茶醛在其他药材和中成药中也被广泛作为质量控制标志物，如在丹参和参芪通脉口服液，均表现出了作为质量标志物的可行性^[21-22]。聚类结果与产地具有相关性，推测产地对于忍冬茶藨子叶状层菌化学成分具有一定的影响。本研究仅对其中5个共有峰进行了成分指认，其他共有峰的成分在后期的研究中将进一步确定。

3.3 重金属元素

中药是包含有机成分、无机元素及其配合物的复杂体系，具有多效性和整体平衡调节性。中药材中的元素对于中药的化学成分和药效具有重要的

作用,可以作为中药的质量控制依据^[23]。大型真菌中元素的富集与其产地、品种和生长环境等有着密切的联系^[24]。本研究对 12 批样品中的 Pb、Cd、Hg、As 等重金属元素进行了测定,结果表明,所有样品均符合《中医药-中药材重金属限量》ISO 国际标准的要求。然而,重金属元素,尤其是 As、Pb 等有毒元素,在中药材中的含量如果超标,将直接影响其安全性和药效。文献中多次报道了中药材中重金属的超标与中毒、肝肾损害等不良反应之间的关系^[25],例如 As 主要通过扩张毛细血管,麻痹血管舒缩中枢,导致腹腔脏器出现严重失血,从而引发肝、肾、心等实质性器官的损害^[26]。因此,重金属含量的控制在中药质量管理中至关重要。此外,重金属元素的富集与药材的产地和环境密切相关。研究表明,不同产地和生长环境的变化,会影响真菌对重金属的富集能力^[27]。本研究发现,4 产地中 Cu 的重金属含量在 18~20 mg/kg,说明该菌对于 Cu 元素有一定的富集作用。研究表明 Cu 元素在生物体内是许多酶的金属辅基,不仅对真菌子实体的生长有重要影响,而且可促进真菌子实体中多糖的合成^[28]。可溶性有机质一方面可以利用表面官能团与 As 竞争矿物表面的吸附点位,另一方面可以与 As 形成络合物从而影响 As 元素的富集^[29]。通过筛选到的特征元素 Cu、As 和特征峰共有峰 2、3 和 13 相关性分析,Cu、As 和共有峰 2、3、13 具有相关性。此外,重金属元素的聚类结果与化学成分的聚类结果一致,进一步验证了产地对其化学成分和重金属富集的双重影响。

本研究通过结合 ITS 序列鉴定、HPLC 指纹图谱法及重金属元素分析,系统评估了茶藨子叶状层菌的质量。ITS 序列鉴定提供了种类鉴定的分子依据,HPLC 指纹图谱则通过定量化学成分特征峰,为质量评价提供了重要的指纹图谱数据,而重金属元素分析则进一步确保了药材的安全性。不同方法的结合,不仅能系统地分析忍冬茶藨子叶状层菌的有效成分,还能够为其产地来源提供依据,提升了质量控制的精准度和全面性。已有文献表明,联合应用 DNA 条形码技术和 HPLC 指纹图谱法能有效提升中药材的鉴定和质量评价精度^[19]。因此,本研究的综合分析方法为忍冬茶藨子叶状层菌的质量控制提供了有力的支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张小青,戴玉成. 中国真菌志(锈革孔菌科)(第 29 卷) [M] 北京: 科学出版社, 2005: 167-170.
- [2] 范轶欧,陈敏,周雯,等. 茶藨子叶状层菌研究概况及开发利用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(1): 91-94.
- [3] 山东省中药材标准 [S]. 2022: 128-129.
- [4] 邹响员. 山东大型真菌种类资源调查及 *Phylloporia* 属真菌的生药学研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2013, 62.
- [5] 卢连华,郭婕,颜燕,等. 金银花菌子实体对小鼠免疫功能调节作用的实验研究 [J]. 毒理学杂志, 2018, 32(5): 379-382.
- [6] Zaidman B Z, Yassin M, Mahajna J, et al. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(4): 453-468.
- [7] 于秀玲,白丽君,李琳,等. 茶藨子叶状层菌化学成分及其体外抗病毒活性 [J]. 中成药, 2020, 42(7): 1777-1781.
- [8] Zhao H Q, Zhang M M, Liu Q, et al. A comprehensive screening shows that ergothioneine is the most abundant antioxidant in the wild macrofungus *Phylloporia ribis* Ryvarden [J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2018, 36(2): 98-111.
- [9] Liu Y H, Xu J Z, Zong A Z, et al. Anti-angiogenic activity and mechanism of a chemically sulfated natural glucan from *Phellinus ribis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107(Pt B): 2475-2483.
- [10] 程书华. 忍冬茶藨子叶层孔菌生药学研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2012.
- [11] 齐大明,董诚明,刘天亮,等. 基于指纹图谱对金银花与山银花的区分及各品种金银花质量评价 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1946-1952.
- [12] Lee I K, Lee J H, Yun B S. Polychlorinated compounds with PPAR-gamma agonistic effect from the medicinal fungus *Phellinus ribis* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(16): 4566-4568.
- [13] 秦国培. 茶藨子叶状层菌的深层发酵及其菌丝质量标准研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- [14] 李聪. 忍冬茶藨子叶层孔菌化学成分研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2009.
- [15] 汤欢,苏燕燕,雷志勇,等. 药用多孔菌 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 世界中医药, 2016, 11(5): 771-776.
- [16] 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.
- [17] 王洋,魏永孝,谷雨薇,等. 基于指纹图谱和多指标成

- 分定量结合化学计量法延胡索不同产地质量评价 [J]. 中草药, 2024, 55(19): 6730-6737.
- [18] 何小翠, 万晶琼, 朱益灵, 等. 基于 ITS 序列和化学模式识别方法鉴定金蝉花及其混淆品独角龙 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2): 403-411.
- [19] 钟婧娉, 殷洪林, 张桐, 等. 基于 ITS2 序列和特征图谱的天冬质量评价 [J]. 中草药, 2024, 55(22): 7812-7819.
- [20] 张景富, 肖雨, 何继江, 等. 原儿茶醛对环磷酰胺诱导急性肾损伤的保护作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1217-1223.
- [21] 李倩, 王莉, 裴京楠, 等. 基于特征图谱、化学计量学及活性评价探讨参芪通脉口服液质量标志物 [J]. 中国医院药学杂志, 2025, 45(6): 622-627.
- [22] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 609-618.
- [23] 范文秀, 冯晨. 不同产地麦冬中锌、铜、锰、铁的比较研究 [J]. 广东微量元素科学, 2006, 13(11): 56-59.
- [24] 周少奇, 高环, 邓春英, 等. 梵净山野生红菇矿质元素分布特征及土壤相关性分析 [J]. 安全与环境学报, 2021, 21(5): 2319-2328.
- [25] 韩小丽, 张小波, 郭兰萍, 等. 中药材重金属污染现状的统计分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2041-2048.
- [26] 程黔荣, 杨勤, 钟世红. 中药材规范化种植中重金属污染的防治 [J]. 中国药业, 2004, 13(6): 21-22.
- [27] 杜巧丽, 蒋君梅, 李向阳, 等. 大型真菌重金属富集能力机制研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2021, 40(3): 36-41.
- [28] 孟江玲, 何德, 李翠新. 蛹虫草对铜离子的耐受性和富集特征 [J]. 河南农业科学, 2021, 50(4): 66-71.
- [29] Hossain M, Mestrot A, Norton G J, *et al.* Arsenic dynamics in paddy soil under traditional manuring practices in Bangladesh [J]. *Environ Pollut*, 2021, 268(Pt A): 115821.

[责任编辑 时圣明]