

基于 12 种活性成分动态变化对不同采收期忍冬叶的质量评价

赵秋晨¹, 管仁伟¹, 张才波², 路俊仙^{1*}

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 齐鲁师范学院, 山东 济南 250200

摘要: **目的** 分析 1~12 月忍冬 *Lonicerae japonicae* 叶中 12 种活性成分含量的动态变化, 评价不同采收期忍冬叶质量。 **方法** 采用 UPLC 法检测每月采摘的忍冬叶中绿原酸、当药苷、断氧化马钱子苷、异槲皮苷等 12 种活性成分的含量, 绘制动态变化曲线, 分析成分含量变化, 并结合聚类分析、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 构建不同采收期忍冬叶中 12 种活性成分的含量差异性模型, 综合评价忍冬叶的质量。 **结果** UPLC 法测得 3、2 月忍冬叶中化学成分的含量较高, 4、12、1 月次之。根据所测每月忍冬叶中活性成分的含量, 聚类分析、PCA、OPLS-DA 分析一致表明, 忍冬叶被分为 4 类, 12、1、2 月为一类, 5、6、7、8、9、10、11 月为一类, 3 月为一类, 4 月为一类。进一步的多元统计分析显示, 绿原酸、异绿原酸 A、木犀草苷或是导致忍冬叶质量差异的关键成分。 **结论** 忍冬叶中 12 种活性成分含量一年中变化显著, 3、2、4、12、1 月忍冬叶的质量较好, 绿原酸、异绿原酸 A、木犀草苷可以作为忍冬叶质控的关键成分。结合忍冬种植模式, 12、1、2 月为忍冬叶最佳采收期。研究结果为忍冬叶的质量控制及评价提供方法和依据, 也为忍冬叶的合理开发利用提供支持。

关键词: 忍冬叶; 超高效液相色谱; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 当药苷; 断氧化马钱子苷; 芦丁; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 木犀草苷; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)17-6370-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.17.025

Quality evaluation of *Lonicerae Japonicae* leaves at different harvest periods based on dynamic variation of 12 active ingredients

ZHAO Qiuchen¹, GUAN Renwei¹, ZHANG Caibo², LU Junxian¹

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

2. Qilu Normal University, Jinan 250200, China

Abstract: **Objective** To evaluate the quality of *Lonicerae japonicae* leaves picked from January to December based on the dynamic changes of 12 active ingredients. **Methods** An ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) method was used to determine the contents of 12 active ingredients such as chlorogenic acid, sweroside, secoxyloganin and isoquercetin in *Lonicerae japonicae* leaves picked every month. Dynamic change curves were plotted to analyze the content change of each ingredient. To comprehensively evaluate the quality of *Lonicerae japonicae* leaves harvested at different periods, clustering analysis, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) were respectively constructed to compare the contents of 12 active components. **Results** The 12 active ingredients changed significantly throughout the year. The total contents of chemical components in *Lonicerae japonicae* leaves picked in March and February were the highest, followed by April, December and January. According to the content of active ingredients in *Lonicerae japonicae* leaves measured each month, the results of cluster analysis, PCA and OPLS-DA consistently indicated that *Lonicerae japonicae* leaves were divided into four categories, one in December, January and February, one in May, June, July, August, September, October and November, one in March and one in April. Further multivariate statistical analysis showed that

收稿日期: 2025-03-02

基金项目: 山东省中医药科技发展计划 (2021Z047); 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训项目 (202396); 中药资源保障能力提升工程 (202319); 国家重点研发计划 (2017YFC1701500); 中央本级重大增减支项目 (2060302)

作者简介: 赵秋晨 (1992—), 研究实习生, 研究方向为中药资源与质量控制。Tel: (0531)82949822 E-mail: 15265545618@163.com

***通信作者:** 路俊仙, 副研究员, 研究方向为中药资源与质量控制。Tel: (0531)82949822 E-mail: lujunxian11@163.com

chlorogenic acid, isochlorogenic acid A and luteolin might be the key components causing the quality difference of *Lonicerae japonicae* leaves. **Conclusion** The contents of 12 active ingredients in *Lonicerae japonicae* leaves picked in different months were significantly different. The quality of *Lonicerae japonicae* leaves was better in March, February, April, December and January. Chlorogenic acid, isochlorogenic acid A and luteolin could be used as key components for quality control of *Lonicerae japonicae* leaves. In combination with the planting pattern of *Lonicerae japonicae*, December, January and February were the best harvesting periods for the leaves. This study will provide methods and basis for the quality control and evaluation of the *Lonicerae japonicae* leaves, and also offers support for their rational development and utilization.

Key words: *Lonicerae japonicae* leaves; ultra-high performance liquid chromatography; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; sweroside; secoxyloganin; rutin; hyperoside; isoquercitrin; galuteolin; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis

忍冬叶为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥叶, 具有清热解毒、疏风通络的功效, 主治诸疮、热毒血痢、温疫秽恶、咽喉疼痛等疾病^[1]。忍冬叶始载于东晋·葛洪的《肘后备急方》^[2], 历代古籍多有“忍冬茎叶, 剉数斛, 煮令浓, 取汁煎之”、“藤叶皆可用”、“忍冬茎叶及花功用皆同”的记录^[3]。但自清朝开始, 忍冬主要以花(金银花)入药、藤茎(忍冬藤)次之^[4], 叶作为非药用部位遭弃用, 一直沿用至今。

目前, 我国忍冬的种植面积高达 2.6 万 hm^2 , 每年修枝整形过程中有高达金银花产量 10 倍的忍冬叶被丢弃, 造成极大的资源浪费^[5]。近年来, 多项研究揭示忍冬叶中黄酮类、有机酸类、环烯醚萜类等多种活性成分的种类和含量优于忍冬藤, 黄酮类成分的含量更是高于金银花^[6]。忍冬叶抗氧化、抑菌能力与金银花相近, 优于忍冬藤^[5, 7], 抗禽流感病毒的能力甚至强于金银花^[8], 具有较高的药用价值, 应进行合理的开发利用。研究者也在探索合理的忍冬叶质量评价方法, 国晓莹等^[9]基于 HPLC-DAD 法, 发现忍冬幼叶中总酚酸含量高于金银花的各发育时期; 黄厚钰等^[10]利用 HPLC 法, 分析 3~11 月忍冬叶中 7 种活性成分的含量, 提出应采收初霜后的忍冬叶。可见忍冬叶的质量与采摘时间相关, 为确保其质优稳定, 需进一步研究忍冬叶全年的质量变化规律及评价方法。为此本研究采用 UPLC 法检测忍冬叶中 12 种活性成分 1 年中的动态含量变化, 结合聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘判别分析, 构建忍冬叶 1~12 月不同采收期的差异性模型, 明确忍冬叶质量的动态变化, 分析影响忍冬叶质量的关键活性成分, 为忍冬叶质量控制提供科学依据, 确定忍冬叶适宜采收期, 保障药材质量, 推动忍冬叶资源化利用, 提高种植效益, 促进忍冬产业高质量发展。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1290 超高效液相色谱仪(安捷伦公司, 美国); XS205DU 型十万分之一分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); ME204E 型万分之一分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); RHP-500A 型高速多功能粉碎机(浙江永康市荣浩工贸有限公司); DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 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 型超纯水机(日本 YAMATO 科学株式会社)。

1.2 材料

忍冬叶采自山东省济南市山东省中医药研究院药圃, 2023 年 1~12 月的 15 号左右采集忍冬枝条中部的叶片, 经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* Thunb. 的叶。每月采集样品(编号 L1~L12)3 份, 45 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 粉碎后过 60 目筛(4 号筛), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光储存备用。

1.3 对照品与试剂

对照品新绿原酸(批号 P27A6F2713)、隐绿原酸(批号 ZF0226BA14)、咖啡酸(批号 Y17D6C7672)、当药苷(批号 P31M7F12286)、金丝桃苷(批号 Y01A8X33092)、木犀草苷(批号 Y19A8H34394)、异绿原酸 A(批号 P2807F23862)、异绿原酸 C(批号 P25J6F1794)购自上海源叶生物科技有限公司; 绿原酸(批号 110753-201716)、芦丁(批号 100080-202012)购自中国食品药品检定研究院; 断氧化马钱子苷(批号 ST20380110)、异槲皮苷(批号 ST11441020)购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。所有对照品质量分数大于 98%。

甲醇(Product of DNK, 色谱级, 美国); 乙腈(Product of DNK, 色谱级, 美国); 磷酸(色谱级, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 超纯水

(WGH201 超纯水机制)。

2 数据处理和挖掘

UPLC 指纹图谱使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”绘制;忍冬叶活性成分含量数据分析使用 IBM SPSS Statistics 21.0, 同时应用 GraphPad Prism 6.01 对数据进行可视化处理;UPLC 色谱峰的 3D 瀑布图及活性成分含量的聚类热图使用 Origin 2023b 绘制;PCA、OPLS-DA 分析使用 SIMCA 14.1 对数据进行处理。

3 方法与结果

3.1 溶液的配制

3.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取适量对照品新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C, 加甲醇溶解, 木犀草苷加 70%乙醇溶解, 制成对照品储备液。取以上 12 种对照品储备液适量, 加甲醇, 配制成新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 质量浓度分别为 79.28、131.43、77.14、89.28、74.28、85.71、62.14、37.85、62.85、49.28、127.85、109.28 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

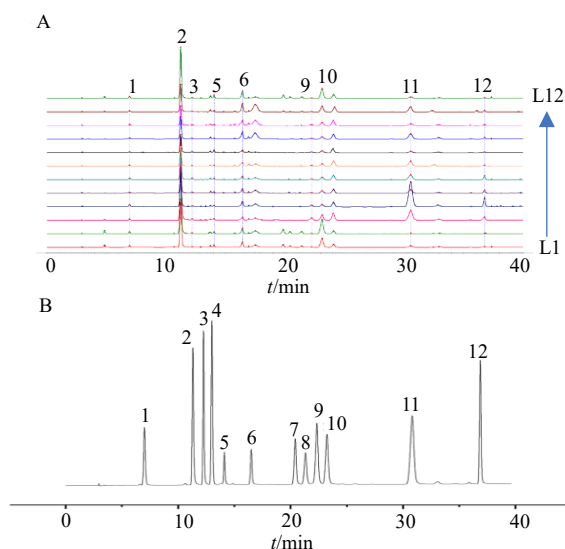
3.1.2 供试品溶液的制备 取忍冬叶样品粉末 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 75%甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声 (512 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 补充质量, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

3.2 色谱条件

Thermo Accucore TM 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), 梯度洗脱 (0~5 min, 0~8% A; 5~8 min, 8%~14% A; 8~12 min, 14%~15% A; 12~25 min, 15%~16% A; 25~30 min, 16%~17% A; 30~35 min, 17%~27% A; 35~40 min, 27% A); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长: 0~13.33 min, 326 nm; 13.33~15.25 min, 242 nm; 15.25~19 min, 238 nm; 19~25 min, 204 nm; 25~40 min, 328 nm。UPLC 结果见图 1、2。

3.3 方法学考察

3.3.1 线性关系考察 分别吸取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品溶液适量, 用甲醇稀释成 6



1-新绿原酸; 2-绿原酸; 3-隐绿原酸; 4-咖啡酸; 5-当药苷; 6-断氧化马钱子苷; 7-芦丁; 8-金丝桃苷; 9-异槲皮苷; 10-木犀草苷; 11-异绿原酸 A; 12-异绿原酸 C。

1-neochlorogenic acid; 2-chlorogenic acid; 3-cryptochlorogenic acid; 4- caffeic acid; 5-sweroside; 6-secoxyloganin; 7-rutin; 8-hyperoside; 9-isoquercitrin; 10-galuteolin; 11-isochlorogenic acid A; 12- isochlorogenic acid C.

图 1 忍冬叶样品 (A) 和混合对照品 (B) 的 UPLC 色谱图
Fig. 1 UPLC chromatograms of *L. japonicae* leaves (A) and mixed reference standards (B)

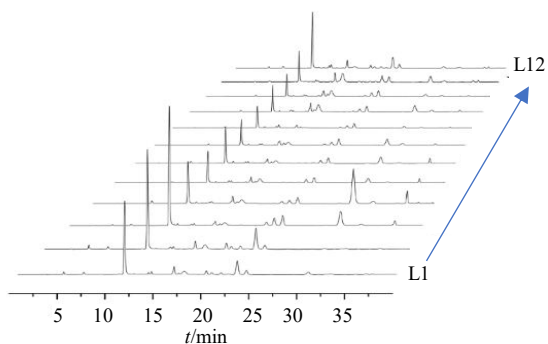


图 2 忍冬叶 UPLC 3D 瀑布图

Fig. 2 3D waterfall plot of UPLC analysis of *L. japonicae* leaves

个不同质量浓度, 按“3.2”项下色谱条件进样, 以对照品进样浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 计算回归方程并绘制标准曲线, 结果见表 1。

3.3.2 精密度考察 取忍冬叶样品, 按“3.1.2”项下制备供试品溶液, 按“3.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算各组分峰面积的 RSD 值, 结果表明新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、木犀草苷

表 1 忍冬叶中 12 种活性成分的线性回归方程

Table 1 Linear regression equations of 12 active ingredients in *L. japonicae* leaves

对照品	标准曲线	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R^2
新绿原酸	$Y=6.110\ 0\ X-1.382\ 5$	1.00~30.00	0.999\ 7
绿原酸	$Y=6.899\ 8\ X-64.572\ 0$	20.40~913.00	0.999\ 6
隐绿原酸	$Y=9.500\ 3\ X-5.178\ 4$	1.35~20.80	0.999\ 4
咖啡酸	$Y=13.843\ 0\ X-0.940\ 3$	0.20~5.00	0.999\ 1
当药苷	$Y=3.698\ 9\ X+2.612\ 8$	3.25~104.00	0.999\ 7
断氧化马钱子苷	$Y=4.470\ 6\ X-3.426\ 2$	6.00~300.00	0.999\ 9
芦丁	$Y=9.803\ 8\ X-2.020\ 3$	1.75~28.00	0.999\ 0
金丝桃苷	$Y=11.532\ 0\ X+1.686\ 5$	1.00~25.10	0.999\ 6
异槲皮苷	$Y=11.142\ 0\ X+36.747\ 0$	0.58~21.50	0.999\ 8
木犀草苷	$Y=13.636\ 0\ X+19.865\ 0$	7.18~135.00	0.999\ 8
异绿原酸A	$Y=11.485\ 0\ X-26.899\ 0$	0.75~447.50	0.999\ 6
异绿原酸C	$Y=10.093\ 0\ X-10.017\ 0$	5.00~35.00	0.999\ 2

草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的相对峰面积 RSD 分别为 2.09%、0.29%、2.65%、2.31%、2.49%、1.94%、2.84%、2.06%、2.38%、0.81%、0.71%、1.22%，各色谱峰相对峰面积的 RSD<3%，表明仪器精密度良好。

3.3.3 重复性考察 平行称取 6 份忍冬叶样品，按“3.1.2”项下制备供试品溶液，在“3.2”项色谱条件下测定。结果表明新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的质量分数 RSD 分别为 0.72%、1.05%、1.33%、2.88%、1.44%、1.93%、0.63%、2.77%、2.89%、0.64%、1.01%、2.92%，相对峰面积的 RSD<3%，表明仪器重复性良好。

3.3.4 稳定性考察 取忍冬叶样品，在“3.1.2”项下制备成供试品溶液，按“3.2”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，计算各成分峰面积的 RSD 值，结果表明新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的面积 RSD 分别为 1.86%、0.48%、2.82%、1.70%、2.18%、0.54%、0.33%、0.86%、2.43%、0.36%、0.49%、1.36%，表明各成分在 24 h 内稳定性良好。

3.3.5 加样回收率试验 精密称取已知含量的忍冬叶粉末 6 份，每份 0.25 g，按对照品与样品含量 1:1 的比例加入新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿

原酸 C 对照品，按“3.1.2”项下制备样品溶液，按“3.2”项色谱条件进行测定。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、当药苷、断氧化马钱子苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的加样回收率分别为 100.82%、101.67%、100.21%、99.48%、101.39%、100.49%、99.64%、99.54%、98.37%、97.97%、99.57%、97.61%。RSD 分别为 0.34%、2.14%、2.28%、0.87%、2.56%、1.42%、0.86%、0.89%、2.19%、1.70%、0.94%、1.69%，表明方法准确度良好。

3.3.6 含量测定 将 12 批忍冬叶样品粉末制备成供试品溶液，进样测定，结果计算出 12 个月份忍冬叶中 12 种成分的含量，见表 2。

3.4 不同月份忍冬叶中 12 种活性成分含量变化分析

3.4.1 6 种酚酸类成分含量变化 不同采收月份忍冬叶中 6 种酚酸类成分的含量动态变化，见图 3。忍冬叶中绿原酸的质量分数最高，其次是异绿原酸 A。绿原酸质量分数在 1~3 月份逐渐升高，3 月份达到峰值 (84.19 ± 0.57) mg/g，4 月份质量分数急速下降至 (32.33 ± 0.10) mg/g，4~10 月份之间含量变化较小，10 月份质量分数全年最低为 (19.86 ± 0.23) mg/g，10~12 月质量分数逐渐升高。虽然忍冬叶中绿原酸含量在 1 年内不断变化，但各月份的含量均超过《中国药典》金银花项下绿原酸不得少于 1.5%^[1] 的限度。异绿原酸 A 质量分数在 2 月份最低 (1.12 ± 0.02) mg/g，3、4 月份持续攀升至 (37.70 ± 0.05) mg/g，达到全年最高。

表 2 忍冬叶 12 种活性成分在不同月份的含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Contents variations of 12 active ingredients in *L. japonicae* leaves across different months ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

采收期/月	质量分数/(mg·g ⁻¹)											
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	当药苷	断氧化马钱子苷	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷	木犀草苷	异绿原酸 A	异绿原酸 C
1	1.96±0.03	49.50±0.93	0.54±0.01	0.12±0.00	3.53±0.08	9.43±0.48	1.37±0.00	1.18±0.01	0.26±0.01	8.22±0.06	2.99±0.18	0.82±0.04
2	2.44±0.03	70.28±0.07	0.57±0.03	0.27±0.01	2.43±0.01	9.91±0.17	2.34±0.03	1.93±0.03	0.08±0.02	13.00±0.03	1.12±0.02	0.83±0.01
3	1.35±0.02	84.19±0.57	1.10±0.03	0.14±0.00	2.61±0.06	6.68±0.26	—	—	2.50±0.14	4.72±0.05	14.59±0.09	3.17±0.06
4	2.42±0.01	32.33±0.10	0.77±0.01	0.17±0.00	2.14±0.04	10.33±0.18	—	0.23±0.00	1.88±0.07	2.36±0.03	37.70±0.05	7.33±0.16
5	0.99±0.01	24.53±0.10	0.55±0.01	—	2.18±0.04	8.66±0.08	0.62±0.00	0.32±0.00	0.45±0.00	2.39±0.03	5.48±0.02	2.56±0.03
6	1.90±0.01	29.35±0.19	1.02±0.06	—	2.35±0.08	6.89±0.12	0.45±0.03	0.35±0.01	0.69±0.02	2.29±0.03	7.95±0.06	3.30±0.05
7	1.20±0.01	21.57±0.09	0.45±0.02	—	1.50±0.03	8.46±0.31	—	0.24±0.02	0.71±0.04	2.00±0.05	6.90±0.03	1.05±0.02
8	1.10±0.01	23.37±0.07	0.62±0.05	—	4.89±0.01	4.96±0.03	—	—	1.29±0.06	2.35±0.01	2.64±0.01	1.03±0.03
9	1.46±0.00	23.61±0.07	0.54±0.01	—	1.29±0.05	15.02±0.10	—	0.27±0.00	0.41±0.01	1.97±0.06	8.27±0.03	1.20±0.03
10	1.33±0.01	19.86±0.23	0.50±0.02	—	1.38±0.03	11.10±0.18	—	0.36±0.01	1.02±0.02	2.77±0.05	3.09±0.03	0.80±0.03
11	1.41±0.01	28.91±0.04	0.51±0.01	—	2.23±0.04	15.18±0.33	0.60±0.01	0.65±0.00	0.38±0.01	5.17±0.05	7.38±0.02	1.20±0.03
12	2.24±0.01	51.83±0.23	0.48±0.01	0.15±0.00	5.39±0.15	13.47±0.31	1.62±0.01	1.37±0.00	0.42±0.02	8.93±0.11	2.59±0.05	0.86±0.03

“—”表示未检测到。

“—” indicates not detected.

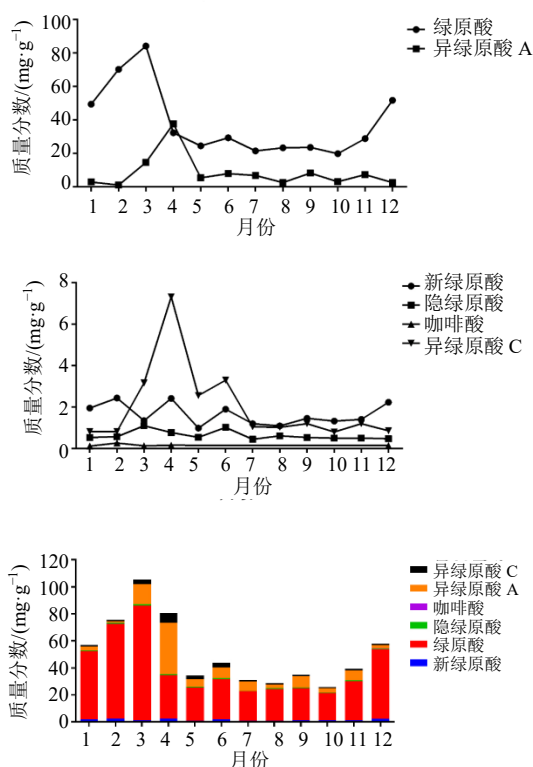


图 3 6 种酚酸类成分含量变化

Fig. 3 Contents variations of six phenolic acid components

异绿原酸 C 质量分数在 4 月份达到最高 (7.33 ± 0.16) mg/g。新绿原酸在 2 月份质量分数达到最高 (2.44 ± 0.03) mg/g。隐绿原酸质量分数在 3 月份最高, 为 (1.10 ± 0.03) mg/g。咖啡酸最高质量分数为

(0.27 ± 0.01) mg/g 采摘于 2 月份。由图 3 可知, 6 种酚酸类成分总含量整体呈现先升高、再降低、后升高的趋势, 3 月份总成分含量最高, 其次是 4、2、12、1 月。因此, 新叶 (3 月份新长出的叶子) 中酚酸类成分的含量明显高于老叶 (12、1、2 月的叶子)。

3.4.2 4 种黄酮类成分含量变化 不同采收月份忍冬叶中 4 种黄酮类成分的含量动态变化, 见图 4。芦丁、金丝桃苷、木犀草苷的含量在 1~12 月份整体均表现为先升高、后降低、趋于平稳、再升高的趋势, 且这 3 种成分的含量均在 2 月份达到最高值, 木犀草苷为 (13.00 ± 0.03) mg/g, 芦丁为 (2.34 ± 0.03) mg/g, 金丝桃苷为 (1.93 ± 0.03) mg/g。本研究测得的木犀草苷最低质量分数为 (1.97 ± 0.06) mg/g, 远高于《中国药典》规定的金银花中木犀草苷含量不得低于 0.05% 的限度^[1]。一年中异槲皮苷的含量变化较为复杂, 2 月份质量分数最低 (0.08 ± 0.02) mg/g, 3 月份质量分数最高 (2.50 ± 0.14) mg/g。由图 4 可知 4 种黄酮类总含量整体呈现先升高、再降低、后升高的趋势, 2 月份总成分含量最高, 其次是 12、1、3 月, 说明越冬的老叶中黄酮类成分的含量高于新叶。

3.4.3 2 种环烯醚萜类成分含量变化 不同采收月份忍冬叶中 2 种环烯醚萜类成分的含量动态变化, 见图 5。当药苷含量在 1~7 月份变化较为平稳, 8 月份含量上升, 随后 9 月份降低, 10~12 月份含量又缓慢升高, 至 12 月份达到最高 (5.39 ± 0.15) mg/g。断氧化马钱子苷含量在一年内变化较

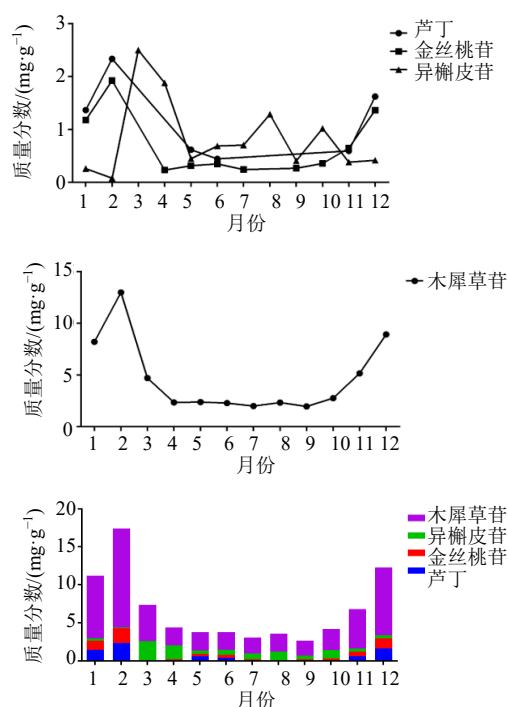


图 4 4 种黄酮类成分含量变化

Fig. 4 Contents variations of four flavonoid components

为复杂, 11 月质量分数达到最高 (15.18 ± 0.33) mg/g 。由图 5 可知, 12 月份 2 种环烯醚萜类总成分含量最高, 其次是 11 月、9 月, 说明越冬老叶中环烯醚萜类成分多于新叶。

综合分析一年中 12 种成分在忍冬叶中的含量变化, 见图 6。忍冬叶中活性成分的积累随月份不

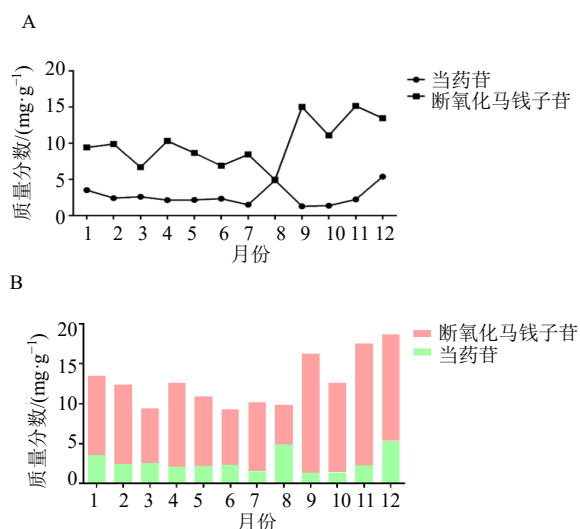


图 5 2 种环烯醚萜类成分含量变化

Fig. 5 Contents variations of two iridoid terpenoids

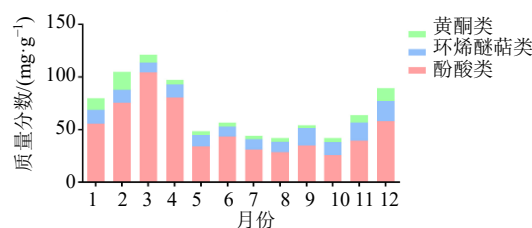


图 6 3 类活性成分含量变化

Fig. 6 Contents variations of three types of active ingredients

同产生一定程度的差异, 12 种活性成分的总含量: 3 月 > 2 月 > 4 月 > 12 月 > 1 月 > 11 月 > 6 月 > 9 月 > 5 月 > 7 月 > 8 月 > 10 月, 总体呈现先升高、再降低、后升高的趋势, 与 6 种酚酸类、4 种黄酮类总成分含量变化一致。

3.4.4 聚类分析 将忍冬叶 12 种活性成分含量的数据导入 origin 2023b 软件, 建立聚类热图分析模型, 见图 7。聚类结果显示, 忍冬叶根据活性成分含量的不同被聚为 4 类, 1、12、2 月份聚为一类, 5、7、10、9、11、6、8 月聚为一类, 3 月份聚为一类, 4 月份聚为一类。

3.5 UPLC 指纹图谱的建立

精密称取 12 批忍冬叶样品粉末, 按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“3.2”项色谱条件下进样测定, 将色谱峰数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”, 以 L1 的色谱图作为参照图谱, 采用平均数法, 时间窗宽度设置为 0.1 min, 做 Mark 峰匹配, 见图 1-A。经对照品保留时间及色谱峰光谱信息指认比对, 共标定 12 个色谱峰, 见图 1-B, 其中共有峰 9 个, 并确认峰 1 为新绿原酸, 峰 2 为绿原酸, 峰 3 为隐绿原酸, 峰 5 为当药苷, 峰 6 为断氧化马钱子苷, 峰 9 为异槲皮苷, 峰 10 为木犀草苷, 峰 11 为异绿原酸 A, 峰 12 为异绿原酸 C。采用 origin 2023b 软件绘制 3D 瀑布图, 更直观的呈现出各月份中活性成分的含量差异, 见图 2。

3.6 化学模式识别分析

3.6.1 PCA 以 12 种活性成分的含量为变量导入 SIMCA 软件中, 建立 PCA 模型, 见图 8。前两个主成分方差贡献率分别为 54.5% 和 29.3%, 两个值相加为 83.8%, 大于 80%, 且 Q^2 为 0.585, 大于 0.5, 证明模型拟合较好且具有良好的预测性。根据活性成分含量的变化, 12 个月份的忍冬叶被分为 4 组,

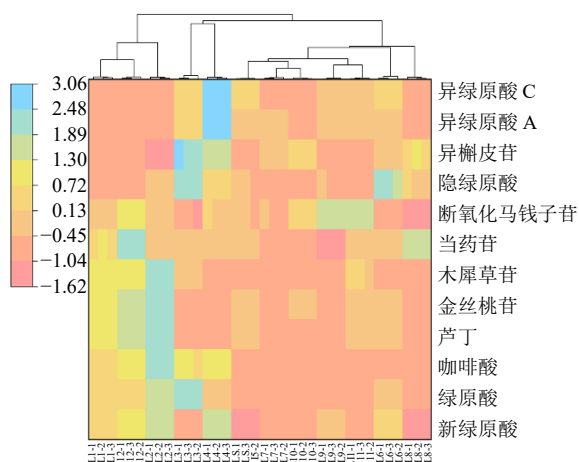


图 7 聚类热图

Fig. 7 Cluster heatmap

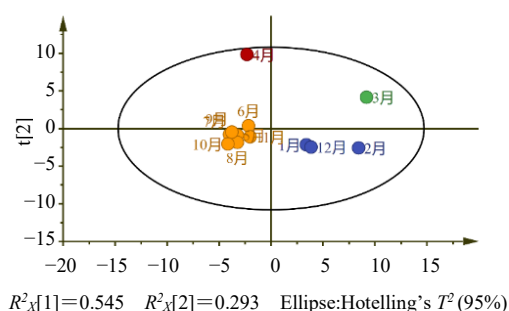


图 8 忍冬叶 12 种活性成分的 PCA 得分图

Fig. 8 PCA score plot of 12 active ingredients in *L. japonicae* leaves

1、2、12 月份为一组，5、6、7、8、9、10、11 月为一组，3 月份为一组，4 月份为一组，此结果与聚类分析结果一致。

3.6.2 OPLS-DA PCA 不能忽略组内误差，为消除与研究目的无关的随机误差，在 PCA 基础上选择有监督模式的 OPLS-DA（图 9-A）模型进行分析。建立的 OPLS-DA 累积解释能力参数 $R^2_X=0.971$ ， $R^2_Y=0.939$ ，预测能力参数 $Q^2=0.791$ ，表明模型预测能力强。OPLS-DA 分析结果将 12 个月份的忍冬叶分为 4 组，1、2、12 月份为一组，5、6、7、8、9、10、11 月聚为一组，3 月份为一组，4 月份为一组，与 PCA 分析结果一致。对建立的 OPLS-DA 模型置换检验 200 次（图 9-B），结果显示，左侧的 R^2 值和 Q^2 值均低于右侧的 R^2 值和 Q^2 值，且右侧 Q^2 的回归线在纵坐标上的截距 <0 ，说明模型不存在过拟合，OPLS-DA 模型可靠。结合变量权重（variable importance projection, VIP）结果（图

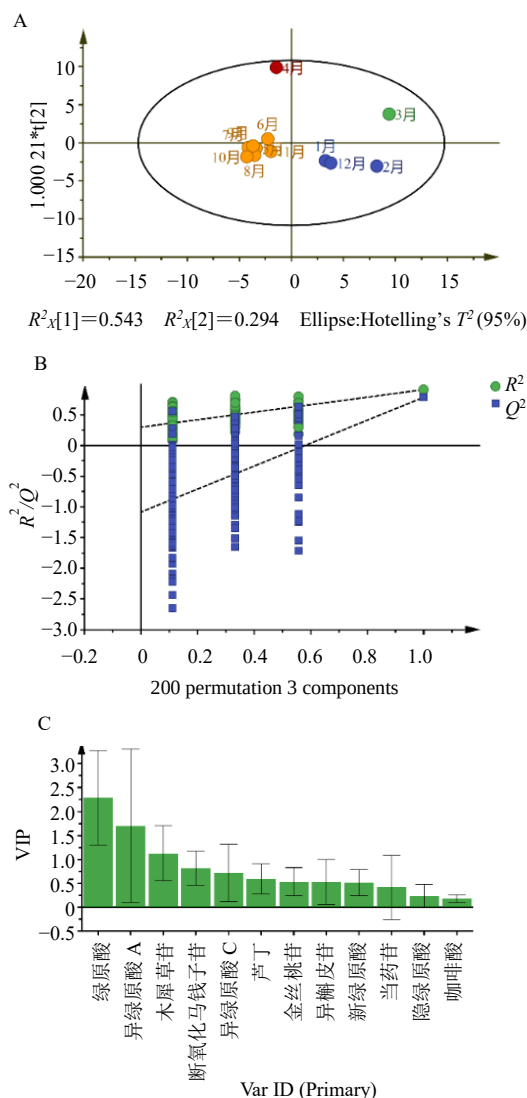


图 9 忍冬叶 12 种活性成分的 OPLS-DA 得分图 (A)、置换检测结果图 (B)、VIP 图 (C)

Fig. 9 OPLS-DA score plot (A), permutation plot (B), VIP plot (C) of 12 active ingredients in *L. japonicae* leaves

9-C)，VIP 值越大，表明该成分对忍冬叶质量的贡献率越大。选择 $VIP>1$ 的活性成分作为区分各月份忍冬叶的潜在质量标志物，分别为绿原酸、异绿原酸 A、木犀草苷，它们可能是导致忍冬叶质量差异的关键成分。

4 讨论

忍冬主产山东、河南、河北等地，广布于全国大部分省区，种植面积达 2.6 万 hm^2 。5~10 月花蕾采收期过后植株迅速恢复长势、秋梢大量抽出，为提高来年金银花产量必须对植株进行修剪、整形，期间可产生约为金银花 10 倍量的叶子，长期以来

一直作为非药用部位被丢弃,造成了严重的资源浪费,急需将忍冬叶进行资源化利用,使忍冬价值得到多层次、多途径的有效释放,提高种植效益,走绿色和高质量的忍冬产业发展之路,为此应积极开展忍冬叶相关研究。

忍冬叶的质量是药用价值的保证,活性成分的种类及含量又决定了忍冬叶的质量。现代研究表明,忍冬叶中含有的活性成分与金银花、忍冬藤相似,包括黄酮类、有机酸类、环烯醚萜类、挥发油等组分,药效物质的相似性证实了历代本草所载“茎、叶及花,功用皆同”的科学性。绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、木犀草苷为《中国药典》2020 年版金银花项下的质控指标^[1],咖啡酸、断氧化马钱子苷、芦丁、木犀草苷等酚酸类、环烯醚萜类、黄酮类成分更是金银花、忍冬藤药材质量综合评价的重要指标^[9, 12]。研究证实,这些活性成分均为金银花清热解毒功效的物质基础,具有明确的抗炎、抗病毒、抗菌、抗氧化、调血脂、降血糖等作用。因此,忍冬叶的质量评价也应从这些活性成分的含量入手,明确叶中多种活性成分含量在 1 年中的变化规律,对于合理评价忍冬叶质量,确定最佳采收期、获得优质药材尤为重要。

本研究采用 UPLC 法检测不同月份忍冬叶中绿原酸、当药苷、断氧化马钱子苷等 12 种活性成分的含量。结果表明,所测 6 种酚酸中,绿原酸含量最高;4 种黄酮中,木犀草苷含量最高;2 种环烯醚萜类成分中,断氧化马钱子苷含量最高。且新叶中 6 种酚酸类成分总含量明显高于老叶。越冬的老叶中 4 种黄酮类成分、2 种环烯醚萜类成分的含量高于新叶。12 种活性成分的总含量:3 月>2 月>4 月>12 月>1 月>11 月>6 月>9 月>5 月>7 月>8 月>10 月。因此,以 12 种活性成分的含量为评价指标得出,3、2、4、12、1 月忍冬叶的质量较好,其余月份次之。运用聚类、PCA、OPLS-DA 分析等方法对忍冬叶质量进行客观合理的评价,结果一致表明忍冬叶被分为 4 类,1、2、12 月为一类,5、6、7、8、9、10、11 月为一类,3 月份为一类,4 月份为一类。此外 VIP 图结果揭示,绿原酸、异绿原酸 A、木犀草苷或是导致忍冬叶质量差异的关键成分。结合 UPLC 测定结果,绿原酸、异绿原酸 A 是忍冬叶中含量最高的成分,木犀草苷是含量最高的黄酮类成分,全年中含量变化较大,对忍冬叶质量影响较

大,因此认为绿原酸、异绿原酸 A、木犀草苷可作为忍冬叶质量控制的标志性成分。

根据种植模式,忍冬的修枝整形可分为冬剪和夏剪。夏剪常在 5 月底至 8 月左右,以短截为主,疏剪为辅,裁剪量比较小,不利于大量收集忍冬叶。冬剪多在 12 月下旬至来年 2 月还未发出新芽之前进行,去掉多余的枝条,裁剪量较大,利于药材收集。结合研究结果,12 月、1 月、2 月忍冬叶质量仅次于 3、4 月份,且此时为农闲时节,忍冬叶采收的劳动力充足,还可使农户获得额外收入。因此 12 月、1 月、2 月为忍冬叶的最佳采收期。该研究将为忍冬叶质量控制提供数据支持,对忍冬叶药用价值开发和资源化利用具有切实的指导意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 马春霞,南敏伦,司学玲,等.忍冬叶化学成分和药理作用研究进展[J].中国药师,2021,24(6):1138-1145.
- [2] 张永清,王丽萍,刘志敏.金银花名称本草考证[J].山东中医药大学学报,1998,22(6):89-98.
- [3] 薛长松.金银花药性形成过程影响因素考证及中药单味药药性成因假说[J].中草药,2020,51(11):3090-3096.
- [4] 刘天亮,董诚明,高启国,等.以忍冬为例浅论古籍考证思路及考证拾遗[J].中草药,2021,52(7):2163-2177.
- [5] 陈两绵,邹芳艳,刘晓谦,等.3 种检测方法比较忍冬药用和非药用部位的抗氧化活性[J].世界中医药,2021,16(17):2513-2519.
- [6] 刘雪平,陈士国,李静,等.金银花及其茎叶中功能成分分析与综合利用研究进展[J].农产品加工,2023(1):69-71.
- [7] 梁新红,黄俊超,涂存键,等.忍冬不同部位提取液抑菌活性及其对酸土脂环酸芽孢杆菌的抑菌特性[J].食品工业科技,2023,12:1-13.
- [8] 李静,韩燕雨.忍冬非花蕾部位的研究进展[J].中华中医药学刊,2020,38(4):43-50.
- [9] 国晓莹,王雨伟,于晓,等.HPLC-DAD 同时测定忍冬不同发育期花和叶片中 11 种活性成分含量[J].中国中药杂志,2022,47(8):2148-2157.
- [10] 黄厚钰,耿泽宇,李卫东,等.忍冬叶生长及修剪期的 7 种活性成分年动态变化规律研究[J].中国中药杂志,2022,47(16):4341-4346.
- [11] 中国药典[S].一部.2020:231.
- [12] 王淑,张翠翠,郭凤丹,等.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[J].中草药,2024,55(3):947-955.

[责任编辑 时圣明]