

基于 HPLC 指纹图谱与指标性成分结合多元统计学对色选金银花等级的评价研究

郝培君¹, 张林祥¹, 靳婉君², 倪琳^{2*}, 邱国玉³, 翟玉生⁴, 雷春鸣⁴, 宋平顺^{2*} (1.甘肃中医药大学, 兰州 730030; 2.甘肃省药品检验研究院, 国家中药材及饮片质量控制重点实验室, 甘肃省中藏药检验检测技术工程实验室, 兰州 730030; 3.甘肃药业集团科技创新研究院有限公司 兰州 730030; 4.通渭县清涼沉金银花产业扶贫开发有限公司, 甘肃 定西 743300)

摘要: 目的 建立色选金银花 HPLC 指纹图谱等级相关性评价及质量评价的方法, 为色选金银花等级标准提供技术依据。方法 色谱柱: SVEA C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B); 梯度洗脱; 进样体积 10 μL; 检测波长 245 nm; 体积流量 0.5 mL·min⁻¹; 柱温 38 °C。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)对 HPLC 图谱数据进行共有峰确定、相似度评价; 采用 CA、PCA 与 PLS-DA 进行色选等级评价。采用中国药典 2020 年版一部测定质量控制指标, 对数据进行综合统计分析。结果 指纹图谱共确定 28 个共有峰, 指认 7 个成分, 24 批色选等级样品相似度为 0.936~0.968。CA 和 PCA 将 28 批金银花样品分为 4 类, 与色选等级划分基本吻合, 且 PLS-DA 实现了与色选等级划分十分吻合的判别结果。色选等级与金银花直径、开花率与破损率及木犀草苷含量呈负相关。色选等级与绿原酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸呈正相关。色选金银花等级与所建立的指纹图谱整体上呈明显的关联性。色选等级金银花质量存在差异, 在感官指标直径、开花率和破损率的基础上, 木犀草苷的含量、直径开花率及破损率由高到低趋势为三级>二级>一级>特级, 3 种酚酸类含量由高到低趋势均为特级>一级>二级>三级, 特级中 3 种酚酸类含量均是最高。结论 结合木犀草苷含量和酚酸类含量作为色选等级评价和控制指标具有可行性、科学性, 可以实现金银花等级的智能化色选等级生产。

关键词: 金银花; 指纹图谱; 聚类分析; 质量评价; 等级标准

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)19-2694-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223295

引用本文: 郝培君, 张林祥, 靳婉君, 等. 基于 HPLC 指纹图谱与指标性成分结合多元统计学对色选金银花等级的评价研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2694-2701.

Grade Evaluation of Color Sorting Lonicerae Japonicae Flos Based on HPLC Fingerprint and Index Components Combined with Multivariate Statistics

HAO Peijun¹, ZHANG Linxiang¹, JIN Wanjuan², NI Lin^{2*}, QIU Guoyu³, ZHAI Yusheng⁴, LEI Chunming⁴, SONG Pingshun^{2*} (1.Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2.Gansu Provincial Institute of Pharmaceutical Inspection, National Key Laboratory for Quality Control of Chinese Medicinal Materials and Pieces, Gansu Provincial Engineering Laboratory for Testing Technology of Chinese and Tibetan Medicines, Lanzhou 730030, China; 3.Gansu Pharmaceutical Group Science and Technology Innovation Research Institute Limited, Lanzhou 730030, China; 4.Tongwei County Qingliang Yuan Honeysuckle Industry Poverty Alleviation Development Co., Ltd., Dingxi 743300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the correlation evaluation and quality evaluation method of HPLC fingerprint grade of color sorting Lonicerae Japonicae Flos, and provide technical basis for the grade standard of color sorting Lonicerae Japonicae Flos. **METHODS** The chromatographic column was SVEA C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); mobile phase was acetonitrile(A)-0.2% formic acid aqueous solution(B); gradient elution; injection volume was 10 μL; detection wave length was 245 nm; volume flow rate was 0.5 mL·min⁻¹; column temperature was 38 °C. The common peak determination and similarity evaluation of HPLC chromatogram data were carried out by using the Similarity Evaluation System of Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprints(Version 2012); the color sorting grade evaluation was carried out by CA, PCA and PLS-DA. The first part of Chinese Pharmacopoeia 2020 Edition was used to measure the quality control indicators, and the data were analyzed comprehensively. **RESULTS** A total of 28 common peaks were identified in the fingerprints, and 7 components were identified. The similarity of 24 batches of color sorting grade samples was 0.936–0.968. CA and PCA divided 28 batches of Lonicerae Japonicae Flos samples into 4 categories, which were basically consistent with the classification of color sorting, and PLS-DA achieved a discrimination result that was very consistent with the classification of color sorting. The color sorting grade was negatively correlated with the diameter, flowering rate, damage rate, and luteolin content of Lonicerae Japonicae Flos. The color

作者简介: 郝培君, 女, 硕士生 E-mail: 1423581688@qq.com *通信作者: 宋平顺, 男, 主任药师 E-mail: 2530517601@qq.com 倪琳, 女, 主任中药师 E-mail: 1724010367@qq.com

sorting grade was positively correlated with chlorogenic acid, 3,5-di-*O*-caffeoyl quinic acid and 4,5-di-*O*-caffeoyl quinic acid. There was a clear correlation between the color sorting of *Lonicerae Japonicae* Flos and established fingerprint overall. There were differences in the quality of *Lonicerae Japonicae* Flos in the color sorting grade. Based on the sensory indicators of diameter, flowering rate, and damage rate, the content, diameter, flowering rate, and damage rate of luteolin showed a trend from high to low, ranging from third grade>second grade>first grade>special grade. The content of three phenolic acids showed a trend from high to low, ranging from special grade>first grade>second grade>third grade. Among the special grade, the content of three phenolic acids was the highest. **CONCLUSION** Combining the content of luteolin and phenolic acids as evaluation and control indicators for color selection grade is feasible and scientific, which can achieve intelligent color sorting grade production of *Lonicerae Japonicae* Flos grade.

KEYWORDS: *Lonicerae Japonicae* Flos; fingerprint; cluster analysis; quality evaluation; grade standard

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,具有清热解毒、疏散风热等功效^[1]。金银花主要含黄酮类、有机酸类、挥发油类、环烯醚萜类等多种化学成分^[2],具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤和护肝等药理活性^[3-4],已涉及生产、化学、分子生物学和药理药效等众多领域研究^[5]。金银花受环境条件、品系、栽培技术、采收期、加工方法和储藏条件等的影响,含量指标的变化幅度较大,不同等级的含量差异较明显^[6-7]。中药材商品交易是“看货评级、分档议价”,在商品交易中传统规格等级对药材质量的评价发挥重要作用,规格等级是中药材研究的重要内容之一^[8-9],近年有关规格等级与指标成分、药理药效相关性研究成为学术热点^[10-13]。

中药材的性状特征是传统规格等级划分的重要依据,金银花在《七十种药材商品规格标准》(1984年)是以形状、颜色、开花率、花蕾破损及黄条划分为4个等级,对其颜色的要求比较宽泛。原农业部《农产品等级规格·金银花》(2013年)增加了色系,细化了花朵开放率、黑头率、破损花蕾率指标^[14]。贵州、河南、广西采用感官指标、理化指标、含量指标或安全性指标^[15-17],甘肃、山东基本同前地方标准,主要是感官指标采用了不同色系^[18-19]。近年来,报道以花蕾长度、直径和绿原酸、木犀草苷含量为主要指标的等级研究^[20-21],也有提出以颜色、黑头及酚酸类含量等级划分的建议^[22]。现有等级标准划分存在较强的主观因素,导致等级与指标成分含量存在关联性或关联性不强的情况,特别是大批量生产中时效性较差,无法有效推广。目前,中药行业引进自动化、智能化设备,形成了一批全新的生产工艺,开展智能技术的工艺、标准和产品等研究是当务之急。

甘肃省通渭县立足自然条件,大力推进金银花特色产业,成为西北地区金银花种苗繁育、标准化种植和产品研发的最大基地^[23]。为了对当地

金银花进行色选等级加工,通渭县清凉沅公司引进了智能化色选机。色选机是按照物料颜色的差别作为分选剔除的依据,利用光电探测将颗粒物料中的异色颗粒自动分拣出来的分选设备。其工作原理是物料进入色选机的第一层分选室后,从传感器和背景板间穿过,在光源的作用下,传感器接收颜色信号,经处理后产生输出信号,驱动喷阀工作,将枝叶等异物吹至背部接料斗内流走,其余物料继续下落,经过第二层分选室再次分选后至出料口流走^[24]。金银花花蕾的发育程度不同导致其颜色不同,木犀草苷和酚酸类的含量也会有所差异,这为金银花的色选分级提供了理论依据。本研究采用 HPLC 指纹图谱技术、指标性成分含量和等级划分物理常数,应用多种统计学方法对色选金银花等级的可行性、科学性进行检测和验证,为进一步规范色选生产工艺,制定色选金银花等级标准提供参考依据。

1 材料

ACQUITY Arc 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,含输液泵、柱温箱、二极管阵列检测器、自动进样器);KQ-300DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);QUINTTX224-1CN 万分之一天平(赛多利斯)。乙腈(色谱纯)、甲醇、冰醋酸、磷酸为分析纯,水为屈臣氏蒸馏水。对照品绿原酸(批号:110753-202018;含量:96.1%)、木犀草苷(批号:111720-201810;含量:93.5%)、咖啡酸(批号:110885-201703;含量:99.7%)、芦丁(批号:100080-201408;含量:92.8%)、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸(批号:111782-201807;含量:93.7%)均购自中国食品药品检定研究院;隐绿原酸对照品(批号:905-99-7;含量:98.0%)、新绿原酸对照品(批号:906-33-2;含量:98.0%)均购自诗丹德;4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸对照品(四川维克奇生物,批号:wkq21012501;含量:98.0%)。金银花对照药材(中国食品药品检定研究院,批号:121060-201608)。

24 批金银花均来自甘肃通渭县清凉沉金银花产业扶贫开发有限公司(色选机等级样品),经甘肃省药品检验研究院马潇主任中药师鉴定,样品信息见表 1。

表 1 24 批不同商品等级金银花样品信息

Tab. 1 Information of 24 batches of Lonicerae Japonicae Flos samples of different commodity grades

样品编号	产地	等级	样品编号	产地	等级
1	常河镇	特级	13	襄南镇	特级
2	常河镇	一级	14	襄南镇	一级
3	常河镇	二级	15	襄南镇	二级
4	常河镇	三级	16	襄南镇	三级
5	李店乡	特级	17	鸡川镇	特级
6	李店乡	一级	18	鸡川镇	一级
7	李店乡	二级	19	鸡川镇	二级
8	李店乡	三级	20	鸡川镇	三级
9	榜罗镇	特级	21	碧玉镇	特级
10	榜罗镇	一级	22	碧玉镇	一级
11	榜罗镇	二级	23	碧玉镇	二级
12	榜罗镇	三级	24	碧玉镇	三级

2 方法

2.1 指纹图谱分析

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 SVEA C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B); 梯度洗脱(0~10 min, 8%→9%A; 10~25 min, 9%→11%A; 25~35 min, 11%→15%A; 35~50 min, 15%→16%A; 50~65 min, 16%→20%A; 65~75 min, 20%→24%A; 75~80 min, 24%→38%A); 检测波长 245 nm; 体积流量 0.5 mL·min⁻¹; 柱温 38 ℃。进样量为 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁、木犀草苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇分别制成每 1 mL 含 0.250, 0.478, 0.239, 0.418, 0.386, 0.370, 0.670 mg 的溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取金银花(样品 1)粉末(过四号筛)1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 35 kHz) 30 min, 放冷, 补足减失的质量, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 仪器精密度试验 取金银花(样品 1)供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以咖啡酸色谱峰为参照峰(S), 计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.06%~0.30%, 相对峰面积 RSD 为 0.23%~2.14%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取金银花(样品 1)制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 以咖

啡酸色谱峰为参照峰(S), 计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.25%~0.73%, 相对峰面积 RSD 为 1.62%~4.22%, 表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取金银花供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 分别在 0, 4, 8, 16, 20, 24, 48 h 进样测定, 以咖啡酸色谱峰为参照峰(S), 计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.23%~0.98%, 相对峰面积 RSD 为 0.85%~4.82%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2 总灰分、酸不溶性灰分与指标成分含量测定

按中国药典 2020 年版一部对 24 批不同商品等级金银花的灰分与酸不溶性灰分进行测定, 以及含量测定项下的木犀草苷、绿原酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸进行测定, 结果见表 2。对照品及样品的 HPLC 图见图 1~2。

表 2 24 批色选金银花检查项目及指标成分测定

Tab. 2 Inspection items and index composition determination of 24 batches of color sorting Lonicerae Japonicae Flos %

编号	总灰分	酸不溶性灰分	木犀草苷	绿原酸	3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	总酚酸
1	5.82	0.38	0.047 6	4.471 5	1.247 2	0.163 7	5.882 4
5	5.72	0.56	0.044 9	4.629 9	1.296 3	0.170 3	6.096 4
9	5.71	0.40	0.048 9	4.744 4	1.325 1	0.175 7	6.245 2
13	5.79	0.52	0.048 2	4.721 3	1.358 8	0.186 3	6.266 4
17	5.86	0.56	0.043 8	4.695 9	1.323 5	0.177 4	6.196 7
21	5.76	0.46	0.045 5	4.771 5	1.355 3	0.179 1	6.305 9
平均值	5.78	0.48	0.05	4.67	1.32	0.18	6.17
标准值	0.05	0.07	0.00	0.10	0.04	0.01	0.14
2	5.65	0.41	0.062 6	4.548 3	1.294 8	0.157 8	6.001 0
6	5.19	0.39	0.060 4	4.612 0	1.324 2	0.162 6	6.098 8
10	5.67	0.72	0.058 4	4.726 1	1.335 6	0.168 1	6.229 8
14	5.84	0.62	0.060 6	4.700 0	1.341 0	0.170 1	6.211 0
18	5.71	0.63	0.052 5	4.639 1	1.351 8	0.180 1	6.171 0
22	5.67	0.54	0.057 6	4.666 4	1.338 0	0.166 0	6.170 4
平均值	5.57	0.56	0.06	4.58	1.30	0.16	6.03
标准值	0.20	0.12	0.00	0.06	0.02	0.01	0.08
3	5.31	1.12	0.086 4	4.104 2	1.196 5	0.125 9	5.426 7
7	5.25	0.33	0.091 1	4.043 5	1.161 9	0.111 4	5.316 9
11	7.42	0.57	0.079 3	4.168 0	1.248 4	0.136 8	5.553 1
15	5.24	0.63	0.087 8	4.232 1	1.219 8	0.136 9	5.588 8
19	5.29	0.64	0.076 3	3.948 8	1.153 8	0.126 9	5.229 5
23	5.28	0.58	0.077 1	4.276 5	1.215 7	0.131 8	5.624 0
平均值	5.63	0.65	0.08	4.13	1.20	0.13	5.46
标准值	0.80	0.24	0.01	0.11	0.03	0.01	0.15
4	5.52	0.50	0.080 6	3.967 7	1.048 2	0.105 4	5.121 3
8	5.26	0.41	0.080 0	3.972 0	1.033 4	0.105 9	5.111 4
12	5.46	0.28	0.075 0	4.156 6	1.058 2	0.113 4	5.328 2
16	6.58	0.53	0.074 1	3.998 8	1.013 5	0.107 3	5.119 6
20	5.58	0.48	0.071 6	4.102 2	1.052 8	0.110 0	5.265 1
24	5.50	0.58	0.070 9	4.137 1	1.088 8	0.107 2	5.333 1
平均值	5.65	0.46	0.08	4.06	1.05	0.11	5.21
标准值	0.43	0.10	0.00	0.08	0.02	0.00	0.10

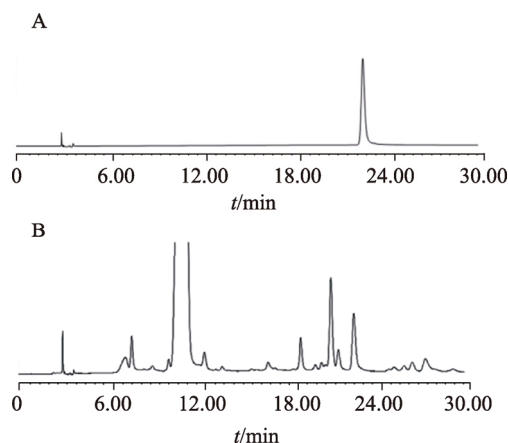


图1 木犀草苷对照品(A)及样品(B)的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chart of luteolin reference substance(A) and sample(B)

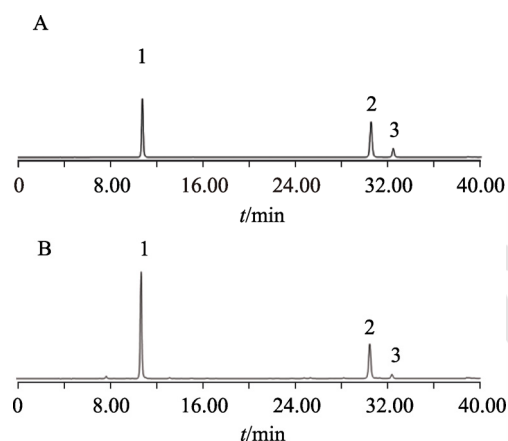


图2 混合对照品(A)及样品(B)的 HPLC 色谱图
1-绿原酸; 2-3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸; 3-4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸。
Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substance(A) and sample(B)
1-chlorogenic acid; 2-3,5-di-O-caffeoylquinic acid; 3-4,5-di-O-caffeoylquinic acid.

2.3 金银花等级及物理常数的测定

对色选机分出的金银花测定物理常数, 24 批金银花中每批取 100 根测量其相关物理常数, 计算平均值。结果见表 3。

3 结果与分析

3.1 HPLC 指纹图谱

3.1.1 指纹图谱相似度评价 将 24 批金银花样品 HPLC 图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”以金银花对照药材色谱图为参照图谱, 采用平均数法进行多点校正, 时间窗宽度为 0.5, 计算相似度。24 批次金银花的相似度分别 0.962, 0.962, 0.952, 0.953, 0.962, 0.964, 0.949, 0.956, 0.962, 0.960, 0.936, 0.949, 0.968, 0.964, 0.954, 0.963, 0.962, 0.961, 0.951, 0.953, 0.963, 0.961,

0.955, 0.958, 相似度均>0.900。区间变动幅度范围非常小, 反映了 24 批次金银花药材在整体化学成分的组成相近, 而在含量上有明显差异的情况。

表 3 24 批色选金银花物理常数

Tab. 3 Physical constants of 24 batches of color-sorting *Loniceræ Japonicæ* Flos

分级	样品 编号	平均直径/ cm	平均长度/ cm	平均质量/ g	黑头率/ %	开花率/ %	破损率/ %
特级	1	0.21	2.04	0.02	18.50	0.00	0.00
	5	0.18	2.06	0.02	2.90	0.00	5.70
	9	0.20	2.00	0.01	18.20	0.00	8.20
	13	0.17	1.83	0.01	39.30	0.00	3.60
	17	0.18	2.04	0.02	8.80	0.00	6.80
	21	0.22	2.06	0.02	0.00	0.00	9.60
	平均值	0.19	2.01	0.02	14.60	0.00	5.70
一级	2	0.18	1.95	0.02	11.10	0.00	25.90
	6	0.29	2.21	0.02	26.90	0.00	15.40
	10	0.17	2.01	0.02	11.10	0.00	22.20
	14	0.18	1.94	0.02	16.10	0.00	16.10
	18	0.17	1.97	0.02	22.20	0.00	11.10
	22	0.16	2.02	0.01	19.20	0.00	23.00
	平均值	0.19	2.02	0.02	17.80	0.00	18.95
二级	3	0.24	2.31	0.02	5.40	0.00	13.20
	7	0.29	2.75	0.02	26.70	6.70	43.30
	11	0.22	2.61	0.02	14.30	7.10	17.90
	15	0.28	2.58	0.02	2.90	2.90	32.40
	19	0.25	2.42	0.02	4.00	12.00	36.00
	23	0.22	2.40	0.02	2.60	3.80	42.30
	平均值	0.25	2.51	0.02	9.30	5.42	30.85
三级	4	0.20	2.41	0.02	12.00	12.00	60.00
	8	0.24	2.61	0.02	6.90	20.70	41.40
	12	0.22	2.62	0.02	23.80	14.30	23.80
	16	0.23	2.53	0.02	20.70	6.90	55.20
	20	0.23	2.42	0.02	0.00	10.70	42.90
	24	0.24	2.50	0.02	11.10	18.50	59.30
	平均值	0.23	2.50	0.02	12.40	13.85	47.10

经全谱峰匹配后生成叠加图谱, 共标定并指认了 28 个共有峰, 通过与对照品对比, 指认了 7 个成分, 分别为峰 1 新绿原酸, 峰 6 绿原酸, 峰 8 隐绿原酸, 峰 11 咖啡酸, 峰 23 芦丁, 峰 24 木犀草苷, 峰 28 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸, 见图 3~4。因绿原酸含量较高, 在各批次样品中的稳定性最好且具有良好的分离度, 故选取其为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.05%~0.18%。相对峰面积 RSD 为 11.95%~42.82%。

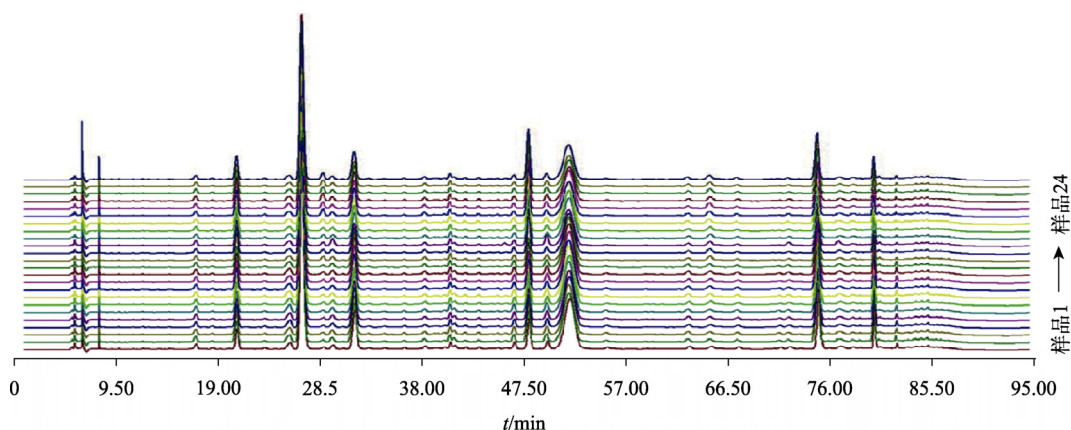


图3 24批金银花样品 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of 24 batches of Lonicerae Japonicae Flos samples

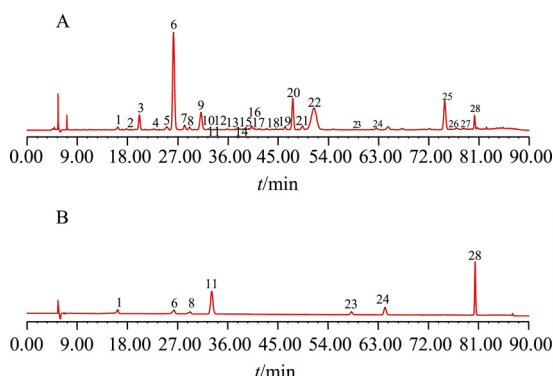


图4 金银花样品(A)及混合对照品溶液(B)的 HPLC 图

1-新绿原酸; 6-绿原酸; 8-隐绿原酸; 11-咖啡酸; 23-芦丁; 24-木犀草苷; 28-4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸。

Fig. 4 HPLC chromatogram of Lonicerae Japonicae Flos samples(A) and mixed reference solution(B)

1-neochlorogenic acid; 6-chlorogenic acid; 8-cryptochlorogenic acid; 11-caffeic acid; 23-rutin; 24-luteolin; 28-4,5-di-O-caffeoylquinic acid.

3.1.2 指纹图谱聚类分析(clustering analysis, CA) 将共有峰面积变量进行预处理(预处理后变量=峰面积/称样量),采用 SPSS 25.0 软件,以 24 批金银花样品中 28 个共有峰的预处理后数据为变量,选择平方欧氏距离作为测度进行 CA 分析,见图 5。当选择平方欧氏距离为 10 时,样品聚为 2 类,特级和一级聚为一类,二级和三级聚为一类。当选择平方欧氏距离为 5 时,样品整体可聚为 4 类,特级和一级分别聚为一类,与色选等级分类完全吻合;二级与三级中 8, 11 和 12 号样品聚类效果不好,说明金银花各成分含量相差不大。同时运用多元变量统计软件 SIMCA 14.1, 将 24 批数据导入,基于主成分分析(principle component analysis, PCA)建立无监督的模式识别模型,观察样品的组内聚集和组间分离趋势,得到 PCA 得分图,见图 6。结果将其分为 4 类,对比 CA 和 PCA 结果,发现两者分类结果基本一致,进一步证明了 CA 结果。

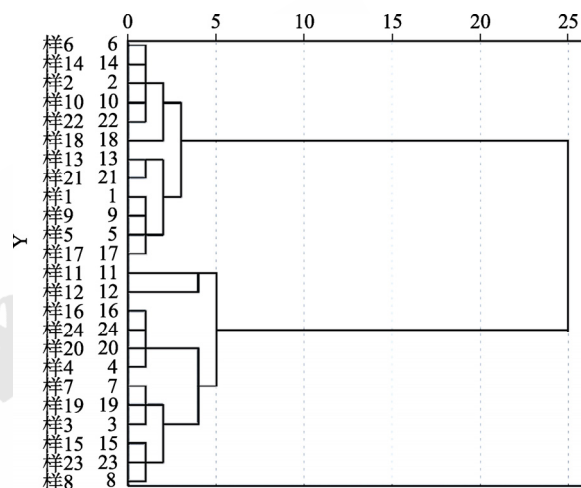


图5 24批金银花样品聚类分析图

Fig. 5 Cluster analysis of 24 batches of Lonicerae Japonicae Flos samples

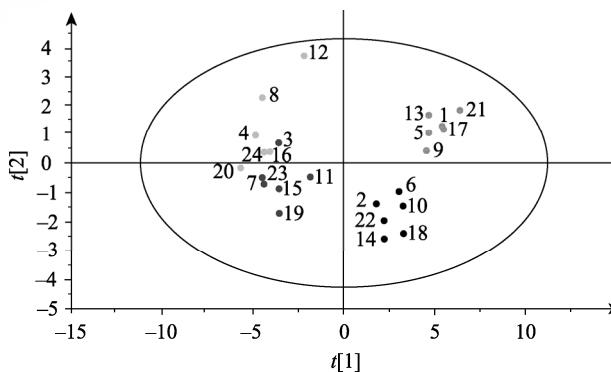


图6 24批金银花样品的主成分分析得分

Fig. 6 Principal component analysis scores of 24 batches of Lonicerae Japonicae Flos samples

3.1.3 偏最小二乘判别分析法(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 为了进一步证明分类的准确性,采用监督的模式识别 PLS-DA 分析。对 24 批金银花药材指纹图谱的 28 个共有峰的预处理变量数据进行 PLS-DA 分析,通过

PLS-DA 得分图, 见图 7A。结果发现累积解释能力参数 R^2X 为 0.845, R^2Y 为 0.927, 预测能力参数 Q^2 为 0.811, 均 >0.5 , 结果表明建立的模型稳定。PLS-DA 模型的验证见图 7B, R^2 回归线截距 0.34, Q^2 截距为 -0.594, $R^2 > Q^2$, 且 Q^2 为负值, 说明没有过度拟合现象, 且该模型预测能力较好。金银花样品聚类可以按色选等级聚为 4 类, 从而进一步验证了色选等级分类的合理性。

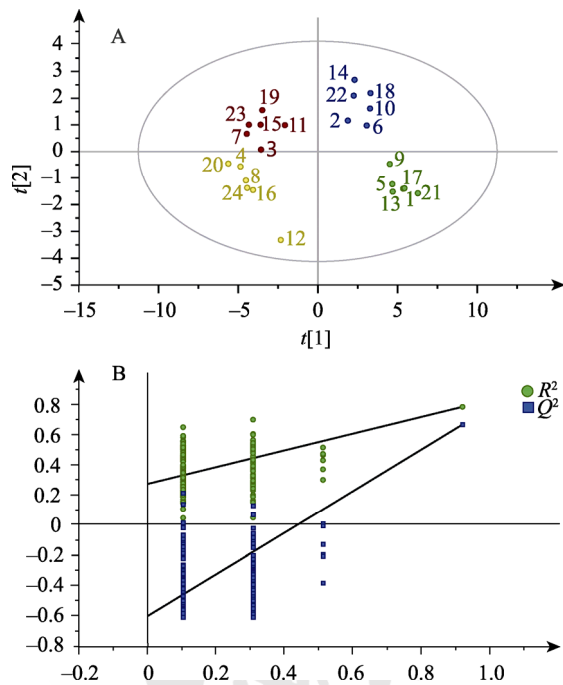


图 7 24 批金银花样品 PLS-DA 得分图(A)及模型检验图(B)
Fig. 7 PLS-DA score chart(A) and model test chart(B) of 24 batches of Lonicerae Japonicae Flos samples

PLS-DA 模型 VIP 图见图 8, 在 95%置信区间内, 由于所有变量的 VIP 值的平方和为 1, 所以往往将 1 作为 VIP 判定的界值, 一般认为 $VIP > 1$ 的变量对模型解释程度较高^[25]。结果发现峰 7、峰 10、峰 11(咖啡酸)、峰 13、峰 12、峰 18、峰 14、峰 15、峰 8(隐绿原酸)、峰 24(木犀草苷)及峰 9 等

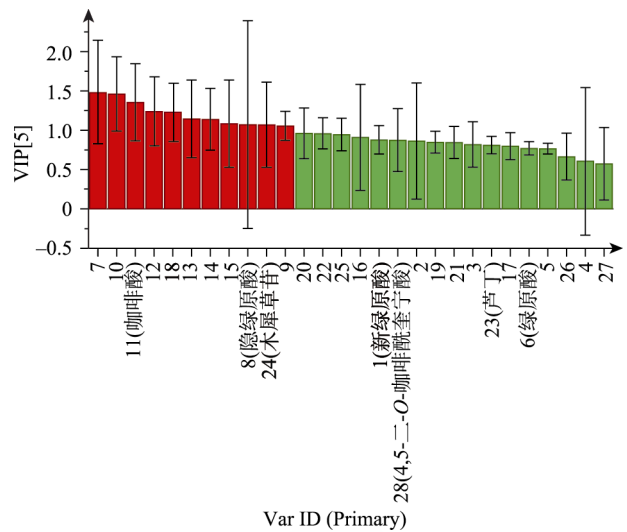


图 8 24 批金银花 PLS-DA 模型 VIP 图
Fig. 8 VIP map of 24 batches of Lonicerae Japonicae Flos PLS-DA model

11 个峰的贡献率 >1 , 说明对金银花等级划分影响较大, 可以视为金银花分级的潜在标志物; 同时, 10 个峰中大多数是未知成分, 且含量很低, 质量控制的实际意义不大。

3.2 理化指标成分与物理常数分析

3.2.1 色选等级理化指标分析 采用 SPSS 25.0 软件, 对 24 批色选等级金银花中理化指标进行分析。结果见表 4。

从表 4 中看出, 特级样品中木犀草苷的含量最低, 并与一级、二级和三级有显著性差异($P < 0.05$), 一级与二级和三级有显著性差异($P < 0.05$), 二级和三级之间显著性差异不明显, 说明金银花色选等级越高, 木犀草苷含量越低。在 4 个等级中 4,5-二-O-咖啡酰基奎宁酸含量都存在显著性差异($P < 0.05$); 特级与一级间绿原酸和 4,5-二-O-咖啡酰基奎宁酸有显著性差异, 其他等级之间均有显著性差异, 值得关注的是 4 个等级中酚酸类总和都存在显著性差异($P < 0.05$); 金银花色选等级越高, 酚酸类含量越高, 含量由高到低趋势为特级 $>$ 一级 $>$ 二级 $>$ 三级。

表 4 不同等级各成分间的比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 4 Comparison of components at different grades($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

等级	灰分	酸不溶性灰分	木犀草苷	绿原酸	3,5-二-O-咖啡酰基奎宁酸	4,5-二-O-咖啡酰基奎宁酸	3 种酚酸总和
特级	5.78±0.05	0.48±0.07	0.05±0.00	4.67±0.04	1.32±0.20	0.18±0.01	6.17±0.14
一级	5.57±0.20	0.56±0.12	0.06±0.00 ¹⁾	4.58±0.06	1.30±0.02 ¹⁾	0.16±0.01	6.03±0.08
二级	5.63±0.80	0.65±0.24	0.08±0.01 ¹⁾²⁾	4.13±0.11 ¹⁾²⁾	1.20±0.03 ¹⁾²⁾	0.13±0.10 ¹⁾²⁾	5.46±0.15 ¹⁾²⁾
三级	5.65±0.43	0.46±0.10	0.08±0.00 ¹⁾²⁾³⁾	4.06±0.08 ¹⁾²⁾	1.05±0.02 ¹⁾²⁾³⁾	0.11±0.00 ¹⁾²⁾³⁾	5.21±0.10 ¹⁾²⁾³⁾

注: 与特级比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与一级比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与二级比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the special level, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the first level, ²⁾ $P < 0.05$; compared with the second level, ³⁾ $P < 0.05$.

3.2.2 色选等级的物理常数分析 采用 SPSS 25.0 软件, 对 24 批色选等级金银花中物理常数分析。结果见表 5。

统计分析发现, 色选等级的质量、黑头率之间没有显著性差异; 破损率特级与其他等级之间有显著性差异($P<0.05$); 直径、开花率特级与二级、三级之间, 一级与二级、三级之间都有显著性差异($P<0.05$), 特级与一级没有差异, 开花率在二级与三级之间有显著性差异($P<0.05$); 而长度比较特殊, 只有二级与其他等级有显著性差异。在物理常数中直径、开花率和破损率越具有等级划分意义。

3.3 色选等级中各指标的相关分析

统计发现, 木犀草苷、绿原酸、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸含量与直径、开花率和破损率存在关联性, 需要进一步验证。相关性分析结果见表 6。

结果发现, 木犀草苷与绿原酸、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸呈负相关, 这就很好地解释了特级金银花中木犀草苷含量最低, 而酚酸类含量最高的原因, 结合表 4 的分析, 酚酸类指标可用于等级划分。木犀草苷与直径、开花率和破损率呈正相关, 结合表 4 的分析, 不

易于等级划分。

4 讨论

本实验采用 HPLC 对色选金银花 4 个等级 24 批次样品进行化学成分指纹图谱研究, 并结合相似度、CA、PCA 及 PLS-DA 方法对等级质量进行综合评价。相似度结果发现不同等级金银花在化学成分种类上非常相近, 而各等级峰面积差别比较大, 说明色选等级在化学成分含量有明显差异, 从化学成分角度进行等级划分存在合理性和可行性。聚类分析与主成分分析将色选 4 个等级样品分为 4 类, 特级和一级中的样品实现了各自的完全相聚, 二级和三级中少数样品聚类效果不理想, 可能与产地不同生产年限或采收加工导致的成分含量出现差异有关, 2 种分析方法的结果互为佐证, 色选等级中绝大部分样品能够实现预期的等级归类。最后通过 PLS-DA 判别分析, 能准确地判别出色选金银花的等级。

为了合理制定色选等级划分指标, 测定了不同等级的理化指标并测量了物理常数, 通过统计学分析, 发现色选等级整体上与其化学指标和物理常数中的直径、开花率及破损率之间存在显著的相关性。

表 5 不同等级各物理常数的比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 5 Comparison of physical constants of different grades($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

等级	直径/cm	长度/cm	质量/g	黑头率/%	开花率/%	破损率/%
特级	0.19±0.02	2.01±0.08	0.02±0.00	14.62±13.05	0.00±0.00	5.65±3.15
一级	0.19±0.04	2.02±0.09	0.02±0.00	17.80±5.73	0.00±0.00	18.95±5.13 ¹⁾
二级	0.20±0.05 ¹⁾²⁾	1.65±1.42 ¹⁾²⁾³⁾	0.02±0.01	9.30±8.73	5.42±3.79 ¹⁾²⁾	30.85±11.51 ¹⁾
三级	0.23±0.02 ¹⁾²⁾	2.52±0.09	0.02±0.00	12.42±8.01	13.85±4.66 ¹⁾²⁾³⁾	47.10±12.74 ¹⁾²⁾

注: 与特级比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与一级比较, ²⁾ $P<0.05$; 与二级比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the special level, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the first level, ²⁾ $P<0.05$; compared with the second level, ³⁾ $P<0.05$.

表 6 金银花总化学成分及物理常数的相关性分析

Tab. 6 Correlation analysis of chemical components and physical constants of *Lonicerae Japonicae* Flos

化学成分及物理常数	平均直径/cm	开花率/%	破损率/%	木犀草苷	绿原酸	3,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸	4,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸
平均直径/cm	—						
开花率/%	0.391	—					
破损率/%	0.404	0.729 ²⁾	—				
木犀草苷	0.540 ²⁾	0.771 ²⁾	0.840 ²⁾	—			
绿原酸	-0.582 ²⁾	-0.828 ²⁾	-0.849 ²⁾	-0.857 ²⁾	—		
3,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸	-0.449 ¹⁾	-0.832 ²⁾	-0.845 ²⁾	-0.682 ²⁾	0.912 ²⁾	—	
4,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸	-0.582 ²⁾	-0.827 ²⁾	-0.849 ²⁾	-0.847 ²⁾	0.957 ²⁾	0.953 ²⁾	—
3 种酚酸总和	-0.507 ¹⁾	-0.845 ²⁾	-0.861 ²⁾	-0.826 ²⁾	0.992 ²⁾	0.955 ²⁾	0.977 ²⁾

注: 相关系数绝对值越大, 概率越小, 相关性越强。与特级比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: The greater the absolute value of the correlation coefficient, the smaller the probability, the stronger the correlation. Compared with the special level, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

综上所述,色选金银花等级与指纹图谱和指标性成分含量呈明显的关联性,以金银花直径、开花率和破损率,结合木犀草苷含量和酚酸类含量作为色选等级评价和控制指标具有可行性、科学性,可以实现金银花等级的智能化色选等级的生产。由于少数样品存在偏离,需要进一步对色选工艺优化和验证,完善色选等级生产工艺的可操作性和规范性。该研究为国家有关部门制定中药材及饮片色选等级标准提供重要的研究思路。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 230.
- [2] WU J, WANG C, YU H C. Chemical constituents and pharmacological effect of *Lonicerae Japonicae Flos*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(4): 225-234.
- [3] 熊乐文, 金莹, 王彦予, 等. 金银花酚酸类化学成分、药理活性及体内代谢研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(3): 864-871.
- [4] YANG R, LU Y, HAO H, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of iridoid glycosides in *Lonicera japonica*[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2021, 46(11): 2746-2752.
- [5] CHEN L M, GAO H M, LIU X Q, et al. Scientificity of traditional commodity grade of Chinese medicinal materials: Taking *Lonicerae Japonicae Flos* as example[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2020, 45(9): 2091-2102.
- [6] FENG F, DUAN X Y, XU M X, et al. Study on quality grade standard of *Lonicerae Japonicae Flos*[J]. *J Food Saf & Qual*(食品安全质量检测学报), 2020, 11(18): 6656-6662.
- [7] YANG G, WANG N, ZHAN Z L, et al. Study on status of criteria for formulating specification and grade of Chinese medicinal materials based on filed survey in medicine market[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 41(5): 761-763.
- [8] DENG Z, ZHOU H Y, JING W G, et al. Research progress on commodity specification and grade of Chinese medicinal materials and some suggestions[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(16): 167-172.
- [9] ZHANG N P, ZHANG P, YU K Z, et al. Study on evaluation method of commodity specification grade of Chinese medicinal materials with ginseng and American ginseng as examples[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2017, 37(10): 1920-1926.
- [10] DANG H X, LIU J, LI B, et al. The research on the value framework of Chinese patent medicine[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2021, 30(11): 961-970.
- [11] SU X Y, ZHANG J G, HAMAMOZHIAMU, et al. Quality evaluation of *Notopterygii Rhizoma et Radix* by UHPLC fingerprint and chemometry analysis[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2020, 43(12): 2966-2970.
- [12] YE D, ZHAO M, SHAO Y, et al. Relativity of commercial specification of *Menthae Herba* based on chemical analysis[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2015, 40(2): 251-257.
- [13] MA H Y, QIAN Q, NIU L Y. Current status and hotspot of *Lonicera Japonica Flos* research based on bibliometrics[J]. *Drug Eval Res*(药物评价研究), 2022, 45(7): 1426-1434.
- [14] NY/T 2303—2013, 农产品等级规格 金银花[S]. 2013-05-20.
- [15] DB 52/T 1060—2015, 地理标志产品 绥阳金银花[S]. 2015-09-16.
- [16] DB 41/T 1681—2018, 地理标志产品 商丘金银花[S]. 2018-09-29.
- [17] DB 45/T 559—2018, 地理标志产品 忻城金银花[S]. 2018-08-30.
- [18] 甘肃省药品监督管理局《甘肃省金银花加工技术规范》[S]. 2020年.
- [19] T/SDCMIA DD01—2020, 地药材金银花[S]. 2020-12-16.
- [20] ZHOU J, ZOU L, LIU W, et al. Study on commercial specification of *Lonicerae Japonicae Flos*[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2015, 38(4): 701-705.
- [21] ZHANG H, WANG H, HAO J B, et al. Grade quality standard classification of *Lonicera japonica*[J]. *Guizhou Agric Sci*(贵州农业科学), 2017, 45(5): 80-84.
- [22] 宋平顺, 杨平荣, 魏锋. 甘肃中药材商品志[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 2021: 262.
- [23] GUO R, DAI X, HUANG H Y, et al. Color grading technology in the quality classification of *Lonicera Japonica Flos* in Tongwei[J]. *Cent South Pharm*(中南药学), 2021, 19(12): 2616-2622.
- [24] PAN X, LIU H, WANG H, et al. Classification discrimination of different types of cigarette based on near infrared spectroscopy and OPLS-DA algorithm[J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2020, 39(11): 1385-1391.

收稿日期: 2022-09-21

(本文责编: 曹粤锋)