

# 指纹图谱结合模式识别、一测多评的连翘质量评价

杨彬<sup>1</sup>, 赵君<sup>1</sup>, 刘芳<sup>1\*</sup>, 张茜<sup>1</sup>, 杨磊<sup>1</sup>, 何华康<sup>1</sup>, 武勇<sup>2</sup>, 冯丽<sup>3</sup>(1.长治医学院, 山西 长治 046000; 2.山东福胶集团有限公司, 济南 250100; 3.长治市市场监督管理局, 山西 长治 046000)

**摘要:**目的 建立连翘药材的指纹图谱并结合模式识别、一测多评技术对其进行系统、全面的质量评价。方法 采用 HPLC 测定 10 批次连翘样品的指纹图谱, 建立指纹图谱共有模式, 通过相似度分析, 结合聚类分析、主成分分析等模式识别技术对其进行定性评价。以连翘苷为内参物, 建立连翘酯苷 A、(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘酯素与内参物的相对校正因子, 并进行含量计算, 实现一测多评的定量评价; 同时采用外标法测定 10 批连翘中 4 个成分的含量, 比较计算值与实测值的差异, 验证一测多评法的准确性。结果 建立的指纹图谱共标定 13 个共有峰, 并对其中 4 个进行了归属, 分别是连翘酯苷 A、(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素, 10 批次连翘样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.98, 通过聚类分析及主成分分析将其分为 3 类。建立的相对校正因子重现性良好, 采用校正因子计算的含量值与实测值之间相关系数均>0.99, 相对误差均<3%。结论 本研究建立的分析方法直观、准确、简便、可行。指纹图谱结合模式识别、一测多评技术进行定性定量分析可以为连翘的质量控制提供科学依据。

**关键词:** 连翘; 指纹图谱; 模式识别; 一测多评; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)03-0292-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.03.007

引用本文: 杨彬, 赵君, 刘芳, 等. 指纹图谱结合模式识别、一测多评的连翘质量评价[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(3): 292-298.

## Quality Evaluation of Forsythiae Fructus Based on Combinative Method of Fingerprint, Pattern Recognition and Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker

YANG Bin<sup>1</sup>, ZHAO Jun<sup>1</sup>, LIU Fang<sup>1\*</sup>, ZHANG Qian<sup>1</sup>, YANG Lei<sup>1</sup>, HE Huakang<sup>1</sup>, WU Yong<sup>2</sup>, FENG Li<sup>3</sup>  
(1.Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 2.Shandong Fupai Ejiao Co., Ltd., Jinan 250100, China; 3.Changzhi Administration for Market Regulation, Changzhi 046000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish the fingerprint of Forsythiae Fructus and conduct a systemic and comprehensive quality evaluation using pattern recognition and quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS). **METHODS** Ten batches of Forsythiae Fructus were determined by HPLC and a common mode of fingerprint was established. The similarities between fingerprints of 10 batches samples and common mode were evaluated. The further qualitative analysis of the drug was carried out by similarity evaluation, cluster analysis(CA), principal component analysis(PCA). QAMS was performed. Forsythidin was selected as internal reference and the relative correction factors(RCF) of forsythiaside A, (+)pinoreosinol- $\beta$ -D-glucoside and phillygenin to it were calculated. At the same time, the content of 4 components in 10 batches of forsythia was measured by external standard method, and the difference between the calculated value and the measured value was compared to verify the accuracy of QAMS. **RESULTS** There were 13 common peaks in fingerprints of 10 batches of Forsythiae Fructus, four of which were identified. The similarities of fingerprints were >0.98. The batches of the drug were divided into 3 categories by CA and PCA. The established RCF had a good reproducibility. The correlation coefficients between the content values calculated using the correction factors and the measured values were all >0.99, and the relative errors were all <3%. **CONCLUSION** The developed method is accurate, simple and feasible. The quality of Forsythiae Fructus could be evaluated qualitatively and quantitatively using a fingerprint combined with pattern recognition technique and QAMS technique. Moreover, it will also lay a solid scientific basis for the further quality control of Forsythiae Fructus.

**KEYWORDS:** Forsythiae Fructus; fingerprint; pattern recognition; quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS); cluster analysis(CA); principal component analysis(PCA)

连翘来源于木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实<sup>[1]</sup>, 为常用中药材, 主产于山西、陕西、河南、河北等省, 主要

集中于太行山、中条山、桐柏山、伏牛山等山区地带, 其中以太行山地区分布最为密集<sup>[2-3]</sup>, 多以野生为主。连翘中主要含有苯乙醇苷类、木质素

基金项目: 国家高等学校大学生创新创业训练计划项目(201710117002); 山西省卫生计生委科研项目(2017158); 长治医学院科研启动基金项目(QDZ201623)

作者简介: 杨彬, 女 Tel: 18803003287 E-mail: 18803003287@163.com \*通信作者: 刘芳, 女, 硕士, 副教授 Tel: 17735513140 E-mail: liufang@czmc.edu.cn

类、挥发油类、黄酮类等成分,具有清热解毒、消肿散结、疏散风热之功效<sup>[1]</sup>,被称为“疮家圣药”。因此,连翘为连花清瘟胶囊、双黄连口服液、银翘解毒冲剂等常用中药制剂的主要原料。

中药的质量直接影响中医临床辨证施治的效果,有效控制中药的质量,是保证中医临床疗效的前提<sup>[4]</sup>。目前,指纹图谱技术已在中药质量控制领域得到广泛应用<sup>[5-7]</sup>,它能够充分提取中药中的化学成分信息和数据,可对药物中已知及未知活性成分进行综合表征,具有整体性、全面性和系统性的特点<sup>[8]</sup>。但指纹图谱中各共有峰代表什么、含量多少,难以说清,这模糊性的特点使其难以充分用于实际生产中<sup>[9]</sup>。因此,在指纹图谱的研究基础上对其代表性化合物进行定量分析,将指纹图谱与一测多评法(multi-components by single marker, QAMS)相结合已成为中药质量控制的趋势<sup>[10-11]</sup>,在一定程度上弥补了指纹图谱的不足。

本研究采用 HPLC,建立不同产地 10 批次连翘药材的指纹图谱,通过相似度评价、聚类分析(clusteranalysis, CA)、主成分分析(principal componentanalysis, PCA)对 10 批次连翘药材进行综合评价。并采用 QAMS 对具有代表性的 4 个化学成分[连翘酯苷 A、(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素]进行含量测定,利用外标法对其科学性和可行性进行验证,为全面、客观、准确评价连翘质量提供依据。

## 1 仪器与材料

Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪、Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m)均来自美国 Agilent; LC-20AT 型高效液相色谱仪、AUW220D 十万分之一电子分析天平均来自日本岛津; Diamonsil C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m, 北京迪马科技有限公司); KQ 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率 250 W,频率 40 KHz); 中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版中国药典委员会)。

连翘苷、连翘酯苷 A 对照品(批号:KA0806CA14, HN1116XA13, 供含量测定用)均来自上海源叶生物科技有限公司; (+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘酯素对照品(批号: MUST-17011707, PS170606-04, 供含量测定用)均来自成都曼斯特生物科技有限公司; 乙腈(色谱

纯,康科德公司); 重蒸水,其他试剂均为分析纯。

连翘药材经长治医学院药学系生药学教研室刘芳副教授鉴定均为木犀科植物连翘 *F. suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,样品信息见表 1。

表 1 连翘药材样品

Tab. 1 Samples of Forsythiae Fructus

序号	采集地点	采集时间	加工方式
S1	山西黎城	2018.07	煮至透心,晒干
S2	山西平顺	2018.07	煮至透心,晒干
S3	山西左权	2018.08	煮至透心,晒干
S4	陕西山阳	2018.07	煮至透心,晒干
S5	河北井陘	2018.08	煮至透心,晒干
S6	陕西商洛 1	2018.07	蒸至透心,晒干
S7	购于药材公司	2014.09	未知
S8	陕西商洛 2	2018.07	蒸至透心,晒干
S9	陕西商洛 3	2018.07	蒸至透心,晒干
S10	陕西商洛 4	2018.07	蒸至透心,晒干

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m)。流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱, 0~5 min, 3%→5%A; 5~15 min, 5%→10%A; 15~20 min, 10%→14%A; 20~35 min, 14%→17%A; 35~45 min, 17%→24%A; 45~50 min, 24%→28%A; 50~60 min, 28%→60%A。流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,检测波长为 235 nm。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取连翘酯素对照品适量于 10 mL 量瓶中,加 70%甲醇溶解并稀释至刻度,其质量浓度为 0.260 mg·mL<sup>-1</sup>,作为连翘酯素储备液。再分别精密称取连翘酯苷 A、(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷对照品适量及精密吸取 1 mL 连翘酯素储备液于 10 mL 量瓶中,加 70%甲醇溶解并稀释至刻度,其质量浓度分别为 1.800, 0.430, 0.200, 0.026 mg·mL<sup>-1</sup>,即得混合对照品溶液,避光低温保存。

### 2.3 供试品溶液的制备

取连翘药材粉末(过 40 目筛,干燥至恒重)约 0.23 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 70%的甲醇溶液 25 mL,称定总质量,冷浸 2 h 后,超声提取 30 min,补足失重,摇匀,0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤,取续滤液备用。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性和范围** 分别吸取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积( $Y$ )对进样量( $X$ )进行线性回归。结果见表 2。

表 2 连翘中 4 种成分的线性回归方程( $n=6$ )

Tab. 2 Results of linear relationships for four components in Forsythiae Fructus( $n=6$ )

对照品	回归方程	相关系数	线性范围/ $\mu\text{g}$	检测限/ $\text{ng}$	定量限/ $\text{ng}$
连翘酯苷 A	$Y=913.28X-449.57$	0.999 8	3.6~21.6	6.6	20.7
(+)松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷	$Y=1\ 185.66X-95.58$	0.999 8	0.86~5.16	5.2	18.1
连翘苷	$Y=1\ 669.64X-85.34$	0.999 7	0.4~2.4	7.6	25.0
连翘酯素	$Y=3\ 767.86X-26.67$	0.999 7	0.052~0.312	9.1	27.9

**2.4.2 仪器精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液(S6) 20  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件连续进样 7 次, 测定各组分的峰面积值, 计算得连翘酯苷 A、(+松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素峰面积的 RSD 分别为 2.14%, 1.45%, 2.15%, 1.42%; 以连翘苷色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰的相对保留时间的 RSD $<1.0\%$ , 各共有峰的相对峰面积的 RSD $<2.0\%$ , 相似度均 $>0.99$ , 符合指纹图谱的技术要求, 表明仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性试验** 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 精密吸取同一供试品溶液(S6) 20  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件测得连翘酯苷 A、(+松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素的峰面积的 RSD 分别为 2.56%, 1.56%, 2.03%, 1.22%; 以连翘苷色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD $<1.0\%$ , 各共有峰相对峰面积的 RSD $<2.0\%$ , 相似度均 $>0.99$ , 符合指纹图谱的技术要求, 表明该供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.4.4 重复性试验** 取同一批连翘药材(S6) 0.23 g, 共 5 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测得连翘酯苷 A、(+松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素的平均质量分数为 6.04%, 0.68%, 0.56%, 0.084 8%, RSD 分别为 0.43%, 1.32%, 1.68%, 0.75%。以连翘苷色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD $<0.4\%$ , 各共有峰相

对峰面积的 RSD $<2.0\%$ , 相似度均 $>0.99$ , 符合指纹图谱的技术要求, 表明该方法重复性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 取连翘药材(S6) 6 份, 每份约 0.115 g, 精密称定, 分别精密加入连翘酯苷 A 2.251  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、(+松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 0.223  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、连翘苷 0.211  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、连翘酯素 0.029  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  混合对照品溶液 3 mL, 按“2.1”项下色谱条件测定, 并计算加样回收率。测得连翘酯苷 A、(+松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素的回收率分别为 100.07%, 100.23%, 99.80%, 100.11%, RSD 分别为 1.05%, 0.53%, 1.40%, 1.67%, 表明该方法的准确度良好。

## 2.5 指纹图谱

**2.5.1 指纹图谱共有模式的建立** 将 10 批次连翘药材按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 取对照品溶液, 分别按“2.1”项下色谱条件进行测定。色谱图见图 1。

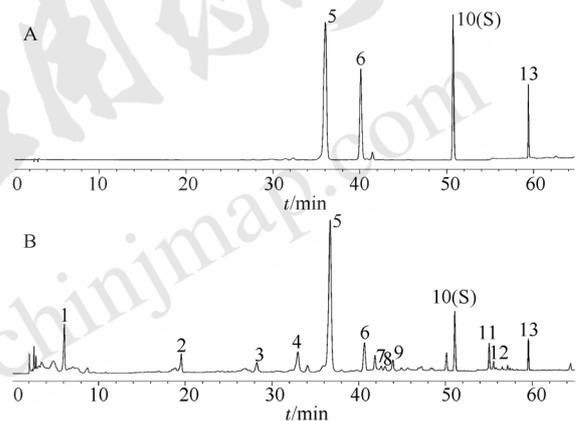


图 1 混合对照品(A)和连翘样品(B)的色谱图

5-连翘酯苷 A; 6-(+)松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷; 10-连翘苷; 13-连翘酯素。

Fig. 1 Spectrogram of reference substances(A) and sample (B) 5-forsythiaside A; 6-(+)pinoresinol- $\beta$ -D-glucoside; 10-forsythinin; 13-phillygenin.

将 10 批次连翘药材样品测定数据以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版), 经过色谱峰自动匹配, 进行色谱峰整体相似性评价。通过比较, 确定共有峰为 13 个, 并对其中 4 个色谱峰进行了归属。由于第 10 号色谱峰为连翘苷, 是连翘的特征性成分, 比较稳定, 且与相邻峰分离度较好, 故将其指定为参照峰。其余 3 个色谱峰 5 号为连翘酯苷 A, 6 号为(+松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷, 13 号为连翘酯素。

**2.5.2 HPLC 指纹图谱相似度评价** 通过《中药色

谱指纹图谱相似度评价系统》的分析处理,生成连翘指纹图谱的共有模式图(R)。以 R 作为对照指纹图谱,对各批次连翘样品指纹图谱进行相似度评价,相似度分别为 0.988, 0.995, 0.996, 0.986, 0.994, 0.990, 0.984, 0.989, 0.987, 0.988。相似度范围 0.984~0.996,表明 10 批次连翘药材相似度良好,结果见图 2。

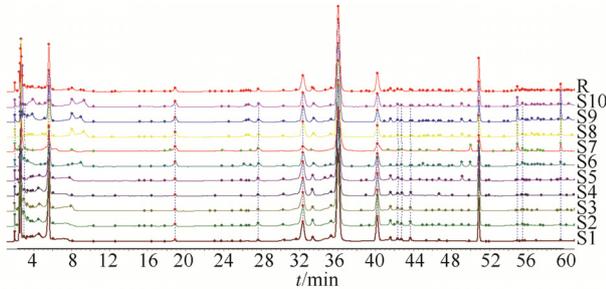


图 2 10 批次连翘药材 HPLC 指纹图谱  
Fig. 2 HPLC fingerprints of 10 batches of Forsythiae Fructus

## 2.6 连翘指纹图谱的模式识别研究

**2.6.1 聚类分析** 以连翘指纹图谱中确定的 13 个共有峰的峰面积为变量,采用 SPSS 19.0 软件中的平方 Euclidean 距离进行系统聚类分析,结果见图 3。根据聚类分析结果,将连翘药材大致分为 3 类: S6、S8、S9、S10 来源于陕西的蒸品聚为一类; S1~S5 来源于山西、陕西、河北的煮品归为一类; S7 单独归为一类。

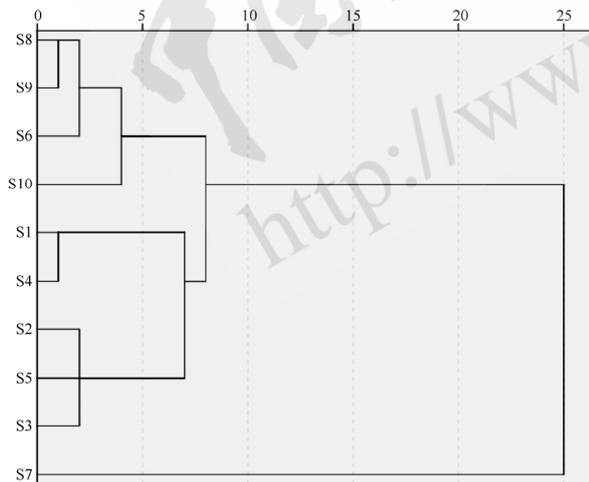


图 3 聚类分析树状图  
Fig. 3 Dendrogram of clustering analysis

**2.6.2 主成分分析** 通过 SIMCA-P11.5 软件,以 13 个共有峰的峰面积为变量,完成主成分分析模式图,见图 4。10 批连翘药材分为 3 类: S6、S8、

S9、S10 归为 I 类; S1~S5 归为 II 类; S7 归为 III 类,与聚类分析结果一致。

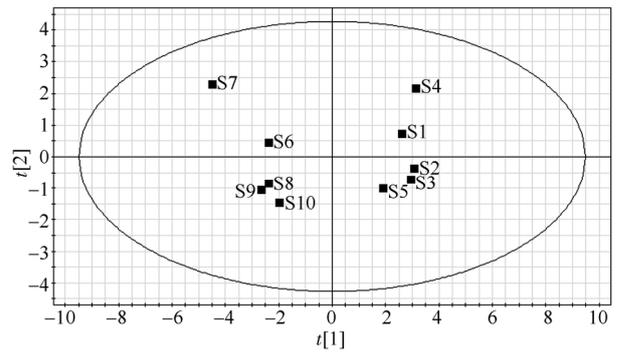


图 4 连翘 PCA 分析模式图  
Fig. 4 PCA results of Forsythiae Fructus

## 2.7 QAMS 测定连翘中 4 种成分含量

**2.7.1 相对校正因子的确定** 以连翘苷为内参物,取 6 个质量点计算所得的相对校正因子  $f_{s/i}$ ,取平均值作为定量用  $f_{s/i}$ 。相对校正因子计算公式:  $f_{s/i} = (W_s \times A_i) / (W_i \times A_s)$ ,其中  $A_s$  为内参物峰面积,  $W_s$  为内参物质量,  $A_i$  为某待测组分 i 峰面积,  $W_i$  为某待测组分 i 质量。结果见表 3。

表 3 连翘中 3 种成分与连翘苷的相对校正因子

Tab. 3 Relative correction factors of three components to forsythin in Forsythiae Fructus

进样体积/ $\mu\text{L}$	相对校正因子 $f_{s/A}$	相对校正因子 $f_{s/B}$	相对校正因子 $f_{s/C}$
2	0.542 3	0.726 2	2.243 5
4	0.544 9	0.720 5	2.255 9
6	0.541 9	0.724 1	2.234 0
8	0.549 4	0.719 6	2.257 3
10	0.544 6	0.714 3	2.251 1
12	0.546 3	0.712 6	2.255 0
均值	0.544 9	0.719 6	2.249 5
RSD/%	0.505 8	0.738 6	0.402 5

注: A-连翘酯苷 A; B-(+)松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷; C-连翘酯素; S-连翘苷。

Note: A-forsythiaside A; B-(+)pinoresinol- $\beta$ -D-glucoside; C-phillygenin; S-forsythin.

**2.7.2 校正因子重现性考察** 精密吸取混合对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,进样分析,在 2 个实验室分别考察了 Agilent 1260 Infinity、Shimadzu LC-20AT 2 种高效液相色谱系统和 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Diamonsil C<sub>18</sub>(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 2 种色谱柱对相对校正因子的影响,结果 RSD 均 $<$ 3%,表明在不同实验室和不同色谱柱下具有良好的重现性。结果见表 4。

表 4 不同仪器和色谱柱测定连翘中 3 种成分与连翘苷的相对校正因子

Tab. 4 Relative correction factors of three components to forsythin determined by different instruments and columns in Forsythiae Fructus

仪器	色谱柱	$f_{S/A}$	$f_{S/B}$	$f_{S/C}$
Agilent	Agilent C <sub>18</sub>	0.549 5	0.719 5	2.257 0
	Diamonsil C <sub>18</sub>	0.542 0	0.717 8	2.244 5
Shimadzu	Agilent C <sub>18</sub>	0.543 2	0.714 4	2.250 6
	Diamonsil C <sub>18</sub>	0.534 9	0.707 5	2.234 1
均值		0.542 4	0.714 8	2.246 5
RSD/%		1.105 6	0.736 9	0.434 1

注: A-连翘酯苷 A; B-(+)-松脂醇-β-D-吡喃葡萄糖苷; C-连翘酯素; S-连翘苷。

Note: A-forsythiaside A; B-(+)-pinoresinol-β-D-glucoside; C-phillygenin; S-forsythin.

2.7.3 待测组分色谱峰的定位 利用相对保留时间( $r_{i/s}=t_{Ri}/t_{RS}$ , 其中  $t_{Ri}$  为待测成分色谱峰保留时间,  $t_{RS}$  为内参物色谱峰保留时间)在 2 种高效液相色谱仪和 2 种不同型号色谱柱中的重现性, 结果见表 5。结果表明, 各待测成分相对保留时间的 RSD 均 <3%, 可以用于待测成分色谱峰的定位。

2.7.4 QAMS 与外标法测定结果的比较 取 10 批次连翘药材, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 分别采用外标法(external standard method, ESM)和 QAMS 测定连翘药材中 4 种成分的含量, 见表 6。为确认 QAMS 的准确性, 将 2 种方法计算结果经相关系数分析, 结果 2 种方法之间的相关系数均>0.99, 2 种方法计算得质量分数结果一致, 并以相对误差为参数对 2 种方法所得结果进行比较, 结果表明, 相对

表 6 一测多评法与外标法测得的连翘中 4 种成分含量

Tab. 6 Contents of four components by ESM and QAMS

序号	连翘苷	连翘酯苷 A			(+)松脂醇-β-D-吡喃葡萄糖苷			连翘酯素			%
		外标法	一测多评法	相对误差	外标法	一测多评法	相对误差	外标法	一测多评法	相对误差	
S1	0.918 8	7.450 3	7.435 6	-0.20	1.377 0	1.356 8	-1.47	-	-	-	
S2	1.074 9	8.697 4	8.688 0	-0.11	1.548 3	1.524 2	-1.55	-	-	-	
S3	1.009 0	9.087 4	9.105 0	0.19	1.129 8	1.102 4	-2.43	-	-	-	
S4	0.989 5	7.302 7	7.266 6	-0.50	1.284 6	1.260 0	-1.92	-	-	-	
S5	0.814 3	8.342 3	8.391 7	0.59	1.265 1	1.247 8	-1.36	-	-	-	
S6	0.532 0	7.350 5	7.501 5	2.05	0.797 7	0.785 0	-1.59	-	-	-	
S7	0.564 3	6.041 6	6.095 2	0.89	0.682 5	0.663 4	-2.80	0.084 8	0.085 4	0.71	
S8	0.534 1	7.293 2	7.439 2	2.00	0.818 6	0.806 6	-1.47	0.109 9	0.112 3	2.14	
S9	0.632 5	8.371 7	8.506 0	1.60	0.923 9	0.908 5	-1.66	0.107 2	0.109 3	2.02	
S10	0.646 4	7.699 7	7.794 9	1.24	0.892 4	0.875 2	-1.93	0.095 4	0.096 1	0.69	
相关系数	-	0.996 87			0.999 90			0.999 64			-

误差均<3%, 可见 QAMS 在连翘的多指标成分质量评价中应用是可行的。

表 5 不同仪器和色谱柱测定的连翘中 3 种成分与连翘苷的相对保留时间

Tab. 5 Relative retention time of three components to forsythin determined by different instruments and columns in Forsythiae Fructus

仪器	色谱柱	$r_{A/S}$	$r_{B/S}$	$r_{C/S}$
Agilent	Agilent C <sub>18</sub>	0.72	0.80	1.17
	Diamonsil C <sub>18</sub>	0.71	0.79	1.17
Shimadzu	Agilent C <sub>18</sub>	0.75	0.82	1.15
	Diamonsil C <sub>18</sub>	0.75	0.83	1.15
均值		0.73	0.81	1.16
RSD/%		2.98	2.20	0.83

注: A-连翘酯苷 A; B-(+)-松脂醇-β-D-吡喃葡萄糖苷; C-连翘酯素; S-连翘苷。

Note: A-forsythiaside A; B-(+)-pinoresinol-β-D-glucoside; C-phillygenin; S-forsythin.

### 3 讨论

#### 3.1 提取条件的优化及检测波长的选择

由于连翘酯苷不稳定, 高温易分解, 因此采用超声提取法。另考察了水、不同体积分数的甲醇-水、乙醇-水作为提取溶剂制备连翘药材供试品溶液, 结果以体积分数 70%甲醇作为提取溶剂, 得到色谱峰最多、目标成分峰面积最大, 且方法简单, 故确定以 70%甲醇超声提取 30 min 作为供试品溶液的制备方法。

连翘酯苷 A 为苯乙醇苷类化合物, (+)松脂醇-β-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素为双环氧木质素类化合物<sup>[12]</sup>, 采用二极管阵列检测器, 在

波长 190~390 nm 下, 分别对供试品溶液和混合对照品溶液的各待测成分进行了全波长三维图谱扫描, 并比较波长 235, 277 nm 处的色谱图, 结果表明, 在波长 235 nm 处的色谱峰信息较全面, 各待测成分色谱峰的峰面积较大, 且分离度良好, 因此选择 235 nm 作为检测波长。

### 3.2 指纹图谱建立与相似度分析

本研究通过 10 批次样品, 建立了连翘的 HPLC 指纹图谱, 其分离度和重现性均较好。通过比较, 确定了 13 个共有峰; 采用与对照品比较的方法, 确定了其中 4 个色谱峰的归属, 分别为连翘酯苷 A、(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素。以连翘的共有模式图作为参照, 计算相似度, 结果显示 10 批样品的相似度范围 0.984~0.996, 表明连翘化学成分整体特征相似度高, 药材质量相对稳定, 有较好的一致性。

### 3.3 模式识别研究

化学模式识别是化学计量学的重要组成部分, 包括聚类分析、主成分分析、簇类独立软模式法、判别分析、偏最小二乘法-判别分析、人工神经网络等<sup>[13-14]</sup>。目前, 指纹图谱结合模式识别方法已广泛应用于中药材的质量控制、差异标记物筛选和种质鉴别等方面, 可有效对中药材复杂的次生代谢产物信息进行综合评价<sup>[15-16]</sup>。本实验聚类分析结果基本上可将 10 批次样品分为 3 类: S7 为购于药材公司样品, 且存放于实验室较长时间, 与其他样品差异较大, 单独归为一类; S6、S8、S9、S10 均来源于陕西, 并且在产地采用蒸至透心, 晒干的加工方法杀青, 为一类; S1~S5 来源于山西、陕西、河北的样品, 但在产地采用煮至透心, 晒干的加工方法杀青, 为一类。说明连翘在采用不同的杀青方法导致某些化学成分含量发生了变化, 从而出现差异, 这个差异大于不同产地的气候、土壤、水分、种源及采收期等因素所带来的差异。主成分分析同样可将 10 批样品分为 3 类, 结果与聚类分析结果一致。

### 3.4 QAMS

连翘为“疮家圣药”, 在清热解毒方面极具疗效, 主要有抗菌、抗病毒等药理作用。连翘酯苷 A、(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷和连翘酯素均具有抑菌活性, 连翘酯苷 A 作用较强<sup>[17-18]</sup>。连翘酯苷对合胞病毒、腺病毒 3 型和 7 型、柯萨奇病毒 B 组 3 型和 7 型均有抑制作用, 是连翘预防

和治疗病毒感染的物质基础<sup>[19]</sup>。因此选择连翘酯苷 A、(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷和连翘酯素作为评价连翘药材质量的指标成分。由于连翘酯苷 A 对热、对碱性环境不稳定<sup>[20]</sup>、纯化难度大, 对照品不易得到, 因此本实验选择结构稳定、价格低廉且为连翘专属性成分的连翘苷为内参物, 采用 QAMS 测定连翘中连翘酯苷 A、(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷和连翘酯素的含量。在指纹图谱中将 10 批次样品分为 3 大类, 其中蒸品与煮品中 4 种成分的含量经方差分析, 连翘酯苷 A 蒸品与煮品之间的含量变化不显著, 但是连翘苷和(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷蒸品与煮品之间的含量存在显著性差异。特别是在煮品中连翘酯素能检测到, 但未能达到定量限, 不能进行定量。

本研究运用指纹图谱结合模式识别、QAMS 对连翘的质量评价进行研究, 建立了 10 批连翘指纹图谱的共有模式。此外, 本实验采用 QAMS 建立了连翘中 4 种成分同时测定的方法, 以连翘苷为内参物, 计算该成分与连翘酯苷 A、(+)-松脂醇- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷和连翘酯素的相对校正因子  $f$ , 通过不同色谱条件下的考察以及对 10 批次药材的各成分含量测定, 验证了 QAMS 具有良好的可行性和准确性。定性的指纹图谱、模式识别与定量的 QAMS 相结合, 简便快捷、稳定可靠, 为连翘的质量评价和临床用药提供了可靠的依据。

## REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 170-171, 405.
- [2] TENG H Y, SHEN J S, PAN H T, et al. Current situation and strategy of Forsythia suspensa(Thunb.)Vahl industry in Hebei province [J]. J Hebei Forest Sci Technol(河北林业科技), 2018(4): 46-49.
- [3] 黄洁, 晁思萌, 刘娟, 等. 陕西省不同地区连翘种质资源调查报告[J]. 南方农业, 2017, 11(26): 48-49.
- [4] QIN K M, YANG B, HU J. Application status and thinking of quantitative analysis of multi-components by single marker in quality control of multi-components traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(3): 725-731.
- [5] DOU Z H, BIAN L, XU B, et al. Quality evaluation of Rhei Radix et Rhizoma based on combinative method of fingerprint, assay of multi-component and pattern recognition [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2017, 35(11): 2903-2907.
- [6] LIU J, LIU H, DAI Z, et al. Quality analysis of Long dan Xie gan pill by a combination of fingerprint and multicomponent quantification with chemometrics analysis [J]. J Anal Methods Chem, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4105092>.
- [7] ZHANG H, WANG J N, CHEN Y, et al. Establishing the chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine

- standard decoction based on quality by design approach: A case study of Licorice [J]. *J Separat Sci*, 2019. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800989>.
- [8] LIU D F, ZHAO L N, LI Y F, et al. Research progress and application in fingerprint technology on Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [9] LI Q, DU S M, ZHANG Z L, et al. Progress in fingerprint technology on Chinese materia medica and prospect of its future development [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [10] LIU X S, WU Z Z, YANG K, et al. Quantitative analysis combined with chromatographic fingerprint for comprehensive evaluation of Danhong injection using HPLC-DAD [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013(76): 70-74.
- [11] TONG F M, LIU H, WANG J Z. Study on fingerprint and quantitation method of multi-components by single-marker of Zhengtian pills [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2018, 38(1): 79-88.
- [12] ZHANG C X, LIU S X, ZHAO Y M, et al. Analysis on chemical constituents from Forsythiae Fructus by HPLC-Q-TOF-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2016, 47(12): 2053-2060.
- [13] BALLABIO D, CONSONNI V, TODESCHINI R. The Kohonen and CP-ANN toolbox: A collection of MATLAB modules for self organizing maps and counterpropagation artificial neural networks [J]. *Chemom Intell Lab Syst*, 2009, 98(2): 115-122.
- [14] SUN L L, WANG M, REN X L. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2017, 48(20): 4339-4345
- [15] TAN S H, REN W Q, LIU Y X, et al. Fingerprint and pattern recognition of crude/vinegar processed *Linderae Radix* from different habitats [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2018, 38(10): 1803-1809
- [16] ZHOU L, LIANG S H, SUN Z, et al. Quality control research of compound Xueshuantong capsules based on UPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition [J]. *Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志)*, 2019, 39(1): 34-38
- [17] JIANG T, ZHANG L W. Study on relationship between HPLC fingerprint chromatogram and antibacterial activity of *Forsythia suspensa Vahl* [J]. *Chem Res Appl(化学研究与应用)*, 2015, 27(3): 256-261
- [18] 匡海学, 张宁, 陆志博. 青连翘抗菌活性成分的研究[J]. *中药通报*, 1988, 13(7): 32-34.
- [19] XIAO H M, WANG S W, WANG J B, et al. Progress on the study of forsythia suspense in antivirus [J]. *Chin Med Herald(中国医药导报)*, 2010, 7(2): 9-10.
- [20] ZHANG L W, YANG P. Study on the stability of forsythiaside [J]. *Chin Tradit Patent Med(中成药)*, 2003, 25(5): 353-356.

收稿日期: 2019-03-20

(本文责编: 沈倩)