

基于指纹图谱及化学模式识别方法优选蜜枇杷叶药材产地*

张新博¹, 汪芸兰¹, 雷璇¹, 张颖¹, 宋逍^{1,2**}

(1. 陕西中医药大学, 咸阳 712046; 2. 中药制药与新药开发教育部工程研究中心, 北京 100029)

摘要 目的:基于高效液相色谱指纹图谱和化学模式识别方法,评价不同产地蜜枇杷叶的质量,优选出蜜枇杷叶的最佳产地。**方法:**采用 Acclaim™ 120A C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱进行检测,流动相为 0.2% 磷酸水溶液(A) - 乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% B; 5 ~ 6 min, 5% B → 10% B; 6 ~ 20 min, 10% B; 20 ~ 50 min, 10% B → 25% B; 50 ~ 60 min, 25% B),体积流量 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 327 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。建立 30 批不同产地蜜枇杷叶的指纹图谱,采用指纹图谱结合化学模式识别的方法对不同产地蜜枇杷叶进行综合分析,对不同产地蜜枇杷叶进行聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)及综合评分,采用正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares - discriminant analysis, OPLS - DA)筛选出不同产地蜜枇杷叶的差异标志物,根据综合评分优选出蜜枇杷叶的产地。**结果:**建立了 30 批蜜枇杷叶的指纹图谱,标定出 12 个共有峰,根据对照品指认出 4 个色谱峰,确定为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷;CA 将 30 批蜜枇杷叶样品分为 6 类;经 PCA 提取出 3 个主成分,累计方差贡献率为 84.315%;根据 OPLS - DA 筛选得到 6 个差异标志物,其中 2 个确定为金丝桃苷、绿原酸;根据综合评分筛选出蜜枇杷叶的较优产地为四川、广西、广东、陕西。**结论:**指纹图谱及含量测定过程中的精密度、重复性和稳定性均良好。指纹图谱与化学模式识别相结合方法可全面综合评价蜜枇杷叶质量,此方法稳定、可靠,可为蜜枇杷叶的产地研究提供有效的参考依据。

关键词:蜜枇杷叶;指纹图谱;化学模式识别;主成分分析;新绿原酸;绿原酸;隐绿原酸;金丝桃苷

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2024)02 - 0340 - 11

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.02.18

Fingerprinting and chemical pattern recognition methods for preferential selection of the habitat of honeyed Eriobotryae Folium*

ZHANG Xin - bo¹, WANG Yun - lan¹, LEI Xuan¹, ZHANG Ying¹, SONG Xiao^{1,2**}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. Engineering Research Center for Pharmaceutics of Chinese Materia Medica and New Drug Development, Ministry of Education, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To evaluate the quality of honeyed Eriobotryae Folium from different habitats and to select the best habitat of honeyed Eriobotryae Folium preferentially based on high performance liquid chromatography fingerprinting and chemical pattern recognition methods. **Methods:** The detection was performed on an Acclaim™ 120A C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with the mobile phase of 0.2% aqueous phosphoric acid (A) - acetonitrile (B) in gradient elution (0 - 5 min, 5% B; 5 - 6 min, 5% B → 10% B; 6 - 20 min, 10% B;

* 陕西省教育厅项目(21JC011);陕西省中医药管理局(2021 - 04 - ZZ - 007);国家重点研发计划(2019YFC1711204)

** 通信作者 Tel:15319015083;E - mail: song - xiaoyao@163.com

第一作者 Tel:15769203985;E - mail: zhangxinbo200528@163.com

20–50 min, 10%B→25%B; 50–60 min, 25%B)。The volume flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, the detection wavelength was 327 nm, the column temperature was $30 \text{ }^\circ\text{C}$, and the injection volume was $10 \text{ } \mu\text{L}$. The fingerprint profiles of 30 batches of honeyed *Eriobotryae Folium* from different habitats were established, and the fingerprint profiles combined with chemical pattern recognition were used to conduct comprehensive analysis of honeyed *Eriobotryae Folium* from different habitats. And cluster analysis(CA), principal component analysis(PCA) and comprehensive scoring were performed on honeyed *Eriobotryae Folium* from different habitats. Orthogonal partial least squares – discriminant analysis(OPLS – DA) was used to screen out the differential markers of honeyed *Eriobotryae Folium* from different habitats, and the habitats of honeyed *Eriobotryae Folium* were selected based on the comprehensive scoring. **Results:** The fingerprint profiles of 30 batches of honeyed *Eriobotryae Folium* were established. Twelve common peaks were identified, and 4 peaks were identified as neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and auriculoside according to the control finger. CA divided the 30 batches of Honeyed *Eriobotryae Folium* samples into 6 categories. By PCA, 3 principal components were extracted, with a cumulative variance contribution of 84.315%. Six differential markers were obtained according to OPLS – DA, two of which were identified as chrysoiside and chlorogenic acid. The better habitats of honeyed *Eriobotryae Folium* were screened as Sichuan, Guangxi, Guangdong and Shaanxi according to the comprehensive score. **Conclusion:** Good precision, repeatability and stability results are obtained for fingerprinting and content determination. The combination of fingerprinting and chemical pattern recognition can comprehensively evaluate the quality of honeyed *Eriobotryae Folium*, and this method is stable and reliable, which can provide an effective reference basis for the habitat study of honeyed *Eriobotryae Folium*.

Keywords: honeyed *Eriobotryae Folium*; Fingerprinting; chemical pattern recognition; principal component analysis; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; auriculoside

枇杷叶,又名巴叶、芦桔叶,其性微寒,味苦,归肺、胃经,为蔷薇科枇杷属植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶,始载于《名医别录》,列为中品,是清肺止咳的常用中药,其为革质,深绿色,背有白色绒毛,边缘成锯齿状,具有清肺止咳、降逆止呕之功效,用于肺热咳嗽、气逆喘急、胃热呕逆、烦热口渴等症^[1-2]。现代研究表明,枇杷叶主要含有三萜酸类、挥发油类、黄酮类、糖苷类、多酚类、有机酸类、以及皂苷、鞣质及维生素 B₁ 等有效成分,具有抗炎、祛痰、止咳、抗肺纤维化、抗氧化、降血糖、抗肿瘤、止呕等药理活性^[3],主要分布于我国江苏、安徽、浙江、江西、福建、台湾、四川等南方地区。枇杷叶炮制前后临床应用有所差异,生品长于清肺止咳,多用于肺热咳喘;蜜炙后能增强润肺止咳作用,常用于肺燥咳嗽;姜汁制枇杷叶多用于和胃止呕;甘草制枇杷叶多用于祛痰止咳;清炒枇杷叶少了滋腻之性,多用于治疗外感咳嗽、呕吐^[4-5]。其中,蜜枇杷叶清肺化痰、润肺止咳,也是小儿消积止咳口服液中的臣药^[6]。本研究通过 HPLC 指纹图谱与含量测定相结

合,应用 CA 与 PCA 全面综合评价蜜枇杷叶的质量,为优选小儿消积止咳口服液中蜜枇杷叶的产地来源提供有效的参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UltiMate 3000 高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技公司);KQ-250DE 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);电热鼓风干燥箱(北京科伟永鑫实验仪器设备场);高速多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司);EL104 型万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试剂与试剂

蜜枇杷叶中药饮片共 30 批,样品具体信息见表 1。对照品绿原酸(批号 B20780)、新绿原酸(批号 B21396)、隐绿原酸(批号 B21587)、金丝桃苷(批号 B20631)均购自上海源叶生物技术有限公司,质量分数 $\geq 98\%$;乙腈(色谱纯,Fisher 公司);水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);其余试剂均为分析纯。

表 1 30 批蜜枇杷叶样品信息

Tab. 1 Information on 30 batches of honeyed *Eriobotryae Folium* samples

编号 (serial No.)	产地 (habitat)	批号 (batch No.)	编号 (serial No.)	产地 (habitat)	批号 (batch No.)
S1	广东(Guangdong)	200701CP174 - A	S16	广西(Guangxi)	2004015
S2	安徽(Anhui)	191001	S17	广西(Guangxi)	20051301
S3	安徽(Anhui)	200201	S18	河南(Henan)	20061803
S4	安徽(Anhui)	201001	S19	河南(Henan)	21011503
S5	安徽(Anhui)	20200501 - 2	S20	江苏(Jiangsu)	180901
S6	广东(Guangdong)	200401	S21	江苏(Jiangsu)	20200301
S7	广东(Guangdong)	201002	S22	陕西(Shaanxi)	190701
S8	广东(Guangdong)	2004002	S23	陕西(Shaanxi)	200401
S9	广东(Guangdong)	2101001	S24	陕西(Shaanxi)	201201
S10	广东(Guangdong)	2103004	S25	陕西(Shaanxi)	210301
S11	广东(Guangdong)	20201203	S26	陕西(Shaanxi)	210501
S12	广东(Guangdong)	20201229	S27	陕西(Shaanxi)	20191001
S13	广东(Guangdong)	2002801001	S28	四川(Sichuan)	20200608
S14	广东(Guangdong)	048M140801	S29	四川(Sichuan)	191205251
S15	广东(Guangdong)	1905001 - 2	S30	四川(Sichuan)	CM450210401

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Acclaim™ 120A C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 磷酸水溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5%B; 5 ~ 6 min, 5%B → 10%B; 6 ~ 20 min, 10%B; 20 ~ 50 min, 10% → 25%B; 50 ~ 60 min, 25%B); 体积流量: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 327 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 精密称取饮片粉末 1.0 g, 置于 10 mL 量瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 称量, 超声(功率 100 W, 频率 40 kHz) 处理 1 h, 放置冷却至室温, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 溶液过 0.22 μm 微孔滤膜, 弃去初滤液, 续滤液作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液 分别取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷的对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 分别制得质量浓度为新绿原酸 0.324 mg · mL⁻¹、绿原酸 0.419 mg · mL⁻¹、隐绿原酸 0.253 mg · mL⁻¹、金丝桃苷 0.123 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 指纹图谱方法学考察^[7-9]

2.3.1 精密度试验 按“2.2.1”项下方法制备 1 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以绿原酸(3 号峰)为参照峰(S), 计算 12 个共有峰

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 < 1.0%, 相对峰面积的 RSD < 3.0%, 以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》评价, 6 次进样的相似度均为 1.00, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

2.3.2 重复性试验 按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 以绿原酸(3 号峰)为参照峰(S), 计算 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 时进样, 以绿原酸(3 号峰)为参照峰(S), 计算 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4 指纹图谱的建立及相似度评价

将 30 批蜜枇杷叶按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.1 版本)”软件进行评价, 设定 S1 样品的图谱为参照图谱, 时间窗宽度为 0.1, 采用平均数法结合多点校正生成对照图谱, 并

进行相似度评价。30批蜜枇杷叶中药饮片的HPLC指纹图谱及对照图谱见图1。共标定了12个共有峰,通过与对照品图谱比对,指认了其中4个色谱峰(图2),其中峰1为新绿原酸、峰3为绿原酸、峰4为隐绿原酸、峰10为金丝桃苷。峰3出峰时间居中、峰面积较大且分离度良好,故选择3号色谱峰(绿原酸)作为参照峰(S),计算样品指纹图谱其他共有峰相对保留

时间的RSD均<0.50%,表明30批蜜枇杷叶样品中12个共有峰的保留时间比较稳定;但共有峰相对峰面积的RSD范围在29%~67%,相差较大,显示这12个共有峰所代表化合物在不同产地、批次之间的含量差别很大。除S19号样品外,其他各批次样品与对照图谱的相似度均>0.91,可见大部分产地的蜜枇杷叶中药饮片的质量比较接近。

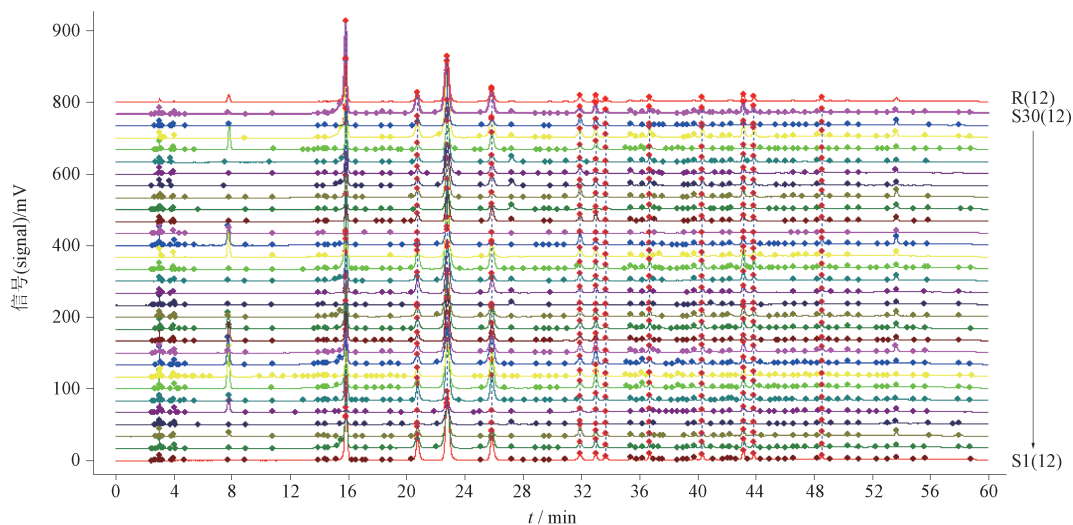
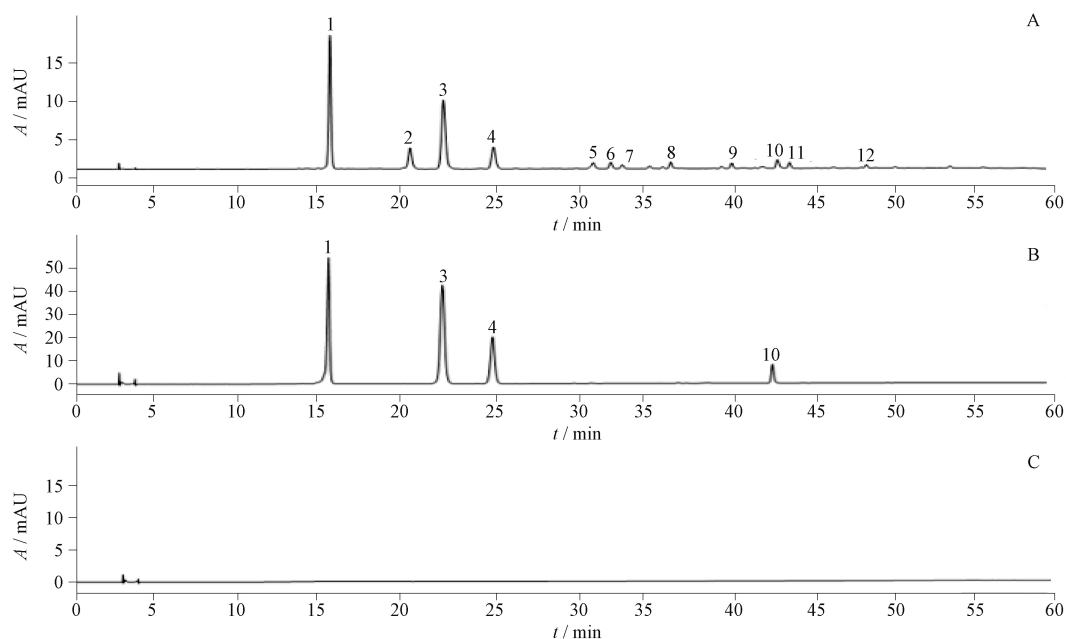


图1 30批蜜枇杷叶中药饮片的HPLC指纹图谱及对照图谱(R)

Fig. 1 HPLC fingerprints and reference chromatogram of 30 batches of honeyed Eriobotryae Folium prepared slices (R)



1. 新绿原酸(neochlorogenic acid) 3. 绿原酸(chlorogenic acid) 4. 隐绿原酸(cryptochlorogenic acid) 10. 金丝桃苷(auriculoside)
A. 供试品(sample) B. 混合对照品(mixed reference substances) C. 空白溶剂(blank solvent)

图2 蜜枇杷叶样品高效液相色谱图

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of honeyed Eriobotryae Folium sample

2.5 化学模式识别分析^[10-16]

2.5.1 聚类分析 采用 SPSS 25.0 统计软件,以 30 批蜜枇杷叶共有峰面积为变量,采用组间联接法, Squared Euclidean distance 聚类,对 30 批样品指纹图谱进行聚类分析(CA)。由 CA 谱系图(图 3)可知,30 批蜜枇杷叶饮片可聚为 6 类,其中 S2、S3、S11、S13~S16、S18、S21、S23、S24~S27 聚为一类,S7~S10 聚为一类,S4、S5、S19、S20、S22、S29 聚为一类,S12、S28、S30 聚为一类,S1、S6 聚为一类,S17 为一类。结果提示,不同产地蜜枇杷叶饮片的化学成分存在差异。

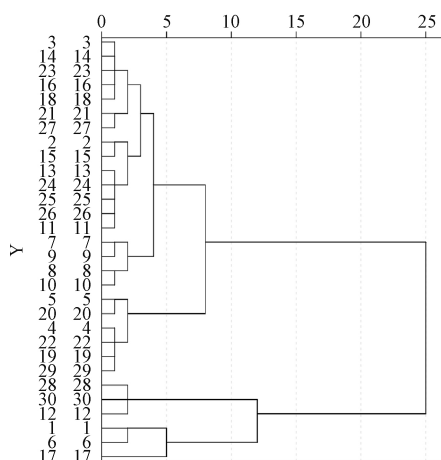


图 3 蜜枇杷叶样品 CA 树状图

Fig. 3 Tree chart of CA of honeyed *Eriobotryae Folium* samples

2.5.2 主成分分析 以 30 批蜜枇杷叶共有峰峰面积为变量,采用 SPSS 25.0 和 SIMCA 14.1 进行主成分分析(PCA),以主成分特征值及方差贡献率作为选择主成分的依据。

以特征值 > 1 为标准,提取出 3 个主成分,累计方差贡献率为 84.315% (表 2),表明提取出的 3 个主成分反映了 30 批蜜枇杷叶样品指纹图谱的主要信息,碎石图(图 4)进一步说明了 3 个主成分可以表征蜜枇杷叶的整体特征。根据旋转后的成分矩阵分析结果(表 3)可知,12 个共有峰对第 1、第 2 主成分都呈正相关,对第 3 主成分大多呈正相关。色谱峰 1~3、色谱峰 8~11 对第 1 主成分贡献最大;峰 4、6 对第 2 主成分贡献最大,色谱峰 5、色谱峰 12 对第 3 主成分贡献最大。

表 2 3 个主成分分子的特征值和方差贡献率

Tab. 2 Eigenvalues and variance contribution rates of three principal component factors

主成分 (principal component)	特征值 (eigenvalue)	方差贡献率 (variance contribution rate)/%	累计方差贡献率 (cumulative variance contribution rate)/%
1	5.720	47.670	47.670
2	2.298	19.152	66.821
3	2.099	17.494	84.315

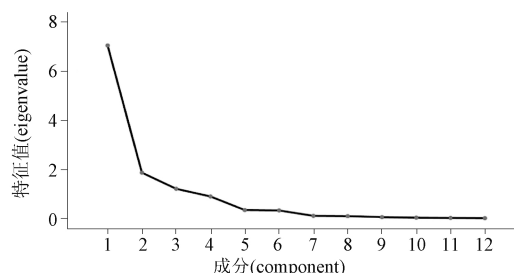


图 4 蜜枇杷叶样品指纹图谱共有峰碎石图

Fig. 4 Fingerprint of honeyed *Eriobotryae Folium* samples with common peaks and gravel map

表 3 旋转后的成分矩阵分析结果

Tab. 3 Component matrix analysis results after rotation

峰号(peak No.)	主成分 1(principal component 1)	主成分 2(principal component 2)	主成分 3(principal component 3)
1	0.864	0.214	-0.200
2	0.814	0.370	0.158
3	0.882	0.257	0.024
4	0.534	0.794	-0.189
5	0.069	0.321	0.913
6	0.181	0.922	0.132
7	0.603	0.543	0.301
8	0.849	0.229	0.096
9	0.828	0.089	0.178
10	0.884	0.202	0.320
11	0.789	0.188	0.220
12	0.196	-0.188	0.930

根据 SPSS 软件得到主成分得分(图 5),再根据各主成分的贡献率,计算出综合得分,其公式为 $Z_{\text{综}} = 0.477Z_1 + 0.192Z_2 + 0.175Z_3$,主成分得分和综合得分结果见表 4。综合得分最高的为 S17 号样品,产地广西;其次是 S28、S30 号样品,产地四川;第 4~7 名分别为 S1、S12、S13、S10 号样品,产地广东;第 8 名为 S2 号样品,产地安徽;第 9~11 名为 S6、S7、S11 号样品,产地广东;第 12 名为 S16 号样品,产地广西;

第 13 名为 S15 号样品,产地广东;第 14~15 名为 S24、S23 号样品,产地陕西;S20 号样品排名最后,产地江苏,考虑为批号较早,成分损失较为严重。从 PCA 及综合得分角度来看,本研究中四川产地蜜枇杷叶成分含量相对优于广西,广西产地蜜枇杷叶成分含量相对优于广东,产地为广东的样品综合得分排名在前 20,比较稳定,广东产地蜜枇杷叶成分含量相对优于陕西。

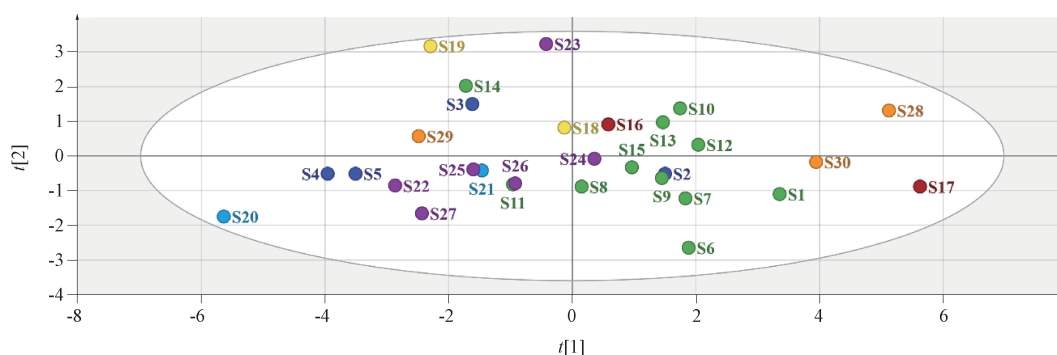


图 5 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score chart

2.5.3 偏最小二乘法判别分析 将 30 批蜜枇杷叶的 12 个共有峰导入 SIMCA 14.1 统计软件进行偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),得到各批次蜜枇杷叶样品间差异性成分(图 6)。由模型分析验证参数可知, $R_x^2 = 0.681$, $R_y^2 = 0.119$, $Q^2 = -0.0158$,表明不同产地蜜枇杷叶分组间的差异程度并不太大。以变量投影重要度(variable importance for the projection, VIP) > 1.0 为筛选标准,共得到 6 个差异标志物(图 7),按照 VIP 大小依次为 10 号峰(金丝桃苷)、8 号峰、7 号峰、2 号峰、9 号峰、3 号峰(绿原酸)。这些成分是 30 批蜜枇杷叶样品之间产生差异的主要原因,具有一定的标志性作用,今后对蜜枇杷叶的研究应重点关注上述成分的质量变化。

2.6 4 个成分含量测定

2.6.1 线性关系考察 取质量浓度分别为 0.324、0.419、0.252 8、0.123 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷对照品溶液,按浓度逐倍稀释后制得 6 个系列溶液,注入液相色谱仪,按照“2.1”项下色谱条件测定,以各成分对照品质量浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,得回

归方程。结果(表 5)表明,对照品溶液质量浓度在相应范围内与峰面积有良好的线性关系。

2.6.2 仪器精密度试验 精密吸取对照品溶液适量,按照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次测定,记录峰面积。计算各成分峰面积的 RSD。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷峰面积的 RSD 分别为 1.6%、1.9%、1.1%、1.4%,表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 精密称取蜜枇杷叶样品粉末 6 份(批号 200701CP174-A),按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷的含量($n = 6$)分别为 1.923 6、2.495 1、0.995 5、0.607 5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 分别为 2.8%、2.1%、1.2%、2.5%,表明方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,记录峰面积,计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷峰面积的 RSD 分别为 0.38%、2.6%、1.0%、0.79%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.5 加样回收率试验 精密称定已测质量浓度

表 4 主成分得分和综合得分

Tab. 4 Principal component score and comprehensive score

编号 (serial number)	主成分 1 (principal component 1)	主成分 2 (principal component 2)	主成分 3 (principal component 3)	综合得分 (comprehensive score)	排名 (ranking)
S1	1.493	0.176	-0.568	0.647	4
S2	0.456	0.495	-0.224	0.273	8
S3	-0.922	-0.031	0.978	-0.275	21
S4	-0.816	-1.408	-0.789	-0.798	29
S5	-0.726	-1.226	-0.738	-0.711	28
S6	1.076	0.344	-1.769	0.269	9
S7	-0.397	2.671	-0.476	0.240	10
S8	-0.564	1.516	-0.459	-0.058	17
S9	-0.631	2.609	-0.065	0.189	11
S10	0.021	0.883	1.210	0.391	6
S11	-0.331	0.156	-0.647	-0.241	19
S12	0.702	0.162	0.383	0.433	5
S13	0.727	-0.577	0.741	0.365	7
S14	-0.872	-0.398	1.322	-0.261	20
S15	0.415	0.085	-0.177	0.183	13
S16	0.462	-0.742	0.603	0.183	12
S17	2.655	-0.328	-0.328	1.146	1
S18	-0.130	-0.134	0.579	0.014	16
S19	-1.335	-0.349	2.113	-0.334	24
S20	-1.433	-1.136	-1.762	-1.210	30
S21	-0.674	0.284	-0.374	-0.332	23
S22	-0.459	-1.112	-0.929	-0.595	27
S23	-0.353	-0.770	2.226	0.073	15
S24	0.525	-0.702	-0.122	0.094	14
S25	-0.309	-0.557	-0.442	-0.332	22
S26	0.434	-1.309	-0.782	-0.181	18
S27	-0.932	0.430	-1.296	-0.589	26
S28	1.982	-0.189	1.263	1.130	2
S29	-1.289	0.308	0.302	-0.503	25
S30	1.225	0.851	0.229	0.788	3

的蜜枇杷叶样品 9 份, 每份 0.5 g, 加入各对照品适量, 按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法进样测定, 计算各成分的回收率。结果见表 6。

2.6.6 样品含量测定 将 30 批蜜枇杷叶样品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算

含量。结果见表 7。

3 结果与讨论

实验考察了乙腈-0.2% 磷酸水溶液、甲醇-0.2% 磷酸溶液 2 种不同流动相系统及比例, 结果显示以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时所得各色谱峰峰形较好, 分离效果好。考察提取

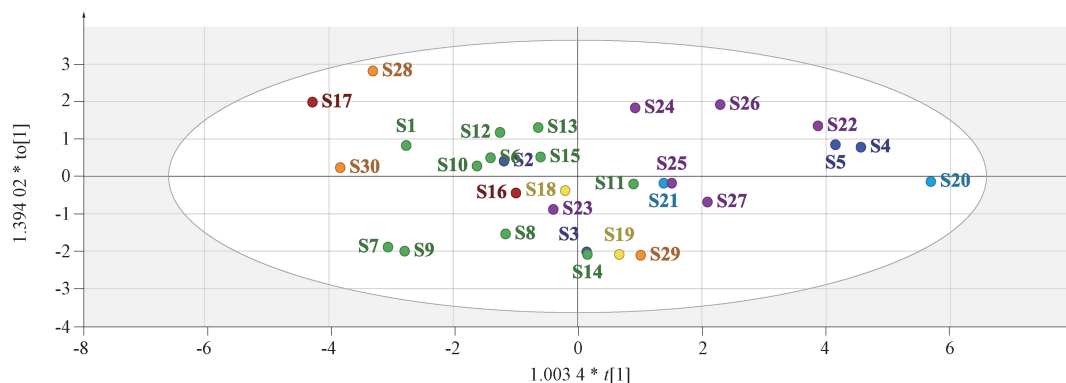


图 6 30 批蜜枇杷叶样品 OPLS-DA 散点图

Fig. 6 Scatter plot for OPLS-DA of 30 batches of honeyed Eriobotryae Folium samples

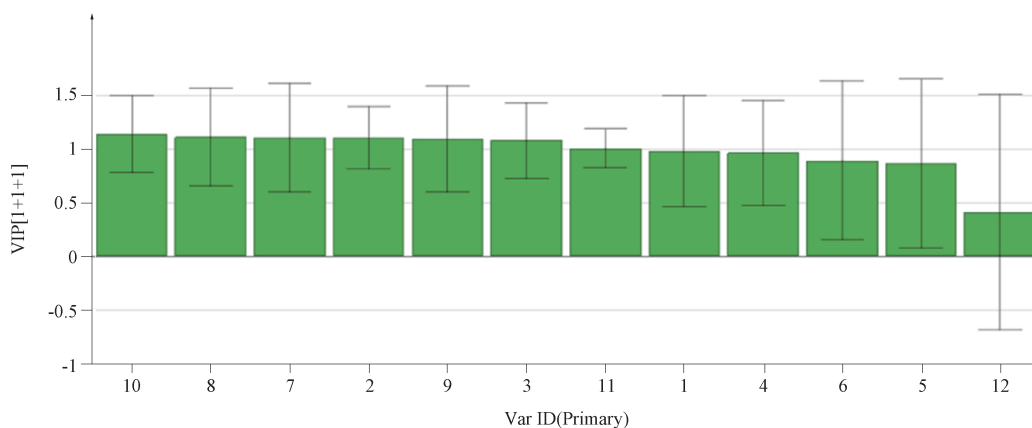


图 7 30 批蜜枇杷叶样品各成分 VIP 图

Fig. 7 VIP chart of components of 30 batches of honeyed Eriobotryae Folium samples

表 5 蜜枇杷叶中 4 个成分的线性关系考察结果

Tab. 5 Linear relationship results of four components in honeyed Eriobotryae Folium

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
新绿原酸(neochlorogenic acid)	$Y = 0.2278X - 0.5251$	0.9993	3.32 ~ 324.00
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y = 0.2142X - 1.3687$	0.9998	4.29 ~ 419.00
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	$Y = 0.1780X - 1.2360$	0.9991	2.59 ~ 252.80
金丝桃苷(auriculoside)	$Y = 0.0804X - 0.1051$	0.9993	1.26 ~ 123.00

溶剂(甲醇、50% 甲醇)、超声时间(30、60 min)、波长(327、365 nm)以及供试品溶液制备样品浓度(0.05、0.10 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对色谱图的影响,结果表明,在流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液、波长 327 nm 等条件下,以甲醇为溶剂超声处理 60 min 时,各成分提取率最高,所得色谱图基线平,色谱峰数量多、峰面积最佳。

本文结果表明,四川、广东、陕西的蜜枇杷叶质

量较好,可为小儿消积止咳口服液制备过程中从中药饮片的产地选择提供较好的品质。研究用 SIMAC 软件进行 PCA,采用 OPLS-DA 模型中 VIP 值筛选出 6 个具有统计学意义的差异标志物,并通过对照品指认出其中的 2 个成分为金丝桃苷和绿原酸,可考虑将其加入到小儿消积止咳口服液中质量控制的指标中。

表 6 蜜枇杷叶中 4 个成分的加样回收率试验结果 ($n=3$)Tab. 6 Test results of sample addition recovery of 4 components in honeyed *Eriobotryae Folium*

成分 (component)	称样量 (sample size)/ g	样品含量 (sample content)/ mg	加入量 (quantity added)/ mg	测得量 (measured amount)/ mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/ %	RSD/ %
新绿原酸 (neochloro - genic acid)	0.500 5	0.962 8	0.77	1.736 7	100.5	100.7	0.32
	0.501 6	0.964 9	0.77	1.739 5	100.6		
	0.502 8	0.967 2	0.77	1.745 3	101.1	102.2	1.5
	0.503 3	0.968 1	0.97	1.969 9	103.3		
	0.503 0	0.967 6	0.97	1.966 1	102.9		
	0.502 9	0.967 4	0.97	1.942 1	100.5		
	0.502 7	0.967 0	1.16	2.175 2	104.2	104.8	0.63
	0.503 4	0.968 3	1.16	2.192 0	105.5		
	0.501 0	0.963 7	1.16	2.178 7	104.7		
	绿原酸 (chlorogen - ic acid)	0.502 6	1.254 0	1.00	2.238 5	98.4	98.4
0.503 5		1.256 3	1.00	2.239 7	98.3		
0.501 2		1.250 5	1.00	2.236 1	98.6	100.8	1.1
0.500 3		1.248 3	1.25	2.507 4	100.7		
0.502 2		1.253 0	1.25	2.526 9	101.9		
0.504 2		1.258 0	1.25	2.504 5	99.7		
0.500 9		1.249 8	1.50	2.750 1	100.0	101.7	1.5
0.500 7		1.249 3	1.50	2.793 9	103.0		
0.502 3		1.253 3	1.50	2.787 0	102.2		
隐绿原酸 (cryptochl - orogenic acid)		0.502 8	0.500 5	0.40	0.884 0	95.9	98.3
	0.502 4	0.500 1	0.40	0.894 3	98.5		
	0.501 1	0.498 8	0.40	0.900 5	100.4	101.1	2.7
	0.500 7	0.498 4	0.50	1.016 7	103.7		
	0.500 5	0.498 2	0.50	1.005 3	101.4		
	0.501 4	0.499 1	0.50	0.990 9	98.3		
	0.500 9	0.498 6	0.60	1.096 0	99.6	99.0	2.1
	0.501 9	0.499 6	0.60	1.080 1	96.7		
	0.503 2	0.500 9	0.60	1.105 4	100.7		
	金丝桃苷 (auriculosi - de)	0.500 2	0.303 9	0.24	0.547 3	101.4	102.3
0.500 7		0.304 2	0.24	0.547 5	101.4		
0.501 6		0.304 7	0.24	0.554 3	104.0	101.2	1.2
0.501 9		0.304 9	0.30	0.608 7	101.3		
0.501 5		0.304 7	0.30	0.604 8	100.0		
0.502 2		0.305 1	0.30	0.612 4	102.4		
0.500 9		0.304 3	0.37	0.686 9	103.4	102.2	1.3
0.502 0		0.305 0	0.37	0.678 1	100.8		
0.501 1		0.304 4	0.37	0.683 1	102.3		

表 7 不同产地蜜枇杷叶含量测定结果

 Tab. 7 Content determination results of honeyed *Eriobotryae Folium* from different habitats

编号 (serial number)	含量(content)/(mg·g ⁻¹)			
	新绿原酸 (neochlorogenic acid)	绿原酸 (chlorogenic acid)	隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	金丝桃苷 (auriculoside)
S1	1.923 6	2.495 1	0.995 5	0.607 5
S2	0.821 2	1.547 5	0.268 9	0.429 4
S3	0.306 5	1.099 8	0.096 6	0.305 3
S4	0.121 8	0.654 9	0.043 5	0.164 2
S5	0.089 8	0.392 7	0.054 4	0.276 6
S6	1.991 3	2.879 0	0.460 9	0.543 7
S7	0.714 4	1.463 8	0.566 9	0.470 5
S8	0.642 8	1.133 7	0.345 1	0.400 1
S9	0.645 7	1.431 2	0.436 4	0.359 5
S10	0.596 7	1.422 6	0.301 3	0.540 1
S11	0.698 7	1.416 4	0.238 3	0.249 5
S12	0.927 3	1.963 8	0.314 0	0.467 1
S13	0.622 0	1.533 5	0.197 1	0.546 4
S14	0.297 5	1.238 0	0.078 2	0.376 2
S15	1.029 6	1.597 9	0.220 5	0.390 1
S16	0.497 2	1.281 6	0.135 0	0.513 1
S17	2.547 8	2.601 8	0.376 6	0.796 7
S18	0.396 8	1.280 0	0.201 6	0.459 0
S19	0.111 5	0.676 1	0.072 4	0.314 1
S20	0.052 2	0.189 1	0.033 8	0.096 5
S21	0.382 4	0.928 2	0.197 2	0.296 4
S22	0.266 6	0.685 3	0.099 6	0.212 4
S23	0.364 1	1.335 4	0.086 2	0.475 9
S24	0.573 7	1.712 8	0.208 7	0.511 8
S25	0.743 2	1.394 1	0.147 3	0.261 9
S26	0.695 7	1.336 7	0.118 3	0.361 7
S27	0.427 1	0.844 0	0.229 4	0.212 8
S28	1.160 5	2.267 5	0.318 1	0.700 5
S29	0.279 0	0.794 0	0.106 7	0.218 0
S30	1.365 3	1.929 0	0.350 3	0.579 7

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020;213
ChP 2020. Vol I [S]. 2020; 213
- [2] 肖旭坤, 王翰华, 阮洪生. 枇杷叶化学成分和药理活性研究进展[J]. 中医药导报, 2019, 25(21):60
XIAO XK, WANG HH, RUAN HS. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Pipaye (*Eriobotryae Folium*) [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 25(21): 60
- [3] 叶广亿, 李书渊, 陈艳芬, 等. 枇杷叶不同提取物的止咳化痰平喘作用比较研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2):100
YE GY, LI SY, CHEN YF, *et al.* Comparative study of different extracts of loquat leaf in antitussive and expectorant and antiasthmatic effects [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2013, 29(2): 100
- [4] 汪世浩, 闫其朋, 周玉波. 枇杷叶及其炮制品中总三萜的含量分析[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(12):22
WANG SH, YAN QP, ZHOU YB. Content determination of total triterpenoids in *Folium Eriobotryae* processed products[J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2017, 26(12): 22
- [5] 高伟城, 王小平, 何丽珊. 枇杷叶生品及不同炮制品质量评价[J]. 中国药房, 2022, 33(2):196

- GAO WC, WANG XP, HE LS. Quality evaluation of crude drug and different processed products of *Eriobotryae Folium*[J]. *China Pharm*, 2022,33 (2): 196
- [6] 李文兵, 许玲, 卢君蓉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的枇杷叶蜜炙前后标准汤剂质量控制研究[J]. *中草药*, 2020,51 (13): 3444
- LI WB, XU L, LU JR, *et al.* Quality control study of standard decoction of raw and honey processed *Eriobotryae Folium* based on HPLC fingerprint[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51 (13): 3444
- [7] 谢苏梦, 季巧遇, 吕尚, 等. 不同产地野菊花 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究[J]. *中草药*, 2021,52(24): 7616
- XIE SM, JI QY, LÜ S, *et al.* Study on establishment of HPLC fingerprints and chemical pattern recognition of *Chrysanthemum indicum* from different regions[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52 (24): 7616
- [8] 位翠杰, 陈芳, 丁青, 等. 基于 UPLC 指纹图谱和多成分定量的茵陈配方颗粒质量控制研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(10): 99
- WEI CJ, CHEN F, DING Q, *et al.* Quality control of *Artemisia Scopariae Herba* dispensing granules based on UPLC fingerprints and multi-component content determination[J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2021,28 (10): 99
- [9] 张泽康, 王昌海, 赵玥瑛, 等. 经典名方阳和汤基准样品的 HPLC 指纹图谱分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29 (10): 13
- ZHANG ZK, WANG CH, ZHAO YY, *et al.* HPLC fingerprint analysis of benchmark sample of Yanghetang[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(10): 13
- [10] 黄宽, 付鹏, 林艾和, 等. 不同产地夏枯草 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J]. *中华中医药学刊*, 2021,39(12): 124
- HUANG K, FU P, LIN AH, *et al.* Study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Xiakucao (Prunella vulgaris)* from different producing areas[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2021, 39 (12): 124
- [11] 陈琳, 唐志书, 刘妍如, 等. UPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价白芷药材质量[J]. *天然产物研究与开发*, 2019,31(10): 1697
- CHEN L, TANG ZS, LIU YR, *et al.* Quality control research of *Angelica dahurica* base on UPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2019,31 (10): 1697
- [12] 彭警, 樊箫雨, 王迪磊, 等. 基于成分定量和指纹图谱的化学模式识别法评价胆木不同部位的差异性[J]. *中草药*, 2023, 54 (10): 3281
- PENG J, FAN XY, WANG DL, *et al.* Differences of *Nauclea officinalis* in different parts based on quantitative analysis of components and fingerprint by chemical pattern recognition[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(10): 3281
- [13] 张建新, 燕雪花, 马昕, 等. 芳香新塔花总黄酮的 HPLC 指纹图谱研究及化学模式识别分析[J]. *现代中药研究与实践*, 2021, 35(6): 45
- ZHANG JX, YAN XH, MA X, *et al.* HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of total flavonoids from *Ziziphora clinopodioides* Lam[J]. *Res Pract Chin Med*, 2021,35 (6): 45
- [14] 童欢, 张明伟, 张炳武, 等. 基于指纹图谱、含量测定和化学模式识别的五子衍宗丸质量评价研究[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(1): 103
- TONG H, ZHANG MW, ZHANG BW, *et al.* Study on quality evaluation of Wuzi Yanzong pills based on HPLC fingerprint, assay and chemical pattern recognition[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(1): 103
- [15] 赵茜, 于佳萍, 章聚宝, 等. 基于高效液相色谱指纹图谱的不同产地不同采摘期昆仑雪菊的化学模式识别及抗氧化谱效关系探究[J]. *理化检验-化学分册*, 2023, 59(2): 125
- ZHAO Q, YU JP, ZHANG JB, *et al.* Chemical pattern recognition and antioxidant spectrum-effect relationship development coreopsis tinctoria of Kunlun from different habitats and harvesting periods based on high performance liquid chromatography fingerprint [J]. *Phys Test Chem Anal Part B: Chem Anal*, 2023, 59(2): 125
- [16] 程茜菲, 张玩涛, 彭修娟, 等. 指纹图谱和化学模式识别评价前列舒通胶囊的质量[J]. *华西药学杂志*, 2023, 38(1): 95
- CHENG QF, ZHANG WT, PENG XJ, *et al.* Quality evaluation of Qianlie Shutong capsules based on fingerprints and chemical pattern recognition[J]. *West China J Pharm Sci*, 2023, 38 (1): 95

(本文于 2023 年 4 月 6 日收到)