

鲜鱼腥草 UPLC 特征图谱及 5 种指标成分含量测定研究

徐 杰,曾昭君,邓李红,魏 梅,黄梦婷,刘燎原*,程学仁

广东一方制药有限公司 广东省中药配方颗粒企业重点实验室,佛山 528244

摘要:为建立鲜鱼腥草药材 UPLC 特征图谱及 5 种指标成分含量同时测定的方法,本研究采用 UPLC 技术,以乙腈 : 0.1% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱,流速 0.3 mL/min,检测波长分别为 254 和 326 nm,同时测定不同产地 16 批鲜鱼腥草药材中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、槲皮苷含量及特征图谱,采用超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)对共有峰进行了指认。实验结果显示,本研究建立的特征图谱及含量测定方法符合方法学要求,5 种指标成分的含量均有不同程度的差异;特征图谱共标定了 7 个共有峰,指认了其中 5 个峰;不同产地鲜鱼腥草药材与对照特征图谱的相似度在 0.890 ~ 0.999 之间;聚类分析和主成分分析均可将 16 批鲜鱼腥草分为 3 类,不同类别间质量存在差异;主成分综合得分结果表明浙江金华种植的鲜鱼腥草质量最优,其次是四川彭州、广汉、绵阳等地。结果表明本研究建立的 UPLC 特征图谱及 5 种指标成分含量同时测定方法可用于鲜鱼腥草药材质量的综合评价。

关键词:鲜鱼腥草;UPLC;特征图谱;含量测定;聚类分析;主成分分析

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)6-0968-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.6.009

Study on the determination of five index components and characteristic chromatogram of fresh *Houttuynia cordata* by UPLC

XU Jie,ZENG Zhao-jun,DENG Li-hong,WEI Mei,HUANG Meng-ting,LIU Liao-yuan*,CHENG Xue-ren

Guangdong Yifang Pharmaceutical Co.,Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of
Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan 528244, China

Abstract: To establish a method for simultaneous analysis on five index components determination and characteristic chromatogram of fresh *Houttuynia cordata* by ultra performance liquid chromatography (UPLC). The UPLC method was carried out by gradient elution with aqueous phosphoric acid (0.1%). The flow rate was 0.3 mL/min. The detection wavelength was at 254 nm and 326 nm. The contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, hyperoside and quercetin of 16 batches of fresh *H. cordata* from different origins and the characteristics chromatogram were analyzed. The common peaks were identified by ultra performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry (UPLC-MS). The methods for characteristic chromatogram analysis and compound determination were in agreement with methodological requirements. There are differences at different degrees in the contents of five indicative compounds; The common characteristic chromatogram of fresh *H. cordata* were completed with seven recognizable peaks and five of them determined; The similarity between the 16 batches of fresh *H. cordata* and the control characteristic chromatography was between 0.890 and 0.999. Both cluster analysis and principal component analysis can classify 16 batches of fresh *H. cordata* in three categories, and the quality of different categories is different. The results of main component comprehensive scores indicate that the quality of fresh *H. cordata* planted in Zhejiang Jinhua is the best, followed by Pengzhou, Guanghan, Miyang and other places. The established UPLC characteristic chromatogram and simultaneous analysis on five index components determination methods can be used for the comprehensive quality evaluation of fresh *H. cordata*.

Key words: fresh *Houttuynia cordata*; UPLC; characteristic chromatogram; content determination; cluster analysis; principal component analysis

收稿日期:2019-09-02 接受日期:2020-06-02

基金项目:广东省科技计划(2018B030323004);广东特支计划科

技创业领军人才项目(2017TY04R197)

*通信作者 Tel:86-757-85128603;E-mail:99263@163.com

鲜鱼腥草为三白草科植物蕺菜 (*Houttuynia cordata* Thunb.) 的新鲜全草,性辛,味微寒,具有清热

解毒,消痈排脓,利尿通淋的功效^[1],是常见的“药膳兼用型”大宗中药材之一,具有广阔的经济和药用价值。研究表明,鱼腥草主要的活性成分为挥发油、有机酸和黄酮类化合物,其中绿原酸、芦丁、槲皮苷等是其质量控制的重要指标^[2-4]。显然,单一成分定量分析难以全面反映鲜鱼腥草药材的质量。

中药特征图谱是中药整体性的化学表征,在中药质量评价方面应用广泛^[5]。目前已有鲜鱼腥草 HPLC 特征图谱研究的报道^[6],但该方法检测时间长达 70~90 min,供试品制备方法复杂、分析耗时长、试剂用量大、检测成本高,不利于全面推广应用。超高效液相色谱法(UPLC)是在传统高效液相色谱法(HPLC)基础上开发的一种基于小颗粒填料的液相色谱技术,具分离度好、灵敏度高、分析速度快等优点,在中药特征图谱的研究中发挥了重要的作用^[7]。近年来,由于 UPLC 特征图谱技术突破了单组份定量分析的局限性,能快速、全面、系统地对中药材进行多指标定量、定性分析,因此已逐渐成为中药材质量评价的重要手段^[8-12]。本研究建立了基于 UPLC 同时测定鲜鱼腥草药材特征图谱及 5 种指标成分含量的方法,显著缩短了分析时间,提高了分析效率,为鲜鱼腥草药材质量评价提供了参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY 型超高效液相色谱系统(包括真空脱气机、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、TUV 检测器、Empower 数据处理系统,美国 Waters 公司);Waters 液质联用仪(液相部分 ACQUITY UPLC H-Class Core System、质谱部分 Waters Xevo TQD MS,美国 Waters 公司);MiliQ Direct 8 型超纯水机(德国默克密理博公司);ME203E 型分析天平(美国 METTLER TOLEDO 公司)。

1.2 材料

新绿原酸(批号:wkq18030107,纯度 98.0%)、隐绿原酸(批号:wkq16081903,纯度 98.0%)对照品均购自四川省维克奇生物科技有限公司;绿原酸(批号:110753-201817,纯度 96.8%)、金丝桃苷(批号:111521-201708,纯度 95.1%)、槲皮苷(批号:111538-201606,纯度 90.6%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。色谱级甲醇、乙腈(德国默克股份两合公司);磷酸色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司);甲醇分析纯(西陇科学股份有限公司)。

16 批鲜鱼腥草药材经广东一方制药有限公司魏梅主任药师鉴定为三白草科植物蕺菜(*Houttuynia cordata* Thunb.)的新鲜全草。药材来源见表 1。

表 1 16 批鲜鱼腥草药材来源
Table 1 Origin of 16 batches of fresh *H. cordata*

编号 No.	产地 Origin	采样时间 Date	编号 No.	产地 Origin	采样时间 Date
Y1	广东肇庆(Zhaoqing, Guangdong)	2019.6.1	Y9	四川什邡(Shifang, Sichuan)	2019.6.10
Y2	广东东莞(Dongguan, Guangdong)	2019.6.6	Y10	四川绵阳(Mianyang, Sichuan)	2019.6.12
Y3	湖北黄冈(Huanggang, Hubei)	2019.6.7	Y11	四川绵阳(Mianyang, Sichuan)	2019.6.12
Y4	四川彭州(Pengzhou, Sichuan)	2019.6.9	Y12	四川宜宾(Yibin, Sichuan)	2019.6.14
Y5	四川广汉(Guanghan, Sichuan)	2019.6.10	Y13	四川宜宾(Yibin, Sichuan)	2019.6.14
Y6	四川什邡(Shifang, Sichuan)	2019.6.10	Y14	四川宜宾(Yibin, Sichuan)	2019.6.14
Y7	四川广汉(Guanghan, Sichuan)	2019.6.10	Y15	四川宜宾(Yibin, Sichuan)	2019.6.15
Y8	四川什邡(Shifang, Sichuan)	2019.6.10	Y16	浙江金华(Jinhua, Zhejiang)	2019.6.20

2 方法

2.1 指标成分含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备

取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、槲皮苷对照品适量,精密称定,加 90% 甲醇溶解、定容,制成质量浓度分别为 0.097 12、0.102 87、0.052 04、

0.095 14、0.141 88 mg/mL 混合对照品溶液,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备

取鲜鱼腥草药材约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 90% 甲醇 50 mL,密塞,称定重量,加热回流 30 分钟,放冷,再称定重量,用 90% 甲醇补足减失的重量,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续

滤液,即得。

2.1.3 色谱条件

Waters ACQUITY HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱;流动相为乙腈(A):0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~7 min, 5%→11% A; 7~10 min, 11%→11.5% A; 10~13 min, 11.5%→20% A; 13~20 min, 20%→25% A);0~13 min 检测波长为326 nm, 13~20 min 检测波长为254 nm;流速0.3 mL/min;柱温30 °C;进样量1 μL。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液适量,分别加90%甲醇稀释2、5、10、20、50倍,摇匀。分别按“2.1.3”项下色谱条件进行分析。以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),绘制各标准曲线,得到线性回归方程和线性范围,结果见表2,新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、槲皮苷在各浓度范围内的线性关系良好。

表2 5种指标成分的标准曲线及线性范围

Table 2 Calibration curves and linear range for 5 constituents

指标成分 Component	线性回归方程 Regression equation	R^2	线性范围 ($\times 10^{-3}$ mg/mL)
新绿原酸 Neochlorogenic acid	$Y = 10.841X - 7.119.3$	0.999 1	1.94~48.56
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y = 9.997.2X + 1.396.6$	0.999 5	2.06~51.44
隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	$Y = 10.431X - 3.332.9$	0.999 2	1.04~26.02
金丝桃苷 Hyperoside	$Y = 9.356.9X + 5.005.7$	0.999 3	1.90~47.57
槲皮苷 Quercetin	$Y = 10.578X + 8.313.2$	0.999 4	2.84~70.94

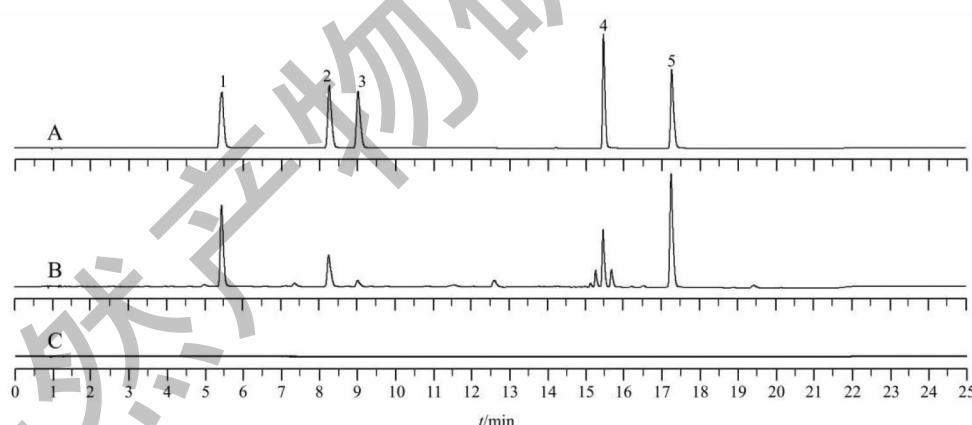


图1 混合对照品(A)、鲜鱼腥草药材样品(B)、阴性对照(C)的UPLC色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed reference substance(A), sample of fresh *H. cordata* (B) and the negative control (C)
注:1. 新绿原酸;2. 绿原酸;3. 隐绿原酸;4. 金丝桃苷;5. 槲皮苷。Note:1. Neochlorogenic acid;2. Chlorogenic acid;3. Cryptochlorogenic acid;
4. Hyperoside;5. Quercetin.

2.1.4.2 精密度试验

取Y1号样品按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件,连续进样6次,计算5种化合物峰面积RSD值,分别为0.45%、0.56%、1.38%、0.54%、0.54%,表明仪器精密度良好。

2.1.4.3 稳定性试验

取Y1号样品按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件,分别在制备后0、2、4、8、16、24 h进行检测,计算5种化合物峰面积RSD值,分别为1.27%、1.67%、2.62%、1.46%、1.47%,表明样品在24 h内稳定性良好。

2.1.4.4 重复性试验

分别取 Y1 号样品 6 份,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.1.3”项下色谱条件,分别进样检测,计算 5 种化合物含量的 RSD 值,分别为 1.99%、2.99%、2.36%、2.19%、2.94%,表明重复性良好。

2.1.4.5 加样回收率试验

取 Y1 号样品 6 份,每份为 1.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入一定量的对照品溶液,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件进样检测,计算 5 种成分的加样回收率,平均回收率依次为 97.22%、99.15%、97.43%、100.96%、97.03%,RSD 分别为 3.78%、3.51%、4.38%、3.24%、3.15%,表明回收率良好。

2.2 特征图谱建立

2.2.1 对照品溶液的制备

同“2.1.1”项下。

2.2.2 供试品溶液的制备

同“2.1.2”项下。

2.2.3 色谱条件

同“2.1.3”项下。

2.2.4 质谱条件

氮气作为质谱离子源的雾化、锥孔气;电喷雾电离正离子模式;毛细管电压:3.0 kV;锥孔电压:25 V;离子源温度:100 ℃;脱溶剂气温度:300 ℃;脱溶剂气流速:800 L/h;扫描时间:0.5 s;扫描时间间隔:0.02 s;扫描范围 m/z 100~600。

2.2.5 方法学考察

2.2.5.1 精密度试验

取 Y1 号样品按照“2.2.2”项下方法制备供试

品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件,连续进样 6 次,以绿原酸(2 号峰)作为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间 RSD 在 0.00%~0.65% 范围内,相对峰面积 RSD 在 0.11%~1.00% 范围内,表明仪器精密度良好。

2.2.5.2 稳定性试验

取 Y1 号样品按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件,分别在制备后 0、2、4、8、16、24 h 进行检测,以绿原酸(2 号峰)作为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间 RSD 在 0.05%~0.60% 范围内,相对峰面积 RSD 在 0.31%~1.14% 范围内,表明稳定性良好。

2.2.5.3 重复性试验

分别取 Y1 号样品 6 份,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.2.3”项下色谱条件,分别进样检测,以绿原酸(2 号峰)作为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间 RSD 在 0.05%~0.12% 范围内,相对峰面积 RSD 在 0.94%~2.58% 范围内,表明重复性良好。

3 结果与分析

3.1 样品含量测定

取 16 批鲜鱼腥草药材,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件进样检测,测定各批鲜鱼腥草药材新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、槲皮苷的含量。结果表明不同批次的鲜鱼腥草药材中 5 种化合物的含量均有不同程度的差异。

表 3 16 批鲜鱼腥草药材中 5 种指标成分的含量

Table 3 Contents of 5 indicative compounds in 16 batches of fresh *H. cordata*

编号 No.	含量 Content (mg/g)				
	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	金丝桃苷 Hyperoside	槲皮苷 Quercetin
Y1	0.176	0.080	0.025	0.170	0.720
Y2	0.633	0.181	0.033	0.177	0.410
Y3	0.370	0.127	0.125	0.344	0.388
Y4	0.486	0.151	0.052	0.162	0.624
Y5	0.716	0.269	0.035	0.325	1.266
Y6	0.758	0.232	0.035	0.233	0.942
Y7	0.711	0.222	0.036	0.330	1.095

续表3(Continued Tab. 3)

编号 No.	含量 Content (mg/g)				
	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	金丝桃苷 Hyperoside	槲皮苷 Quercetin
Y8	0.359	0.109	0.024	0.157	0.607
Y9	0.535	0.163	0.025	0.172	0.869
Y10	0.407	0.111	0.041	0.170	0.745
Y11	0.599	0.191	0.038	0.420	1.210
Y12	0.246	0.127	0.064	0.255	0.311
Y13	0.388	0.128	0.048	0.320	0.644
Y14	0.351	0.118	0.051	0.229	0.540
Y15	0.267	0.065	0.025	0.292	0.556
Y16	0.431	0.534	0.338	0.522	0.615

3.2 特征图谱的建立及共有峰的鉴定

取16批鲜鱼腥草药材,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样检测,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012

版”软件对16批鲜鱼腥草药材UPLC特征图谱进行数据处理,建立鲜鱼腥草药材的对照特征图谱(如图2所示),确定共有峰7个,其中采用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-MS)以及与对照品对照

表4 基于UPLC-MS的鲜鱼腥草特征图谱共有峰的归属
Table 4 Common peaks inferred in fresh *H. cordata* by UPLC-MS

峰号 Peak	t_R (min)	分子式 Molecular formula	[M-H] ⁻ (m/z)	主要碎片离子 Major fragment ion	化合物 Compound
1	5.59	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.17	163.06, 205.25, 206.10, 355.10	新绿原酸 Neochlorogenic acid
2	8.54	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.17	163.13, 214.03, 291.00, 354.91, 355.10	绿原酸 Chlorogenic acid
3	9.30	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.10	163.06, 214.29, 217.54, 354.91, 355.10	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid
5	15.59	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.10	116.12, 214.03, 303.09, 464.97, 465.17	金丝桃苷 Hyperoside
7	17.56	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.17	109.95, 213.90, 302.77, 302.90, 449.24	槲皮苷 Quercetin

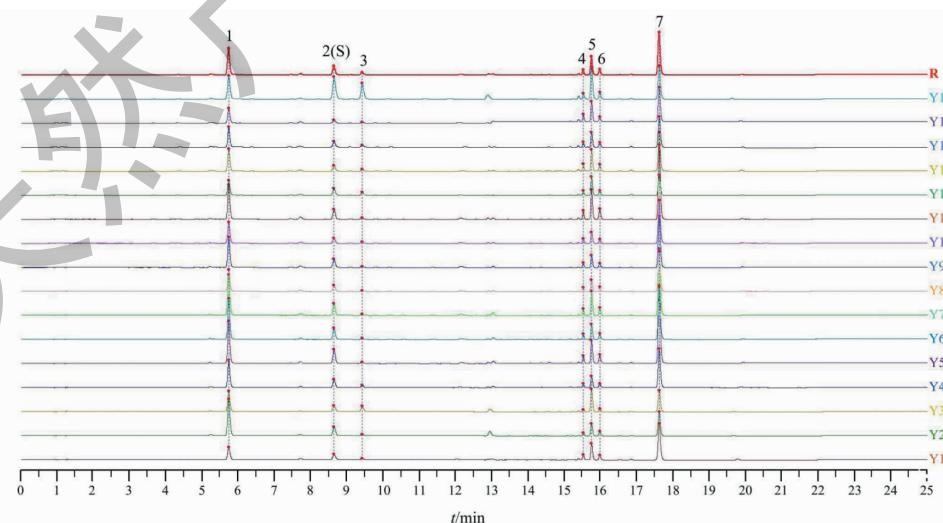


图2 16批鲜鱼腥草叠加UPLC特征图谱

Fig. 2 UPLC characteristic chromatograms of 16 batches of fresh *H. cordata*

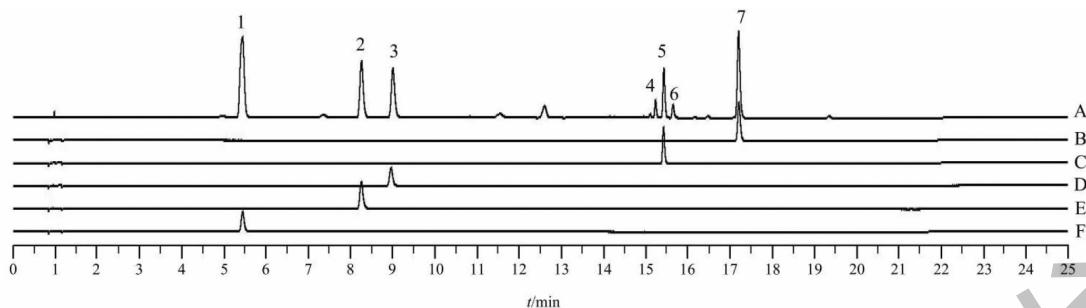


图 3 鲜鱼腥草药材 UPLC 特征图谱

Fig. 3 UPLC characteristic chromatograms of fresh *H. cordata*

注: A. 鲜鱼腥草药材; B. 槲皮苷; C. 金丝桃苷; D. 隐绿原酸; E. 绿原酸; F. 新绿原酸。Note: A. Fresh *H. cordata*; B. Quercetin; C. Hyperoside; D. Catecholchlorogenic acid; E. Chlorogenic acid; F. Neochlorogenic acid.

指认了 1、2、3、5、7 号峰分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、槲皮苷。以绿原酸(2 号峰)作为峰 1、峰 3 的参照峰 S1, 金丝桃苷(5 号峰)作为峰 4、峰 6、峰 7 的参照峰 S2, 分别计算各共有峰的保留时间和相对峰面积, 结果见表 5 和 6。

共有峰相对保留时间和相对峰面积的结果显

示, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 值范围为 0.00% ~ 0.76%, 说明 7 个共有峰在不同鲜鱼腥草样品间的重现性较好, 建立的 UPLC 特征图谱方法较为稳定可行; 各色谱峰的相对峰面积的 RSD 值范围为 17.82% ~ 66.73%, 波动范围较大, 说明不同产地鲜鱼腥草中各成分含量存在差异。

表 5 鲜鱼腥草药材共有峰相对保留时间

Table 5 The relative retention time of co-existing peaks of fresh *H. cordata*

编号 No.	峰 1 Peak 1	峰 2 Peak 2 (S1)	峰 3 Peak 3	峰 4 Peak 4	峰 5 Peak 5 (S2)	峰 6 Peak 6	峰 7 Peak 7
Y1	0.67	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.12
Y2	0.66	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.11
Y3	0.65	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.11
Y4	0.66	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.11
Y5	0.66	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.12
Y6	0.66	1.00	1.09	0.98	1.00	1.01	1.12
Y7	0.66	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.12
Y8	0.66	1.00	1.09	0.98	1.00	1.01	1.12
Y9	0.66	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.12
Y10	0.66	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.11
Y11	0.66	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.12
Y12	0.66	1.00	1.09	0.98	1.00	1.01	1.12
Y13	0.67	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.12
Y14	0.67	1.00	1.09	0.98	1.00	1.01	1.12
Y15	0.66	1.00	1.09	0.98	1.00	1.01	1.12
Y16	0.66	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.11
均值 Average	0.66	1.00	1.09	0.99	1.00	1.01	1.12
RSD(%)	0.76	0.00	0.00	0.49	0.00	0.00	0.43

表 6 鲜鱼腥草药材共有峰相对峰面积

Table 6 The relative peak area of co-possessing peaks of fresh *H. cordata*

编号 No.	峰 1 Peak 1	峰 2 Peak 2 (S1)	峰 3 Peak 3	峰 4 Peak 4	峰 5 Peak 5 (S2)	峰 6 Peak 6	峰 7 Peak 7
Y1	2.064	1.000	0.247	0.266	1.000	0.290	3.003
Y2	3.678	1.000	0.137	0.218	1.000	0.391	2.668
Y3	3.613	1.000	0.171	0.307	1.000	0.435	4.791
Y4	3.889	1.000	0.259	0.265	1.000	0.414	4.993
Y5	2.732	1.000	0.101	0.277	1.000	0.380	4.475
Y6	3.230	1.000	0.116	0.322	1.000	0.410	4.602
Y7	3.162	1.000	0.121	0.243	1.000	0.334	3.625
Y8	3.149	1.000	0.130	0.312	1.000	0.401	4.464
Y9	3.390	1.000	0.104	0.323	1.000	0.366	5.714
Y10	3.458	1.000	0.259	0.330	1.000	0.349	4.277
Y11	3.153	1.000	0.154	0.258	1.000	0.367	3.305
Y12	2.055	1.000	0.478	0.215	1.000	0.265	1.429
Y13	3.281	1.000	0.353	0.277	1.000	0.314	2.381
Y14	2.909	1.000	0.393	0.293	1.000	0.327	2.673
Y15	4.071	1.000	0.198	0.312	1.000	0.241	2.181
Y16	0.915	1.000	0.689	0.149	1.000	0.218	1.384
均值 Average	3.047	1.000	0.244	0.273	1.000	0.344	3.498
RSD(%)	26.12	0.00	66.73	17.82	0.00	18.75	37.59

3.3 鲜鱼腥草特征图谱的效果评价

3.3.1 相似度评价

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”软件计算 16 批鲜鱼腥草药材之间以及相对于对照特征图谱(R)的相似度。结果显示,16 批鲜鱼

腥草样品间的相似度介于 0.798 ~ 0.999 之间;除 Y16 样品外,其余批次鲜鱼腥草药材样品相对于对照特征图谱的相似度均 >0.900,说明鲜鱼腥草药材样品与对照特征图谱间的相似度较好。

表 7 鲜鱼腥草特征图谱相似度评价

Table 7 Similarity analysis of characteristic chromatograms of fresh *H. cordata*

编号 No.	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	Y16	R
Y1	1.000	0.798	0.899	0.955	0.982	0.943	0.976	0.982	0.971	0.984	0.995	0.935	0.985	0.980	0.990	0.854	0.978
Y2	0.798	1.000	0.916	0.932	0.881	0.945	0.904	0.879	0.891	0.857	0.847	0.897	0.881	0.899	0.822	0.827	0.906
Y3	0.899	0.916	1.000	0.933	0.911	0.928	0.932	0.910	0.902	0.895	0.914	0.989	0.953	0.955	0.927	0.942	0.949
Y4	0.955	0.932	0.933	1.000	0.992	0.999	0.996	0.991	0.994	0.985	0.977	0.943	0.979	0.988	0.951	0.866	0.994
Y5	0.982	0.881	0.911	0.992	1.000	0.987	0.998	1.000	0.998	0.998	0.994	0.935	0.986	0.990	0.972	0.851	0.994
Y6	0.943	0.945	0.928	0.999	0.987	1.000	0.992	0.986	0.990	0.978	0.969	0.938	0.972	0.983	0.942	0.855	0.989
Y7	0.976	0.904	0.932	0.996	0.998	0.992	1.000	0.998	0.996	0.993	0.992	0.950	0.991	0.995	0.974	0.861	0.998
Y8	0.982	0.879	0.910	0.991	1.000	0.986	0.998	1.000	0.998	0.998	0.995	0.933	0.987	0.991	0.974	0.844	0.994
Y9	0.971	0.891	0.902	0.994	0.998	0.990	0.996	0.998	1.000	0.997	0.988	0.920	0.978	0.984	0.960	0.832	0.990
Y10	0.984	0.857	0.895	0.985	0.998	0.978	0.993	0.998	0.997	1.000	0.995	0.919	0.982	0.985	0.973	0.828	0.988

续表 7(Continued Tab. 7)

编号 No.	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	Y16	R
Y11	0.995	0.847	0.914	0.977	0.994	0.969	0.992	0.995	0.988	0.995	1.000	0.942	0.993	0.991	0.990	0.849	0.991
Y12	0.935	0.897	0.989	0.943	0.935	0.938	0.950	0.933	0.920	0.919	0.942	1.000	0.974	0.973	0.956	0.948	0.966
Y13	0.985	0.881	0.953	0.979	0.986	0.972	0.991	0.987	0.978	0.982	0.993	0.974	1.000	0.998	0.992	0.885	0.995
Y14	0.980	0.899	0.955	0.988	0.990	0.983	0.995	0.991	0.984	0.985	0.991	0.973	0.998	1.000	0.984	0.894	0.999
Y15	0.990	0.822	0.927	0.951	0.972	0.942	0.974	0.974	0.960	0.973	0.990	0.956	0.992	0.984	1.000	0.853	0.977
Y16	0.854	0.827	0.942	0.866	0.851	0.855	0.861	0.844	0.832	0.828	0.849	0.948	0.885	0.894	0.853	1.000	0.890
R	0.978	0.906	0.949	0.994	0.994	0.989	0.998	0.994	0.990	0.988	0.991	0.966	0.995	0.999	0.977	0.890	1.000

3.3.2 聚类分析

将 16 批鲜鱼腥草药材特征图谱中的 7 个共有峰的峰面积相对于称样量进行量化(峰面积/称样量),形成 7×16 阶数据矩阵,导入 SPSS 20.0 软件,以离均差平方和法(Ward's method)为聚类方法、欧氏距离平方法(squared Euclidean distance)为测量距离方法,进行聚类分析。聚类结果如图 4 所示。

16 批鲜鱼腥草大致可聚为 3 类。广东(Y1 和

Y2)、湖北(Y3)、四川彭州(Y4)、什邡(Y6、Y8、Y9)、宜宾(Y12、Y13、Y14、Y15)等地的鲜鱼腥草基本可聚为一类;四川广汉(Y5 和 Y7)、绵阳(Y10、Y11)的鲜鱼腥草可聚为一类;浙江金华(Y16)的鲜鱼腥草单独聚为一类。结果表明,同一产地不同居群的鲜鱼腥草药材质量较为一致,不同产地鲜鱼腥草药材质量存在一定差异。

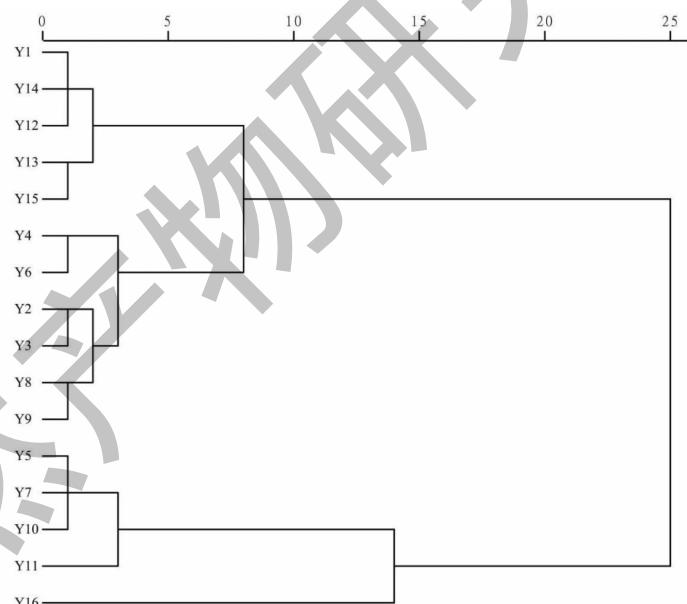


图 4 鲜鱼腥草药材特征图谱聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of characteristic chromatograms of fresh *H. cordata*

3.3.3 主成分分析

利用 SPSS 20.0 软件对量化后的共有峰峰面积(峰面积/称样量)进行数据标准化处理,标准化后数据见表 8。对 16 批鲜鱼腥草药材的 7 个共有峰进行主成分分析,计算相关矩阵的方差和特征值,结果见表 9、表 10。前 3 个因子累计方差贡献率达到

95.797%,特征根大于 1,可以代表鲜鱼腥草药材特征图谱中 7 个共有峰的大部分信息。

对主成分载荷值进行计算,得出各主成分的线型模型,各主成分解析表达式分别为 $F_1 = 0.131ZX_{1+} + 0.189ZX_2 + 0.112ZX_3 + 0.214ZX_4 + 0.233ZX_5 + 0.256ZX_6 + 0.209ZX_7$; $F_2 = -0.210ZX_1$

表 8 数据标准化

Table 8 Data standardization

编号 No.	Peak 1 (ZX ₁)	Peak 2 (ZX ₂)	Peak 3 (ZX ₃)	Peak 4 (ZX ₄)	Peak 5 (ZX ₅)	Peak 6 (ZX ₆)	Peak 7 (ZX ₇)
Y1	-1.43	-0.81	-0.33	-0.41	-0.35	-0.77	-0.52
Y2	0.55	-0.11	-0.37	-1.62	-1.02	-0.82	-1.26
Y3	0.59	-0.05	-0.27	-1.17	-1.21	-0.84	-0.45
Y4	1.27	0.20	0.03	-0.84	-0.69	-0.19	0.38
Y5	0.91	0.82	-0.33	1.02	0.66	1.36	1.80
Y6	0.80	0.32	-0.35	-0.03	-0.53	0.02	0.36
Y7	0.85	0.40	-0.32	0.74	0.90	1.08	1.20
Y8	-0.75	-0.72	-0.48	-0.86	-1.02	-0.76	-0.35
Y9	-0.05	-0.34	-0.48	-0.71	-0.99	-0.94	0.33
Y10	1.69	0.75	0.21	1.11	0.17	0.38	1.00
Y11	0.30	0.02	-0.30	1.97	1.71	2.57	1.63
Y12	-1.31	-0.67	0.09	-0.72	-0.09	-0.74	-1.51
Y13	-0.72	-0.75	-0.14	0.71	0.42	0.30	-0.43
Y14	-0.96	-0.77	-0.10	-0.28	-0.48	-0.60	-0.85
Y15	-1.28	-1.29	-0.52	1.05	0.29	-0.64	-0.69
Y16	-0.46	2.98	3.67	0.04	2.22	0.58	-0.64

表 9 主成分特征值及方差

Table 9 Eigenvalue and total variance of principal component

成份 Component	特征根值 Characteristic root value	方差贡献率 Variance contribution(%)	累积贡献率 Cumulative variance contribution(%)
1	3.634	51.909	51.909
2	1.807	25.809	77.718
3	1.266	18.079	95.797

表 10 主成分载荷及得分系数矩阵

Table 10 Principal component load matrix and scores

共有峰 Common peak	载荷 Load matrix			得分系数 Scoring coefficient		
	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2	主成分 3 Principal component 3	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2	主成分 3 Principal component 3
新绿原酸 Neochlorogenic acid	0.476	-0.379	0.766	0.131	-0.210	0.605
绿原酸 Chlorogenic acid	0.687	0.546	0.465	0.189	0.302	0.368
隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	0.407	0.899	0.103	0.112	0.498	0.081
峰 4 Peak 4	0.778	-0.290	-0.494	0.214	-0.160	-0.391
金丝桃苷 Hyperoside	0.847	0.334	-0.393	0.233	0.185	-0.311

续表 10 (Continued Tab. 10)

共有峰 Common peak	载荷 Load matrix			得分系数 Scoring coefficient		
	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2	主成分 3 Principal component 3	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2	主成分 3 Principal component 3
峰 6 Peak 6	0.932	-0.200	-0.151	0.256	-0.111	-0.119
槲皮素 Quercetin	0.761	-0.567	0.173	0.209	-0.314	0.137

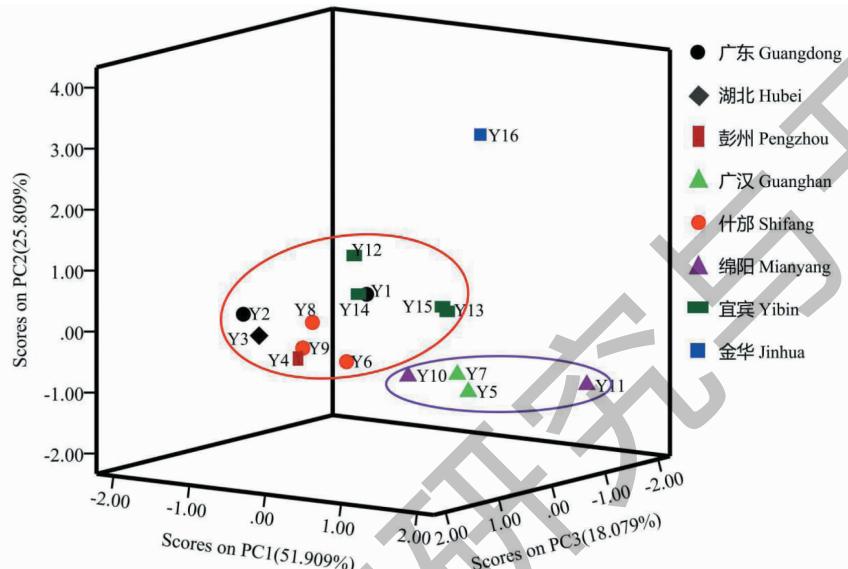


图 5 16 批鲜鱼腥草主成分得分散点图

Fig. 5 3D score scatter plot of 16 batches of fresh *H. cordata*

+ 0.302ZX₂ + 0.498ZX₃ - 0.160ZX₄ + 0.185ZX₅ - 0.111ZX₆ - 0.314ZX₇; F3 = 0.605ZX₁ + 0.368ZX₂ + 0.081ZX₃ - 0.391ZX₄ - 0.311ZX₅ - 0.119ZX₆ + 0.137ZX₇; 主成分综合得分函数 F = (51.909% × F1 + 25.809% × F2 + 18.079% × F3) / 95.797%, 各批次综合得分结果见表 11。

主成分得分结果显示,根据主成分分析基本可将不同产地种植的鲜鱼腥草分为 3 大类。浙江金华的鲜鱼腥草(Y16)单独分为一类;广东(Y1 和 Y2)、湖北(Y3)、四川彭州(Y4)、什邡(Y6、Y8、Y9)、宜宾(Y12、Y15、Y14、Y15)的鲜鱼腥分为一类;四川广汉(Y5 和 Y7)、绵阳(Y10 和 Y11)的鲜鱼腥草分为一类。由此可见,相同产地不同居群的鲜鱼腥草均聚在同一类,16 批鲜鱼腥草主成分分析与聚类分析描述的结果基本一致。

利用主成分综合得分函数计算 16 批鲜鱼腥草的综合得分,结果显示浙江金华种植鲜鱼腥草综合得分远高于其他产地,其次是四川彭州、广汉、绵阳

等地,广东、湖北、四川宜宾的鲜鱼腥草综合得分较低,说明不同产地鲜鱼腥草的质量存在较大的差异。

4 讨论

本研究建立了鲜鱼腥草药材质量综合评价的方法,在同一色谱条件下,在 20 min 内同时完成了鲜鱼腥草 5 种指标成分含量及特征图谱的测定,极大的缩短了检测时间,降低了分析成本,对于样品的高通量分析具有显著优势,便于推广使用。

本研究分别考察了提取溶剂(50% 甲醇、90% 甲醇、甲醇、70% 乙醇、乙醇)、提取方式(加热回流提取、超声提取)及提取时间(15、30、45、60 min),对鲜鱼腥草药材中 5 种指标成分提取效率以及特征图谱的影响,结果表明,加入 90% 甲醇回流提取 30 min,提取效率高、效果好。

本研究分别考察了乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.2% 醋酸水溶液 3 个不同的流动相系统,结果发现采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相,各色谱峰分离效果最好。利用 PDA

表 11 16 批鲜鱼腥草药材综合得分情况
Table 11 Comprehensive scores of 16 batches of fresh *H. cordata*

编号 No.	主成分得分 Principal component score			综合得分 Comprehensive score
	F1	F2	F3	
Y1	-0.852	0.142	-0.904	-0.594
Y2	-1.046	0.228	1.139	-0.290
Y3	-0.804	-0.076	1.189	-0.232
Y4	-0.101	-0.284	1.460	0.145
Y5	1.334	-0.863	0.304	0.548
Y6	0.077	-0.453	0.801	0.071
Y7	1.047	-0.668	0.102	0.406
Y8	-0.977	-0.156	-0.062	-0.583
Y9	-0.678	-0.399	0.547	-0.372
Y10	0.970	-0.531	0.918	0.556
Y11	1.829	-1.002	-1.219	0.491
Y12	-0.968	0.775	-0.837	-0.474
Y13	-0.014	-0.080	-1.224	-0.260
Y14	-0.787	0.208	-0.658	-0.495
Y15	-0.487	-0.203	-1.809	-0.660
Y16	1.457	3.362	0.254	1.743

检测器对供试品溶液进行全波长扫描,并结合已有的文献研究^[6,13,14],分别在254、326、280 nm以及程序波长(0~13 min为326 nm,13~25 min为254 nm)下采集供试品溶液的色谱图,对采集的色谱图进行比较。结果表明,采用程序波长检测方式,色谱峰峰型好,且主要色谱峰吸收强度高,因此选择程序波长检测方式。

目前,特征图谱相似度评价法、欧氏距离聚类分析法和主成分分析法等化学模式识别方法在中药材质量、产地差异以及品种鉴别等研究领域的应用已较为广泛^[15-17]。本研究引入特征图谱相似度分析、聚类分析以及主成分分析,可以直观衡量不同产地鲜鱼腥草样品间特征图谱变化模式的相似性及亲疏程度。鱼腥草广泛分布在我国南方诸省,市场上以四川、重庆、湖北等地的鱼腥草较为常见,多成分含量测定及特征图谱结果均显示不同产地的鲜鱼腥草药材存在一定差异,引入主成分综合得分函数,可直观且客观地判断各产地鲜鱼腥草药材的整体质量。本研究通过对特征图谱数据进行聚类分析和主成分分析,可将16批鲜鱼腥草分为3类,主成分综合得分结果表明浙江金华种植的鲜鱼腥草质量最优。因

此,利用本研究开发的鲜鱼腥草UPLC特征图谱及多指标成分测定的方法,结合综合质量评价函数,可以更全面、直观地评估各产地鲜鱼腥草的质量,规范鲜鱼腥草药材的质量控制。

本研究旨在建立鲜鱼腥草UPLC特征图谱及5种指标成分含量测定的方法,同时结合相关化学识别模式构建鲜鱼腥草药材质量综合评价函数,为鲜鱼腥草质量评价和控制提供参考。由于鱼腥草新鲜样品采集和存储存在一定的困难,本研究收集的鲜鱼腥草样品未能覆盖全国各地,因此关于各产区鲜鱼腥草药材质量评价的结果是否具有更广泛的代表性,还有待于后续进一步扩大样本量系统深入的研究。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 224.
- 2 Zheng YJ, Peng QS, Ma YQ, et al. Research progress on chemical constituents of *Houttuynia cordata* [J]. J Guang-

- dong Chem Ind(广东化工),2017,44(17):85-86.
- 3 Li LH. Determination of chlorogenic acid and rutin in different parts of *Houttuynia cordatas* by HPLC[J]. China J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2012,18(19):94-97.
- 4 Yin XH, Jin HT, Tan LW, et al. Determination of quercitrin in *Houttuyniae herba* from different producing areas[J]. Chin J Inform Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志),2016,23(12):78-80.
- 5 Ma P, Xu LJ, Liu YZ, et al. Studies on the UPLC fingerprint and quality evaluation of crude drug of *Polygonum cuspidatum*[J]. China J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2012,18(2):72-76.
- 6 Li ZH, Hu SY, Yu QB, et al. Study on HPLC fingerprint of fresh *Houttuynia cordata*[J]. J Gansu Univ Tradit Chin Med (甘肃中医药大学学报),2016,33(6):38-42.
- 7 Chen J, Wang GL, Yao LW, et al. Recent application of ultra performance liquid chromatography (UPLC) in pharmaceutical analysis [J]. China J Pharm Anal (药物分析杂志),2008,28:1976-1981.
- 8 Feng XL, Li CY, Li S, et al. Identification, HPLC fingerprinting and multi-component determination of *Heremocallis citrina*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:444-450.
- 9 Zhang YH, Pan FH, He BJ, et al. HPLC fingerprint and contents of three kinds of alkaloids of *Sophora davidii*(Franch.) Skeels[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:797-802.
- 10 Liu XX, Xia ZT, He Y, et al. Simultaneous analysis on index compounds and fingerprint analysis on *Polygalae Radix* by ultra performance liquid chromatography [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2016,47:2167-2174.
- 11 Wang DD, Yan Y, Zhang FS, et al. Establishment for methods of fingerprint analysis and determination of index compounds on commercial *Polygala tenuifolia* by ultra performance liquid chromatography[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2018,49:1150-1159.
- 12 Zhao Q, Chen YP, Cui YS, et al. Study on multi-compound determination and fingerprint of *Rheum palmatum* by ultra performance liquid chromatography[J]. China J Pharm Anal (药物分析杂志),2018,38:1697-1709.
- 13 Meng J, Zhou YS, Zhao ZZ, et al. Simultaneous quantitative determination of eight bioactive components in different parts of fresh *Houttuynia cordata* by HPLC [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报),2007,38:516-518.
- 14 He B, Liu Y, Li CH, et al. Simultaneous determination of six active constituent in different parts of *Houttuyniae Herba* by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药),2013,43:2160-2164.
- 15 Zhu XL, Zhang DW, Xie CX, et al. Analysis of chemical quality characteristics of *Ligustrum Lucidi Fructus* from different producing areas[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:1498-1505.
- 16 Xie LLF, Shi MM, Gong XH, et al. The main components and methanol extracts HPLC fingerprint of *Dendrobium officinale* from different areas[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:1181-1187.
- 17 Tan J, Li LY, Wang JR, et al. Study on quality evaluation of *Flos Sophorae Immaturus*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:2166-2174.

(上接第 1029 页)

- 16 Wang HX. New Food Resources (食品新资源)[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2002:177.
- 17 Tsai SY, Tsai HL, Mau JL. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*[J]. Food Chem, 2008,107:977-983.
- 18 Li XB, Zhou F, Yang Y, et al. Effect of culture media on nutritional value of proteins in *Pleurotus eryngii* fruit bodies [J]. Food Sci(食品科学),2015,36(23):262-267.
- 19 Chen XW, Cheng YJ, Fan HA, et al. Amino acid composition analysis and protein nutrition evaluation of strawberry jiaosu during fermentation process[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2018,39(19):64-70.
- 20 Wen L, Zhen G, Yan Y, et al. Non-volatile taste components of several cultivated mushrooms [J]. Food Chem, 2014, 143: 427-431.
- 21 Fei P, Ying S, Gao XY, et al. Changes in non-volatile taste components of button mushroom (*Agaricus bisporus*) during different stages of freeze drying and freeze drying combined with microwave vacuum drying[J]. Food Chem, 2014, 165: 547-554.