

基于 UPLC 的梅花多成分含量测定及不同花期的质量分析

梁月仪, 吕渭升, 黄爽,
杨洁, 侯栩轩, 陈志鹏, 夏天睿, 何广铭*

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:为了比较不同花期梅花药材质量的差异,采集了45批不同花期的梅花药材,采用UPLC法建立了一种同时测定梅花药材中9个成分含量的方法,在此基础上结合化学计量学分析,通过聚类分析(cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法-判别式分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)等对45批梅花药材进行不同花期鉴别和分类。研究结果显示:所建立的方法能够使样品中的各指标成分达到良好分离,新绿原酸、绿原酸等酚酸类成分含量随着生长期的增长而减少;而金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁、槲皮素-3-O-新橙皮苷等黄酮类成分则是盛花期含量高于其他时期。从HCA和PCA分析中可发现45批梅花样品可明显区分为2类,从OPLS-DA分析结果可得出新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸是区分不同生长期贡献较大的3种成分,可作为指导梅花药材质量控制的关键成分,从而进一步对三种花期进行区分。由此可见,本研究建立的UPLC方法准确度良好,结合化学计量分析,该方法可用于区分不同花期梅花药材质量的差异性,为其质量控制提供参考。

关键词:梅花;花期;化学计量学;多成分含量测定

中图分类号:R282.4

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)3-0388-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.3.003

Multicomponent content determination and quality analysis of Mume Flos at different flowering stages based on UPLC

LIANG Yue-yi, LYU Wei-sheng, HUANG Shuang,
YANG Jie, HOU Xu-xuan, CHEN Zhi-peng, XIA Tian-rui, HE Guang-ming*

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

Abstract: In order to compare the quality differences of Mume Flos at different flowering stages, 45 batches of Mume Flos at different growth and flowering stages were collected. UPLC method was used to establish a method for simultaneous determination of nine components in Mume Flos. On this basis, combined with stoichiometric analysis, 45 batches of Mume Flos were identified and classified by cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The results showed that the established method could achieve good separation of each index component in the sample, and the content of phenolic acids such as neochlorogenic acid and chlorogenic acid decreases with the increase of growth period. The contents of flavonoids such as hypericin, isoquercetin, rutin, quercetin-3-O-neohesperidin were higher in the full flowering period than in other periods. According to HCA and PCA analysis, 45 batches of Mume Flos samples can be clearly divided into two categories. According to PLS-DA analysis results, it could be concluded that neochlorogenic acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid were the three components that contribute significantly to distinguish different growth stages, and could be used as the key components to guide the quality control of Mume Flos, so as to further distinguish the three flowering stages. It can be seen that the UPLC method established in this study has good accuracy.

收稿日期:2023-07-28 接受日期:2024-01-16

基金项目:国家工业和信息化部2022年产业技术基础公共服务平台项目(2022-230-221);2022年佛山市南海区重点领域科技攻关专项(2023-20-18)

*通信作者 Tel:86-013828489762; Email:hgm1229@126.com

Combined with stoichiometric analysis, the method can be used to distinguish the quality differences of Mume Flos at different flowering stages and provide references for their quality control.

Key words: Mume Flos; flowering stages; chemometrics; multicomponent determination

梅在我国的栽培历史深远悠久,品种复杂繁多,为多年生小乔木或灌木,其花和果实等部位均可作药用。梅花为我国传统花类药材之一,据《本草纲目》记载:梅花性平,微酸,归肝、胃、肺经,收载于《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》),来源为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb. et Zucc.) Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾^[1]。具有疏肝和中、化痰散结的功效,常用于治疗梅核气,肝胃气痛、郁闷心烦,食欲不佳,瘰疬疮毒。梅在我国各地区均有栽培,而药用梅花的道地产区主要为江苏、浙江、安徽等地^[2]。

目前已有约上百种化学成分可从梅花中分离得出,主要为挥发性成分、黄酮类、酚酸类、酰化类产物、酚苷类成分和醇苷类成分;其中酚酸类及黄酮类成分具有多方面药理活性,例如抗菌、抗炎、抗氧化、抑制黑色素生成等,是梅花药理活性的主要物质基础^[3]。现行版《中国药典》规定的含量测定指标有绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷三种成分,Zheng 等^[4]则以梅花中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素共 6 种成分的含量进行质量控制,但对其他黄酮类成分的含量尚未见报道,目前针对梅花的质量控制研究仍较为匮乏。

鉴于酚酸类、黄酮类均为梅花发挥药效的基础物质,本研究基于对文献的调查,分别选取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸 3 种酚酸类代表性成分和金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁、槲皮素-3-O-新橙皮苷、水仙苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷 6 种黄酮类代表性成分^[5]作为质量控制指标,建立了同时测定梅花药材中 9 个指标成分 UPLC 含量测定方法,收集 45 批梅花药材,分为花蕾期、盛花期、末花期 3 类样品进行测定,并对其化学成分含量的差异进行比较分析^[3]。

因梅花化学成分较复杂,难以通过单一成分变化对药材质量作出评价,而本研究中可通过同时测定多类活性成分反映不同时期含量变化而推测质量变化趋势。根据历代本草中记载,梅花含苞未放者与花开者质量存在差异,但目前暂未有深入报道对不同生长期的质量研究。故对梅花不同花期的质量进行对比研究,对确定梅花的采收期有重要意义。

1 仪器与试药

1.1 仪器

超高效液相色谱仪 (H-class, 美国沃特世公

司);Waters BEH C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) 色谱柱;百万分之一天平 (XP26 型, 瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂和对照品

分析级乙醇和甲醇均购自西陇科学股份有限公司,液相用磷酸、甲醇和乙腈均购自默克股份有限公司,水为超纯水,由实验室自制。

绿原酸(批号:110753-202119,含量:96.3%)、新绿原酸(批号:DSTDX001504,含量:98.0%)、隐绿原酸(批号:DST210520-017,含量:98.0%)对照品(乐美天医药科技有限公司);金丝桃苷(批号:111521-201809,含量:94.9%)、异槲皮苷(批号:111809-201804,含量:97.2%)、水仙苷(批号:111997-201501,含量:93.10%)、芦丁(批号:100080-201811,含量:91.7%)对照品(中国食品药品检定研究院);槲皮素-3-O-新橙皮苷(批号:CFS202002,含量:98.0%)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(批号:CFS202102,含量:98.0%)对照品(ChemFaces 公司)。

1.3 药材

实验所用梅花药材均由广东一方制药有限公司采购管理部于产地采集,经广东一方制药有限公司质量中心检定合格,均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》(一部)“梅花”药材项下规定,且经孙冬梅主任中药师鉴定为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb. et Zucc.) Sieb. et Zucc. 的干燥花,药材产地信息详见表 1,包括花蕾期(bud stage, BS)、盛花期(blooming period, BP)、末花期(final flowering period, FP)3 类样品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

选择 Waters BEH C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) 色谱柱;以甲醇-乙腈(6:1)为流动相 A, 0.3% 磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱(0~10 min, 13% A; 10~11 min, 13%→20% A; 11~30 min, 20% A; 30~43 min, 20%→28% A; 43~53 min, 28%→35% A), 流速为 0.25 mL/min; 柱温为 45 °C; 检测波长为 355 nm; 进样量 1 μL。

表 1 梅花样品信息

Table 1 Sample information of Mume Flos

采收时间 Harvest time	编号 Number	产地 Origin
BS	BS1 ~ BS3	江苏省苏州市
BP	BP1 ~ BP3	
FP	FP1 ~ FP3	
BS	BS4	江苏省镇江市
BP	BP4	
FP	FP4	
BS	BS5、BS6	江苏省宿迁市
BP	BP5、BP6	
FP	FP5、FP6	
BS	BS7 ~ BS9	浙江省湖州市
BP	BP7 ~ BP9	
FP	FP7 ~ FP9	
BS	BS10、BS11	安徽省芜湖市
BP	BP10、BP11	
FP	FP10、FP11	
BS	BS12 ~ BS15	安徽省黄山市
BP	BP12 ~ BP15	
FP	FP12 ~ FP15	

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、槲皮素-3-O-新橙皮苷、金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷对照品适量,加甲醇制成每1 mL含绿原酸140 μg、其他成分各含20 μg的混合溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备

取不同花期的梅花药材粉末(粉碎;过筛用药品筛号为四号筛,目数为65目,筛孔内径为250 μm ± 9.9 μm)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入10%甲醇50 mL,称定重量,加热回流30 min,取出,放冷,再称定重量,用10%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性试验

按照“2.1”项下色谱条件测定混合对照品溶液、梅花样品(FP14)供试品溶液和空白溶剂,结果表明样品中各成分分离度与响应值均较好,且空白样品溶液无干扰(见图1)。

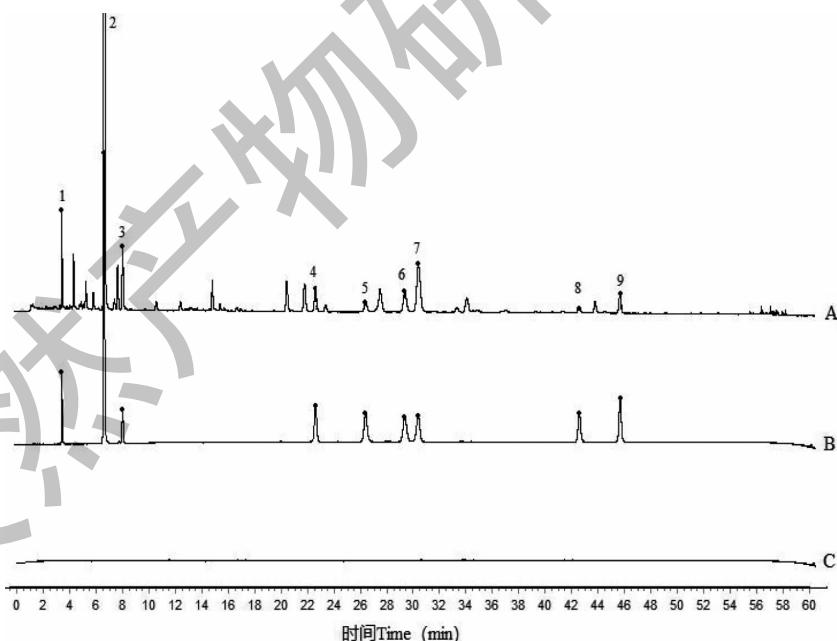


图1 梅花药材中9个成分含量专属性考察图

Fig. 1 Specificity investigation of nine components in Mume Flos

注:A:梅花供试品溶液色谱图;B:混合对照品溶液色谱图;C:空白溶剂色谱图。1:新绿原酸;2:绿原酸;3:隐绿原酸;4:槲皮素-3-O-新橙皮苷;5:金丝桃苷;6:异槲皮苷;7:芦丁;8:山柰酚-3-O-芸香糖苷;9:水仙苷。Note: A: Chromatogram of Mume Flos test sample solution; B: Chromatogram of mixed reference solution; C: Chromatogram of blank solvent. 1: Neochlorogenic acid; 2: Chlorogenic acid; 3: Cryptochlorogenic acid; 4: Quercetin-3-O-neohesperidin; 5: Hyperin; 6: Isoquercitrin; 7: Rutin; 8: Kaempferol-3-O-rutoside; 9: Narcissoside.

2.3.2 线性试验

精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、槲皮素-3-O-新橙皮苷、金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷对照品适量, 制成每1 mL含新绿原酸809.382 μg、绿原酸1 392.113 μg、隐绿原酸10.408 μg、槲皮素-3-O-新橙皮苷110.054 μg、金丝桃苷558.866 μg、异槲皮苷768.074 μg、芦丁390.459 μg、山柰酚-3-O-芸香糖苷112.896 μg和水仙苷110.510 μg的混合对照品贮备溶液。分别精密移取上述对照品贮备溶液0.5、1.0、1.5、2.5、3.0 mL, 分别置5 mL量瓶中, 加甲醇制成每1 mL含新绿原酸0.0809、0.1619、0.2428、0.4047、0.4856、0.8094 μg, 绿原酸0.1392、0.2784、0.4176、0.6961、0.8353、1.3921 μg, 隐绿原酸0.0010、0.0021、0.0031、0.0052、0.0062、0.0104 μg, 槲皮素-3-O-

新橙皮苷0.0110、0.0220、0.0330、0.0550、0.0660、0.1101 μg, 金丝桃苷0.0559、0.1118、0.1677、0.2794、0.3353、0.5589 μg, 异槲皮苷0.0768、0.1536、0.2304、0.3840、0.4608、0.7681 μg, 芦丁0.0395、0.0789、0.1184、0.1973、0.2368、0.3946 μg, 山柰酚-3-O-芸香糖苷0.0113、0.0226、0.0339、0.0564、0.0677、0.1129 μg, 水仙苷0.0111、0.0221、0.0332、0.0553、0.0663、0.1105 μg的混合对照品应用液, 依次精密吸取上述混合对照品贮备液和应用液各1 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积(Y)为纵坐标, 以对照品浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 结果见表2所示, 相关系数r均大于0.9990, 表明各成分在规定的浓度范围内, 峰面积与对照品浓度线性关系良好。

表2 各成分线性考察结果

Table 2 Linear relationship results of various constituents

指标成分 Index component	线性范围 Linear range(μg/mL)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient(r)
新绿原酸 Neochlorogenic acid	0.0809~0.8094	$Y = 9.09 \times 10^6 X + 53.439$	0.9994
绿原酸 Chlorogenic acid	0.1392~1.3921	$Y = 3.52 \times 10^6 X - 21.707$	0.9995
隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	0.0010~0.0104	$Y = 2.84 \times 10^6 X + 85.840$	0.9994
槲皮素-3-O-新橙皮苷 Quercetin-3-O-neohesperidin	0.0110~0.1101	$Y = 4.70 \times 10^6 X + 1.103.9$	0.9999
金丝桃苷 Hyperin	0.0559~0.5589	$Y = 7.60 \times 10^6 X - 21.279$	0.9995
异槲皮苷 Isoquercitrin	0.0768~0.7681	$Y = 9.52 \times 10^6 X - 17.453$	0.9995
芦丁 Rutin	0.0395~0.3946	$Y = 5.31 \times 10^6 X + 3.610.2$	0.9998
山柰酚-3-O-芸香糖苷 Kaempferol-3-O-rutoside	0.0113~0.1129	$Y = 5.81 \times 10^6 X + 1.207.3$	0.9999
水仙苷 Narcissoside	0.0111~0.1105	$Y = 4.87 \times 10^6 X + 543.18$	0.9991

2.3.3 稳定性试验

取同一份梅花样品(FP14), 分别于样品制备后的0、2、4、8、12、18、24 h进样, 按“2.1”项下色谱条件测定, 结果梅花样品溶液中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁、槲皮素-3-O-新橙皮苷、水仙苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷峰面积RSD值分别为2.0%、2.7%、3.0%、1.8%、2.7%、2.8%、2.0%、1.4%、0.46%, 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验

取同一份梅花样品(FP14)约0.5 g, 精密称定,

按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液6份, 按“2.1”项下色谱条件测定, 结果梅花样品溶液中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁、槲皮素-3-O-新橙皮苷、水仙苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷含量的RSD值分别为0.24%、0.45%、2.6%、2.8%、0.76%、2.5%、1.8%、1.7%、2.0%, 表明重复性良好。

2.3.5 加样回收试验

分别称取6份已知含量的梅花样品(FP14)约0.25 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 分别加入一定量的绿原酸、异槲皮苷、芦丁、新绿原酸、隐绿原

酸、金丝桃苷、槲皮素-3-O-新橙皮苷、水仙苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,测定溶液中的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、槲皮素-3-O-新橙皮苷、金丝桃苷、异槲皮

苷、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷含量并计算加样回收率,结果见表3所示,均符合规定,表明该分析方法准确度良好。

表3 各成分加样回收率测定结果

Table 3 Determination results of recovery rate of each component

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample quantity (g)	测得量 Measured quantity (mg)	已知量 Known quantity (mg)	加入量 Added quantity (mg)	回收率 Recovery rate (%)	均值 Average (%)	RSD (%)
新绿原酸 Neochlorogenic acid	1	0.250 1	2.99	1.49	1.50	99.63	99.50	1.5
	2	0.250 2	3.01	1.50	1.50	101.1		
	3	0.250 9	2.98	1.50	1.50	98.64		
	4	0.255 6	3.05	1.53	1.50	101.4		
	5	0.248 7	2.95	1.49	1.50	97.52		
	6	0.251 1	2.99	1.50	1.50	99.23		
绿原酸 Chlorogenic acid	1	0.250 1	26.1	13.1	13.1	98.95	99.21	1.7
	2	0.250 2	26.9	13.2	13.1	101.6		
	3	0.250 9	26.5	13.2	13.1	100.2		
	4	0.255 6	26.4	13.4	13.1	97.65		
	5	0.248 7	26.1	13.1	13.1	98.25		
	6	0.251 1	26.0	13.2	13.1	96.91		
隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	1	0.250 1	0.156	0.075 1	0.080 5	100.9	99.38	2.2
	2	0.250 2	0.156	0.075 1	0.080 5	100.0		
	3	0.250 9	0.154	0.075 3	0.080 5	98.15		
	4	0.255 6	0.159	0.076 7	0.080 5	102.4		
	5	0.248 7	0.153	0.074 6	0.080 5	98.10		
	6	0.251 1	0.153	0.075 4	0.080 5	96.33		
槲皮素-3-O-新橙皮苷 Quercetin-3-O-neohesperidin	1	0.250 1	1.68	0.836	0.851	99.78	99.82	0.83
	2	0.250 2	1.68	0.836	0.851	99.39		
	3	0.250 9	1.69	0.839	0.851	99.85		
	4	0.255 6	1.69	0.854	0.851	97.95		
	5	0.248 7	1.68	0.831	0.851	100.4		
	6	0.251 1	1.69	0.839	0.851	99.70		
金丝桃苷 Hyperin	1	0.250 1	3.52	1.74	1.75	101.7	100.3	2.2
	2	0.250 2	3.49	1.74	1.75	99.93		
	3	0.250 9	3.46	1.74	1.75	97.94		
	4	0.255 6	3.48	1.78	1.75	97.36		
	5	0.248 7	3.50	1.73	1.75	101.2		
	6	0.251 1	3.55	1.75	1.75	102.8		
异槲皮苷 Isoquercitrin	1	0.250 1	4.16	2.07	2.05	101.2	99.98	1.4
	2	0.250 2	4.11	2.07	2.05	99.16		
	3	0.250 9	4.15	2.08	2.05	101.3		

续表3(Continued Tab. 3)

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample quantity (g)	测得量 Measured quantity (mg)	已知量 Known quantity (mg)	加入量 Added quantity (mg)	回收率 Recovery rate (%)	均值 Average (%)	RSD (%)
异槲皮苷 Isoquercitrin	4	0.255 6	4.11	2.12	2.05	97.56	99.98	1.4
	5	0.248 7	4.11	2.06	2.05	99.78		
芦丁 Rutin	6	0.251 1	4.15	2.08	2.05	100.4		
	1	0.250 1	5.48	2.73	2.74	100.5	97.90	1.9
山柰酚-3-O-芸香糖苷 Kaempferol-3-O-rutoside	2	0.250 2	5.48	2.73	2.74	100.2		
	3	0.250 9	5.38	2.74	2.74	96.55		
水仙苷 Narcissoside	4	0.255 6	5.49	2.79	2.74	98.33		
	5	0.248 7	5.40	2.71	2.74	98.31		
山柰酚-3-O-芸香糖苷 Kaempferol-3-O-rutoside	6	0.251 1	5.38	2.74	2.74	95.77		
	1	0.250 1	0.461	0.222	0.251	95.57	99.55	2.7
水仙苷 Narcissoside	2	0.250 2	0.473	0.222	0.251	100.4		
	3	0.250 9	0.466	0.222	0.251	97.56		
水仙苷 Narcissoside	4	0.255 6	0.483	0.227	0.251	102.4		
	5	0.248 7	0.476	0.221	0.251	102.1		
水仙苷 Narcissoside	6	0.251 1	0.471	0.223	0.251	99.41		
	1	0.250 1	0.834	0.417	0.421	99.44	100.3	1.2
水仙苷 Narcissoside	2	0.250 2	0.834	0.417	0.421	99.23		
	3	0.250 9	0.846	0.418	0.421	101.9		
水仙苷 Narcissoside	4	0.255 6	0.842	0.426	0.421	98.97		
	5	0.248 7	0.838	0.414	0.421	100.9		
水仙苷 Narcissoside	6	0.251 1	0.843	0.418	0.421	101.1		

2.4 样品测定

取45批各花期的梅花药材粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,采用外标法进行计算,45批梅花药材中9个成分含量测定数据结果见表4。结果显示45批梅花药材中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、槲皮素-3-O-新橙皮苷、金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁、山柰酚-3-O-芸

香糖苷和水仙苷含量范围分别为0.410%~1.29%、4.83%~7.66%、0.005%~0.066%、0.185%~0.508%、0.259%~0.859%、0.387%~1.18%、0.606%~1.52%、0.042%~0.127%、0.140%~0.334%,不同花期9个指标成分含量的均值对比见图2。

表4 含量测定结果
Table 4 Content determination results

编号 No.	含量 Content (%)								
	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	槲皮素-3-O-新橙皮苷 Quercetin-3-O-neohesperidin	金丝桃苷 Hyperin	异槲皮苷 Isoquercitrin	芦丁 Rutin	山柰酚-3-O-芸香糖苷 Kaempferol-3-O-rutoside	水仙苷 Narcissoside
FP1	0.542 ± 0.003	5.948 ± 0.015	0.054 ± 0.002	0.407 ± 0.001	0.509 ± 0.001	0.603 ± 0.001	0.875 ± 0.045	0.103 ± 0.070	0.221 ± 0.006
FP2	0.640 ± 0.003	5.386 ± 0.010	0.036 ± 0.003	0.377 ± 0.001	0.712 ± 0.001	0.879 ± 0.001	1.137 ± 0.005	0.098 ± 0.030	0.183 ± 0.025

续表4(Continued Tab. 4)

编号 No.	含量 Content(%)								
	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	隐绿原酸 Cryptochl- orogenic acid	槲皮素-3-O- 新橙皮苷 Quercetin-3-O- neohesperidin	金丝桃苷 Hyperin	异槲皮苷 Isoquercitrin	芦丁 Rutin	山柰酚-3-O- 芸香糖苷 Kaempferol-3- O-rutoside	水仙苷 Narcisoside
FP3	0.527 ± 0.008	5.158 ± 0.030	0.049 ± 0.015	0.329 ± 0.015	0.535 ± 0.015	0.652 ± 0.025	0.895 ± 0.020	0.092 ± 0.060	0.164 ± 0.003
FP4	0.532 ± 0.007	5.137 ± 0.010	0.047 ± 0.020	0.320 ± 0.015	0.492 ± 0.005	0.593 ± 0.005	0.841 ± 0.005	0.085 ± 0.025	0.164 ± 0.030
FP5	0.569 ± 0.007	5.286 ± 0.008	0.045 ± 0.010	0.334 ± 0.007	0.531 ± 0.007	0.652 ± 0.003	0.907 ± 0.030	0.087 ± 0.025	0.173 ± 0.030
FP6	0.597 ± 0.002	5.263 ± 0.005	0.031 ± 0.020	0.335 ± 0.002	0.692 ± 0.002	0.827 ± 0.002	1.089 ± 0.002	0.088 ± 0.015	0.167 ± 0.004
FP7	0.488 ± 0.004	4.979 ± 0.015	0.052 ± 0.010	0.307 ± 0.008	0.477 ± 0.006	0.564 ± 0.002	0.804 ± 0.020	0.082 ± 0.015	0.153 ± 0.001
FP8	0.602 ± 0.005	6.106 ± 0.010	0.050 ± 0.015	0.413 ± 0.002	0.549 ± 0.002	0.661 ± 0.001	0.950 ± 0.010	0.104 ± 0.035	0.228 ± 0.040
FP9	0.456 ± 0.010	4.946 ± 0.025	0.057 ± 0.022	0.292 ± 0.002	0.404 ± 0.002	0.481 ± 0.002	0.705 ± 0.007	0.079 ± 0.080	0.148 ± 0.002
FP10	0.573 ± 0.005	5.249 ± 0.010	0.041 ± 0.030	0.329 ± 0.028	0.505 ± 0.001	0.619 ± 0.003	0.872 ± 0.030	0.088 ± 0.020	0.174 ± 0.020
FP11	0.767 ± 0.020	5.823 ± 0.025	0.016 ± 0.025	0.398 ± 0.026	0.787 ± 0.002	0.975 ± 0.002	1.276 ± 0.020	0.106 ± 0.060	0.214 ± 0.004
FP12	0.504 ± 0.025	5.445 ± 0.010	0.055 ± 0.032	0.411 ± 0.007	0.521 ± 0.007	0.603 ± 0.004	0.844 ± 0.035	0.103 ± 0.035	0.206 ± 0.035
FP13	0.410 ± 0.004	4.831 ± 0.005	0.066 ± 0.007	0.277 ± 0.018	0.334 ± 0.001	0.387 ± 0.001	0.605 ± 0.007	0.079 ± 0.007	0.140 ± 0.003
FP14	0.598 ± 0.010	5.258 ± 0.005	0.030 ± 0.010	0.334 ± 0.002	0.695 ± 0.002	0.829 ± 0.003	1.091 ± 0.025	0.089 ± 0.025	0.167 ± 0.025
FP15	0.709 ± 0.015	5.526 ± 0.005	0.030 ± 0.009	0.406 ± 0.012	0.817 ± 0.009	1.015 ± 0.005	1.286 ± 0.045	0.102 ± 0.075	0.195 ± 0.008
BP1	1.122 ± 0.005	6.383 ± 0.008	0.017 ± 0.017	0.446 ± 0.021	0.794 ± 0.005	1.132 ± 0.005	1.503 ± 0.045	0.109 ± 0.050	0.279 ± 0.045
BP2	1.197 ± 0.010	6.202 ± 0.010	0.016 ± 0.010	0.443 ± 0.006	0.743 ± 0.006	1.102 ± 0.002	1.506 ± 0.020	0.108 ± 0.015	0.300 ± 0.015
BP3	1.046 ± 0.025	6.071 ± 0.010	0.027 ± 0.011	0.453 ± 0.013	0.722 ± 0.003	1.039 ± 0.003	1.376 ± 0.025	0.109 ± 0.030	0.276 ± 0.007
BP4	0.934 ± 0.030	6.154 ± 0.005	0.033 ± 0.009	0.445 ± 0.010	0.694 ± 0.002	0.964 ± 0.001	1.279 ± 0.010	0.108 ± 0.008	0.258 ± 0.005
BP5	1.134 ± 0.015	6.427 ± 0.010	0.012 ± 0.010	0.426 ± 0.010	0.768 ± 0.001	1.089 ± 0.001	1.507 ± 0.010	0.111 ± 0.085	0.291 ± 0.009
BP6	0.984 ± 0.020	6.243 ± 0.020	0.023 ± 0.010	0.508 ± 0.007	0.844 ± 0.007	0.984 ± 0.008	1.347 ± 0.075	0.127 ± 0.080	0.334 ± 0.008
BP7	1.064 ± 0.010	6.502 ± 0.005	0.013 ± 0.010	0.429 ± 0.010	0.813 ± 0.003	1.119 ± 0.003	1.492 ± 0.025	0.108 ± 0.025	0.266 ± 0.030
BP8	1.163 ± 0.020	6.265 ± 0.015	0.021 ± 0.008	0.471 ± 0.005	0.806 ± 0.005	1.174 ± 0.004	1.519 ± 0.035	0.113 ± 0.045	0.289 ± 0.050
BP9	0.997 ± 0.015	6.602 ± 0.010	0.005 ± 0.020	0.378 ± 0.020	0.788 ± 0.002	1.015 ± 0.002	1.447 ± 0.015	0.105 ± 0.020	0.249 ± 0.020
BP10	0.908 ± 0.025	6.108 ± 0.025	0.033 ± 0.010	0.455 ± 0.010	0.727 ± 0.007	0.994 ± 0.008	1.294 ± 0.075	0.111 ± 0.075	0.254 ± 0.008
BP11	1.004 ± 0.025	6.232 ± 0.007	0.024 ± 0.010	0.451 ± 0.010	0.759 ± 0.006	1.073 ± 0.006	1.389 ± 0.060	0.109 ± 0.055	0.264 ± 0.006
BP12	1.224 ± 0.025	6.017 ± 0.010	0.016 ± 0.020	0.449 ± 0.020	0.725 ± 0.002	1.102 ± 0.002	1.497 ± 0.020	0.111 ± 0.015	0.308 ± 0.015
BP13	0.805 ± 0.030	5.751 ± 0.005	0.011 ± 0.007	0.413 ± 0.007	0.798 ± 0.007	1.007 ± 0.007	1.307 ± 0.070	0.107 ± 0.060	0.228 ± 0.060
BP14	0.793 ± 0.010	5.909 ± 0.009	0.016 ± 0.010	0.415 ± 0.010	0.808 ± 0.006	1.022 ± 0.007	1.322 ± 0.065	0.107 ± 0.070	0.219 ± 0.007
BP15	0.991 ± 0.025	6.322 ± 0.020	0.006 ± 0.010	0.484 ± 0.004	0.859 ± 0.004	1.171 ± 0.004	1.472 ± 0.040	0.117 ± 0.040	0.272 ± 0.006

续表4(Continued Tab. 4)

编号 No.	含量 Content(%)								
	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	隐绿原酸 Cryptochloro- genic acid	槲皮素-3-O- 新橙皮苷 Quercetin-3-O- neohesperidin	金丝桃苷 Hyperin	异槲皮苷 Isoquercitrin	芦丁 Rutin	山柰酚-3-O- 芸香糖苷 Kaempferol-3- O-rutoside	水仙苷 Narcisoside
BS1	1.291 ± 0.025	7.659 ± 0.010	0.021 ± 0.010	0.253 ± 0.010	0.422 ± 0.002	0.68 ± 0.002	1.226 ± 0.020	0.073 ± 0.020	0.217 ± 0.015
BS2	1.128 ± 0.020	6.704 ± 0.010	0.021 ± 0.030	0.200 ± 0.030	0.259 ± 0.002	0.524 ± 0.006	0.615 ± 0.055	0.042 ± 0.050	0.193 ± 0.050
BS3	1.285 ± 0.010	6.600 ± 0.025	0.014 ± 0.010	0.228 ± 0.010	0.386 ± 0.003	0.665 ± 0.006	1.248 ± 0.060	0.071 ± 0.060	0.237 ± 0.004
BS4	1.045 ± 0.020	7.164 ± 0.007	0.022 ± 0.010	0.192 ± 0.010	0.289 ± 0.002	0.481 ± 0.002	0.962 ± 0.050	0.058 ± 0.040	0.185 ± 0.010
BS5	1.277 ± 0.005	6.985 ± 0.010	0.017 ± 0.025	0.236 ± 0.003	0.396 ± 0.003	0.664 ± 0.003	1.224 ± 0.030	0.073 ± 0.030	0.227 ± 0.030
BS6	1.164 ± 0.015	6.752 ± 0.020	0.016 ± 0.010	0.203 ± 0.010	0.323 ± 0.002	0.559 ± 0.001	1.106 ± 0.010	0.064 ± 0.015	0.216 ± 0.015
BS7	1.127 ± 0.010	7.065 ± 0.009	0.019 ± 0.010	0.198 ± 0.010	0.306 ± 0.001	0.522 ± 0.001	1.043 ± 0.005	0.061 ± 0.005	0.201 ± 0.010
BS8	1.153 ± 0.005	6.903 ± 0.009	0.017 ± 0.009	0.200 ± 0.008	0.316 ± 0.004	0.543 ± 0.003	1.079 ± 0.030	0.063 ± 0.025	0.208 ± 0.025
BS9	1.139 ± 0.015	6.958 ± 0.008	0.018 ± 0.010	0.199 ± 0.010	0.312 ± 0.002	0.534 ± 0.002	1.061 ± 0.020	0.062 ± 0.030	0.205 ± 0.025
BS10	1.188 ± 0.008	6.913 ± 0.015	0.018 ± 0.010	0.210 ± 0.005	0.337 ± 0.003	0.578 ± 0.007	1.129 ± 0.065	0.065 ± 0.070	0.219 ± 0.010
BS11	1.127 ± 0.025	7.058 ± 0.010	0.019 ± 0.035	0.197 ± 0.008	0.307 ± 0.008	0.521 ± 0.007	1.043 ± 0.065	0.061 ± 0.040	0.199 ± 0.020
BS12	1.064 ± 0.006	7.012 ± 0.006	0.019 ± 0.010	0.184 ± 0.010	0.277 ± 0.002	0.473 ± 0.002	0.977 ± 0.020	0.058 ± 0.015	0.193 ± 0.015
BS13	1.132 ± 0.002	6.764 ± 0.015	0.017 ± 0.005	0.196 ± 0.009	0.307 ± 0.004	0.532 ± 0.003	1.071 ± 0.030	0.062 ± 0.025	0.212 ± 0.035
BS14	1.175 ± 0.007	6.749 ± 0.005	0.016 ± 0.010	0.205 ± 0.010	0.329 ± 0.010	0.568 ± 0.003	1.119 ± 0.030	0.065 ± 0.030	0.219 ± 0.030
BS15	1.149 ± 0.020	7.022 ± 0.010	0.018 ± 0.008	0.202 ± 0.004	0.317 ± 0.001	0.541 ± 0.001	1.072 ± 0.080	0.064 ± 0.075	0.206 ± 0.070

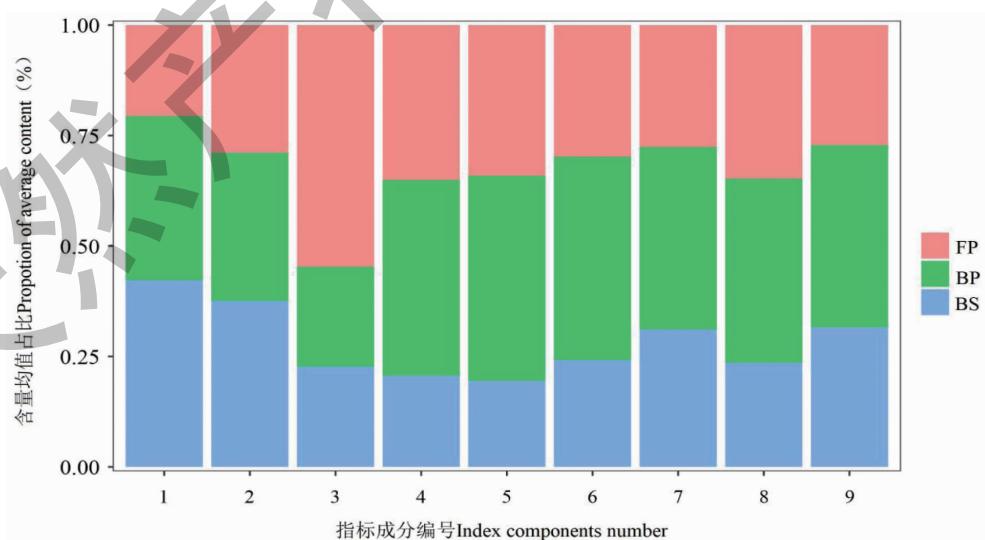


图2 不同花期梅花药材9个指标成分含量均值占比图

Fig. 2 The average proportion of nine index components in different flowering stages of Mume Flos

注:1:新绿原酸;2:绿原酸;3:隐绿原酸;4:槲皮素-3-O-新橙皮苷;5:金丝桃苷;6:异槲皮苷;7:芦丁;8:山柰酚-3-O-芸香糖苷;9:水仙苷,下同。Note:1:Neochlorogenic acid;2:Chlorogenic acid;3:Cryptochlorogenic acid;4:Quercetin-3-O-neohesperidin;5:Hyperin;6:Isoquercitrin;

7:Rutin;8:Kaempferol-3-O-rutoside;9:Narcisoside, the same below.

2.5 化学模式识别分析

化学计量学中的模式识别技术已广泛应用于中药材产地、基原、炮制、真伪鉴别等方面^[6],分为有、无监督两种统计方法,一般先进行无监督的 HCA、PCA,观察样本之间是否有分类趋势,再采用 PLS-DA 或者 OPLS-DA 进行有监督的模式识别,显示样本间引起差异主要的变量,从而寻找质量差异性标志物^[7]。

2.5.1 聚类分析(HCA)

以 45 批不同花期梅花样品中 9 个成分的含量

为数据源,利用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行 min ~ max 标准化处理,再应用 HemI1.0 软件以平方欧式距离进行层次聚类,见图 3,显示所有 45 批样品被聚为 3 类,其中 15 批花蕾期样品聚为一类,主要特征为绿原酸的含量最高(范围为 6.6% ~ 7.6%);11 批末花期样品聚为一类,主要特征为新绿原酸的含量最低(0.41% ~ 0.77%);15 批盛花期样品以及 4 批末花期样品大致聚为一类,说明通过聚类分析可大致区分花蕾期与另外两个花期的梅花样品。

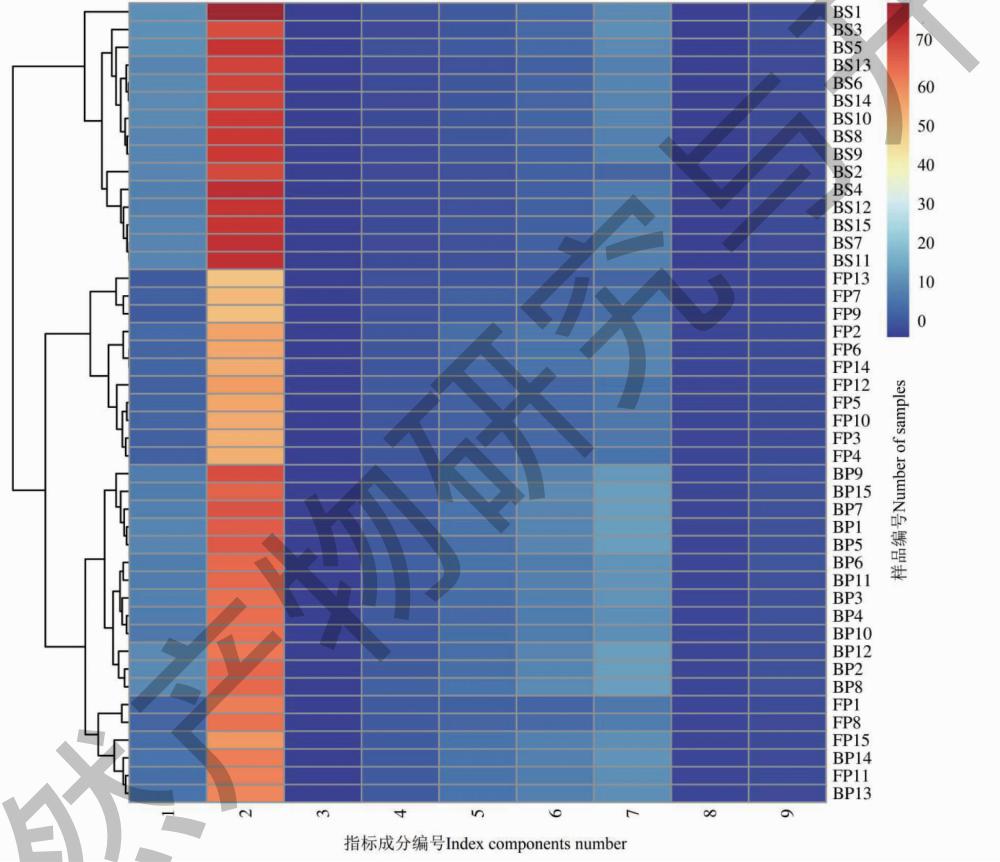


图 3 不同花期梅花药材中 9 个指标成分含量的聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis diagram of nine index components in Mume Flos medicinal materials at different flowering stages

2.5.2 主成分分析(PCA)

为了更好地将各不同花期梅花进行区分,另采用主成分分析(principal component analysis, PCA)进行分析,PCA 可实现高维数据的降维处理,少数几个主成分(综合变量)即可代原始数据的大部分信息。同样以 45 批不同花期梅花药材 9 个成分含量为原始数据,导入 SIMCA14.1 软件绘制 45 批不同花期梅花样品的主成分得分图,生成 3 个主成分,累积贡献率为 0.973, Q^2 为 0.928, Q^2 大于 0.5 证明模

型有效,以前两个主成分的得分值为 X、Y 值,生成 PCA 得分图(见图 4)。结果显示,PCA 按花期的不同,将 45 批梅花大致分为三类,其中 15 批花蕾期梅花(BS1 ~ BS15)为 I 类,15 批盛花期梅花(BP1 ~ BP15)为 II 类,15 批末花期梅花(FP1 ~ FP15)为 III 类。盛花期和末花期梅花在 PCA 得分图上分布较为接近,而花蕾期梅花,在主成分得分上与盛花期、末花期梅花的差异较大,说明梅花在花蕾期和开花后化学成分的含量存在较大变化,该结果与聚类分

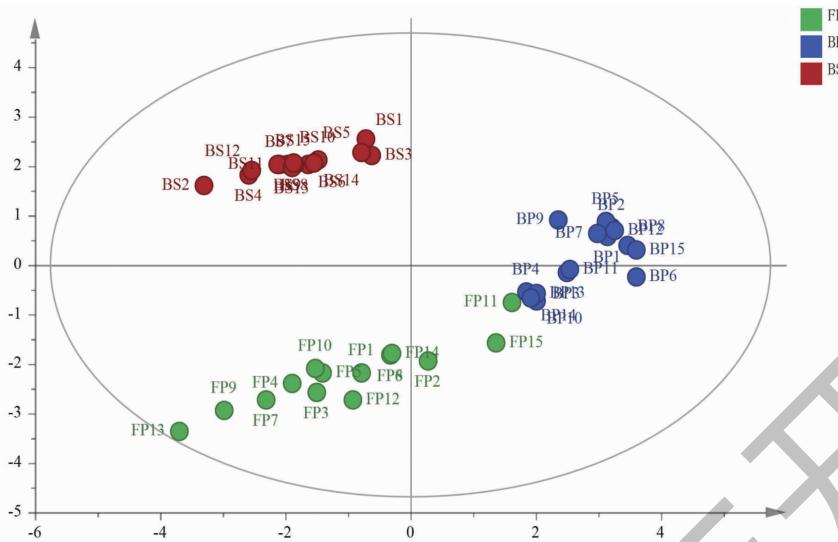


图4 PCA得分图

Fig. 4 PCA score diagram

析基本一致。

2.5.3 正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA)

为了更好地观察不同花期梅花样品之间的组内差异,进一步采用有监督的 OPLS-DA 模型进行分析。以样品 FP1 ~ FP15、BP1 ~ BP15、BS1 ~ BS15 为 Y 变量,9 种成分的含量为 X 变量,利用 SIMCA14.1 软件进行 OPLS-DA 处理。结果在建立的偏最小二乘判别分析模型中 $R^2X(\text{cum}) = 0.971$, $R^2Y(\text{cum}) = 0.876$, $Q^2(\text{cum}) = 0.845$, 均大于 0.5, 说明建立的 OPLS-DA 模型解释率和预测力可靠、良好, 见 OPLS-

DA 得分图 5。结果显示 45 批样品分为 3 类,3 种花期各为一类,更进一步对 9 个成分含量数据聚类分析结果进行分类,同时表明这 9 个成分在评价样品花期之间的质量差异具有重要参考价值。同时,结合变量重要性投影值(variable importance in projection, VIP)值越大,表明对样品分类贡献较大;图 6 其中 VIP > 1 的有 3 种成分,依次为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸,说明这 3 种成分是影响不同花期样品之间质量差异贡献较大的成分,均为酚酸类成分,可作为指导梅花药材质量控制的关键成分。

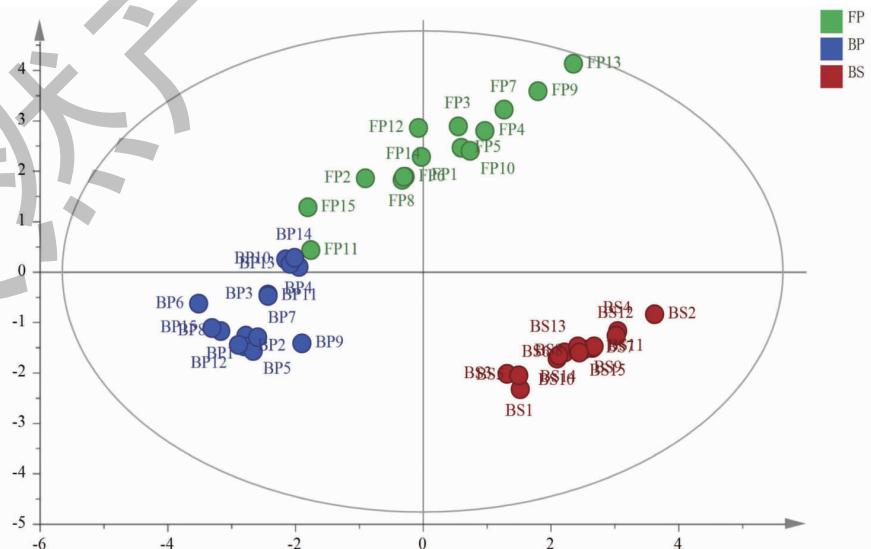


图5 OPLS-DA得分图

Fig. 5 OPLS-DA score diagram

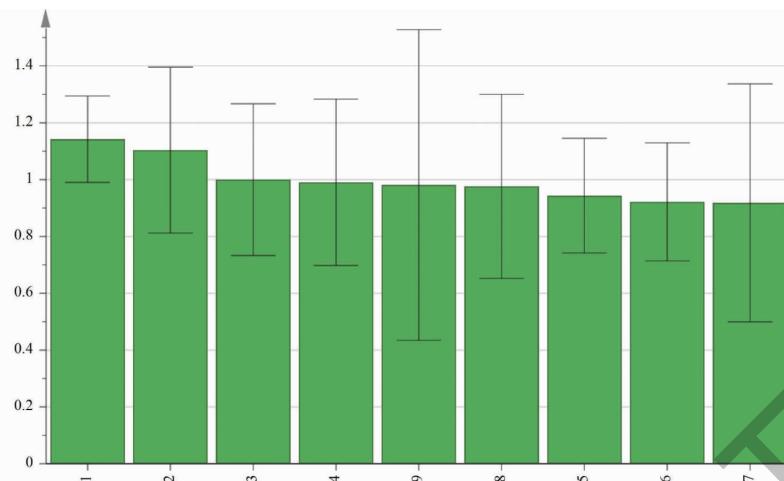


图 6 PLS-DA 模型 VIP 图
Fig. 6 VIP diagram of PLS-DA model

3 讨论与结论

本研究含量测定结果显示,不同花期梅花药材中新绿原酸、绿原酸等主要酚酸类成分的含量在花蕾期最高,而丝桃苷、异槲皮苷、芦丁等黄酮类成分的含量则盛花期最高。其中酚酸类成分的含量变化与文献报道的趋势一致^[8,9],即由花蕾期到末花期随着花开的阶段绿原酸含量有所降低。因此,造成梅花不同花期差异的主要原因为酚酸类成分的变化。

近年利用中药多成分测定结合化学模式识别分析中药样品的差异,在中药质量评价研究应用中较为广泛^[10-14]。本研究通过同时测定45批梅花药材中9个成分含量,并结合化学模式进行分析,探索了鉴别不同花期梅花药材的方法。在HCA分析结果中,3个花期的梅花样品分别聚为3类,其中花蕾期梅花全部聚为一类,末花期梅花样品大部分聚为一类,所有盛花期样品聚为一类,结果表明梅花药材的不同花期成分含量有明显的差异。结合PCA和PLS-DA进一步分析了不同花期梅花的质量差异标志物,结果显示,3个花期的梅花样品均明显位于空间的不同位置,反映了梅花样品不同花期间的差异。同时发现新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸3种酚酸类成分是区分不同花期样品贡献较大的差异性成分,这与上述梅花不同花期主要酚酸类成分含量有所差异的结论相符。

综上,本研究建立了梅花药材多个成分的含量测定方法,为梅花药材的质量标准提升提供了重要参考,同时结合化学计量学的分析,揭示了酚酸类成

分在梅花不同花期间的差异,对其进行质量控制,有利于反映梅花的质量变化属性。

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, 2020:324-325.
- 2 Yan H, Lan JS, Pu ZJ, et al. Advances in studies on chemical compositions and pharmacological activities of Mume Flos [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 3453-3461.
- 3 Wang CC, Zhang W, Wu DL, et al. Chemical constituents from ethyl acetate extraction of *Prunus mume* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45:347-351.
- 4 Zheng YZ, Lu JH, Sun YQ, et al. Simultaneous determination of six flavonoids in *Prunus mume* flowers by HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2018, 40:2007-2010.
- 5 Zhang QH, Zhang L, Shang LX, et al. Studies on the chemical constituents of flowers of *Prunus mume* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2008, 41:1666-1668.
- 6 Sun LL, Wang M, Ren XL, et al. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48:4339-4345.
- 7 Yu Y, Li J, Li BG, et al. Application of chemometrics in the study of Chinese medicine quality control [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2018, 40:1139-1142.
- 8 Sun SF, Shen XG, Zhang XF, et al. Effects of harvesting stage on functional constituents of four kinds of Hangbaiju [J].

- China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2011,36:2945-2949.
- 9 Fan YP, Yao YC, Zhao QB, et al. The study of the seasonal variations of the contents of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves of *Acer truncatum* Bunge[J]. Chin Agr Sci Bull(中国农学通报),2006,22:157-159.
- 10 Wang CC, Yang M, Wu DL, et al. A study of fingerprints of Mume Flos by ultra-performance liquid chromatography[J]. Anhui Univ Tradit Chin Med(安徽中医药大学学报),2019,38:93-96.
- 11 Tao XS, Gong HY, Xie CX, et al. Quality evaluation of *Dioscorea zingiberensis* from different origins based on UPLC fingerprint and chemometrics [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药),2021,52:227-233.
- 12 Lin L, Li HH, Xie H, et al. Quality study of Inulae Flos based on HPLC and chemometrics[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2021,52:1751-1758.
- 13 Zeng ZJ, Yu XT, Deng CC, et al. Study on the differences in different parts of Gossampini Flos based on chemical pattern recognition and entropy TOPSIS method [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2022,34:1557-1564.
- 14 Zhao HS, Zhao R, Qiao JW, et al. Evaluation of quality markers of Mume Flos based on fingerprint and chemical pattern recognition[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2022,53:1345-1353.

(上接第 376 页)

- 13 Yedukondalu N, Suraya J, Gianluigi L, et al. Isolation, synthesis and structure determination of cannabidiol derivatives and their cytotoxic activities [J]. Nat Prod Res, 2021, 35: 471-480.
- 14 Chen GF, You HM, Wang GJ, et al. Simultaneous determination of four cannabinoids in industrial hemp by HPLC[J]. Heilongjiang Agric Sci(黑龙江农业科学),2021,5:60-64.
- 15 Xie NY, Bao G, Zhang H. Determination of cannabidiol in cosmetics by HPLC[J]. Flavour Frag Cosmet(香料香精化妆品),2022,1:74-77.

(上接第 387 页)

- 12 Zhang ZH, Qian XY, Huang GZ, et al. Oil yield, components and antimicrobial activity of volatile oils of Cinnamomi Cortex from different growth environments and growth years [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2019,50:2990-2996.
- 13 Gao MZ, Li T, Tian CQ, et al. Search progress on chemical constituents and pharmacological effects of Cinnamomi Cortex [J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药),2021,17:201-205.
- 14 Li X, Lu HY, Jiang XW, et al. *Cinnamomum cassia* extract promotes thermogenesis during exposure to cold via activation

(中草药),2021,52:227-233.

- 16 Yan JT, Chang L, Zhang JJ, et al. Optimization of extraction process and analysis of biological activity of cannabidiol in industrial hemp [J]. Plant Fiber Sci China(中国麻业科学),2020,42:61-69.
- 17 Hao HJ, Sun WX, Xing JB, et al. Study on the extraction process of cannabidiol from industrial hemp leaves [J]. J Green Sci Technol(绿色科技),2019,1:149-150.
- 18 Gao Z, Zhang ZJ, Li XJ, et al. Hot reflux extraction of cannabidiol from hemp leaves [J]. China Oil Fat(中国油脂),2019,44:107-111.

of brown adipose tissue [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 266: 113413.

- 15 Xiang L, Bo X, Xin L, et al. Network pharmacology-based research uncovers cold resistance and thermogenesis mechanism of *Cinnamomum cassia* [J]. Fitoterapia, 2021, 149: 104824.
- 16 Wu WX, Liu Y, He YS, et al. Current situation of peel-removing of relevant Chinese medicine in Chinese Pharmacopoeia [J]. Henan Tradit Chin Med(河南中医),2016,36:2043-2046.