

本文引用: 袁文珺, 赵小梅, 杨志军, 俞晓英, 张立军. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别和多指标成分定量评价贯叶连翘药材的质量[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(7): 1249-1258.

基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别和多指标成分定量评价 贯叶连翘药材的质量

袁文珺¹, 赵小梅¹, 杨志军^{1*}, 俞晓英², 张立军²

1. 兰州市中医医院 药剂科, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

[摘要] **目的** 建立贯叶连翘药材 HPLC 指纹图谱及金丝桃苷、槲皮素、金丝桃素 3 种黄酮成分含量测定方法, 并结合化学模式识别, 评价不同产地贯叶连翘药材的质量。**方法** 采用 HPLC-DAD 技术, 以 Phenomenex ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 甲醇-0.1% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 建立贯叶连翘药材指纹图谱, 同时测定 3 种黄酮成分的含量; 采用《中药指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》软件对 12 批次药材样品进行共有峰确认及相似度评价; 通过 SIMCA 14.1 和 SPSS 22.0 统计分析软件, 采用聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 对不同产地贯叶连翘药材进行质量评价。**结果** 建立了贯叶连翘药材指纹图谱, 12 批贯叶连翘药材的相似度均大于 0.85; 确定共有峰 14 个。通过化学模式识别分析, HCA 将 12 批次贯叶连翘药材分为 4 类, 反映了不同产地贯叶连翘药材的质量特征; PCA 筛选出累计贡献率达到 88.484% 的 3 个主成分, 得到决定贯叶连翘药材质量的 5 个化学成分; PLS-DA 分析筛选出贯叶连翘药材中 5 个差异性成分, 指出 3 个成分 (金丝桃苷、槲皮素、金丝桃素), 可作为评价贯叶连翘药材质量差异的质量标志物。并对贯叶连翘药材中金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素含量进行测定, 其含量均值分别为 0.461 4%、0.276 0%、0.051 4%。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱结合含量测定分析方法专属性强、稳定性高、分离度好, 可以客观、全面、有效地用于贯叶连翘药材的质量评价, 为其质量控制提供依据。

[关键词] 贯叶连翘; 指纹图谱; 不同产地; 金丝桃苷; 槲皮素; 金丝桃素; 化学模式识别

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.07.007

Quality evaluation of *Hypericum perforatum* L. medicinal materials based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition and multi-component quantitative analysis

YUAN Wenjun¹, ZHAO Xiaomei¹, YANG Zhijun^{1*}, YU Xiaoying², ZHANG Lijun²

1. Pharmacy Department, Lanzhou City Hospital of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000, China

[Abstract] **Objective** To establish an HPLC fingerprint and develop a content-determining method for three flavonoid components (hyperoside, quercetin, and hypericin) in *Hypericum perforatum* L. medicinal materials, and to assess the quality of *Hypericum perforatum* L. medicinal materials from different origins by applying chemical pattern recognition. **Methods** HPLC-DAD technique was employed with a Phenomenex ODS C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and a mobile phase composed of methanol-0.1% phosphoric acid aqueous solution for gradient elution. The fingerprint of *Hypericum perforatum* L. medicinal

[收稿日期] 2025-02-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81460611)。

[通信作者] * 杨志军, 男, 硕士, 主任药师, 硕士研究生导师, E-mail: gsherb001@163.com。

materials was established, and the component contents of the three flavonoids were simultaneously determined. The software Similarity Evaluation System for Traditional Chinese Medicines Fingerprint (2012 edition) was used to confirm common peaks and evaluate the similarity of 12 batches of medicinal material samples. Statistical analyses, including hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and partial least squares–discriminant analysis (PLS–DA), were performed using SIMCA 14.1 and SPSS 22.0 software to assess the quality of *Hypericum perforatum* L. medicinal materials from different origins. **Results** The HPLC fingerprint of *Hypericum perforatum* L. medicinal materials was successfully established, with similarity values exceeding 0.85 for all 12 batches, and 14 common peaks were identified. Through chemical pattern recognition analysis, HCA classified the 12 batches of *Hypericum perforatum* L. medicinal materials into four categories, reflecting the quality characteristics of *Hypericum perforatum* L. medicinal materials from different origins. PCA selected three principal components with a cumulative contribution rate of 88.484%, identifying five key chemical components influencing quality. PLS–DA screened five differential components, with three (hyperoside, quercetin, and hypericin) identified as quality markers for evaluating quality variations. Furthermore, the content of hyperoside, quercetin, and hypericin were determined, with mean values of 0.4614%, 0.2760%, and 0.0514%, respectively. **Conclusion** The established HPLC fingerprint combined with quantitative analysis demonstrates strong specificity, high stability, and good resolution. It can be objectively, comprehensively, and effectively used for the quality evaluation of *Hypericum perforatum* L. medicinal materials, providing a basis for their quality control.

[**Keywords**] *Hypericum perforatum* L.; fingerprint; different origins; hyperoside; quercetin; hypericin; chemical pattern recognition

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 为藤黄科金丝桃属的草本植物, 全草入药, 该植物在欧洲具有悠久的历史, 又名圣约翰草 (St. John's wort), 是国际医药市场上最重要的抗抑郁植物制剂原料, 收录于德、美等国的药典^[1-3]。贯叶连翘在我国主要分布于西南和西北各省。在《本草从新》《本草纲目拾遗》《植物名实图考》等本草著作中均有记载, 又名元宝草、赶山鞭、贯叶金丝桃及千层楼等, 其具有清心明目、舒筋活血、收敛止血、调经通乳、清热解毒及利湿的功效, 用于治疗肝气郁结、情志不畅、心胸郁闷、咳血、吐血、肠风下血、关节肿痛、月经不调、乳痈、乳少^[4-5]。近年研究证明, 贯叶连翘提取物具有抗病毒、抑菌、抗抑郁、促进记忆、抗肿瘤及抗阿尔茨海默病等药理作用, 并在欧美得到了广泛的应用^[5-6]。研究发现, 贯叶连翘含有苯并二萜酮类、间苯三酚类、黄酮类、萜类、有机酸类、挥发性成分和鞣质等, 对人体免疫功能、肠功能、心脑血管功能都具有很好的增强和促进作用^[6-7]。通过对不同产地贯叶连翘资源调查发现, 市场贯叶连翘药材存在普遍掺杂、混用、乱用等现象。此外, 贯叶连翘在我国仅收载于地方标准中, 仅对其性状、检查项作了相关规定^[8-10], 缺乏必要的质控指标及评价方法, 难以全面反映其内在质量, 严重限制了其进一步开发利用。

中药指纹图谱是一种能够整体、全面反映中药材及其制剂中所含化学成分种类和数量信息, 进而反映中药材的质量, 特别是高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 指纹图谱, 具有整体性好、特征性强及分析效率高等特点, 被广泛用于中药材及其制剂的质量控制^[11-13]。同时, 聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘法–判别分析 (partial least squares–discriminant analysis, PLS–DA) 等化学模式识别方法能够很好的反映中药内部质量, 也是最近几年运用较多的新分析方法^[13-15]。因此, 本实验采用 HPLC 法建立统一条件的色谱指纹图谱鉴别和多指标成分含量测定分析方法, 并结合 HCA、PCA、PLS–DA 等化学模式识别方法对不同产地贯叶连翘药材进行综合质量评价, 建立同时测定金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素含量的分析方法对不同来源的贯叶连翘药材进行研究, 评价不同产区贯叶连翘药材的质量差异, 为全面地控制贯叶连翘药材质量提供实验依据, 为其进一步开发利用提供数据支撑。

1 仪器与试剂

1.1 贯叶连翘药材

贯叶连翘药材共 12 批次, 主要购于甘肃、陕西、

表1 贯叶连翘药材样品来源

Table 1 Origins of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples

编号	购买时间	采购地点	编号	购买时间	采购地点
S1	2021-09-11	甘肃省高台县(药农采挖)	S7	2020-10-11	陕西省镇坪县(药农采挖)
S2	2021-09-22	甘肃省金塔县(药农采挖)	S8	2019-09-21	湖南省桑植县(药农采挖)
S3	2019-09-13	湖南省炎陵县(药农采挖)	S9	2020-09-21	陕西省旬阳县(药农采挖)
S4	2021-09-20	贵州省仁怀县(药农采挖)	S10	2019-10-22	湖南省宜章县(药农采挖)
S5	2019-10-13	湖南省武冈市(药农采挖)	S11	2021-09-13	贵州省桐梓县(药农采挖)
S6	2021-10-21	贵州省江口县(药农采挖)	S12	2021-10-29	贵州省湄潭县(药农采挖)

贵州、湖南等地。所有样品经兰州市中医医院药剂科杨志军主任鉴定为藤黄科植物金丝桃属贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 的干燥全草, 具体信息见表1。

1.2 仪器与试剂

XS205 型电子天平(德国梅特勒托利多有限公司); KQ250DB 超声波清洗器(昆山市禾创超声仪器有限公司); 2000C 高速多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司); DZTW 型调温电热套(北京市永光明医疗仪器厂); 岛津 LC-2030 型高效液相色谱仪、LC Solution 色谱工作站(日本岛津科技有限公司); Phenomenex ODS C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 金丝桃苷(批号: 111521-201809, 含量94.90%)、槲皮素(批号: 100081-201610, 含量98.60%)均购于中国食品药品检定研究院; 金丝桃素(批号: 160904, 含量98.00%)购于成都克洛玛生物科技有限公司; 乙腈、甲醇均为色谱纯; 磷酸为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex ODS C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶); 流动相 A: 0.1%磷酸水溶液, 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱: 0~5 min, 15.5%→22.5% (B); 5~12 min, 22.5%→32.5% (B); 12~15 min, 32.5%→35.5% (B); 15~25 min, 35.5%→55.0% (B); 25~37 min, 55.0%→85.0% (B), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 检测波长 270 nm; 柱温 40 ℃。

2.2 对照品溶液制备

精密称取金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素对照品适量, 加 75% 甲醇溶解制备质量浓度分别为 0.833 0、0.754 0、0.129 0 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 存贮于 4 ℃ 冰箱中备用。

2.3 供试品溶液制备

取贯叶连翘粉末约 1 g(过五号筛), 精密称定, 置 100 mL 棕色量瓶中, 精密加入 75% 甲醇 50 mL 密塞, 摇匀, 称定重量, 浸泡 30 min, 超声处理 45 min(功率 300 W, 频率 50 kHz, 水温 35 ℃), 放冷, 再称定重量, 加 75% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置, 取上清液, 滤过, 取续滤液, 进样前用 0.45 μm 微孔膜过滤, 作为供试品溶液。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 空白溶剂考察 取 75% 甲醇, 按“2.1”项下色谱条件分析, 结果表明溶剂无干扰。

2.4.2 精密度试验 取同一批贯叶连翘样品溶液(S1), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 以金丝桃苷色谱峰为参照峰(S), 计算指纹图谱中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、相对峰面积的 RSD 分别为 0.36%、1.12%(重复 6 次), 表明仪器精密密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批贯叶连翘样品溶液(S1), 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、4、8、12、24、48 h 进样分析, 记录色谱图, 以金丝桃苷色谱峰为参照峰(S), 计算指纹图谱中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、相对峰面积的 RSD 分别为 0.40%、1.26%(重复 6 次), 结果表明 48 h 内样品稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批贯叶连翘样品(S1)粉末(过五号筛), 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 以金丝桃苷色谱峰为参照峰(S), 计算指纹图谱中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、相对峰面积的 RSD 分别为 0.52%、1.32%, 表明本法有良好的重复性。

2.5 贯叶连翘药材 HPLC 指纹图谱建立

2.5.1 不同产地贯叶连翘药材指纹图谱建立与共有峰标定 取 12 批贯叶连翘供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,并将数据导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》软件进行分析,以 S1 的色谱图作为参照图谱,采用中位数矢量法,经多点校正,自动色谱峰匹

配,生成贯叶连翘药材样品叠加指纹图谱(图 1A)及对照指纹图谱(图 1B),确定共有峰 14 个。通过与对照品的色谱图及紫外光谱图信息比对,确定其中 5 号峰为金丝桃苷、8 号峰为槲皮素、12 号峰为金丝桃素。由于金丝桃苷在各批次贯叶连翘中均有出现,分离度好、峰面积大,故选择金丝桃苷作为参照峰(S),计算各共有峰与参照峰的相对保留时间与相对峰面积,结果见表 2。

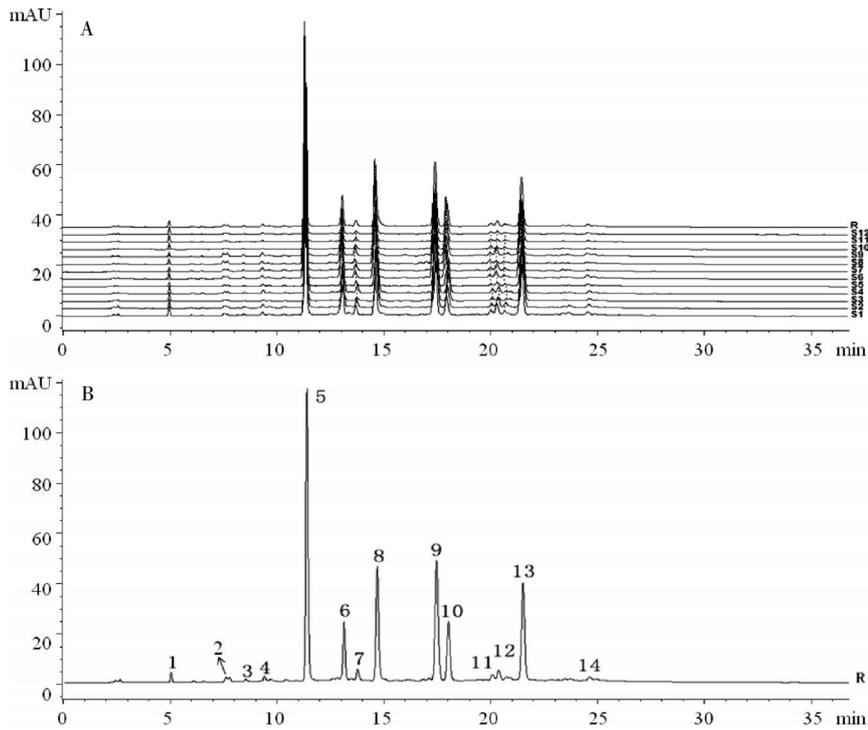


图 1 12 批贯叶连翘药材样品 HPLC 叠加指纹图谱(A)和对照指纹图谱(B)

Fig.1 HPLC overlay fingerprint (A) and reference fingerprint (B) of 12 batches of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples

表 2 12 批贯叶连翘样品 HPLC 指纹图谱分析结果

Table 2 Analysis results of HPLC fingerprints for 12 batches of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples

编号	相对保留 时间/min	相对峰面积											
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.437	0.033	0.033	0.056	0.024	0.023	0.026	0.012	0.027	0.011	0.046	0.053	0.046
2	0.681	0.006	0.008	0.012	0.008	0.012	0.013	0.010	0.024	0.014	0.038	0.045	0.010
3	0.744	0.009	0.012	0.016	0.006	0.008	0.010	0.005	0.007	0.007	0.020	0.031	0.016
4	0.823	0.016	0.024	0.012	0.019	0.021	0.019	0.019	0.025	0.016	0.015	0.014	0.015
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	1.151	0.242	0.263	0.192	0.195	0.216	0.237	0.185	0.227	0.231	0.215	0.167	0.155
7	1.212	0.043	0.052	0.032	0.045	0.049	0.049	0.036	0.034	0.041	0.047	0.046	0.028
8	1.290	0.237	0.372	0.588	0.362	0.426	0.440	0.296	0.786	0.513	0.528	0.383	0.332
9	1.537	0.689	0.998	0.604	0.446	0.620	0.660	0.516	0.506	0.390	0.818	0.689	0.543
10	1.586	0.114	0.168	0.386	0.216	0.229	0.263	0.058	0.292	0.349	0.201	0.220	0.179
11	1.765	0.026	0.027	0.041	0.022	0.025	0.026	0.020	0.033	0.016	0.045	0.032	0.031
12	1.791	0.067	0.084	0.026	0.038	0.049	0.052	0.047	0.026	0.047	0.040	0.037	0.036
13	1.894	0.467	0.638	0.616	0.426	0.537	0.624	0.147	0.282	0.380	0.487	0.594	0.456
14	2.172	0.022	0.032	0.039	0.021	0.030	0.030	0.026	0.021	0.019	0.020	0.022	0.026

2.5.2 贯叶连翘药材样品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(2012版)》的分析处理,进行各批样品图谱的相似度评价,得到12批药材的相似度评价结果。相似度可以体现不同批次样品之间各成分在种类和相对含量上的相似程度。由于相似度不能反映不同批次样品间成分绝对含量的差异,所以同时采用总峰面积比(总峰面积比=样品总峰面积/12批样品平均总峰面积)和相似度2个指标共同来对样品进行评价^[2],结果见表3。相似度均>85%,表明各批次样品之间具有较高的相似性;而从总峰面积比值上分析,各批次之间比值不同,可能受药材产地、环境因子、生长年限及采集时间不同的影响。

2.6 化学模式识别分析

2.6.1 不同产地贯叶连翘药材 HCA 采用多元统计分析软件 SIMCA 14.1,以12批贯叶连翘药材的

14个共有峰的峰面积为原始数据,对其进行HCA,结果见图2。由图2可知,12批贯叶连翘药材样品被分为4类,S7为I类,产地为陕西镇坪县;S9为II类,产地为陕西旬阳县;S1、S2、S4、S6为III类,产地为甘肃省高台县、金塔县,贵州省仁怀县、江口县;S3、S5、S8、S10、S11、S12为IV类,产地为湖南省炎陵县、武冈市、桑植县、宜章县。

2.6.2 主成分分析(principal component analysis, PCA) 采用 SPSS 22.0 软件中的因子分析对12批贯叶连翘药材色谱原始数据进行标准化处理,以主成分的特征值及贡献率为依据,对其指纹图谱中14个共有峰(变量)进行PCA,计算方差贡献率。提取前11个主成分方差贡献率,结果见表4。

由表4可知,以特征值均>1为标准,提取前3个主成分,累计贡献率达88.484%。其中,第一主成分特征值为9.036,贡献率为64.542%;第二主成分

表3 12批贯叶连翘药材样品相似度评价结果

Table 3 Similarity evaluation results of 12 batches of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	1											
S2	0.982	1										
S3	0.945	0.949	1									
S4	0.977	0.944	0.978	1								
S5	0.985	0.972	0.988	0.991	1							
S6	0.981	0.978	0.992	0.985	0.998	1						
S7	0.963	0.921	0.912	0.964	0.951	0.932	1					
S8	0.899	0.887	0.961	0.951	0.948	0.938	0.927	1				
S9	0.936	0.906	0.981	0.987	0.974	0.968	0.941	0.977	1			
S10	0.978	0.982	0.977	0.972	0.993	0.987	0.949	0.951	0.953	1		
S11	0.987	0.983	0.983	0.981	0.997	0.997	0.938	0.927	0.957	0.989	1	
S12	0.995	0.985	0.992	0.995	0.985	0.992	0.966	0.992	0.998	0.995	0.985	1
对照	0.986	0.972	0.984	0.994	0.998	0.994	0.965	0.956	0.978	0.991	0.993	0.996
总峰面积比	1.053	1.399	0.749	1.235	0.724	1.276	1.393	0.872	1.494	0.603	0.555	0.631

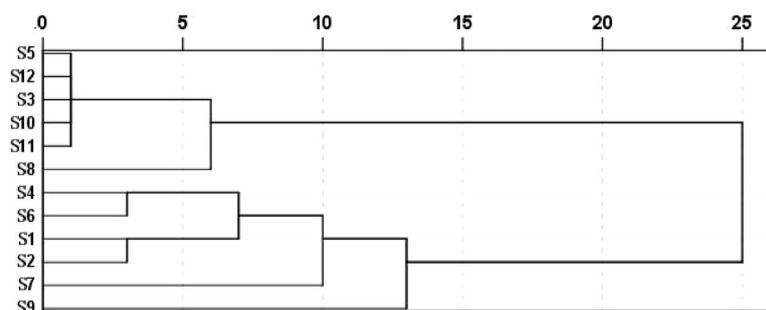


图2 12批贯叶连翘样品 HCA 树状关系

Fig.2 Dendrogram of cluster analysis for 12 batches of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples

表4 贯叶连翘药材样品指纹谱共有峰特征值和方差贡献率

Table 4 Eigenvalues and variance contribution rate of common peaks in fingerprints of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples

主成分	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
A1	9.036	64.542	64.542
A2	1.862	13.302	77.844
A3	1.489	10.639	88.484
A4	0.669	4.777	93.261
A5	0.439	3.137	96.398
A6	0.266	1.897	98.295
A7	0.096	0.684	98.979
A8	0.055	0.391	99.370
A9	0.047	0.332	99.702
A10	0.032	0.230	99.932
A11	0.004	0.068	100.000

特征值为 1.862, 贡献率为 13.302%; 第三主成分特征值为 1.489, 贡献率为 10.639%, 可代表 12 批贯叶连翘药材指纹图谱中 14 个共有峰的主要信息, 14 个共有峰对主成分 1 均成正相关, 其中主要代表共有峰 5、7、9、12 对其的贡献最大(得分分别为 0.991、0.966、0.897、0.853); 14 个共有峰中部分共有峰对主成分 2 成正相关, 其中主要代表共有峰 1、3、11、13 对其的贡献最大(得分分别为 0.765、0.774、0.262、0.329); 14 个共有峰中部分共有峰对主成分 3 成正相关, 其中主要代表共有峰 2、8、10、12 对其的贡献最大(得分分别为 0.406、0.358、0.472、0.047)。结合实际检测结果, 综合分析, 可同时采用对主成分 1、2、3 贡献最大的、峰面积也较大 5、8、9、12、13 号共有峰作为后期贯叶连翘的质量控制指标, 其中 5 号峰为金丝桃苷、8 号峰为槲皮素、12 号峰为金丝桃素, 峰面积较大的 9、13 号峰未知, 需要进一步分析

确认, 结果见图 3。

2.6.3 偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 为进一步筛选对不同产地贯叶连翘药材整体差异性影响较大的差异性标志物, 采用 SIMCA 14.1 软件, 在 HCA 和 PCA 基础上对 12 批次贯叶连翘药材进行 PLS-DA 分析, 以各批指纹图谱数据中共有峰峰面积为变量, 建立 PLS-DA 模型。在 PLS-DA 模型中, 模型拟合参数 R^2_{cum} 为 0.856、 R^2_{Ycum} 为 0.939, 预测能力参数 Q^2_{cum} 为 0.816, 提示所建立的 PLS-DA 模型具有较好的预测能力。PLS-DA 得分显示, 不同产地的贯叶连翘药材可很好地区分为 4 类, 结果与 HCA 分析结果一致(图 4A)。为防止模型出现过拟合, 通过置换检验 200 次对模型内部进行验证, R^2 、 Q^2 回归线的截距均小于原始值, 证明模型稳定可靠, 可用于不同产地贯叶连翘药材整体差异性分析(图 4B)。VIP 图以变量重要性投影值 >1.0 为标准, 共筛选出 5 个差异性标志物。按照 VIP 值从大到小依次为: 5 号峰(金丝桃苷)、8 号峰(槲皮素)、9 号峰、12 号峰(金丝桃素)、13 号峰(图 4C)。这些差异标志物因产地环境而发生含量差异变化, 是区分贯叶连翘药材产地和品质的特征性成分, 可作为后期贯叶连翘药材的质量控制指标。

2.7 贯叶连翘样品中金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素含量测定

2.7.1 专属性考察 取空白溶剂、混合对照品溶液和供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 色谱图见图 5。结果表明, 金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素的分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 5 000, 空白溶剂无干扰。此方法专属性好。

2.7.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品贮备液

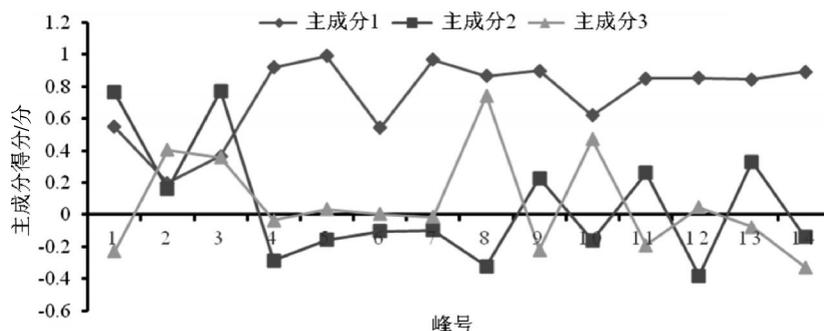


图3 14个共有峰3个主成分的排序坐标图

Fig.3 Score plot of 14 common peaks of the 3 principal components

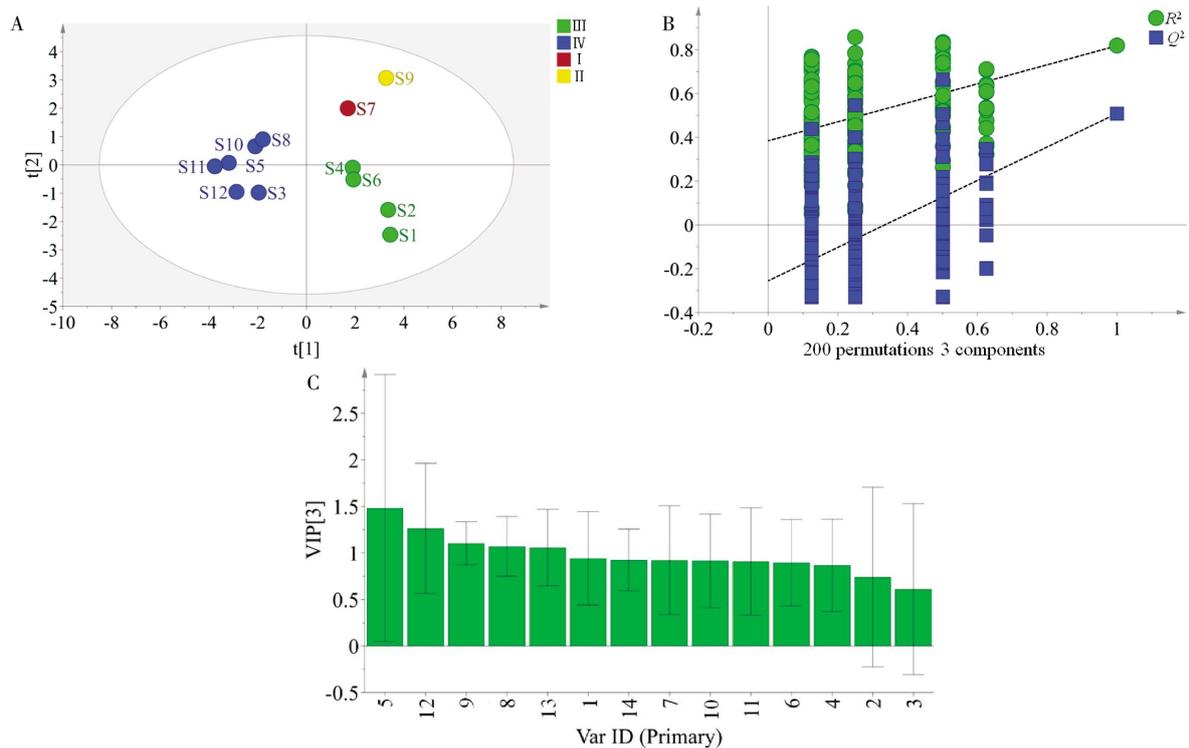


图4 12批贯叶连翘药材样品 PLS-DA 得分图(A)、模型置换检验结果(B)与变量贡献度图(C)

Fig.4 PLS-DA score plot (A), model permutation test results (B), and variable contribution plot (C) for 12 batches of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples

(金丝桃苷为 $0.833\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 槲皮素 $0.754\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 金丝桃素 $0.129\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) $0.08, 0.2, 0.5, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0\ \text{mL}$, 置于 $10.0\ \text{mL}$ 容量瓶中, 加 75% 甲醇定容至刻度, 摇匀。分别按“2.1”项下色谱条件分析, 测定峰面积, 以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归。结果表明, 金丝桃苷在 $0.066\ 64\sim 8.330\ \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好, 回归方程 $Y=13\ 112X+13.794$, $r=0.999\ 9$; 槲皮素在 $0.060\ 32\sim 7.540\ \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好, 回归方程 $Y=8\ 346.4X-51.736$, $r=0.999\ 2$; 金丝桃素在 $0.010\ 32\sim 1.290\ \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好, 回归方程 $Y=5\ 141.2X+6.626\ 3$, $r=0.999\ 9$ 。

2.7.3 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液按“2.1”项下色谱条件进样分析, 连续进样6次, 结果金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素峰面积的RSD分别为 0.63% 、 0.55% 及 0.41% (重复6次), 表明仪器精密度良好。

2.7.4 稳定性试验 取S1样品溶液按“2.1”项下色谱条件进样, 分别于 $0, 4, 8, 12, 24, 48\ \text{h}$ 测定, 记录金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素的峰面积。其峰面积的RSD分别为 1.62% 、 1.45% 及 1.20% (重复6次)。结

果表明 $48\ \text{h}$ 内样品的稳定性良好。

2.7.5 重复性试验 取S1样品粉末(过五号筛), 按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 计算金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素的含量。结果表明, 本法有良好的重复性, 金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素含量的RSD分别为 1.25% 、 1.26% 、 1.10% 。

2.7.6 加样回收率试验 取已知含量的贯叶连翘粉末约 $0.5\ \text{g}$ (金丝桃苷含量为 $0.324\ 7\%$, 槲皮素含量为 $0.189\ 7\%$, 金丝桃素含量为 $0.034\ 7\%$)共6份, 精密称定。分别加入 $2\ \text{mL}$ “2.2”项下混合对照溶液, 按“2.3”项下方法制备, 依法测定, 计算金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素的平均回收率分别为 100.52% 、 101.26% 、 99.57% , RSD分别为 1.23% 、 1.37% 、 1.69% , 表明该方法的回收率良好。

2.7.7 样品含量测定 取12批不同产区贯叶连翘样品粉末约 $1\ \text{g}$, 精密称定, 每个产地平行3份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样分析。测定样品中金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素的含量。不同产地贯叶连翘样品中金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素成分含量均有不同程度的差异。

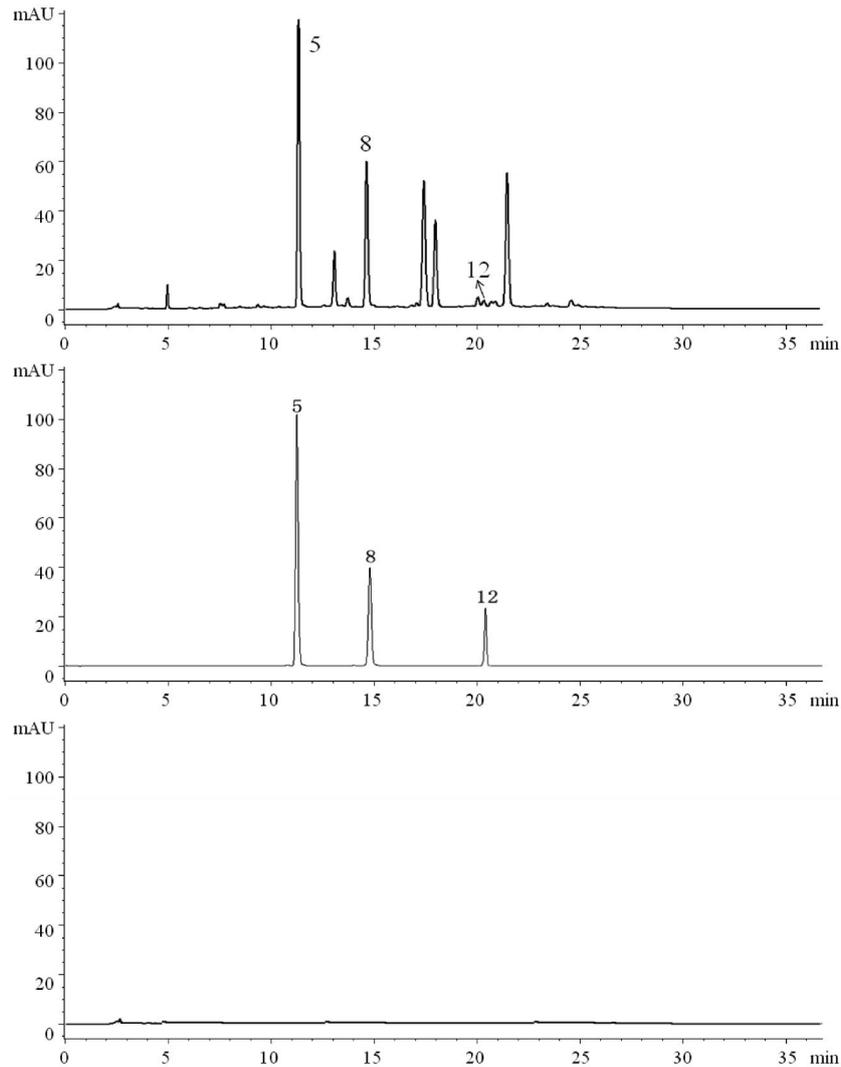


图5 贯叶连翘药材样品(A)、混合对照品(B)及空白溶剂(C)的 HPLC 色谱图

Fig.5 HPLC chromatograms of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples (A), mixed reference substance (B), and blank solvent (C)

可能与药材产地、环境因子、生长年限及采集时间等因素有关。12 批贯叶连翘中金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素成分的含量均值分别为 0.461 4%、0.276 0%、0.051 4%，结果见表 5。同时对含量测定结果进行聚类热图分析，如图 6 所示，不同产地的贯叶连翘样品中金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素成分含量均存在不同程度的差异，聚类热图可将 12 批贯叶连翘药材分为 4 类，产地 I 类(S7 为陕西镇坪县)和产地 II 类(S9 为陕西旬阳县)的金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素含量远高于产地 III 类(S1、S2、S4、S6 分别为甘肃省高台县、金塔县，贵州省仁怀县、江口县)与产地 IV 类(S3、S5、S8、S10、S11、S12 分别为湖南省炎陵县、武冈市、桑植县、宜章县)，其中产地 I 类和 II 类的 3 个黄酮成分含量总体差异不大。结果与 HCA 和 PLS-DA 分析结果一致。

表 5 12 批贯叶连翘药材中金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素的含量

Table 5 Content of hyperoside, quercetin, and hypericin in 12 batches of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples

样品编号	金丝桃苷/%	槲皮素/%	金丝桃素/%	总计/%
S1	0.668 6	0.282 7	0.071 2	1.022 5
S2	0.534 5	0.330 6	0.079 0	0.944 1
S3	0.299 6	0.250 4	0.013 7	0.563 7
S4	0.630 5	0.337 5	0.054 6	1.022 6
S5	0.324 7	0.189 7	0.034 7	0.549 1
S6	0.528 4	0.268 9	0.064 3	0.861 6
S7	0.639 7	0.444 5	0.109 3	1.193 5
S8	0.380 1	0.220 6	0.019 5	0.620 2
S9	0.706 5	0.542 3	0.109 5	1.358 3
S10	0.254 4	0.184 3	0.020 2	0.458 9
S11	0.247 5	0.121 2	0.017 1	0.385 8
S12	0.322 2	0.138 7	0.023 3	0.484 2
平均值	0.461 4	0.276 0	0.051 4	0.788 7

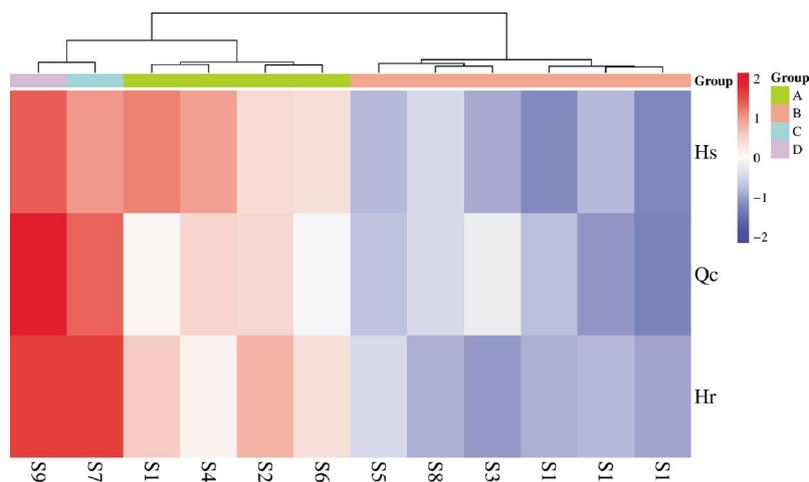


图 6 12 批贯叶连翘药材指标成分含量聚类热图

Fig.6 Clustered heatmap of marker component content in 12 batches of *Hypericum perforatum* L. medicinal material samples

注: Hs. 金丝桃苷 (Hyperoside); Qc. 槲皮素 (Quercetin); Hr. 金丝桃素 (Hypericin)。

3 讨论

3.1 样品提取条件与色谱条件考察

实验先后考察了不同提取溶剂(50%甲醇、75%甲醇、甲醇及95%乙醇)、提取方式(超声提取,加热回流提取)、提取时间(30、45、60 min)及料液比(1:25、1:50、1:100),结果显示75%甲醇作为提取溶剂,超声提取45 min,料液比为1:50,色谱峰数目较多,提取效率高且简单方便,而95%乙醇作为提取溶剂时,色谱峰数目过多影响金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素的分离,综合分析最终选择75%甲醇作为提取溶剂,超声处理45 min及料液比1:50作为提取条件。实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水作不同流动相体系,梯度洗脱,贯叶连翘中部分化学成分能较好的基线分离,考虑经济原因,故采用甲醇-水作为流动相。在上述两种流动相系统,为了改善金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素的峰形。在此基础上,实验分别加入0.05%、0.1%、0.5%的磷酸,结果显示0.1%磷酸水效果更好。同时也考察了不同波长(254、270、360 nm)及柱温对分离的影响,结果显示实验所用条件为最佳条件。

3.2 指纹图谱建立与指标性成分的选择

有关贯叶连翘黄酮类化合物分离研究报道中,金丝桃苷、槲皮素容易得到,目前市场上也有相应的对照品。金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素均属于黄酮类化合物,是贯叶连翘中最重要的活性成分之一,

其中金丝桃苷与金丝桃素具有很好的抗抑郁、促进记忆、抗阿尔茨海默病的疗效,是国际医药市场上最重要抗抑郁制剂的原料^[16-18];槲皮素属于黄酮类中五羟基黄酮,对出血性疾病、循环障碍、动脉粥样硬化等具有较高疗效^[19-20]。此外,金丝桃苷、槲皮素及金丝桃素还具有抗病毒、抗肿瘤、提高记忆力、抗氧化等多种生物活性,在新型药物和天然保健品中具有广泛的应用前景^[21-22]。故最终选择其作为指标性成分。

3.3 分析方法评价

本研究建立了 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定的分析方法,完成了统一色谱条件下对贯叶连翘药材进行定性和定量分析的目的,补充了目前贯叶连翘药材质量标准过于简单的空缺,可以为贯叶连翘质量标准制订提供科学的实验依据。同时运用 HCA、PCA 和 PLS-DA 分析,HCA 分析将 12 批药材分为 4 类,结合含量测定结果,可以划分为:以陕西省为主产区的贯叶连翘,药材质量较优;以甘肃省、贵州省为主产区的贯叶连翘,药材质量次之;以湖南省为主产区的贯叶连翘,药材质量较差。通过 PCA 和 PLS-DA 分析,3 个主成分累计贡献率达 88.484%,进一步分析筛选出区分贯叶连翘药材产地和品质的 5 个特征成分,通过与对照品及其紫外光谱图对比指认出其中 3 个,分别为金丝桃苷、槲皮素、金丝桃素,可作为区分贯叶连翘药材产地和评价贯叶连翘药材品质的质量标志物。未知的 9 号、13

号峰,可通过质谱分析进行确定。三者分析方法相互验证和补充,可以为贯叶连翘药材质量评价提供参考。由于收集样品的批次有限以及产地有限,后续可以收集更多产地贯叶连翘药材,采用本研究建立的分析方法进行确认,制定符合市场要求、促进产业可持续发展的质量评价标准。

参考文献

- [1] ROY U. American herbal pharmacopoeia: *Hypericum perforatum* L.[J]. *Herbal Gram*, 1997, 40:1-16.
- [2] LINDE K, RAMIREZ G, MULROW C D, et al. St John's wort for depression: An overview and meta-analysis of randomised clinical trials[J]. *BMJ*, 1996, 313(7052): 253-258.
- [3] The United States Pharmacopoeial Convention. The United States pharmacopoeia and national formulary[M]. The United States Pharmacopoeial Convention, Inc, 2022: 1022.
- [4] BARNES J, ARNASON J T, ROUFOGALIS B D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): Botanical, chemical, pharmacological and clinical advances[J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2019, 71(1): 1-3.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 9[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 366.
- [6] VELINGKAR V S, GUPTA G L, HEGDE N B. A current update on phytochemistry, pharmacology and herb-drug interactions of *Hypericum perforatum*[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2017, 16(4): 725-744.
- [7] 金月, 李富云, 谢静, 等. 贯叶连翘的历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2024, 43(3): 82-89.
- [8] 宋小妹, 王薇. 太白七药原色图谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010: 22-23.
- [9] 《福建省中药饮片炮制规范》编写组. 福建省中药饮片炮制规范[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2012: 141.
- [10] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准: 2003年版[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 238.
- [11] 张立军, 戴海蓉, 杨志军, 等. 高乌头炮制前后镇痛抗炎活性部位 HPLC 指纹图谱建立及质量研究[J]. *中草药*, 2017, 48(12): 2442-2447.
- [12] 张立军, 张新玥, 李鹏, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合一测多评法的葛花质量控制研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2024, 36(2): 233-242.
- [13] 范欣荣, 张乐怡, 罗莎, 等. 基于指纹图谱-网络药理学-多指标定量分析预测树参中的差异活性成分[J]. *中草药*, 2025, 56(6): 2122-2134.
- [14] WANG Y, ZUO Z T, WANG Y Z. Pattern recognition: An effective tool for quality assessment of herbal medicine based on chemical information[J]. *Journal of Chemometrics*, 2021, 35(3): e3305.
- [15] 张立军, 张新玥, 马冬妮, 等. 基于大数据与模式识别技术对中药材品质的快速评价研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(4): 630-639.
- [16] GUO Y, HUANG F, SUN W G, et al. Unprecedented polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols with anti-Alzheimer's activity from St. John's wort[J]. *Chemical Science*, 2021, 12(34): 11438-11446.
- [17] JIANG Z M, WANG F F, ZHAO Y Y, et al. *Hypericum perforatum* L. attenuates depression by regulating Akkermansia muciniphila, tryptophan metabolism and NFκB-NLRP2-Caspase1-IL1β pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155847.
- [18] CAPASSO R, BORRELLI F, AVIELLO G, et al. Inhibitory effect of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on rat gastric motility[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2008, 376(6): 407-414.
- [19] ZHOU Y K, QIAN C, TANG Y, et al. Advance in the pharmacological effects of quercetin in modulating oxidative stress and inflammation related disorders[J]. *Phytotherapy Research*, 2023, 37(11): 4999-5016.
- [20] 张舒宁, 叶淳, 兰清华, 等. 槲皮素的生药资源、药理作用及主要剂型研究进展[J]. *温州医科大学学报*, 2025, 55(1): 66-74.
- [21] MENEGAZZI M, MASIELLO P, NOVELLI M. Anti-tumor activity of *Hypericum perforatum* L. and hyperforin through modulation of inflammatory signaling, ROS generation and proton dynamics[J]. *Antioxidants*, 2020, 10(1): 18.
- [22] ALLEGRA A, TONACCI A, SPAGNOLO E V, et al. Antiproliferative effects of St. John's wort, its derivatives, and other *Hypericum* species in hematologic malignancies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 22(1): 146.

(本文编辑 苏维)