

# 基于总量统计矩分析法的金银花、山银花 HPLC 指纹图谱评价

刘惠, 杨姣, 朱志飞, 樊启猛, 周晋\*, 贺福元\*

(湖南中医药大学药学院, 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室,  
中医药超分子机理与数理特征化实验室, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:以总量统计矩分析法为分析手段,以金银花与山银花为模型药物,采用总量统计矩分析法对金银花与山银花 HPLC 指纹图谱进行评价,研究二者整体化学成分性质的异同性,旨在为阐述二者“异源同效”现象本质提供助力。方法:分别建立不同批次的金银花、山银花 HPLC 指纹图谱,采用总量统计矩法对不同批次金银花、不同批次山银花、金银花与山银花之间的统计矩参数及相似性进行评价。结果:10 批金银花样品总量统计矩参数  $AUC_T, \bar{\lambda}_T, \bar{\sigma}_T^2$  的 RSD 分别为 27.537%, 1.685%, 8.346%; 10 批山银花样品总量统计矩参数的  $AUC_T, \bar{\lambda}_T, \bar{\sigma}_T^2$  的 RSD 分别为 14.752%, 2.155%, 2.882%。10 批金银花指纹图谱相似度均在 0.92 以上,10 批山银花指纹图谱均在 0.93 以上。然后进行 10 批金银花与 10 批山银花指纹图谱两两比较,其相似度在 0.84 以上。结论:金银花与山银花的指纹图谱相似度很高,表明金银花与山银花整体化学成分性质及构成比存在相似性,这便为研究二者“异质同效”现象的本质奠定了实验基础。

**[关键词]** 金银花; 山银花; 异质等效; 总量统计矩; 相似度

**[中图分类号]** R284.1; R281; R282.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)21-0132-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191315

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190320.1615.002.html>

**[网络出版时间]** 2019-03-21 9:49

## Evaluation of HPLC Fingerprint of *Lonicerae Japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos Based on Total Statistical Moment Analysis Method

LIU Hui, YANG Jiao, ZHU Zhi-fei, FAN Qi-meng, ZHOU Jin\*, HE Fu-yuan\*

(*Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica, Hunan Provincial Key Laboratory of Drugability and Preparation Modification of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine Changsha 410208, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the HPLC fingerprints of *Lonicerae Japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos by total statistical moment analysis, in order to provide a basis for studying the nature of the "heterologous effect" phenomenon. **Method:** HPLC fingerprints of *Lonicerae Japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos were established, and the statistical moment parameters and similarity were evaluated by total statistical moment method. **Result:** According to the total statistical moment parameters of the 10 batches of *Lonicerae Japonicae* Flos samples, RSDs of  $AUC_T, \bar{\lambda}_T, \bar{\sigma}_T^2$  were 27.537%, 1.685%, and 8.346%. According to the total statistical moment parameters of the 10 batches of *Lonicerae* Flos samples, RSDs of  $AUC_T, \bar{\lambda}_T, \bar{\sigma}_T^2$  were 14.752%, 2.155% and 2.882%. The similarity of 10 batches of *Lonicerae Japonicae* Flos fingerprints was above 0.92, and the similarity of 10 batches of

**[收稿日期]** 20181119(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81573691, 81703824, 81874507, 81803729, 81874344); 湖南省自然科学基金项目(2017JJ3236, 2016JJ4065); 湖南省教育厅基金项目(17B200); 湖南省“国内一流培育学科”药学开放基金项目; 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室开放基金项目; 2011 协同创新中心资助; 国家留学基金项目

**[第一作者]** 刘惠, 在读硕士, E-mail: 1248086553@qq.com

**[通信作者]** \* 周晋, 硕士生导师, 副教授, E-mail: hnzhoujin@sina.com;

\* 贺福元, 博士生导师, 教授, E-mail: pharmsharking@tom.com

Lonicerae Flos were above 0.93. The 10 batches of Lonicerae Japonicae Flos and the 10 batches of Lonicerae Flos fingerprints were compared, and the similarity was above 0.84. **Conclusion:** According to the results, the similarity of the Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos fingerprints was very high, which indicated a similarity in chemical composition and composition ratio between Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos. This may be a prerequisite for the phenomenon of "heterologous effects".

[ **Key words** ] Lonicerae Japonicae Flos; Lonicerae Flos; heterologous effect; total statistical moment; similarity

中药及其复方均为成分极其复杂的体系,其多成分通过与人体多靶点结合,产生整体综合效应。为便于中药及复方质量把控,多采用 HPLC, HPCE, GC, GC-MS 及 HPLC-MS 等方法建立起其指纹图谱,达到定性定量鉴别的目的<sup>[1-4]</sup>。中药指纹图谱在一定程度上反应了中药内部化学成分含量及其化学性质特点,具有特征性与模糊性<sup>[5-7]</sup>。因此,药物指纹图谱相似程度,可作为评判药物性质相似性的依据之一。常见的中药指纹图谱评价方法有直观分析法、主成分分析法、聚类分析法、相关系数法、夹角余弦法等<sup>[8-13]</sup>。其中,总量统计矩分析法是本实验团队早期建立的一种能定性定量研究中中药指纹图谱的方法<sup>[14-15]</sup>,并通过一系列的实验验证,表明该法在指纹图谱数学分析方面有其明显的优势:①抗干扰性,该方法对测试方法的要求有所降低,各峰的状态、形状、重复性、稳定性、共有与非共有没有严格的要求;②加和性,能用来消除仪器的干扰,对复方进行拆方、合方研究;③偶联性,能与多维向量偶联构成多维曲线中心矩及偏差分析。

金银花与山银花为临床典型的“异源同效”中药,二者在药材化学成分种类及含量上均存在差异,却拥有相同的临床疗效<sup>[16-19]</sup>。但直至目前为止,依旧没有公认的理论或科学手段来解释这种现象。因此,本文以总量统计矩理论为基础,以金、山银花为模型药物,运用总量统计矩分析方法对金、山银花指纹图谱进行解析,试图对二者整体化学成分性质及构成比进行比较,奠定阐释“异源同效”现象的基础。

### 1 基本原理

**1.1 总量统计矩分析法** 基于色谱理论和统计学方法,本实验室前期已建立了可对中药指纹图谱进行评价的统计矩分析方法。总量统计矩法包括 4 个参数,以此 4 个参数对指纹图谱性质进行刻画,达到定性定量分析中药的目的<sup>[20-21]</sup>。

①总量零阶矩  $AUC_T$ , 即一定总量下曲线的总响应面积;式(1)为线性药物,式(2)为非线性药物。

$$AUC_T = \int_0^{\infty} \sum_{i=1}^r M_i e^{-\alpha t} dt = \sum_{i=1}^r \frac{M_i}{\alpha_i} \quad (1)$$

$$AUC_T = \frac{k_m c_0}{V_m} + \frac{c_0^2}{2V_m} \quad (2)$$

②总响应率  $AUCPW_T$ ;为  $AUC_T$  与进样总量  $W_T$  的比值。

$$AUCPW_T = \frac{C_T \sum_{j=1}^m K_{ij} \cdot K_{cj}}{C_T f_T} = f_T \sum_{j=1}^m K_{ij} \cdot K_{cj} \quad (0 < \lambda < t) \quad (3)$$

③总量一阶矩  $MCRT_T$ , 亦总量中心矩或总量平均保留时间,用  $\bar{\lambda}_T$  表示。

$$\lambda_T = \frac{\sum_{j=1}^m \int_0^{\lambda} \lambda R_j d\lambda}{\sum_{j=1}^m \int_0^{\lambda} R_j d\lambda} = \frac{\sum_{j=1}^m A_j \lambda_j}{\sum_{j=1}^m A_j} \quad (0 < \lambda < t) \quad (4)$$

④总量二阶矩  $VCRT_T$ , 为平均保留时间方差,用  $\bar{\sigma}_T^2$  表示。

$$\bar{\sigma}_T^2 = \frac{\sum_{j=1}^m \int_0^{\lambda} (\lambda - \lambda_T)^2 R_j d\lambda}{\sum_{j=1}^m \int_0^{\lambda} R_j d\lambda} = \frac{\sum_{j=1}^m A_j (\sigma_j^2 + \lambda_j^2)}{\sum_{j=1}^m A_j} - \lambda_T^2 \quad (0 < \lambda < t) \quad (5)$$

其中  $AUC_T$  可用于定量分析,  $AUCPW_T$ ,  $MCRT_T$ ,  $VCRT_T$  用于定性分析。

**1.2 总量统计矩相似度法** 本实验室根据总量统计矩与正态分布曲线的转换性质,建立了总量统计矩相似度法,并通过相关实验研究,验证了该方法的准确性与可靠性<sup>[22-23]</sup>。

**1.2.1 总量统计矩相似度参数** 总量统计矩两参数的一阶矩和二阶矩为正态分布的总体均数和方差,可表达整张图谱的峰均数和离散程度。指纹图谱的概率密度函数为式(6)。

$$F(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(t-\mu)^2}{2\sigma^2}} dt \quad (-\infty < t < +\infty) \quad (6)$$

设两指纹图谱的总量统计矩一阶矩分别为  $t_{T1}$ ,  $t_{T2}$ , 二阶矩分别为  $\sigma_{T1}$ ,  $\sigma_{T2}$ , 其  $\sigma_{T1} > \sigma_{T2}$ 。两指纹图谱正态曲线下相交点 A 和 B 可根据式(7)求得。

$$\frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{T1}} e^{-\frac{t-t_{T1}}{2\sigma_{T1}^2}} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{T2}} e^{-\frac{t-t_{T2}}{2\sigma_{T2}^2}} \quad (-\infty < t < +\infty) \quad (7)$$

$$t_{1(2)} = \frac{(t_{T1}\sigma_{T2}^2 - t_{T2}\sigma_{T1}^2) \pm \sqrt{(t_{T1}\sigma_{T2}^2 - t_{T2}\sigma_{T1}^2)^2 - (\sigma_{T2}^2 - \sigma_{T1}^2) \left( 2\sigma_{T1}^2\sigma_{T2}^2 \ln \frac{\sigma_{T1}}{\sigma_{T2}} + \sigma_{T2}^2 t_{T1}^2 - \sigma_{T1}^2 t_{T2}^2 \right)}}{\sigma_{T2}^2 - \sigma_{T1}^2} \quad (9)$$

则可定义指纹图谱的相似度  $S$  为两指纹图谱正态曲线下重叠面积之和, 见图 1B。计算式为式(10)。

$$S = 1 - \left| \int_{t_1}^{t_2} \left( \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{T1}} e^{-\frac{t-t_{T1}}{2\sigma_{T1}^2}} - \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{T2}} e^{-\frac{t-t_{T2}}{2\sigma_{T2}^2}} \right) dt \right| \quad (-\infty < t < +\infty) \quad (10)$$

存在 3 种情况: ①当  $\sigma_{T1} = \sigma_{T2}$ ,  $t_{T1} \neq t_{T2}$ ,  $t_{T1} > t_{T2}$  时, 见图 1A, 两正态曲线有一个交点  $\lambda$ , 为式(11), 指纹图谱的相似度  $S$  计算式为式(12)。

$$t = \frac{t_{T1} + t_{T2}}{2} \quad (11)$$

$$S = 1 - \left| \int_{-\infty}^t \left( \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{T1}} e^{-\frac{t-t_{T1}}{2\sigma_{T1}^2}} - \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{T2}} e^{-\frac{t-t_{T2}}{2\sigma_{T2}^2}} \right) dt \right| \quad (-\infty < t < +\infty) \quad (12)$$

②当  $\sigma_{T1} = \sigma_{T2}$ ,  $t_{T1} = t_{T2}$ , 见图 1C, 两正态曲线完全重叠, 其总量统计矩参数的相似度为 1。

③当  $\sigma_{T1} \neq \sigma_{T2}$ ,  $t_{T1} \neq t_{T2}$ ,  $\sigma_{T1} > \sigma_{T2}$  时, 见图 1B, 两正态曲线有 2 个交点为式(9), 相似度按式(10)计算。

**1.2.2 总量统计矩相似度模型建立** ①总量统计矩标准相似度, 即 1 减标准正态分布曲线在置信区间  $[-D_r, D_r]$  积分面积, 见式(13)。

$$S_\mu = 1 - \left| \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx - \int_{y_1}^{y_2} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{y^2}{2}} dy \right| \quad (-\infty < x, y < +\infty) \quad (13)$$

$$\text{其中 } x^2 = \frac{(t - t_{T1})^2}{\sigma_{T1}^2}, y^2 = \frac{\left( x - \left( \frac{t_{T2} - t_{T1}}{\sigma_{T1}} \right) \right)^2}{\frac{\sigma_{T2}^2}{\sigma_{T1}^2}},$$

而  $x_{1(2)}, y_{1(2)}$  分别见式(14), (15)。

$$x_{1(2)} = \frac{t_{1(2)} - t_{T1}}{\sigma_{T1}} \quad (14)$$

$$y_{1(2)} = x_{1(2)} \frac{\sigma_{T1}}{\sigma_{T2}} - \left( \frac{t_{T2} - t_{T1}}{\sigma_{T2}} \right) \quad (15)$$

总离差, 式(13)给出的标准正态分布置信区间差异可用标准正态分布置信区间变量  $D_r$  表示, 为式(16)。当  $x, y, u$  合并为一个变量  $x$  时, 表示为等

整理得方程(8)

$$(\sigma_{T2}^2 - \sigma_{T1}^2)t^2 - 2(t_{T1}\sigma_{T2}^2 - t_{T2}\sigma_{T1}^2)t + (2\sigma_{T1}^2\sigma_{T2}^2 \ln \frac{\sigma_{T1}}{\sigma_{T2}} + \sigma_{T2}^2 t_{T1}^2 - \sigma_{T1}^2 t_{T2}^2) = 0 \quad (8)$$

解之得两解  $t_1, t_2$  分别为式(9)。

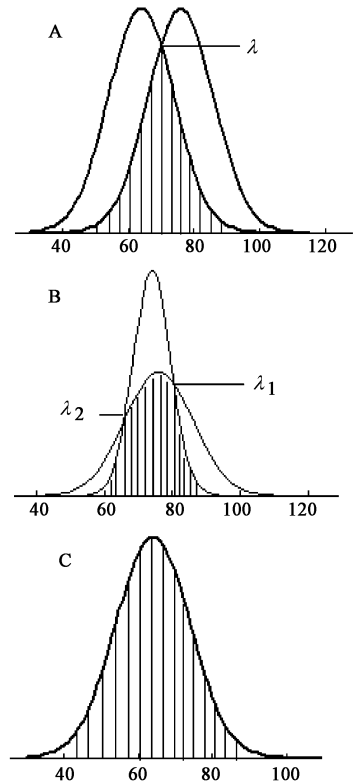


图 1 一个交点(A), 两个交点(B), 重叠时(C)的相似度

Fig.1 Similarity of one intersection (A), two intersection (B), overlap (C)

式(17)。将等式(17)代入等式(13), 则为等式(18)。

$$\left| \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx - \int_{y_1}^{y_2} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{y^2}{2}} dy \right| = \int_{-D_r}^{D_r} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\mu^2}{2}} d\mu \quad (-\infty < x, y, \mu < +\infty) \quad (16)$$

$$\left| \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx - \int_{y_1}^{y_2} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{y^2}{2}} dy \right| = \int_{-D_r}^{D_r} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx \quad (-\infty < x < +\infty) \quad (17)$$

$$\int_{-\infty}^{-D_r} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx = \frac{s_\mu}{2} \quad (18)$$

③总差异度指总离差所引起标准正态分布的累积概率, 即为标准正态分布  $[-D, D]$  区间对应的概

率,其值越小,说明离均程度越低,变异程度越低,越来源于同一个样本,其值为  $1 - S_s$ 。

④总相似度与总差异的把握度,即作出两正态概率分布曲线具有差异和无差异的把握度和所犯的两类错误的概率。当给定检验水准  $\alpha$  时(犯拒绝实际上两样本相似的 I 型错误的概率),对应得  $\mu_\alpha$ ,由于  $\mu_{10} - \mu_{20} = 2D_T = \mu_\alpha + \mu_\beta$ ,则求得  $\mu_\beta = 2D_T - \mu_\alpha$ ,可求得接受两样本来源于同一整体总相似度的把握度  $\beta$ (犯接受实际上两样本相似的 II 型错误的概率)。 $1 - \beta$  为接受总差异的把握度,即来源于不同样本存

在总差异把握度或为检验效能。按式(19)计算。

$$\beta = 1 - \int_{-\infty}^{D_T - \mu_\alpha} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx \quad (-\infty < D_T < +\infty)$$

$$1 - \beta = \int_{-\infty}^{D_T - \mu_\alpha} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx \quad (19)$$

**1.2.3 标准相似度临界值** 根据上式,当给定检验水准  $\alpha(u_\alpha)$  后,可算出与总量统计矩相似度对应的  $\beta$  值,在作出两样本相似与否结论时承担可能犯统计检验 I, II 错误的概率。表 1 列出了在检验水准  $\alpha(\mu_\alpha)$  下  $\beta$  值。

表 1 TQSM 的标准均值变异性,变量概率,变量置信概率和相似度

Table 1 Standard mean variability, variable probability, variable confident probability and similarity for TQSM

参数	关键值																
$\alpha$	0.01	0.753	0.530	0.500	0.274	0.180	0.100	0.057	0.043	0.030	0.021	0.015	0.010	0.007	0.006	0.005	0.005
	0.05	0.901	0.750	0.726	0.500	0.376	0.248	0.164	0.131	0.099	0.076	0.058	0.044	0.033	0.029	0.026	0.025
	0.10	0.945	0.839	0.820	0.624	0.500	0.358	0.253	0.210	0.166	0.131	0.104	0.082	0.064	0.056	0.051	0.050
	0.20	0.975	0.912	0.900	0.752	0.642	0.500	0.382	0.330	0.273	0.225	0.185	0.152	0.124	0.111	0.102	0.100
	0.30	0.986	0.945	0.936	0.823	0.729	0.597	0.478	0.423	0.359	0.305	0.258	0.216	0.181	0.165	0.153	0.150
	0.40	0.992	0.964	0.957	0.869	0.790	0.670	0.556	0.500	0.434	0.376	0.325	0.278	0.237	0.218	0.203	0.200
	0.50	0.995	0.975	0.970	0.901	0.834	0.727	0.620	0.566	0.500	0.440	0.386	0.335	0.291	0.269	0.253	0.250
	0.60	0.997	0.983	0.979	0.924	0.869	0.775	0.675	0.624	0.560	0.500	0.444	0.392	0.345	0.321	0.303	0.300
	0.70	0.998	0.988	0.985	0.942	0.896	0.814	0.724	0.675	0.614	0.555	0.500	0.446	0.397	0.372	0.353	0.350
	0.80	0.999	0.991	0.990	0.956	0.918	0.848	0.767	0.722	0.665	0.608	0.554	0.500	0.450	0.425	0.405	0.401
	0.90	0.999	0.994	0.993	0.967	0.936	0.876	0.804	0.763	0.709	0.655	0.603	0.550	0.500	0.474	0.454	0.450
$1 - \alpha$	0.01	0.753	0.530	0.500	0.274	0.180	0.100	0.057	0.043	0.030	0.021	0.015	0.010	0.007	0.006	0.005	0.005
	0.05	0.901	0.750	0.726	0.500	0.376	0.248	0.164	0.131	0.099	0.076	0.058	0.044	0.033	0.029	0.026	0.025
	0.10	0.945	0.839	0.820	0.624	0.500	0.358	0.253	0.210	0.166	0.131	0.104	0.082	0.064	0.056	0.051	0.050
	0.20	0.975	0.912	0.900	0.752	0.642	0.500	0.382	0.330	0.273	0.225	0.185	0.152	0.124	0.111	0.102	0.100
	0.30	0.986	0.945	0.936	0.823	0.729	0.597	0.478	0.423	0.359	0.305	0.258	0.216	0.181	0.165	0.153	0.150
	0.40	0.992	0.964	0.957	0.869	0.790	0.670	0.556	0.500	0.434	0.376	0.325	0.278	0.237	0.218	0.203	0.200
	0.50	0.995	0.975	0.970	0.901	0.834	0.727	0.620	0.566	0.500	0.440	0.386	0.335	0.291	0.269	0.253	0.250
	0.60	0.997	0.983	0.979	0.924	0.869	0.775	0.675	0.624	0.560	0.500	0.444	0.392	0.345	0.321	0.303	0.300
	0.70	0.998	0.988	0.985	0.942	0.896	0.814	0.724	0.675	0.614	0.555	0.500	0.446	0.397	0.372	0.353	0.350
	0.80	0.999	0.991	0.990	0.956	0.918	0.848	0.767	0.722	0.665	0.608	0.554	0.500	0.450	0.425	0.405	0.401
	0.90	0.999	0.994	0.993	0.967	0.936	0.876	0.804	0.763	0.709	0.655	0.603	0.550	0.500	0.474	0.454	0.450
1.00	0.999	0.996	0.995	0.975	0.950	0.900	0.836	0.800	0.750	0.700	0.650	0.599	0.550	0.524	0.504	0.500	

## 2 材料

1525 Binary 型 HPLC 泵, Breeze 色谱工作站, 2487 型双通道检测器, 2410 型示差折光检测器(美

国 Waters 公司); SB-5200 DTD 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司), MS205DU 型 1/10 万电子天平(瑞士 Mettler Toledo), EKUP-II-20T 型

超纯水系统(长沙市科临电子科技有限公司)。

绿原酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 R05F6F1,纯度 $\geq 98\%$ ),乙腈(色谱纯,美国天地公司,批号 17095087),甲醇(色谱纯,瑞典欧普森公司,批号 0000406281/03),无水乙醇(分析纯,成都市科隆化学品有限公司,批号 2017060501),磷酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号 20170313)。

金银花药材 J1 ~ J10 均为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica*,山银花药材 S1 ~ S10 均为忍冬科植物灰毡毛忍冬 *L. macranthoides*,以上药材均由湖南中医药大学药学院中药炮制教研室石继连副教授按 2015 年版《中国药典》(一部)有关项下进行鉴别,具体信息见表 2。

表 2 金银花及山银花药材样品信息

Table 2 Medicinal material sample information of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos*

编号	产地	编号	产地
J1	山东	S1	湖南隆回水栗塘
J2	河南	S2	湖南隆回小沙江
J3	河南	S3	湖南隆回
J4	山东	S4	湖南隆回麻塘山乡
J5	河南	S5	湖南
J6	河南	S6	湖南
J7	山东平邑平邑镇	S7	湖南张家界
J8	山东平邑流峪镇	S8	湖南邵阳
J9	河南	S9	湖南新化
J10	河南	S10	湖南隆回

### 3 方法与结果

**3.1 色谱条件** Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.4% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% ~ 8% B; 5 ~ 25 min, 8% ~ 20% B; 25 ~ 35 min, 20% ~ 22% B; 35 ~ 45 min, 22% ~ 30% B; 45 ~ 50 min, 30% ~ 36% B);流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 20 μL,检测波长 238 nm,柱温 30 ℃。

**3.2 样品溶液制备** 药材粉碎,过四号筛,取粉末 1 g,精密称定,置于 25 mL 量瓶内,加入 50% 乙醇 25 mL,称定质量。超声提取 45 min(40 kHz, 300 W, 20 ℃),补足减失质量。过滤,滤液 4 ℃ 保存,进样前 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

#### 3.3 方法学考察

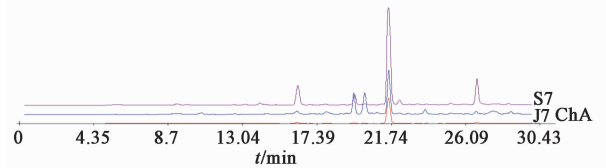
**3.3.1 精密度的试验** 取同一样品溶液,按上述色谱

条件进样 20 μL 测定,重复进样 6 次,测得各共有峰的相对保留时间 RSD 1.6%,各共有峰的相对峰面积 RSD 2.1%,表明实验仪器精密良好。

**3.3.2 重复性试验** 分别取同一批金银花,山银花药材,按 3.2 项下方法操作,分别平行制备 6 份供试品溶液,按上述色谱条件进样 20 μL 测定,测得各共有峰的相对保留时间 RSD 及相对峰面积 RSD 均 < 3%,表明该方法重复性良好。

**3.3.3 稳定性试验** 室温下,分别取金银花,山银花的同一样品溶液,在 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 时按上述色谱条件进样 20 μL 测定,测得各共有峰的相对保留时间 RSD 及相对峰面积 RSD 均 < 3%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

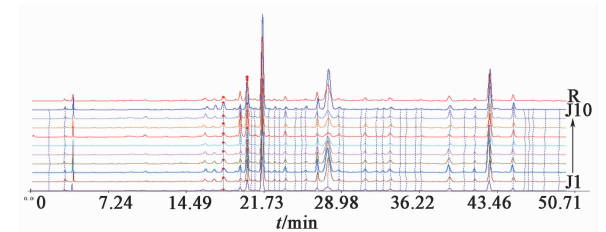
**3.4 金银花与山银花 HPLC 指纹图谱建立** 分别取 10 批金银花药材和山银花药材,按 3.2 项下方法制备供试品溶液,并按照 3.1 项下的色谱条件进样,记录 50 min 内各样品溶液的色谱图,见图 2(其中 ChA 为绿原酸对照品, J7 为金银花样品, S7 为山银花样品),金银花与山银花 HPLC 色谱图分别见图 3, 4。



ChA. 对照品; J7. 金银花; S7. 山银花

图 2 金银花和山银花 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos*



R. 对照指纹谱(图 4 同)

图 3 金银花 HPLC 指纹谱叠加

Fig. 3 HPLC superposition fingerprint of *Lonicerae Japonicae Flos*

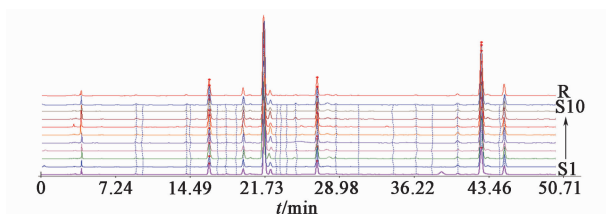


图 4 山银花 HPLC 指纹谱叠加

Fig. 4 HPLC superposition fingerprint of *Lonicerae Flos*

3.5 总量统计矩相似度法分析

花 HPLC 指纹图谱的总量统计矩参数计算结果见

3.5.1 总量统计矩参数计算 10 批金银花与山银

表 3。

表 3 金银花与山银花指纹图谱总量统计矩参数

Table 3 Total statistical moment parameters of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* fingerprint

编号	AUC <sub>T</sub> /μA·s	$\bar{\lambda}_T/\text{min}$	$\bar{\sigma}_T^2/\text{min}^2$	编号	AUC <sub>T</sub> /μA·s	$\bar{\lambda}_T/\text{min}$	$\bar{\sigma}_T^2/\text{min}^2$
J1	38 547 595	26.633	88.861	S1	78 004 445	28.490	104.643
J2	86 871 204	27.199	78.686	S2	92 700 809	30.141	113.993
J3	104 406 416	27.697	86.165	S3	109 275 093	28.959	109.686
J4	93 692 210	27.503	81.817	S4	96 283 831	29.708	115.817
J5	90 017 520	27.282	84.691	S5	118 635 782	29.509	111.004
J6	63 118 595	26.774	86.653	S6	128 974 919	29.050	113.296
J7	81 930 838	26.135	97.032	S7	127 150 924	28.853	114.000
J8	74 553 325	26.910	88.713	S8	112 528 464	28.387	111.785
J9	109 189 037	26.921	98.638	S9	105 671 817	30.189	113.698
J10	120 777 013	27.266	75.708	S10	118 136 794	29.414	114.694

3.5.2 总量统计矩相似度计算 分别计算 10 批金银花相似度结果见表 4,10 批山银花相似度结果见

表 5,10 批金银花与 10 批山银花俩俩间相似度见表 6。

表 4 金银花指纹图谱总量统计矩相似度

Table 4 Totality of statistical moments of *Lonicerae Japonicae Flos* fingerprints

编号	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
J1	1.000 0									
J2	0.963 3	1.000 0								
J3	0.954 2	0.970 5	1.000 0							
J4	0.959 0	0.984 3	0.985 4	1.000 0						
J5	0.970 6	0.981 9	0.981 8	0.987 9	1.000 0					
J6	0.991 8	0.971 4	0.960 4	0.966 4	0.977 6	1.000 0				
J7	0.971 8	0.935 2	0.930 9	0.932 5	0.944 5	0.963 7	1.000 0			
J8	0.988 3	0.969 0	0.965 9	0.969 4	0.981 4	0.992 3	0.963 1	1.000 0		
J9	0.972 7	0.944 4	0.956 3	0.950 0	0.960 9	0.968 2	0.968 1	0.974 3	1.000 0	
J10	0.954 1	0.990 3	0.964 5	0.979 0	0.972 9	0.962 2	0.926 2	0.959 3	0.934 8	1.000 0

表 5 山银花指纹图谱总量统计矩相似度

Table 5 Totality of statistical moments of *Lonicerae Flos* fingerprints

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000 0									
S2	0.934 8	1.000 0								
S3	0.979 6	0.954 8	1.000 0							
S4	0.949 6	0.983 6	0.969 9	1.000 0						
S5	0.959 2	0.975 6	0.979 0	0.987 8	1.000 0					
S6	0.972 7	0.959 2	0.991 6	0.975 1	0.982 3	1.000 0				
S7	0.976 0	0.951 9	0.990 0	0.968 0	0.974 8	0.992 5	1.0000			
S8	0.983 7	0.934 1	0.978 0	0.950 2	0.957 6	0.9749	0.9821	1.0000		
S9	0.933 1	0.998 1	0.953 0	0.981 7	0.974 0	0.9573	0.9500	0.9323	1.0000	
S10	0.960 2	0.972 9	0.980 6	0.988 9	0.991 5	0.9862	0.9790	0.9612	0.9710	1.0000

表 6 各批次金银花与山银花指纹图谱俩俩间的总量统计矩相似度

Table 6 Total statistical moment similarity between two batches of *Lonicerae Japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos

编号	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
S1	0.918 2	0.916 3	0.945 1	0.930 6	0.932 3	0.920 4	0.905 5	0.927 9	0.936 9	0.909 7
S2	0.853 3	0.858 3	0.887 2	0.873 6	0.871 2	0.856 0	0.842 1	0.863 3	0.872 6	0.854 3
S3	0.898 1	0.897 0	0.926 1	0.911 7	0.912 4	0.900 1	0.886 9	0.907 6	0.917 8	0.891 1
S4	0.868 3	0.869 2	0.898 3	0.884 2	0.883 6	0.870 3	0.858 2	0.877 8	0.888 4	0.864 1
S5	0.877 5	0.880 5	0.909 7	0.895 7	0.894 4	0.880 1	0.865 9	0.887 5	0.896 8	0.875 7
S6	0.892 6	0.889 4	0.918 3	0.903 9	0.905 1	0.894 0	0.882 9	0.901 5	0.913 3	0.883 2
S7	0.898 6	0.892 7	0.921 2	0.906 7	0.909 0	0.899 4	0.890 1	0.907 0	0.920 1	0.886 0
S8	0.915 3	0.905 2	0.932 7	0.918 4	0.922 4	0.915 2	0.908 0	0.922 9	0.937 9	0.897 8
S9	0.851 6	0.857 0	0.885 9	0.872 4	0.869 8	0.854 4	0.840 3	0.861 6	0.870 9	0.853 1
S10	0.879 2	0.878 5	0.907 6	0.893 3	0.893 4	0.881 0	0.869 2	0.888 4	0.899 5	0.872 9

#### 4 分析与讨论

由总量统计矩参数计算结果可知,10 批金银花样品总量统计矩参数  $AUC_T, \bar{\lambda}_T, \bar{\sigma}_T^2$  的 RSD 分别为 27.537%, 1.685%, 8.346%; 10 批山银花样品总量统计矩参数  $AUC_T, \bar{\lambda}_T, \bar{\sigma}_T^2$  的 RSD 分别为 14.752%, 2.155%, 2.882%。就金银花统计矩参数而言,其零阶矩变化较大,而一阶矩及二阶矩变化相对较小。这表明不同批次金银花间,药材中化学成分含量存在较大差别,可随产地、时间变化,但其化学成分种类及性质却是很相似的,山银花亦然。

由总量统计矩相似度计算结果可知,10 批金银花指纹图谱相似度均在 0.92 以上,10 批山银花指纹图谱均在 0.93 以上。然后进行 10 批金银花与 10 批山银花指纹图谱俩俩比较,其相似度在 0.84 以上。结果表明 10 批金银花指纹图谱间总体差异较小,10 批山银花指纹图谱间的差异也较小,二者间的指纹图谱色谱行为总体也很相似。说明金银花与山银花整体化学成分性质及构成比的相似性。

中药指纹图谱在一定程度上可对中药及其复方质量进行控制,其中峰数、峰面积、峰高、保留时间及相似度等为指纹图谱常用表征指标。但建立指纹图谱过程会受实验条件及仪器灵敏度的干扰,很可能出现漏掉较小响应值特征峰及增加非特征峰的情况,使得分析结果不稳定,同一有效成分群难以出现完全相同的峰形和峰数,因此采用传统的峰峰对应指纹图谱分析方法很难对其进行准确分析。总量统计矩法从整体作用入手,具有整体性与模糊性,对两张指纹图谱的评价,并非采用单一的两两对比模式。因此对于同一中药指纹图谱,纵然指纹图谱中单峰图谱信息发生变化,只要化学成分整体综合性质稳

定不变,其总量统计矩分析结果便是确定的;而对于不同中药,即便两味中药的化学成分含量、种类及其性质均不完全相同,只要其整体化学成分性质及构成比相似,在指纹图谱中则会体现为相近的总量一、二阶矩及较大相似度。因此通过对两张不同指纹图谱总量零、一、二阶矩及相似度的对比,可对两味中药间的整体化学性质及构成比相似性有所了解,为后续判断提供基础。在本实验中,采用总量统计矩分析法,对金银花与山银花指纹图谱进行了评价。结果表明不同批次间的金银花或山银花指纹图谱相似度较高,金银花化学成分含量可随产地、时间产生变化,但其化学成分种类及性质却是稳定的,山银花亦然,该结果与中药目前的实际情况相符。又通过对金银花与山银花之间的指纹图谱进行分析,发现二者之间存在较高的相似度,表明金银花与山银花中整体化学成分的化学行为是相近的,这很可能便是“异源同效”现象产生的物质基础。

本文运用总量统计矩法对金银花与山银花指纹图谱进行评价。从结果来看,二者的指纹图谱相似度很高,表明金银花与山银花化学整体化学成分性质及构成比存在相似性,这很可能便是二者产生“异源同效”现象的前提条件。且目前临床用药中,存在“异源同效”现象的中药远不止金、山银花。因此,将总量统计矩运用于中药指纹图谱的分析中,不仅能为金、山银花研究提供基础,更能为中医临床用药的科学性提供理论支持。

#### [参考文献]

[1] 谭玲龙,钟凌云,宋嫵,等.地龙炮制品 HPLC 指纹图谱的建立及 5 种成分测定[J].中成藥,2018,40

- (10):2238-2243.
- [ 2 ] 吴珊珊,李玮,何席呈,等. 缩泉丸挥发油 GC-MS 标准指纹图谱的建立[J]. 中药材,2018,41(2):369-372.
- [ 3 ] 陈祥胜,刘艳菊,陈海霞,等. 苍术炒焦前后 GC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(2):24-28.
- [ 4 ] 陈昭,陈伟韬,罗文汇,等. HPLC 法研究土鳖虫镇痛作用与其指纹图谱的关系[J]. 中成药,2016,38(5):1074-1077.
- [ 5 ] 展浩,言方荣,陆涛. 中药指纹图谱数据分析方法研究进展[J]. 安徽农业科学,2017,45(16):203-205.
- [ 6 ] 陈露,张晓萌,林秋婕,等. 指纹图谱在中药质量控制中的研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志,2017,4(45):8909-8910.
- [ 7 ] 陈昭,陈伟韬,罗文汇,等. HPLC 法研究土鳖虫镇痛作用与其指纹图谱的关系[J]. 中成药,2016,38(5):1074-1077.
- [ 8 ] 付小梅,孙菡,刘婧,等. 基于聚类分析和主成分分析的栀子指纹图谱研究[J]. 中草药,2018,49(19):4653-4661.
- [ 9 ] 田润涛,谢培山. 色谱指纹图谱相似度评价方法的规范化研究(一)[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(1):40-42,54.
- [10] 王龙星,肖红斌,梁鑫淼,等. 一种评价中药色谱指纹图谱相似性的新方法:向量夹角法[J]. 药学学报,2002,37(9):713-717.
- [11] 徐妍,杨华蕊,杨永寿,等. 中药指纹图谱研究现状及展望[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(76):91-94.
- [12] 杨岩涛,吴春英,刘文龙,等. 不同相似度法对当归补血汤指纹图谱分析的比较研究[J]. 中华中医药杂志,2013,28(5):1431-1435.
- [13] 陈亮元,程轩轩,唐晓敏,等. 指纹图谱、模式识别结合一测多评法在广金钱草质量评价中的应用研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(16):3322-3328.
- [14] 贺福元,邓凯文,刘文龙,等. 中药复方药物动力学总量统计矩法的实验验证研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(2):253-262.
- [15] 周晋,邓凯文,贺福元,等. 指纹图谱总量统计矩法对补阳还五汤分煎与合煎提取成分变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):79-82.
- [16] 刘玉峰,李鲁盼,马海燕,等. 金银花化学成分及药理作用的研究进展[J]. 辽宁大学学报:自然科学版,2018,45(3):255-262.
- [17] 冯雅兰,董青,庾佳苗,等. 金银花与山银花之“争”[J]. 陕西农业科学,2018,64(7):90-95.
- [18] 杨倩茹,赵媛媛,郝江波,等. 金银花与山银花化学成分及其差异的研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(7):1204-1211.
- [19] 李锦燊,吴洪文. 山银花化学成分与药理活性研究进展[J]. 北方药学,2014,11(2):71-73.
- [20] 段晓鹏,贺福元,周晋,等. 补阳还五汤指纹图谱总量统计矩加合性的研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3247-3252.
- [21] 谢相贵,贺福元,石继连,等. 总量统计矩法与主成分分析对红花 HPLC 指纹图谱的考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):64-69.
- [22] 贺福元,邓凯文,黄胜,等. 总量统计矩标准相似度数学模型的建立及应用研究[J]. 药学学报,2013,48(9):1453-1458.
- [23] 胡超,贺红,杨岩涛,等. 片仔癀 HPLC 指纹图谱的总量统计矩及其相似度法分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(8):53-57.

[责任编辑 顾雪竹]