

Research on Leaf Quality of Hawthorn in Different Months by Combining Fingerprint Atlas with Cluster Analysis

Weiwei Zhou Yanying Wang Jie Liu Yang Yu Haihong Chen Qingyan Kong*

Chengde Food and Drug Inspection and Testing Center/Hebei Yanshan Region Authentic Medicinal Materials Inspection and Testing Technology Innovation Center, Chengde, Hebei, 067000, China

Abstract

Objective: To establish a fingerprint map combined with clustering heatmap for comprehensive analysis of hawthorn leaves in different months in Chengde, Hebei Province, in order to explore their differences. **Method:** Collect 20 batches of hawthorn leaf medicinal materials from July to November, and evaluate the differences in hawthorn leaf samples from different months by combining high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint spectra with cluster heat maps. **Result:** An HPLC fingerprint of hawthorn leaves was established, matching 20 common peaks and identifying 7 compounds. The similarity of the fingerprint spectra ranged from 0.942 to 0.996. The clustering heatmap shows significant differences in the chemical composition of hawthorn leaves during the growth process in different months. **Conclusion:** The HPLC fingerprint and clustering heatmap model of hawthorn leaves established in this study can accurately evaluate the quality differences of hawthorn leaf medicinal materials, providing scientific basis for further optimizing the planting management and harvesting timing of hawthorn leaves.

Keywords

hawthorn leaves; fingerprint spectrum; clustering heatmap; quality difference

指纹图谱结合聚类分析研究不同月份山楂叶质量

周维维 王艳英 刘杰 于扬 陈海红 孔庆岩*

承德市食品药品检验检测中心 / 河北省燕山地区道地药材检验检测技术创新中心, 中国·河北承德 067000

摘要

目的: 建立指纹图谱结合聚类热图, 对河北承德地区不同月份的山楂叶进行全面分析, 以探究其差异。**方法:** 收集20批7—11月份山楂叶药材, 通过高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱结合聚类热图, 评估不同月份山楂叶样品存在的差异。**结果:** 建立了山楂叶HPLC指纹图谱, 匹配20个共有峰, 分别指认出7种化合物, 指纹图谱相似度在0.942~0.996之间。聚类热图显示, 山楂叶在不同月份的生长过程中, 化学成分呈现出显著差异。**结论:** 该研究建立的山楂叶HPLC指纹图谱及聚类热图模型, 能准确评估山楂叶药材质量差异, 为进一步优化山楂叶的种植管理和采收时机提供科学依据。

关键词

山楂叶; 指纹图谱; 聚类热图; 质量差异

1 引言

山楂叶为蔷薇科植物山里红 (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.) 或山楂 (*Crataegus pinnatifida* Bge.) 的干燥叶。具有活血化瘀, 理气通脉, 化浊降脂之功效^[1]。现代研究表明, 山楂叶富含多种生物活性化合物^[2], 其中黄酮

类化合物是山楂叶的主要活性成分, 也是临床发挥增加冠脉血流量、降血压、降血脂等作用的主要物质基础^[3]。山楂叶药材便宜易得, 广泛应用于心脑血管疾病的治疗。随着市场需求不断增加, 确保山楂叶药材质量稳定性成为亟待解决的问题。

本研究在山楂叶的主产区河北承德兴隆县, 采集7—11月份的山楂叶药材20批, 采用指纹图谱技术和聚类热图分析不同生长阶段的山楂叶药材化合物的变化趋势, 结合特定化学成分的变化与山楂叶的药用价值的联系, 为山楂叶药材的合理采收、高效利用和保证质量稳定提供科学依据。

2 仪器与材料

2.1 仪器

电子天平 (瑞士梅特勒 - 托利多公司, AG135 型);

【课题项目】 河北省药品监督管理局科技计划项目 (项目编号: 2022ZC1009)。

【作者简介】 周维维 (1990-), 女, 满族, 中国河北承德人, 硕士, 工程师, 从事中药学研究。

【通讯作者】 孔庆岩 (1981-), 男, 回族, 中国河北承德人, 在职硕士, 高级工程师, 从事食品检验研究。

高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司,1260型)。

2.2 材料

对照品:绿原酸(110753-202119,96.3%)、牡荆素葡萄糖苷(111979-201501,92.8%)、牡荆素(111687-202105,99.1%)、金丝桃苷(111521-202310,94.9%)、芦丁(100080-202012,92.2%)、牡荆素鼠李糖苷(111668-200602),均购自中国食品药品检定研究院;异槲皮素(20112403,98.22%)购自成都普菲德生物技术有限公司。水为娃哈哈纯化水;甲酸、甲醇、乙腈均为色谱纯。20批山楂叶药材均来自河北承德隆化县,经鉴定山楂叶基原均为山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥叶。详细信息见表1。

表1 20批山楂叶药材基本信息

序号	编号	采集时间	序号	编号	采集时间
1	S01	2020.7	11	S11	2020.9
2	S02	2020.7	12	S12	2020.9
3	S03	2020.7	13	S13	2020.10
4	S04	2020.7	14	S14	2020.10
5	S05	2020.8	15	S15	2020.10
6	S06	2020.8	16	S16	2020.10
7	S07	2020.8	17	S17	2020.11
8	S08	2020.8	18	S18	2020.11
9	S09	2020.9	19	S19	2020.11
10	S10	2020.9	20	S20	2020.11

注:上述药材参照《中国药典》2020年版山楂叶标准进行检验,均符合规定。

3 方法与结果

3.1 色谱条件

采用Agilent ZORBAX SB-C18色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温为30℃,流速1.0 mL/min,进样量10 μL,检测波长340 nm。流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)-四氢呋喃(C),梯度洗脱程序见表2。

表2 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	92	4	4
15	90	6	4
22	86	12	2
39	84	14	2
45	82	14	4
50	71	25	4
60	71	25	4
65	0	96	4
70	0	96	4

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取芦丁、绿原酸、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷、异槲皮素对照品适量,用甲醇配制得到浓度分别为360.1 μg/mL、300.4 μg/mL、1101.2 μg/mL、653.9 μg/mL、304.4 μg/mL、401.2 μg/mL、501.4 μg/mL的储备溶液。再精密量取适量,制备成浓度分别为36.01 μg/mL、150.22 μg/mL、550.63 μg/mL、65.39 μg/mL、15.22 μg/mL、20.06 μg/mL、25.07 μg/mL的对照品溶液。

3.2.2 样品溶液的制备

精密称取山楂叶细粉1g,置具塞锥形瓶中,精密加入60%甲醇50 mL,密塞,称定重量,超声处理30 min,冷却至室温,用60%甲醇补足减失的重量,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

3.3 方法学考察

3.3.1 精密度试验

取山楂叶样品溶液(S15),采用2.1项下色谱条件连续分析测定6次,将16号峰(金丝桃苷)设为参照峰(S),结果各共有峰相对保留时间及相对峰面积RSD≤3.0%。表明仪器精密度良好。

3.3.2 重复性试验

取山楂叶样品(S15)细粉,按2.2.1项下方法平行制备6份,采用上述2.1项下色谱条件进样测定,将16号峰(金丝桃苷)设为参照峰(S),结果各共有峰相对保留时间及相对峰面积RSD≤3.0%。该方法重复性良好。

3.3.3 稳定性试验

取山楂叶样品溶液(S15),采用2.1项下色谱条件,分别在0h、2h、4h、8h、12h、24h时间点进行分析,以16号峰(金丝桃苷)为参照峰(S),结果各共有峰相对保留时间及相对峰面积RSD≤3.0%。表明样品稳定性良好。

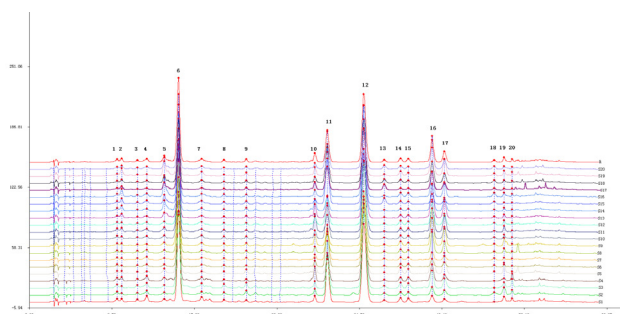
3.4 指纹图谱的建立及分析

取20批山楂叶样品溶液,以2.1项下色谱条件分析测定记录色谱信息,导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)》,多点校正匹配得到20批山楂叶样品的对照指纹图谱及样品指纹图谱叠加图,见图1,相似度分别为0.973,0.972,0.980,0.987,0.967,0.959,0.981,0.958,0.942,0.996,0.983,0.989,0.976,0.968,0.984,0.984,0.990,0.985,0.956,0.985,结果均大于0.900,表明各样品间相似度较好。20批样品共标定了20个共有峰。经对照品指认,得到7个已知化合物(图1)分别为:绿原酸(6号峰)、牡荆素葡萄糖苷(11号峰)、牡荆素鼠李糖苷(12号峰)、牡荆素(13号峰)、芦丁(15号峰)、金丝桃苷(16号峰)、异槲皮素(17号峰)。

3.5 聚类分析

以20批山楂叶指纹图谱共有峰峰面积为变量,导入

MetaboAnalyst 5.0 在线分析系统,选择“数据分析”模式,进行“归一化”处理后,得到 20 批样品共有峰面积的聚类热图,见图 2。聚类热图是数据进行筛选、提取和降维分析后,得到的可直观反映样品接近程度和化学成分含量的关系的图像^[4]。热图显示,每个月份样品特征较为接近,其中 10 月份样品总体峰面积较大,化学成分含量普遍较高;11 月份样品中化学成分含量降低。



R 为对照指纹图谱,6: 绿原酸; 11: 牡荆素葡萄糖苷;
12: 牡荆素鼠李糖苷; 13: 牡荆素; 15: 芦丁; 16: 金丝桃苷;
17: 异槲皮素;

图 1 20 批山楂叶指纹图谱叠加图

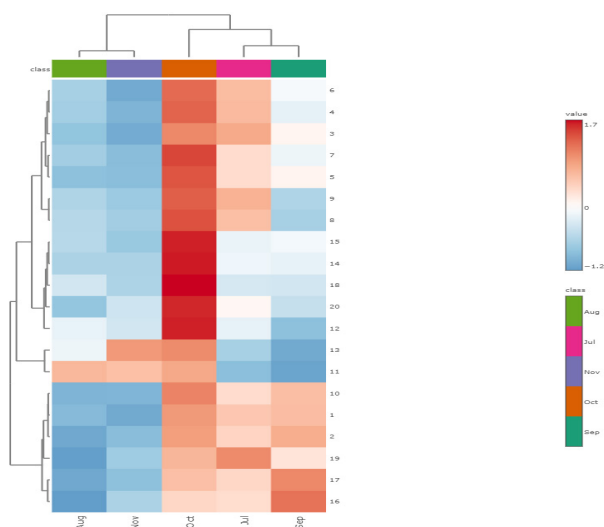


图 2 聚类热图

4 讨论

采用 HPLC 指纹图谱技术,可全面系统地呈现不同生长月份的山楂叶样品的特征物质群的变化。总体来讲,每个月份样品较为接近;通过比较各个月份样品的指纹图谱和聚类热图,可观察到明显的差异。绿原酸、芦丁等组分,在 7 月份样品中含量较高,8—9 月份逐步下降,10 月份到达峰值,11 月份样品中又呈现下降趋势。牡荆素葡萄糖苷和牡荆素在 7—9 月份样品中含量较低,10—11 月份逐渐升高;以上两种成分差异较大,或为影响样品聚类的主要因素。有学者研究表明,牡荆素葡萄糖苷对山楂叶药材质量影响较为显著,可能是影响山楂叶药材质量的差异标志物^[5]。金丝桃苷、异槲皮素等组分则在 9 月份含量最高。这些差异可能与当月气候条件、降雨量、光照强度和土壤养分等环境因素密切相关。为保证药材质量,在不影响山楂果生长的前提下,山楂叶的采收期可尽可能定在 10 月份。

5 结论

本研究通过指纹图谱结合聚类热图技术,对不同月份的山楂叶进行了全面分析,揭示了山楂叶在不同月份的生长条件下,其化学成分呈现出显著的变化趋势。该变化与环境因素、生理代谢和生长阶段密切相关。建立的聚类热图模型,能够准确地区分不同月份的山楂叶样品,还能直观清晰地展现出不同月份样品总体含量的高低,这些发现为山楂叶生长机制和种植管理研究提供了新的视角,可为山楂叶药材质量评估和科学采收提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2020年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 王双艳.山楂叶的化学成分研究[D].天津:天津中医药大学,2020.
- [3] 张祺嘉钰,赵佩媛,孙静,等.山楂的化学成分及药理作用研究进展[J].西北药学杂志,2021,36(3):521-523.
- [4] 李艳荣,杜义龙,沈莹,等.指纹图谱、多成分定量分析及化学模式识别分析相结合的心安胶囊质量评价[J].中国药房,2022,33(6):706-712.
- [5] 李艳荣,段丽颖,魏红,等.指纹图谱结合一测多评法评价山楂叶质量[J].中国药房,2023,34(22):2727-2733.