

基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的旋覆花药材质量评价研究

林 丽¹, 李欢欢¹, 谢 辉¹, 严国俊¹, 胡玉涛^{2*}, 陆兔林^{1*}, 毛春芹^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏联合职业技术学院连云港中医药分院, 江苏 连云港 222000

摘要: 目的 建立旋覆花药材的 HPLC 指纹图谱及同时测定绿原酸、咖啡酸、芦丁、花旗松素、1,5-*O*-二咖啡先奎宁酸、1-*O*-乙酰旋覆花内酯、槲皮素、狭叶依瓦菊素 8 个成分含量的方法, 运用化学计量学对不同产地旋覆花药材进行质量评价。方法 采用 Dubhe C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 205 nm; 进样量 10 μL; 柱温 30 ℃。采用中药指纹图谱相似度评价软件进行相似度分析, 结合主成分分析和偏最小二乘法判别分析寻找并分析 7 个产地旋覆花药材间的差异成分及其分布特点。结果 建立了旋覆花药材的 HPLC 指纹图谱, 相似度为 0.88~0.98, 标定共有峰 20 个, 通过对照品比对指认出绿原酸、咖啡酸、芦丁、花旗松素、1,5-*O*-二咖啡先奎宁酸、1-*O*-乙酰旋覆花内酯、槲皮素、狭叶依瓦菊素 8 个共有峰, 样品一致性良好。通过主成分分析将样品聚为 4 类, 结合偏最小二乘法判别分析发现咖啡酸、绿原酸、1-*O*-乙酰旋覆花内酯等 7 个成分是造成样品差异性的主要标记性成分。含量测定结果表明: 各产地 8 种成分总量江苏>甘肃>河南>浙江>河北>安徽>山东。结论 首次建立了旋覆花药材 HPLC 指纹图谱及倍半萜类、黄酮类、酚酸类多成分含量测定的质量评价方法, 操作简便、结果可靠, 明确了不同产地旋覆花药材间成分差异, 为旋覆花药材的资源开发及利用提供依据。

关键词: 旋覆花; 指纹图谱; 化学计量学; 多成分定量; 绿原酸; 咖啡酸; 芦丁; 花旗松素; 1,5-*O*-二咖啡先奎宁酸; 1-*O*-乙酰旋覆花内酯; 槲皮素; 狭叶依瓦菊素

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)06-1751-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.06.025

Quality study of *Inulae Flos* based on HPLC and chemometrics

LIN Li¹, LI Huan-huan¹, XIE Hui¹, YAN Guo-jun¹, HU YU-tao², LU Tu-lin¹, MAO Chun-qin¹

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Lianyungang TCM Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang 222000, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints and simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, taxifolin, 1,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 1-*O*-acetyl britannilactone, quercetin, ivangustin of *Inulae Flos*, the chemometrics method was used to carry out the quality evaluation of *Inulae Flos* from different producing areas. **Methods** Separation was performed on Hanbon Dubhe C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 205 nm, the injection volume was 10 μL and the column temperature was 30 ℃. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (TCM) was adopted; Principal component analysis (PCA) and discriminant analysis by partial least square method (PLS-DA) were used to identify and analyze the differential components in 35 batches of *Inulae Flos* from seven habitats. **Results** The fingerprints of *Inulae Flos* were established, the similarity was 0.88—0.98. There were 20 common peaks in the fingerprints and 8 common peaks of chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, taxifolin, 1,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 1-*O*-acetyl britannilactone, quercetin, ivangustin were identified by reference substances, indicating good consistency of the samples. The samples were clustered into four categories by PCA. Combined with PLS-DA, seven components, such as caffeic acid, chlorogenic acid, and 1-*O*-acetyl britannilactone, were found

收稿日期: 2020-08-06

基金项目: 国家重点研发计划: 中药饮片质量识别关键技术研究 (2018YFC1707000)

作者简介: 林 丽, 女, 在读硕士, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: 15952788450 E-mail: 1306124026@qq.com

*通信作者: 陆兔林, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: 13951636763 E-mail: lutuling2005@126.com

毛春芹, 女, 正高级实验师, 主要从事新药研发及药物制剂研究。E-mail: mcq63@163.com

胡玉涛, 男, 讲师, 主要从事药用植物教学研究。Tel: 15705142858 E-mail: 907773517@qq.com

to be the main markers for sample variability. Content determination results showed that eight components of each producing area is Jiangsu > Gansu > Henan > Zhejiang > Hebei > Anhui > Shandong. **Conclusion** The establishment of HPLC fingerprint quality evaluation method and multi-component determination method of sesquiterpenes, flavonoids and phenolic acids of *Inulae Flos* was easy to operate and reliable, clarified the difference of composition between different producing areas, which provided the basis for the exploitation and utilization of medicinal materials.

Key words: *Inulae Flos*; fingerprint; chemometrics; assay of multi-component; chlorogenic acid; caffeic acid; rutin; taxifolin; 1,5-O-dicaffeoylquinic acid; 1-O-acetyl britannilactone; quercetin; ivangustin

旋覆花为菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 或欧亚旋覆花 *I. britannica* L. 的干燥头状花序, 具有降气、消痰、行水、止呕的功效, 主治风寒咳嗽、喘咳痰多、呕吐噎气、心下痞硬等症^[1], 主产于河南、江苏、浙江等地。旋覆花成分复杂, 主要含有倍半萜内酯类、黄酮类、酚酸类、萜类等化学成分^[2-5], 具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化等药理作用^[5-9], 文献研究表明倍半萜内酯类成分为旋覆花特征性成分^[5], 黄酮类、酚酸类成分也是其抗菌、消炎的主要活性成分^[10]。《中国药典》2015年版一部旋覆花药材项下仅有薄层鉴别, 旋覆花药材的质量研究多集中于倍半萜类、总黄酮类等同类成分的含量测定研究^[11-12]以及指纹图谱研究^[13-14]。现有文献对旋覆花药材的质量研究尚不全面, 数据分析方法较为单一, 指纹图谱结合模式识别方法能真实、形象地反映中药质量差异, 揭示复杂化合物之间的规律, 已被应用于药物的质量控制、差异标志物的筛选等方面^[15-16]。因此, 本实验收集同一基原多产地的旋覆花药材, 建立 HPLC 指纹图谱, 有效分离色谱峰, 实现了倍半萜类、黄酮类、酚酸类的多成分同时测定, 指认出绿原酸、咖啡酸、芦丁、花旗松素、1,5-O-二咖啡基奎宁酸、1-O-乙酰旋覆花内酯、槲皮素、狭叶依瓦菊素 8 个化学成分。结合化学计量学对数据进行深入分析, 筛选出造成产地差异的标记性成分, 寻求产地间的差异, 有利于旋覆花药材资源的开发利用, 以期旋覆花药材质量控制标准的制定提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪[安捷伦科技(中国)有限公司]; MS-105D 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-500E 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料

1-O-乙酰旋覆花内酯(批号 CFS201802)、狭叶依瓦菊素(批号 CFS201801)均购自武汉天植生物技术有限公司; 1,5-O-二咖啡基奎宁酸(批号

P26F9F54633)、花旗松素(批号 Z07M6B1)、绿原酸(批号 Y24J7K16726)、芦丁(批号 Y22S653719)均购自上海源叶生物科技有限公司; 咖啡酸(批号 110885-200102)、槲皮素(批号 10081-9905)均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈(HPLC 级, 德国 Merck 公司); 色谱纯磷酸(上海化学试剂有限公司); 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂均为分析纯(山东禹王实业有限公司化工分公司); Dubhe C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, 汉邦科技)。35 批旋覆花药材的产地见表 1, 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定均为菊科植物旋覆花 *I. japonica* Thunb. 的干燥头状花序。

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱条件

Dubhe C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(B)-0.05%磷酸水溶液(A), 梯度洗脱, 0~45 min, 90%~75% A; 45~50 min, 75%~70% A; 50~85 min, 70%~60% A; 85~90 min, 60%~90% A; 检测波长为 205 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

表 1 旋覆花样品的来源

Table 1 Information of *Inulae Flos* samples

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	TA180111001	山东	S19	201902014	河北
S2	TA180112001	山东	S20	201902015	河北
S3	TA180113001	山东	S21	17063011	安徽
S4	TA180114001	山东	S22	17063012	安徽
S5	TA180115001	山东	S23	17063013	安徽
S6	2019032501	江苏	S24	17063014	安徽
S7	2019032502	江苏	S25	17063015	安徽
S8	2019032503	江苏	S26	19101606	甘肃
S9	2019032504	江苏	S27	19101706	甘肃
S10	2019032505	江苏	S28	19101806	甘肃
S11	19101401	浙江	S29	19101906	甘肃
S12	19101402	浙江	S30	19102006	甘肃
S13	19101501	浙江	S31	161023	河南
S14	19101502	浙江	S32	161024	河南
S15	19101503	浙江	S33	161025	河南
S16	201902011	河北	S34	161027	河南
S17	201902012	河北	S35	161028	河南
S18	201902013	河北			

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取绿原酸、咖啡酸、1-O-乙酰旋覆花内酯、1,5-O-二咖啡酰奎宁酸、花旗松素、芦丁、槲皮素、狭叶依瓦菊素对照品适量，加 70% 甲醇配制成质量浓度分别为 1.11、0.078、1.58、99.3、0.354、4.19、0.776、1.43 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取样品粉末（过 4 号筛）约 1.0 g，精密称定，置 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 30 mL，称定质量，超声处理（功率 500 W，频率 40 kHz）60 min，放冷，再称定质量，用 70% 甲醇补足减失质量，摇匀，滤过，续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤

过，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密称取绿原酸、咖啡酸、1-O-乙酰旋覆花内酯、1, 5-O-二咖啡酰奎宁酸、花旗松素、芦丁、槲皮素、狭叶依瓦菊素对照品适量，加 70% 甲醇配制成质量浓度分别为 1.67、0.117、2.36、148.9、0.531、6.29、1.16、2.15 mg/mL 的混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液，用倍比稀释的方法以 70% 甲醇制成系列对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下，分别进样 10 μL，每个质量浓度 2 针，记录各峰面积的值，以峰面积平均值（Y）对质量浓度（X）进行线性回归，结果见表 2。

表 2 有效成分的回归方程、线性范围及相关系数

Table 2 Linear equation, linear ranges and correlation coefficient of eight effective components

化合物	回归方程	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	R ²
绿原酸	$Y=6\,166.8X+305.3$	0.555~1.665	0.999 5
咖啡酸	$Y=17\,915X+19.847$	0.039~0.117	0.999 7
芦丁	$Y=1\,361.8X+78.01$	2.097~6.291	0.999 7
花旗松素	$Y=14\,439X+248.1$	0.177~0.531	0.999 2
1,5-O-二咖啡酰奎宁酸	$Y=443.45X+747.07$	49.63~148.9	0.999 8
1-O-乙酰旋覆花内酯	$Y=10\,001X+199.49$	0.788~2.364	0.999 7
槲皮素	$Y=7782X+1337.7$	0.388~1.164	0.999 8
狭叶依瓦菊素	$Y=5472X+83.149$	0.715~2.145	0.999 7

2.4.2 精密度试验 取旋覆花样品（S6）1.0 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，“2.1”项下色谱条件测定，连续进样 6 次，记录指纹图谱，以 1,5-O-二咖啡酰奎宁酸为参照峰，计算各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.54%~3.08%，相对保留时间的 RSD 为 0.04%~0.67%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取旋覆花样品（S6）1.0 g，平行 6 份，按“2.3”项下的方法制备供试品溶液，“2.1”项下色谱条件测定，记录指纹图谱，以 1, 5-O-二咖啡酰奎宁酸为参照峰，计算各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.54%~3.37%，相对保留时间的 RSD 为 0.02%~1.57%，表明方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取旋覆花样品（S6）1.0 g，精密称定，按“2.3”项下的方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h，按“2.1”项下色谱条件测定，记录指纹图谱，以 1,5-O-二咖啡酰奎宁酸为参照峰，计算各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.47%~3.33%，相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.43%，表明在该条件下供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已测定的 8 种成分含量的旋覆花药材粉末（S6）9 份，每份 0.5 g，分成 3 组，每组 3 份，分别精密加入含绿原酸 1.11 mg/mL、咖啡酸 0.078 mg/mL、1-O-乙酰旋覆花内酯 1.58 mg/mL、1,5-O-二咖啡酰奎宁酸 99.3 mg/mL、花旗松素 0.354 mg/mL、芦丁 4.19 mg/mL、槲皮素 0.776 mg/mL、狭叶依瓦菊素 1.43 mg/mL 的混合对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL，按“2.3”项下方法制备成供试品溶液，按“2.1”项色谱条件进样测定，计算平均加样回收率。结果表明，绿原酸、咖啡酸、1-O-乙酰旋覆花内酯、1,5-O-二咖啡酰奎宁酸、花旗松素、芦丁、槲皮素、狭叶依瓦菊素的平均回收率分别为 99.97%、98.87%、101.84%、100.94%、100.13%、101.04%、99.05%、101.45%，RSD 分别为 0.74%、1.44%、2.75%、1.66%、1.33%、1.60%、1.49%、2.77%。

2.5 旋覆花药材指纹图谱的建立及共有峰的标定

2.5.1 旋覆花药材指纹图谱的建立 分别取 35 批不同产地的旋覆花药材 1.0 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，将 35 批旋覆花药材指纹图谱依次导

入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)软件,设定S6为参照图谱,采用平均数法,时间窗宽度为0.5,进行多点校正和色谱峰匹配,并进行了相似度计算,结果见表3;确定了20个共有峰,得到旋覆花药材指纹图谱叠加图,见图1;生成旋覆花药材的共有模式特征图谱,见图2。

2.5.2 旋覆花药材指纹图谱共有峰的标定 通过与对照品对照,指出其中8个色谱峰,分别为绿原酸(6号峰)、咖啡酸(8号峰)、芦丁(9号峰)、花旗松素(10号峰)、1,5-O-二咖啡酰奎宁酸(12号峰)、1-O-乙酰旋覆花内酯(16号峰)、槲皮素(17号峰)、狭叶依瓦菊素(20号峰)。在35批旋覆花药材指纹图谱中,以12号1,5-O-二咖啡酰奎宁酸色谱峰分离良好,峰面积适中,所以确定12号色谱峰为参照峰,计算各共有峰的相对峰面积。

表3 旋覆花样品的相似度

Table 3 Information of *Inulae Flos* samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.959	S19	0.977
S2	0.954	S20	0.973
S3	0.957	S21	0.979
S4	0.949	S22	0.978
S5	0.946	S23	0.980
S6	0.967	S24	0.980
S7	0.953	S25	0.976
S8	0.966	S26	0.889
S9	0.953	S27	0.892
S10	0.967	S28	0.880
S11	0.979	S29	0.888
S12	0.978	S30	0.892
S13	0.980	S31	0.948
S14	0.980	S32	0.950
S15	0.976	S33	0.950
S16	0.975	S34	0.955
S17	0.978	S35	0.948
S18	0.975		

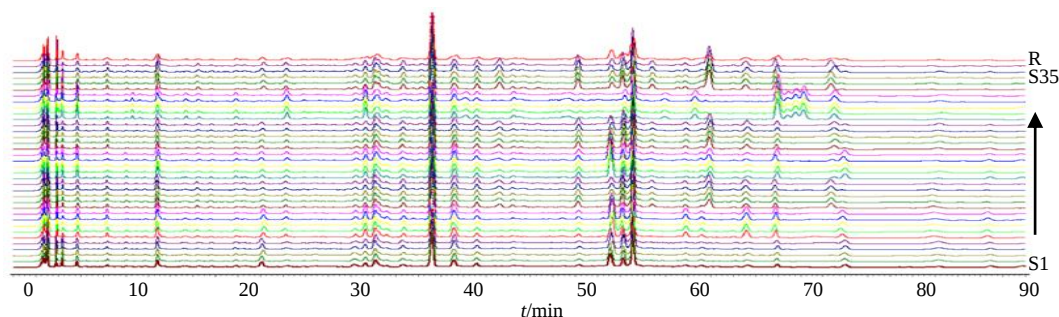
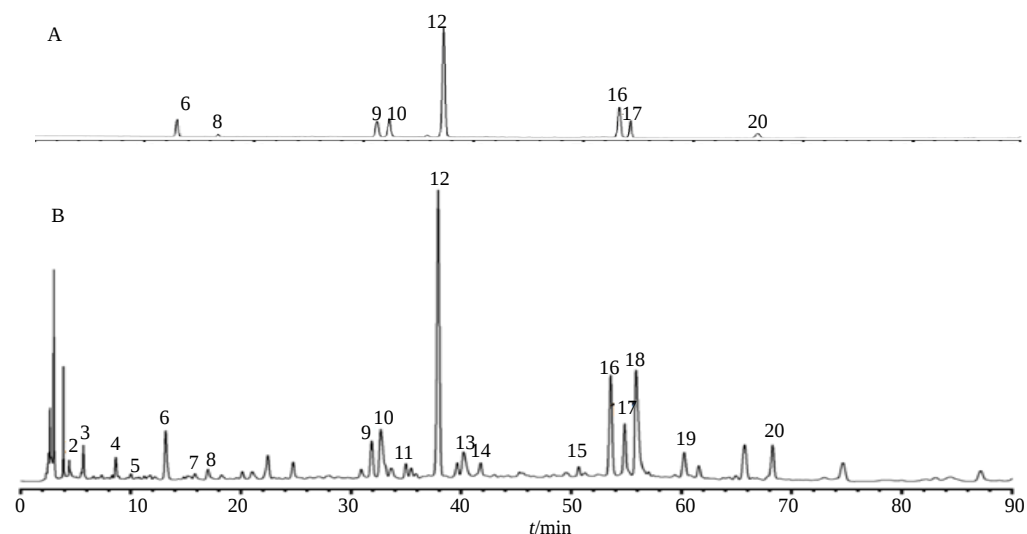


图1 35批旋覆花药材指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of 35 batches of *Inulae Flos*

6-绿原酸 8-咖啡酸 9-芦丁 10-花旗松素 12-1,5-O-二咖啡酰奎宁酸 16-1-O-乙酰旋覆花内酯 17-槲皮素 20-狭叶依瓦菊素
6-chlorogenic acid 8-cafeic acid 9-rutin 10-taxifolin 12-1,5-O-dicaffeoylquinic acid 16-1-O-acetyl britannilactone 17-quercetin 20-ivangustin

图2 旋覆花混合对照色谱图 (A) 及指纹图谱共有模式图 (B)

Fig. 2 Chromatogram of chromatogram of reference substances (A) and reference fingerprint of *Inulae Flos* (B)

2.5.3 旋覆花药材指纹图谱的相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)软件计算指纹图谱相似度(表 3),结果显示,35 批旋覆花药材指纹图谱的相似度在 0.88~0.98,相似度在 0.9 以上的药材占 85.71%;35 批旋覆花药材的 20 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.06%,相对峰面积的 RSD 为 8.91%~79.71%。说明不同产地间旋覆花药材整体化学组分相似,药材质量稳定,但可能由于受到气候、土壤、地势地貌等环境因素以及采收加工过程中人为因素的影响,导致药材内在化学成分的含量存在一定差异。

2.6 主成分分析(PCA)

PCA 其本质是以最大方差为原则进行分析,将数据的多元变量抽取少量主成分,前几个主成分对于复杂的中药体系而言,往往能够表征化学量测数据的整体情况^[17-19]。为了进一步分析 35 批样品

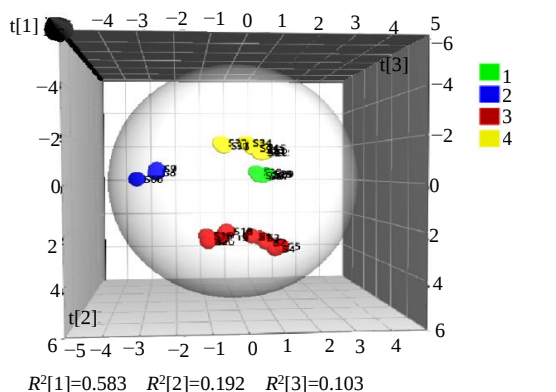
间的差异,以主成分的特征值和累积贡献率作为选择主成分的依据,采用 SPSS 22.0 软件对 35 批旋覆花药材数据进行 PCA 分析,相关系数的特征值和方差贡献率见表 4。以特征值>1 为提取标准,可提取 4 个主成分,其累积方差贡献率达 95.56%,可代表旋覆花药材指纹图谱共有峰的大部分信息。

将矩阵数据导入 SIMCA-P+13.0 软件,采用非监督识别方法进行主成分分析观察旋覆花药材的自然聚集,35 批旋覆花药材的 PCA 得分矩阵图见图 3,7 个产地的旋覆花药材可以完全区分为 4 类,可直观显示样品间的差异。由图 3 可知,聚为一组的样品存在产地间的差异性,同产地内也存在差异性。江苏产地样品间离散度较大;山东、河北聚为一类但内部差异性显著,可能是因为这 2 个产地均为沿海城市且相邻,但气候、地理环境仍存在差异,导致样品化学成分存在差别。

表 4 特征值和方差贡献率

Table 4 Characteristic value and variance contribution rate

共有峰	起始特征值			循环平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	10.660	53.298	53.298	6.815	34.076	34.076
2	4.120	20.599	73.897	6.507	32.533	66.609
3	2.832	14.160	88.057	3.357	16.783	83.392
4	1.501	7.505	95.563	2.434	12.170	95.563



1-甘肃 2-江苏 3-山东、河北 4-河南、浙江、安徽,下同图
1-Gansu 2-Jiangsu 3-Shandong, Hebei 4-Henan, Zhejiang, Anhui, same as below

图 3 35 批旋覆花药材的 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score plot for 35 batches of *Inulae Flos* samples

2.7 偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)

为更好地观察组间差异,在 PCA 的基础上选择有监督模式的 PLS-DA 进行了各组间的判别分析。结合评价 PLS-DA 模型的 3 个指标:模型拟合参数

$R^2X=0.876$, $R^2Y=0.976$, 模型预测参数 $Q^2=0.971$, 均大于 0.5, 表明建立的数学模型稳定且预测能力较强。PLS-DA 得分矩阵图见图 4, 可看出不同产地的样品集中在不同区域, 与 PCA 结果一致。

结合变量重要性投影值(variable importance in the projection, VIP)筛选出引起组间差异的主要标记性成分, VIP 得分图见图 5, 拥有较大 VIP 值的变量($VIP>1$), 对分类的贡献越大^[17], 筛选出贡献率较大的 7 个变量, 按 VIP 大小排序依次为咖啡

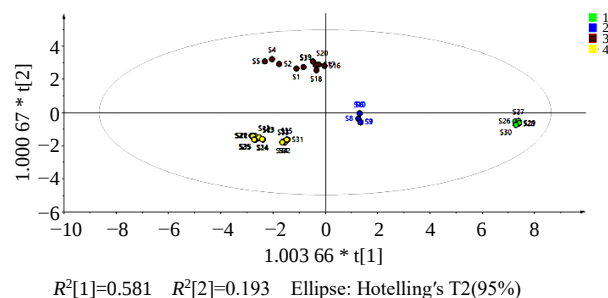


图 4 35 批旋覆花药材的 PLS-DA 得分图

Fig. 4 PLS-DA of score plot for 35 batches of *Inulae Flos* samples

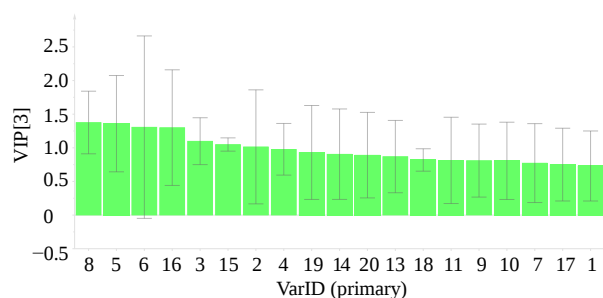


图 5 旋覆花药材 20 个色谱峰的 VIP 值

Fig. 5 VIP value of 20 chromatographic peak of *Inulae Flos* samples

酸（8 号峰）、5 号峰、绿原酸（6 号峰）、1-O-乙酰旋覆花内酯（16 号峰）及 3、15、2 号峰，这些成分在区分不同产地旋覆花药材间起到重要作用，是其主要标志性成分。

2.8 旋覆花样品含量测定及结果分析

取 35 批旋覆花药材样品，平行 3 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录峰面积，计算 8 种化学成分含量见表 5。

按照产地进行区分，不同产地样品所测的 8 种成分含量差异明显。结果表明，1,5-O-二咖啡酰奎宁酸是各产地旋覆花样品中含量最高的化学成分，

表 5 35 批旋覆花样品中 8 种成分含量测定结果 (n=3)

Table 5 Content of eight compounds in 35 batches of *Inulae Flos* samples (n=3)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	绿原酸	咖啡酸	芦丁	花旗松素	1,5-O-二咖啡酰奎宁酸	1-O-乙酰旋覆花内酯	槲皮素	狭叶依瓦菊素
S1	1.477	0.083	4.619	0.899	119.094	2.616	2.055	0.576
S2	1.396	0.079	4.051	0.790	110.397	2.461	1.896	0.561
S3	1.419	0.076	3.691	0.666	109.583	2.157	1.294	0.894
S4	1.369	0.076	3.728	0.696	107.501	2.233	1.496	0.732
S5	1.351	0.071	4.011	0.741	108.408	2.181	1.299	0.931
S6	2.219	0.155	8.390	0.707	198.516	3.152	1.553	2.862
S7	2.306	0.159	9.206	0.785	212.425	3.493	1.749	3.150
S8	2.132	0.102	8.408	0.713	196.747	3.145	1.508	2.828
S9	2.116	0.151	8.084	0.634	198.603	3.158	1.549	2.859
S10	2.145	0.155	8.112	0.625	198.429	3.122	1.557	2.831
S11	1.973	0.143	4.783	0.649	175.023	0.871	2.012	1.816
S12	1.979	0.184	4.811	0.659	176.171	0.941	2.038	1.802
S13	1.991	0.183	4.656	0.676	176.625	0.913	2.039	1.809
S14	1.888	0.143	4.654	0.684	172.133	0.937	2.120	1.863
S15	1.987	0.189	4.885	0.695	177.780	0.959	2.119	1.835
S16	2.249	0.125	5.933	0.989	169.844	3.895	1.481	0.946
S17	2.113	0.142	5.663	0.919	160.520	3.741	1.664	0.900
S18	2.154	0.116	5.776	0.984	163.657	3.715	1.577	0.910
S19	2.141	0.151	5.550	0.901	160.173	3.771	1.600	0.914
S20	2.155	0.116	5.693	0.929	163.103	3.935	1.697	0.890
S21	1.432	0.129	3.567	0.865	134.591	1.447	2.123	1.817
S22	1.433	0.130	3.576	0.886	134.745	1.439	2.129	1.801
S23	1.430	0.132	3.310	0.887	134.044	1.302	1.946	1.764
S24	1.413	0.130	3.279	0.895	132.756	1.287	1.876	1.762
S25	1.450	0.131	3.604	0.895	136.139	1.333	2.143	1.763
S26	2.137	0.225	10.491	0.657	204.309	0.137	0.757	0.247
S27	2.049	0.229	10.517	0.639	200.198	0.133	0.757	0.216
S28	2.088	0.224	10.953	0.692	205.911	0.134	0.780	0.243
S29	2.136	0.239	11.389	0.665	210.643	0.139	0.822	0.210
S30	1.980	0.222	10.933	0.635	199.017	0.120	0.774	0.183
S31	2.052	0.208	5.160	0.583	181.724	0.943	2.050	2.049
S32	2.031	0.161	4.700	0.567	177.299	0.931	2.029	1.983
S33	2.006	0.161	4.728	0.567	178.220	0.946	1.994	2.001
S34	2.023	0.164	4.709	0.566	178.954	0.943	1.994	2.025
S35	2.000	0.196	4.693	1.060	179.254	1.006	2.130	1.955

在 107.501~212.425 mg/g, 以甘肃产地含量最高, 山东产地最低; 7 个产地中 1-O-乙酰旋覆花内酯质量分数达到 0.120~3.935 mg/g, 以河北产地最高, 安徽产地最低; 倍半萜类成分总量以江苏产地最高, 含量达到 5.953~6.643 mg/g, 甘肃产地最低; 3 个主要标记性成分(咖啡酸、绿原酸、1-O-乙酰旋覆花内酯)总量范围在 3.871~10.448 mg/g, 河北>江苏>山东>河南>浙江>安徽>甘肃。

综上所述, 甘肃产地咖啡酸、芦丁、1,5-O-二咖啡酰奎宁酸含量最高, 花旗松素、1-O-乙酰旋覆花内酯、槲皮素、狭叶依瓦菊素含量最低, 与其他产地成分差异显著, 与指纹图谱相似度评价结果 and PCA 结果一致。各产地 8 种成分总量江苏>甘肃>河南>浙江>河北>安徽>山东, 同一成分在各产地旋覆花药材中的含量差异显著, 不同成分的含量波动范围不同。

3 讨论

本实验考察了回流法、超声提取法 2 种提取方法, 结果表明超声处理与回流提取无显著差异, 故选择超声处理制备样品。同时对提取溶剂(50%、60%、70%、80%)甲醇、(50%、60%、70%、80%)乙醇, 料液比(1:15、1:30)进行综合考察, 发现以 70%甲醇为提取溶剂, 液料比 1:30 时, 提取效果最佳, 色谱峰基线较为平稳、杂质干扰较少, 因此选择 30 mL 70%甲醇为提取溶剂。

本实验通过 DAD 检测器进行全波长扫描, 在 205 nm 检测条件下可以一次性完成检测, 色谱峰信息全面, 各峰吸收均匀, 整体峰形良好; 同时比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液等流动相系统梯度洗脱情况, 发现乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时色谱峰分离度较好、对称性最好, 杂质干扰较小, 确定流动相通过最终优化建立较全面的旋覆花药材 HPLC 指纹图谱。

对 7 个产地 35 批旋覆花药材建立指纹图谱, 指认出绿原酸、咖啡酸、芦丁、花旗松素、1,5-O-二咖啡酰奎宁酸、1-O-乙酰旋覆花内酯、槲皮素、狭叶依瓦菊素 8 个成分, 同时采用不同分析方法^[18-19]对旋覆花药材 20 个共有峰进行多元统计分析, 考察样品整体性与差异性。结果表明, PCA 和 PLS-DA 分析结果一致, 样品聚为 4 类, 山东与河北产地由于生态环境相似, 相邻且均为沿海城市因而聚为一类, 但内部能明显区分; 甘肃产地

聚为一类, 与其他产地相距较远, 与相似度结果一致; VIP 筛选出 7 个主要标记性成分, 通过对照品指认出咖啡酸、绿原酸、1-O-乙酰旋覆花内酯这 3 个成分。不同产地间的成分差异可能来源于地形地貌、气候、土壤等因素在其生长代谢过程中产生的影响, 同一产地的生态环境相似, 但药材质量也会受采收时间、种植方式等因素影响。《中国药典》2015 年版一部旋覆花药材无含量测定项, 实验筛选出的标记性成分可为旋覆花药材质量标准的建立提供科学依据, 基于网路药理学研究可知 1-O-乙酰旋覆花内酯、狭叶依瓦菊素、槲皮素为旋覆花活性成分, 可为旋覆花降气止呕功效机制研究打下基础, 本实验仅收集单一基原的旋覆花药材样品, 对旋覆花药材多基原的分析尚未进行, 有望后续采集欧亚旋覆花样品进行深入研究, 比较两个基原样品间指纹图谱的差异和主要标记性成分的异同, 为建立全面科学的旋覆花药材质量评价体系提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 325.
- [2] 覃江江. 四种旋覆花属药用植物中新型倍半萜的发现及生物活性研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2011.
- [3] 朱虹, 唐生安, 秦楠, 等. 旋覆花中化学成分及其活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 83-88.
- [4] 吴一兵, 王云志, 查建蓬, 等. 欧亚旋覆花中三萜和甾体化合物的分离和结构鉴定 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 666-668.
- [5] 张婷, 杜冠华, 陈若芸. 旋覆花属植物中倍半萜类成分及生物活性的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(24): 1889-1894.
- [6] Yu Z P, Zhang J S, Zhang Q Q, et al. Bioactive sesquiterpenoids and sesquiterpenoid glucosides from the flowers of *Inula japonica* [J]. *Fitoterapia*, 2019, 138: 104292.
- [7] Mohti H, Taviano M F, Cacciola F, et al. *Inula viscosa* (L.) Aiton leaves and flower buds: Effect of extraction solvent/technique on their antioxidant ability, antimicrobial properties and phenolic profile [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(1): 46-52.
- [8] 于峰, 王思明, 董玫, 等. 三种倍半萜类化合物体外抗肿瘤细胞增殖活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3): 506-509.
- [9] 张馨予, 王喆星, 单俊杰. 旋覆花属植物化学成分及生物活性的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2008,

- 35(6): 433-440.
- [10] Kim S R, Park M J, Lee M K, *et al.* Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(7): 596-604.
- [11] 杨茜, 刘慧, 何雅君, 等. HPLC 法同时测定旋覆花属植物中 5 种倍半萜内酯成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(2): 116-120.
- [12] 耿红梅. RP-HPLC 法同时测定欧亚旋覆花中 4 种黄酮的含量 [J]. 中国药房, 2009, 20(27): 2122-2123.
- [13] 侯艳鹏, 王建华, 尚明英, 等. 旋覆花药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37(12): 894-899.
- [14] 施之琪, 付建武, 蔡春晖, 等. 旋覆花配方颗粒 HPLC 特征图谱研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(6): 765-770.
- [15] Peng Q, Tian R, Chen F, *et al.* Discrimination of producing area of Chinese Tongshan Kaoliang Spirit using electronic nose sensing characteristics combined with the chemometrics methods [J]. *Food Chem*, 2015, 178: 301-305.
- [16] 甄亚钦, 冯玉, 田伟, 等. 忍冬不同部位 UPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4449-4454.
- [17] Liang J, Wu W Y, Sun G X, *et al.* A dynamic multiple reaction monitoring method for the multiple components quantification of complex traditional Chinese medicine preparations: Niu Huang Shang Qing Pill as an example [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1294: 58-69.
- [18] 王琪, 李晓琦, 黄萌萌, 等. 基于指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价不同产地栀子药材的质量 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2690-2699.
- [19] 秦建平, 李家春, 吴建雄, 等. 基于 UPLC 结合化学计量学方法的龙血竭指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1114-1118.

[责任编辑 时圣明]