

## 不同产地野菊花 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究

谢苏梦<sup>1</sup>, 季巧遇<sup>2</sup>, 吕尚<sup>1</sup>, 张尧<sup>3</sup>, 邹瀚霖<sup>1</sup>, 汪弟<sup>1</sup>, 饶毅<sup>1,3</sup>, 魏惠珍<sup>1,3\*</sup>

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 华润江中药业技术中心, 江西 南昌 330004

3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

**摘要:** 目的 建立野菊花 *Chrysanthemum indicum* 药材 HPLC 指纹图谱, 并进行化学模式识别。方法 采用 Hypersil ODS C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1%磷酸, 梯度洗脱, 检测波长 334 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL, 建立野菊花药材 HPLC 指纹图谱, 结合相似度评价、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘-判别分析等模式识别方法, 对不同产地野菊花药材进行质量评价。**结果** 建立的指纹图谱方法符合方法学要求, 29 批野菊花药材 HPLC 指纹图谱有 10 个共有峰, 相似度均在 0.91 以上; 通过聚类分析将样品按不同产地分为 2 大类; 主成分分析与聚类分析结果一致; 最后采用正交偏最小二乘-判别分析筛选出了不同批次野菊花药材的 6 个差异标志物, 通过对照品指认, 确定了 10 号峰为蒙花苷、5 号峰为 3,4-二咖啡酰奎宁酸、3 号峰为木犀草苷、1 号峰为绿原酸。**结论** 建立的指纹图谱方法稳定、可靠、重复性好; 结合化学模式识别可用于野菊花药材的质量品质评价。

**关键词:** 野菊花; HPLC 指纹图谱; 化学模式识别; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘-判别分析; 蒙花苷; 3,4-二咖啡酰奎宁酸; 犀草苷; 绿原酸

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)24-7616-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.024

## Study on establishment of HPLC fingerprints and chemical pattern recognition of *Chrysanthemum indicum* from different regions

XIE Su-meng<sup>1</sup>, JI Qiao-yu<sup>2</sup>, LV Shang<sup>1</sup>, ZHANG Yao<sup>3</sup>, ZOU Han-lin<sup>1</sup>, WANG Di<sup>1</sup>, RAO Yi<sup>1,3</sup>, WEI Hui-zhen<sup>1,3</sup>

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. China Resources Jiangzhong Pharmaceutical Technology Center, Nanchang 330004, China

3. National Engineering Research Center for Manufacturing Technology of Traditional Chinese Medicine Solid Preparation, Nanchang 330006, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC fingerprint of *Chrysanthemum indicum* medicinal materials and perform chemical pattern recognition. **Methods** Hypersil ODS C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) chromatographic column was used; Mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid, gradient elution; Detection wavelength was 334 nm; Flow rate was 1 mL/min; Column temperature was 30 °C; Injection volume was 10 μL. HPLC fingerprints of *C. indicum* medicinal materials was established, combined with similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis and other pattern recognition methods, quality evaluation of *C. indicum* medicinal materials from different places. **Results** The established fingerprint method met the method requirements. The 29 batches of *C. indicum* medicinal materials had 10 common peaks in the HPLC fingerprint, and the similarity was all above 0.91; The samples were divided into two categories according to different origins through cluster analysis; The results of principal component analysis and cluster analysis were consistent; Finally, the orthogonal partial least squares-discriminant analysis was used to screen out six different markers of different batches of wild chrysanthemum medicinal materials. Through the identification of the reference substance, it was determined that peak 10 was montmorin and peak 5 was 3,4-dicaffeoylquinic acid, peak 3 was luteolin, peak 1 was chlorogenic acid. **Conclusion** The established fingerprint method is stable, reliable, and reproducible; Combined with chemical pattern recognition, it can be used for the quality evaluation of *C. indicum* medicinal materials.

收稿日期: 2021-05-06

基金项目: 江西中医药大学中药学一流学科专项科研项目(5251800280); 2019年度江西省中医药管理局科技计划项目(2019A005)

作者简介: 谢苏梦(1995—), 在读硕士, 从事药物质量控制研究。Tel: 18379973259

\*通信作者: 魏惠珍, 硕士生导师, 副主任药师, 从事药物质量控制研究和新药研发。Tel: 13870939636 E-mail: weihezhen101@126.com

**Key words:** *Chrysanthemum indicum* L.; HPLC fingerprint; chemical pattern recognition; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; montmorin; 3,4-dicaffeoylquinic acid; luteolin; chlorogenic acid

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L.的干燥头状花序<sup>[1]</sup>。性微寒，味苦，归心、肝经，广泛分布于我国东北、华北、华中、华东及西南地区，是临床常用的清热泻火药，具有疏散风热、消肿解毒的功效<sup>[2]</sup>。野菊花主要活性成分为黄酮类和酚酸类<sup>[3]</sup>，《中国药典》2020年版的指标成分为单一成分蒙花苷，而《香港中药材标准》第8期的指标成分是绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草苷。文献报道<sup>[4-5]</sup>不同产地野菊花药材中黄酮类、酚酸类成分含量差异较大。目前对野菊花质量控制研究主要集中在指标成分含量测定<sup>[5]</sup>、指纹图谱分析中<sup>[6-7]</sup>，但多数是从方法学角度考察色谱条件，未能较直观地反映出不同批次野菊花药材的差异标志物。

中药指纹图谱能系统反映出中药各组分信息，广泛应用于中药质量控制领域，但其数据量大，需要借助多种中药指纹图谱数据处理方法进行深度、科学地分析<sup>[8]</sup>。目前多使用中药色谱指纹图谱相似度评价软件对获得中药色谱指纹图谱数据进行快速匹配和识别，但该软件不能多方面反映出药材整体质量，无法直观反映出不同批次药材的差异标志物<sup>[9]</sup>。而化学模式识别方法通过分析实验获得的大量数据，最大限度地提取有效化学信息，对数据进行深入分析。在中药指纹图谱数据分析中应用较多的化学模式识别方法包括聚类分析法、主成分分析法和偏最小二乘法<sup>[10]</sup>。采用指纹图谱和化学模式识别相结合的方法，可以更加全面、科学、客观地评价药材质量，目前也越来越多地应用于中药材质量控制和评价领域<sup>[11-13]</sup>。因此，本研究采用 HPLC 法建立野菊花药材指纹图谱，结合化学模式识别方法对指纹图谱进行综合分析，为野菊花药材的质量

评价研究提供参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

SHIMADZU LC-20AT 高效液相色谱仪；AB-104N 万分之一电子天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）；AUW-220D 十万分之一电子分析天平（日本 SHIMADZU 公司）；KQ-250DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Milli-Q 超纯水器（美国 Millipore 公司）。

### 1.2 材料

绿原酸（批号 110753-201314）、咖啡酸（批号 111720-201703）、木犀草苷（批号 111720-201307）、3,5-二咖啡酰奎宁酸（批号 111782-201807）、4,5-二咖啡酰奎宁酸（批号 111894-201102）、蒙花苷（批号 111528-201710），以上对照品均购自中国食品药品检定研究院；3,4-二咖啡酰奎宁酸对照品（批号 15101132）购自成都康邦生物科技有限公司；所有对照品质量分数均大于 98%。乙腈为色谱纯（美国 Anaqua 安可化学）；水为实验室自制超纯水；其余试剂均为分析纯。本实验搜集了湖北麻城、枣阳、罗田；安徽金寨、庐江、桐城、霍山共 7 产地 29 批次的野菊花药材，经江西中医药大学罗晓健教授鉴定为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L.的干燥头状花序，样品信息见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Hypersil ODS C<sub>18</sub>（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱；流动相为乙腈（A）-0.1%磷酸（B），梯度洗脱（0~5 min，85% B；5~25 min，85%~80% B；25~40 min，80%~70% B；40~50 min，

表 1 野菊花药材样品信息

Table 1 Sample information of *Chrysanthemi Indici Flos*

编号	产地	编号	产地	编号	产地
S1	湖北麻城	S11	湖北枣阳	S21	湖北罗田
S2	湖北麻城	S12	湖北枣阳	S22	湖北罗田
S3	湖北麻城	S13	湖北枣阳	S23	湖北罗田
S4	湖北麻城	S14	湖北枣阳	S24	安徽桐城
S5	湖北麻城	S15	湖北枣阳	S25	安徽桐城
S6	安徽金寨	S16	安徽庐江	S26	安徽桐城
S7	安徽金寨	S17	安徽庐江	S27	安徽霍山
S8	安徽金寨	S18	安徽庐江	S28	安徽霍山
S9	安徽金寨	S19	安徽庐江	S29	安徽霍山
S10	安徽金寨	S20	安徽庐江		

70%~35% B; 50~60 min, 35% B); 检测波长: 334 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样体积 10  $\mu$ L。

## 2.2 供试品溶液的制备

取野菊花样品粉末(过三号筛)约 0.5 g。精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇 50 mL,称定质量,超声 30 min,放冷,再称定质量,用 50%甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

## 2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷对照品适量,于 10 mL 量瓶中,加 50%甲醇溶解并稀释至刻度,制得各对照品母液;再精密吸取 7 种对照品母液适量,加 50%甲醇稀释,制得绿原酸为 25.89  $\mu$ g/mL、咖啡酸为 20.14  $\mu$ g/mL、木犀草苷为 3.828  $\mu$ g/mL、3,4-二咖啡酰奎宁酸为 21.32  $\mu$ g/mL、3,5-二咖啡酰奎宁酸为 19.73  $\mu$ g/mL、4,5-二咖啡酰奎宁酸为 3.682  $\mu$ g/mL、蒙花苷为 24.66  $\mu$ g/mL 的混合对照品溶液。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 按“2.2”项下方法制备 1 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以 3,5-二咖啡酰奎宁酸(6 号峰)为参照峰(S),计算 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%<sup>[14]</sup>。

**2.4.2 重复性试验** 按“2.2”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,以 3,5-二咖啡酰奎宁酸(6 号峰)为参照峰(S),计算 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%<sup>[14]</sup>,表明该方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 时进样,以 3,5-二咖啡酰奎宁酸(6 号峰)为参照峰(S),计算 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%<sup>[14]</sup>。

## 2.5 指纹图谱的建立及相似度评价

将 29 批野菊花药材按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,将 29 批色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统

(2012.1 版本)”软件进行评价,设定 S1 样品的图谱为参照图谱,时间窗宽度为 0.1,采用平均数法结合多点校正生成对照图谱,并进行相似度评价,29 批野菊花药材 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱见图 1、2。共标定了 10 个共有峰,通过与对照品图谱比对,指认了其中 7 个色谱峰,见图 3,即峰 1 为绿原酸、峰 2 为咖啡酸、峰 3 为木犀草苷、峰 5 为 3,4-二咖啡酰奎宁酸、峰 6 为 3,5-二咖啡酰奎宁酸、峰 8 为 4,5-二咖啡酰奎宁酸、峰 10 为蒙花苷。峰 6 出峰时间居中、峰面积较大且分离度良好,故选择 3,5-二咖啡酰奎宁酸(6 号峰)为参照峰(S),计算样品指纹图谱共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.50%,表明这 29 批样品中 10 个共有峰保留时间较稳定;但共有峰相对峰面积 RSD 为 24.50%~89.08%,相差较大,表明各批次间这 10 个共有峰所代表化合物的含量存在较大差异。以对照指纹图谱为对照,计算各批次样品相似度,结果见表 2,29 批样品相似度均大于 0.91。

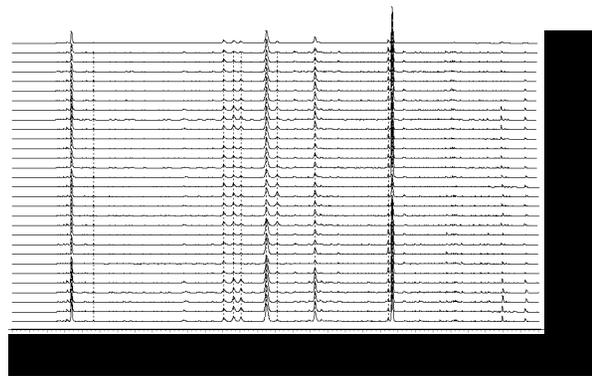


图 1 29 批野菊花药材的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 29 batches of *Chrysanthemi Indici Flos*

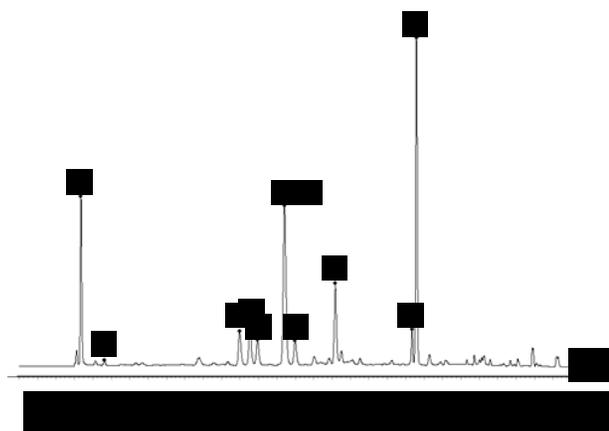
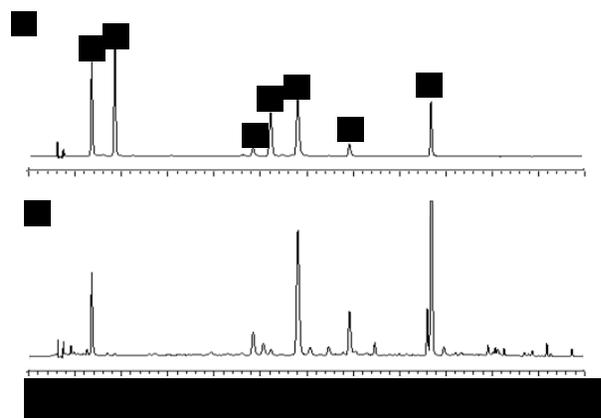


图 2 野菊花药材的对照指纹图谱

Fig. 2 Comparative fingerprint of *Chrysanthemi Indici Flos*



1-绿原酸 2-咖啡酸 3-木犀草苷 5-3,4-二咖啡酰奎宁酸 6-3,5-二咖啡酰奎宁酸 8-4,5-二咖啡酰奎宁酸 10-蒙花苷  
1-chlorogenic acid 2-caffeic acid 3-luteolin 5-3,4-dicaffeoylquinic acid 6-3,5-dicaffeoylquinic acid 8-4,5-dicaffeoylquinic acid 10-monocose

图 3 混合对照品 (A) 和野菊花样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC of mixed reference substance (A) and *Chrysanthemi Indici Flos* sample (B)

表 2 29 批野菊花药材相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of 29 batches of *Chrysanthemi Indici Flos*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.967	S11	0.944	S21	0.977
S2	0.962	S12	0.962	S22	0.973
S3	0.959	S13	0.914	S23	0.973
S4	0.973	S14	0.962	S24	0.989
S5	0.969	S15	0.935	S25	0.992
S6	0.980	S16	0.991	S26	0.990
S7	0.973	S17	0.987	S27	0.968
S8	0.973	S18	0.991	S28	0.969
S9	0.987	S19	0.998	S29	0.966
S10	0.988	S20	0.988		

## 2.6 化学模式识别分析

**2.6.1 聚类分析 (clustering analysis, CA)** 利用 SPSS 22.0 软件, 以野菊花 HPLC 指纹图谱的 10 个共有峰的峰面积为变量, 采用组间联接的聚类方法, 以平方欧式距离为样品间距离进行聚类分析, 结果见图 4, 各批次野菊花样品主要分为 2 大类、6 小类: S1~S5、S21-S23、S11~S15、聚为一大类 (I 组), 产地均为湖北, 其中 S1~S5 聚为一小类 (Ia 组) 产地为湖北麻城、S21~23 聚为一小类 (Ib 组)

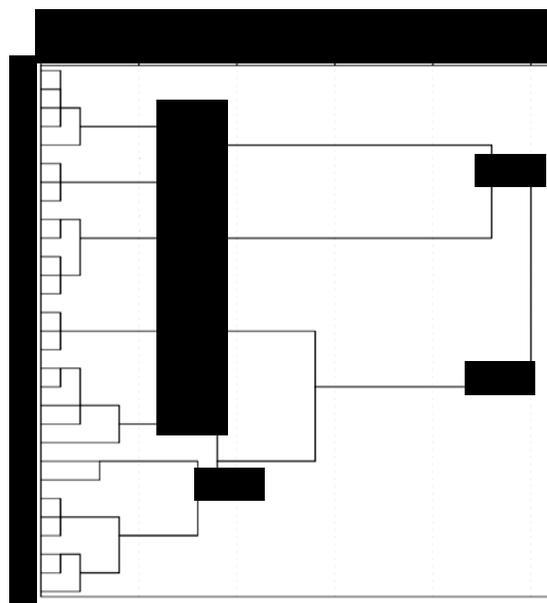


图 4 29 批野菊花药材聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis of 29 batches of *Chrysanthemi Indici Flos*

产地为湖北罗田、S11~S15 聚为一小类 (Ic 组) 产地为湖北枣阳; S24~S26、S16-S20、S6~S10、S27~S29 聚为一大类 (II 组), 产地均为安徽, 其中 S24~S26 聚为一小类 (IIa 组) 产地为安徽桐城、S16-20 聚为一小类 (IIb 组) 产地为安徽庐江、S6~S10、S27~S29 聚为一小类 (IIc 组) 产地为安徽金寨和安徽霍山, 考虑这 2 个产地均为安徽省六安市, 野菊花药材差异较小, 故分为一类。

**2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA)** 用 SPSS 22.0 软件对各共有峰峰面积进行标准化处理后, 对 29 批野菊花药材指纹图谱所得的 10 个共有峰进行主成分分析, 结果见表 3, 以特征值 > 1 为提取标准, 得到 2 个主成分 ( $Z_1$ 、 $Z_2$ ), 其累计方差贡献率为 85.769%, 可代表野菊花指纹图谱共有峰的大部分信息。旋转后的主成分载荷矩阵反映了各变量对主成分的贡献大小和方向, 载荷的绝对值越大, 对主成分的贡献越大<sup>[15]</sup>, 主成分载荷矩阵见图 5, 较直观反映出各变量对主成分的贡

表 3 特征值及累积方差贡献率

Table 3 Eigenvalue and cumulative variance contribution rate

成分	初始特征值		
	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.932	49.322	49.322
2	3.645	36.447	85.769

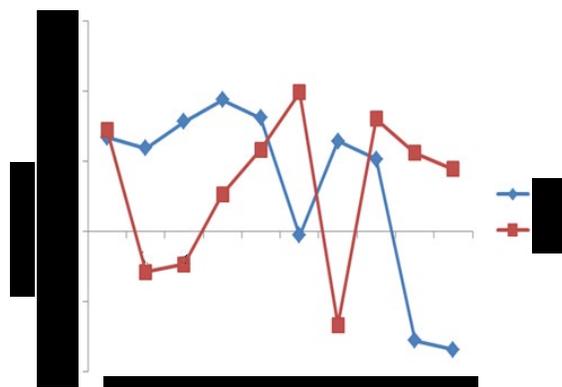


图 5 10 个共有峰 2 个主成分的排序坐标图

Fig. 5 Sorted coordinate chart of 10 principal peaks and two principal components

献率：10 个共有峰对第 1 主成分多成正相关，共有峰 4、10、9、5、3 对第 1 主成分贡献较大；共有峰 6、8、1、9 对第 2 主成分贡献较大，共有峰 2、3、7 对第 2 主成分成负相关。再根据主成分载荷矩阵，计算主成分得分，2 个主成分得分表达式： $Z_1 = 0.302X_1 + 0.267X_2 + 0.352X_3 + 0.422X_4 + 0.364X_5 - 0.012X_6 + 0.289X_7 + 0.232X_8 - 0.350X_9 - 0.379X_{10}$ ； $Z_2 = 0.379X_1 - 0.151X_2 - 0.122X_3 + 0.138X_4 + 0.305X_5 + 0.518X_6 - 0.349X_7 + 0.419X_8 + 0.292X_9 + 0.233X_{10}$ 。通过将各特征向量标准化后，代入主成分得分表达式中计算 29 批样品的主成分得分。再根据各主成分的贡献率，计算出综合得分，其公式为  $Z_{综} = 0.493Z_1 + 0.364 Z_2$ ，主成分得分和综合得分结果见表 4，可反映 S1~S5、S21~S23、S11~S15 批次样品综合得分几乎均为正值，将该 13 批湖北样品聚为一类；S24~S26、S16~S20、S6~S10、S27~S29 批次样品综合得分均为负值，因此将该 16 批安徽样品聚为一类，这与聚类分析结果完全一致。根据综合得分=相应的因子得分×相应主成分的特征值的平方根，综合得分越高，表明峰面积相对越大，药材含量相对越高<sup>[6]</sup>，可知：S1~S5、S21~S23、S11~S15 批次样品综合得分排名靠前，S24~S26、S16~S20、S6~S10、S27~S29 批次样品排名靠后，从主成分分析及综合得分角度来看，本研究中湖北产地野菊花药材含量相对优于安徽产地。

用变量统计分析软件 (SIMAC14.1) 对 29 批野菊花样品进行主成分分析，变量为指纹图谱中所得到的共有峰的相对峰面积，以此构建 29×10 的原始数据矩阵，Par 作为标度化方式，绘制出主成分

表 4 主成分得分和综合得分

Table 4 Principal component score and comprehensive score table

编号	主成分 1	主成分 2	综合得分	排名
S1	2.218	3.188	2.630	1
S5	2.169	3.245	2.627	2
S2	2.383	2.951	2.625	3
S4	1.962	3.058	2.427	4
S3	2.256	2.521	2.368	5
S22	2.590	0.622	1.754	6
S21	2.556	0.051	1.491	7
S23	2.620	-0.277	1.389	8
S14	2.411	-2.507	0.321	9
S12	1.998	-2.346	0.152	10
S15	2.326	-3.018	0.055	11
S13	1.883	-2.984	-0.185	12
S11	1.770	-2.865	-0.200	13
S25	-1.211	1.126	-0.218	14
S24	-1.337	1.219	-0.251	15
S19	-0.008	-0.924	-0.397	16
S26	-1.394	0.862	-0.436	17
S17	-0.619	-0.669	-0.640	18
S16	0.078	-2.120	-0.856	19
S20	-1.309	-0.282	-0.873	20
S18	-0.915	-1.140	-1.011	21
S10	-2.690	0.648	-1.271	22
S6	-2.881	0.843	-1.299	23
S8	-3.516	1.382	-1.435	24
S29	-2.971	0.444	-1.520	25
S27	-2.831	0.041	-1.611	26
S9	-2.384	-0.747	-1.689	27
S28	-2.686	-0.354	-1.695	28
S7	-2.467	-1.967	-2.254	29

分析图，见图 6-A，原点左侧为安徽产地，右侧为湖北产地，不同批次的野菊花样品呈现较明显的分类，与聚类分析的结果一致。

2.6.3 正交偏最小二乘-判别分析 (partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 为了进一步寻找不同批次野菊花的差异标志物，采用 SIMAC 14.1 软件对样品数据进行 OPLS-DA 分析，将 29 批样品的 10 个共有峰导入 SIMAC 14.1 软件中，建立 OPLS-DA 模型，模型得分图见图 6-B，湖北与安徽产地野菊花分布在中线两侧，表明 29 批野菊花样品被较好地分为 2 类，由模型分析验证参数可知，结实率参数  $R^2_X$  为 1，区分参数  $R^2_Y$  为 0.96，预测参数  $Q^2$  为 0.903，均大于 0.5 且接近于 1，说明模型稳定且具有良好的预测准确性。为防止该模型过拟合造成假阳性结果，设置分类 Y 矩阵变量随机排列 200 次做置换检验，得置换检验图 7-A， $R^2$  回归线在 Y 轴截距为 0.27、 $Q^2$  回归线在 Y 轴截距为 -0.943，说明所建立的模型没有出现拟合现象，可用于判别分析 29 批样品的组间差异。OPLS-DA

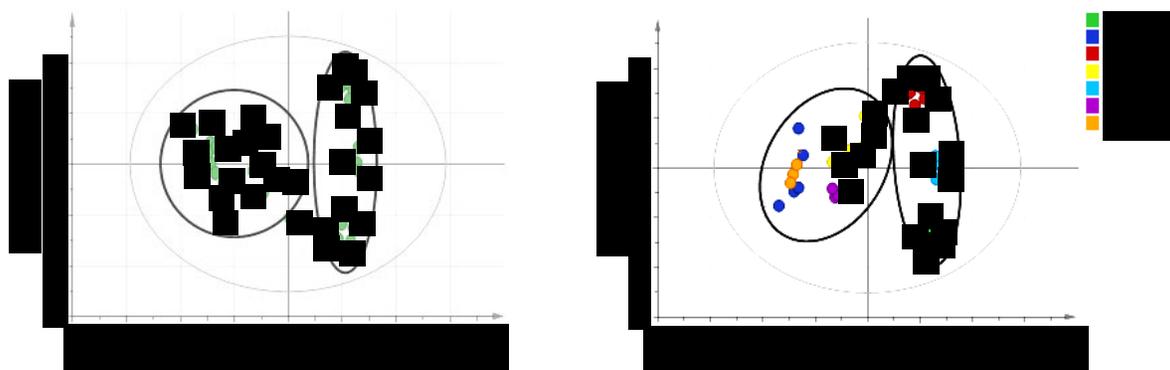


图6 PCA (A)和 OPLS-DA (B) 得分散点图

Fig. 6 PCA diagram (A) and scattered point diagram of OPLS-DA (B)

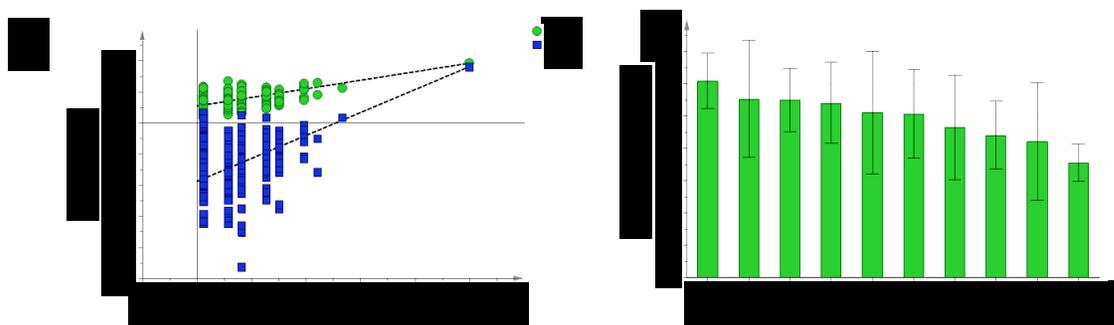


图7 OPLS-DA 置换检验图 (A) 和 29 批样品各成分 VIP 图 (B)

Fig. 7 OPLS-DA replacement test chart (A) and VIP chart of each component of 29 batches of samples (B)

模型中变量重要性投影值 (variable Importance for the projection, VIP 值) 可直观反映出具有统计学意义的差异标志物, 结果见图 7-B, 在 95% 置信区间内, 筛选出  $VIP > 1.0$  的色谱峰为差异标志物, 并通过对照品指认, 具有统计学意义的 6 个差异标志物的影响程度依次为 4 号峰  $>$  10 号峰 (蒙花苷)  $>$  5 号峰 (3,4-二咖啡酰奎宁酸)  $>$  3 号峰 (木犀草苷)  $>$  9 号峰  $>$  1 号峰 (绿原酸)。计算差异标志物峰面积占共有峰峰面积占比, 可知 29 批样品的差异标志物中蒙花苷平均占比最高, 为 32.37%, 绿原酸占比其次, 为 13.03%, 且这些成分 RSD 均大于 21.27%, 表明这些成分在各批次间含量差异较大。

根据以下文献可知, 以上这些成分同样是野菊花的活性成分。张金杰等<sup>[17]</sup>采用微量肉汤稀释法发现野菊花总黄酮及蒙花苷单体对葡萄牙假丝酵母的体外抗菌活性较好。许韩婷等<sup>[18]</sup>发现蒙花苷可通过抑制 NF- $\kappa$ B 及其相关信号通路的活化来减少炎症黏附和炎症因子分泌, 从而缓解脂多糖引起的血管内皮细胞炎症损伤, 发挥抗炎药理活性。戴胜<sup>[19]</sup>采用 HSC 细胞对化合物进行四甲基偶氮唑盐比色法保肝活性筛选, 发现 3,4-二咖啡酰奎宁酸活性较为

突出。赵晶晶<sup>[20]</sup>应用四甲基偶氮唑盐比色法和细胞病变法 2 种方法对木犀草苷等黄酮类化合物进行研究, 发现木犀草苷具有体外抗巨细胞病毒体作用, Shan 等<sup>[21]</sup>发现绿原酸通过减弱核因子  $\kappa$ B 和 JNK/AP-1 信号通路活化来抑制脂多糖诱导的环氧酶-2 表达, 抑制前列腺素 E2 的生成来起到抗炎作用。

综上所述, 结合 OPLS-DA 中 VIP 值筛选、对照品指认及相关药效学文献, 说明蒙花苷、3, 4-二咖啡酰奎宁酸、木犀草苷、绿原酸可作为野菊花药材的差异标志物。

### 3 讨论

#### 3.1 供试品溶液制备方法考察和色谱条件优化

本研究考察了不同提取溶剂 (30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇和乙醇)、不同提取方式 (回流、超声)、不同提取时间 (20、30、40 min) 对野菊花药材指纹图谱色谱图的影响, 结果发现: 50% 甲醇提取的色谱峰较多, 超声和回流提取无明显差异, 不同提取时间也无明显差异, 故选择 50% 甲醇超声提取 30 min 为最优提取方法。

通过考察甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸为流动相体系进行梯度洗脱时, 发现乙腈-0.1% 磷酸作为

流动相, 各色谱峰分离度较好, 峰型较佳, 基线较平稳; 通过在 190~400 nm 全波长扫描, 比较各波长色谱图, 发现在 334 nm 处色谱峰响应值最佳, 故选择 334 nm 作为野菊花药材指纹图谱的检测波长。

### 3.2 共有峰确定

本研究建立的野菊花药材 HPLC 指纹图谱方法确定了 10 个共有峰, 共有峰峰面积占比 85% 以上, 能较好地代表野菊花整体质量; 通过对照品指认, 确定了 7 个化合物, 分别绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷, 与陈宁等<sup>[6,22]</sup>研究结果基本一致。因此本研究所建立的指纹图谱能较全面反映野菊花所包含的化学信息, 为日后野菊花中该类成分定量研究奠定基础, 为其质量控制提供参考。

### 3.3 野菊花分类及差异标志物筛选

前期对指纹图谱数据处理通常是采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件, 而使用化学模式识别结合指纹图谱的方法正越来越多地应用于中药质量控制及评价领域<sup>[23-25]</sup>, 可目前有关野菊花指纹图谱结合化学模式识别的研究相对较少, 本研究通过采用指纹图谱结合化学模式识别方法, 通过聚类分析、主成分分析、最小偏二乘-判别分析这三种主要的化学模式识别方法, 对不同产地野菊花指纹图谱数据进行处理, 研究显示, 聚类分析、主成分分析结果一致, 都将不同产地样品聚为一类, 且根据综合得分排序可知, 本研究中湖北产地野菊花得分靠前, 与韩正洲<sup>[4]</sup>结论一致; 最后用 SIMAC 软件进行 PCA 分类, 采用 OPLS-DA 模型中 VIP 值筛选出 6 个具有统计学意义的差异标志物, 并通过对照品指认出影响较大的化学成分, 其余未知色谱峰可通过液相-质谱联用等手段进一步确定。通过比较差异标志物峰面积占共有峰峰面积占比, 可初步得知蒙花苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、木犀草苷、绿原酸等成分在各批次间含量差异较大, 且《香港中药材标准》第 8 期中野菊花指标成分为绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草苷, 表明在对野菊花的质量控制研究中不能仅关注蒙花苷的质量变化, 还应重点关注上述其他成分的质量变化。

综上, 本实验采用指纹图谱结合化学模式识别的方法对不同产地野菊花药材进行综合分析, 对不同产地野菊花药材进行聚类分析、主成分分析及综合评分, 采用 OPLS-DA 快速筛选出了不同产地野菊花的差异标志物, 为评价野菊花药材的质量及品

质提供参考。

**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. 2020: 126.
- [2] 樊高洁, 李淑敏, 张珊, 等. 野菊花的质量标准研究 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4073-4076.
- [3] 吴雪松, 许浚, 张铁军, 等. 野菊的化学成分及质量评价研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 443-452.
- [4] 韩正洲. 野菊资源研究与野菊花药材品质评价 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [5] 张丽先, 范毅, 魏悦, 等. 一测多评法同时测定野菊花中 12 个成分 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(2): 218-226.
- [6] 陈宁, 韩永成, 刘伟, 等. 野菊花的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 83-85.
- [7] 郑继标, 杨红梅, 黄春华, 等. 野菊花不同部位蒙花苷含量测定及 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(6): 39-41.
- [8] 张艳欣, 吴佩颖, 王丹丹. 中药指纹图谱中常用的数理统计方法 [J]. 上海医药, 2019, 40(9): 74-77.
- [9] 邹纯才, 鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年(1988—2017 年)研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 1969-1977.
- [10] 赵娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1): 82-86.
- [11] 邱俊娜, 张榆, 张双, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及定量测定的夏枯草质量控制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2842-2850.
- [12] 杨玉莹, 张丹丹, 罗心遥, 等. 指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地青钱柳质量 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 1082-1088.
- [13] 李士敏, 李强, 孙崇鲁, 等. 基于多模式识别结合指纹图谱的三叶青产地鉴别比较研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 197-203.
- [14] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行) [J]. 中成药, 2000, 22(10): 23-29.
- [15] 邱俊娜, 张榆, 张双, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及定量测定的夏枯草质量控制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2842-2850.
- [16] 朱星宇, 陈勇强. SPSS 多元统计分析方法及应用 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2011.
- [17] 张金杰, 吕文文, 翁远超, 等. 野菊花中黄酮类成分的抗菌活性及指纹图谱 [J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(6): 807-812.
- [18] 许韩婷, 苏洁, 吴亚军, 等. 蒙花苷对脂多糖诱导的血管内皮细胞炎症损伤的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 29-32.
- [19] 戴胜. 野菊花保肝活性成分的分离、鉴定及初步分析

- [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [20] 赵晶晶. 中药有效成分抗豚鼠巨细胞病毒体外实验研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [21] Shan J H, Fu J, Zhao Z H, *et al.* Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW<sub>264.7</sub> cells through suppressing NF-kappaB and JNK/AP-1 activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(9): 1042-1048.
- [22] 史紫娟, 林碧珊, 曾杉, 等. 野菊花药材与菊花药材特征图谱的比较 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(9): 1511-1513.
- [23] 杨琳, 李廷利. 基于HPLC指纹图谱结合化学模式识别的护肝片质量控制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3351-3356.
- [24] 张丽先, 李自红, 宋梦娇, 等. 基于指纹图谱、模式识别及多成分同时定量的野菊花质量评价研究 [J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(3): 183-188.
- [25] 孙岩, 吴晨光, 韩群, 等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价祖师麻注射液的整体质量 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2170-2176.

[责任编辑 时圣明]