

基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及多成分定量的蒲公英质量评价研究

孟 然^{1,2}, 吴 哲^{1,2}, 冯 薇^{1,2}, 吴晨曦³, 王秀萍^{1,2*}, 李赵嘉^{1,2*}

1. 河北省农林科学院滨海农业研究所, 河北 唐山 063299

2. 唐山市蒲公英工程技术研发中心, 河北 唐山 063299

3. 华北理工大学中医学院, 河北 唐山 063210

摘要: **目的** 建立蒲公英的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法, 优化指纹图谱测定条件, 结合化学模式识别法对不同产地蒲公英进行质量评价, 为蒲公英质量控制提供参考。**方法** 采用 Box-Behnken 响应面分析法优化蒲公英主要有效成分的制备工艺。采用 Mars ODS-AQ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-0.2%磷酸水溶液 (35:65) 为流动相, 等梯度洗脱; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长 323 nm; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C; 检测时间为 12 min; 对 10 个不同产地的 30 批蒲公英建立 HPLC 指纹图谱, 并对 5 个成分含量进行测定, 通过相似度评价、聚类分析及主成分分析对蒲公英质量进行评价。**结果** 蒲公英主要有效成分的最佳制备工艺为料液比 1:55、甲醇体积分数 72%、超声温度 80 °C、超声时间 79 min, 在此条件下 OD 值为 0.93。建立了蒲公英 HPLC 指纹图谱, 30 批蒲公英的相似度在 0.647~0.980, 标定 6 个共有峰, 指出 5 个色谱峰。单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸质量分数分别为 0.426%~1.856%、0.007%~0.117%、0.023%~0.101%、0.003%~0.025%、0.311%~1.412%。聚类分析将 10 个产地的蒲公英分为 4 类, 主成分分析结果表明哈尔滨和沈阳产地的质量较优, 并确定单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸和菊苣酸可作为蒲公英质量评价的主要指标。**结论** 确定了蒲公英主要有效成分最佳制备工艺, 提取率远高于药典方法。建立的蒲公英指纹图谱结合多成分含量测定及化学模式识别法准确、高效、全面地评价蒲公英质量, 为蒲公英的质量控制提供依据。

关键词: 蒲公英; 指纹图谱; 单咖啡酰酒石酸; 绿原酸; 咖啡酸; 阿魏酸; 菊苣酸; 化学模式识别; 质量评价

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)24-7887-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.24.026

Quality evaluation of dandelion based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition and multi-component determination

MENG Ran^{1,2}, WU Zhe^{1,2}, FENG Wei^{1,2}, WU Chen-xi³, WANG Xiu-ping^{1,2}, LI Zhao-jia^{1,2}

1. Institute of Coastal Agricultural, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Tangshan 063299, China

2. Tangshan Dandelion Engineering Technology Research Center, Tangshan 063299, China

3. School of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and the determination method of multi-component content of dandelion, optimize the conditions of fingerprint determination, and combine the method of chemical pattern recognition to evaluate the quality of dandelion from different origins, so as to provide reference for the quality control of dandelion. **Methods** The preparation process of main ingredients in dandelion were optimized by Box-Behnken response surface methodology. Mars ODS-AQ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used; methanol-0.2% phosphoric acid aqueous solution (35:65) was used as the mobile phase for gradient elution; the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 323 nm; the injection volume was 10 μL; the column temperature was 30 °C; the detection time was 12 min. HPLC fingerprints were established for 30 batches of dandelion from 10 different origins, and the contents of five components were determined. The quality of dandelion was evaluated by similarity evaluation, cluster analysis and principal component analysis. **Results** The optimal preparation process of dandelion was as follows: solid-liquid ratio was 1:55, methanol concentration was 72%, ultrasonic temperature was

收稿日期: 2022-06-09

基金项目: 河北省重点研发计划项目 (21326312D-8); 河北省农林科学院现代农业科技创新工程课题资助 (2022KJCZX-BHS-4); 河北省农林科学院基本科研业务费项目资助 (2021010101)

作者简介: 孟 然 (1993—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为中草药功能成分提取与分析。E-mail: yoki_meng@163.com

***通信作者:** 王秀萍, 女, 研究员, 从事中药材鉴定研究。E-mail: bhsxwp@163.com

李赵嘉, 男, 助理研究员, 从事中草药高效利用研究。E-mail: tofriendzhaojia@163.com

80 °C, ultrasonic time was 79 min, and the OD value under these conditions was 0.93. The HPLC fingerprint of dandelion was established, the similarity of 30 batches of dandelion was 0.699—0.980, six common peaks were calibrated, and five chromatographic peaks were identified. The mass fractions of caftaric acid, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid and cichoric acid were 0.426%—1.856%, 0.007%—0.117%, 0.023%—0.101%, 0.003%—0.025% and 0.311%—1.412%, respectively. The dandelion from 10 origins were divided into four categories by cluster analysis. The results of principal component analysis showed that the quality of Harbin and Shenyang origins were better, and it was determined that caftaric acid, chlorogenic acid, caffeic acid and cichoric acid could be used as the main indicators for the quality evaluation of dandelion. **Conclusion** The optimal preparation process for main ingredients of dandelion was determined, and the extraction rate was much higher than that of the pharmacopoeia method. The established dandelion fingerprint, combined with the determination of multi-component content and method of chemical pattern recognition, can evaluate the quality of dandelion accurately, efficiently and comprehensively, and provide a basis for the quality control of dandelion.

Key words: dandelion; fingerprint; caftaric acid; chlorogenic acid; caffeic acid; ferulic acid; cichoric acid; chemical pattern recognition; quality evaluation

蒲公英是菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz.、碱地蒲公英 *T. borealisinense* Kitam.或同属数种植物的干燥全草，主要分布于我国河北、陕西、辽宁和黑龙江等地，临床上具有清热解毒、消肿散结、利尿通淋的作用，常用于治疗疔疮肿毒、乳痈、咽痛、肠痈、湿热黄疸、热淋涩痛等症^[1]。现代药理研究表明，蒲公英具有抗氧化、抗炎、抗癌和降血糖等作用^[2-3]，其中酚酸类化合物是蒲公英的主要有效成分，是发挥药效的重要物质基础。目前从蒲公英中分离得到的酚酸类化合物有 32 种（表 1）^[4-7]，《中国药典》2020 年版以菊苣酸的含量作为蒲公英质量评价指标，仅靠单个主效成分不足以全面、综合地反映蒲公英整体质量。此外，由于蒲公英同属植物多种类、多产地、多成分及相互作用复杂等因素影响，造成不同产地蒲公英质量的差异性。已有文献报道蒲公英饮片、栓剂、配方汤剂等质量研究^[8-10]，但仍存在研究不系统、分析方法单一的问题，未能较直观地反映出不同批次蒲公英的差异标志物。因此，蒲公英质量综合性评价显得尤为重要。

中药指纹图谱与化学模式识别相结合，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，已成为目前最常用最有效的控制天然药材质量的手段^[11-12]。本研究建立了蒲公英高效液相色谱（high performance liquid chromatography, HPLC）指纹图谱，同时高效测定单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和菊苣酸 5 个成分含量，利用响应面法优化蒲公英主效成分的最佳制备方法，结合相似度评价、相关性分析、聚类分析、主成分分析等化学模式识别法对 10 个不同产地 30 批蒲公英进行质量分析研究，明确造成产地差异的标记性成分，旨在为蒲公英质量标准的建立提供科学依据。

表 1 蒲公英酚酸类化合物

Table 1 Phenolic acid compounds of dandelion

编号	中文名	英文名	文献
1	绿原酸	chlorogenic acid	4
2	酒石酸	tartaric acid	4
3	单咖啡酰酒石酸	caftaric acid	4
4	2,4-二羟基苯甲酸	2,4-di-hydroxybenzoic acid	4
5	奎宁酸	quinic acid	4
6	苯乙酸	phenylacetic acid	5
7	原儿茶酸	protocatechuate	5
8	香荚兰酸	vanillic acid	5
9	3,5-二羟基苯甲酸	3,5-dihydroxybenzoic acid	5
10	咖啡酸甲酯	methylcaffeate	5
11	咖啡酸乙酯	caffeic acid ethylester	5
12	对羟基苯乙酸	p-hydroxyphenylacetic acid	5
13	对羟基苯乙酸甲酯	ethyl p-hydroxybenzoate	5
14	对羟基苯乙酸乙酯	ethyl p-hydroxyphenylacetate	5
15		11β,13-di-hydroxytaraxinic acid	5
16		artecalin	5
17		arsanin	5
18	菊苣酸	cichoric acid	5
19	没食子酸	gallic acid	6
20	3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸	3,5-O-dicaffeoylquinic acid	6
21	3,4-O-双咖啡酰基奎宁酸	3,4-O-dicaffeoylquinic acid	6
22	4,5-O-双咖啡酰基奎宁酸	4,5-O-dicaffeoylquinic acid	6
23	对香豆酸	p-hydroxycinnamic acid	6
24	阿魏酸	ferulic acid	6
25	丁香酸	syringic acid	6
26		mongolicumin A	6
27		rufescidride	6
28	5-咖啡酰基奎宁酸	5-caffeoylquinic acid	7
29	对羟基苯甲酸	p-hydroxybenzoic acid	7
30	咖啡酸	caffeic acid	7
31	甲氧基苯乙醛酸	dl-alpha-methoxyphenylacetic acid	7
32	没食子酸甲酯	methyl gallate	7

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); DHY-300 型超微粉碎机(北京东华原医疗设备有限责任公司); AP124W 型电子天平(日本岛津公司); HH-6 型数显恒温水浴锅(上海力辰邦仪器科技有限公司); JT-1027HTD 型机械超声波清洗机(深圳市洁拓超声波清洗设备有限公司)。

1.2 材料

单咖啡酰酒石酸(批号 SC5580, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、绿原酸(批号 SC8210, 质量分数 $\geq 98.0\%$)标准品购自北京索莱宝科技有限公司; 咖啡酸(批号 YZ-110885, 质量分数 $\geq 99.7\%$)、阿魏酸(批号 YZ-110773, 质量分数 $\geq 99.4\%$)、菊苣酸(批号 YZ-111752, 质量分数 $\geq 98.0\%$)对照品均购自中国药品生物制品检定所; 磷酸、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司); 无水甲醇(分析纯, 天津市恒兴化学试剂制造有限公司); 屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。本实验收集了 10 个产地 30 批蒲公英, 经河北省农林科学院滨海农业研究所王秀萍研究员鉴定均为菊科植物蒲公英 *T. mongolicum* Hand. -Mazz, 样品信息见表 2。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Mars ODS-AQ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5

μm); 流动相甲醇(A)-流动相 0.2%磷酸水溶液(B) (35:65), 等梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 323 nm, 检测时间 12 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取蒲公英样品粉末(过四号筛) 0.50 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 80%甲醇 20 mL, 称定质量, 超声处理(功率 400 W, 频率 40 kHz) 20 min, 放冷, 再称定质量, 用 80%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 的针式过滤器滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸对照品适量, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 80%甲醇溶液, 超声溶解, 定容, 制成质量浓度分别为 0.975、0.260、0.156、0.126、1.125 mg/mL 的对照品贮备液。然后分别精密量取各对照品贮备液 2.00 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 加 80%甲醇定容, 摇匀, 制得单咖啡酰酒石酸为 0.195 mg/mL、绿原酸为 0.052 mg/mL、咖啡酸为 0.031 mg/mL、阿魏酸为 0.025 mg/mL、菊苣酸为 0.225 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 80%甲醇溶液至刻度, 摇匀, 作为系列对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样分析, 以各组分峰面积为纵坐标(Y), 以对照品溶液的浓度为横坐标(X), 进行线性回归。结果见表 3。

2.3.2 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下方法制备的蒲公英供试品(S7) 20 μL , 按“2.1”项色谱条件下重复进样 6 次, 记录色谱图。以单咖啡酰酒石酸(1 号峰)为参照峰, 考察各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果表明各共有峰相对保留

表 3 蒲公英中主效成分的线性关系考察结果

Table 3 Linear relationship investigation of main ingredients in dandelion

成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
单咖啡酰酒石酸	$Y=0.634X+1.026$	0.997	19.51~117.07
绿原酸	$Y=0.614X+0.929$	0.999	5.22~31.32
咖啡酸	$Y=0.390X+0.814$	0.999	3.13~18.77
阿魏酸	$Y=0.353X-1.251$	0.998	2.52~15.12
菊苣酸	$Y=0.456X+3.007$	0.999	22.51~135.04

表 2 蒲公英药材信息

Table 2 Information of dandelion herbs

编号	产地	编号	产地
S1	河北省保定市安国市	S16	河北省张家口市万全区
S2	河北省保定市安国市	S17	河北省张家口市万全区
S3	河北省保定市安国市	S18	河北省张家口市万全区
S4	河北省保定市易县	S19	河北省张家口市蔚县
S5	河北省保定市易县	S20	河北省张家口市蔚县
S6	河北省保定市易县	S21	河北省张家口市蔚县
S7	河北省沧州市任丘市	S22	山东省泰安市泰山区
S8	河北省沧州市任丘市	S23	山东省泰安市泰山区
S9	河北省沧州市任丘市	S24	山东省泰安市泰山区
S10	黑龙江省哈尔滨市松北区	S25	河北省邯郸市涉县
S11	黑龙江省哈尔滨市松北区	S26	河北省邯郸市涉县
S12	黑龙江省哈尔滨市松北区	S27	河北省邯郸市涉县
S13	辽宁省沈阳市沈河区	S28	河北省唐山市曹妃甸区
S14	辽宁省沈阳市沈河区	S29	河北省唐山市曹妃甸区
S15	辽宁省沈阳市沈河区	S30	河北省唐山市曹妃甸区

时间和相对峰面积 RSD 值均小于 1.54%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批蒲公英供试品 (S7) 6 份，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下测定，以单咖啡酰酒石酸 (1 号峰) 为参照峰，考察各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果表明各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 2.06%，表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 精密称取同一批蒲公英供试品 (S7)，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 时按上述色谱条件进样分析，以单咖啡酰酒石酸 (1 号峰) 为参照峰，考察各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果表明各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 2.17%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4 蒲公英指纹图谱的建立及相似度评价

2.4.1 蒲公英指纹图谱的建立及共有峰的标定 将 30 批蒲公英样品按“2.2.1”项下优化的提取工艺条件制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行色谱分析，记录色谱图。将所得的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版本)”软件进行评价，设定 S10 样品图谱作为参照图谱，时间窗宽度为 0.1 min，采用中位数法结合多点校正，进行色谱峰匹配，生成对照指纹图谱。选择蒲公英中的主要成分且分离较好的色谱峰作为共有峰，共标定了 6 个共有峰。通过与对照品比对，指出其中 5 个色谱峰，分别为单咖啡酰酒石酸 (峰 1)、绿原酸 (峰 2)、咖啡酸 (峰 3)、阿魏酸 (峰 4) 和菊苣酸 (峰 5)。30 批蒲公英 HPLC 指纹图谱见图 1，蒲公英对照指纹图谱见图 2。

2.4.2 蒲公英指纹图谱的相似度评价 将 30 批蒲公英指纹图谱与对照图谱进行相似度评价，相似度结果如表 4 所示，30 批蒲公英指纹图谱的相似度在 0.647~0.980，相似度在 0.9 以上的蒲公英占 70.00%；30 批蒲公英各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.02%，相对峰面积的 RSD 为 7.69%~67.75%，相差较大，表明各批次间这 6 个共有峰所代表化合物的含量存在较大差异，不同产地间蒲公英质量参差不齐。

2.5 蒲公英提取工艺优化

由蒲公英的指纹图谱可知检测的蒲公英色谱峰的峰面积较小，所采用的制备方法提取率不高。因

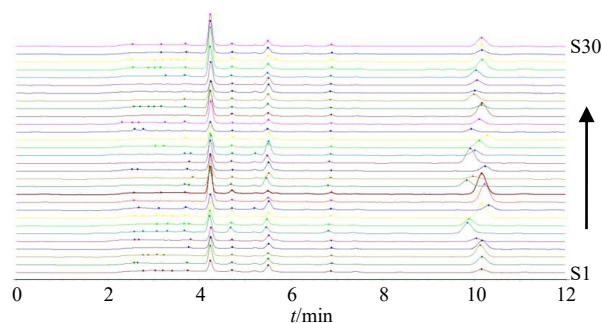
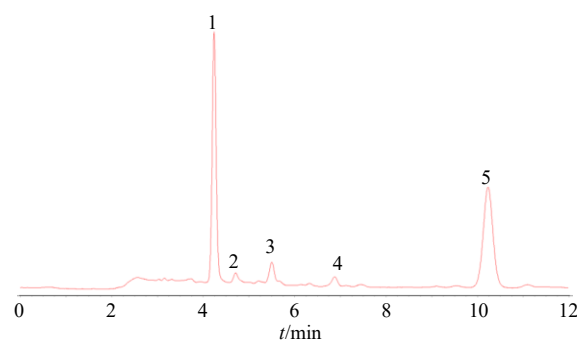


图 1 30 批蒲公英的 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprints of 30 batches of dandelion



1-单咖啡酰酒石酸 2-绿原酸 3-咖啡酸 4-阿魏酸 5-菊苣酸
1-caftaric acid 2-chlorogenic acid 3-caffeic acid 4-ferulic acid
5-cichoric acid

图 2 蒲公英 HPLC 对照指纹图谱
Fig. 2 Reference HPLC fingerprint of dandelion

表 4 30 批蒲公英相似度评价结果

Table 4 Similarity calculation results of 30 batches of dandelion

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.859	S16	0.919
S2	0.969	S17	0.940
S3	0.908	S18	0.963
S4	0.699	S19	0.733
S5	0.940	S20	0.926
S6	0.647	S21	0.929
S7	0.742	S22	0.906
S8	0.877	S23	0.966
S9	0.813	S24	0.915
S10	0.955	S25	0.874
S11	0.980	S26	0.964
S12	0.963	S27	0.738
S13	0.945	S28	0.958
S14	0.931	S29	0.930
S15	0.929	S30	0.974

此, 本研究对指纹图谱中指认的单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸 5 个主要有效成分的制备工艺进行优化, 进一步对 30 批不同产地蒲公英进行含量测定。

2.5.1 响应面法优化提取工艺试验设计与结果 采用 Design-Expert 8.0.6 软件, 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 结合单因素实验结果, 对蒲公英提取工艺进一步优化。为将 5 个指标成分的效应值综合成一个可以反映总体效应结果的数值, 数据处理采用“总评归一化法”^[13], 对于综合数值越大越好的因素, 总评归一值(overall desirability, OD)计算公式如下:

$$d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

$$OD = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{1/n}$$

n 为考察指标总数, d_i 为各指标值。

以料液比(A)、甲醇体积分数(B)、超声温度(C)和超声时间(D)作为自变量, 以单咖啡酰酒

石酸(Y_1)、绿原酸(Y_2)、咖啡酸(Y_3)、阿魏酸(Y_4)和菊苣酸(Y_5)含量的 OD 值为因变量, 设计 4 因素 3 水平的响应面优化实验, 因素水平设定见表 5。

$$\text{蒲公英主效成分含量} = (C \times 10^{-6} \times V \times N) / W \times 100.$$

C 为提取液各成分的质量浓度; V 为粗提液体积; N 为稀释倍数; W 为原料质量。

表 5 因素水平设定

Table 5 Factor level setting table

水平	因素			
	A	B/%	C/°C	D/min
-1	1 : 10	30	40	60
0	1 : 35	55	60	80
1	1 : 60	80	80	100

根据因素水平设定表, 按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和菊苣酸的含量。Box-Behnken 优化实验设计及结果见表 6。

表 6 Box-Behnken 优化实验设计及结果

Table 6 Design and results of Box-Behnken optimization experiment

编号	A	B	C	D	质量分数/%					OD 值
					酒石酸	绿原酸	咖啡酸	阿魏酸	菊苣酸	
1	-1	0	1	0	0.20	0.01	0.04	0.02	0.30	0.00
2	0	0	1	-1	1.21	0.38	0.59	0.26	5.43	0.59
3	0	-1	-1	0	0.70	0.12	0.26	0.09	2.81	0.23
4	0	0	0	0	1.29	0.32	0.48	0.34	6.80	0.62
5	0	0	0	0	0.99	0.41	0.67	0.34	6.08	0.64
6	1	-1	0	0	1.54	0.16	0.38	0.09	3.99	0.35
7	0	-1	0	-1	0.67	0.03	0.07	0.02	1.31	0.00
8	0	0	-1	-1	1.95	0.14	0.33	0.12	4.98	0.39
9	0	0	0	0	2.39	0.35	0.56	0.25	7.53	0.71
10	1	0	0	1	0.65	0.13	0.13	0.08	2.51	0.18
11	1	0	1	0	2.08	0.58	0.49	0.34	4.73	0.72
12	-1	0	-1	0	0.15	0.04	0.04	0.06	0.63	0.00
13	-1	-1	0	0	0.29	0.05	0.03	0.02	0.79	0.00
14	-1	0	0	1	0.16	0.03	0.04	0.02	0.61	0.00
15	0	-1	1	0	0.71	0.16	0.26	0.11	2.61	0.26
16	0	1	-1	0	0.53	0.16	0.23	0.12	2.59	0.23
17	0	1	1	0	2.88	0.29	0.42	0.31	6.03	0.67
18	-1	1	0	0	0.26	0.05	0.06	0.02	0.92	0.00
19	1	0	-1	0	0.66	0.11	0.13	0.09	2.09	0.18
20	0	0	0	0	2.97	0.43	0.54	0.39	7.04	0.83
21	1	1	0	0	3.17	0.52	0.64	0.36	8.54	0.93
22	-1	0	0	-1	0.59	0.20	0.16	0.09	3.12	0.23
23	0	1	0	-1	1.15	0.14	0.16	0.07	2.33	0.22
24	0	0	1	1	3.40	0.38	0.37	0.21	5.96	0.65
25	0	0	0	0	2.82	0.42	0.49	0.31	8.76	0.80
26	0	-1	0	1	0.54	0.13	0.16	0.10	3.25	0.21
27	0	0	-1	1	0.52	0.21	0.14	0.09	2.41	0.20
28	0	1	0	1	0.34	0.07	0.09	0.02	1.52	0.00
29	1	0	0	-1	1.70	0.20	0.19	0.13	2.53	0.32

2.5.2 模型的建立与显著性检验 应用 Design-Expert 进行回归拟合分析, 可得到 OD 值对料液比(A)、甲醇体积分数(B)、超声温度(C)和超声时间(D)二次多项回归方程: $OD \text{ 值} = 0.99 + 0.25A + 0.11B + 0.18C - 0.051D + 0.19AB + 0.18AC + 0.028AD + 0.13BC - 0.095BD + 0.084CD - 0.35A^2 - 0.30B^2 - 0.17C^2 - 0.33D^2$; 方差分析结果见表 7, 模拟项 $P < 0.01$, 极显著, 表明本试验所选用的二次多项模型具有高度的显著性; 失拟项 $P = 0.0917$, 不显著, 说明建立模型不存在失拟因素, 拟合程度好^[14]; $R^2 = 0.8541$, $R^2_{\text{adj}} = 0.8066$, 表明此模型拟合度较好。因此, 该模型能够预测各因素对蒲公英提取含量的影响。因素 A、 A^2 、 B^2 、 D^2 达到极显著水平 ($P < 0.01$), 说明对蒲公英主效成分含量有极显著的影响。由 F 值可知, 4 个因素对蒲公英主效成分提取含量的影响依次是 $A > C > B > D$ 。

响应面曲线梯度反映各因素对主效成分提取含量的影响大小, 响应曲面越陡说明该因素的影响越显著^[15]。根据图 3 曲线上各因素的坡度变化及等高线疏密可知, 料液比对主效成分提取含量的影响最大, 且因素之间存在一定的交互作用, 其中 A、B 2 因素间交互作用显著 ($P < 0.05$)。各因素对提取含量的影响由大到小的顺序为: $A > C > B > D$, 这与方差分析结果一致。

表 7 回归方程系数显著性检验

Table 7 Test table of regression equation coefficient significance

来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值(显著性)
模型	3.26	14	0.23	4.67	0.0034**
A	0.77	1	0.77	15.50	0.0015**
B	0.15	1	0.15	3.04	0.1029
C	0.38	1	0.38	7.63	0.0153*
D	0.03	1	0.03	0.64	0.4385
AB	0.14	1	0.14	2.79	0.0472*
AC	0.14	1	0.14	2.72	0.1214
AD	3.18×10^{-3}	1	3.18×10^{-3}	0.06	0.8044
BC	0.07	1	0.07	1.43	0.2512
BD	0.04	1	0.04	0.73	0.4079
CD	0.03	1	0.03	0.56	0.4653
A^2	0.78	1	0.78	15.61	0.0014**
B^2	0.58	1	0.58	11.70	0.0041**
C^2	0.18	1	0.18	3.63	0.0775
D^2	0.70	1	0.70	14.11	0.0021**
残差	0.70	14	0.05		
失拟项	0.64	10	0.06	4.14	0.0917
纯误差	0.06	4	0.02		
总差	3.96	28			

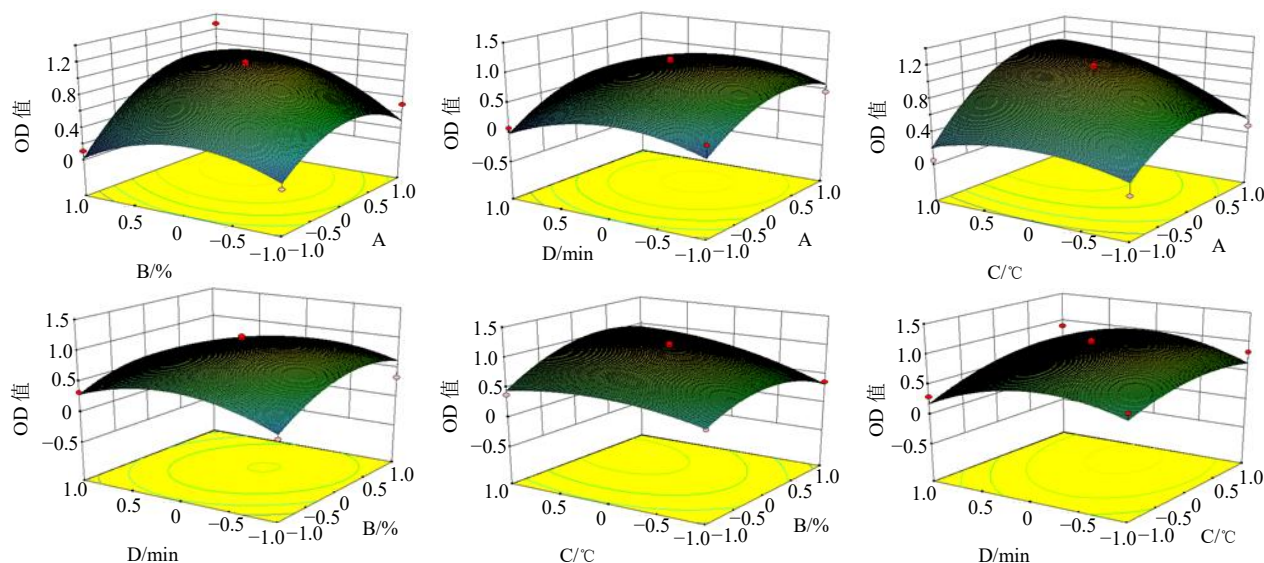
*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$)*indicates significant difference ($P < 0.05$), **indicates extremely significant difference ($P < 0.01$)

图 3 各因素交互作用对 OD 值影响的响应面图

Fig. 3 Response surface diagram of interaction of various factors on OD value

2.5.3 最佳条件的预测及验证试验 通过回归模型的预测,得到超声波辅助提取蒲公英主效成分的最佳制备工艺为:料液比 1:55.27、甲醇体积分数 71.63%、超声温度 80.00 °C、超声时间 79.49 min,此时 OD 值最大为 0.93。结合生产实际,将各因素进行调整为:料液比 1:55、甲醇体积分数 72%、超声温度 80 °C、超声时间 79 min。为了检验方法预测的结果,用试验中得到的最佳制备工艺条件重复试验,平行 3 份。结果表明,在此条件下进行 3 次平行实验进行验证,平均 OD 值为 (0.928±0.005),与理论预测值误差值小于 0.689%,且经 *t* 检验的结果差异不显著 ($P>0.05$),表明建立的工艺模型具有较好的预测性,可运用此方法制备蒲公英主效成分。

2.5.4 蒲公英主效成分含量测定 取 30 批蒲公英样品,按照“2.2.1”项下优化的工艺条件制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,以外标法计算样品中 5 种主效成分的含量,结果见表 8,30 批蒲公英中 5 个主效成分含量有所差异,单咖啡酰酒石酸含量为 0.426%~1.856%,绿原酸含量为 0.007%~0.117%,咖啡酸含量为 0.023%~0.101%,阿魏酸 0.003%~0.025%。S11 单咖啡酰酒石酸、菊苣酸含量最高,S27 中绿原酸、咖啡酸含量最高,S30 中阿魏酸含量最高。

在上述 5 种蒲公英主效成分中,《中国药典》2020 年版只对菊苣酸进行了限定,要求含量不得低于 0.45%^[1],本研究也以此作为菊苣酸的限量标准。测定结果显示,30 批蒲公英中菊苣酸的含量为 0.311%~1.412%,各产地蒲公英的菊苣酸含量差异明显,绝大部分产地的蒲公英菊苣酸含量达标,其中黑龙江哈尔滨、河北唐山产地的蒲公英菊苣酸含量远远高出药典规定。

2.6 化学模式识别分析

2.6.1 相关性分析 蒲公英成分指标间存在相互依存和制约的关系,多样本 2 指标之间系数绝对值越大,则这两指标之间的联系越紧密^[16]。利用 SPSS 26.0 软件双变量 Pearson 相关分析法对 5 个主效成分之间的相关性进行分析,由表 9 可知,除酒石酸与绿原酸之间相关性不显著 ($P>0.05$)、酒石酸与阿魏酸呈显著正相关 ($P<0.05$) 之外,其他成分指标之间均呈现两两显著正相关。酒石酸与咖啡酸、菊苣酸均呈极显著正相关 ($P<0.01$),与阿魏酸呈显著正相关 ($P<0.05$),其中酒石酸与菊苣酸之间

表 8 30 批蒲公英 5 种主效成分含量测定结果 ($n=3$)

Table 8 Determination results of five kinds of main ingredients in 30 batches of dandelion ($n=3$)

编号	质量分数/%				
	单咖啡酰酒石酸	绿原酸	咖啡酸	阿魏酸	菊苣酸
S1	1.069	0.012	0.023	0.005	0.436
S2	1.236	0.007	0.041	0.003	0.599
S3	1.014	0.044	0.052	0.016	0.903
S4	0.795	0.027	0.067	0.012	0.566
S5	0.707	0.007	0.023	0.004	0.354
S6	0.923	0.011	0.066	0.008	0.454
S7	1.066	0.019	0.063	0.012	0.525
S8	0.914	0.007	0.035	0.004	0.953
S9	1.530	0.028	0.098	0.013	0.981
S10	1.782	0.080	0.093	0.025	1.287
S11	1.856	0.052	0.082	0.024	1.412
S12	1.274	0.046	0.066	0.025	0.912
S13	0.426	0.014	0.034	0.013	0.353
S14	0.534	0.013	0.024	0.007	0.556
S15	0.986	0.046	0.084	0.020	1.029
S16	0.707	0.012	0.038	0.013	0.767
S17	0.654	0.008	0.023	0.006	0.605
S18	0.851	0.013	0.037	0.007	0.768
S19	0.866	0.017	0.053	0.016	0.872
S20	0.820	0.023	0.081	0.017	0.674
S21	1.338	0.026	0.052	0.022	0.976
S22	0.625	0.020	0.023	0.009	0.728
S23	0.741	0.009	0.057	0.017	0.857
S24	0.651	0.020	0.031	0.007	0.311
S25	0.523	0.017	0.042	0.007	0.674
S26	0.774	0.007	0.023	0.004	0.719
S27	0.586	0.117	0.101	0.016	0.643
S28	0.901	0.028	0.053	0.011	1.072
S29	0.751	0.027	0.064	0.020	0.738
S30	0.767	0.102	0.079	0.018	0.814

相关性较高,相关系数为 0.687;绿原酸与咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸均呈极显著正相关 ($P<0.01$),其中绿原酸与咖啡酸之间相关系数达 0.699,说明两者间关系紧密;咖啡酸与阿魏酸、菊苣酸呈极显著正相关 ($P<0.01$);阿魏酸与菊苣酸呈极显著正相关 ($P<0.01$);结果表明酒石酸与绿原酸之间相互影响不显著,其他主效成分含量之间相互显著影响,进而影响蒲公英的质量。

表 9 30 批蒲公英 5 种主效成分的相关性分析
Table 9 Correlation analysis of five kinds of main ingredients in 30 batches of dandelion

成分指标	酒石酸	绿原酸	咖啡酸	阿魏酸	菊苣酸
酒石酸	1.000				
绿原酸	0.127	1.000			
咖啡酸	0.485**	0.699**	1.000		
阿魏酸	0.221*	0.553**	0.469**	1.000	
菊苣酸	0.687**	0.270**	0.493**	0.424**	1.000

*表示水平上（双侧）显著相关（ $P < 0.05$ ），**表示水平上（双侧）极显著相关（ $P < 0.01$ ）
*indicates a significant correlation ($P < 0.05$) on the level (two-sided),
**indicates a extremely significant correlation ($P < 0.01$) on the level (two-sided)

2.6.2 聚类分析 利用 SPSS 26.0 软件，以 30 批蒲公英中的酒石酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和菊苣酸含量为变量，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，构建树系图（图 4），将样本划分为不同类群进行评价。由图可知，各批次蒲公英样本主要分为 2 大类、4 小类：S10~S15 聚为一大类（II），其他样本聚为一大类（I）。在平方欧式距离 8 处，S1~S9、S16~S21、S25~S30 聚为一小类（Ia），S22~S24 聚为一小类（Ib）；S10、S11 聚为一小类（IIa），S12~S15 聚为

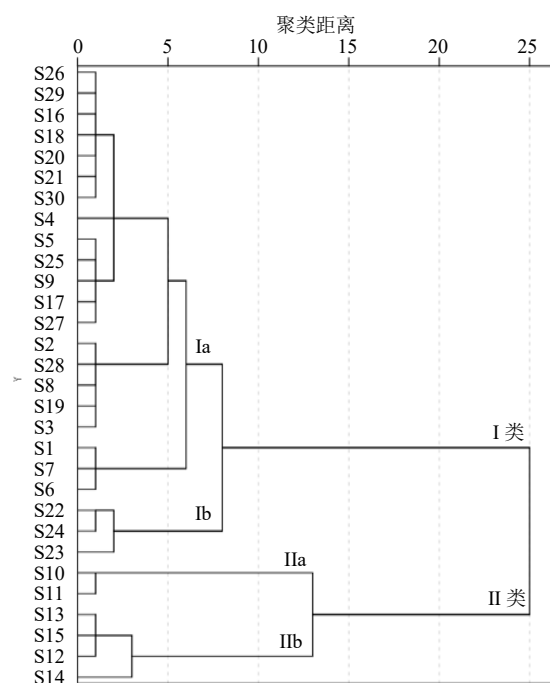


图 4 30 批蒲公英聚类分析树状图
Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis of 30 batches of dandelion

一小类（IIb）。从总体数据来看，不同产地蒲公英质量具有一定差异，其中第 II 类与其他样本差异较大，距离为 25 时就可以归为不同的类型，这说明黑龙江哈尔滨和辽宁沈阳产区的蒲公英与其他产地蒲公英具有明显的差异；在距离为 1 时所有样本完全分离，说明虽然 30 批蒲公英样本来自于不同产地，但仍具有较强相似性。

2.6.3 主成分分析 为了进一步比较不同产地蒲公英样品的质量差异，以 30 批蒲公英中的酒石酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和菊苣酸含量为变量，采用 SPSS 26.0 软件进行主成分分析，得出主成分的特征值、贡献率、主成分载荷矩阵及特征向量矩阵等。选取其中特征值大于 1 的前 2 个因子作为主成分 1 与主成分 2，贡献率分别为 59.558% 和 21.596%，累积贡献率为 81.155%（表 10），故 2 个主成分可以基本反映本实验测定的所有成分指标的信息。载荷值反映了各品质指标对主成分矩阵中的权重，数值绝对值的大小反映了原始变量对于因子影响的强度，正负反映了方向^[17]。表 11 显示了主成分分析载荷值的分布，酒石酸、绿原酸、阿魏酸和咖啡酸在第 1 主成分上载荷较大，表明与 PC1 相关系数较高，且均成正相关，第 1 主成分主要反映了这些元素的信息；菊苣酸在第 2 主成分上载荷较大，即与 PC2 相关系数较高，表明第 2 主成分主要反映了菊苣酸的信息。

表 10 特征值和累积方差贡献率
Table 10 Eigen value and cumulative variance contribution rate

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	2.978	59.558	59.558
2	1.080	21.596	81.155
3	0.471	9.412	90.567
4	0.258	5.165	95.732
5	0.213	4.268	100.000

表 11 主成分载荷矩阵
Table 11 Principal component loading matrix

成分	主成分 1	主成分 2
酒石酸	0.858	-0.184
绿原酸	0.810	-0.428
阿魏酸	0.768	0.491
咖啡酸	0.734	-0.434
菊苣酸	0.676	0.659

根据公式 $F = Zx \times t$ 计算各主成分值, 其中 Zx 原始数据标准化得标准化矩阵, t 为标准化的正交特征向量矩阵。根据各主成分的贡献率, 计算出综合得分, 其公式为 $F_{\text{综}} = 0.5956 \times F_1 + 0.2160 \times F_2$ 。各主成分值及综合排序结果见表 12, 根据得分情况反映各产地蒲公英的质量情况, 总得分越高表明该地区蒲公英的综合质量越好, 本研究中 S10~S15 综合得分较高, 说明来自哈尔滨和沈阳的蒲公英质量相对较优。分别以 PC1 与 PC2 建立坐标系, 得到主成分分析散点图 (图 5), 由图可知, PC1 和 PC2 可将样品分为 4 类, 第 1 类为 S10、S11, 第 2 类为 S12~S15, 第 3 类为 S22~S24, 其他归为第 4 类。主成分分析与聚类分析结果相一致, 进一步证明了 PC1 和 PC2 可代表蒲公英的质量用于分类。

表 12 主成分综合得分和排序

Table 12 Comprehensive scores and ranking of principal components

序号	F_1	F_2	$F_{\text{综}}$	排名
S1	-0.591	-0.452	-0.450	18
S2	1.013	0.758	0.767	7
S3	0.673	-0.022	0.396	8
S4	-0.372	0.019	-0.217	16
S5	-1.017	-0.502	-0.714	23
S6	-0.858	0.111	-0.487	19
S7	-0.253	-0.176	-0.189	15
S8	-0.961	1.008	-0.355	17
S9	-1.799	-0.249	-1.125	26
S10	4.150	0.589	2.599	1
S11	3.728	0.806	2.394	2
S12	2.897	-0.217	1.679	5
S13	2.857	0.363	1.780	4
S14	1.987	0.112	1.208	6
S15	3.070	0.019	1.833	3
S16	-0.907	0.165	-0.505	20
S17	-1.938	-0.050	-1.165	28
S18	-1.029	0.383	-0.530	21
S19	-0.011	0.389	0.077	13
S20	0.280	0.322	0.236	11
S21	-0.217	0.554	-0.010	14
S22	-2.463	-0.761	-1.631	30
S23	-1.493	-1.213	-1.151	27
S24	-1.761	-0.748	-1.210	29
S25	-1.100	-0.033	-0.662	22
S26	-1.609	0.170	-0.922	25
S27	-1.039	-0.568	-0.742	24
S28	0.247	0.963	0.355	9
S29	0.205	-0.028	0.116	12
S30	0.827	-0.922	0.293	10

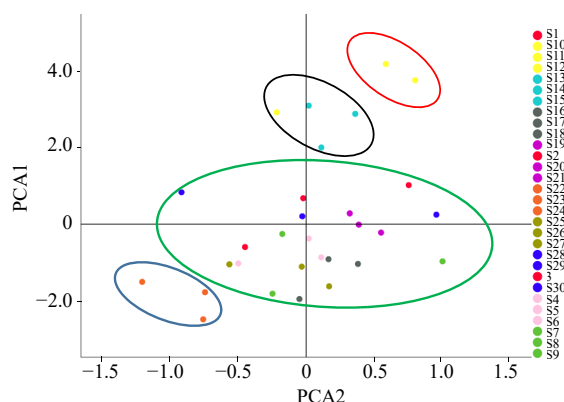


图 5 主成分分析散点图

Fig. 5 Scatter plots of principal component analysis

3 讨论

本实验采用《中国药典》2020 年版^[1]的提取方法, 检测得到蒲公英中单咖啡酰酒石酸含量为 0.59%, 绿原酸含量为 0.12%, 咖啡酸含量为 0.15%, 阿魏酸含量为 0.08%, 菊苣酸为 0.363%, 计算得 OD 值为 0.09, 表明药典提供的方法检测结果可能偏低。因此, 本研究以液料比、甲醇浓度、超声时间及温度为因子, 采用响应面优化设计, 对指纹图谱测定条件进行了优化, 得到最佳制备方法为料液比 1:55、甲醇浓度 72%、超声温度 80.00 °C、超声时间 79 min, 此时 OD 值最大为 0.93, 大大提高了蒲公英主效成分的提取率。

经查阅文献报道^[8,19-20]可知, 采用高效液相色谱法检测蒲公英菊苣酸等成分的检测时间通常在 26~35 min。在此基础上, 本研究对色谱条件进行了系统考察, 包括不同流动相系统 (乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液和甲醇-0.1%甲酸水溶液)、流动相比比例 (50:50、45:55、35:65)、不同体积流量 (0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同柱温 (25、30、35 °C) 的考察, 最终确定了蒲公英分析的最佳色谱条件。在此色谱条件下可将蒲公英中单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸 5 种主效成分在 12 min 内检出, 从而大大降低了检测时间成本。

产地是影响药材质量的主要原因之一, 地形地貌、土壤、气候等因素都可能造成不同产地间的成分差异, 同一产地的药材质量也会受采收时间、种植方式等因素影响^[18]。本实验通过建立蒲公英 HPLC 指纹图谱, 对 10 个不同产地 30 批蒲公英指纹图谱相似度分析, 结果显示 21 批蒲公英样品相似度高于 0.9, 化学成分组成较为相似。有 5 批样品

相似度低于 0.8, 可能与生长年限、地理环境条件及贮藏等因素有关, 需进一步分析。后续通过方法学考察确定多成分含量测定方法可行, 进一步对单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸 5 种有效成分的含量进行测定, 结果发现单咖啡酰酒石酸和菊苣酸含量相对较高, 不同产地间含量存在较大差异。

聚类分析中, 在平方欧式距离 25 处, 将黑龙江和辽宁的蒲公英聚为一类, 而河北 7 个地区和山东的蒲公英聚为一类。当距离刻度为 8 时, 又将河北 7 个地区与山东的蒲公英区分开, 说明河北 7 个地区与山东的蒲公英药材质量具有相似性, 有可能是因为河北与山东产地相邻、生态环境相似而聚为一类, 但也可能因为地处沿海与内陆的区别具有一定差异性; 而不能将黑龙江和辽宁 2 产地的药材清晰地分离出来, 说明东北 2 地的蒲公英药材质量较为接近, 可能原因是两个产区同属于东北地区, 药材的化学成分很相似, 因此造成这 2 类数据差异性小。

主成分分析结果分析发现酒石酸、绿原酸、阿魏酸和咖啡酸最能代表第 1 主成分, 但阿魏酸峰面积较小; 菊苣酸最能代表第 2 主成分。同时, 文献表明, 单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸和菊苣酸为蒲公英主要活性成分—酚酸类物质中重要成分^[21], 选择酒石酸、绿原酸、咖啡酸和菊苣酸作为药材含量测定指标可以更加全面反映蒲公英内在品质。主成分分析将 30 批蒲公英样本分为 4 类, 结果与聚类分析结果相一致。根据综合得分可知, 来自哈尔滨和沈阳产地的蒲公英质量相对较优。

综上所述, 相似度分析、聚类分析、主成分分析是中药指纹图谱结合化学模式识别手段应用最普遍的分析方法, 清晰地表明了不同产地蒲公英药材的差异。本研究建立指纹图谱与成分测定、化学模式识别法相结合, 能较为科学、全面地反映药材质量。本实验建立的方法操作简便、高效稳定, 对蒲公英质量标准的提升具有重要意义。

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: 367-368.
- [2] Montes F O, A, Fenton-Navarro B. Active compounds of medicinal plants, mechanism for antioxidant and beneficial effects [J]. *Phyton*, 2019, 88(1): 1-10.
- [3] Faria T C, Nascimento C C H C, De Vasconcelos S D D, et al. Literature review on the biological effects of *Taraxacum officinale* plant in therapy [J]. *Asian J Pharm Res Dev*, 2019, 7(3): 94-99.
- [4] Grauso L, Emrick S, Bonanomi G, et al. Metabolomics of the alimurgic plants *Taraxacum officinale*, *Papaver rhoeas* and *Urtica dioica* by combined NMR and GC-MS analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2019, 30(5): 535-546.
- [5] 聂文佳, 徐帅师, 张咏梅. 蒲公英有效成分及其药理作用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(7): 140-145.
- [6] 施树云, 周长新, 徐艳, 等. 蒙古蒲公英的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, (10): 1147-1157.
- [7] Jędrejek D, Kontek B, LIS B, et al. Evaluation of antioxidant activity of phenolic fractions from the leaves and petals of dandelion in human plasma treated with H₂O₂ and H₂O₂/Fe [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 262: 29-37.
- [8] 徐帅师, 聂文佳, 张咏梅. 蒲公英栓剂的制备及质量检查 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2021, 38(7): 744-750.
- [9] 李超, 苏晓楠, 朱法根, 等. 蒲地蓝消炎口服液源头把控: 基于超高效液相指纹图谱的蒲公英药材质量研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(18): 4307-4315.
- [10] 孙博, 常阿倩, 朱广伟, 等. 基于传统煎药工艺的川牛膝饮片标准汤剂制备及质量评价方法研究 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(12): 3144-3149.
- [11] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 231-237.
- [12] 李妍, 何文媛, 王康宇, 等. 基于 HPLC 多指标成分测定及指纹图谱多模式识别方法的北细辛质量分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 238-243.
- [13] 李欧, 赵善婷, 李亚迪, 等. 总评“归一值”优选黄芩中黄酮类成分的提取工艺 [J]. *兽医医药杂志*, 2021, 40(3): 17-23.
- [14] 杨凯, 马子豪, 李源, 等. Box-Behnken 响应面法优化白及多糖/聚乙烯醇湿法纺丝工艺及纤维性能评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(14): 3645-3654.
- [15] 郭宏焱, 李冬, 雷雄, 等. 花椒多酚提取工艺响应面优化及动力学分析 [J]. *食品科学*, 2018, 39(2): 247-253.
- [16] 孟然, 张晓东, 杨雅华, 等. 基于多元统计分析的曹妃甸区 24 份盐地碱蓬成分指标综合评价 [J]. *食品工业科技*, 2021, 42(15): 78-84.
- [17] 卢冉, 王炳智, 田英姿. 不同品种杏仁氨基酸组成分析及综合评价 [J]. *食品科学*, 2021, 42(24): 229-235.
- [18] 林丽, 李欢欢, 谢辉, 等. 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 [J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1751-1758.
- [19] 惠西珂, 李超, 谷巍, 等. 蒲公英质量标准提升及不同产地药用蒲公英质量评价 [J]. *中国药房*, 2021, 32(7): 818-824.
- [20] 刘爱朋, 郭利霄, 薛紫鲸, 等. 基于指纹图谱和多组分含量测定的蒲公英药材质量控制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(18): 3715-3721.
- [21] Xie P J, Huang L X, Zhang C H, et al. Skin-care effects of dandelion leaf extract and stem extract: Antioxidant properties, tyrosinase inhibitory and molecular docking simulations [J]. *Ind Crops Prod*, 2018, 111: 238-246.

[责任编辑 时圣明]