

# 基于 HPLC 指纹图谱及化学模式识别对比研究曲花紫堇及同属药材

李惠敏<sup>1</sup>, 李凤超<sup>1</sup>, 高必兴<sup>3</sup>, 郭佳晨<sup>1</sup>, 张 艺<sup>2</sup>, 蒋桂华<sup>1,2\*</sup>, 尹显梅<sup>1,2\*</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学 民族医药学院, 四川 成都 611137

3. 四川省药品检验研究院/国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 四川 成都 611731

**摘要:** **目的** 建立曲花紫堇 *Corydalis curviflora* 的 HPLC 指纹图谱, 并通过所建立的指纹图谱方法对紫堇属其他 14 种药材进行对比研究。**方法** HPLC-DAD 指纹图谱条件: Agilent ZORBAX Extend C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 289 nm; 柱温 30 °C。结合聚类分析 (combine cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA) 区分与其极易混淆的暗绿紫堇。**结果** 首次建立了曲花紫堇 HPLC 指纹图谱, 相似度为 0.853~0.996, 标定 18 个共有峰, 通过对照品比对指认出新绿原酸、绿原酸、原阿片碱、紫堇灵、乙酰紫堇灵、芦丁、紫云英苷、烟花苷、槲皮素、山柰酚 10 个共有峰; 14 种同属药材与曲花紫堇对照指纹图谱相似度在 0.078~0.686。通过化学模式识别可区分曲花紫堇和暗绿紫堇, 二者有 6 个差异性标志物。**结论** 建立的指纹图谱方法合理、准确, 结合化学计量学方法, 能有效地鉴别曲花紫堇及同属药材, 寻找不同紫堇质量差异成分, 为紫堇属不同药材的质量控制和品质评价提供科学依据和参考。

**关键词:** 曲花紫堇; HPLC 指纹图谱; 暗绿紫堇; 紫堇属; 新绿原酸; 绿原酸; 原阿片碱; 紫堇灵; 乙酰紫堇灵; 芦丁; 紫云英苷; 烟花苷; 槲皮素; 山柰酚; 化学模式识别

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)05-1709-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.028

## Comparative study of *Corydalis curviflorae herba* and medicinal materials of *Corydalis* based on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition

LI Huimin<sup>1</sup>, LI Fengchao<sup>1</sup>, GAO Bixing<sup>3</sup>, GUO Jiachen<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>, JIANG Guihua<sup>1,2</sup>, YIN Xianmei<sup>1,2</sup>

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicines, National Medical Products Administration, Sichuan Institute of Pharmaceutical Inspection and Research, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To establish the HPLC fingerprint of *Corydalis curviflora* and analyze the other 14 medicinal materials of *Corydalis* by the established fingerprint method. **Methods** The HPLC analysis was performed on a Agilent ZORBAX ExtendC<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.2% phosphoric acid aqueous solution for gradient elution, the volume flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 289 nm, and the column temperature was 30 °C. The combine cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) were used to distinguish *C. melanochlora* which is easy to be confused with *C. curviflora*. **Results** The HPLC fingerprint of *C. curviflora* was established for the first time, the similarity was 0.853—0.996, and 18 common peaks were calibrated. Through comparison with the reference substance, 10 components were identified: neochlorogenic acid, chlorogenic acid, protopine, corynoline, acetyl corynoline, rutin, astragaloside, nicotiflorin, quercetin, kaempferol; The

收稿日期: 2023-09-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82173928); 国家重点研发计划课题项目 (2019YFC1712302); 国家重点研发计划课题项目 (2019YFC1712305); 四川省科技厅应用基础项目 (2020YJ0369)

作者简介: 李惠敏 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中藏药资源与品质研。Tel: 18408287964 E-mail: 875962758@qq.com

\*通信作者: 蒋桂华 (1970—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中藏药资源与品质研究。Tel: 18980923782 E-mail: 11469413@qq.com

尹显梅 (1991—), 女, 博士, 研究方向为中药资源与品质研究。Tel: 15724764573 E-mail: 626041103@qq.com

similarity of the fingerprints of 14 kinds of medicinal materials and *C. curviflora* was in the range of 0.078—0.686. The chemical pattern recognition can distinguish *C. curviflora* and *C. melanochlora*, with six differential markers between them. **Conclusion** The established fingerprint method is reasonable and accurate, and can effectively identify *C. curviflora* and the same genus of medicinal materials combined with chemometric methods to find the differential components of different *Corydalis* medicinal materials, which provide scientific basis and reference for the quality control and quality evaluation of different *Corydalis* medicinal materials.

**Key words:** *Corydalis curviflora* Maxim. ex Hemsl.; HPLC fingerprint; *Corydalis melanochlora* Maxim.; *Corydalis*; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; protopine; corynoline; acetyl corynoline; rutin; astragaline; nicotiflorin; quercetin; kaempferol; chemical pattern recognition

罂粟科紫堇属藏药始载于《月王药诊》，后续《宇妥本草》《晶珠本草》等藏医药经典著作对其均有记载，多以全草入药，性甘味寒，在藏医中多用于清热解毒、止血镇痛、活血散瘀、祛风利气，主治热性病、肝热、脉热、血热、肝炎、流感、疫病、高血压、瘫痪、跌打损伤、痈疔等<sup>[1]</sup>，在瘟疫时疫中使用也较多，是藏医临床常用特色药材，在南北各地均有分布，但以西南地区最集中，大部分药用植物主要分布在青海、四川、西藏、甘肃及云南等西南高山，生长在海拔 2 500~5 000 m 的灌丛、高山草地、流石滩等环境。紫堇属植物含有丰富的化学成分，包含生物碱<sup>[2-4]</sup>、黄酮<sup>[5]</sup>、挥发油<sup>[6]</sup>，甾体<sup>[7]</sup>、苯丙酰胺类<sup>[8]</sup>、萜类<sup>[9]</sup>等活性成分，具有抗菌、抗炎、镇痛、抗心律失常、保肝、杀虫、抗疟、抗肿瘤等作用，对心血管系统、中枢神经系统、平滑肌等具有药理作用<sup>[10]</sup>。

因资源分布、用药习惯差异等因素，紫堇属藏药的多基原、地域性现象十分突出，这类藏药基原复杂，在历代藏本草和标准中记载情况不尽相同，各地实际使用药材基原大不相同，其来源涉及紫堇属多种植物<sup>[10]</sup>。如藏药“丝哇”在流通使用过程中，常出现地区习用品、替代品或混淆品，均作为清热止痛药入方剂或者单独使用，性状相似，难以明辨真伪。如收载于《四川省藏药材标准》（2020 版）的“玉珠丝哇”，是紫堇属植物曲花紫堇 *Corydalis curviflora* Maxim. 的干燥全草，功效为清热利胆，止血镇痛，止渴，用于“赤彩”病、胆囊炎、肝炎、瘟疫、隐热、“陈旧热”、烧伤等<sup>[11]</sup>。同属植物暗绿紫堇 *C. melanochlora* Maxim. 的干燥全草作为“德哇”也收载于该标准中，二者是传统藏医药治疗热症的药材来源之一。前期调研发现，市售及藏医临床使用的“丝哇”药材还来源于紫堇属多种植物，如斑花黄堇 *C. conspersa* Maxim.、粗糙黄堇 *C. scaberula* Maxim.、赛北紫堇 *C. impatiens* (Pall.) Fisch.、灰绿黄堇 *C. adunca* Maxim.、条裂黄堇 *C. linarioides* Maxim. 等，不同基原的紫堇属药材功效

主治和用法用量有一定差异，众多基原植物的“丝哇”药材同等入药，不利于市场监管，也对质量可控性及临床使用规范性造成一定困扰。因此对紫堇属混淆药材进行鉴别研究，可为该属药材质量控制提供参考。

中藏药的多组分复杂体系以及化学成分的多样性和复杂性是质量评价的重点与难点。指纹图谱可以整体表征被测样品主要化学成分的特征，能较为全面地反映中药及其制剂中所含化学成分的信息及不同样品间的相互关系，进而对药品质量进行整体描述和评价<sup>[12]</sup>，是目前公认的最适合中药及天然药物物质质量控制的手段之一<sup>[13]</sup>。化学模式识别方法能更全面和系统地对药材进行评价，主要包括主成分分析、聚类分析、判别分析等<sup>[14]</sup>。指纹图谱结合多元统计分析可以对复杂的化学数据信息进行整合，更加形象地反映不同样品间的差异。因此，本研究主要针对化学成分，首次建立曲花紫堇药材指纹图谱，再通过建立的指纹图谱方法与同属 14 种药材进行对比鉴别；并对其形态上极易混淆的暗绿紫堇进行化学模式识别研究，为优选曲花紫堇质量控制指标、完善紫堇属药材质量评价体系提供参考，为紫堇属药材鉴别提供新方法，为该属药材资源的合理开发、市场的规范发展及临床使用提供科学的依据。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪；BT125D 型十万分之一电子天平（德国 Sartorius 公司）；BP121S 型万分之一天平（德国 Sartorius 公司）；Milli-Q Direct 型超纯水系统（德国 Merck 公司）；KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；ZBRTD-211 型电子恒温水浴锅（常州智博仪器有限公司）。

### 1.2 试药

新绿原酸（批号 MUST-21030108）、绿原酸（批号 MUST-21030304）、原阿片碱（批号 MUST-19110711）、紫堇灵（批号 MUST-19052702）、乙酰

紫堇灵(批号 MUST-20052703)、芦丁(批号 MUST-21011510)、紫云英苷(批号 MUST-21022410)、烟花苷(批号 MUST-21040704)、槲皮素(批号 MUST-20101104)、山柰酚(批号 MUST-20082818)均购自成都曼思特生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98.0\%$ ;甲醇为色谱纯;水为超纯水;其他均为分析纯。

60批药材样品经成都中医药大学蒋桂华教授鉴定,分别为曲花紫堇 *C. curviflora* Maxim. ex Hemsl.、暗绿紫堇 *C. melanochlora* Maxim.、斑花黄堇 *C. conspersa* Maxim.、钩距黄堇 *C. hamata* Franch.、粗糙黄堇 *C. scaberula* Maxim.、密穗黄堇 *C. densispica* C. Y. Wu、条裂黄堇 *C. linarioides* Maxim.、紫堇 *C. edulis* Maxim.、叠裂黄堇 *C. dasyptera* Maxim.、白穗紫堇 *C. trachycarpa* var. *Leucostachya* C. Y. Wu et H. Chuang.、糙果紫堇 *C. trachycarpa* Maxim.、灰绿黄堇 *C. adunca* Maxim.、草黄堇 *C. straminea* Maxim. ex Hemsl.、赛北紫堇 *C. impatiens* (Pall.) Fisch.及小花黄堇 *C. racemosa* (Thunb.) Pers.的干燥全草。样品信息见表1。

## 2 方法与结果

### 2.1 指纹图谱的建立

**2.1.1 对照品溶液的制备** 取新绿原酸、绿原酸、原阿片碱、紫堇灵、乙酰紫堇灵、芦丁、紫云英苷、烟花苷、槲皮素及山柰酚对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成质量浓度分别为0.032、0.026、0.044、0.129、0.179、0.070、0.030、0.036、0.051、0.047 mg/mL的混合对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 称取曲花紫堇(过四号筛)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,称定质量,超声处理30 min,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.1.3 色谱条件** 色谱柱: Agilent ZORBAX Extend C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相为甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 5%~16% A; 5~25 min, 16%~20% A, 25~32 min, 20%~25% A; 32~45 min, 25% A; 45~60 min, 25%~35% A; 60~70 min, 35%~40% A; 70~80 min, 40%~60% A; 80~85 min, 60%~90% A; 体积流量1.0 mL/min; 检测波长298 nm; 柱温30  $^{\circ}$ C。

**2.1.4 精密度试验** 取“2.1.1”项下混合对照品溶液,按“2.1.3”项下的色谱条件连续进样6次,记录指纹图谱,以4号峰(绿原酸)为参照峰,计算

共有色谱峰的相对保留时间及相对峰面积度的RSD小于1.0%,结果表明仪器精密度良好。

**2.1.5 重复性试验** 取同一批曲花紫堇粉末(Q1)6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件进行测定,记录指纹图谱,以4号峰(绿原酸)的保留时间和色谱峰面积为参照,计算各共有色谱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及相对峰面积的RSD值均小于2.0%,结果表明重复性良好。

**2.1.6 稳定性试验** 取精密度试验项下同一供试品溶液Q1,按照“2.1.3”项下色谱条件,分别在0、2、4、6、8、12、24 h测定,记录指纹图谱,以4号峰(绿原酸)的保留时间和色谱峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有的相对保留时间及相对峰面积的RSD值均小于3.0%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

**2.1.7 曲花紫堇指纹图谱的建立** 取10批曲花紫堇粉末,分别精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取10  $\mu$ L,分别进样测定,记录85 min的HPLC色谱图,将检测波长为289 nm处的色谱图转换成AIA格式,导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723版本,以下简称“指纹图谱软件”),将Q1号样品的图谱设为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度设为0.5 min,进行多点校正和色谱峰全谱峰匹配,最终确定了18个共有峰,得到指纹图谱叠加图,并生成对照指纹图谱,见图1。

**2.1.8 特征峰的标定** 根据10批曲花紫堇的指纹图谱检测结果,共标定18个特征峰。结合前期高分辨质谱对曲花紫堇中化学成分的初步分析结果,再与对照品色谱峰的保留时间、紫外吸收光谱信息比对,共指认10个峰,2号峰为新绿原酸,4号峰为绿原酸,9号峰为原阿片碱,11号峰为紫堇灵,12号峰为乙酰紫堇灵,13号峰为芦丁,14号峰为紫云英苷,15号峰为烟花苷,17号峰为槲皮素,18号峰为山柰酚,对照指纹图谱及混合对照品溶液的HPLC图见图2。

### 2.2 相似度分析

**2.2.1 曲花紫堇相似度分析** 10批曲花紫堇药材与对照指纹图谱进行相似度比较分析,结果见表2,不同批次曲花紫堇药材与对照指纹图谱比较相似度均 $> 0.850$ ,相似度良好,表明不同批次药材的化学成分差异性较小,质量相对稳定。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	基原	采集地	采集时间
Q1	曲花紫萁	四川省甘孜藏族自治州康定市	2019-07-22
Q2		四川省甘孜藏族自治州白玉县	2019-07-25
Q3		青海省海南藏族自治州泽库县	2020-07-12
Q4		四川省甘孜藏族自治州康定市	2020-07-16
Q5		四川阿坝藏族羌族自治州汶川县	2021-06-10
Q6		四川阿坝藏族羌族自治州汶川县	2021-06-10
Q7		四川阿坝藏族羌族自治州汶川县	2021-06-11
Q8		四川阿坝藏族羌族自治州汶川县	2021-06-11
Q9		四川阿坝藏族羌族自治州汶川县	2021-06-11
Q10		四川省甘孜藏族自治州康定市	2021-07-12
A1	暗绿紫萁	青海省果洛藏族自治州玛多县	2019-07-16
A2		四川省甘孜藏族自治州康定市	2019-07-23
A3		青海省海南藏族自治州贵南县	2019-07-24
A4		青海省海南藏族自治州泽库县	2020-07-12
A5		青海省海南藏族自治州贵南县	2020-07-29
A6		青海省西宁市湟源县	2019-07-16
A7		甘肃省甘南藏族自治州夏河县	2021-07-18
A8	青海省海南藏族自治州贵南县	2021-08-23	
B1	斑花黄萁	青海省果洛藏族自治州玛多县	2020-08-10
B2		四川省甘孜藏族自治州康定市	2019-06-29
B3		西藏自治区那曲市巴青县	2020-07-24
B4		四川省阿坝藏族羌族自治州阿坝县	2020-07-27
B5		青海省玉树藏族自治州玉树市囊谦县	2020-08-03
G1	钩距黄萁	云南省迪庆藏族自治州德钦县	2020-08-14
G2		四川省甘孜藏族自治州稻城县	2020-08-17
G3		四川省甘孜藏族自治州乡城县	2020-08-15
G4		四川省甘孜藏族自治州稻城县	2020-08-16
G5		四川省甘孜藏族自治州康定市	2020-08-18
C1	粗糙黄萁	青海省海南藏族自治州贵南县	2020-07-11
C2		青海省海南藏族自治州贵南县	2020-07-11
C3		青海省果洛藏族自治州玛沁县	2020-07-29
C4		青海省果洛藏族自治州玛沁县	2020-07-29
C5		甘肃省甘南藏族自治州夏河县	2021-07-18
M1	密穗黄萁	四川省甘孜藏族自治州泸定县	2021-07-10
M2		四川省甘孜藏族自治州康定市	2021-07-10
M3		四川省甘孜藏族自治州康定市	2021-07-13
M4		西藏自治区阿里地区日土县	2021-07-15
T1	条裂黄萁	青海省海南藏族自治州贵德县	2019-07-16
T2		四川省甘孜藏族自治州白玉县	2019-07-25
T3		四川省甘孜藏族自治州道孚县	2019-07-26
T4		青海省西宁市药材市场	2020-07-15
Z1	紫萁	四川省成都市武侯区	2021-02-20
Z2		四川省成都市高新南区	2021-04-11
DL	叠裂黄萁	青海省海南藏族自治州泽库县	2020-07-12
BS1	白穗紫萁	青海省海南藏族自治州贵南县	2020-07-11
BS2		青海省海南藏族自治州贵南县	2020-07-12
CG1	糙果紫萁	云南省迪庆藏族自治州德钦县	2020-08-13
CG2		云南省迪庆藏族自治州德钦县	2020-08-14
CG3		云南省迪庆藏族自治州德钦县	2020-08-14
H1	灰绿黄萁	西藏自治区昌都市察雅县	2019-09-05
H2		青海省海南藏族自治州泽库县	2020-07-13
H3		四川省阿坝藏族羌族自治州茂县	2021-06-13
H4		四川省甘孜藏族自治州道孚县	2021-07-11
H5		四川省甘孜藏族自治州道孚县	2021-07-12
CH	草黄萁	青海省果洛藏族自治州玛沁县	2020-07-30
S1	赛北紫萁	西藏自治区昌都市药材市场	2020-06-15
S2		青海省果洛藏族自治州玛沁县	2020-07-29
S3		四川省阿坝藏族自治州阿坝县	2020-07-29
X1	小花黄萁	西藏自治区山南市桑日县	2020-08-15
X2		四川省阿坝藏族羌族自治州色达县	2020-09-04

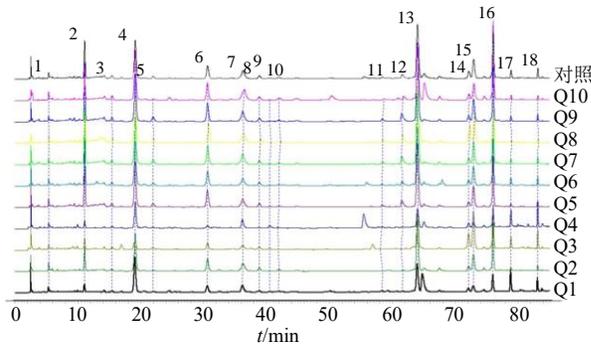
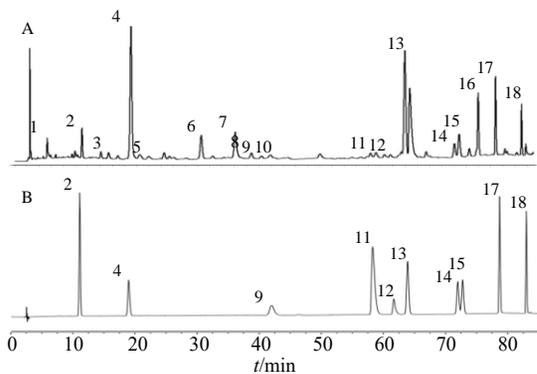


图1 曲花紫堇样品和对照 HPLC 指纹图谱  
Fig. 1 HPLC fingerprint of *C. curviflora*



2-新绿原酸, 4-绿原酸, 9-原阿片碱, 11-紫堇灵, 12-乙酰紫堇灵, 13-芦丁, 14-紫云英苷, 15-烟花苷, 17-槲皮素, 18-山柰酚。  
2-neochlorogenic acid, 4-chlorogenic acid, 9-protopine, 11-corynoline, 12-acetyl corynoline, 13-rutin, 14-astragaloside, 15-nicotiflorin, 17-quercetin, 18-kaempferol.

图2 曲花紫堇对照指纹图谱 (A) 和混合对照品 HPLC 图 (B)

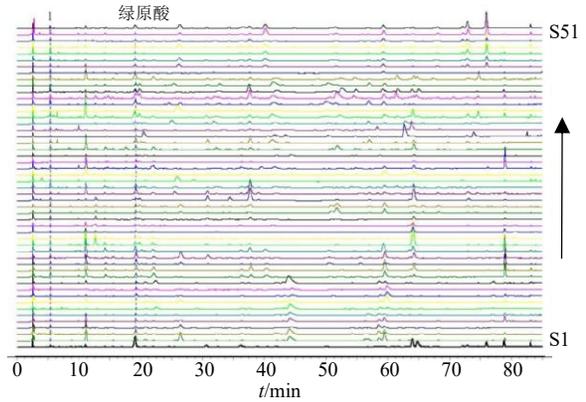
Fig. 2 HPLC reference fingerprint of *C. curviflora* (A) and HPLC chromatogram of mixed reference substances (B)

表2 曲花紫堇指纹图谱相似度

Table 2 Comparison of reference fingerprint of *C. curviflora*

编号	相似度	编号	相似度
Q1	0.915	Q6	0.996
Q2	0.992	Q7	0.991
Q3	0.853	Q8	0.986
Q4	0.884	Q9	0.992
Q5	0.995	Q10	0.974

2.2.2 曲花紫堇及同属其他药材指纹图谱相似度分析 取表1中除曲花紫堇其他14种紫堇属药材样品50批,按“2.1.2”项下方法处理后进样,与曲花紫堇对照指纹图谱进行相似度比较分析,结果见图3、表3,曲花紫堇与其他14种紫堇属药材有2个共有峰,相似度在0.078~0.686;取15种紫堇样品共60批,进行指纹图谱相似度交叉比较,结果显示



S1-Q(R), S2~S6-B1~B5, S7~S11-G1~G5, S12~S16-C1~C5, S17~S20-M1~M4, S21~S24-T1~T4, S25~S26-Z1~Z2, S27-DL, S28~S29-BS1~BS2, S30~S32-CG1~CG3, S33~S37-H1~H5, S38-CH, S39~S41-S1~S3, S42~S43-X1~X2, S44~S51-A1~A8.

图3 曲花紫堇对照指纹图谱和14种紫堇的色谱图比较  
Fig. 3 Comparison of similarity between control fingerprint of *C. curviflora* and fourteen species

表3 曲花紫堇对照指纹图谱和14种紫堇相似度比较  
Table 3 Comparison of similarity of fingerprints of *C. curviflora* and fourteen species

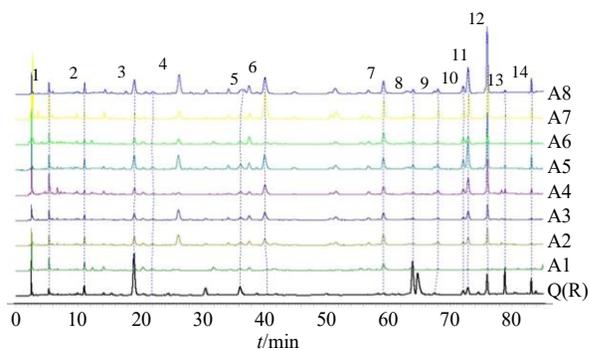
编号	相似度	编号	相似度
B1~B5	0.184~0.304	S1~S3	0.195~0.397
G1~G5	0.083~0.247	X1~X2	0.183~0.553
C1~C5	0.408~0.584	A1	0.343
M1~M4	0.613~0.686	A2	0.456
T1~T4	0.257~0.636	A3	0.429
Z1~Z2	0.381~0.446	A4	0.431
DL	0.083	A5	0.481
BS1~BS2	0.422~0.453	A6	0.402
CG1~CG3	0.470~0.628	A7	0.335
H1~H5	0.078~0.550	A8	0.472
CH	0.401		

相似度在0.021~0.849,说明各种之间化学成分差异较大。以上表明该指纹图谱方法可以反映不同基原紫堇化学成分的差异,对紫堇属15种药材进行初步鉴别。

因暗绿紫堇与曲花紫堇原植物形态及药材性状上极其相似,仅凭外观评价往往难以鉴别、极易混淆,故选取暗绿紫堇进行进一步指纹图谱相似度比较分析和化学模式识别研究,结果见图4、表3,曲花紫堇对照指纹图谱与8批暗绿紫堇有14个共有峰,相似度在0.335~0.481。

### 2.3 化学模式识别

因暗绿紫堇与曲花紫堇原植物形态及药材性状



2-新绿原酸, 3-绿原酸, 8-芦丁, 10-紫云英苷, 11-烟花苷, 13-槲皮素, 14-山柰酚。  
2-neochlorogenic acid, 3-chlorogenic acid, 8-rutin, 10-astragal, 11-nicotiflorin, 13-quercetin, 14-kaempferol.

图4 曲花紫堇对照指纹图谱和暗绿紫堇的色谱图比较  
Fig. 4 Comparison of similarity between control fingerprint of *C. curviflora* and *C. melanochlora*

极其相似, 且难以鉴别、极易混淆, 故选取暗绿紫堇进行进一步化学模式识别研究。

**2.3.1 聚类分析 (clustering analysis, CA)** 以 18 批样品 (表 1 中 10 批曲花紫堇和 8 批暗绿紫堇) 的 14 个指纹图谱共有峰峰面积为变量, 导入 SPSS 26.0 软件, 采用 Ward 聚类方法, 平方欧式距离作为度量标准, Z 得分进行数据标准化, 得到聚类分析树状图, 见图 5。当分类距离为 25 时, 可分为 2 类, 曲花紫堇聚为一类 (Q1~Q10), 暗绿紫堇聚为一类 (A1~A8)。

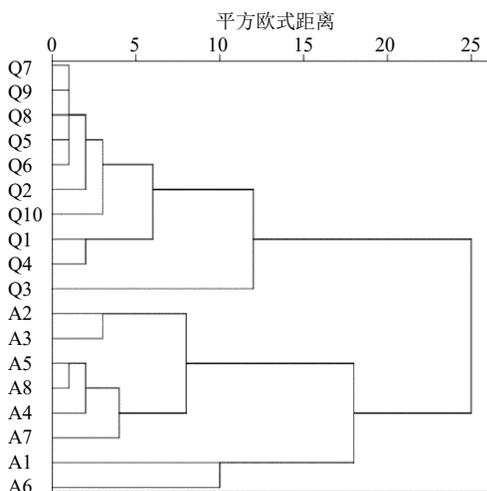


图5 曲花紫堇及暗绿紫堇聚类分析树状图  
Fig. 5 Cluster analysis dendrogram of *C. curviflora* and *C. melanochlora*

表4 特征根、各主成分的贡献率

Table 4 Contribution rate of characteristic roots and principal components

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比/%	累积贡献率/%	总计	方差百分比/%	累积贡献率/%
1	6.917	49.408	49.408	6.917	49.408	49.408
2	3.335	23.821	73.229	3.335	23.821	73.229
3	1.257	8.975	82.205	1.257	8.975	82.205
4	1.060	7.568	89.773	1.060	7.568	89.773

同时将 18 批样品指纹图谱的 14 个共有色谱峰的峰面积导入 SIMCA 14.1 软件, 采用非监督识别方法进行主成分分析, 观察样品的自然聚集, 建立 PCA 模型, 采用自标度化法 (UV) 进行缩放<sup>[16]</sup>, 提取 4 个主成分, 得到模型解释率参数  $R^2_X$  为 0.89, 预测能力参数  $Q^2$  为 0.429, 表明提取的主成分可解释 89.0% 的原始变量, 模型的预测能力为 49.2%。18 批样品的 PCA 得分图见图 6, 结果显示样品可分为 2 类, 一类为曲花紫堇, 另一类为暗绿紫堇, 与相似度评价和聚类分析结果相一致, 说明 2 种紫堇

**2.3.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA)** 主成分分析是在尽可能保持原有数据信息的前提下, 通过降维处理达到简化指标的计量学方法<sup>[15]</sup>。将 18 批样品的 14 个共有峰峰面积导入 SPSS 26.0 软件, 进行主成分分析, 结果见表 4。由表 4 可知, 提取特征值大于 1 的 4 个成分, 其方差的累积贡献率为 89.77%, 表明这 4 个成分能够代表 14 个指标在这批样品中大部分的信息, 该结果与 PCA 分析结果相同。

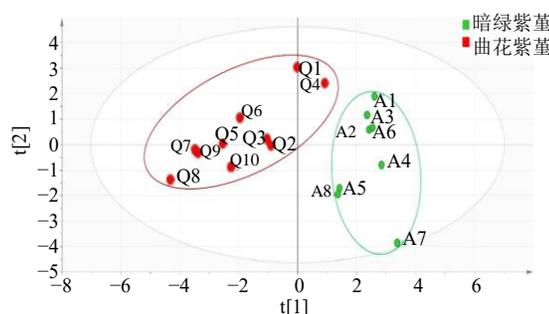


图6 18批紫堇样品 PCA 得分图  
Fig. 6 PCA score chart of 18 batches of *Corydalis*

的化学成分有一定差异。

**2.3.3 正交偏最小二乘法-判别式分析 (partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)** OPLS-DA 是一种有监督的判别分析统计方法。将 18 批紫堇的 14 个共有峰峰面积导入 SIMCA14.1 软件, 建立有监督模式识别法 OPLS-DA 模型进行分析, 获得相应模型。其中  $R^2X$  和  $R^2Y$  分别为 0.863 和 0.964, 模型预测能力参数  $Q^2$  为 0.823, 表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率分别为 86.3% 和 96.4%, 模型预测能力为 82.3%, 说明该模型稳定、可靠。从 OPLS-DA 得分矩阵图 (图 7) 可看出, 2 组样品聚类良好, 分离显著, 与 PCA 结果相比, 2 组样品进一步聚集。运用统计推断分析进一步验证鉴别模型, 图 8 为 OPLS-DA 模型置换验证图, 图中  $Q^2$  为累积交叉有效性,  $Q^2$  值越大表示模型预测能力越好;  $R^2$  为累积方差值, 表示原始数据被用于建立新的 OPLS-DA 判别模型的解释率,  $R^2$  值越大模型解释能力越强<sup>[15]</sup>。置换检验参数  $R^2$  和  $Q^2$  的截距值分别为 0.412 和 -1.18, 位于右边的 OPLS-DA 模型原始  $R^2$  和  $Q^2$  值均大于其左边随机排列后的  $R^2$  和  $Q^2$ , 说明建立的 OPLS-DA 模型没有出现过拟合现象, 具有较好的预测能力。

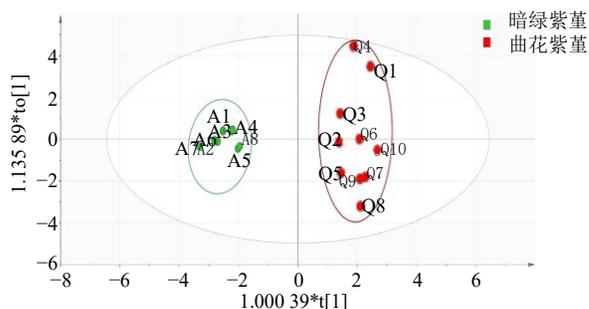


图 7 18 批紫堇样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 7 OPLS-DA score plots of 18 batches of *Corydalis*

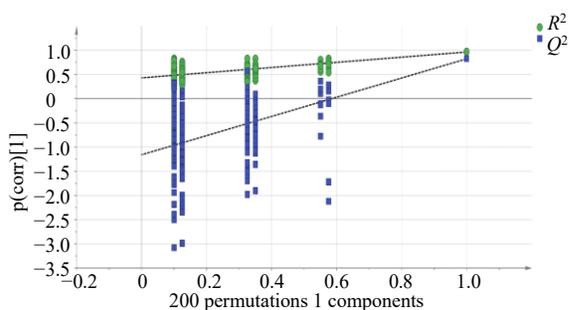


图 8 18 批紫堇样品 OPLS-DA 模型的置换验证

Fig. 8 OPLS-DA permutation test of 18 batches of *Corydalis*

变量重要性投影值 (variable importance in projection scores, VIP) 是筛选差异性化合物的重要指标, VIP 值越高, 对组间差异的影响越大<sup>[15]</sup>。结合 VIP 法, 以变量 VIP 值 > 1.0 为显著影响, 共找到两种基原药材的 6 个差异性标志物, 结果见图 9, 分别为峰 7、峰 3 (绿原酸)、峰 8 (芦丁)、峰 5、峰 2 (新绿原酸) 以及峰 1, 根据 VIP 值大小进行排序, 为峰 7 > 绿原酸 > 芦丁 > 峰 5 > 新绿原酸 > 峰 1, 这些峰是引起曲花紫堇和暗绿紫堇之间差异的主要变量, 其余峰 VIP 值小于 1, 对区分样品影响较小。

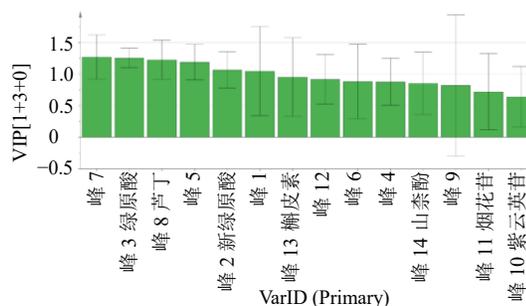


图 9 18 批紫堇样品 14 个共有峰的 VIP 值

Fig. 9 VIP values of 14 common peaks of 18 batches of *Corydalis*

### 3 讨论

本研究建立了曲花紫堇 HPLC 指纹图谱方法, 并对紫堇属药材进行对比研究, 同时结合化学计量学方法实现对暗绿紫堇的准确区分及反映差异标志物, 能够有效地鉴别曲花紫堇及同属药材, 为紫堇属药材质量评价提供方法及科学依据。

#### 3.1 供试品溶液制备方法考察和色谱条件优化

本实验考察冷浸、超声、回流 3 种提取方法, 结果表明超声提取效率最高。同时对提取溶剂 (甲醇、70% 甲醇、甲醇、盐酸-70% 甲醇 (1:100)、乙醇), 提取时间 (15、30、60 min) 进行考察, 发现以 70% 甲醇为提取溶剂, 超声处理 30 min 提取效果佳; 考察了不同色谱柱, 确定以 Agilent ZORBAX Extend C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 所得到的色谱图峰形最好, 峰数多。检测波长经 DAD 全波长图谱对比, 同时考虑基线, 发现 289 nm 下色谱峰信息全面, 基线平稳, 因此选择检测波长为 289 nm。对流动相 (甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸水、甲醇-0.2% 磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水), 体积流量 (0.8、1.0、1.2 mL/min)、柱温 (25、30、35 °C) 进行考察, 以流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C 为佳。

### 3.2 曲花紫堇及同属药材指纹图谱分析

质量控制研究一直是中药研究发展的关键<sup>[17]</sup>。指纹图谱能比较全面地反映出中药所含的化学成分种类和数量,体现药材的整体质量和临床的整体疗效<sup>[13]</sup>。目前对于紫堇属藏药的鉴别研究较少,多种混用品的区分不够全面,同等入药使用影响该属藏药的临床规范使用。以《四川省藏药材标准》2020版收载的曲花紫堇药材为主建立指纹图谱,可为紫堇属药材的基原鉴定和质量控制提供参考和依据。因此本研究首次建立了曲花紫堇药材 HPLC 对照指纹图谱,标定 18 个共有峰,识别了其中 10 种成分,能全面反映药材的内在质量;曲花紫堇对照指纹图谱与紫堇属其他药材相似度在 0.078~0.686,说明该指纹图谱方法可以显示出不同紫堇的化学成分差异,可以有效区分曲花紫堇和同属其他混淆药材;对紫堇属 15 种药材的指纹图谱进行相似度交叉比较,相似度在 0.021~0.849,表明上述药材化学成分存在较大差异,是否可以同等入药使用,有待后续药效进一步研究。所建立的指纹图谱方法适用于区别紫堇属大部分药材,可为紫堇属药材提供有效可行的指纹图谱鉴别方法。

### 3.3 曲花紫堇及暗绿紫堇的模式识别分析

曲花紫堇和暗绿紫堇药材及易混淆,鉴别研究较少,缺乏指纹图谱和化学计量学层面的区分鉴别,且尚未提出差异标志物。因此本实验基于 HPLC 指纹图谱和化学模式识别对两者进行区分研究,实验数据表明,曲花紫堇与暗绿紫堇的指纹图谱中具有 14 个共有峰,含有的化学成分种类大体基本一致。但相似度计算结果却有明显差异,说明 2 种药材在化学成分上还是存在一定的差异。为进一步区分 2 种基原,寻找差异性成分,使用化学模式识别研究,对曲花紫堇和暗绿紫堇的指纹图谱进行聚类分析和主成分分析,结果发现 2 种紫堇化学成分存在差异,模式识别分析可很好的区分 2 个种。并利用所建立的 OPLS-DA 模型分析,找到了 6 个差异性成分,其中绿原酸、芦丁、新绿原酸 3 个成分经对照品比对确认,说明药材中含有的黄酮类和酚酸类成分具有差异,能够作为区分 2 种药材的依据,为后期质量标志物的确定提供研究思路。实验结果证明该方法准确可靠,专属性强,为 2 种药材的区分和质量控制提供分析方法和参考依据。

目前只收集到 8 批暗绿紫堇,该种的指纹图谱样本量不足。6 个差异性标志物,目前只指出绿原

酸、芦丁、新绿原酸,另外 3 个差异性标志物所代表的化学成分及其药理活性有待后续进一步研究。

本研究采用 HPLC 指纹图谱结合相似度评价以及化学计量学识别方法对紫堇属不同药材综合分析,可对曲花紫堇及紫堇属其他易混淆药材进行有效区分,为紫堇属不同药材的质量控制和品质评价提供依据和参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 罗达尚,冯赤华,夏光成. 青藏高原藏药资源—紫堇属植物初探 [J]. 中草药, 1984, 15(6): 33-36.
- [2] Muhammad N, Shrestha R L, Adhikari A, et al. First evidence of the analgesic activity of govaniadine, an alkaloid isolated from *Corydalis govaniiana* Wall [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(5): 430-437.
- [3] Tian M, Yang C J, Yang J, et al. Ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analyses of constituents of *Corydalis bungeana* Turcz extract [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3463.
- [4] 张晓峰,张宏,李小云,等. 高速逆流色谱-UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分离制备延胡索中脱氢紫堇碱和海罂粟碱 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4351-4356.
- [5] 吕芳,徐筱杰. 粗糙黄堇化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 990-991.
- [6] 姚默. 五种罂粟科药用植物挥发油的提取、鉴定及体外抗氧化、抗菌活性研究 [D]. 西安: 西北大学, 2014.
- [7] 高燕萍,吴强,梁健,等. 藏族药矮紫堇化学成分分离鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(18): 60-63.
- [8] 彭治添,晁凌会,霍会霞,等. 紫堇中的苯丙酰胺类成分 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(1): 109-113.
- [9] Gao Y P, Liang J, Zhong G Y, et al. Triterpenoids from *Coluria longifolia* [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(3): 294-298.
- [10] 晁凌会,彭治添,任易,等. 紫堇的化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1508-1512.
- [11] 四川省藏药材标准 [S]. 2020: 103-226.
- [12] 梁军,刘彩凤,刘冬涵,等. 藏药白脉软膏多成分定量、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 356-363.
- [13] 姚令文,刘燕,郑笑为,等. 指纹图谱、特征图谱技术在中药材和中成药中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(8): 934-939.
- [14] 于洋,李军,李宝国. 化学计量学在中药质量控制研究中的应用 [J]. 中成药, 2018, 40(5): 1139-1142.
- [15] 彭琴,邹福贤,许少华,等. 基于化学计量学的指纹图谱法鉴别金线莲及其混伪品 [J]. 药学研究, 2021, 40(3): 149-159.
- [16] 郑振兴,胡瀚文,曾利,等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 174-180.
- [17] 余一鸣,胡永慧,韩立云,等. 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.

[责任编辑 时圣明]