

基于指纹图谱、化学计量学及熵权 TOPSIS-GRA 融合模型法评价不同产地大青叶的质量

刘仟禧¹, 刘梦云^{1,2,3}, 曹素芹¹, 李红伟^{1,2,3}, 郭志俊⁴, 李 凯^{1,2,3*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046

3. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450046

4. 华润三九现代中药制药有限公司, 广东 深圳 518110

摘要: **目的** 建立不同产地批次大青叶 *Isatidis Folium* 的 HPLC 指纹图谱及指标成分含量测定方法, 结合化学模式识别法评价不同产地大青叶质量。 **方法** 建立大青叶 HPLC 指纹图谱, 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本)、IBM SPSS Statistics 27.0、SIMCA14.1 软件, 结合聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 对不同产地大青叶质量进行评价, 根据变量重要性投影 (variable importance for projection, VIP) 值, 对差异性成分异牡荆素、靛玉红进行定量分析, 基于含量测定结果建立熵权逼近理想排序法 (technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS)-灰色关联度 (grey relation analysis, GRA) 融合模型进一步分析评价。 **结果** 建立的大青叶 HPLC 指纹图谱中, 识别共有峰 19 个, 指认峰 6 个, 分别为峰 4 (丁香酸)、峰 9 (阿魏酸)、峰 12 (异牡荆素)、峰 16 (色胺酮)、峰 18 (靛蓝)、峰 19 (靛玉红)。指纹图谱相似度在 0.871~0.989; HCA 将 15 批大青叶分为 2 类; PCA 共提取 4 个成分, 累积方差贡献率为 91.745%; OPLS-DA 筛选出异牡荆素、靛玉红等 6 个差异性成分。大青叶中异牡荆素、靛玉红的质量分数在 0.781~4.385 mg/g、0.134~0.921 mg/g, 熵权 TOPSIS-GRA 融合模型结果显示 15 批不同产地大青叶样品含量存在差异, 编号为 S1、S2、S3 的样品质量较优。 **结论** 建立的 HPLC 指纹图谱和含量测定结果可为大青叶的质量控制和整体性评价提供参考。

关键词: 大青叶; 指纹图谱; 丁香酸; 阿魏酸; 异牡荆素; 化学模式识别; 质量评价; 熵权 TOPSIS-GRA 融合模型

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)06-2148-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.06.026

Evaluation of quality of *Isatidis Folium* from different producing areas based on fingerprint, chemometrics and entropy weight TOPSIS-GRA fusion model

LIU Qianxi¹, LIU Mengyun^{1,2,3}, CAO Suqin¹, LI Hongwei^{1,2,3}, GUO Zhijun⁴, LI Kai^{1,2,3}

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Henan Province, Zhengzhou 450046, China

3. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine; Zhengzhou 450046, China

4. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518110, China

Abstract: Objective The HPLC fingerprint and the index component content determination method were established to evaluate the quality of Daqingye (*Isatidis Folium*) from different producing areas with chemical pattern recognition methods. **Methods** Establish HPLC fingerprint of *Isatidis Folium*, apply the TCM chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2012.130723 version), IBM SPSS Statistics 27.0 and SIMCA14.1 software. Combining hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discrimination analysis (OPLS-DA) to evaluate the quality of *Isatidis Folium* from different

收稿日期: 2024-09-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82474099); 大青叶咀嚼饮片研究横向课题 (14207848)

作者简介: 刘仟禧 (2000—), 女, 河南焦作人, 硕士研究生, 主要从事中药炮制工艺及质量标准研究。E-mail: liuqianxi27@163.com

*通信作者: 李 凯 (1982—), 男, 河南许昌人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药炮制研究工作。

Tel: (0371) 65962746 E-mail: cpulikai@163.com

producing areas. Quantitative analysis of the differential components, isovitexin and indirubin, was conducted based on the variable importance for projection (VIP) values. Based on the content measurement results, the technique for order preference by similarity to ideal solution (TOPSIS)-grey relation analysis (GRA) fusion model was established to further analyze and evaluate. **Results** In the established HPLC fingerprint of *Isatidis Folium*, 19 common peaks were identified, with six peaks assigned, which are peak 4 (syringic acid), peak 9 (ferulic acid), peak 12 (isovitexin), peak 16 (tryptanthrin), peak 18 (indigo), and peak 19 (indirubin). The similarity of the fingerprint spectra ranged from 0.871 to 0.989; HCA classifies 15 batches of *Isatidis Folium* into two categories; PCA extracts four components with a cumulative variance contribution rate of 91.745%; OPLS-DA identifies six differential components including isovitexin and indirubin. The average mass fraction of isovitexin and indirubin in *Isatidis Folium* were 0.781—4.385 mg/g and 0.134—0.921 mg/g, respectively. The entropy weight TOPSIS-GRA fusion model shows that there are differences in the content of 15 batches of *Isatidis Folium* samples from different origins, with samples numbered S1, S2, and S3 having superior quality. **Conclusion** The established HPLC fingerprint and content determination results can provide a reference for the quality control and holistic evaluation of *Isatidis Folium*.

Key words: *Isatidis Folium*; fingerprints; syringic acid; ferulic acid; isovitexin; chemical pattern recognition; quality evaluation; entropy weight TOPSIS-GRA fusion model

大青叶为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶，味苦性寒，归心、胃经，具有清热解毒，凉血消斑的功能^[1]，临床治疗常用于流行性感冒等病毒性传染病及发烧、肺热引起的咳嗽和喉咙痛等症^[2]。现代研究表明大青叶中的有效活性成分为生物碱类（靛玉红、色胺酮、靛蓝）、有机酸类（丁香酸、阿魏酸）、黄酮类（异牡荆素）等，具有抗菌、抗内毒素、抗肿瘤、抗病毒、抗炎、增强免疫、抗氧化、保护精神疾病和心血管系统等药理作用^[3-7]。

大青叶基原植物菘蓝的生态适应性较强，基于引种驯化，现全国各地均有种植，然而由于不同地域气候、土壤成分存在差异^[8]，各地大青叶质量多有不均^[9]。除传统鉴别项外，《中国药典》2020 年版仅以靛玉红含量为测定指标，由于大青叶化学成分丰富，仅依靠单一成分靛玉红很难全面反映大青叶的质量^[10-11]。高效液相色谱（HPLC）特征指纹图谱以其独特的特征性和高度的整体性，与中药多成分协同作用的特征相吻合，已成为现代中药材质量控制的常用方法^[12]，徐建华等^[13]通过化学模式识别技术对多维信息进行分析，结合熵权逼近理想排序法（technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS）-灰色关联度（grey relation analysis, GRA）融合模型对含量测定结果进行运算，评价 18 批凤尾草的品质差异，该方法简单、易于挖掘数据规律，能够科学、精确地反映药材的整体质量^[14]。本实验对 15 批不同产地大青叶进行指纹图谱研究，并测定 2 种指标性成分（异牡荆素、靛玉红）的含量，结合化学模式识别分析不同产地大青叶的成分差异，评价不同产地大青叶的质量，筛选出质量较

好的大青叶产区，为完善大青叶的质量控制和整体性评价提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CTO-20A 型高效液相色谱仪（岛津仪器有限公司）；FA21043 型万分之一电子分析天平（上海越平科学仪器有限公司）；十万分之一电子分析天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；DLH-200 型多功能粉碎机（武义祺腾电器有限公司）；UPR-II-10TNZP 型优普系列超纯水机（四川优普超纯科技有限公司）；KQ-500DV 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 材料

1.2.1 试剂 甲醇（色谱纯，上海麦克林生化科技有限公司），甲酸[色谱级，赛默飞世尔科技(中国)有限公司]；对照品丁香酸（批号 D03HB203147）、阿魏酸（批号 G13S11L124423）、异牡荆素（批号 A29HB193210）、色胺酮（批号 M18HS179375）、靛蓝（批号 Z01M8H30322）、靛玉红（批号 J19A10T95563），质量分数均≥97%，均购于上海源叶生物科技有限公司；水为双蒸水，其他试剂为分析纯。

1.2.2 药材 15 批大青叶药材样品，编号分别为 S1~S15，见表 1，经河南中医药大学李凯教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *I. indigotica* Fort. 的干燥叶。将所得样品粉碎后过 5 号筛，干燥保存备用。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备 称取大青叶粉末（过 5 号筛）1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加

表 1 大青叶药材信息

Table 1 Information of *Isatidis Folium*

样品编号	产地信息	采集时间	样品编号	产地信息	采集时间
S1	甘肃张掖	2023-08	S9	安徽亳州	2023-08
S2	甘肃张掖	2023-08	S10	山东菏泽	2023-08
S3	甘肃张掖	2023-08	S11	山东菏泽	2023-08
S4	山西运城	2023-08	S12	山东菏泽	2023-08
S5	山西运城	2023-08	S13	河南商丘	2023-08
S6	山西运城	2023-08	S14	河南商丘	2023-08
S7	安徽亳州	2023-08	S15	河南商丘	2023-08
S8	安徽亳州	2023-08			

入 65% 甲醇 30 mL，密塞，称定质量，超声处理（功率 500 W，频率 40 kHz）30 min，取出，放冷，再称定质量，用 65% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 取对照品丁香酸、阿魏酸、异牡荆素、色胺酮、靛蓝、靛玉红适量，精密称定重量，分别置于 2 mL 量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，制备得到质量浓度依次为 0.510、0.640、1.825、0.560、0.250、0.500 mg/mL 的对照品溶液，分别取上述对照品溶液适量，用甲醇稀释成一定浓度的混合对照品溶液。

2.2 大青叶指纹图谱的建立及相似度评价

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Ecosil C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μ m），体积流量 0.4 mL/min，进样量 10 μ L，柱温 35 $^{\circ}$ C，检测波长为 289 nm，以甲醇（A）-0.1% 甲酸水溶液（B）为流动相，按照表 2 进行梯度洗脱。

表 2 梯度洗脱条件

Table 2 Gradient elution conditions

t _R /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~5	10	90
5~10	10~20	90~80
10~20	20~30	80~70
20~45	30~40	70~60
45~60	40~45	60~55
60~90	45~75	55~25
90~110	75~80	25~20

2.2.2 参照峰的选择 在图谱中，异牡荆素峰形较好、含量较高，且有较好的稳定性，故选择异牡荆素色谱峰（12 号峰）作为参照峰，进行计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。

2.2.3 精密度试验 取同一批供试品溶液（S1），按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图。

以异牡荆素（12 号峰）为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.23%，相对峰面积的 RSD 小于 2.85%，表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一批供试品溶液（S1），按“2.2.1”项下色谱条件，分别在 0、4、8、12、18、24 h 进样测定，记录色谱图。以异牡荆素为参照峰，计算得到各共有峰的相对保留时间的 RSD 小于 0.29%，相对峰面积的 RSD 小于 3.24%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批大青叶样品（S1）6 份，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件测定分析，记录色谱图。以异牡荆素为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1.47%，相对峰面积的 RSD 小于 2.99%，表明方法重复性良好。

2.2.6 HPLC 指纹图谱的建立和相似度评价 取 15 批大青叶粉末，按照“2.1.1”项下方法，分别制备 15 批供试品溶液（S1~S15），按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定，得到 15 批大青叶的色谱数据。将 HPLC 数据导入软件中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版本），选择样品（S1）作为参照图谱，对 15 批大青叶色谱图进行多点校正及 Mark 峰匹配，生成指纹图谱及对照图谱（图 1），并进行相似度评价。15 批大青叶色谱图中共指认共有峰 19 个，通过比较对照溶液与混合对照品溶液图谱（图 2），确认峰 4 为丁香酸、峰 9 为阿魏酸、峰 12 为异牡荆素、峰 16 为色胺酮、峰 18 为靛蓝、峰 19 为靛玉红。相似度结果（表 3）显示，S1~S15 的相似度结果在 0.871~0.989，S1~S9、S11~S13、S15 的相似度均 > 0.9，表明这 13 批大青叶质量具有较高的相似性，S10、S14 的相似度 < 0.9，表明这 2 批与其他批次大青叶质量存在差异，可能与不同产地种质基原类型、土壤条件、采收时间有关。

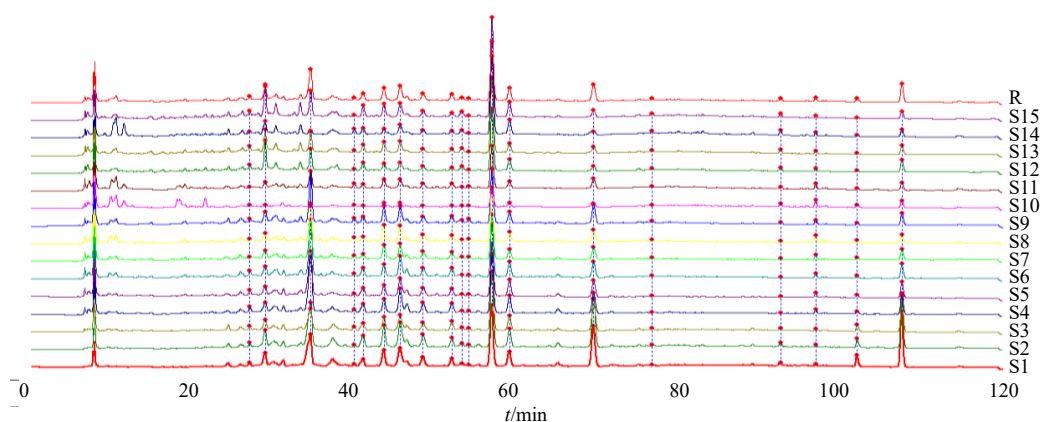
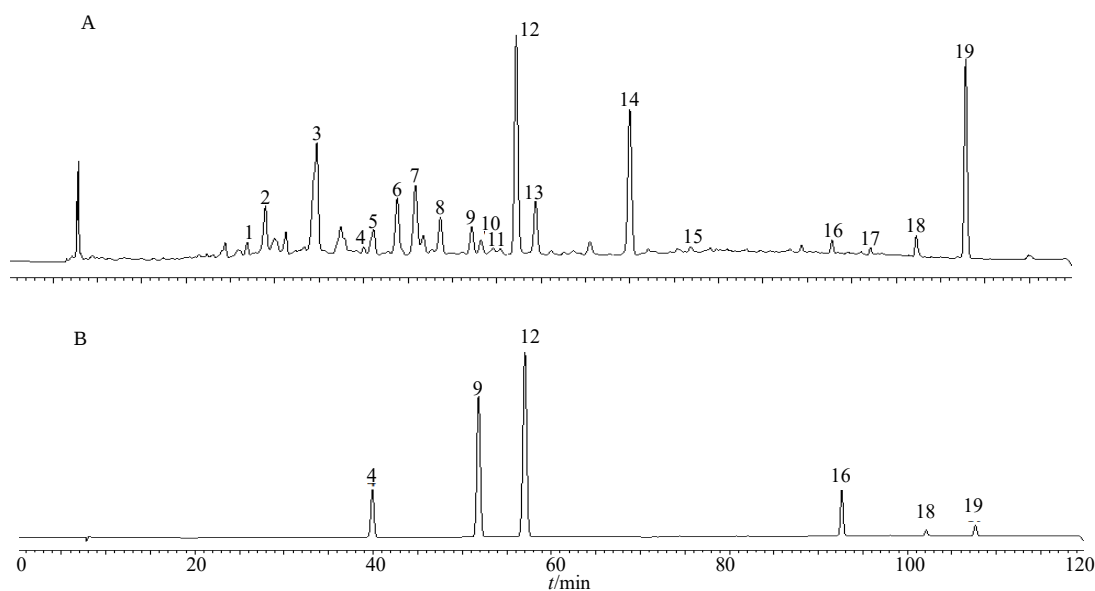


图 1 15 批次不同产地大青叶 HPLC 叠加指纹图谱和对照图谱 (R)

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprint and control chromatogram of 15 batches of *Isatidis Folium* from different origins (R)



4-丁香酸; 9-阿魏酸; 12-异牡荆素; 16-色胺酮; 18-靛蓝; 19-靛玉红。
4-syringic acid; 9-ferulic acid; 12-isovitexin; 16-tryptanthrin; 18-indigo; 19-indirubin.

图 2 大青叶 (A) 和混合对照品 (B) 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of *Isatidis Folium* (A) and mixed control substance (B)

表 3 15 批大青叶相似度评价结果

Table 3 Similarity evaluation results of 15 batches of *Isatidis Folium*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.943	S9	0.979
S2	0.966	S10	0.892
S3	0.971	S11	0.966
S4	0.955	S12	0.943
S5	0.973	S13	0.943
S6	0.954	S14	0.871
S7	0.981	S15	0.912
S8	0.989	—	—

2.3 化学模式识别

2.3.1 HCA 根据聚类特征的相似性对不同样本数据进行分类建模^[15], 将 15 批大青叶 HPLC 色谱图的共有峰面积导入 SPSS 27.0 软件, 采用组内联接法, 选用欧氏距离进行聚类, 结果见图 3。当欧式距离为 20 时, 15 批大青叶样品可以聚为 2 类, S7、S8、S10~S15 聚为第 I 类, S1~S6、S9 聚为第 II 类。第 I 类样品分别来自安徽 (S7、S8)、山东、河南, 第 II 类样品来自甘肃、山西、安徽 (S9)。结果显示, 山东、河南、安徽产地大青叶质量较为接近, 可能与三省均位于中国中部, 雨热同期, 水资源丰

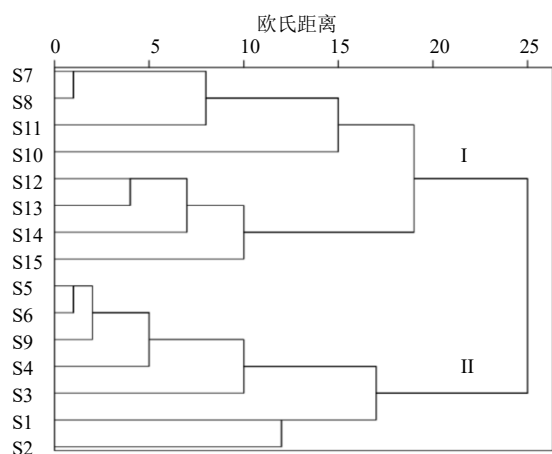


图 3 15 批大青叶样品系统聚类分析

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of 15 batches of *Isatidis Folium*

富有关；甘肃与山西产地大青叶质量较为接近，可能与二省均位于中国北部，昼夜温差大，且土壤多为黄土或黄土状物质有关。安徽境内 S9 与 S7、S8 大青叶质量差异较大，这可能与种植管理、采收时间、储存方式有关。

2.3.2 PCA 为了研究不同样本之间的差异性，将 15 批大青叶 19 个共有峰的峰面积导入 SPSS 27.0 软件，进行 PCA。Bartlett 球形度检验显示 $P < 0.05$ ，说明该数据适 PCA，以特征值 > 1 的标准进行提取，得 4 个主成分的累积方差贡献率为 91.745%，可以代表大青叶特征图谱 19 个共有色谱峰的大部分信息，结合碎石图（图 4）的突变点，提取 4 个成分进行质量评价，其特征值及贡献率见表 4。

因子载荷矩阵表明原始变量与对应因子的相关系数，即各主成分与 19 个共有峰的相关系数，从表

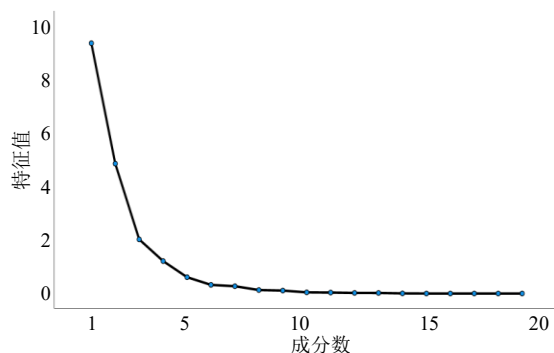


图 4 大青叶 PCA 碎石图

Fig. 4 PCA scree plot of *Isatidis Folium*

表 4 特征值及方差贡献率

Table 4 Eigenvalue and variance contribution rate

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.349	49.206	49.206
2	4.850	25.527	74.733
3	2.021	10.637	85.370
4	1.211	6.375	91.745

5 可见，主成分 1 主要反映色谱峰 1、3、5、6、7、8、9（阿魏酸）、13、14、18（靛蓝）、19（靛玉红）的信息，主成分 2 主要反映色谱峰 2、10、12（异牡荆素）、15、16（色胺酮）的信息，主成分 3 主要反映峰 17 的信息，主成分 4 主要反映色谱峰 4（丁香酸）、11 的信息。运用 SPSS 27.0 软件将 15 批大青叶共有峰面积进行标准化处理，结合主成分特征值和因子得分，计算 15 批样品的主成分得分，最终得到各样品的综合得分并进行排序，结果见表 6，从表中可以看出排名最高的 2 个名次为 S1~S2（甘肃），排名最低的 2 个名次为 S10~S11（山东），说明在这 15 批大青叶中，甘肃产地质量较好，山东产地质量较差。由于 4 个主成分的方差贡献率（表 4）不同，在做评价时，须以各主成分的贡献率为权重，根据方差贡献率和标准化数据，得出各主成分表达式： $F_1 = 0.235 X_1 + 0.192 X_2 + 0.258 X_3 + 0.056 X_4 + 0.308 X_5 + 0.274 X_6 + 0.308 X_7 + 0.293 X_8 + 0.268 X_9 + 0.185 X_{10} + 0.145 X_{11} + 0.183 X_{12} + 0.299 X_{13} + 0.275 X_{14} + 0.051 X_{15} - 0.000 7 X_{16} - 0.217 X_{17} + 0.215 X_{18} + 0.255 X_{19}$ ； $F_2 = 0.149 X_1 + 0.331 X_2 - 0.223 X_3 - 0.145 X_4 + 0.059 X_5 - 0.127 X_6 - 0.126 X_7 - 0.181 X_8 - 0.232 X_9 + 0.357 X_{10} - 0.244 X_{11} + 0.332 X_{12} - 0.034 X_{13} - 0.105 X_{14} + 0.396 X_{15} + 0.333 X_{16} - 0.306 X_{17} - 0.056 X_{18} - 0.039 X_{19}$ ； $F_3 = 0.322 X_1 + 0.147 X_2 + 0.166 X_3 + 0.284 X_4 + 0.161 X_5 - 0.004 X_6 + 0.028 X_7 - 0.008 X_8 + 0.091 X_9 - 0.015 X_{10} + 0.087 X_{11} + 0.159 X_{12} + 0.129 X_{13} - 0.331 X_{14} + 0.049 X_{15} - 0.353 X_{16} + 0.058 X_{17} - 0.513 X_{18} - 0.424 X_{19}$ ； $F_4 = -0.199 X_1 - 0.082 X_2 - 0.195 X_3 + 0.656 X_4 - 0.088 X_5 + 0.169 X_6 - 0.057 X_7 - 0.056 X_8 - 0.006 X_9 + 0.083 X_{10} + 0.499 X_{11} + 0.117 X_{12} - 0.107 X_{13} + 0.078 X_{14} + 0.238 X_{15} + 0.309 X_{16} + 0.054 X_{17} - 0.004 X_{18} - 0.023 X_{19}$ ；

式中， F_1 、 F_2 、 F_3 、 F_4 分别为主成分 1、2、3、4 的得分， $X_1 \sim X_{19}$ 分别为共有峰 1~19 标准化处理后的数据。由各主成分得分和对应的权重相乘求和，构建综合评价函数：

表 5 因子载荷矩阵

Table 5 Factor loading matrix

共有峰编号	载荷				共有峰编号	载荷			
	1	2	3	4		1	2	3	4
1	0.717	0.329	0.457	-0.219	11	0.444	-0.538	0.123	0.549
2	0.586	0.728	0.209	-0.091	12 (异牡荆素)	0.560	0.731	0.226	0.129
3	0.787	-0.491	0.236	-0.214	13	0.915	0.075	0.184	-0.118
4 (丁香酸)	0.171	-0.319	0.403	0.722	14	0.842	-0.230	-0.470	0.085
5	0.942	0.130	0.229	-0.097	15	0.157	0.873	0.069	0.262
6	0.839	-0.279	-0.006	0.187	16 (色胺酮)	-0.002	0.733	-0.501	0.340
7	0.942	-0.278	0.040	-0.062	17	-0.669	-0.673	0.082	0.060
8	0.897	-0.399	-0.012	-0.062	18 (靛蓝)	0.658	-0.122	-0.729	-0.005
9 (阿魏酸)	0.820	-0.510	0.130	-0.006	19 (靛玉红)	0.778	-0.086	-0.603	-0.026
10	0.564	0.787	-0.021	0.092					

表 6 15 批大青叶的主成分得分和排序

Table 6 Factor scores and sorting of principal components of 15 batches of *Isatidis Folium*

编号	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4	综合得分	排名
S1	3.441	0.031	-3.138	-0.334	1.346	2
S2	6.278	0.050	-1.446	0.301	2.967	1
S3	2.139	-0.157	-0.972	0.840	0.963	4
S4	2.587	-1.879	1.555	-0.858	0.904	5
S5	0.648	-1.390	0.962	-1.560	-0.033	11
S6	1.254	-1.967	1.706	-1.081	0.228	7
S7	-1.628	-1.726	0.062	-0.464	-1.265	13
S8	-1.588	-2.094	0.380	0.664	-1.233	12
S9	0.695	-1.799	1.337	2.426	0.180	8
S10	-6.396	-0.805	-2.348	-0.595	-3.640	15
S11	-3.868	-1.436	-0.502	0.373	-2.301	14
S12	-1.254	2.916	0.471	-0.915	0.119	9
S13	-0.930	3.448	0.690	-0.107	0.489	6
S14	-1.538	2.562	0.576	1.875	0.078	10
S15	0.161	4.246	0.667	-0.566	1.198	3

$F=0.492\ 06\ F_1+0.255\ 27\ F_2+0.106\ 37\ F_3+0.063\ 75\ F_4$; 综合评价函数中, F 代表不同批次大青叶品质综合得分。

2.3.3 OPLS-DA 为了更好地体现不同样本之间的差异, 选出对样本具有较大贡献率的成分^[16], 将 15 批大青叶的 19 个共有峰面积导入 SIMCA 14.1 软件中, 以峰面积为变量, 进行 OPLS-DA, 结果如图 5 所示, S1~S6、S9 均位于第 1、4 象限, S7、S8、S10~S15 均位于第 2、3 象限, 即除 S9 外, 安徽、山东、河南分为一类, 甘肃、山西分为一类, 这一结果与聚类分析结果基本一致。OPLS-DA 模型中累积解释能力参数 R^2_{Xcum} 为 0.976, R^2_{Ycum} 为 0.835,

预测能力参数 Q^2_{cum} 为 0.634>0.5, 表明所建模型稳定、可靠。为进一步评估模型的准确性和预测能力, 对模型采取 200 次置换实验, 结果如图 6 所示, $Q^2=-0.93<0$, 表明模型不存在拟合过的现象, 即置换检验过关, 模型准确、预测力强。根据此模型可得 VIP 值得分图 (图 7), 以结果显示中 VIP 值>1 的标准筛选差异性成分, 按照影响大小排序依次为峰 3、12 (异牡荆素)、19 (靛玉红)、14、6、7, 表明这 6 个成分在批次中差异较大。为进一步评价这 15 批大青叶的质量, 本研究针对差异性成分峰 12 (异牡荆素)、峰 19 (靛玉红), 对其异牡荆素与靛玉红的含量进行测定。

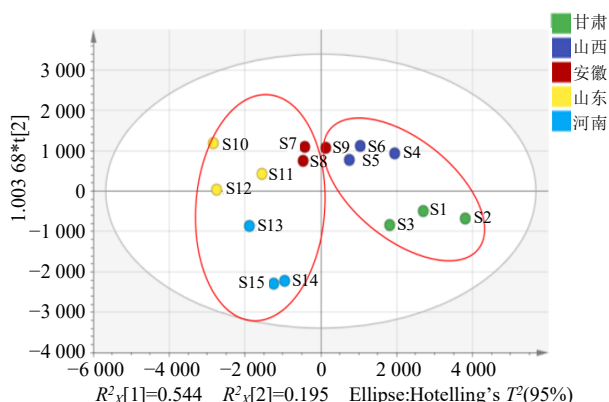


图 5 15 批大青叶 OPLS-DA 得分图

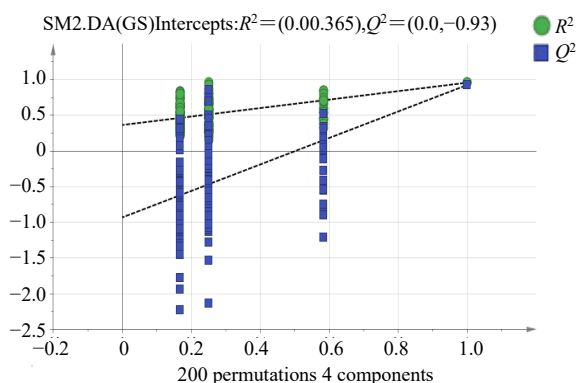
Fig. 5 OPLS-DA score chart of 15 batches of *Isatidis Folium*

图 6 15 批大青叶 OPLS-DA 置换检验

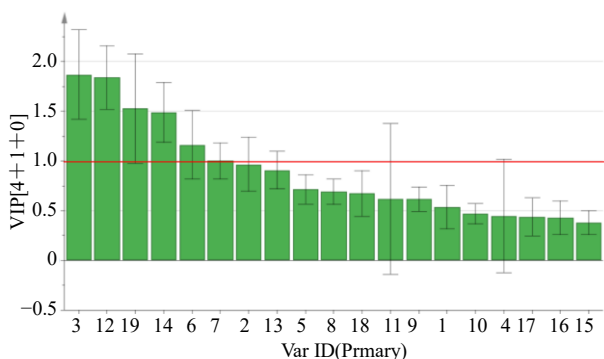
Fig. 6 OPLS-DA replacement inspection diagram of 15 batches of *Isatidis Folium*

图 7 15 批大青叶 VIP 得分图

Fig. 7 VIP score chart of 15 batches of *Isatidis Folium*

2.4 大青叶主要成分含量测定

2.4.1 对照品和供试品溶液的制备 同“2.1.1”“2.1.2”项。

2.4.2 色谱条件 同“2.2.1”项色谱条件。

2.4.3 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下异牡荆素、靛玉红对照品适量，加甲醇制备质量浓度为 182.500 $\mu\text{g/mL}$ 、靛玉红质量浓度为 62.500 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液，使用倍比稀释法制成系列浓度的混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，以峰面积为纵坐标 (Y)，对照品溶液质量浓度为横坐标 (X)，进行线性回归，异牡荆素 $Y=42\,040\,X+121\,621$ ，相关系数 (r) 为 0.999 1，线性范围 5.703~182.500 $\mu\text{g/mL}$ ；靛玉红 $Y=114\,308\,X-71\,238$ ， r 为 0.999 1，线性范围 1.953~62.500 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.4 精密度试验 取“2.1.2”项下混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积，计算得异牡荆素、靛玉红峰面积的 RSD 分别为 0.09%、0.43%。

2.4.5 稳定性试验 取同一批供试品溶液 (S_1)，按“2.2.1”项下色谱条件，分别在 0、4、8、12、18、24 h 进样测定，计算得异牡荆素、靛玉红峰面积的 RSD 分别为 1.34%、1.23%。

2.4.6 重复性试验 取同一批大青叶样品 6 份 (S_1)，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件测定分析，计算得异牡荆素、靛玉红峰面积的 RSD 分别为 0.97%、2.4%。

2.4.7 加样回收率试验 取 6 份已知成分含量的大青叶样品 (S_1) 0.5 g，精密称定，分别加入与样品中成分含量近似相等的对照品，按“2.1.1”项下制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算得到异牡荆素、靛玉红的平均加样回收率分别为 99.94%、99.69%，RSD 分别为 0.46%、0.71%。

2.4.8 样品含量测定 精密称取 15 批大青叶粉末，按照“2.1.1”项下制备供试品溶液，接着按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定分析，根据线性方程计算异牡荆素、靛玉红的含量，数据结果 (表 7) 显示异牡荆素质量分数在 0.781~4.385 mg/g，为河南产地质量分数较高；靛玉红质量分数在 0.134~0.921 mg/g，为甘肃产地质量分数较高。

2.4.9 基于熵权 TOPSIS-GRA 融合模型的大青叶质量评价 为使评价结果客观可靠，参考文献数据建模的流程^[14]，建立基于熵权 TOPSIS-GRA 融合模型评价大青叶的质量。首先以 15 批大青叶中异牡荆素与靛玉红的含量为原始数据，采用熵权法确定理想样本和负理想样本，接着计算各样本与正负理

想样本的欧式距离 (D^+ 、 D^-)、关联度 (S^+ 、 S^-)、 (γ) ，利用相对贴近度的大小对 15 批不同产地大青叶的质量进行排序，结果见表 8。

表 7 15 批大青叶中含量测定结果

Table 7 Results of content determination in 15 batches of *Isatidis Folium*

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)		编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)	
	异牡荆素	靛玉红		异牡荆素	靛玉红
S1	2.771	0.921	S9	2.402	0.222
S2	3.439	0.801	S10	0.781	0.142
S3	2.674	0.598	S11	1.799	0.140
S4	2.605	0.352	S12	2.697	0.213
S5	2.322	0.279	S13	3.291	0.163
S6	2.305	0.253	S14	3.424	0.134
S7	1.926	0.197	S15	4.385	0.143
S8	2.118	0.156			

表 8 15 批大青叶的品质排序

Table 8 Quality sequencing result of 15 batches of *Isatidis Folium*

编号	D^+	D^-	S^+	S^-	E^+	E^-	γ	排序
S1	0.091	1.000	1.000	0.435	1.000	0.263	0.792	1
S2	0.194	0.846	0.793	0.519	0.819	0.357	0.697	2
S3	0.417	0.593	0.703	0.491	0.648	0.454	0.588	3
S4	0.723	0.288	0.614	0.580	0.451	0.651	0.409	4
S5	0.814	0.206	0.623	0.605	0.414	0.709	0.369	6
S6	0.845	0.178	0.619	0.623	0.399	0.734	0.352	7
S7	0.915	0.138	0.653	0.649	0.396	0.782	0.336	8
S8	0.967	0.107	0.619	0.703	0.363	0.835	0.303	12
S9	0.885	0.143	0.601	0.654	0.372	0.770	0.326	9
S10	0.983	0.165	0.905	0.665	0.535	0.824	0.394	5
S11	0.987	0.119	0.660	0.706	0.389	0.846	0.315	10
S12	0.897	0.127	0.571	0.682	0.349	0.789	0.306	11
S13	0.963	0.062	0.515	0.785	0.289	0.874	0.248	13
S14	1.000	0.044	0.501	0.835	0.272	0.918	0.229	14
S15	0.995	0.011	0.454	1.000	0.232	0.998	0.189	15

D^+ 为正理想样本的欧氏距离； D^- 为负理想样本的欧氏距离； S^+ 为正理想样本的关联度； S^- 为负理想样本的关联度； E^+ 、 E^- 为无量纲化后的欧氏距离和灰色关联度； γ 为相对贴近度。

D^+ is the Euclidean distance of the positive ideal sample; D^- is the Euclidean distance of the negative ideal sample; S^+ is the correlation degree of positive ideal samples; S^- is the correlation degree of negative ideal samples; E^+ and E^- are dimensionless Euclidean distances and grey correlations. γ is relative proximity.

从化学成分质量角度来看，含量越高，质量较好。表 8 数据显示，15 批大青叶样品的相对贴近度为 0.189~0.792，说明不同产地大青叶质量差异显著，相对贴近度大于 0.5 的样品有 3 批，均为甘肃产地，相对贴近度小于 0.3 的样品有 3 批，均为河南产地，综合排序为甘肃>山西>安徽>山东>河南。从表 8 可以看出，甘肃与河南产地异牡荆素差异不大，但靛玉红含量差异明显，推测可能与甘肃气候干燥、光照充足，河南气候湿润、雨量适中条

件有关。

3 讨论

实验前期考察了不同提取溶剂（100%甲醇、95%甲醇、85%甲醇、75%甲醇、65%甲醇、65%乙醇），不同超声提取时间（10、30 min），结果发现使用 65%甲醇超声提取 30 min 时出峰数量较多且峰分离度较好。为了使指纹图谱信息丰富，提高峰值响应、稳定性及灵敏度^[17]，实验分别考察了不同流动相甲醇-0.1%磷酸水、甲醇-0.2%磷酸水、甲醇-

0.1%甲酸水、甲醇-0.2%甲酸水、乙腈-0.1%磷酸水,不同柱温 30、35 ℃,不同体积流量 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL/min,不同梯度,不同柱子对色谱图的影响,同时对供试品溶液与对照品溶液进行全波长扫描,结果显示,采用色谱柱 Ecosil C₁₈、流动相为甲醇-0.1%甲酸水、体积流量 0.4 mL/min、柱温 35 ℃、波长 289 nm 时,流动相基线平稳、峰形良好、峰响应值高,能够满足分析要求。

中药指纹图谱可全面反映化学成分信息,结合化学模式识别可对样品中共有峰的差异性进行分析。15 批大青叶样品指纹图谱的相似度为 0.871~0.989,说明不同产地大青叶的化学成分基本相似,为了进一步区分不同产地大青叶的差异,采用化学模式识别对 15 批大青叶样品的共有峰进行分析。HCA 结果显示,15 批大青叶样品聚为 2 类,除安徽 S9 外,安徽、山东、河南聚为一类,甘肃、山西聚为一类,说明大青叶存在地域性差异。PCA 结果显示甘肃大青叶样品总体质量较好,这一结果与王晨曦等^[18]研究大青叶品质与产地相关性中灰分、醇溶性浸出物、靛玉红含量结果数据基本一致,可能与甘肃处于中国北部,光照充足,昼夜温差大,更有益于有效成分的积累有关。

OPLS-DA 得分图结果显示,15 批大青叶样品可分为 2 大类,与 HCA 分类结果基本一致,经 VIP 值分析筛选共得到 6 个差异性成分,其影响显著性大小排序依次为峰 3、12(异牡荆素)、19(靛玉红)、14、6、7,目前峰 3、14、6、7 的化学成分尚未可知,实验后续将采用成分分离、结构鉴定等技术对以上 4 种成分进一步研究。含量测定结果表明异牡荆素、靛玉红的含量在不同产地间存在显著差异,异牡荆素含量为河南产地较高,靛玉红含量为甘肃含量较高。基于含量测定结果,构建熵权 TOPSIS-GRA 融合模型对样品进行相近贴度评价,评价结果显示,甘肃产地质量相对较好,与 PCA 结果基本一致。PCA 与熵权 TOPSIS-GRA 融合模型评价结果能显示出甘肃产地质量较好,对于山东、河南产地个别批次的不同结果,首先与数据处理有关,PCA 采用的数据为 15 批次大青叶的共有峰峰面积,熵权 TOPSIS-GRA 融合模型采用的数据为 15 批次大青叶异牡荆素与靛玉红的含量,其次可能与计算方法有关,PCA 是数据分析与挖掘,查找样本之间的共性与不同,主要目标为数据降维,对数据进行最大程度的保留处理,熵权 TOPSIS-GRA 融合模型

则客观科学地对指标进行权重赋值,为多属性决策分析,对样本间的相似度进行关联性分析^[19-20]。

综上所述,本研究建立了大青叶的 HPLC 指纹图谱,结合化学模式识别分析对不同产地大青叶质量进行评价,得到影响大青叶各批次间的显著性差异成分,其中,甘肃产地大青叶质量较优。目前也有其他学者对不同产地大青叶质量进行评价,但所选成分较为简单,本实验中对峰形较好、分离度较高的异牡荆素成分进行指认,经 VIP 值筛选,该成分对大青叶质量影响较大,可为大青叶质标性成分的进一步筛选及补充提供参考,同时基于此方法对大青叶中异牡荆素与靛玉红的含量进行测定,方法稳定、准确,操作简便,可进一步为大青叶的质量评价及控制提供参考依据。

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: 22-23.
- [2] Chen J, Zhu Z P, Gao T H, et al. *Isatidis Radix* and *isatidis folium*: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114648.
- [3] 李柯城. 大青叶化学成分研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2023.
- [4] Jiang L L, Lu Y L, Jin J H, et al. N-Butanol extract from *Folium isatidis* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production in macrophages and protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 5601-5609.
- [5] Lü H T, Liu J, Deng R, et al. Preparative isolation and purification of indigo and indirubin from *Folium isatidis* by high-speed counter-current chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(6): 637-641.
- [6] Yang Q Y, Zhang T, He Y N, et al. From natural dye to herbal medicine: A systematic review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of indigo naturalis [J]. *Chin Med*, 2020, 15(1): 127.
- [7] He M, Min J W, Kong W L, et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin [J]. *Fitoterapia*, 2016, 115: 74-85.
- [8] 杨春风, 孔庆耀, 孙铭君. 浅谈大青叶的研究进展 [J]. 山东畜牧兽医, 2019, 40(5): 78-80.
- [9] 董娟娥, 梁宗锁, 尉芹, 等. 不同区域松蓝根、叶(板蓝根、大青叶)有效成分含量差异 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(9): 1613-1618.

- [10] 李环环, 王英姿, 梁丽丽, 等. 不同产地大青叶饮片反相高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 81-85.
- [11] 黄敏, 张金莲, 谢亚婷, 等. 基于 HPLC 的茶芍指纹图谱和多成分含量测定方法研究 [J]. 中药材, 2023, 46(11): 2778-2781.
- [12] 魏爱红, 曾伟龙, 区泳茵, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别法评价不同产地蒲桃叶药材质量 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 3: 1-14.
- [13] 徐建华, 周虹, 李志明, 等. 基于一测多评结合化学模式识别法及加权 TOPSIS 与灰色关联度融合模型评价不同产地凤尾草的质量 [J]. 中草药, 2024, 55(19): 6738-6748.
- [14] 张红娟, 史银基, 罗玉琴, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多指标定量结合熵权 TOPSIS 法评价不同产地白屈菜药材质量 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4194-4203.
- [15] 刘国禄, 雷勇刚. 基于聚类分析法的太原地区冬季太阳能供暖的气象分类研究 [J]. 太原理工大学学报, 2024, 2: 1-12.
- [16] 黄雅, 王保锦, 王乐, 等. 基于指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别的莲房药材质量评价 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 3098-3106.
- [17] 刘振杰, 丘海芯, 甘金月, 等. 紫苏叶 HPLC 指纹图谱建立及其抗流感病毒活性谱效关系研究 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 287-296.
- [18] 王晨曦, 戴海霞, 拉拉古丽·吾依合尔别克, 等. 大青叶品质与产地气候的相关性 [J]. 人参研究, 2021, 34(4): 56-58.
- [19] 蔡淑珍, 王晓虹, 王志刚, 等. QAMS 多组分定量联合 PCA、OPLS-DA 及 GRA 分析法评价白花蛇舌草的质量 [J]. 中医药导报, 2024, 30(5): 71-78.
- [20] 施丹萍, 沈敏, 俞振伟, 等. 基于多组分定量联合主成分分析正交偏最小二乘法-判别分析及熵权优劣解距离法的抗菌消炎胶囊质量差异性评价 [J]. 中国药物与临床, 2024, 24(12): 749-755.

[责任编辑 时圣明]