

基于多指标成分定量联合多元统计分析评价不同产地鹅不食草药材质量

陈巍¹, 杨海峰¹, 陈毓¹, 王豪^{2,3*}, 陈晓兰^{1*}

¹江苏农牧科技职业学院药学院, 泰州 225300; ²中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023; ³泰州学院江苏省手性医药化学品生物制造重点实验室, 泰州 225300

摘要: 基于多指标成分定量联合多元统计分析综合评价不同产地鹅不食草质量差异, 提高鹅不食草药材的整体质量控制水平。以 Waters XTerra MS C₁₈ 柱为色谱柱, 乙腈-0.2%磷酸为流动相, 采用 HPLC 法同时测定鹅不食草中绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素、山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C、短叶老鹳草素 A、羽扇豆醇、 β -谷甾醇和蒲公英甾醇含量。对 16 批鹅不食草多指标成分定量检测结果进行聚类分析 (cluster analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和因子分析 (factor analysis, FA), 对不同产地鹅不食草药材进行分组和综合质量评价。利用正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 分析挖掘影响产品质量的差异性标志物。方法学验证符合中华人民共和国药典要求, 13 种成分在各自范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.999$), 平均加样回收率 ($n=9$) 在 96.88%~100.14% 之间 (RSD < 2.0%)。CA 结果显示 16 批鹅不食草聚为 3 类。PCA 结果显示前 2 个主成分特征值分别为 10.187 和 2.059, 方差贡献率分别为 78.361% 和 15.839%, 表明前 2 个主成分代表鹅不食草 94.200% 信息量, 对鹅不食草质量评价具有很好的代表性。FA 结果显示 16 批鹅不食草样品主成分综合得分在 -1.451~1.344, 其中浙江和江苏产鹅不食草综合得分较高, 排名居于前 5 位, 湖北、湖南和广东产鹅不食草综合得分排名居中, 贵州和四川产鹅不食草综合得分排名靠后。OPLS-DA 结果显示短叶老鹳草素 A、异绿原酸 A、小堆心菊素 C、槲皮素、山金车内酯 C 是影响鹅不食草产品质量的差异性标志物。所建立的 HPLC 法操作便捷, 结果准确, 可用于鹅不食草多指标成分定量控制; 多元统计分析可用于不同产地鹅不食草的整体质量评价。

关键词: 鹅不食草; 高效液相色谱法; 多元统计分析; 因子分析; 质量评价

中图分类号: R917 文献标识码: A

Quality evaluation of Centipeda Herba from different origins based on multi-component quantification combined with multivariate statistical analysis

CHEN Wei¹, YANG Hai-feng¹, CHEN Yu¹, WANG Hao^{2,3*}, CHEN Xiao-lan^{1*}

¹School of Pharmacy, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

²Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

³Jiangsu Key Laboratory of Chiral Pharmaceuticals Biosynthesis, Taizhou University, Taizhou 225300, China

Abstract: This study aims to comprehensively evaluate the quality differences of Centipeda Herba in different producing areas by multi-component quantification combined with multivariate statistical analysis, and to improve the overall quality control level of Centipeda Herba. The Waters XTerra MS C₁₈ column was used, with acetonitrile-0.2% phosphoric acid serving as the mobile phase. The contents of chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, quercetin, kaempferol, 3-O-methylquercetin, arnicolide D, arnicolide C, microhelenin C, brevilin A, lupeol, β -sitosterol and taraxasterol in Centipeda Herba were simultaneously determined by HPLC. Cluster analysis(CA), principal component analysis(PCA) and factor analysis(FA) were performed on the quantitative detection results of multi-components components of 16 batches of Centipeda Herba, and the differential markers affecting product quality were excavated by OPLS-DA. The methodology was verified in accordance with the requirements of Chinese Pharmacopoeia. The 13 components showed good linear relationships in their respective ranges($R^2>0.999$), and the average recovery rate ($n=9$) were 96.88%-100.14% (RSD<2.0%). The CA results showed that 16 batches of Centipeda Herba were clustered into 3 categories. The PCA results showed that the eigenvalues of the first two principal components were 10.187 and 2.059, respectively, and the variance contribution rates were 78.361% and 15.839%, respectively, indicating that the first two principal components represented 94.200% of the information content of Centipeda Herba, and had a good representation for the quality evaluation of Centipeda Herba. The results of FA showed that the comprehensive scores of principal components of 16 batches of Centipeda Herba samples were -1.451-1.344. Among them, the comprehensive scores of Centipeda Herba in Zhejiang and Jiangsu were higher, ranking in the top five, the comprehensive scores of Centipeda Herba in Hubei, Hunan and Guangdong were in the middle, and the comprehensive scores of Centipeda Herba in Guizhou and Sichuan were lower. The results of OPLS-DA showed that short-leaved geraniin A, isochlorogenic acid A, inulin C, quercetin, and seneciolid C were the differential markers affecting the quality of Centipeda Herba. The established HPLC method is convenient and accurate, and can be used for quantitative control of multi-index components in Centipeda Herba. Multivariate statistical analysis can be used for the overall quality evaluation of Centipeda Herba in different origins.

Key words: Centipeda Herba; HPLC; multivariate statistical analysis; factor analysis; quality evaluation

鹅不食草为菊科植物鹅不食草 *Centipeda minima* (L.) A. Br. et Aschers.的干燥全草, 其资源丰富, 具有发散风寒、通鼻窍、止咳之功^[1], 研究表明鹅不食草具有抗过敏性鼻炎、抗癌、抗肿瘤、抗炎、抗诱变、抗氧化等多种药理作用^[2-4]。鹅不食草主要含黄酮类, 倍半萜

类、甙体类、苯丙素类、三萜及其苷类、挥发油等多种成分，其中槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素等为其黄酮类主要成分，山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C 和短叶老鹳草素 A 为其倍半萜类主要成分，羽扇豆醇为其三萜类成分，绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 为其苯丙素类主要成分， β -谷甾醇、蒲公英甾醇为其甙体类主要成分。Zhu 等^[5]研究表明鹅不食草中的山金车内酯 C、短叶老鹳草素 A、羽扇豆醇、槲皮素和 3-甲氧基槲皮素具有明显的抗肿瘤活性；Yang 等^[6]发现 β -谷甾醇和蒲公英甾醇具有较强的抗炎活性；Dong 等^[7]研究发现槲皮素和山柰酚具有抗氧化活性；Xiong 等^[8]发现绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒的作用；Lin 等^[9]发现山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C 和短叶老鹳草素 A 具有抗肿瘤活性。上述指标均为鹅不食草药效成分，是鹅不食草发挥临床功效的主要活性成分。中药材成分繁杂、功效多样，多指标综合评价模式成为了中药质量评价的趋势。多元统计分析通过降维的方式对多变量进行系统分析，预测精度高，越来越多地用于评价中药质量^[10-13]。鹅不食草收载于《中华人民共和国药典》2020 年版一部^[1]，标准仅对短叶老鹳草素 A 进行了定量分析，本研究利用 HPLC 法对 7 省 16 个批次的鹅不食草样品中绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素、山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C、短叶老鹳草素 A、羽扇豆醇、 β -谷甾醇和蒲公英甾醇含量进行测定，并借助多元统计分析对测定的含量数据进行系统分析，旨在为鹅不食草的道地性评价和内在质量的全面控制提供借鉴。

1 材料

1.1 试药

鹅不食草药材经江苏农牧科技职业学院药学院陈晓兰副教授按《中华人民共和国药典》2020 年版一部中鹅不食草标准鉴定为菊科植物鹅不食草 *Centipeda minima* (L.) A. Br. et Aschers. 的干燥全草，系正品。标本存放于江苏农牧科技职业学院药学院标本室，标本编号及采集地信息见表 1。

槲皮素（批号：100081-201610，含量：99.8%）、短叶老鹳草素 A（批号：112067-202001，含量 99.0%）、绿原酸（批号：110753-202119，含量：96.3%）、 β -谷甾醇（批号：110851-201909，含量：92.7%）对照品（中国食品药品检定研究院）；异绿原酸 C（批号：PRF8060542，含量：99.3%）、山柰酚（批号：PRF8082323，含量：99.3%）、异绿原酸 A（批号：PRF8061204，含量：98.7%）、羽扇豆醇（批号：PRF7101343，含量：98.2%）、蒲公英甾醇（批号：PRF8062821，含量：98.7%）、3-甲氧基槲皮素（批号：PRF22053023，含量：98.5%）、山金车内酯 D（批号：PRF22022523，含量：98.3%）、山金车内酯 C（批号：PRF21021924，含量：98.6%）、

小堆心菊素 C（批号：PRF21091521，含量：98.2%）对照品（成都普瑞法生物科技有限公司）；乙腈、磷酸（色谱纯，德国 Merck 公司）；其余试剂为分析纯。

表 1 鹅不食草药材来源信息

Table 1 Information on the source of Centipeda Herba

编号 No.	采集地 Collection place	标本编号 Specimen number	编号 No.	采集地 Collection place	标本编号 Specimen number
S1	湖北英山县	CH-210701	S9	浙江桐庐县	CH-220803
S2	湖北通山县	CH-220903	S10	浙江仙居县	CH-210902
S3	湖北随县	CH-211001	S11	江苏宝应县	CH-220701
S4	湖南安化县	CH-220801	S12	江苏建湖县	CH-220801
S5	湖南双峰县	CH-220901	S13	贵州普安县	CH-210901
S6	广东阳山县	CH-210703	S14	贵州麻江县	CH-220701
S7	广东连平县	CH-220901	S15	四川宝兴县	CH-220601
S8	浙江云和县	CH-210801	S16	四川黑水县	CH-220803

1.2 仪器

XS105 型分析天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；Primaide 1430 型高效液相色谱仪（日本日立公司）；QK-500DA 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

2 方法与结果

2.1 HPLC 多组分定量控制

2.1.1 对照品溶液制备

精密称取各对照品适量，用 70% 甲醇溶解并制成每 mL 含绿原酸 0.516 mg、异绿原酸 A 0.83 mg、异绿原酸 C 0.342 mg、槲皮素 0.12 mg、山柰酚 0.098 mg、3-甲氧基槲皮素 0.076 mg、山金车内酯 D 0.534 mg、山金车内酯 C 0.382 mg、小堆心菊素 C 0.194 mg、短叶老鹳草素 A 2.17 mg、羽扇豆醇 0.032 mg、 β -谷甾醇 0.084 mg 和蒲公英甾醇 0.026 mg 的混合贮备液。精密吸取贮备液，用 70% 甲醇定量稀释 20 倍，摇匀，制得混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备

取鹅不食草粉末（过二号筛）约 1.0 g，精密称定，置锥形瓶中，用 70% 甲醇约 20 mL 超声提取 45 min，冷却，过滤，用提取溶剂定容至 25 mL，摇匀，过滤，即得。

2.1.3 HPLC 色谱条件

色谱柱 Waters XTerra MS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司), 柱温 30 °C; 检测波长 325 nm (0~24 min 检测绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C) [14,15]; 360 nm (24~35 min 检测槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素) [16]; 225 nm (35~49 min 检测山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C、短叶老鹳草素 A) [17]; 210 nm (49~70 min 检测羽扇豆醇、β-谷甾醇、蒲公英甾醇) [18]; 乙腈-0.2%磷酸为流动相梯度洗脱 (0~11 min, 16.0%乙腈; 11~24 min, 16.0%→22.0%乙腈; 24~35 min, 22.0%→35.0%乙腈; 35~61 min, 35.0%→52.0%乙腈; 61~70 min, 52.0%→16.0%乙腈); 进样体积 10 μL, 流量 1.0 mL/min。取“2.1.1”项下混合对照品溶液、“2.1.2”项下供试品溶液及空白溶剂进样检测, 进行干扰试验, 谱图显示指标成分与基线能完全分离, 理论板数按各成分计均大于 5 500 (见图 1)。

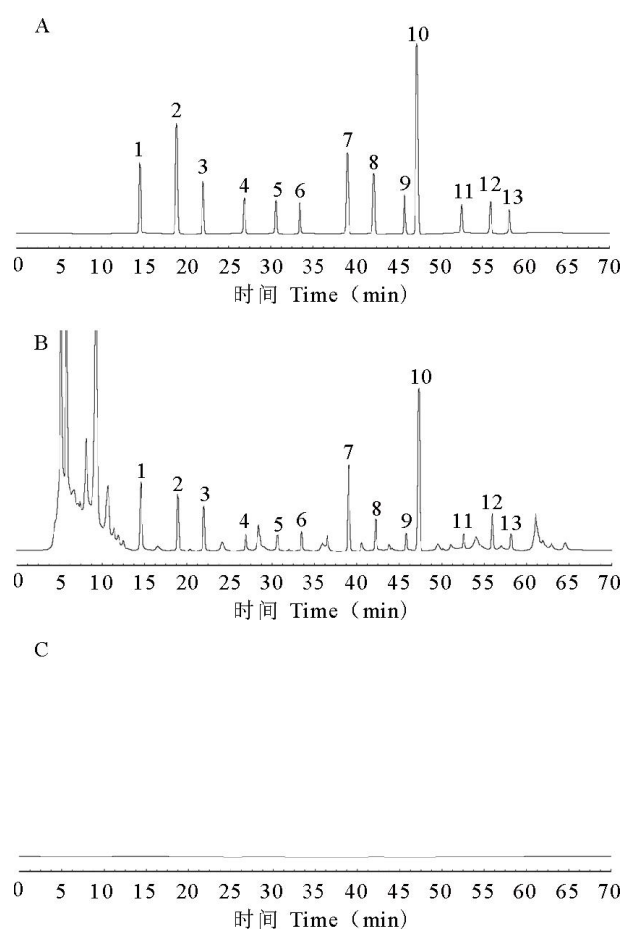


图 1 对照品 (A)、供试品 (B) 和空白溶剂 (C) 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance(A), test products(B) and blank solvent(C)

注: 1: 绿原酸; 2: 异绿原酸 A; 3: 异绿原酸 C; 4: 槲皮素; 5: 山柰酚; 6: 3-甲氧基槲皮素; 7: 山金车内酯 D; 8: 山金车内酯 C; 9: 小堆心菊素 C; 10: 短叶老鹳草素 A; 11: 羽扇豆醇; 12: β-谷甾醇; 13: 蒲公英甾醇。

Note: 1: Chlorogenic acid; 2: Isochlorogenic acid A; 3: Isochlorogenic acid C; 4: Quercetin; 5: Kaempferol; 6: 3-O-Methylquercetin; 7: Arnicolide D; 8: Arnicolide C; 9: Microhelenin C; 10: Brevilin A; 11: Lupeol; 12: β-Sitosterol; 13: Taraxasterol.

2.1.4 线性关系考察

精密量取混合对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 至 20 mL 容量瓶, 分别用提取溶剂定容至刻度, 摇匀制得 6 个浓度从低到高的混合对照品溶液, 分别取混合液各 10 μ L 进样, 以对照品绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素、山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C、短叶老鹳草素 A、羽扇豆醇、 β -谷甾醇和蒲公英甾醇质量浓度与相应的色谱峰面积作图, 得标准曲线, 经回归, 得线性方程和相关系数, 结果见表 2。

表 2 13 种成分的线性关系考察结果

Table 2 Results of linear relationship investigation of 13 components

成分 Component	回归方程 Regression equation	线性范围 Range of linearity (μ g/mL)	R^2
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y=2.9013 \times 10^6 X + 516.8$	2.58~129.00	0.999 2
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	$Y=3.8237 \times 10^6 X + 683.4$	4.15~207.50	0.999 7
异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	$Y=2.6701 \times 10^6 X + 1025.3$	1.71~85.50	0.999 6
槲皮素 Quercetin	$Y=2.4864 \times 10^6 X - 672.5$	0.60~30.00	0.999 9
山柰酚 Kaempferol	$Y=2.1138 \times 10^6 X - 1152.7$	0.49~24.50	0.999 4
3-甲氧基槲皮素 3-O-Methylquercetin	$Y=9.8157 \times 10^5 X + 452.9$	0.38~19.00	0.999 1
山金车内酯 D Darnicolide D	$Y=3.6049 \times 10^6 X + 751.2$	2.67~133.50	0.999 2
山金车内酯 C Carnicolide C	$Y=3.1952 \times 10^6 X + 582.1$	1.91~95.50	0.999 5
小堆心菊素 C microhelenin C	$Y=2.8396 \times 10^6 X - 937.4$	0.97~48.50	0.999 8
短叶老鹳草素 Abrevilin A	$Y=3.4274 \times 10^6 X + 1086.5$	10.85~542.50	0.999 3
羽扇豆醇 Lupeol	$Y=1.5349 \times 10^6 X + 578.8$	0.16~8.00	0.999 4
β -谷甾醇 β -Sitosterol	$Y=1.7096 \times 10^6 X - 254.6$	0.42~21.00	0.999 7
蒲公英甾醇 Taraxasterol	$Y=1.2854 \times 10^6 X + 792.5$	0.13~6.50	0.999 3

2.1.5 精密度、稳定性及重复性试验

取鹅不食草 (S1), 按“2.1.2”项步骤制备供试品溶液一份, 连续进样 6 次, 每次 10 μ L, 记录绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素、山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C、短叶老鹳草素 A、羽扇豆醇、 β -谷甾醇和蒲公英甾醇的峰面积, 结果峰面积无显著变化, 各成分峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)

依次为 1.1%、0.83%、1.1%、1.3%、1.4%、1.5%、1.0%、1.2%、1.3%、0.98%、1.6%、1.5% 和 1.6% ($n=6$)，表明仪器精密度能满足检测要求。取一份鹅不食草 (S1) 供试品溶液，于制备后每隔 4 h 进样检测，至 36 h，每次 10 μ L，测定峰面积，结果峰面积变化不显著，各成分峰面积的 RSD 依次为 1.2%、1.1%、1.4%、1.5%、1.5%、1.6%、1.1%、1.3%、1.4%、1.1%、1.7%、1.5% 和 1.7% ($n=10$)，表明在 36 h 内鹅不食草供试品溶液是稳定的。取鹅不食草 (S1) 适量，按“2.1.2”项方法制成供试品溶液 6 份，进样，测定峰面积，代入标准曲线，计算各成分含量，结果各成分含量的 RSD 依次为 1.6%、1.5%、1.6%、1.8%、1.8%、1.9%、1.6%、1.5%、1.7%、1.4%、1.9%、1.8% 和 2.0% ($n=6$)，表明方法重复性良好。

2.1.6 准确性试验

本试验采用加样回收的方法进行准确性考察。取已知绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素、山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C、短叶老鹳草素 A、羽扇豆醇、 β -谷甾醇和蒲公英甾醇含量的鹅不食草 (S1) 9 份，粉碎，每份约 0.5 g，精密称定，分别按低、中、高水平加入混合对照品溶液（每 mL 含 0.371 mg 绿原酸、0.564 mg 异绿原酸 A、0.239 mg 异绿原酸 C、0.057 mg 槲皮素、0.048 mg 山柰酚、0.037 mg 3-甲氧基槲皮素、0.412 mg 山金车内酯 D、0.272 mg 山金车内酯 C、0.093 mg 小堆心菊素 C、1.487 mg 短叶老鹳草素 A、0.016 mg 羽扇豆醇、0.042 mg β -谷甾醇和 0.013 mg 蒲公英甾醇）0.8、1.0、1.2 mL，按照“2.1.2”的方法制备样品，结果上述 13 种成分的平均加样回收率均在 96.88%~100.14% 之间，RSD 均 $<2.0\%$ ，表明该方法准确度高，回收率试验符合含量测定要求。

2.1.7 含量测定

分别取编号 S1~S16 的鹅不食草粉末各约 1.0 g，精密称定，按照供试品溶液处理流程制成供试品溶液，进样，采用外标法计算绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素、山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C、短叶老鹳草素 A、羽扇豆醇、 β -谷甾醇和蒲公英甾醇的含量，见表 3。结果各成分含量分别为 0.599~1.004、0.527~1.893、0.368~0.617、0.067~0.164、0.048~0.128、0.057~0.097、0.705~1.210、0.251~0.901、0.106~0.257、2.313~3.878、0.020~0.058、0.064~0.124 和 0.022~0.044 mg/g，显示各成分含量存在一定的差异。

表 3 不同产地与批号的鹅不食草中 13 种成分的含量测定结果

Table 3 Determination results of 13 components in Centipede Herba from different origins and batches ($n=3$)

成分 Component	含量 Content (mg/g)																平均值±标准偏差 ($\bar{x} \pm s$)
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	
绿原酸 Chlorogenic acid	0.754	0.835	0.791	0.771	0.708	0.730	0.658	0.966	0.924	1.004	0.982	0.944	0.641	0.658	0.599	0.622	0.787±0.139
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	1.136	1.321	0.855	1.259	1.014	1.077	0.919	1.737	1.616	1.832	1.893	1.547	0.614	0.656	0.591	0.527	1.162±0.460
异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	0.472	0.434	0.491	0.466	0.516	0.482	0.480	0.568	0.605	0.617	0.581	0.516	0.388	0.406	0.376	0.368	0.485±0.079
槲皮素 Quercetin	0.117	0.150	0.164	0.144	0.140	0.135	0.122	0.108	0.091	0.113	0.088	0.099	0.095	0.103	0.073	0.067	0.113±0.028
山柰酚 Kaempferol	0.091	0.086	0.059	0.081	0.069	0.071	0.063	0.103	0.113	0.128	0.118	0.097	0.052	0.060	0.048	0.055	0.081±0.025
3-甲氧基槲皮素 3-O-Methylquercetin	0.072	0.065	0.074	0.070	0.074	0.069	0.065	0.091	0.089	0.097	0.093	0.087	0.061	0.063	0.059	0.057	0.074±0.013
山金车内酯 Darnicolide D	0.816	0.881	0.997	0.908	0.992	0.937	0.940	1.135	1.210	1.172	1.051	1.080	0.761	0.792	0.733	0.705	0.944±0.158
山金车内酯 Carnicolide C	0.541	0.629	0.407	0.600	0.483	0.513	0.438	0.827	0.770	0.873	0.901	0.737	0.293	0.313	0.282	0.251	0.554±0.219
小堆心菊素 Cmicrohelenin C	0.184	0.236	0.257	0.227	0.221	0.212	0.192	0.170	0.143	0.177	0.138	0.156	0.150	0.162	0.115	0.106	0.178±0.044
短叶老鹳草素 Abrevilin A	2.967	2.731	3.084	2.928	3.243	3.031	3.016	3.572	3.803	3.878	3.651	3.245	2.438	2.551	2.362	2.313	3.051±0.499
羽扇豆醇 Lupeol	0.031	0.033	0.034	0.037	0.039	0.041	0.042	0.054	0.052	0.058	0.050	0.044	0.024	0.025	0.020	0.022	0.038±0.012
β -谷甾醇 β -Sitosterol	0.083	0.089	0.084	0.097	0.100	0.094	0.089	0.071	0.069	0.064	0.078	0.081	0.118	0.115	0.124	0.121	0.092±0.019
蒲公英甾醇 Taraxasterol	0.027	0.031	0.035	0.032	0.034	0.030	0.028	0.043	0.041	0.044	0.038	0.037	0.023	0.024	0.022	0.023	0.032±0.007

2.2 多元统计分析质量评价体系的建立

2.2.1 聚类分析

以 16 批鹅不食草中绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素、山金车内酯 D、山金车内酯 C、小堆心菊素 C、短叶老鹳草素 A、羽扇豆醇、 β -谷甾醇和蒲公英甾醇含量为数据矩阵，导入多元统计软件 SPSS 26.0 进行聚类分析（cluster analysis, CA），平均联接（组间）谱系图见图 2。从图 2 可知当距离为 10 时，16 批鹅不食草明显聚为 3 组，S15、S16、S13 和 S14 为第一组，S3、S7、S5、S1、S6、S4 和 S2 为第二组，S8、S11、S9、S10 和 S12 为第三组^[10]。其中第一组样品聚类较为集中，样品质量一致性较好；第二组样品中 S3、S7、S5 与 S1、S6、S4、S2 各聚为一小类，样品呈现一定组内差异；第三组中 S12 与其他样品组内差异相对较大。

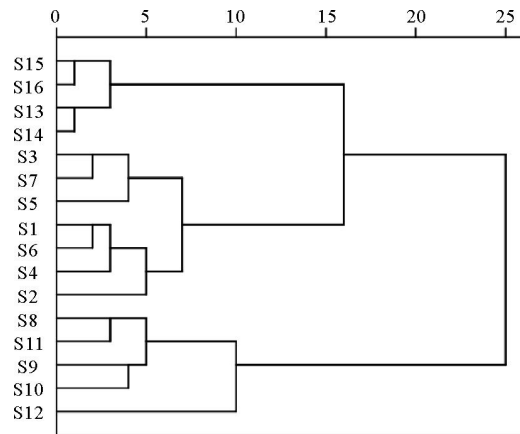


图 2 16 批鹅不食草的平均联接（组间）谱系图

Fig.2 Pedigree diagram of the average linkage (between groups) of 16 batches of Centipeda Herba

2.2.2 主成分分析

采用 SPSS 26.0 软件对 16 批鹅不食草中 13 种成分含量进行主成分分析（principal component analysis, PCA），得主成分特征值和方差贡献率（见表 4）及碎石图（见图 3）、初始因子载荷矩阵表（见表 5）、成分得分系数（见表 6）。由表 4 可知前 2 个主成分特征值分别为 10.187 和 2.059（特征值 >1 ）^[11]，方差贡献率分别为 78.361%和 15.839%，表明前 2 个主成分代表鹅不食草 13 个成分 94.200%的信息量^[12]，对鹅不食草质量评价具有很好的代表性。表 5 可知绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、山柰酚、3-甲氧基槲皮素、山金车内酯 D、山金车内酯 C、短叶老鹳草素 A、羽扇豆醇、 β -谷甾醇、蒲公英甾醇对第 1 主成分贡献度高，槲皮素和小堆心菊素 C 对第 2 主成分贡献度显著。第 3 个及其以后的主成分特征值相对较小，对鹅不食草质量评价的信息量贡献较小。

表 4 鹅不食草中主成分方差分析

Table 4 Analysis of variance of principal components in Centipediae Herba

主成分 Principal component	特征值 Eigenvalue	方差贡献率 Variance contribution rate (%)	累积方差贡献率 Cumulative variance contribution rate (%)
1	10.187	78.361	78.361
2	2.059	15.839	94.200
3	0.390	3.003	97.203
4	0.138	1.064	98.267
5	0.094	0.722	98.989
6	0.069	0.528	99.517
7	0.027	0.209	99.727
8	0.019	0.150	99.876
9	0.012	0.090	99.966
10	0.004	0.034	100.000
11	1.900E ⁻⁵	0.000	100.000
12	1.466E ⁻⁶	1.128E ⁻⁵	100.000
13	7.596E ⁻⁸	5.843E ⁻⁷	100.000

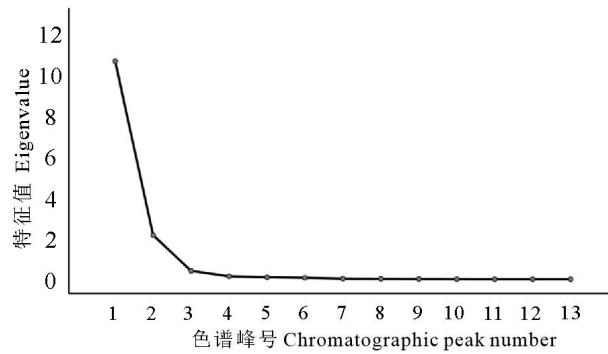


图 3 主成分分析碎石图

Fig.3 Scree plot of principal component analysis

表 5 鹅不食草中 13 种成分的初始因子载荷矩阵表

Table 5 Initial factor loadings matrix table of 13 components in Centipediae Herba

成分 Component	初始因子载荷 Initial factor loading
-----------------	----------------------------------

	Principal component 1	Principal component 2
绿原酸 Chlorogenic acid	0.955	-0.082
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	0.962	-0.088
异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	0.973	0.002
槲皮素 Quercetin	0.159	0.985
山柰酚 Kaempferol	0.932	-0.197
3-甲氧基槲皮素 3-O-Methylquercetin	0.968	-0.157
山金车内酯 Darnicolide D	0.953	0.057
山金车内酯 Carnicolide C	0.962	-0.089
小堆心菊素 Cmicrohelenin C	0.155	0.986
短叶老鹳草素 Abrevilin A	0.973	0.002
羽扇豆醇 Lupeol	0.964	0.007
β -谷甾醇 β -Sitosterol	-0.948	-0.153
蒲公英甾醇 Taraxasterol	0.970	0.067

表 6 鹅不食草中 13 种成分的得分系数

Table 6 Component score coefficient of 13 components in Centipeda Herba

成分 Component	成分得分系数 Component score coefficient	
	主成分 1	主成分 2
	Principal component 1	Principal component 2
绿原酸 Chlorogenic acid	0.094	-0.040
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	0.094	-0.043
异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	0.096	0.001
槲皮素 Quercetin	0.016	0.478
山柰酚 Kaempferol	0.092	-0.096
3-甲氧基槲皮素 3-O-Methylquercetin	0.095	-0.076
山金车内酯 Darnicolide D	0.094	0.028
山金车内酯 Carnicolide C	0.094	-0.043
小堆心菊素 Cmicrohelenin C	0.015	0.479

短叶老鹳草素 Abrevilin A	0.096	0.001
羽扇豆醇 Lupeol	0.095	0.004
β -谷甾醇 β -Sitosterol	-0.093	-0.074
蒲公英甾醇 Taraxasterol	0.095	0.033

2.2.3 因子分析

按公式 $Y_{ij} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{SD_j}$ (其中 X_{ij} 为第 i 批样品第 j 个成分的含量, \bar{X}_j 为 16 批鹅不食草第 j 个成分的平均含量, SD_j 为 16 批鹅不食草第 j 个成分含量的标准差, Y_{ij} 为第 i 批样品第 j 个成分含量标准化后结果) 对表 3 中 16 批鹅不食草中 13 种成分含量测定数据进行标准化处理, 得标准化数据矩阵 (见表 7)。再按公式:

$$F_{i1} = Y_{i1} \times 0.094 + Y_{i2} \times 0.094 + Y_{i3} \times 0.096 + Y_{i4} \times 0.016 + Y_{i5} \times 0.092 + Y_{i6} \times 0.095 + Y_{i7} \times 0.094 + Y_{i8} \times 0.094 + Y_{i9} \times 0.015 + Y_{i10} \times 0.096 + Y_{i11} \times 0.095 - Y_{i12} \times 0.093 + Y_{i13} \times 0.095, F_{i2} = Y_{i1} \times (-0.040) - Y_{i2} \times 0.043 + Y_{i3} \times 0.001 + Y_{i4} \times 0.478 - Y_{i5} \times 0.096 - Y_{i6} \times 0.076 + Y_{i7} \times 0.028 - Y_{i8} \times 0.043 + Y_{i9} \times 0.479 + Y_{i10} \times 0.001 + Y_{i11} \times 0.004 - Y_{i12} \times 0.074 + Y_{i13} \times 0.033$$

分别计算 16 批鹅不食草第一、第二主成分得分。按公式 $W_t = \frac{C_t}{C_z}$ (其中 W_t 为第 t 个主成分相对权重, C_t 为第 t 个主成分方差贡献率, C_z 为累积方差贡献率) 计算主成分相对权重, 结果主成分 1 和 2 相对权重分别为 0.832 和 0.168。再按公式: $F_i = F_{i1} \times 0.832 + F_{i2} \times 0.168$ 计算鹅不食草各批次主成分综合得分^[12] (见表 8), 并按照主成分综合得分高低对样品进行排序, 因子分析 (factor analysis, FA) 中综合得分越高, 产品质量相对越优。

表 7 鹅不食草中多指标成分含量数据标准化处理结果

Table 7 Results of standardized processing of multi-index component in Centipeda herba

成分 Component	含量数据标准化处理后结果 Results of content data standardization processing															
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
绿原酸 Chlorogenic acid	-0.237	0.345	0.029	-0.115	-0.568	-0.410	-0.928	1.288	0.986	1.561	1.403	1.129	-1.050	-0.928	-1.353	-1.187
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	-0.057	0.346	-0.667	0.211	-0.322	-0.185	-0.528	1.250	0.987	1.457	1.589	0.837	-1.191	-1.100	-1.241	-1.380
异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	-0.165	-0.646	0.076	-0.241	0.392	-0.038	-0.063	1.051	1.519	1.671	1.215	0.392	-1.228	-1.000	-1.380	-1.481
槲皮素 Quercetin	0.143	1.321	1.821	1.107	0.964	0.786	0.321	-0.179	-0.786	0.000	-0.893	-0.500	-0.643	-0.357	-1.429	-1.643
山柰酚 Kaempferol	0.400	0.200	-0.880	0.000	-0.480	-0.400	-0.720	0.880	1.280	1.880	1.480	0.640	-1.160	-0.840	-1.320	-1.040
3-甲氧基槲皮素 3-O-Methylquercetin	-0.154	-0.692	0.000	-0.308	0.000	-0.385	-0.692	1.308	1.154	1.769	1.462	1.000	-1.000	-0.846	-1.154	-1.308
山金车内酯 Darnicolide D	-0.810	-0.399	0.335	-0.228	0.304	-0.044	-0.025	1.209	1.684	1.443	0.677	0.861	-1.158	-0.962	-1.335	-1.513
山金车内酯 Carnicolide C	-0.059	0.342	-0.671	0.210	-0.324	-0.187	-0.530	1.247	0.986	1.457	1.584	0.836	-1.192	-1.100	-1.242	-1.384
小堆心菊素 Cmicrohelenin C	0.136	1.318	1.795	1.114	0.977	0.773	0.318	-0.182	-0.795	-0.023	-0.909	-0.500	-0.636	-0.364	-1.432	-1.636
短叶老鹳草素 Abrevilin A	-0.168	-0.641	0.066	-0.246	0.385	-0.040	-0.070	1.044	1.507	1.657	1.202	0.389	-1.228	-1.002	-1.381	-1.479
羽扇豆醇 Lupeol	-0.583	-0.417	-0.333	-0.083	0.083	0.250	0.333	1.333	1.167	1.667	1.000	0.500	-1.167	-1.083	-1.500	-1.333
β -谷甾醇 β -Sitosterol	-0.474	-0.158	-0.421	0.263	0.421	0.105	-0.158	-1.105	-1.211	-1.474	-0.737	-0.579	1.368	1.211	1.684	1.526
蒲公英甾醇 Taraxasterol	-0.714	-0.143	0.429	0.000	0.286	-0.286	-0.571	1.571	1.286	1.714	0.857	0.714	-1.286	-1.143	-1.429	-1.286

表 8 16 批次鹅不食草样品主成分得分及排序

Table 8 Principal component scores and ranking of 16 batches of Centipeda herba samples

编号 Number	F_{i1}	F_{i2}	F_i	排序 Sort
S1	-0.194	0.107	-0.143	11
S2	-0.109	1.246	0.119	9
S3	-0.055	1.925	0.278	6
S4	-0.067	1.046	0.120	8
S5	-0.029	1.013	0.146	7
S6	-0.148	0.829	0.016	10
S7	-0.332	0.503	-0.192	12
S8	1.249	-0.341	0.982	2
S9	1.275	-0.904	0.909	3
S10	1.675	-0.298	1.344	1
S11	1.218	-1.200	0.812	4
S12	0.727	-0.640	0.497	5
S13	-1.249	-0.463	-1.117	14
S14	-1.070	-0.229	-0.929	13
S15	-1.461	-1.212	-1.419	15
S16	-0.194	0.107	-1.451	16

表 8 显示 16 批鹅不食草样品主成分综合得分在-1.451~1.344，其中样品 S8~S12 主成分综合得分较高，排名居于前 5 位。S1~S7 样品主成分综合得分排名居中。其余 4 个批次样品主成分综合得分较低排名靠后。由此可见，FA 可用于不同产地与批次鹅不食草样品质量差异评价。

2.2.4 正交偏最小二乘法-判别分析

为挖掘影响鹅不食草产品质量的差异标志物，将 16 批鹅不食草中 13 个组分含量数据矩阵导入 SIMCA 14.1 统计软件进行正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA），结果模型参数 $R^2_X=0.981$ ， $R^2_Y=0.898$ ， $Q^2=0.831$ ，提示模型稳定可靠、预测能力良好（模型参数均大于 0.5），模型得分图见图 4 和图 5。图 4 显示 16 批鹅不食草分为 3 组，与聚类分析一致；以变量重要性投影（variable importance for

projection, VIP) >1 为筛选标准^[13], 筛选对分组影响较大的因子, 结果成分 10 (短叶老鹳草素 A, VIP=1.712)、成分 2 (异绿原酸 A, VIP=1.651)、成分 9 (小堆心菊素 C, VIP=1.439)、成分 4 (槲皮素, VIP=1.148) 和成分 8 (山金车内酯 C, VIP=1.139), 以上 5 个成分对鹅不食草质量影响较大, 可作为影响鹅不食草产品质量的差异标志物。对 OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验, 得置换检验图 (见图 6), 结果 R^2 拟合直线 Y 轴截距 < 0.3, 同时 Q^2 拟合直线 Y 轴截距为负值, 提示建立的模型不存在过度拟合, 可有效判别分析 16 批鹅不食草质量差异。

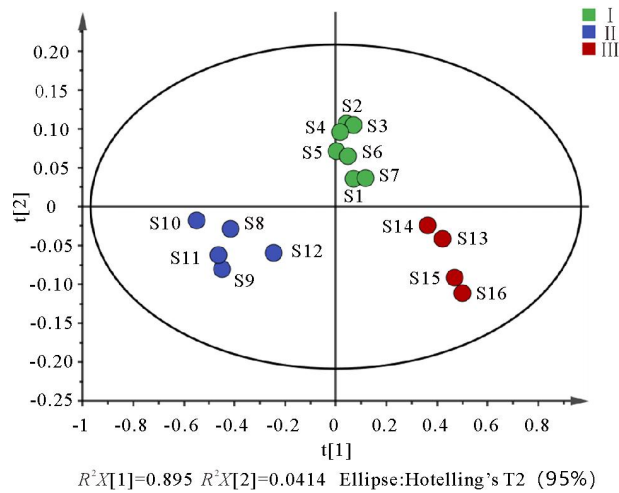


图 4 16 批鹅不食草样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 4 OPLS-DA score chart of 16 batches of Centipedeae Herba

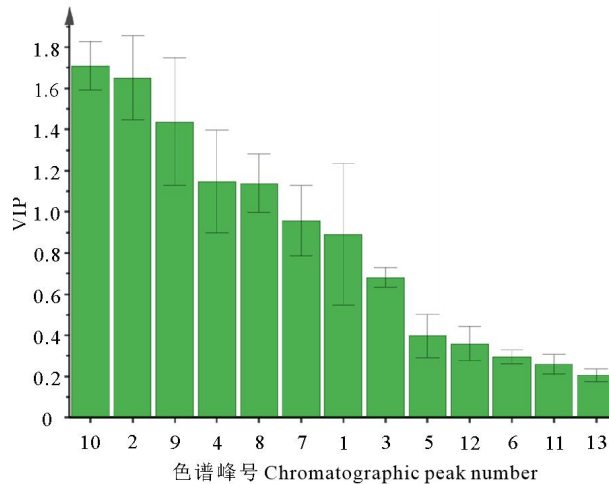


图 5 差异性标志物 VIP 图

Fig. 5 VIP map of different markers

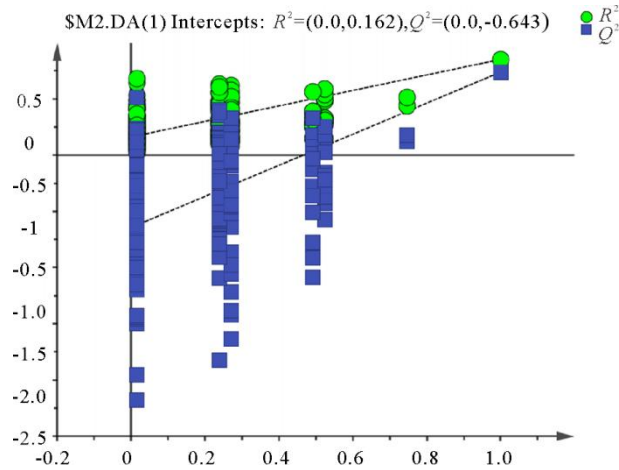


图 6 OPLS-DA 置换检测验证图

Fig. 6 OPLS-DA model permutation test diagram

3 讨论与结论

在前期预试验中分别考察了简单易行的超声不同提取溶剂（30%乙醇、70%乙醇、30%甲醇和70%甲醇）和时间（30、45、60 min），从提取的色谱信息全面性、色谱峰丰度、杂质干扰等方面考虑，发现70%甲醇超声提取45 min得到的供试品色谱图，基线噪音小，杂质干扰少，13个指标成分的峰面积和最大，可作为鹅不食草供试品制备的最佳方法。试验还对HPLC系统进行了考察：不同流动相系统（乙腈-0.02%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液）、不同洗脱程序。结果显示乙腈-0.2%磷酸溶液运行时，所得色谱图中基线平稳、色谱峰数量较多且色谱峰丰度饱满。

本试验采用HPLC法对7省16个批次鹅不食草绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸C、槲皮素、山柰酚、3-甲氧基槲皮素、山金车内酯D、山金车内酯C、小堆心菊素C、短叶老鹳草素A、羽扇豆醇、 β -谷甾醇和蒲公英甾醇进行定量测定，结果各成分含量分别为0.599~1.004、0.527~1.893、0.368~0.617、0.067~0.164、0.048~0.128、0.057~0.097、0.705~1.210、0.251~0.901、0.106~0.257、2.313~3.878、0.020~0.058、0.064~0.124和0.022~0.044 mg/g，批次间差异较大。所建立的HPLC法可用于鹅不食草多指标成分定量控制。

CA结果显示16批鹅不食草明显聚集为3组，呈现一定的产区差异，可能与产地的气候、土壤、采收季节等因素相关。PCA在减少数据维度并保留主要信息时实现对样品的分组，结果前2个主成分特征值分别为10.187和2.059，方差贡献率分别为78.361%和15.839%，对鹅不食草质量评价具有很好的代表性。FA结果显示16批鹅不食草样品主成分综合得分在-1.451~1.344，其中浙江和江苏产鹅不食草综合得分较高，排名居于前5位；湖北、湖南和广东产鹅不食草综合得分居中，位于排名中间7位；贵州和四川产鹅不食草综合得分较低，

排名居于后 4 位。为探索引起不同产地的鹅不食草质量差异的主要因子,在 CA 及 FA 分组基础上,对试验数据进行 OPLS-DA 分析,结果显示短叶老鹳草素 A、异绿原酸 A、小堆心菊素 C、槲皮素和山金车内酯 C 的 VIP 值均大于 1,是鹅不食草质量差异主要标志物^[19]。建议将上述成分纳入鹅不食草质量控制标准中。

作者在实验中,曾以 OPLS-DA 分析中 VIP 值为权重,利用加权 TOPSIS^[20]与灰色关联度^[21,22]融合模型对 16 批次鹅不食草中 13 种成分检测结果进行分析评价,结果 16 批鹅不食草样品的相对贴度在 0.219 5~0.728 5 之间,其中浙江和江苏产 5 批鹅不食草相对贴度在 0.596 2~0.728 5 之间,排名靠前;湖北、湖南和广东产 7 批鹅不食草相对贴度在 0.450 4~0.547 9 之间,排名居中;贵州和四川产 4 批鹅不食草相对贴度在 0.219 5~0.319 4 之间,排名靠后。加权 TOPSIS 与灰色关联度融合模型对鹅不食草质量差异评价排序结果与因子分析排序结果基本一致。为有利于读者更好地理解研究成果,尽可能采用较少的统计软件完成更多的数据分析,同时为今后其他研究人员提供更高的参考价值,故最终未将加权 TOPSIS 与灰色关联度融合模型评价相关内容纳入正文中。

本试验采用 HPLC 法结合化学计量学及多元统计分析技术评价了 16 批不同产地鹅不食草质量,所建立的多组分定量控制模式简单、易推广,为鹅不食草资源的合理开发和利用及优质种源的筛选和栽培提供借鉴。后续将进一步扩大样品收集产地,汇总气候、海拔、土壤等关键数据,将各指标检测结果与药材产地等关键数据进行综合分析,挖掘影响鹅不食草质量的关键影响因素,同时结合各成分临床药理作用,进一步对鹅不食草资源开发和道地性进行研究。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission.Pharmacopoeia of the People's Republic of China:Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M].Beijing:China Medical Science Press,2020:361-362.
- 2 Linh NTT,Ha NTT,Tra NT,et al.Medicinal plant *Centipeda minima*:a resource of bioactive compounds[J].Mini Rev Med Chem,2021,21:273-287.
- 3 Xue PH,Duan JS,Ding LQ,et al.Steroids and phenols from *Centipeda minima*[J].Chin J Med Chem(中国药物化学杂志),2020,30:340-346.
- 4 Zhang SN,Zhang YY.Research progress on clinical application and pharmacology of *Centipeda minima*[J].Agriculture of Jilin(吉林农业),2015,19:76-77.
- 5 Zhu YP.Study on the chemical constituents and the antitumor activity of *Centipeda minima*[D].Wuhan:Hubei University of Chinese Medicine(湖北中医药大学),2012.

- 6 Yang L,Gao Q,Zhou L,et al.Study on chemical constituents of *Centipeda minima* and anti-inflammatory activity[J].J Chin Med Mater(中药材),2023,46:1924-1930.
- 7 Dong LM,Kong LX,Chen DX,et al.Study on chemical constituents and antioxidant activities of flavonoids in fig[J].China Food Safety Magazine(食品安全导刊),2023,16:93-95,99.
- 8 Xiong LW,Jin Y,Wang YY,et al.Research progress on chemical constituents,pharmacological activities and *in vivo* metabolism of phenolic acids in *Lonicera japonica*[J].Chin Tradit Pat Med(中成药),2023,46:1924-1930.
- 9 Lin YS,Lv QY,Chen SB.Isolation and structural elucidation of sesquiterpene lactones from *Centipeda minima*(L.) A.Br.et Aschers.and bioassay on their anticancer activities[J].Cent South Pharm(中南药学),2019,17:356-360.
- 10 Zuo DJ ,Li CY,Yang J,et a.Quality analysis of Nymphaeae Flos based on HPLC fingerprint and QAMS[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:1112-1123.
- 11 Yan X,Zhu XY,He SH,et al.Simultaneous determination of 6 flavonoids in Zhuang medicine *Engelhardia roxburghiana* by HPLC-QAMS and multivariate statistical analysis[J].J China Pharm(中国药房),2021,20:2485-2491.
- 12 Wei M,To YL,Du XY,et al.Content determination and chemometrics evaluation of 7 components in Mori Cortex from different producing areas[J].J Chin Med Mater(中药材),2020,43:125-129.
- 13 Zhong MY,Qiao RF,Luo T,et al.Quality evaluation of Aurantii Fructus based on fingerprint qualitative analysis,multi-component quantitative analysis and chemometrics[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2022,28:138-145.
- 14 Zan K,XieY,Guo LN,et al.Study on characteristic chromatogram and quantitation method of seven components for Centipeda Herba[J].Chin J Pharm Anal(药物分析杂志),2018,38:151-157.
- 15 Wang L,Li YZ,Fang MJ,et al.Determination of chlorogenic acid and gallic acid in dandelion root,leaf,and flower by HPLC[J].Cereal Food Ind(粮食与食品工业),2023,30:64-68,72.
- 16 Kuang Y,Xiang Q.Simultaneous determination of five active constituents in *Centipeda minima*(L.) A.Br.et Aschers. by HPLC-DAD[J].China Pharm(中国药师),2017,20:1302-1304.
- 17 Ren HQ,Lv QY,Peng YD,et al.Simultaneous determination of five sesquiterpene lactones in *Centipeda minima* by HPLC/UV Assay[J].Mod Chin Med(中国现代中药),2019,21:616-621.
- 18 Chen G,Xia JZ,Xu ZG.Qualitative and quantitative analysis of β -sitosterol in Radix Helicteris[J].Chin J Ethnom Ethnop(中国民族民间医药),2020,29:40-42.

- 19 Feng YW,Liu XX,Liang YY,et al.Comparative study on UPLC characteristic chromatogram and multivariate component content of different specifications of Pericarpium Citri Reticulatae Viride[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2022,34:1169-1180.
- 20 Zeng ZJ,Yu XT,Deng CC,et al.Study on the differences in different parts of Gossampim Flos based on chemical pattern recognition and entropy TOPSIS method[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2022,34:1557-1564,1581.
- 21 Pang WJ,Zhang SJ,Tian ZM.Quality evaluation of Banlangen(Isatidis Radix) decoction pieces from different producing areas by grey relation analysis and cluster analysis[J].Guiding J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报),2023,29:53-57.
- 22 Zhang N,Weng WF,Wei KS.et al.Quality evaluation of Curcumae Radix from different areas based on grey correlation degree and TOPSIS fusion model[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2020,26:137-145.

收稿日期: 2024-03-04 接受日期:

基金项目: 江苏省高校自然科学基金面上项目(18KJB350011); 泰州市科技支撑计划项目(TN202006)

*通信作者 Tel: 1515262119; E-mail: pofkcn@163.com, vrzsve@163.com