鼠曲草抗慢性阻塞性肺疾病的质量标志物筛选Δ

刘婉婷[1*]，谢　榕[1]，林达淮[1]，叶向丽[2]，严国鸿[3]，李　煌[1#]（1.福建中医药大学药学院，福州　350122；2.福建医科大学附属协和医院呼吸内科，福州　350001；3.福建中医药大学附属人民医院药学部，福州　350004）

中图分类号　R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）06-0683-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.06.08

摘　要　目的　筛选鼠曲草抗慢性阻塞性肺疾病（COPD）的质量标志物并测定其含量。**方法**　通过网络药理学以“鼠曲草”为检索条件预测其抗COPD的有效成分及靶点。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012年版）》建立10批鼠曲草药材（S1～S10）的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱，指认共有峰，进行相似度评价；并进行聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘-判别分析，以变量重要性投影（VIP）＞1为标准筛选影响鼠曲草质量的差异性成分作为质量标志物。采用同一HPLC法测定10批样品中上述差异性成分的含量。**结果**　网络药理学检索得到槲皮素、木犀草素、绿原酸等黄酮类和有机酸类共10种主要活性成分，与抗COPD密切相关的靶点有91个。10批样品中共指认出9个共有峰，相似度均大于0.90，其中绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷为差异性成分；S3、S4、S6、S7、S10聚为一类，S2、S5、S8、S9聚为一类，S1聚为一类。10批鼠曲草药材中绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷的含量分别为0.070～7.653、0.010～0.097、0.001～0.036、0.508～6.627 mg/g。**结论**　绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷可作为鼠曲草的潜在质量标志物，其中绿原酸成分含量以江西吉安产鼠曲草最高，咖啡酸成分含量以江西吉安与福建三明产鼠曲草最高，后两种成分含量以广东潮汕产鼠曲草最高。

关键词　鼠曲草；靶点预测；指纹图谱；慢性阻塞性肺疾病；质量标志物

Screening of anti-COPD quality biomarkers of *Gnaphalium affine*

LIU Wanting[1], XIE Rong[1], LIN Dahuai[1], YE Xiangli[2], YAN Guohong[3], LI Huang[1]（1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Dept. of Respiratory Medicine, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China; 3. Dept. of Pharmacy, the Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To screen the quality biomarkers of *Gnaphalium affine* with anti-chronic obstructive pulmonary disease (COPD) effect and determine their contents. **METHODS** The effective components and targets of "*G. affine*" with anti-COPD effect were predicted by using network pharmacology as a search criterion. HPLC fingerprints for 10 batches of *G. affine* were established by using *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 edition); common peak identification and similarity evaluation were conducted; cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were performed to screen differential components as quality maker that affected the quality of *G. affine* using variable importance projection (VIP)＞1 as the standard. The same HPLC method was adopted to determine the contents of the differential components in 10 batches of samples. **RESULTS** A total of 10 flavonoids (such as quercetin, luteolin, and chlorogenic acid) and organic acid components, were identified through network pharmacology search, with 91 targets closely related to anti-COPD. A total of 9 common peaks were identified in 10 batches of samples, with similarity greater than 0.90. Among them, the differential components included chlorogenic acid, caffeic acid, 1, 3-*O*-dicaffeoylquinic acid and apigenin 7-*O*-*β*-D-glucopyranoside; S3, S4, S6, S7 and S10 were clustered into one category, S2, S5, S8 and S9 clustered into one category, and S1 clustered into one category. The contents of chlorogenic acid, caffeic acid, 1,3-*O*-dicaffeoylquinic acid, and apigenin 7-*O*-*β*-D-glucopyranoside in 10 batches of *G. affine* ranged 0.070-7.653, 0.010-0.097, 0.001-0.036, 0.508-6.627 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** Chlorogenic acid, caffeic acid, 1,3-*O*-dicaffeoylquinic acid, apigenin 7-*O*-*β*-D-glucopyranoside can serve as the potential quality marker for the anti-COPD effect of *G. affine*, with the highest content of chlorogenic acid in *G. affine* produced in Ji'an, Jiangxi province, and the highest content of caffeic acid in *G. affine* produced in Ji'an, Jiangxi province and Sanming, Fujian province. The contents of the last two components are highest in *G. affine* produced in Chaoshan, Guangdong province.

KEYWORDS　*Gnaphalium affine*; target prediction; fingerprint; COPD; quality marker

Δ **基金项目** 福建省自然科学基金面上项目（No.2023J01670）；福建省科技计划引导性项目（No.2022Y0036）；福建省卫生健康面向农村和城市社区推广适宜技术资助项目（No.2022TG008）

＊ **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药药效物质基础。E-mail：a775095377@163.com

\# **通信作者** 副教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药药效物质基础。E-mail：lhfjtcm@163.com

鼠曲草为菊科植物鼠曲草*Gnaphalium affine* D. Don的干燥全草，别名佛耳草、清明菜等，最早记载于《名医别录》，曾收载于1977年版《中国药典》，具有化痰止咳、祛风平喘的功效。作为药食两用资源，鼠曲草的民间食用历史悠久，如川渝地区的“清明粑”，以及福建三明、永泰等地区的“鼠粬饼”[1]。现代研究发现，鼠曲草主要成分为黄酮类、有机酸、挥发油等[2]，具有较好的抗炎、抗氧化、抗痛风等作用[3]，尤其对呼吸系统疾病，如慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease，COPD），疗效显著[4－5]。

世界上鼠曲草属品种多样，其中我国有19种[6]，已有的研究主要集中在鼠曲草化学成分提取分析、药效活性评价等方面[7]。然而上述研究均忽略了不同产地来源鼠曲草的质量差异，目前尚未见较为全面的基于中药质量标志物理念的鼠曲草质量标准。本研究运用网络药理学方法，分析预测鼠曲草抗COPD的有效成分及靶点；在此基础上采用高效液相色谱（HPLC）法以10批不同产地的鼠曲草为研究对象，建立HPLC指纹图谱，借助化学模式识别分析探究鼠曲草的质量标志物并测定其含量，以期为全面进行鼠曲草质量评价和质量标志物的量化辨识提供参考。

1　材料

1.1　主要仪器

e2695型HPLC仪购自美国Waters公司；Mettler Toledo XS105型分析天平购自梅特勒托利多科技（中国）有限公司；KQ-500DE型数控超声波清洗器购自昆山舒美超声仪器有限公司。

1.2　主要药品与试剂

原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、金丝桃苷、异毛蕊花糖苷、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、芹菜素对照品（批号分别为W10B104178、MUST-17030620、M27GB143417、M04HB177048、MUST-11122003、W17J10C90785、O20GB164741、100081-200406、111901-202004，纯度均不低于98%）均购自上海源叶生物科技有限公司；10批不同产地鼠曲草药材经福建中医药大学药学院刘小芬副教授鉴定均为菊科植物鼠曲草*G. affine* D. Don的干燥全草，产地包括广东潮汕、广西桂林、湖南衡阳、江西吉安、广东梅州、湖南邵阳、福建闽侯、江西宜春、四川达州、福建三明（编号依次为S1～S10）；乙醇（分析纯）购自西陇科学股份有限公司；磷酸（色谱纯）、乙腈（色谱纯）均购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

2　方法与结果

2.1　鼠曲草抗COPD的有效成分及靶点预测

检索TCMSP（https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php）、CNKI（https://www.cnki.net/）、PubMed（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/）数据库获取鼠曲草成分，并以口服药物利用度（oral bioavailability，OB）≥30%、类药性（drug-like properties，DL）≥0.18为条件进行筛选[8]，得到鼠曲草的活性成分。通过活性成分获取其对应的药物靶点。将所得药物靶点输入到UniProtKB（https://www.uniprot.org/）数据库中寻找其对应的基因简称，方便后续分析；在OMIM（https://omim.org/）、GeneCards（https://www.genecards.org/）数据库中以“chronic obstructive pulmonary disease”为关键词进行检索，设置relevance score≥20，得到抗COPD的相应靶点。使用Venny 2.1.0找出药物-疾病共同靶点。结果显示，鼠曲草的主要活性成分有贝壳杉烯酸、2-（3*S*）-3-羟基-3-甲基戊-4-烯基、4-胆甾烯-3-酮等（表1）；扣除重复靶点后得到共同靶点91个。已有研究表明，黄酮类及有机酸类成分可通过调节氧化应激相关通路起到抗COPD的作用[9]，因此，本课题组综合现有文献及网络药理学结果以原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、金丝桃苷、异毛蕊花糖苷、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、芹菜素为对照，开展进一步研究。

表1　鼠曲草抗COPD的活性成分（OB值排名前10位）

TCMSP ID信息	中文名称（英文名称）	OB/%	DL
MOL013110	贝壳杉烯酸（kaurenoic acid）	59.52	0.34
MOL013111	2-（3*S*）-3-羟基-3-甲基戊-4-烯基）（SBB005938）	49.48	0.21
MOL013112	4-胆甾烯-3-酮（4-cholesten-3-one）	37.18	0.68
MOL002372	6*Z*，10*E*，14*E*，18*E*-2，6，10，15，19，23-六甲基二十四烷-2，6，10，14，18，22-六烯（6*Z*，10*E*，14*E*，18*E*-2，6，10，15，19，23-hexamethyltetracosa-2，6，10，14，18，22-hexaene）	33.55	0.42
MOL000358	*β*-谷甾醇（beta-sitosterol）	36.91	0.75
MOL000359	谷甾醇（sitosterol）	36.91	0.75
MOL000422	山柰酚（kaempferol）	41.88	0.24
MOL000449	豆甾醇（stigmasterol）	43.83	0.76
MOL000006	木犀草素（luteolin）	36.16	0.25
MOL000098	槲皮素（quercetin）	46.43	0.28

2.2　鼠曲草HPLC指纹图谱的建立

2.2.1　色谱条件

采用Diamonsil C_{18}色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈（A）-0.1%磷酸（B）为流动相进行梯度洗脱（0～10 min，10%A→30%A；10～20 min，30%A→35%A；20～28 min，35%A→45%A；28～35 min，45%A→70%A；35～40 min，70%A→10%A）；流速为1.0 mL/min；检测波长为310 nm；柱温为30 ℃；进样量为10 μL。

2.2.2　供试品溶液的制备

称取鼠曲草粉末1.00 g，置于锥形瓶中，精密加入50%乙醇40 mL，超声（功率400 W）提取2次，每次30 min，过滤，滤液蒸干后置于10 mL容量瓶中，加50%甲醇定容，摇匀，提取液通过0.22 μm微孔滤膜，即得供试品溶液。

2.2.3　混合对照品溶液的制备

精密称取原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、1,3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、金丝桃苷、异毛蕊花糖苷、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、芹菜素各0.65、4.86、0.48、1.92、1.07、1.21、1.88、1.15、1.15 mg，置于5 mL容量瓶中，加甲醇定容，制成质量浓度分别为0.13、0.972、0.096、0.384、0.214、0.242、0.376、0.23、0.23 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.4　精密度试验

取鼠曲草供试品溶液（编号S1），按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6针，以7号峰（芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷）为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果显示，各共有峰相对保留时间的RSD为0.01%～0.02%，相对峰面积的RSD为2.17%～2.85%（n=6），表明方法精密度良好，符合指纹图谱技术要求。

2.2.5　重复性试验

取鼠曲草药材（编号S1），按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，以7号峰（芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷）为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果显示，各共有峰相对保留时间的RSD为0.02%～0.26%，相对峰面积的RSD为2.35%～2.81%（n=6），表明方法重复性良好。

2.2.6　稳定性试验

取鼠曲草供试品溶液（编号S1），按“2.2.1”项下色谱条件，分别在放置0、2、4、6、8、12、24 h时进样分析，以7号峰（芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷）为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果显示，各共有峰相对保留时间的RSD为0.06%～0.26%，相对峰面积的RSD为0.88%～2.49%（n=6），表明鼠曲草供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.7　指纹图谱的建立与相似度评价

取10批鼠曲草药材，按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。将10批鼠曲草HPLC数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012年版）》进行评价，设置S1样品图谱为参照，采用平均数法，时间窗宽度设置为0.1 min，经过多点校正和Mark峰匹配，得到10批鼠曲草药材的共有峰模式（图1）及鼠曲草对照指纹图谱R（图2）。其中标定了9个共有峰（1号峰为原儿茶酸，2号峰为绿原酸，3号峰为咖啡酸，4号峰为1,3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸，5号峰为金丝桃苷，6号峰为异毛蕊花糖苷，7号峰为芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷，8号峰为槲皮素，9号峰为芹菜素），以7号峰（芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷）为参照峰，分别计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示，9个共有峰相对保留时间的RSD为0.43%～1.85%（n=9），相对峰面积的RSD为53.29%～102.30%（n=9），表明不同产地鼠曲草的化学成分含量存在较大差异。以生成的对照指纹图谱为对照，计算各批次鼠曲草药材的相似度。结果显示，10批样品相似度均大于0.90，表明不同产地的鼠曲草药材化学成分一致性较好。

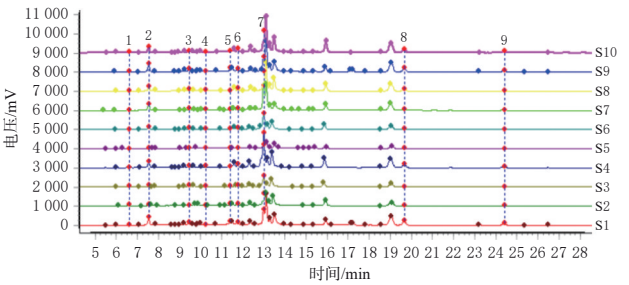


图1　10批鼠曲草药材的共有峰模式

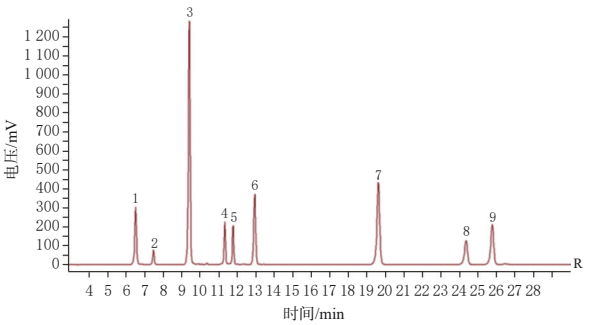


图2　鼠曲草对照指纹图谱R

2.3　10批鼠曲草药材的化学模式识别分析

2.3.1　聚类分析

选择欧氏距离为测度，采用组间连接法进行聚类分析。结果显示，10批样品呈明显的分类趋势，当欧氏距离为20时，10批样品聚为3类，其中S3、S4、S6、S7、S10聚为一类，S2、S5、S8、S9聚为一类，S1聚为一类，结果见图3。

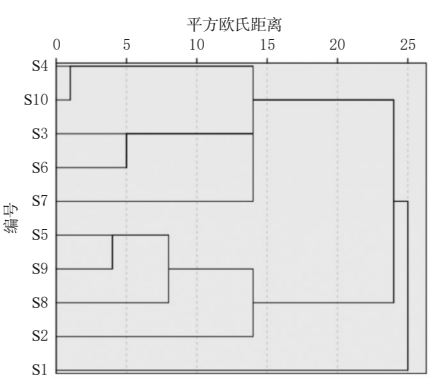


图3　10批鼠曲草药材聚类分析树状图

2.3.2　主成分分析

将10批鼠曲草药材指纹图谱中的9个共有峰数据导入SPSS 21.0软件进行主成分分析，计算得到主成分特征值、累计方差贡献率。结果显示，主成分分析共提取3个特征值大于1的主成分，累计方差贡献率为87.804%，表明提取的前3个主成分可以代表鼠曲草药

材指纹图谱共有峰中大部分的信息。旋转后的成分载荷矩阵反映了各变量对主成分的贡献大小，结果显示，2、3、6、8、9号峰对第1主成分的贡献较大，即绿原酸、咖啡酸、异毛蕊花糖苷、槲皮素、芹菜素对第1主成分影响较大；5、6、8号峰对第2主成分的贡献较大，即金丝桃苷、异毛蕊花糖苷、槲皮素对第2主成分影响较大；1、7号峰对第3主成分贡献较大，即原儿茶酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷对第3主成分影响较大。

将9个共有峰峰面积导入SIMCA 14.0软件进行主成分分析，得到得分散点图（图4），其集中程度与聚类分析结果相符。

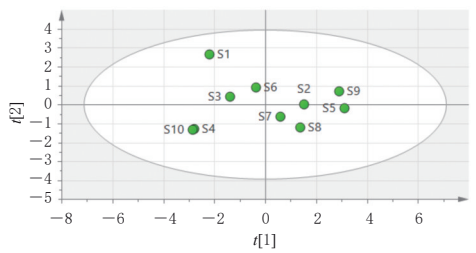


图4　10批鼠曲草药材的主成分分析得分散点图

2.3.3　正交偏最小二乘-判别分析

运用SIMCA 14.0软件对10批鼠曲草药材的9个共有峰峰面积进行正交偏最小二乘-判别分析，得正交偏最小二乘-判别分析模型（图5）。结果显示，模型拟合度R^2Y为0.751，模型预测能力Q^2为0.624，二者均高于0.5，表明模型拟合较好、稳定可靠、预测能力强，可有效判别分析10批鼠曲草药材的质量差异。变量重要性投影（variable importance projection，VIP）结果显示，9个化学成分影响程度由大到小依次为：芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷＞1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸＞绿原酸＞咖啡酸＞槲皮素＞异毛蕊花糖苷＞芹菜素＞金丝桃苷＞原儿茶酸，其中芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷（VIP＝1.460 4）、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸（VIP＝1.247 6）、绿原酸（VIP＝1.114 3）、咖啡酸（VIP＝1.024 7）是影响鼠曲草质量的差异性成分（VIP＞1），可作鼠曲草的潜在质量标志物。这提示应关注鼠曲草中上述成分含量，建立其质量控制体系，以提高产品质量的稳定性与一致性。

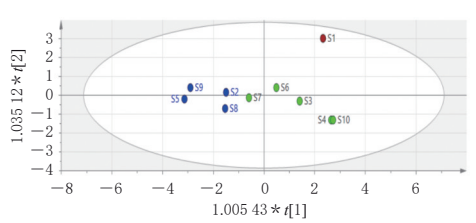


图5　10批鼠曲草药材的正交偏最小二乘-判别分析模型

2.4　4种潜在质量标志物的含量测定

采用HPLC法对“2.3.3”项下所得4种潜在质量标志物（绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷）的含量进行测定。

2.4.1　色谱条件

色谱条件同“2.2.1”项。

2.4.2　混合对照品溶液的制备

取绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷对照品各适量，按“2.2.3”项下方法制成质量浓度分别为1.88、0.48、0.65、4.86 mg/mL的混合对照品溶液。

2.4.3　供试品溶液的制备

制备方法同“2.2.2”项。

2.4.4　专属性试验

取“2.4.2”“2.4.3”项下混合对照品溶液及供试品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图（图略）。结果显示，各成分色谱峰分离良好，提示该方法专属性良好。

2.4.5　线性关系考察

精密吸取“2.4.2”项下混合对照品溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL，分别置于1 mL容量瓶中，用甲醇定容，摇匀制得系列混合溶液。按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，以各差异性成分进样质量浓度为横坐标（X，mg/mL），峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，结果见表2。

表2　4种差异性成分的线性关系考察结果

成分	回归方程	R^2	线性范围/(mg/mL)
绿原酸	$Y=1.674\times10^6X+6.485\times10^4$	0.999	0.188～0.940
咖啡酸	$Y=4.746\times10^7X-3.005\times10^4$	0.999	0.048～0.240
1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸	$Y=3.632\times10^7X+1.183\times10^5$	0.999	0.065～0.325
芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷	$Y=1.084\times10^7X+1.467\times10^5$	0.999	0.486～2.430

2.4.6　精密度试验

取“2.4.3”项下供试品溶液（编号S1），按“2.4.1”项下色谱条件连续进样6次，记录各差异性成分的峰面积。结果显示，绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷峰面积的RSD分别为2.39%、2.91%、2.56%、1.31%（n＝6），表明方法精密度良好。

2.4.7　稳定性试验

取“2.4.3”项下同一供试品溶液（编号S1），分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时，按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积。结果显示，绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷峰面积的RSD分别为2.97%、2.71%、2.89%、0.42%（n＝6），表明该供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4.8　重复性试验

取同一批鼠曲草药材（编号S1）6份，按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积并根据标准曲线计算含量。结果显示，绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷含量的RSD分别为2.95%、1.73%、

1.95%、0.61%（n=6），表明方法重复性良好。

2.4.9　含量测定

取10批鼠曲草药材，按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，记录各差异性成分的峰面积，并根据标准曲线计算绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷的含量，平行测定3次，取平均值。结果见表3。

表3　10批鼠曲草药材中4种差异性成分的含量测定结果（mg/g，n=3）

编号	绿原酸	咖啡酸	1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸	芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷
S1	5.783	0.066	0.036	6.627
S2	2.530	0.044	0.002	2.679
S3	5.283	0.071	0.012	1.464
S4	7.653	0.097	0.012	2.018
S5	0.604	0.023	0.005	0.508
S6	4.644	0.062	0.025	1.092
S7	5.857	0.063	0.001	3.498
S8	1.018	0.057	0.003	1.728
S9	0.070	0.010	0.009	0.608
S10	7.589	0.097	0.013	2.063

3　讨论

鼠曲草作为一种药食两用资源，分布广泛，便于采摘。中药质量标志物能够反映中药材的质量特征，因此近年来在建立质量标准和质量评价方法时常采用中药质量标志物来反映其药效和质量。中药指纹图谱稳定性好、专属性强、整体性高，能够全面反映中药材整体的化学成分信息[10]。基于此，本研究采用网络药理学结合指纹图谱，预测鼠曲草的中药质量标志物，筛选出芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、绿原酸、咖啡酸4种差异性成分为鼠曲草的潜在质量标志物。

3.1　网络药理学预测指标成分

芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、咖啡酸具有抗氧化活性，且起到镇咳和祛痰等作用[11—12]；1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸为咖啡酰基奎尼酸衍生物，具有抗氧化活性和自由基清除活性[13]；槲皮素具有祛痰、止咳作用，并有一定的平喘作用，临床常用于治疗慢性支气管炎[14]；芹菜素的抗氧化性对急性肺损伤具有保护作用[15]。因此，基于网络药理学预测结果，结合现有的研究报道，本研究以原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、金丝桃苷、异毛蕊花糖苷、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、芹菜素为定量控制指标成分，对鼠曲草的质量评价方法展开研究，建立能够体现鼠曲草整体特征的HPLC指纹图谱，研究不同产地鼠曲草的质量差异，为鼠曲草的质量控制提供参考。

3.2　色谱条件的选择

在色谱条件优化方面，本研究比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水等多种流动相及其配比。结果发现，以乙腈-0.1%磷酸为流动相进行梯度洗脱时，基线较平稳，色谱峰分离较好。在多波长（245、254、260、288、310 nm）的对比中，实验发现在310 nm波长处鼠曲草指纹图谱中各色谱峰分离良好，峰数较多，故选择该波长作为检测波长。同时在相同条件下，比较了Diamonsil、Ultimate XB、PLATISIL ODS等C_{18}色谱长柱和短柱，最终确定了以乙腈-0.1%磷酸为流动相，以Diamonsil C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）为色谱柱的液相色谱条件。

3.3　指纹图谱及化学模式识别分析

本研究共指认出10批鼠曲草药材的9个共有峰，与对照指纹图谱的相似度均大于0.9，表明不同产地鼠曲草药材化学成分较为一致。聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘-判别分析结果均显示，湖南衡阳、江西吉安、湖南邵阳、福建闽侯、福建三明产鼠曲草聚为一类，广西桂林、广东梅州、江西宜春、四川达州产鼠曲草聚为一类，广东潮汕产鼠曲草聚为一类。

3.4　质量标志物的筛选及含量分析

本研究共筛选出绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷4种差异性成分为鼠曲草的潜在质量标志物，对其进行含量测定发现，10批鼠曲草药材中绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷的含量分别为0.070～7.653、0.010～0.097、0.001～0.036、0.508～6.627 mg/g。其中，绿原酸含量以江西吉安样品最高，咖啡酸含量以江西吉安及福建三明产地样品最高，1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷含量均以广东潮汕样品最高。由此可知，这些潜在质量标志物可用于区分不同产地的鼠曲草药材，可为该药材质量控制提供参考。

综上所述，本研究整合网络药理学及指纹图谱的方法，筛选出绿原酸、咖啡酸、1，3-*O*-二咖啡酰基奎尼酸、芹菜素7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷作为鼠曲草的潜在质量标志物，其中绿原酸成分含量以江西吉安产鼠曲草最高，咖啡酸成分含量以江西吉安与福建三明产鼠曲草最高，后两种成分含量以广东潮汕产鼠曲草最高。

参考文献

[1] 石青浩，李荣，李书启，等. LC-ESI-MS/MS结合标准品比对鉴定野菜鼠曲草中的黄酮类化合物[J]. 食品研究与开发，2021，42（20）：154-159.
SHI Q H，LI R，LI S Q，et al. Identification of flavonoids from a wild vegetable，*Gnaphalium affine* by LC-ESI-MS/MS coupled with standard comparison method [J]. Food Res Dev，2021，42（20）：154-159.

[2] 苏艺萍，叶向丽，李煌，等. UPLC-MS/MS法同时测定鼠曲草中的咖啡酸、原儿茶酸和绿原酸[J]. 国际药学研

究杂志，2020，47(11)：1001-1005.
SU Y P，YE X L，LI H，et al. Simultaneous determination of caffeic acid，protocatechuic acid and chlorogenic acid in *Gnaphalium affine* by UPLC-MS/MS[J]. J Int Pharm Res，2020，47(11)：1001-1005.

[3] MENG X W，HE C X，CHEN X，et al. The extract of *Gnaphalium affine* D. Don protects against H_2O_2-induced apoptosis by targeting PI3K/AKT/GSK-3β signaling pathway in cardiomyocytes[J]. J Ethnopharmacol，2021，268：113579.

[4] 苏艺萍，李煌，褚克丹，等. UPLC-MS/MS法同时测定鼠曲草中的5个黄酮类化合物[J]. 福建中医药，2021，52(5)：38-41.
SU Y P，LI H，CHU K D，et al. Simultaneous determination of five flavonoids in *Gnaphalium affine* by UPLC-MS/MS[J]. Fujian J Tradit Chin Med，2021，52(5)：38-41.

[5] 叶向丽，李煌. 鼠曲草的活性成分治疗呼吸系统疾病的靶点探讨[J]. 海峡药学，2019，31(4)：24-27.
YE X L，LI H. Study on the therapeutic targets of active components from *Gnaphalium affine* in the treatment of respiratory diseases[J]. Strait Pharm J，2019，31(4)：24-27.

[6] 郑梦迪，刘静，张寒，等. 基于psbA-trnH分子标记的鼠曲草属植物鉴定[J]. 时珍国医国药，2020，31(6)：1383-1386.
ZHENG M D，LIU J，ZHANG H，et al. Identification of *Gnaphalium* Herbs based on psbA-trnH molecular markers [J]. Lishizhen Med Mater Med Res，2020，31(6)：1383-1386.

[7] 李融. 秋鼠曲草、龙利叶和黄芩三种植物的化学成分及抗急性肺损伤活性研究[D]. 苏州：苏州大学，2019.
LI R. Study on the chemical composition and anti-acute lung injury activities of *Gnaphalium hypoleucum Sauropus spatulifolius* and *Scutellaria baicalensis*[D]. Suzhou：Soochow University，2019.

[8] 王延涛，杨智华，陈怡，等. 肉苁蓉治疗骨质疏松作用机制的网络药理学研究[J]. 中国药房，2019，30(5)：645-651.
WANG Y T，YANG Z H，CHEN Y，et al. Network pharmacology exploration of the mechanism of *Cistanche deserticola* in the treatment of osteoporosis[J]. China Pharm，2019，30(5)：645-651.

[9] 王超，陈芳，胡凯淞，等. 蒲公英总黄酮对烟草烟雾致慢性阻塞性肺疾病的抗氧化保护作用及机制[J]. 国际老年医学杂志，2023，44(3)：257-264.
WANG C，CHEN F，HU K S，et al. Antioxidant protective effect and mechanism of total flavonoids from dandelion on cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease[J]. Int J Geriatr，2023，44(3)：257-264.

[10] 卢广英，邢训颜，王嘉昀，等. 经典名方参苓白术散的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志，2022，47(19)：5171-5181.
LU G Y，XING X Y，WANG J Y，et al. Research progress of Shenling Baizhu San and predictive analysis on its quality markers[J]. China J Chin Mater Med，2022，47(19)：5171-5181.

[11] 刘艳，荣晓惠，谭金燕，等. 洋金花叶中黄酮类和生物碱类化学成分研究[J]. 中草药，2021，52(14)：4141-4152.
LIU Y，RONG X H，TAN J Y，et al. Chemical constituents of flavonoids and alkaloids from leaves of *Datura metel*[J]. Chin Tradit Herb Drugs，2021，52(14)：4141-4152.

[12] 周向军，邹亚丽，孙文媛，等. 咖啡酸与牛血红蛋白的相互作用及抗氧化研究[J]. 食品研究与开发，2022，43(11)：109-117.
ZHOU X J，ZOU Y L，SUN W Y，et al. Interaction of caffeic acid with bovine hemoglobin and its antioxidation effects[J]. Food Res Dev，2022，43(11)：109-117.

[13] 李胜男，曹坦，刘雅萍. 药用植物中咖啡酰奎宁酸类化合物的研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2023，32(7)：45-51.
LI S N，CAO T，LIU Y P，et al.Research progress of caffeoylquinic acid compounds in medicinal plants[J].Chin J Ethnomed Ethnopharm，2023，32(7)：45-51.

[14] 舒心，郭擎，高彦祥. 槲皮素及其递送体系的研究进展[J]. 食品科学，2022，43(7)：202-212.
SHU X，GUO Q，GAO Y X. Progress in research on quercetin and its delivery systems[J]. Food Sci，2022，43(7)：202-212.

[15] 颜美秋，苏洁，俞静静，等. 铁皮石斛醇提取物对复合饮食因素所致代谢性高血压大鼠的作用及物质基础研究[J]. 中国中药杂志，2019，44(22)：4896-4904.
YAN M Q，SU J，YU J J，et al. Effects and active substances of ethanol extract from *Dendrobium officinale* on metabolic hypertensive rats induced by comprehensive dietary[J]. China J Chin Mater Med，2019，44(22)：4896-4904.

（收稿日期：2023-07-03　修回日期：2023-11-28）
（编辑：舒安琴）