

# 基于谱效关系的藏药材全缘叶绿绒蒿全草（非花入药部位）抗氧化质量标志物初步研究

黄艳菲<sup>1,4</sup>, 蔡旭<sup>2</sup>, 冉波<sup>3</sup>, 李文兵<sup>1,4</sup>, 杨正明<sup>1,4</sup>, 张绍山<sup>1,4</sup>, 刘圆<sup>1,4\*</sup>

1. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610041
2. 清华大学工程物理系教育部粒子与辐射成像重点实验室, 北京 100084
3. 成都格利普生物科技有限公司, 四川 成都 611130
4. 西南民族大学四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225

**摘要:** 目的 建立基于谱效关系的藏药材全缘叶绿绒蒿 *Meconopsis integrifolia* 全草（非花入药部位）（HMI）的质量标志物研究方法，为其质量控制提供依据。方法 测定 10 批次 HMI 提取物的 UPLC 指纹图谱、UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 法对化学成分进行指认，测定 10 批样品的总抗氧化能力、ABTS 自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力、超氧阴离子自由基抑制能力，采用主成分分析法筛选能更大程度反映 HMI 提取物的抗氧化能力指标，采用灰色关联度法关联抗氧化能力指标与指纹图谱共有峰的相关性，综合分析筛选质量标志物，HSCCC 法分离鉴定所筛选化学成分的结构。结果 从 HMI 提取物指纹图谱确定了 29 个共有峰，UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 法指认了样品中的 18 种化学成分，包括 16 种黄酮类成分和 2 种生物碱类成分；主成分分析法筛选出 DPPH 清除能力能更大程度反映 HMI 提取物的抗氧化能力；灰色关联度分析表明 29 个共有峰与 DPPH 清除能力的关联度均大于 0.5，综合分析确认槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷和槲皮素-3-O-[2'''-O-乙酰基-β-D-半乳糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷] 作为 HMI 的质量标志物，其中槲皮素-3-O-[2'''-O-乙酰基-β-D-半乳糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷] 为新化合物。结论 基于谱效关系的 HMI 质量标志物的研究，对阐明药效物质基础、筛选与药效相关的核心质量标志物，保证药材质量的可控性和合理应用有重要意义。

**关键词:** 全缘叶绿绒蒿全草（非花入药部位）；UPLC；质量标志物；谱效关系；黄酮

中图分类号：R286.2 文献标志码：A 文章编号：0253-2670(2020)17-4521-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.021

## Preliminary discovery of quality marker of herb *Meconopsis integrifolia* (non flower parts) based on spectrum-effect relationship

HUANG Yan-fei<sup>1,4</sup>, CAI Xu<sup>2</sup>, RAN Bo<sup>3</sup>, LI Wen-bing<sup>1,4</sup>, YANG Zheng-ming<sup>1,4</sup>, ZHANG Shao-shan<sup>1,4</sup>, LIU Yuan<sup>1,4</sup>

1. Ethnic Medicine Institute, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China
2. Key Laboratory of Particle & Radiation Imaging, Ministry of Education, Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
3. Chengdu Gelipu Biotechnology Co., Ltd, Chengdu 611130, China
4. Sichuan Provincial Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering Laboratory, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China

**Abstract: Objective** To establish a study method for discovering quality marker of herb *Meconopsis integrifolia* (Non flower parts) based on spectrum-effect relationship for its quality control. **Methods** UPLC fingerprints and UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS method were used to identify the chemical components of 10 batches of HMI extracts. The total antioxidant capacity, ABTS free radical scavenging ability, DPPH free radical scavenging ability and superoxide anion free radical suppression ability of 10 batches of sample were determined. Principal component analysis was used to screen antioxidant capacity index for HMI. Grey relational analysis was used to analyze the correlation between antioxidant capacity index and common peak of fingerprint spectrum. Then, quality marker

收稿日期：2020-01-13

基金项目：国家重点研发计划“哈萨克医、彝医、羌医防治脊柱退行性疾病和痛风研究”（2018YFC1708005）；西南民族大学中央高校平台建设项目（2020PTJS26002）

作者简介：黄艳菲，女，博士，从事民族药物研究。Tel: (028)85523352 E-mail: 47118549@qq.com

\*通信作者 刘圆，女，博士，教授，博士生导师，从事民族药物研究。Tel: (028)85523352 E-mail: 499769896@qq.com

could be preliminarily discovered by comprehensive analysis associated with antioxidant capacity index and efficacy-related constituents. Finally, the constituents were separated by HSCCC. **Results** A total of 29 common peaks were identified from fingerprints of HMI extracts. 18 constituents were identified by UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS analysis, including 16 flavonoids and two alkaloids. DPPH scavenging ability was screened by principal component analysis which could reflect the antioxidant capacity of HMI extracts. Grey relational analysis showed that the correlations between the 29 common peaks and DPPH scavenging ability were all greater than 0.5. The quality markers of HMI were quercetin 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside and quercetin 3-*O*-[2'''-*O*-acetyl- $\beta$ -*D*-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside] by comprehensive analysis. Among them, quercetin 3-*O*-[2'''-*O*-acetyl- $\beta$ -*D*-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside] is a new compound. **Conclusion** Study on the quality marker of HMI based on the spectrum-effect relationship is of great significance for elucidating the pharmacodynamic material basis, screening core quality marker related to medicinal effect, and ensuring the safety and rational application of traditional medicines.

**Key words:** Herb *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch (Non flower parts); UPLC; quality marker; spectrum-effect relationship; flavonoids

传统药物的质量控制是传统药物现代化发展的关键问题之一<sup>[1]</sup>, 但由于传统药物化学成分的多源性、复杂性和质量的不稳定性等因素, 使得质量控制研究一直是研究者面对的难点问题。中药质量标志物 (Q-marker) 概念和理论的提出<sup>[2]</sup>, 为传统药物科学、合理的质量控制提供了理论依据和研究方向。全缘叶绿绒蒿 *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch 为传统藏药材, 具有悠久的使用历史和广泛的应用, 《晶珠本草》记载其为“欧贝”类绿绒蒿的来源之一, 分花和全草入药, 具有“清肝热、肺热”作用<sup>[3-4]</sup>。研究表明, 绿绒蒿属药用植物的主要化学成分为生物碱和黄酮类成分<sup>[5-6]</sup>, 其中绿绒蒿总黄酮具有很好的肝损伤保护、抗炎等作用, 而生物碱具有很好的镇痛、抗炎作用<sup>[7-8]</sup>。由于花的产量非常低, 藏医临床和藏成药多用于重症或者急症; 藏医临床和藏成药常用产量较高的全缘叶绿绒蒿全草 (非花入药部位) (HMI) 入药, 但是其哪些成分起主要药效仍未得到阐明。更为重要的是, HMI 的质量控制中尚未找到指标性成分。因此, 为了藏医临床和藏成药中能够有效、可控、安全使用产量较高的 HMI, 需阐明其药效物质和筛选与其药效密切相关的质量评价标志物。

研究表明, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 引发的氧化应激是多种肝病的共同病理生理基础<sup>[9]</sup>。病肝组织中过剩的 ROS 可能来源于肝细胞线粒体呼吸链复合体利用电子传递生成 ATP、细胞色素 P4502E1 和过氧化物酶体的诱导引起代偿性脂肪酸氧化, 过剩的铁和过氧化氢反应生成 OH $\cdot$ 也可能是肝病氧化应激的原因之一, 过量的 ROS 通过多种途径与细胞因子共同作用引起不同程度的肝损伤<sup>[10]</sup>。因此, 推测 HMI 的抗氧化活性与其肝损伤保护作用具有密切关系。

本研究采用谱效关系的研究方法, 通过建立 HMI 提取物指纹图谱并确定共有峰, UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 法分析 HMI 提取物的化学成分组成, 将指纹图谱的共有峰与抗氧化结果进行主成分分析和灰色关联度分析, 建立谱-效模型, 筛选 HMI 中具有抗氧化活性的成分, 进而采用高速逆流色谱 (HSCCC) 法分离可作为质量标志物的成分, 鉴定化合物结构, 为研究 HMI 药材的药效物质基础、质控指标的筛选提供科学依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 仪器

Waters Quattro Premier XE 液质联用仪, 美国 Waters 公司; Waters Acquity 超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; TU-1950 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 高速逆流色谱仪, 包括 AKTA-Prime 溶剂泵系统, 美国 GE 公司, TBE-300B 半制备型高速逆流色谱主机, 上海同田生化技术有限公司; IKA RV10 旋转蒸发仪, 德国 IKA 公司; Telstar LyoQuest 冷冻干燥机, 西班牙 Telstar 公司; Sartorius BT 25 S 十万分之一电子天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司。

### 1.2 材料与试剂

槲皮素-3-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷 (自制, 质量分数为 98%); 异槲皮苷 (批号 MUST-15070211), 质量分数 99%, 成都曼斯特生物科技有限公司; 槲皮素 (批号 100081-200907), 质量分数 96%, 中国食品药品检定研究院; 芦丁 (批号 100080-201408), 质量分数为 92%, 中国食品药品检定研究院; 没食子酸 (批号 MUST-13040103), 质量分数为 98%, 成都曼斯特生物科技有限公司; DPPH, 梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 福林-酚试剂 (1N), 北京 Solarbio 科技有限公司;

抗坏血酸 (VC), 广东光华科技股份有限公司; 2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT), 成都市科龙化工试剂厂; 2,4,6-三 (2-吡啶基)-1,3,5 三嗪 (TPTZ), 北京百灵威科技有限公司; ABTS, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 抗超氧阴离子试剂盒, 南京建成生物工程研究所; HPLC 级乙腈, Sigma 公司; HPLC 级冰醋酸, 天津科密欧化学试剂有限公司; D-葡萄糖 (批号 17042604)、D-半乳糖 (批号 17042706)、D-甘露糖 (批号 19112803), 质量分数均大于 98%, 成都格利普生物科技有限公司; 碳酸钠、氯化铝、过硫酸钾、硫酸亚铁、氯化铁、盐酸、氢氧化钠、醋酸钠、醋酸乙酯、正丁醇为国产分析纯; 水为蒸馏水, 屈臣氏公司。

HMI 提取物为自制, 采用课题组前期优化的大孔树脂富集纯化绿绒蒿总黄酮的方法制备提取物, 全缘叶绿绒蒿 *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch 全草 (非花入药部位) 样品均来自四川省, 经西南民族大学刘圆教授鉴定, 具体信息见表 1。

表 1 HMI 样品采集信息

Table 1 Sample information of *M. integrifolia*

样品编号	采集地点	采集时间
S1	阿坝州红原县阿木乡龙让沟	2015-06
S2	阿坝州小金县夹金山	2015-06
S3	阿坝州汶川县卧龙特区巴郎山	2015-06
S4	甘孜州康定县折多山	2014-08
S5	阿坝州小金县汗牛乡	2015-08
S6	甘孜州康定县雅家埂虫草基地	2014-06
S7	甘孜州康定县雅家埂山顶	2014-06
S8	阿坝州小金县美沃乡	2014-05
S9	甘孜州康定县折多山二台子	2014-06
S10	甘孜州康定县折多山垭口	2015-07

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液的制备

取药材粉末约 20 g, 加 8 倍体积的 70% 乙醇, 热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 过滤, 合并滤液, 45 °C 减压回收溶剂, 残渣用适量蒸馏水溶出, 冷冻干燥成浸膏干粉, 保存于 4 °C 冰箱中备用。

**2.1.1 抗氧化试验供试品溶液** 精密称取 50 mg 浸膏干粉, 50% 乙醇溶解, 定容至 50 mL 量瓶, 得质量浓度 1.0 mg/mL 的供试品溶液, 保存于 4 °C 冰箱中备用。

**2.1.2 指纹图谱供试品溶液** 精密称取 25 mg 浸膏干粉, 50% 甲醇溶解, 定容至 25 mL 量瓶, 制成质量浓度 1.0 mg/mL 供试品溶液, 保存于 4 °C 冰箱

中备用。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取槲皮素 -3-O-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷、槲皮素、异槲皮苷适量, 加甲醇溶解, 得含槲皮素 -3-O-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷、槲皮素、异槲皮苷质量浓度分别为 0.2、0.1、0.2 mg/mL 对照品溶液。

### 2.3 UPLC 指纹图谱的建立

**2.3.1 色谱条件和质谱条件** 色谱柱: Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈 (A) -0.1% 冰醋酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 4%~14% A; 10~20 min, 14%~16% A; 20~30 min, 16%~25% A; 30~35 min, 25%~60% A; 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 210~400 nm, 进样量 2 μL。

离子源为 ESI 源, 正离子检测模式, 质量扫描范围 *m/z* 100~1 000, 离子源温度 100 °C, 毛细管电压 2.8 kV, 脱溶剂温度 250 °C, 脱溶剂气体流速 500 L/h, 锥孔电压 25 kV, 锥孔气流量 40 L/h。

质谱数据采用 MarkerLynx 4.0 软件分析。

**2.3.2 指纹图谱测定** 将 10 批 HMI 提取物按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项中的色谱条件进行色谱分析, 建立 UPLC 指纹图谱。

### 2.4 酚类化合物的含量测定

**2.4.1 总黄酮含量测定** 总黄酮的测定参考郑媛媛等<sup>[11]</sup>的方法。在 10 mL 离心管中加入 0.15 mL 供试品溶液 (其中样品 S4 和 S5 因含量较低, 取样量为 0.30 mL), 加入 2.5 mL 质量分数为 1% AlCl<sub>3</sub> 溶液, 加入适量 70% 乙醇使反应体系体积为 5.0 mL, 室温反应 1 h, 反应结束后于 415 nm 处测定吸光度 (A) 值。配制质量浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁母液, 取 100、200、300、400、500、600 μL 芦丁母液, 按照上述方法测定 A 值, 绘制标准曲线。总黄酮含量以芦丁计, 以每克浸膏干粉中芦丁的含量表示。

**2.4.2 总多酚测定** 总多酚的测定参考房祥军等<sup>[12]</sup>建立的方法, 采用 Folin-Ciocalteu 法测定。在 10 mL 离心管中加入 0.15 mL 供试品溶液 (其中样品 S4 和 S5 因含量较低, 取样量为 0.30 mL), 加入 1.5 mL 福林-酚溶液和 2.0 mL 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 补充蒸馏水使反应体系体积为 5.0 mL, 室温避光反应 1 h, 反应结束后于 771 nm 处测定 A 值。配制质量浓度为 0.501 mg/mL 的没食子酸母液, 取 100、150、200、250、300、350、400 μL 没食子

酸母液,按照上述方法测定 A 值,绘制标准曲线。总多酚含量以没食子酸计,以每克浸膏干粉中没食子酸的含量表示。

## 2.5 体外抗氧化能力测定

**2.5.1 总抗氧化能力测定** 总抗氧化能力测定参考 Benzie 等<sup>[13]</sup>建立的 FRAP 法。TPTZ 工作液由 10 mmol/L TPTZ、20 mmol/L FeCl<sub>3</sub> 和 pH 3.6 醋酸盐缓冲液溶液按 10:1:1 组成,现用现配。取 1.5 mL 供试品溶液和 1.5 mL TPTZ 工作液于比色管中,混合均匀后于 37 °C 水浴反应 20 min,测定 593 nm 处 A 值。配制质量浓度为 2.78 mg/mL 的 FeSO<sub>4</sub> 母液,依次稀释成 27.800、13.900、6.950、3.475、1.737 5 μg/mL 的对照品稀释液,按照上述方法测定 A 值,绘制标准曲线。以 Fe<sup>3+</sup>-TPTZ 被还原成 Fe<sup>2+</sup>-TPTZ 形式的蓝色物质的生成量表示总抗氧化能力。

**2.5.2 ABTS 自由基清除能力** 参考 Zhou 等<sup>[14]</sup>建立的方法。ABTS 工作液配制:由等体积 7 mmol/L 的 ABTS 水溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾水溶液混合后,室温避光反应 16 h,以 80%乙醇稀释,当 734 nm 处 A 值为 0.700±0.005 时,得 ABTS 工作液。将供试品溶液稀释成 3.125、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 μg/mL 的溶液,取 0.4 mL 各浓度样品溶液和 2.6 mL ABTS 工作液,37 °C 避光反应 30 min,测定 734 nm 处 A 值。以 70%乙醇作为空白溶液代替样品作为空白,同时以 70%乙醇作为空白对照,以 Vc 和 BHT 为阳性对照,清除率按下式计算:

$$\text{清除率} = \frac{A_s - A_t}{A_s - A_0}$$

A<sub>s</sub> 为空白溶液,即 70%乙醇加 DPPH 的 A 值;A<sub>t</sub> 为样品溶液和 DPPH 反应后的 A 值;A<sub>0</sub> 为空白对照的 A 值

**2.5.3 DPPH 自由基清除能力** 参考 Zhou 等<sup>[14]</sup>建立的方法。供试品溶液稀释浓度同“2.5.2”项下的稀释方法,取 0.4 mL 各质量浓度样品溶液和 2.6 mL 0.007 1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液,37 °C 避光反应 1 h,测定 517 nm 处 A 值。以 70%乙醇作为空白溶液,以无水乙醇作为空白对照,以 VC 和 BHT 为阳性对照,清除率按“2.5.2”项下的公示计算。

**2.5.4 抑制超氧阴离子自由基能力** 按“抗超氧阴离子自由基及产生超氧阴离子自由基试剂盒”说明书操作步骤进行试验。

## 2.6 HSCCC 分离条件

采用课题组前期建立的分离全缘叶绿绒蒿花化

学成分的方法<sup>[15]</sup>。以醋酸乙酯-正丁醇-水(2:3:5)为溶剂体系,按比例混匀后以上相作为固定相,下相作为流动相,将 HMI 提取物适量溶于 20 mL 下相中,备用。高速逆流色谱仪转速 900 r/min,体积流量 2.0 mL/min,紫外检测器波长 254 nm,循环水浴温度 35 °C,固定相保留率为 46%。

## 3 结果与分析

### 3.1 HMI 的指纹图谱

**3.1.1 方法学考察** 对实验方法进行精密度、稳定性、重复性考察,结果测试样品色谱图相似度 RSD 均小于 3%,符合分析要求。

**3.1.2 UPLC 指纹图谱** 10 批 HMI 提取物样品按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件,对指纹图谱进行处理,结果见图 1。以 HMI 提取物指纹图谱的共有模式作为匹配依据,进行相似度评价,结果见表 2。

确定了 29 个共有峰,共有峰与对照指纹图谱的相关系数均大于 0.90,表明共有峰具有代表性,能够标示成分特征。通过与对照品比对,23 号峰为槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷,29 号峰为槲皮素。

### 3.2 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 法鉴别 HMI 提取物中的主要成分

对采集于康定县折多山二台子的 S9 号样品进行 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析,正离子模式基峰色谱图见图 2。结合对照品保留时间、对照品质谱裂解规律、文献数据比对等方法指认化学成分,从样品质谱数据中共指认 18 种化学成分,包括 16 种黄酮类成分和 2 种生物碱类成分,结果见表 3。

通过对照品对照,确定保留时间(RT)13.6 min 的峰(M2)为槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷,RT 为 31.3 min 的峰为槲皮素(M18),RT 为 18.4 min 的峰(M8)通过提取离子的方式,与异槲皮苷对照品保留时间比对,确认为异槲皮苷。此外,通过与课题组前期已确认主要成分的全缘叶绿绒蒿花的提取物在相同色谱条件下分析,结合质谱数据,确认 RT 为 15.1 min 的峰(M3)为槲皮素-3-O-[2'''-O-乙酰基-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷],RT 为 16.1 min 的峰(M5)为槲皮素-3-O-[3'''-O-乙酰基-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷],RT 为 16.5 min 的峰(M6)为槲皮素-3-O-[6'''-O-乙酰基-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-

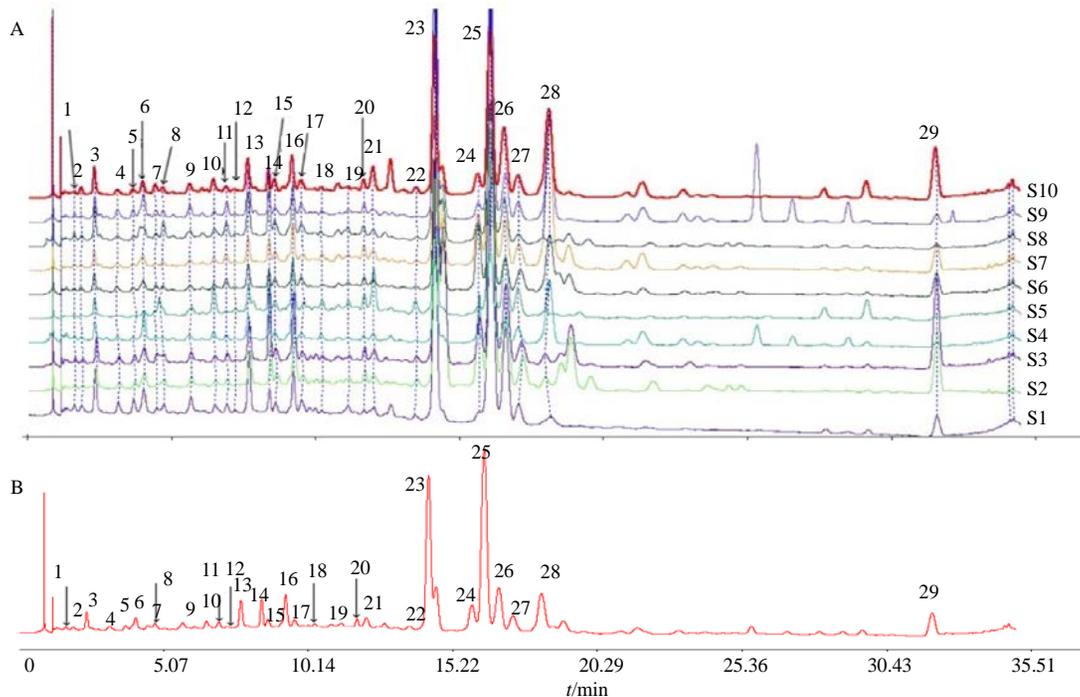


图 1 HMI 提取物的 UPLC 指纹图谱 (A) 和对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 UPLC fingerprint of herb *M. integrifolia* (non flower parts) extracts (A) and reference (B)

表 2 HMI 提取物指纹图谱相似度结果

Table 2 Fingerprint similarities results of herb *M. integrifolia* (non flower parts) extracts

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000										
S2	0.849	1.000									
S3	0.795	0.941	1.000								
S4	0.793	0.741	0.760	1.000							
S5	0.969	0.844	0.788	0.791	1.000						
S6	0.895	0.923	0.861	0.892	0.874	1.000					
S7	0.868	0.821	0.759	0.935	0.841	0.962	1.000				
S8	0.855	0.877	0.949	0.801	0.840	0.854	0.774	1.000			
S9	0.900	0.839	0.830	0.954	0.868	0.938	0.948	0.875	1.000		
S10	0.845	0.835	0.852	0.947	0.843	0.929	0.942	0.836	0.936	1.000	
对照指纹图谱	0.939	0.937	0.920	0.902	0.924	0.973	0.936	0.929	0.963	0.947	1.000

葡萄糖苷]。其他所指认的黄酮类成分通过与槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷的质谱数据对比和推测确认。

生物碱类成分的指认通过 RT 为 19.0 min 的白屈菜碱 (M9) 的解析进行说明。正离子模式一级质谱中, 可见其准分子离子峰  $m/z$  354.13  $[M+H]^+$ , 预测分子式为  $C_{20}H_{19}NO_5$ 。二级质谱中,  $m/z$  354.13 丢失 1 分子  $H_2O$ , 产生  $m/z$  336.12  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  354.13 也能丢失 1 分子  $H_2O$  和  $H_2$  产生  $m/z$  334.09  $[M+H-H_2O-H_2]^+$ 。 $m/z$  336.12 失去  $C_2H_5N$ , 生成  $m/z$  293.09  $[M+H-C_2H_5N]^+$ 。 $m/z$  334.09 失去

$CH_3N$ , 生成  $m/z$  305.08  $[M+H-CH_3N]^+$ 。此外,  $m/z$  354.13 可发生开环, 生成  $m/z$  206.09, 结合文献<sup>[6]</sup>和研究数据<sup>[16]</sup>, 推测该成分为白屈菜碱。白屈菜碱正离子模式可能的质谱裂解途径见图 3。

### 3.3 体外抗氧化活性研究

10 批 HMI 提取物总黄酮、总多酚含量以及体外抗氧化试验结果见表 4。不同批次的 HMI 提取物中有较高含量的黄酮类和多酚类化合物, 都具有很强的体外抗氧化活性, 但提取物中各化合物的含量高低、成分差异与抗氧化活性有何关联, 以谱效关系进行研究。

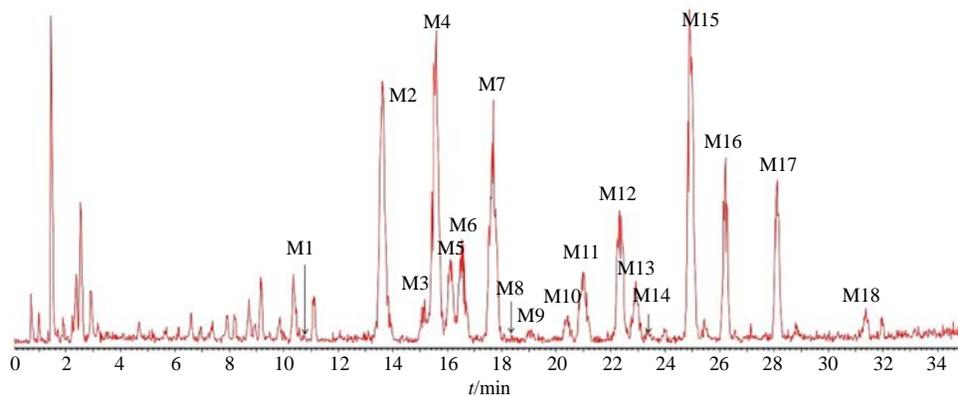


图 2 HMI 提取物 BPC 图

Fig. 2 Base peak chromatogram of herb *M. integrifolia* (non flower parts) extracts

表 3 HMI 提取物 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 化学成分鉴定结果

Table 3 Identification of compounds in herb *M. integrifolia* (non flower parts) extracts by UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

编号	$t_R$ /min	分子式	准分子离子	测量值( $m/z$ )	计算值( $m/z$ )	误差( $\times 10^{-6}$ )	不饱和度	化合物	二级质谱主要碎片离子
M1	10.35	$C_{23}H_{23}NO_4$	$[M+H]^+$	342.1728	342.1705	6.6	10.0	木兰花碱	296, 282, 279, 265, 237, 222, 209, 191, 181, 162
M2 (P23)	13.62	$C_{27}H_{31}O_{17}$	$[M+H]^+$	627.1581	627.1561	3.1	13.0	槲皮素-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖苷	303, 273, 247, 187, 163, 145, 127
M3 (P24)	15.11	$C_{29}H_{32}O_{18}$	$[M+H]^+$	669.1636	669.1667	-4.6	14.0	槲皮素-3-O-[2''-O-乙酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖苷]	303, 229, 205, 187, 169, 145, 127
M4 (P25)	15.59	$C_{29}H_{32}O_{18}$	$[M+H]^+$	669.1686	669.1667	2.9	14.0	槲皮素-3-O-[2''-O-乙酰基- $\beta$ -D-半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖苷]	303, 205, 187, 145, 127
M5 (P26)	16.07	$C_{29}H_{32}O_{18}$	$[M+H]^+$	669.1651	669.1667	-2.4	14.0	槲皮素-3-O-[3''-O-乙酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖苷]	303, 205, 187, 169, 145, 127
M6 (P27)	16.54	$C_{29}H_{32}O_{18}$	$[M+H]^+$	669.1655	669.1667	-1.8	14.0	槲皮素-3-O-[6''-O-乙酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖苷]	303, 205, 187, 145, 127
M7 (P28)	17.69	$C_{31}H_{34}O_{19}$	$[M+H]^+$	711.1782	711.1773	1.3	15.0	槲皮素-二乙酰基-二葡萄糖	303, 247, 229, 205, 187, 169, 127
M8	18.36	$C_{21}H_{31}O_{12}$	$[M+H]^+$	465.1015	465.1033	-3.9	12.0	异槲皮苷	303
M9	18.99	$C_{29}H_{31}NO_5$	$[M+H]^+$	354.1335	354.1341	-1.8	12.0	白屈菜碱	336, 334, 305, 293, 275, 267, 248, 206, 188
M10	20.37	$C_{31}H_{34}O_{19}$	$[M+H]^+$	711.1804	711.1773	4.4	15.0	槲皮素-二乙酰基-二葡萄糖	303, 247, 229, 187, 169, 127
M11	21.00	$C_{31}H_{34}O_{19}$	$[M+H]^+$	711.1768	711.1773	-0.6	15.0	槲皮素-二乙酰基-二葡萄糖	303, 187
M12	22.32	$C_{31}H_{34}O_{19}$	$[M+H]^+$	711.1791	711.1773	2.6	15.0	槲皮素-二乙酰基-二葡萄糖	303, 247, 229, 187, 169, 127
M13	22.92	$C_{31}H_{34}O_{19}$	$[M+H]^+$	711.1779	711.1773	0.9	15.0	槲皮素-二乙酰基-二葡萄糖	303, 227, 127
M14	23.32	$C_{31}H_{34}O_{19}$	$[M+H]^+$	711.1814	711.1773	5.8	15.0	槲皮素-二乙酰基-二葡萄糖	303, 247, 187
M15	24.96	$C_{33}H_{38}O_{20}$	$[M+H]^+$	753.1870	753.1878	-1.1	16.0	槲皮素-三乙酰基-二葡萄糖	303, 229, 169, 127
M16	26.21	$C_{33}H_{38}O_{20}$	$[M+H]^+$	753.1916	753.1878	5.0	16.0	槲皮素-三乙酰基-二葡萄糖	303, 229, 187, 169, 127
M17	28.12	$C_{33}H_{38}O_{20}$	$[M+H]^+$	753.1870	753.1878	-1.1	16.0	槲皮素-三乙酰基-二葡萄糖	303, 229, 169
M18 (P29)	31.33	$C_{15}H_{10}O_7$	$[M+H]^+$	303.0495	303.0505	-3.2	11.0	槲皮素	274, 257, 229, 201, 165, 153, 137, 127, 121

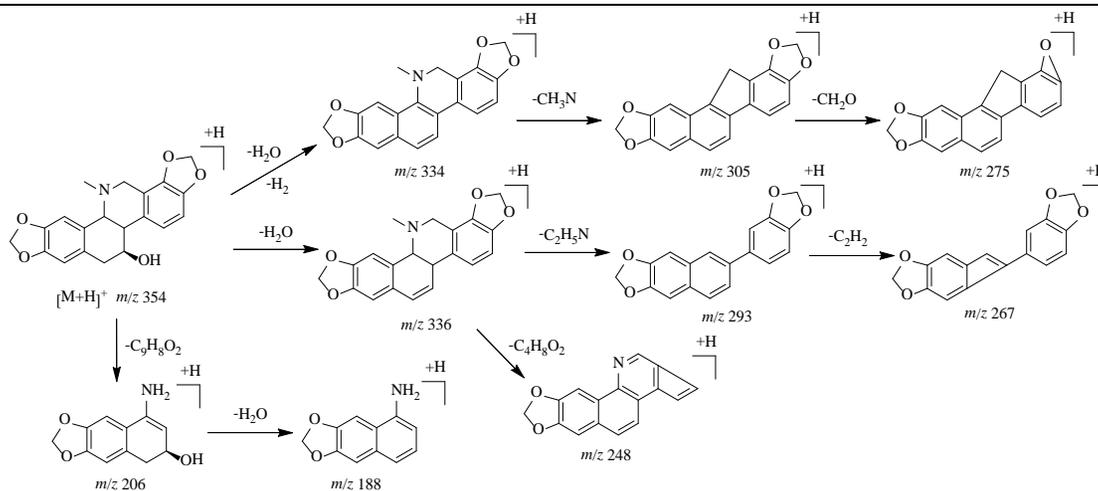


图 3 白屈菜碱正离子模式可能的裂解途径

Fig. 3 Proposed fragmentation pathways in positive ion mode of chelidonium

表 4 HMI 提取物体外抗氧化能力测定结果

Table 4 Antioxidant capacity of herb *M. integrifolia* (non flower parts) extracts *in vitro*

样品编号	总黄酮/(mg·g <sup>-1</sup> )	总多酚/(mg·g <sup>-1</sup> )	总抗氧化能力/(mg·mL <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> /ABTS(μg·mL <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> /DPPH(μg·mL <sup>-1</sup> )	抑制超氧阴离子自由基/(U·g <sup>-1</sup> )
S1	560.2±36.0	465.0±10.5	13.00±0.20	18.7	24.7	127.4±11.7
S2	850.0±29.1	561.9±17.9	13.20±0.00	16.6	21.3	130.4± 5.4
S3	630.4±30.3	485.4±18.3	12.00±0.20	20.5	27.1	121.6± 2.8
S4	250.2± 7.4	223.6±10.2	5.80±0.10	36.3	69.4	110.0± 5.1
S5	307.6± 1.6	314.9± 7.7	9.90±0.02	23.7	38.9	114.2± 5.3
S6	449.8±19.3	354.9±18.1	8.50±0.10	31.3	41.4	119.4± 6.8
S7	702.4±15.1	441.4± 3.3	12.40±0.20	24.2	32.0	118.1±14.4
S8	432.2±29.7	425.1± 2.0	12.40±0.10	31.0	40.4	127.2±14.3
S9	610.6±14.7	406.9± 4.4	11.60±0.04	25.0	33.0	125.3±14.2
S10	371.0± 3.2	437.2± 2.0	12.00±0.04	23.9	31.6	110.5±25.9

### 3.4 谱效学研究与活性物质筛选

**3.4.1 主成分分析 (principal component analysis, PCA)** 总抗氧化能力 (X<sub>1</sub>)、ABTS 自由基清除能力 (X<sub>2</sub>)、DPPH 自由基清除能力 (X<sub>3</sub>) 和抑制超氧阴离子自由基能力 (X<sub>4</sub>) 作为抗氧化活性的评价指标, 存在一定的相关性, 因此, 可通过 PCA 进行降维处理, 重新组合成 1 个综合指标来代替原有的 4 个指标<sup>[17]</sup>。采用 SPSS 19.0 软件进行 PCA, 主成分方差和初始因子载荷矩阵结果见表 5、6。分析结果表明, 主成分 1 的贡献率已达到 80.31%, 可用主成

分 1 作为新变量代替原有的 4 个变量。在初始因子载荷矩阵中, 载荷量表示与主成分对应变量的相关系数, 由载荷矩阵数据与主成分对应的特征值可计算出主成分中每个指标所对应的系数, 得出主成分 1 的模型:  $F_1 = -0.53 X_1 + 0.50 X_2 + 0.54 X_3 - 0.42 X_4$ ; 其中,  $F_1$  表示主成分 1, 各指标的系数绝对值越大, 说明其对主成分的影响越大, 因此, 可以确定影响主成分的指标为 X<sub>3</sub>, 即 DPPH 自由基清除能力可较大程度地反映 HMI 提取物的抗氧化能力强弱。

表 5 体外抗氧化指标 PCA 各主成分贡献率

Table 5 Contribution rate in PCA of antioxidant activity *in vitro*

主成分	初始特征值			提取特征值		
	特征根	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征根	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	3.21	80.31	80.31	3.21	80.31	80.31
2	0.57	14.16	94.47	0.57	14.16	94.47
3	0.17	4.32	98.79	0.17	4.32	98.79
4	0.05	1.21	100.00	0.05	1.21	100.00

表 6 初始因子载荷矩阵

Table 6 Matrix of initial factors

指标	成分			
	1	2	3	4
X <sub>1</sub>	-0.95	-0.04	0.31	0.09
X <sub>2</sub>	0.90	0.33	0.26	-0.09
X <sub>3</sub>	0.97	0.16	-0.02	0.18
X <sub>4</sub>	-0.75	0.66	-0.10	0.01

**3.4.2 灰色关联度分析 (grey relational analysis, GRA)** 将 10 批样品的 29 个共有峰的峰面积数据与 DPPH 自由基清除能力数据进行 GRA, 对原始数据进行标准化转化后, 计算关联度, 结果见表 7。

通过关联度可初步确定共有峰所对应的化学成分与抗氧化活性之间的联系<sup>[18]</sup>。关联度越大, 说明化学成分与抗氧化作用的关联越大, 反之则表示关联越小, 由表 7 可知, HMI 提取物 29 个共有峰与 DPPH 自由基清除能力关联度均大于 0.5, 有较高的关联度, 故表明 HMI 提取物的抗氧化作用是多成分协同作用共同发挥的效果。对 DPPH 自由基清除能力贡献最大的色谱峰是 10、23、8、12 号峰 (关联度大于 0.8), 可初步将这些药效关联度最大的化合物作为指纹图谱的药效控制点。其中, 23 号峰为已知化合物 (槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷), 且该化合物含量高, 易获得, 课题组前期采用高速逆流色谱 (HSCCC) 法从全缘叶绿绒蒿花

表 7 HMI 提取物指纹图谱特征与其抗氧化作用的灰色关联度分析结果

Table 7 Relational order between fingerprint and antioxidant activity of herb *M. integrifolia* (non flower parts) extracts

关联序	峰号	关联度	关联序	峰号	关联度
1	10	0.82	16	17	0.69
2	23	0.82	17	3	0.69
3	8	0.81	18	1	0.69
4	12	0.80	19	7	0.67
5	2	0.78	20	27	0.66
6	22	0.77	21	19	0.65
7	14	0.77	22	6	0.65
8	18	0.76	23	4	0.65
9	28	0.75	24	25	0.65
10	16	0.74	25	9	0.62
11	21	0.74	26	26	0.61
12	15	0.74	27	13	0.61
13	20	0.74	28	24	0.59
14	5	0.71	29	29	0.57
15	11	0.70			

中可快速分离得到质量分数为 98% 的该化合物单体<sup>[15]</sup>, 且该成分目前仅在绿绒蒿属植物中被发现。除此之外, 25 号峰也具有较高的关联度, 且该峰为 HMI 提取物中的主要化学成分, 是可作为 Q-marker 的候选成分。25 号峰虽然与 24、26、27 号峰为同分异构体, 但其具体结构未知, 故采用 HSCCC 法进行分离, 鉴定结构。

### 3.5 HSCCC 法分离 HMI 提取物的主要成分

采用前期建立的 HSCCC 分离方法分离 25 号峰, 得到化合物约 50 mg (UPLC 测定质量分数为 90%), 化合物结构通过 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H)、HSQC 和 HMBC 数据进行鉴定, 通过糖水解脱方法鉴定糖的结构, 确定化合物为槲皮素-3-O-[2'''-O-乙酰基-β-D-半乳糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖基], 经 SciFinder 检索, 该化合物为新化合物。化合物结构式见图 4。

化合物为黄色粉末, ESI-MS (正离子模式): *m/z* 669.168 6, 预测分子式为 C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>18</sub>, MS/MS 产生的二级碎片离子可见槲皮素苷元特征峰 *m/z* 303.04, 该特征与课题组前期从全缘叶绿绒蒿花分离鉴定的乙酰化槲皮素二糖苷一致, 并且该化合物 <sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 数据与乙酰化槲皮素二糖苷相

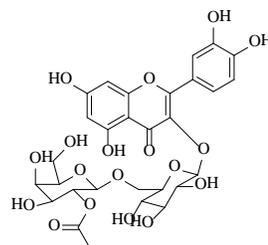


图 4 槲皮素-3-O-[2'''-O-乙酰基-β-D-半乳糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖基] 结构式

Fig. 4 Structure of quercetin 3-O-[2'''-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside]

似, 可推测该化合物为乙酰化槲皮素二糖苷<sup>[15]</sup>。在 HMBC 图谱中, 乙酰基的 C=O ( $\delta_C$  169.1) 与  $\delta_H$  1.71 和  $\delta_H$  4.32 相关,  $\delta_H$  4.32 与 C-1''' ( $\delta_C$  100.1) 和 C-3''' ( $\delta_C$  74.0) 相关; 在 HSQC 图谱中,  $\delta_H$  4.32 与 C-2''' ( $\delta_C$  73.7) 相关, 说明乙酰基与 C-2''' 相连。进一步通过 HSQC、HMBC、COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) 谱归属碳氢的化学位移, 结果见表 8。

采用酸水解实验鉴定化合物中糖的结构, 糖水解脱方法参考文献的方法<sup>[16]</sup>。取化合物粉末约 5 mg, 加浓度为 2 mol/L 的 HCl 2 mL, 94 °C 回流 16 h。回流后的溶液采用醋酸乙酯萃取, 萃取后水层用 1 mol/L NaOH 中和, 中和后 N<sub>2</sub> 吹干。残渣用 0.5 mL 乙醇溶解, TLC 展开, 同时采用 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖对照品对照, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2.5 : 1) 展开, 喷苯胺邻苯二甲酸盐显色剂显色, 105 °C 加热显色。

## 4 讨论

本研究通过 HMI 提取物指纹图谱和 DPPH 清除率的谱效关系研究, 确定 HMI 指纹图谱中的 29 个共有峰与抗氧化活性的相关性都达到 0.5 以上, 说明 29 个共有峰均与 HMI 提取物的抗氧化活性相关, HMI 提取物发挥抗氧化活性是多种成分协同作用的结果。采用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 法从 HMI 提取物中识别了 18 种化学成分, 包括 16 种黄酮类成分和 2 种生物碱类成分。研究表明, HMI 提取物指纹图谱中, 最主要的 2 个峰为黄酮类成分, 其中槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖基与抗氧化活性关联度大于 0.8, 故可将其作为质控指标之一。指纹图谱中另外 1 个主要峰的化合物经 HSCCC 分离后鉴定结构, 确认为槲皮素-3-O-[2'''-O-乙酰基-β-D-半乳糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖基], 该化合物为新化合物, 与抗氧化活性的关联度为 0.65, 具有较好的活性, 且从峰高和峰面积来

表 8 化合物的 <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) 和 <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz) 数据 (DMSO)  
Table 8 <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz) spectroscopic data (DMSO)

编号	$\delta_H$	$\delta_C$	编号	$\delta_H$	$\delta_C$
2		156.2	1''	5.30 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	102.0
3		133.4	2''	3.58 (1H, m)	72.9
4		177.2	3''	3.58 (1H, m)	76.5
5		161.2	4''	3.58 (1H, m)	68.4
6	6.17 (1H, s)	99.1	5''	3.58 (1H, m)	74.7
7		165.5	6''	(a) 3.68 (1H, m)	68.3
8	6.35 (1H, s)	93.8		(b) 3.47 (1H, m)	
9		156.5	1'''	4.25 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)	100.1
10		103.6	2'''	4.32 (1H, t, $J = 8.4$ Hz)	73.7
1'		120.8	3'''	3.09 (1H, m)	74.0
2'	7.57 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)	115.2	4'''	3.09 (1H, m)	69.9
3'		144.9	5'''	3.58 (1H, m)	71.0
4'		148.8	6'''	(a) 3.40 (1H, m)	60.5
5'	6.80 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	115.9		(b) 3.58 (1H, m)	
6'	7.70 (1H, dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz.)	121.9	Ac	1.71 (3H, s)	20.3
					169.1

看, 化合物在 HMI 提取物中具有很高的含量, 是 HMI 的主要成分, 故可将其作为质控指标之一。这 2 种成分目前仅在绿绒蒿属植物中发现, 具有特异性。故以上结果初步确定槲皮素-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖苷和槲皮素-3-O-[2'''-O-乙酰基- $\beta$ -D-半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-葡萄糖苷] 作为 HMI 的质量标志物。

通过谱效关系的研究方法, 研究 HMI 提取物具有抗氧化活性的物质基础, 进而通过化学成分与抗氧化活性的关联程度, 以及化学成分在 HMI 提取物的含量特点, 选择质控指标成分, 使质量标志物与生物活性密切相关, 有利于筛选与药效相关的核心质量标志物, 保证药材质量的可控性, 研究结果为 HMI 药材质量标准的完善、规范合理的应用以及药效物质的进一步阐明提供科学依据并奠定了基础。

参考文献

[1] 刘肖雁, 姜文文, 蒋海强, 等. 基于“谱-效-代”关联的参枝苓口服液质量标志物的初步研究 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4603-4612.  
[2] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.  
[3] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草 [M]. 北京: 科技出版社: 1735.

[4] 罗达尚. 新修晶珠本草 [M]. 成都: 四川出版集团·四川科学技术出版社, 2004.  
[5] 吴海峰, 丁立生, 王 环, 等. 绿绒蒿属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(1): 163-168.  
[6] Zhou Y, Song J Z, Choi F F K, et al. An experimental design approach using response surface techniques to obtain optimal liquid chromatography and mass spectrometry conditions to determine the alkaloids in *Meconopsi* species [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 7013-7023.  
[7] 王志旺, 邵 晶, 郭 玫, 等. 五脉绿绒蒿总黄酮和总生物碱抗大鼠肝纤维化 [J]. 中成药, 2013, 53(6): 1125-1128.  
[8] 王志旺, 郭 玫, 马 骏, 等. 五脉绿绒蒿抗炎镇痛作用有效部位的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(1): 21-22.  
[9] 吴 娜, 蔡光明, 何 群. 氧化应激与肝脏损伤 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(29): 3310-3315.  
[10] 光吉博则, 谷仁焯. 氧化应激的病理生理作用 [J]. 日本医学介绍, 2007, 28(4): 150-152.  
[11] 郑媛媛, 李 辰, 封士兰, 等. 油橄榄叶中总黄酮含量测定方法探讨 [J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(2): 547-550.  
[12] 房祥军, 郜海燕, 陈杭君. 山核桃加工、贮藏前后总多酚含量及其抗氧化活性的变化 [J]. 食品科学, 2011,

- 32(5): 104-107.
- [13] Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay [J]. *Analy Biochem*, 1996, 239(1): 70-76.
- [14] Zhou G, Chen Y X, Liu S, *et al.* *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extract from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148: 664-670.
- [15] Huang Y F, Han Y T, Chen K L, *et al.* Separation and purification of four flavonol diglucosides from the flower of *Meconopsis integrifolia* by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Separation Sci*, 2015, 38(23): 4136-4140.
- [16] Shang X Y, Wang Y H, Li C, *et al.* Acetylated flavonol diglucosides from *Meconopsis quintuplinervia* [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67: 511-516.
- [17] 肖云芝, 于超, 刘朝勇, 等. 鳖甲药材指纹图谱与其抗肝纤维化作用的谱效关系研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(17): 2506-2510.
- [18] 池婕, 林兵, 刘志宏, 等. 雷公藤制剂指纹图谱及谱效关系研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(8): 1479-1483.