

基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别法和薄层色谱生物自显影评价不同生长期毛菊苣药材质量

罗玉琴¹, 魏哲洋^{1,2}, 刘戈宇¹, 阿吉艾克拜尔·艾萨^{1,2*}

1. 中国科学院新疆理化技术研究所 中科院植物资源化学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: **目的** 建立不同生长期(花前期、开花期和成熟期)毛菊苣 *Cichorium glandulosum* 地上部位药材的 HPLC 指纹图谱, 结合化学模式识别法和薄层色谱(TLC)生物自显影技术评价毛菊苣药材质量, 为其进一步研究与开发提供依据。**方法** 采用 PolyPack C₁₈-AQ 色谱柱, 以甲醇(A)-乙腈(B)-0.3%磷酸溶液(C)为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 254 nm, 体积流量为 1.0 mL/min。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012)》建立不同生长期毛菊苣地上部位药材的 HPLC 指纹图谱并分析相似度。应用聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)筛选不同生长期下毛菊苣地上部位药材中具有的差异性化学成分。利用 TLC-生物自显影技术对不同生长期毛菊苣药材进行体外抗氧化作用研究。**结果** 不同生长期下 20 批次药材 HPLC 指纹图谱共匹配出 12 个共有峰, 指出 3 号峰为秦皮乙素、6 号峰为异槲皮苷、7 号峰为 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸。CA 将 20 批不同生长期下药材分为 4 类; PCA 确定了 3 个主成分因子, 累积方差贡献率为 78.143%, PCA 结果与 CA 结果基本一致; PLS-DA 结果显示色谱峰 11、2、6(异槲皮苷)、3(秦皮乙素)和 5 号峰可作为不同生长期毛菊苣药材质量的差异标志物。样品展开斑点和 TLC-生物自显影说明花前期和开花期药材相比成熟期药材具有良好的抗氧化活性作用。**结论** 利用建立的指纹图谱可为毛菊苣地上部位药材规范化种植以及质量评价提供实验依据。

关键词: 毛菊苣; 指纹图谱; 秦皮乙素; 异槲皮苷; 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸; 化学模式识别; 生物自显影

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)08-2746-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.08.023

Quality evaluation of *Cichorium glandulosum* at different growth stages based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition and TLC-bioautographic method

LUO Yuqin¹, WEI Zheyang^{1,2}, LIU Geyu¹, HAJI Akber Aisa^{1,2}

1. Key Laboratory of Plant Resource Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint for the aerial part of *Cichorium glandulosum* at different growth stages (pre-flowering, flowering and maturity stages), and to evaluate the quality combined with chemical pattern recognition and TLC-bioautographic technology, so as to provide a basis for further research and development. **Methods** PolyPack C₁₈-AQ column was used for gradient elution with methanol(A)-acetonitrile(B)-0.3% phosphoric acid solution(C) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, a detection wavelength of 254 nm. The Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012) was used to establish the HPLC fingerprints of medicinal materials from the aerial part of *C. glandulosum* at different growth stages and analyze the similarity. Cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were performed to screen the different chemical components of the aerial part of *C. glandulosum* at different growth stages.

收稿日期: 2023-11-01

基金项目: 国家药品标准制修订研究课题(BZ20230281); 中国科学院战略生物资源计划(KFJ-BRP-007-011)

作者简介: 罗玉琴(1974—), 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药、民族药制剂及质量标准的研究。E-mail: luoyq@ms.xjb.ac.cn

*通信作者: 阿吉艾克拜尔·艾萨(1965—), 男(维吾尔族), 研究员, 博士生导师, 研究方向为天然产物的研究与开发。

E-mail: haji@ms.xjb.ac.cn

The antioxidant activities of medicinal materials of *C. glandulosum* at different growth stages were studied *in vitro* by TLC-bioautography technology. **Results** The HPLC fingerprints of 20 batches of different growth stages matched 12 common fingerprint peaks, and peak 3 was identified as aesculetin, peak 6 as isoquercitrin, peak 7 as 3,5-O-dicaffeoylquinic acid. The 20 batches of medicinal materials were divided into four categories by CA. Three principal component factors were determined by PCA, and the cumulative variance contribution rate was 78.143%. The results of PCA were basically consistent with those of CA. PLS-DA results showed that peaks 11, 2, 6 (isoquercitrin), 3 (aesculetin) and 5 could be used as markers of quality difference of *C. glandulosum* at different growth stages. TLC speckle and TLC-bioautography showed that pre-flowering and flowering herbs had better antioxidant activity than the mature herbs. **Conclusion** The established fingerprint can provide experimental basis for the standardized planting and quality evaluation of medicinal materials from the aerial part of *C. glandulosum*.

Key words: *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet.; fingerprint; aesculetin; isoquercitrin; 3,5-O-dicaffeoylquinic acid; chemical pattern recognition; bioautography

菊科植物毛菊苣 *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet 为一年生草本植物, 其地上部分和根收录在《中国药典》2020 年版一部^[1], 具有清肝利胆、健胃消食、利尿消肿之功效, 用于湿热黄疸、胃痛食少、水肿尿少等。毛菊苣在新疆南北部有大面积栽培, 为新疆民族医习用药材, 对肝损伤有较好的治疗作用^[2-4]。据文献报道^[5-7], 毛菊苣主要含倍半萜类、黄酮类、酚酸类、香豆素类、三萜类、生物碱、甾醇等成分, 具有很强的生物活性和药用价值, 其中含有的秦皮乙素、异槲皮苷、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸等化学成分具有显著的抗氧化作用。

课题组前期采用红外光谱三级宏观指纹鉴定了毛菊苣与菊苣^[8]、程波等^[9]研究了毛菊苣及其易混品菊苣的位点特异性 PCR 鉴别。此外, 以芦丁^[10]、菊苣酸^[11-12]作为参比峰对毛菊苣根、地上部位进行 HPLC 指纹图谱的研究亦有报道; 再娜布等^[13]、骆旭东等^[14]、杨建等^[15-16]分别采用 HPLC 比较了毛菊苣根、茎、种子不同部位中有效成分含量的差异; 胡君萍等^[17]采用 UPLC 同时测定毛菊苣和菊苣根中秦皮甲素、秦皮乙素、山萘苣素、菊苣酸、山萘苣苦素等 5 种成分的含量。为了比较不同生长期下(花前期、开花期和成熟期)毛菊苣地上部位药材质量的差异, 本研究采用高效液相色谱技术建立药材 HPLC 指纹图谱, 并结合化学模式识别法[聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)]和薄层色谱-生物自显影技术(TLC-bioautography)进行综合评价。研究内容可为购买的毛菊苣药材采收期提供判别, 也为维药材规范化种植以及质量评价提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1260 型 HPLC 液相色谱仪(美国安捷伦公司); 高效薄层色谱仪(瑞士 CAMAG 公司); Sartorius CPA124s 型电子天平(德国赛多利斯, 0.1 mg); YP5102 型电子天平(上海光正医疗仪器有限公司, 0.01 g); SK7210LH 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 材料

对照品秦皮乙素、异槲皮苷、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸(均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数分别为 98.3%、96.3%、95.9%, 批号分别为 110741-201708、111809-201403、111782-201405); 山萘苣素(质量分数为 98.6%, 批号为 GSB 11-3216-2014, 由中科院新疆理化技术研究所研制), 山萘苣苦素(自制, 经 HPLC 检测质量分数为 98%, 通过 UV、IR、MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 波谱确定了结构), 乙腈和甲醇为色谱纯, 水为超纯水; 薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄(烟台江友硅胶开发有限公司); 其余试剂均为分析纯。

20 批次药材中 S16~S20 由和田墨玉县种植基地提供, 其余均由新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员提供, 所有药材经何江研究员鉴定均为菊科植物毛菊苣 *C. glandulosum* Boiss. et Huet 的干燥地上部分, 符合《中国药典》2020 年版的有关规定。药材采收后置阴凉通风处自然晾干, 粉碎, 过 80 目筛后置冷冻冰箱(-20 °C)中保存备用。详细信息见表 1。

2 方法

2.1 HPLC 指纹图谱的建立和相似度评价

2.1.1 色谱条件 PolyPak C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为甲醇(A)-乙腈(B)-

表 1 20 批次药材样品信息

Table 1 Sample information of 20 batches of aerial part of *C. glandulosum*

样品编号	采集地	批号	采集时间
S1	吉木萨尔二工镇西村	20150601001	2015-06-01
S2	吉木萨尔二工镇西村	20150708001	2015-07-08
S3	吉木萨尔三厂槽子	20150708002	2015-07-08
S4	吉木萨尔泉子街二工乡头工镇西村	20150708003	2015-07-08
S5	吉木萨尔二工村	20150708004	2015-07-08
S6	吉木萨尔	20150708005	2015-07-08
S7	吉木萨尔	20150708006	2015-07-08
S8	和田墨玉县	20150720001	2015-07-20
S9	和田墨玉县	20150720002	2015-07-20
S10	吉木萨尔	20150720	2015-07-20
S11	吉木萨尔	20150725001	2015-07-25
S12	吉木萨尔	20150725002	2015-07-25
S13	吉木萨尔	20150726001	2015-07-26
S14	皮山县	20190802	2019-08-02
S15	和田墨玉县	20180810	2018-08-10
S16	墨玉园区 (试验田)	20170624	2017-06-24
S17	墨玉园区 (试验田)	20180712	2018-07-12
S18	墨玉园区 (大田)	20180712	2018-07-12
S19	墨玉园区 (试验田)	20180817	2018-08-17
S20	墨玉园区 (大田)	20180817	2018-08-17

0.3%磷酸水溶液 (C), 梯度洗脱 (0~10 min, 6% A, 2%~6% B; 10~20 min, 6%~7% A, 6%~12% B; 20~30 min, 7%~10% A, 12% B; 30~40 min, 10%~13% A, 12%~15% B; 40~80 min, 13% A, 15%~21% B; 80~100 min, 13% A, 21%~40% B); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL; 检测波长 254 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取秦皮乙素、异槲皮苷、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、山莴苣素和山莴苣苦素对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 配制成质量浓度分别为 96、80、117、227、54 μg/mL 的溶液, 摇匀, 滤过 (0.45 μm), 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取粉碎后药材约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 (40 kHz、550 W) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过 (0.45 μm), 取续滤液, 即得。

2.1.4 指纹图谱的建立和相似度分析 制备的供试品溶液按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。将得到的 20 批次药材指纹图谱导入《中药

色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版》软件, 设置时间窗宽度为 0.50, 采用多点校正法对色谱峰进行全谱匹配, 建立毛菊苣药材的共有指纹图谱, 选择中位数法生成对照指纹图谱 (R), 计算相似度。方法学考察中精密度、稳定性、重复性试验均符合要求。

2.2 多元统计分析

将数据分别导入 SPSS 25.0 和 Simca 14.1 软件进行 CA、PCA 和 PLS-DA 多元统计分析, 初步筛选出不同生长期毛菊苣地上部位药材中具有的差异性化学成分。

2.3 薄层色谱图的建立及体外抗氧化活性研究

2.3.1 薄层色谱图的建立 使用高效薄层色谱自动点样仪, 将相同生长期下的供试品溶液 (制备方法同“2.1.3”项) 分别点于 20 cm×10 cm 的硅胶 GF₂₅₄ 板上, 以醋酸乙酯-甲酸-冰乙酸-水 (16:1.5:0.5:1) 为展开剂, 展开, 取出晾干, 置于紫外灯 366 nm 下观察, 并通过薄层色谱扫描仪进行扫描。

2.3.2 体外抗氧化作用的研究 TLC-生物自显影技术可对天然提取物中具有抗氧化活性的化合物进行筛选。通过薄层色谱将化合物呈现在薄层板上, 当脂溶性自由基 DPPH 与抗氧化活性化合物结合时, 会使抗氧化活性部位呈现出亮黄色的斑点, 其它未发生反应的部位呈现出紫色背景; 当与水溶性自由基 ABTS 结合时, 会使抗氧化活性部位呈现出白色斑点, 其余未反应部位呈蓝色背景。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱的建立和相似度评价

3.1.1 指纹图谱的建立及共有峰的确认 依据采收时间和 HPLC 指纹图谱中特征成分的相似性, 将 20 批次药材划分为花前期 (包括 S1、S6、S7、S11、S13、S16)、开花期 (包括 S2、S3、S4、S5、S17、S18) 和成熟期 (包括 S8、S9、S10、S12、S14、S15、S19、S20) 3 个生长期, 不同生长期下 HPLC 指纹图谱共有模式及其对照指纹图谱, 见图 1。20 批次药材的 HPLC 叠加指纹图谱共有模式及其对照指纹图谱, 见图 2。通过与对照品比对, 指纹图谱共指认出 3 个对照品, 分别为 3 号峰秦皮乙素、6 号峰异槲皮苷、7 号峰 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸, 混合对照品溶液 HPLC 色谱图, 见图 3。花前期、开花期和成熟期下的药材分别匹配出 22、24 和 13 个共有指纹峰; 20 批药材叠加后匹配出 12 个共有峰, 共有峰保留时间和峰面积见表 2。

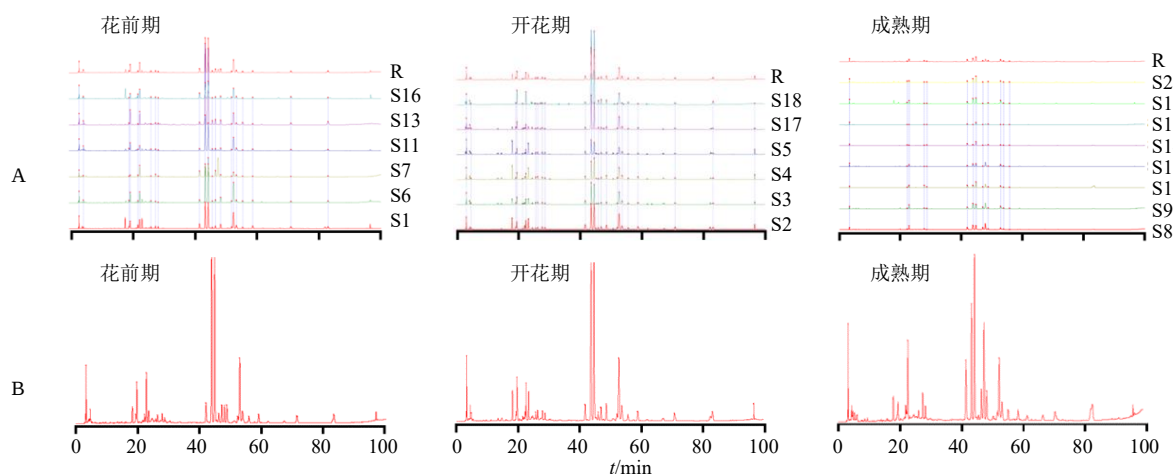


图 1 不同生长期药材指纹图谱 (A) 及其对照图谱 (B)

Fig. 1 Fingerprints of different growth stages of medicinal materials (A) and their control spectra (B)

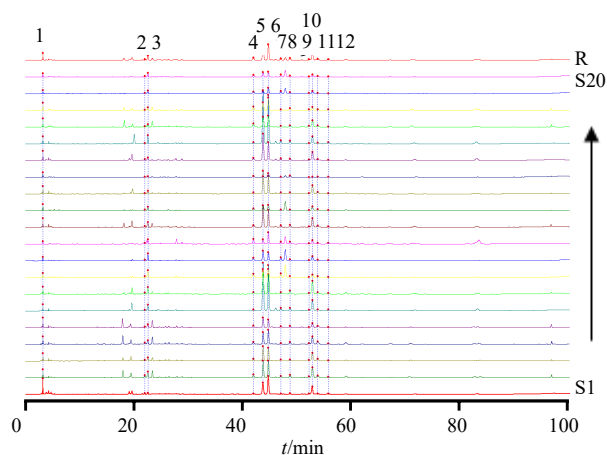
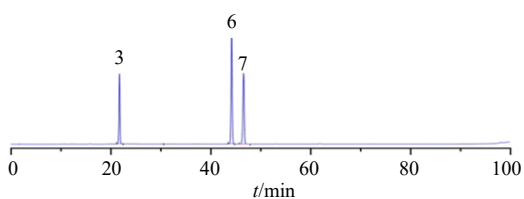


图 2 20 批毛茛苣药材 HPLC 指纹图谱共有模式

Fig. 2 The mutual mode of HPLC fingerprint of 20 batches sample



3-秦皮乙素; 6-异槲皮苷; 7-3,5-O-二咖啡酰奎宁酸。
3-aesculetin; 6-isoquercitrin; 7,3,5-O-dicaffeoylquinic acid.

图 3 混合对照品溶液 HPLC

Fig. 3 HPLC chromatogram of mixedreference substance solution

由图 1 可以看出, 花前期和开花期药材具有的相似化学成分较多, 而成熟期药材化学成分的相似性差别较大。由表 2 看出, 20 批次药材中 12 个共有指纹峰的峰面积 RSD 为 33.04%~87.95%, 表明每批次药材质量存在一定差距。

表 2 20 批药材共有指纹峰的保留时间和峰面积 (n=20)

Table 2 Retention time and peak area of common peaks of 20 batches of medicinal materials (n=20)

峰号	t_R/min	峰面积	RSD/%
1	3.229	362.178	33.04
2	21.780	87.336	40.83
3	22.485	512.649	57.25
4	41.887	486.897	45.53
5	43.667	2 900.954	87.95
6	44.646	2 796.178	72.70
7	46.923	320.661	57.09
8	48.633	366.894	38.17
9	52.107	143.858	39.29
10	52.726	1 484.032	54.91
11	53.696	375.844	49.32
12	55.681	152.992	47.39

3.1.2 相似度分析 通过相似度软件计算得到的 HPLC 指纹图谱相似度分析结果见表 3。由表 3 看出, S1~S9、S11~S13、S15~S20 和对照指纹图谱的相似度范围为 0.918~0.987, 相似度较高; S10 与对照指纹图谱的相似度较低, 为 0.889; S14 与对照指纹图谱的相似度最低, 为 0.737。

3.2 CA

以 20 批次药材 HPLC 指纹图谱的 12 个共有峰峰面积作为变量, 导入 Origin (2021) 软件, 采用组间平均数联结法 (between groups linkage), 以夹角余弦 (cosine) 作为样品相似度的距离公式, 按照各类别之间的区别及联系进行 CA, 见图 4。结果

表 3 20 批样品 HPLC 指纹图谱相似度评价结果

Table 3 HPLC fingerprint similarity evaluation result of

20 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.966	S11	0.993
S2	0.987	S12	0.949
S3	0.987	S13	0.989
S4	0.975	S14	0.737
S5	0.975	S15	0.982
S6	0.976	S16	0.966
S7	0.987	S17	0.979
S8	0.919	S18	0.963
S9	0.962	S19	0.918
S10	0.889	S20	0.935

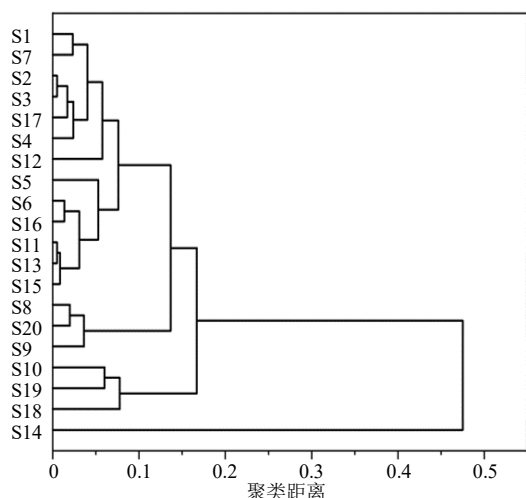


图 4 聚类分析图

Fig. 4 Hierarchical cluster analysis graph

表明,采集的 20 批次药材之间的距离值有较大差距,聚类分析树状图分支较多。

从树状谱系图结果可以看到,当类间距离为 0.1 时,不同生长期下的 20 批次药材可聚为 4 类, S14 单独聚为 1 类,为第Ⅳ类; S1~S7、S11~S13、S15~S17 聚为第Ⅰ类; S8、S9、S20 聚为第Ⅱ类; S10、S18 和 S19 聚为第Ⅲ类。花前期药材 (S1、S6、S7、S11、S13、S16) 和开花期药材 (S2~S5、S17) 均在第Ⅰ类,表明花前期药材和开花期药材质量上较为相似;成熟期药材 (S8~S10、S19、S20) 主要在Ⅱ和Ⅲ类,表明成熟期药材在质量上有一定的差异。CA 分析较好的吻合了不同生长期下的药材指纹图谱与系统相似度的直观差异,正确体现出指纹图谱之间的相

似程度。

3.3 PCA

运用 SPSS 25.0 软件对不同生长期下的 20 批次药材指纹谱 12 个共有峰数据为变量,对其进行 PCA,以主成分特征值 > 1 为提取标准,同时将 20 批次药材的 12 个共有峰数据导入 Simca 14.1 软件。PCA 结果显示 KMO 检验系数为 0.574, Bartlett 球形度检验显著性 $P < 0.000 1$,提示适合进行因子分析,得到 3 个主成分,特征值及方差贡献率见表 4。由表 4 可知,特征值分别为 4.913、2.724、1.740,方差贡献率分别为 40.943%、22.702%、14.498%,累积方差贡献率达到 78.143%,表明这 3 个主成分可以比较全面的表征不同生长期毛茛苣药材的大部分信息。基于 PCA 建立无监督的模式识别模型,模型拟合参数 R^2_X 为 0.997,预测参数 Q^2 为 0.679,以上参数均大于 0.5,表明该模型具有较高的解释和预测性,PCA 得分图见图 5。从图中看出,20 批次药材按花前期、开花期和成熟期分布,且所有样品点均落在 95% 的置信区间之内,每个生长期的样品聚集的较好,特别是花前期与开花期药材分布较聚集,说明花前期和开花期药材质量相差不大。通过观察样品的组内聚集和组间分离趋势,表明 PCA 结果与

表 4 主成分特征值及累积方差贡献率

Table 4 Eigenvalues of principal components and cumulative variance contribution rates

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.913	40.943	40.943
2	2.724	22.702	63.645
3	1.740	14.498	78.143

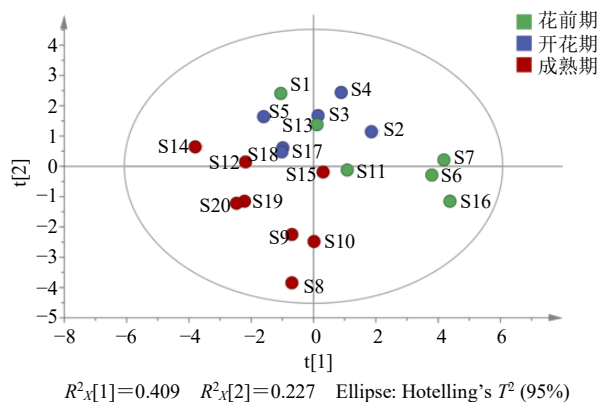


图 5 20 批毛茛苣药材的 PCA 分析

Fig. 5 PCA scatter plot of 20 batches of *C. glandulosum*

CA 结果基本一致。

利用 SPSS 25.0 软件对 PCA 分析结果进行因子提取, 采用凯撒正态化最大方差法正交旋转, 迭代 5 次后得到主成分载荷矩阵, 结果见表 5。由表 5 可知, 第 1 主成分主要反映了色谱峰 5、6 (异槲皮苷)、8、10、12 的信息, 第 2 主成分主要反映了色谱峰 2、3 (秦皮乙素)、4、7 (3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸) 的信息, 第 3 主成分主要反映了色谱峰 1、9、11 的信息。

表 5 毛菊苣主成分因子载荷矩阵

Table 5 Principal component factor load matrix of *C. glandulosum*

峰号	载荷		
	主成分 1	主成分 2	主成分 3
1	0.115	-0.670	0.216
2	0.089	0.743	0.221
3	0.535	0.769	-0.020
4	-0.572	0.643	0.272
5	0.933	0.120	0.085
6	0.960	0.123	0.143
7	0.270	0.854	-0.146
8	0.628	0.212	0.571
9	0.174	0.020	0.939
10	0.658	-0.088	0.642
11	0.080	-0.097	0.814
12	0.745	0.072	0.352

3.4 PLS-DA

为了进一步证明分类的准确性, 更好地体现组间差异, 本研究基于 CA 和 PCA 结果, 采用 PLS-DA 模型进行有监督的判别分析。运用 Simca 14.1 软件, 对 20 批毛菊苣药材指纹图谱的 12 个共有峰数据为变量进行 PLS-DA 建模分析。由 PLS-DA 结果显示, 在该模型下 R^2_X 为 0.827, R^2_Y 为 0.825, Q^2 为 0.647, 表明拟合的预测模型具有较好的解释和预测性能^[18]。PLS-DA 模型的置换检验结果见图 6。

为进一步分析引起 20 批次毛菊苣药材质量差异性原因, 通过提取 PLS-DA 模型中 12 个变量重要性投影值 (variable importance in projection, VIP), 得到差异性标志物的 VIP 得分图, 见图 7, 得分见表 6。以 $VIP > 1$ 为筛选标准, 得到 $VIP > 1$ 的共有峰, 分别为 11、2、6 (异槲皮苷)、3 (秦皮乙素) 和 5 号峰, 说明这 5 个成分对不同生长期毛菊苣药材有较大影响, 可作为不同生长期毛菊苣药材质量差异的主要潜在标志性成分。

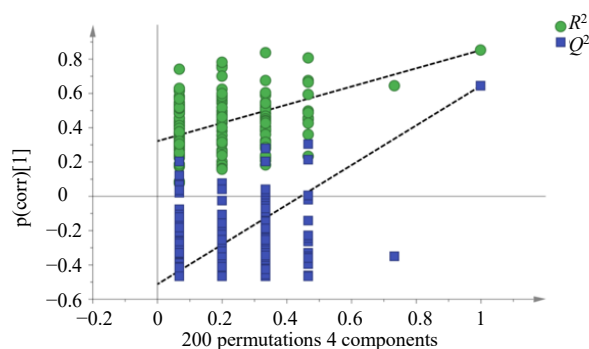


图 6 20 批次毛菊苣 PLS-DA 模型置换检验图

Fig. 6 Permutation test of 20 batches of *C. glandulosum* PLS-DA model

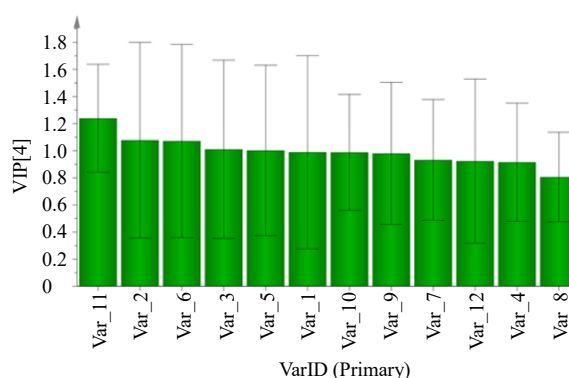


图 7 20 批毛菊苣 PLS-DA 模型 VIP 图

Fig. 7 VIP map of 20 batches of *C. glandulosum* PLS-DA model

表 6 毛菊苣 12 个色谱峰的 VIP 值

Table 6 VIP score for 12 chromatographic peaks of *C. glandulosum*

峰号	VIP 值	峰号	VIP 值
11	1.239 59	10	0.988 13
2	1.077 96	9	0.980 03
6	1.072 14	7	0.932 43
3	1.010 78	12	0.923 46
5	1.002 34	4	0.915 46
1	0.989 20	2	0.806 19

3.5 薄层色谱图的建立及体外抗氧化活性研究

花前期药材、开花期药材、成熟期药材薄层色谱图以及对 ABTS 溶液和 DPPH 溶液的研究, 见图 8~10。

通过薄层色谱图可直观看出各生长期下的药材斑点的差异性, 特别是成熟期的药材与花前期、开

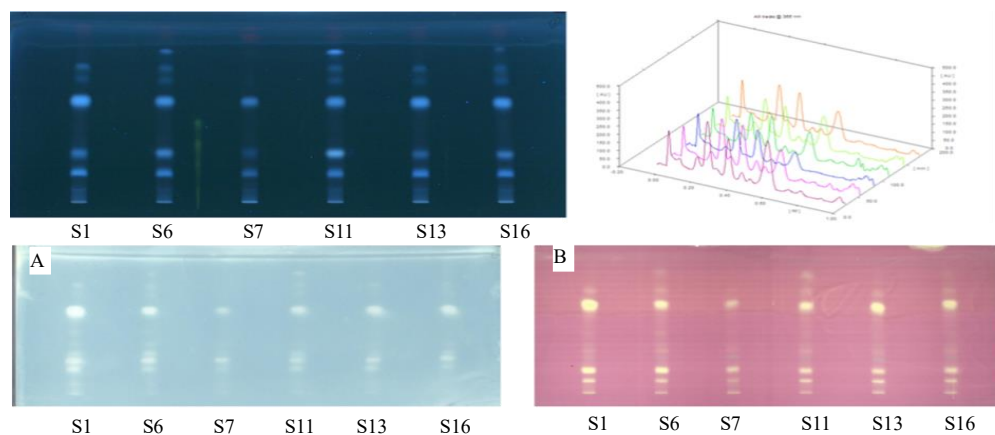


图 8 花前期药材薄层色谱图以及对 ABTS 溶液 (A) 和 DPPH (B) 溶液的反应
Fig. 8 TLC of pre-flowering herbs and reaction in ABTS solution (A) and DPPH solution (B)

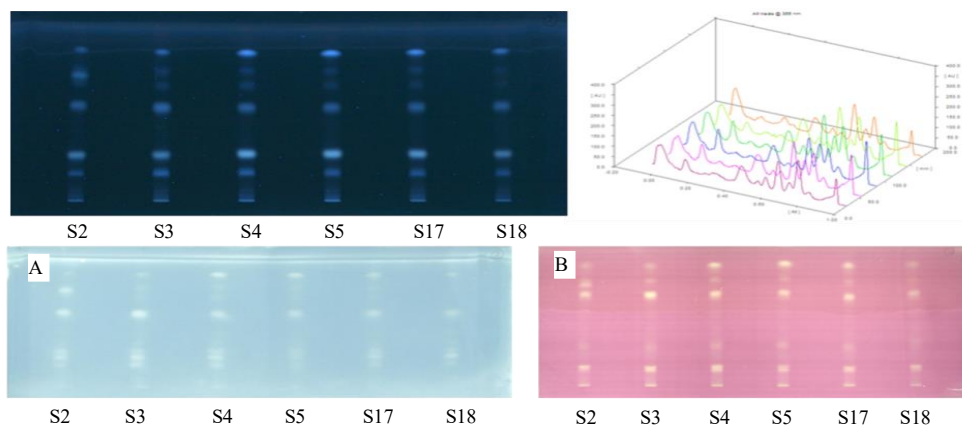


图 9 开花期药材薄层色谱图以及对 ABTS 溶液 (A) 和 DPPH (B) 溶液的反应
Fig. 9 TLC of flowering herbs and reaction in ABTS solution (A) and DPPH solution (B)

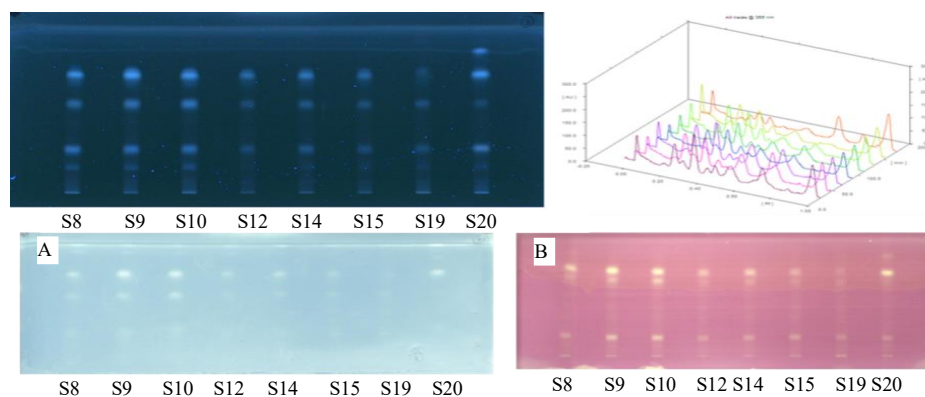


图 10 成熟期药材薄层色谱图以及对 ABTS 溶液 (A) 和 DPPH (B) 溶液的反应
Fig. 10 TLC of mature herbs and reaction in ABTS solution (A) and DPPH solution (B)

花期间差异较大,而在相同生长期下的药材,其薄层色谱图斑点较一致。通过与 DPPH 和 ABTS 的反应可以看出,花前期和开花期药材相比成熟期药材具有良好的抗氧化活性作用。

4 讨论

在供试品前处理方法考察时,比较了不同提取溶剂(乙醇、70%乙醇、50%乙醇、甲醇、70%甲醇、50%甲醇)对药材指纹图谱的影响,利用 DAD 检测

器对供试品溶液进行 190~400 nm 全波长扫描, 结果在波长为 254 nm、提取溶剂为 70% 甲醇时, 指纹图谱色谱峰数量较多。考察了乙腈-磷酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液、甲醇-乙腈-磷酸水溶液作为流动相对指纹图谱的峰形和分离度的影响, 结果表明, 甲醇-乙腈-0.3% 磷酸水溶液梯度洗脱, 供试品溶液指纹图谱色谱峰的分离效果最佳。

采用该色谱条件对不同生长期下的 20 批次药材建立了 HPLC 指纹图谱, 结果发现花前期和开花期药材匹配出的共有指纹峰分别为 22 和 24 个, 远远多于成熟期药材 13 个。通过与对照品比对, 花前期和开花期药材共指认出 5 个对照品, 分别为秦皮乙素 (22.87 min)、山莴苣素 (27.67 min)、异槲皮苷 (44.74 min)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (47.08 min)、山莴苣苦素 (83.51 min), 而成熟期药材没有比对出山莴苣苦素, 说明毛菊苣中的主要成分会随着生长差异发生变化。经相似度评价系统 2012 版软件进行相似度评价后, 得出 20 批次药材间 12 个共有指纹峰的峰面积 RSD 为 33.04%~87.95%。指纹图谱中峰面积 RSD 最大的 5 号峰 (未知), 为 87.95%, 其次峰面积 RSD 排第 2 的为 6 号峰 (异槲皮苷)、排第 3 的为 3 号峰 (秦皮乙素), 而峰面积 RSD 最小的为 1 号峰 (未知)。提示在药材的生长过程中, 由于受地质、气候等环境因素的影响以及采集时间不同, 导致药材中所含化学成分的种类及含量具有一定的差异。

CA 结果显示, 20 批次药材聚为 4 类, 花前期和开花期药材除 S18 外均聚在第 I 类, 而成熟期药材主要聚在第 II 和 III 类; PCA 和 PLS-DA 所得分类结果与 CA 分类结果基本一致。在 PLS-DA 模型的置换检验中, R^2 在 Y 轴的截距为 0.322, Q^2 在 Y 轴的截距为 -0.512, Q^2 回归线与纵轴的相交点小于零, 说明模型没有出现过度拟合现象, 模型验证有效, 表明建立的 PLS-DA 模型有较好的稳定性和预测能力^[19-20]。VIP 值是筛选差异性化合物与生物活性之间的重要指标, VIP 值越大, 尤其大于 1 的时候, 对模型解释能力越强^[21-22]。VIP > 1 的共有峰为峰 11、2、6 (异槲皮苷)、3 (秦皮乙素) 和 5 号峰, 以上共有峰可作为不同生长期毛菊苣药材质量的差异标志物, 后期将对其他共有峰采用高分辨质谱进行鉴定。

薄层色谱-生物自显影技术是将薄层色谱分离和生物活性测定相结合, 是一种在活性指导下的快

速靶向追踪分离、筛选活性成分的方法^[23-25]。本研究利用该技术对相同生长期下不同批次的药材进行薄层扫描以及对 DPPH 和 ABTS 的抗氧化作用研究。结果表明, 相同生长期下各样品的薄层色谱图谱较一致, 花前期和开花期对 DPPH 和 ABTS 的抗氧化作用强于成熟期药材, 而发挥抗氧化作用的活性成分有待进一步研究。

《中国药典》2020 年版一部菊苣项下描述采制时间为夏、秋二季, 通过上述研究表明, 采收时间对药材化学成分影响较大, 而产地不同对药材化学成分的影响差异较小。因此借助指纹图谱的特征性可为购买的毛菊苣地上部位药材的采收期提供判别, 也为课题组在和田墨玉园区规范化种植、采收以及质量评价提供依据。研究结果对保证药材质量和产品安全发挥一定的指导作用, 也为毛菊苣有效部位的制备提供稳定的药材来源。

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: 97.
- [2] Yang W Z, Wang H, Shang J, *et al*. Chemical constituents from *Cichorium glandulosum* [J]. *Chin J Nat Med*, 2009, 7(3): 193-195.
- [3] 祖越, 李国栋, 张程亮, 等. 维药毛菊苣活性成分及其药理作用研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(5): 229-234.
- [4] 杨伟俊. 维药毛菊苣保肝有效部位及制剂研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2012.
- [5] 张英俊, 白鸽, 何向东, 等. 秦皮乙素对氧化损伤 ARPE-19 细胞的保护作用及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(12): 1025-1031.
- [6] 李佳银, 于欢, 石伯阳, 等. 甘薯茎叶中异槲皮苷及咖啡酰奎宁酸类衍生物的抗氧化活性 [J]. *食品科学*, 2013, 34(7): 111-114.
- [7] 杨建. 毛菊苣特征成分的分子印迹及生物活性研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2020.
- [8] 杨伟俊, 罗玉琴, 再娜布, 等. 毛菊苣与菊苣的红外光谱三级宏观指纹鉴定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(11): 131-135.
- [9] 程波, 何江, 郭文倩, 等. 维药毛菊苣及其易混品菊苣的位点特异性 PCR 鉴别研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(18): 4393-4398.
- [10] 买买提·努尔艾合提, 吐尔洪·艾买尔, 袁金斌. 毛菊苣根 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中药材*, 2011, 34(6): 881-885.
- [11] 周俊, 张冰, 林志健, 等. 菊苣和毛菊苣的 HPLC 指纹图谱构建及模式识别研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013,

- 38(9): 1401-1405.
- [12] 李渊. 维药毛菊苣保肝作用及有效成分含量测定 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2012.
- [13] 再娜布. 吐合达洪, 仲婕, 信学雷, 等. 毛菊苣药材不同部位主要活性成分含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 1018-1021.
- [14] 骆旭东, 杨建华, 张海波, 等. HPLC 法同时测定毛菊苣根和种子中 7 种化学成分的含量 [J]. 西北药学杂志, 2019, 34(3): 289-294.
- [15] 杨建, 何倩, 吴娜, 等. 毛菊苣不同部位中菊苣酸、绿原酸、单咖啡酰石酸的含量测定 [J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(6): 792-795.
- [16] 杨建, 何倩, 马晓丽, 等. 新疆毛菊苣不同部位中山莴苣素和山莴苣苦素的含量测定 [J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(1): 25-27.
- [17] 胡君萍, 迪丽拜尔·马木提, 李渊, 等. UPLC 同时测定维药毛菊苣和菊苣中 5 种化学成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17): 65-68.
- [18] 吕振国, 武恬恬, 赵鹏, 等. 基于 UPLC 指纹图谱和化学计量学对华山参及其混伪品的鉴别研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(9): 2202-2206.
- [19] 范雪花, 王艳丽, 侯富国, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的白及与黄花白及辨识研究 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 3990-3998.
- [20] 李雅娟, 李莎莎, 陈曦, 等. 菟丝子及盐菟丝子指纹图谱对比研究 [J]. 中药材, 2023(9): 2185-2189.
- [21] 郝培君, 张林祥, 靳婉君, 等. 基于 HPLC 指纹图谱与指标性成分结合多元统计学对色选金银花等级的评价研究 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2694-2701.
- [22] 周雯雯, 史银基, 何江, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同生长期刺山柑果质量 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2235-2242.
- [23] 谷丽华, 俞桂新, 王峥涛. 基于 ABTS 自由基的薄层色谱-生物自显影新方法的建立及其在中药抗氧化活性评价中的应用 [J]. 上海中医药大学学报, 2013, 27(3): 99-104.
- [24] 姚新成, 刘谢英, 张婷, 等. 薄层色谱-生物自显影观察新疆两色金鸡菊中清除自由基和抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2017, 38(4): 308-313.
- [25] 丁晓艳, 赵英博, 王伟杰, 等. 薄层色谱-生物自显影技术在活性物质筛选中的应用 [J]. 实用药物与临床, 2017, 20(10): 1220-1224.

[责任编辑 时圣明]