

HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别评价菊苣子质量

陈 旭^{1,2}, 姜建双³, 李德华^{1,2}, 何 江^{2*}

1. 新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830017

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830004

3. 中国医学科学院-北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 建立腺毛菊苣 *Cichorium glandulosum* 种子(菊苣子药材)和混伪品菊苣 *Cichorium intybus* 种子 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定,并结合化学模式识别法对二者进行分析比较,为其资源利用开发和进一步的质量控制研究提供参考。**方法** 采用 YMC-PACK ODS-A 色谱柱,以 0.2%磷酸溶液(A)-甲醇(B)为流动相梯度洗脱,体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm,柱温为 40 ℃,进样量为 5 μL。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》建立 19 批腺毛菊苣种子和 4 批菊苣种子样品的 HPLC 指纹叠加图谱并分析相似度,通过对照品比对指认,确定化学成分并进行含量测定,使用 SPSS 20.0 和 SIMCA-P 14.1 软件进行聚类分析、主成分分析(principal component analysis, PCA)分析和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)分析,对不同批次样品进行质量评价。**结果** 建立了 19 批腺毛菊苣种子和 4 批菊苣种子 HPLC 指纹叠加图谱,并确定 19 个共有峰,通过对照品比对指认了其中 8 个色谱峰;建立了绿原酸、秦皮乙素、1,4-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、1,5-二咖啡酰奎宁酸含量测定方法;指纹图谱相似度在 0.915~0.998;OPLS-DA 分析与 PCA 分析结果一致,可将样品分为 3 组,并筛选出 1,5-二咖啡酰奎宁酸、槲皮素、绿原酸、菊苣酸 4 个差异性成分。**结论** 通过 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别方法,建立了一种简单可靠的菊苣子药材质量评价方法,为菊苣子药材的质量评价和资源化利用提供依据。

关键词: 腺毛菊苣;高效液相色谱;指纹图谱;化学模式识别;质量评价;1,5-二咖啡酰奎宁酸;槲皮素;绿原酸;菊苣酸

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4526-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.024

Quality evaluation of chicory seed based on HPLC fingerprint and multi-component quantification combined with chemical pattern recognition

CHEN Xu^{1,2}, JIANG Jianshuang³, LI Dehua^{1,2}, HE Jiang²

1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830017, China

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint spectra and multi-component content determination of *Cichorium glandulosum* seeds (chicory seed medicinal material) and counterfeit *C. intybus* seeds, and analyze and compare the two using chemical pattern recognition method, providing reference for their resource utilization and further quality control research. **Methods** YMC-PACK ODS-A chromatography column was used, with a gradient elution of 0.2% phosphoric acid solution (A) - methanol (B) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 40 ℃, and the injection amount was 5 μL. Using the similarity evaluation system for traditional Chinese medicine chromatography fingerprint (2012 version), HPLC fingerprint overlay spectra were established for 19 batches of *C. glandulosum* seeds and four batches of *C. intybus* seeds samples, and similarity was analyzed. By comparing and identifying the control samples, chemical components were confirmed and content was determined. Cluster analysis, principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were performed using SPSS 20.0 and SIMCA-P 14.1 softwares to evaluate the quality of different batches of samples. **Results** A HPLC fingerprint overlay map was established for 19 batches of *C. glandulosum* seeds and four batches of *C. intybus* seeds, and 19 common peaks were identified. A total of eight chromatographic peaks were identified through comparison with the control samples;

收稿日期: 2023-12-02

基金项目: “天山英才”-青年拔尖人才项目(2022TSYCCX0022);新疆维吾尔自治区重点研发项目(2022B03007-2)

作者简介: 陈 旭(1993—),男,硕士研究生,研究方向为生物与医药。E-mail: 1124551125@qq.com

*通信作者: 何 江(1979—),研究员,研究方向为生药与药用植物资源。Tel: (0991)2320292 E-mail: hj_1211@163.com

A method for determining the content of chlorogenic acid, aesculetin, 1,4-dicaffeoyl quinic acid, isochlorogenic acid A, and 1,5-dicaffeoyl quinic acid had been established; The similarity of fingerprint spectra was between 0.915 and 0.998; The results of OPLS-DA were consistent with those of PCA. The samples can be divided into three groups and four differential components, including 1,5-dicaffeoylquinic acid, quercetin, chlorogenic acid, and cichoric acid, can be selected. **Conclusion** A simple and reliable quality evaluation method for chicory seed medicinal material was established by combining HPLC fingerprint with chemical pattern recognition, providing a basis for the quality evaluation and resource utilization of chicory seed medicinal material.

Key words: *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet.; high performance liquid chromatography; fingerprint; chemical pattern recognition; quality evaluation; 1,5-dicaffeoylquinic acid; quercetin; chlorogenic acid; cichoric acid

菊苣子为菊科菊苣属植物腺毛菊苣 *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. 的干燥成熟种子, 俗称毛菊苣子(菊苣子药材), 主要分布于我国新疆和国外的高加索、土耳其等地^[1]。《新疆维吾尔自治区维吾尔药材标准》中记载, 菊苣子用于清热解毒、消肿利尿、湿热黄疸和肝硬化腹水^[2], 有文献报道腺毛菊苣种子、根以及地上部分均可入药^[3], 其种子常以与其他药用部位配伍的形式出现于维吾尔医传统方剂中^[4], 例如复方木尼孜其颗粒, 护肝布祖热颗粒, 迪娜尔糖浆等, 具有保肝、消炎、改善体液异常的作用。另外市场上常出现菊苣 *Cichorium intybus* L. 的种子充当菊苣子药材使用, 二者性状极为相似, 极易混淆, 但基原不同, 导致成分存在一定差异, 不能一概而论。目前针对腺毛菊苣种子和菊苣种子的对比研究较少, 缺乏成分全面深入的研究, 故实验收集二者不同产地样品, 建立 HPLC 指纹图谱进行对比研究, 并采用聚类分析(cluster analysis, CA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)等化学计量学方法进行差异分析, 并测定其中 5 个共有成分绿原酸、秦皮乙素、1,4-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、1,5-二咖啡酰奎宁酸的含量, 以期对菊苣子药材质量控制及药效物质基础研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); MS105DU 型电子天平(瑞士梅特勒-托利公司); UPC-1-10T 型超纯水仪(四川优普超纯科技有限公司); DZTW 型调温电热套(北京永光明医疗仪器有限公司); FW-80 型高速万能粉碎机(北京永光明医疗仪器有限公司); KQ-5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); EYELA N-1300 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 材料

秦皮甲素(批号 110740-201806)、4-羟基苯甲

酸(批号 101149-202204)、绿原酸(批号 110753-202119)、秦皮乙素(批号 110741-202109)、菊苣酸(批号 111752-202105)、槲皮素(批号 100081-201610)、异鼠李素(批号 110860-201410)购自中国食品药品检定研究院; 异绿原酸 A(批号 PS001052)、1,4-二咖啡酰奎宁酸(批号 PS230627-06)、1,5-二咖啡酰奎宁酸(批号 PS011115)购自成都普思生物科技股份有限公司; α -亚麻酸(批号 S16HB192030)购自上海源叶生物科技有限公司; 所有对照品质量分数均大于 98%; 甲醇、磷酸为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。经新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定 S1~S19 批药材为菊科植物腺毛菊苣 *C. glandulosum* Boiss. et Huet. 干燥成熟的种子, S20~S23 为菊科植物菊苣 *C. intybus* L. 干燥成熟的种子, 所有样品采收后放置于阴凉通风处自然晾干, 使用前粉碎过 40 目筛后置于干燥器中备用。样品具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: YMC-PACK ODS-A (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.2%磷酸溶液(A)-甲醇(B); 洗脱梯度: 0~5 min, 5%~15% B; 5~10 min, 15%~20% B; 10~15 min, 20%~27.5% B, 15~20 min, 27.5%~30% B; 20~30 min, 30%~37% B; 30~40 min, 37% B; 40~45 min, 37%~50% B; 45~50 min, 50%~60% B; 50~60 min, 60%~65% B; 60~65 min, 65%~85% B; 65~70 min, 85%~100% B; 70~80 min, 100% B; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样量 5 μ L。

2.2 对照品溶液制备

精确称定秦皮甲素、4-羟基苯甲酸、绿原酸、秦皮乙素、菊苣酸、1,4-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、1,5-二咖啡酰奎宁酸、槲皮素、异鼠李素、 α -亚麻酸 11 种对照品, 加甲醇配制成质量浓度为 0.043 3、

表 1 不同批次药材样品信息
Table 1 Sample information of different batches of medicinal materials

编号	产地	编号	基原植物
S1	新疆吉木萨尔泉水街	20221220	腺毛菊苣种子
S2	新疆	Z30040605	腺毛菊苣种子
S3	新疆和田	2015 (1)	腺毛菊苣种子
S4	新疆和田	2015 (2)	腺毛菊苣种子
S5	新疆和田	2015 (3)	腺毛菊苣种子
S6	新疆	20220808	腺毛菊苣种子
S7	新疆	Z30051901	腺毛菊苣种子
S8	新疆	Z30270821	腺毛菊苣种子
S9	新疆	Z30275902	腺毛菊苣种子
S10	新疆	Z30275904	腺毛菊苣种子
S11	新疆	150817	腺毛菊苣种子
S12	新疆吉木萨尔	20210929	腺毛菊苣种子
S13	新疆和田骨髓茶叶店	2022	腺毛菊苣种子
S14	新疆墨玉县	20220807-10	腺毛菊苣种子
S15	成都故乡特色产品店	2022	腺毛菊苣种子
S16	成都赤心特色产品店	2022	腺毛菊苣种子
S17	辽宁	20230506	腺毛菊苣种子
S18	辽宁	20230504	腺毛菊苣种子
S19	巴基斯坦花茶店	2021	腺毛菊苣种子
S20	伊犁	2022	菊苣种子
S21	新疆乌鲁木齐哈熊沟	20230906	菊苣种子
S22	新疆乌鲁木齐柏杨河村	20230911	菊苣种子
S23	新疆乌鲁木齐柏杨河村	20230911	菊苣种子

0.040 5、0.044 5、0.047 0、0.046 7、0.041 5、0.045 0、0.045 8、0.042 5、0.043 7、0.083 3 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精确称定 23 批次药材粉末 2 g，精密加入 60% 乙醇 20 mL，加热回流提取 3 h，冷却至室温，过滤后减压蒸干，于 5 mL 量瓶，用甲醇定容至刻度，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 精确称定腺毛菊苣种子粉末 (S1)，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次，以 19 号色谱峰 1,5-二咖啡酰奎宁酸色谱峰为参照峰 (S)，计算各共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.07%，相对峰面积 RSD 值均小于 3.63%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精确称定腺毛菊苣种子粉末

(S1)，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，以 19 号色谱峰 1,5-二咖啡酰奎宁酸色谱峰为参照峰 (S)，计算各共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.37%，相对峰面积 RSD 值均小于 4.6%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 精确称定腺毛菊苣种子粉末 (S1)，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项下色谱条件进样测定，以 19 号色谱峰 1,5-二咖啡酰奎宁酸色谱峰为参照峰 (S)，计算各共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.38%，相对峰面积 RSD 值均小于 4.38%，表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立和相似度分析

2.5.1 指纹图谱的建立 取 23 批次药材样品粉末按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定分析，将结果色谱图数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》，以 S1 号样品色谱图为参照图谱，设置时间窗宽度为 0.1，采用中位数法生成叠加指纹图谱进行多点校正，生成叠加图谱及对照图谱。结果表明 19 批腺毛菊苣种子样品 HPLC 图谱指认出 25 个共有峰，其中峰 10~13、16~19、21~23 经过对照品指认分别为秦皮甲素、4-羟基苯甲酸、绿原酸、秦皮乙素、菊苣酸、1,4-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、1,5-二咖啡酰奎宁酸、槲皮素、异鼠李素、α-亚麻酸。19 批腺毛菊苣种子样品叠加指纹图谱和对照图谱见图 1。

混合对照品图谱见图 2。另将 4 批菊苣种子样品 HPLC 图谱与上述 19 批腺毛菊苣种子 HPLC 图谱进行叠加，得到 23 批样品 HPLC 叠加指纹图谱，见图 3，识别出 19 个共有峰，相较于 19 批腺毛菊苣种子样品 HPLC 指纹图谱的 25 个共有峰，缺少了 11 (4-羟基苯甲酸)、15、20、22 (异鼠李素)、23 (α-亚麻酸)、24 号峰。根据指纹图谱色谱峰数量和面积可以初步判断腺毛菊苣种子和菊苣种子的成分种类以及含量均具有差异。

2.5.2 相似度分析 以生成的对照指纹图谱为标准，计算 23 批样品的相似度，结果如表 2 所示，样品相似度为在 0.915~0.998，其中 4 批菊苣种子样品 (S20~S23) 相似度评分明显低于腺毛菊苣子样品 (S1~S19)，说明指纹图谱可以初步对腺毛菊苣种子和菊苣种子进行区分，并用于对菊苣子质量进行综合评价。

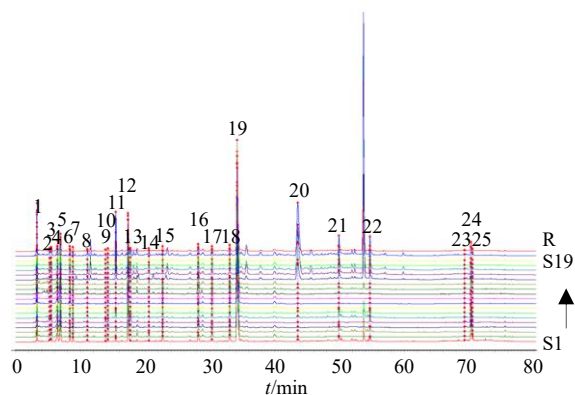
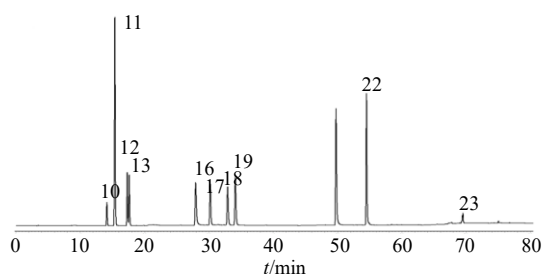


图 1 腺毛菊苣种子样品的叠加指纹图谱和对照指纹图谱(R)

Fig. 1 Overlapping fingerprint of *C. glandulosum* seed samples and control fingerprint (R)



10-秦皮甲素; 11-4-羟基苯甲酸; 12-绿原酸; 13-秦皮乙素; 16-菊苣酸; 17-1,4-二咖啡酰奎宁酸; 18-异绿原酸 A; 19-1,5-二咖啡酰奎宁酸; 22-异鼠李素; 23- α -亚麻酸。

10-aesculin; 11-4-hydroxybenzoic acid; 12-chlorogenic acid; 13-aesculetin; 16-chicory acid; 17-1,4-dicaffeoyl quinic acid; 18-isochlorogenic acid A; 19-1,5-dicaffeoyl quinic acid; 22-isorhamnosum; 23- α -linolenic acid.

图 2 混合对照品 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed reference substance

表 2 23 批样品指纹图谱相似度分析结果

Table 2 Similarity analysis results of fingerprint spectra of 23 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.997	S7	0.998	S13	0.990	S19	0.990
S2	0.995	S8	0.996	S14	0.985	S20	0.927
S3	0.998	S9	0.997	S15	0.985	S21	0.972
S4	0.998	S10	0.997	S16	0.988	S22	0.933
S5	0.979	S11	0.997	S17	0.998	S23	0.915
S6	0.998	S12	0.997	S18	0.997		

原酸、秦皮乙素、1,4-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、1,5-二咖啡酰奎宁酸的混合对照品溶液贮备液，取适量上述混合对照品溶液贮备液，用甲醇稀释成系列浓度的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，计算线性回归方程，结果见表 3。

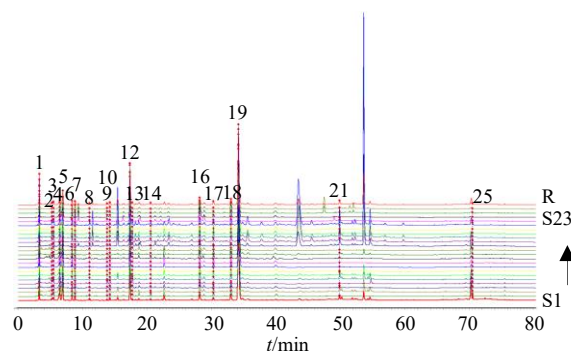


图 3 腺毛菊苣种子和菊苣种子样品的叠加指纹图谱及对对照指纹图谱 (R)

Fig. 3 Overlapping fingerprint of *C. glandulosum* and *C. intybus* seed samples and control fingerprint (R)

2.6 化学成分含量测定

实验通过对照品比对，指认出 19 批腺毛菊苣种子和 4 批菊苣种子样品中 8 个共有峰，分别为秦皮甲素（峰 10）、绿原酸（峰 12）、秦皮乙素（峰 13）、菊苣酸（峰 16）、1,4-二咖啡酰奎宁酸（峰 17）、异绿原酸 A（峰 18）、1,5-二咖啡酰奎宁酸（峰 19），选取其中峰型较好，峰面积较大的绿原酸（峰 12）、秦皮乙素（峰 13）、1,4-二咖啡酰奎宁酸（峰 17）、异绿原酸 A（峰 18）、1,5-二咖啡酰奎宁酸（峰 19）5 个成分建立含量测定方法，测定 23 批样品中的含量。

2.6.1 线性关系考察 精确称取绿原酸、秦皮乙素、1,4-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、1,5-二咖啡酰奎宁酸标准品适量，用甲醇配置成质量浓度分别为 0.534、0.141、0.124 5、0.135、1.71 mg/mL 的绿

2.6.2 精密度试验 精确称定腺毛菊苣种子粉末 (S1)，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录各成分峰面积，计算峰面积 RSD 值小于 1.36%，表明该仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性试验 精确称定腺毛菊苣种子粉末

表 3 5 个化学成分的线性关系考察结果

Table 3 Linear relationship inspection results of five chemical components

成分	回归方程	r^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
绿原酸	$Y=7\,065.4\,X+25.382$	0.999 7	53.400~534.000
秦皮乙素	$Y=6\,701.7\,X+18.693$	0.999 0	14.100~141.000
1,4-二咖啡酰奎宁酸	$Y=8\,669.1\,X-34.35$	0.999 8	12.450~124.500
异绿原酸 A	$Y=7\,224.1\,X+7.675$	0.999 3	13.500~135.000
1,5-二咖啡酰奎宁酸	$Y=8\,154.4\,X+122.02$	0.999 5	171.000~1\,710.000

(S1), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h, 在“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录各成分峰面积, 计算峰面积 RSD 值, RSD 值均小于 3.57%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.4 重复性试验 精确称定腺毛菊苣种子样品粉末 (S1) 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录各成分峰面积, 计算质量分数, RSD 值均小于 2.16%, 表明该方法重复性良好。

2.6.5 加样回收率试验 精确称定 1 g 腺毛菊苣种子样品粉末 (S1) 6 份, 分别加入一定量对

照品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, “2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱峰面积, 计算回收率和 RSD 值, 绿原酸、秦皮乙素、1,4-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、1,5-二咖啡酰奎宁酸的平均回收率分别为 101.03%、105.48%、111.35%、103.00%、103.25%, RSD 值均小于 5%。

2.6.6 样品含量测定 取 23 批次药材样品粉末, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项下色谱条件进样测定, 将测得 5 个成分的峰面积, 根据线性回归方程计算各样品中 5 个成分的质量分数, 结果见表 4。

表 4 腺毛菊苣种子和菊苣种子样品中 5 个化学成分含量测定结果

Table 4 Content determination results of five chemical components in *C. glandulosum* and *C. intybus* seed samples

编号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	绿原酸	秦皮乙素	1,4-二咖啡酰奎宁酸	异绿原酸 A	1,5-二咖啡酰奎宁酸
S1	0.900 4	0.034 8	0.076 6	0.223 4	3.300 5
S2	0.758 5	0.083 1	0.135 4	0.221 1	3.264 3
S3	0.923 0	0.057 2	0.134 0	0.223 1	3.429 3
S4	0.790 0	0.088 9	0.110 6	0.195 6	3.133 4
S5	0.490 2	0.241 0	0.054 0	0.104 7	1.450 9
S6	0.734 6	0.044 1	0.104 7	0.171 7	2.678 2
S7	1.055 3	0.047 7	0.141 2	0.237 2	3.697 3
S8	0.907 3	0.044 9	0.141 6	0.193 2	3.421 9
S9	0.892 4	0.055 8	0.136 2	0.189 3	3.342 9
S10	1.006 5	0.068 6	0.150 6	0.209 6	3.679 9
S11	1.032 4	0.083 2	0.159 8	0.277 3	4.328 1
S12	1.115 4	0.043 4	0.169 5	0.271 5	4.319 4
S13	0.766 8	0.114 9	0.154 0	0.237 1	3.355 6
S14	0.612 4	0.124 5	0.066 1	0.154 8	1.408 7
S15	0.761 4	0.159 6	0.132 0	0.217 8	2.509 4
S16	0.897 0	0.144 5	0.174 8	0.227 2	2.888 3
S17	1.150 3	0.106 0	0.191 9	0.207 7	3.961 8
S18	1.194 3	0.125 5	0.236 4	0.211 8	4.168 6
S19	0.890 1	0.185 3	0.176 8	0.245 4	3.071 0
S20	0.857 4	0.072 4	0.060 3	0.177 6	1.153 4
S21	1.222 5	0.033 4	0.090 4	0.289 9	2.450 7
S22	1.481 2	0.031 4	0.059 8	0.411 5	2.069 2
S23	1.310 6	0.025 7	0.045 0	0.297 3	1.638 5

2.7 化学模式识别

2.7.1 聚类分析 将 23 批腺毛菊苣种子和菊苣种子样品共有峰的峰面积数据导入 SPSS 20.0 软件, 采用组间联接、平方欧式距离法进行系统聚类分析, 结果见图 4。当欧氏距离为 25 时, 23 批次药材样品可分为 2 大类, 其中 S5、S14、S20~23 归为第 1 类, 其余产地归为第 2 类。当欧氏距离为 7 时, 第一类又可分为 2 小类, 其中 S1、S7、S10、S12、S17、S18 为一类, 其余样品为另一类。当欧氏距离为 5 时, 第 2 类也可分为 2 小类, S5、S14、S20 为一类, S21~S23 归为一类。

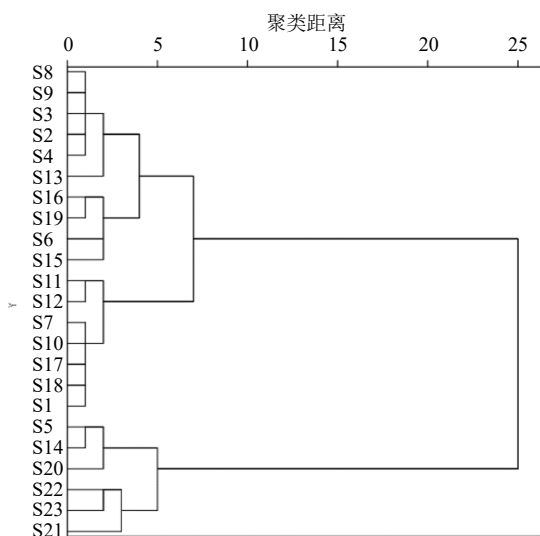


图 4 腺毛菊苣种子和菊苣种子系统聚类分析图

Fig. 4 System cluster analysis diagram of *C. glandulosum* and *C. intybus* seeds

2.7.2 主成分分析 将 23 批腺毛菊苣种子和菊苣种子样品共有峰的峰面积数据导入 SPSS 20.0 软件, 进行主成分分析, 以主成分特征值 >1 为提取标准并生成因子得分系数矩阵^[5]。结果 Bartlett 球形检定显著性 $P<0.001$, 说明拒绝变量相互独立的假设, 主成分分析成立, 共得到 5 个主成分, 方差贡献率分别为 31.442%、23.883%、13.265%、9.062%、7.103%, 累积方差贡献率为 84.755%, 说明这 5 个主成分可解释原有变量 84.755% 的信息, 表明 5 个主成分可以代替原指纹图谱 19 个共有峰评价原样品, 特征值及贡献率见表 5。

因子载荷矩阵反映了各主成分与 19 个共有峰即原始变量之间的相关系数, 结果见表 6, 主成分因子 1 特征值为 5.974, 主要反映了共有色谱峰 1、2、3、8、13、14、21、25 的信息, 主成分因子 2 特

表 5 特征值及方差贡献率

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.974	31.442	31.442
2	4.538	23.883	55.326
3	2.520	13.265	68.591
4	1.722	9.062	77.653
5	1.349	7.103	84.755

征值为 4.538, 主要反映了色谱峰 4、5、6、14、17 的信息, 主成分因子 3 特征值为 2.520, 主要反映了色谱峰 12、16、18 的信息。主成分因子 4 特征值为 1.722, 主要反映了色谱峰 7 的信息, 主成分因子 5 特征值为 1.349, 主要反映了色谱峰 9、10 的信息。

利用 SPSS 20.0 软件计算 23 批腺毛菊苣种子和菊苣种子样品主成分得分, 并以各主成分对应的贡献率为权重系数计算综合得分, 结果见表 7。其中 S19、S16、S15、S13 腺毛菊苣种子样品排名靠前, 说明这 4 批腺毛菊苣种子质量较好, 而 4 批菊苣种子 S20、S23、S21、S22 排名均靠后, 说明相较于腺毛菊苣种子这 4 批菊苣种子质量相对较差, 进一步体现了腺毛菊苣种子与菊苣种子之间的差异。

2.7.3 OPLS-DA 分析 为了更直观地体现组间差异, 进行 OPLS-DA 建模分析, 筛选出对组间差异贡献率较大的成分。以 23 批次腺毛菊苣种子和菊苣种子样品指纹图谱中 19 个共有峰峰面积为变量导入 SIMCA-P 14.1 软件, 进行 OPLS-DA 建模分析, 建立模型。OPLS-DA 得分结果(图 5), $R^2_X(\text{cum})=0.833$, $R^2_Y(\text{cum})=0.789$, $Q^2(\text{cum})=0.708$, 说明模型具有较好的解释预测能力, 通过 200 次置换验证(图 6), R^2 和 Q^2 的回归线斜率均大于 0, R^2 和 Q^2 的回归线截距为 0.195 和 -0.518, 表明置换验证结果较为理想, 不存在过拟合现象出现, OPLS-DA 得分图结果表明 23 批药材样品被分为 3 类, 成都和巴基斯坦腺毛菊苣种子(S15、S16、S19)为一类, 所有新疆和辽宁腺毛菊苣种子为一类, 所有菊苣种子(S20~S23)为一类, 可以说明不同地区腺毛菊苣种子之间以及腺毛菊苣种子和菊苣种子之间均存在差异。变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值是筛选差异性化合物的重要指标, 成分 VIP 值越大, 表明该成分对组间差异的影响越大^[6]。通过对 VIP 值进行分析, 得到差异性标记物的 VIP 得分图(图 7)。以 VIP 值 >1 为阈值, 推测峰 19(1,5-二咖啡酰奎宁酸), 峰 21(槲皮素)、峰 12(绿原酸)、峰 16(菊苣酸)可能为对组

表 6 因子载荷矩阵
Table 6 Factor load matrix

共有峰编号	载荷				
	1	2	3	4	5
1	0.478	0.190	0.176	-0.577	0.239
2	0.859	0.258	-0.018	0.281	0.166
3	0.933	0.166	-0.019	0.134	0.094
4	-0.302	0.594	-0.527	0.349	0.136
5	-0.384	0.835	-0.300	-0.071	0.036
6	-0.030	0.763	0.304	-0.095	-0.163
7	-0.732	0.228	-0.012	0.406	0.277
8	0.773	0.068	0.291	0.531	-0.050
9	-0.014	-0.640	0.055	-0.257	0.598
10	-0.209	0.047	-0.799	0.253	0.357
12	-0.661	0.397	0.482	0.052	0.114
13	0.826	-0.199	-0.160	-0.039	0.409
14	0.714	0.542	0.259	-0.277	0.087
16	-0.522	-0.016	0.547	0.228	0.439
17	0.330	0.826	-0.071	-0.222	0.084
18	-0.454	0.308	0.707	0.106	0.048
19	0.017	0.905	-0.276	-0.139	-0.099
21	0.672	0.220	0.300	0.566	0.062
25	0.225	-0.417	-0.078	0.214	-0.492

表 7 腺毛菊苣种子和菊苣种子样品主成分得分和综合得分
Table 7 Principal component scores and comprehensive scores of *C. glandulosum* and *C. intybus* seed samples

编号	得分						排序
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5	综合	
S1	-3.067	1.958	-0.206	0.327	-0.141	-1.129	12
S2	2.286	0.509	0.087	-0.286	-0.141	2.456	7
S3	-2.347	0.957	-0.669	0.270	0.046	-1.744	15
S4	-0.309	-0.918	-0.395	-0.129	-0.002	-1.753	16
S5	3.736	-4.506	-1.248	0.011	0.254	-1.754	17
S6	-0.969	-0.980	-0.501	0.211	-0.097	-2.336	18
S7	-3.714	1.449	-0.425	0.162	0.030	-2.499	19
S8	-1.366	0.862	-0.290	-0.168	-0.158	-1.119	11
S9	-1.126	0.388	-0.324	-0.163	-0.133	-1.359	13
S10	-1.520	1.374	-0.306	-0.152	-0.061	-0.665	9
S11	0.869	2.046	0.096	-0.088	0.046	2.970	5
S12	-4.034	2.999	0.016	0.153	0.059	-0.808	10
S13	4.138	0.298	0.313	-0.468	0.045	4.327	4
S14	4.313	-5.824	-0.055	0.069	-0.226	-1.723	14
S15	8.254	0.294	0.626	0.160	0.005	9.339	3
S16	8.624	1.071	0.398	0.303	0.012	10.408	2
S17	-0.244	1.698	-0.168	-0.204	0.073	1.156	8
S18	0.221	2.932	-0.275	-0.205	0.085	2.758	6
S19	8.635	1.757	0.624	0.152	0.074	11.242	1
S20	-2.407	-3.895	0.436	-0.065	0.103	-5.828	20
S21	-7.179	-1.021	0.583	0.062	0.141	-7.414	22
S22	-6.732	-1.973	1.133	-0.039	0.029	-7.582	23
S23	-6.062	-1.472	0.550	0.087	-0.044	-6.942	21

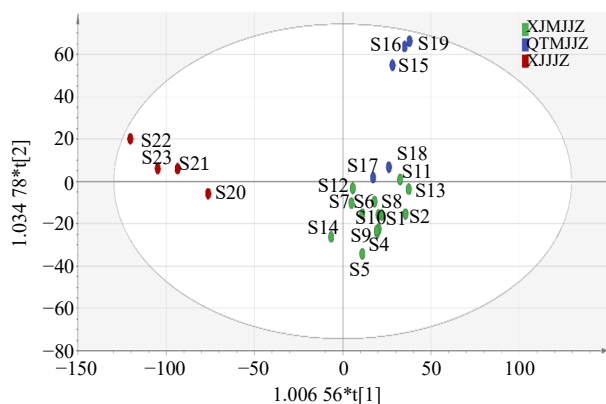


图 5 腺毛菊苣种子和菊苣种子样品 OPLS-DA 得分平面图
Fig. 5 OPLS-DA score plan of *C. glandulosum* and *C. intybus* seed samples

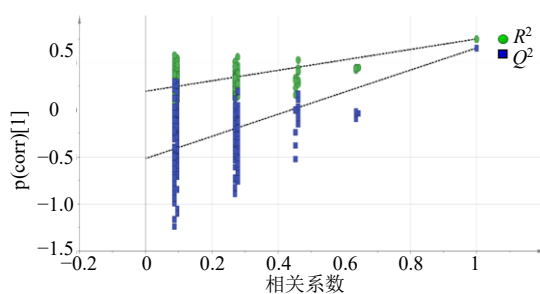


图 6 腺毛菊苣种子和菊苣种子样品置换验证图
Fig. 6 Permutation verification chart of *C. glandulosum* and *C. intybus* seed samples

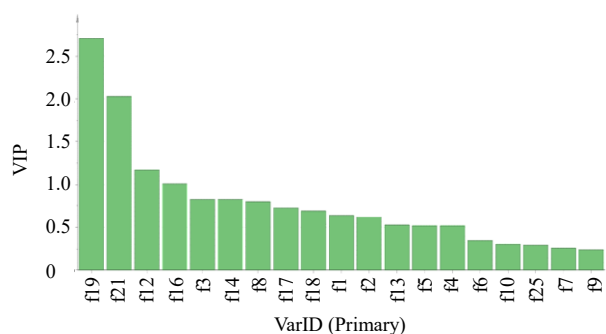


图 7 腺毛菊苣种子和菊苣种子样品共有色谱峰 VIP 得分图
Fig. 7 VIP scores of common chromatographic peaks in *C. glandulosum* and *C. intybus* seed samples

间差异影响较大的成分，是菊苣子质量控制的关键成分。

3 讨论

实验分别考察了不同提取溶剂（超纯水，50%、60%、70%、80%、90%、100%甲醇，50%、60%、

70%、80%、90%、95%乙醇），提取方法（超声提取法、加热回流提取法），提取时间（1、2、3、5、7 h），提取次数（1、2、3 次）。色谱条件考察了不同流动相（甲醇-0.1%磷酸、甲醇-0.2%磷酸、甲醇-0.4%磷酸、乙腈-0.2%磷酸、甲醇-0.2%甲酸、甲醇-0.2%乙酸），柱温（25、30、40 ℃），进样量（5、10 μL），此外还对供试品溶液进行 200~400 nm 全波长扫描，发现样品经 60%乙醇加热回流单次提取 3 h，在流动相为甲醇-0.2%磷酸、柱温 40 ℃、进样量 5 μL、检测波长 254 nm 的液相条件下，指纹图谱色谱峰分离度、峰型、峰数量、塔板数均较高，指纹图谱的整体效果最佳，可满足指纹图谱的建立要求。

实验对 23 批次腺毛菊苣种子、菊苣种子叠加指纹图谱进行比较，结果显示腺毛菊苣种子和菊苣种子的图谱色谱峰数量和色谱峰面积均存在差异。19 批腺毛菊苣种子叠加指纹图谱比 23 批腺毛菊苣种子和菊苣种子的指纹叠加图谱多识别出了 6 个共有峰，多指认出了 4-羟基苯甲酸、异鼠李素、α-亚麻酸 3 个共有成分，表明腺毛菊苣种子所含成分种类更加丰富，其中 4-羟基苯甲酸具有抗菌、抗炎的功效^[7-8]，α-亚麻酸可以降低血糖、调血脂并且能有效改善非酒精性脂肪肝病^[9-10]，验证了腺毛菊苣种子作为菊苣子药材使用具有更好的抗菌、抗炎、调血脂、保肝活性的科学性。

为了更加客观全面地评价了腺毛菊苣种子和菊苣种子的质量，利用化学模式识别法对 23 批腺毛菊苣种子和菊苣种子化学组分进行分析^[11]，在对指纹图谱的相似度分析中，样品相似度均大于 0.9，但 4 批菊苣种子相似度明显低于其他批次腺毛菊苣种子，体现了腺毛菊苣种子和菊苣种子样品之间化学成分含量的差异。聚类分析中在欧式距离为 10 时，样品被分为 2 类，推测 S5 和 S14 2 批样品因质量较差与 S20~S23 菊苣种子同为一类。根据 PCA 分析综合得分结果，推测产于巴基斯坦和成都的 3 批腺毛菊苣种子样品整体质量较高，腺毛菊苣种子与菊苣种子样品之间整体质量存在一定差距，与指纹图谱研究结果相对一致。OPLS-DA 分析结果结合腺毛菊苣种子样品产地地理位置，由于新疆和辽宁纬度相近，成都和巴基斯坦纬度相近，推测造成腺毛菊苣种子种内差异的主要因素可能与纬度有关，腺毛菊苣种子和菊苣种子则因为药材基原的不同存在种间差异，表明 OPLS-DA 分析结果与聚类分析和 PCA 分析结果趋于一致且进行相应补充。VIP 值分

析筛选出 1,5-二咖啡酰奎宁酸(峰 19)、槲皮素(峰 21)、绿原酸(峰 12)等重要成分,其中咖啡酰奎宁酸类化合物具有抗氧化、抗炎、抗微生物和保肝作用^[12],1,5-二咖啡酰奎宁酸在保肝、抗肝损伤、治疗肝纤维化和乙型肝炎方面具有突出的效果,绿原酸也被证实具有降尿酸的功效^[13]。槲皮素具有抗氧化、抗癌、抗炎等多种生物学活性的黄酮类化合物,通常是植物药材发挥疗效的关键成分^[14],这些成分生理活性均与菊苣子药材药理活性吻合,具有成为质量标志物的潜力。

综上,本实验建立了一种快速、稳定的腺毛菊苣种子和混伪品菊苣种子品质评价及含量测定方法,根据 19 批腺毛菊苣种子 HPLC 指纹图谱,确定了 25 个共有峰,通过对照品比对确认了 11 个共有峰所代表成分。又根据 19 批腺毛菊苣种子和 4 批菊苣种子 HPLC 指纹图谱确定了 19 个共有峰,确认了 8 个共有峰所代表成分,并测定了其中峰型较好,峰面积较大的 5 个成分的含量。结合化学模式识别法确定了腺毛菊苣种子和混伪品菊苣种子之间的质量差异,筛选出 4 个差异指标物:1,5-二咖啡酰奎宁酸、槲皮素、绿原酸和菊苣酸,为菊苣子资源开发和利用提供了有力依据,为菊苣子的质量评价提供了参考,后续还可将菊苣子 HPLC 指纹图谱与其药效活性研究相结合,通过建立谱-效关系,明确质量标志物,确定反映菊苣子内在质量的评价方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 马其云等编著. 中国植物志-拉丁名索引: 1959—1992 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 分卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 326-328.
- [3] 新疆维吾尔自治区食品药品监督管理局. 新疆维吾尔自治区维吾尔药材标准 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人们卫生出版社, 2010: 56.
- [4] 李茜, 杨建华, 臧薇, 等. 毛菊苣根-毛菊苣子配伍的化学成分研究 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(5): 584-588.
- [5] 周冰倩, 高喜梅, 杨颖, 等. 不同来源竹茹药材 HPLC 指纹图谱和化学计量学分析 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 853-857.
- [6] 王娜, 程璐, 王浩, 等. 茯神指纹图谱结合化学模式识别和多指标成分定量研究 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 279-286.
- [7] 黄宇飞, 张楠, 周忠玉, 等. 毡毛马兰酚性成分及其抗肿瘤活性 [J]. 中成药, 2020, 42(11): 2922-2926.
- [8] 陈淋敏. 一点红化学成分分离、分析及抗氧化活性研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- [9] 常松林, 高晓余, 柳双凤, 等. α -亚麻酸对高脂饮食和链脲佐菌素诱导 II 型糖尿病模型小鼠的降血糖作用 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 86-94.
- [10] 李晓钰, 郑明明, 郭艳, 等. α -亚麻酸植物甾醇酯抑制氧化应激改善非酒精性脂肪性肝病 [J]. 营养学报, 2020, 42(6): 575-580.
- [11] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 231-237.
- [12] 赵昱, 赵军, 李湘萍, 等. 咖啡酰奎宁酸类化合物研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11): 869-874.
- [13] Zhu C S, Zhang B, Lin Z J, *et al.* Relationship between high-performance liquid chromatography fingerprints and uric acid-lowering activities of *Cichorium intybus* L [J]. *Molecules*, 2015, 20(5): 9455-9467.
- [14] Yao L H, Jiang Y M, Shi J, *et al.* Flavonoids in food and their health benefits [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2004, 59(3): 113-122.

[责任编辑 时圣明]