

基于 UPLC 指纹图谱及多指标成分测定结合化学计量学评价不同来源紫菀药材的质量

李蕊, 徐荣荣, 张楚涵, 王鑫国, 牛丽颖, 冯薇*

河北中医药大学药学院, 中药材品质评价与标准化河北省工程研究中心, 河北 石家庄 050091

摘要: 目的 建立紫菀 *Aster tataricus* 的 UPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法, 并结合化学计量学方法寻找不同产地紫菀药材质量差异成分, 为其质量控制研究提供技术方法和基础数据。方法 采用菲罗门 Titank C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 以 0.2% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B) 溶液为流动相, 梯度洗脱 (0~3 min, 5%~9% B; 3~13 min, 9%~10% B; 13~15 min, 10%~16% B; 15~20 min, 16% B; 20~50 min, 16%~28% B; 50~54 min, 28%~51% B; 54~64 min, 51%~100% B; 64~74 min, 100% B; 74~76 min, 100%~5% B), 体积流量为 0.3 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 2 μL, 检测波长采用定时波长 (0~50 min, 325 nm; 50~70 min, 260 nm; 70~76 min, 203 nm)。采用中药指纹图谱相似度评价软件进行相似度评价, 结合化学计量学分析, 同时对绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚、紫菀酮的含量进行测定。结果 建立了紫菀药材的指纹图谱, 共标记了 17 个共有峰, 基于对照品比对法及质谱鉴定指认 9 个色谱峰, 分别为峰 1 (绿原酸)、峰 3 (咖啡酸)、峰 5 (阿魏酸)、峰 10 (槲皮素)、峰 11 (asterin)、峰 12 (山柰酚)、峰 13 (甘草素)、峰 16 (豆甾醇葡萄糖苷)、峰 17 (紫菀酮)。聚类分析 (cluster analysis, CA) 将 18 批紫菀样品分为河北产地和安徽产地。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 表明, 不同产地的紫菀样品间存在差异。通过正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 项下的 VIP 分析筛选出峰 11 (asterin)、12 (山柰酚)、1 (绿原酸)、14、10 (槲皮素)、9、13 (甘草素)、17 (紫菀酮) 可能是影响不同产地、不同加工方式紫菀质量差异的标志物。绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚、紫菀酮的质量分数分别为 5.941 6~18.745 1、0.477 2~1.046 6、0.177 4~0.265 6、1.135 8~1.720 7、0.574 9~2.755 7、148.340 8~252.163 9 μg/g, 经方法学考察, 各成分呈现良好的线性关系。含量测定结果表明, 熏硫对紫菀酮含量影响较大, 经熏硫后的紫菀中紫菀酮含量显著降低。结论 以多指标成分定量结合化学计量学建立的评价方法区分了不同产地的紫菀, 评价了不同加工方式的紫菀中化学成分的含量差异, 可为紫菀药材的质量评价与控制提供科学依据及参考。

关键词: 紫菀; 指纹图谱; 不同产地; 含量测定; 化学计量学; 绿原酸; 咖啡酸; 阿魏酸; 槲皮素; asterin; 山柰酚; 甘草素; 豆甾醇葡萄糖苷; 紫菀酮

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)02-0647-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.026

Quality evaluation of *Asteris Radix et Rhizoma* from different sources based on UPLC fingerprint and multi-index component determination combined with chemometrics

LI Rui, XU Rongrong, ZHANG Chuhan, WANG Xinguo, NIU Liying, FENG Wei

Hebei Province Engineering Research Center of Quality Evaluation & Standardization of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint and multi-component content determination method for Ziwan (*Asteris Radix et Rhizoma*) from different sources, and evaluate the quality of *Asteris Radix et Rhizoma* from different sources in combination with chemometrics methods, so as to provide technical method reference and basic data for its quality control research. **Methods** Phenomenex Titank C₁₈ chromatographic column (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used, with 0.2% formic acid water (A) - acetonitrile (B) solution as mobile phase, gradient elution (0—3 min, 5%—9% B; 3—13 min,

收稿日期: 2024-07-05

基金项目: 河北省省级科技计划项目资助 (21372503D)

作者简介: 李蕊, 女, 硕士, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: lightingrose@qq.com

*通信作者: 冯薇, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0311)85216828 E-mail: rainbow10571@126.com

9%—10% B; 13—15 min, 10%—16% B; 15—20 min, 16% B; 20—50 min, 16%—28% B; 50—54 min, 28%—51% B; 54—64 min, 51%—100% B; 64—74 min, 100% B; 74—76 min, 100%—5% B). The flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 40 °C, the injection volume was 3 μ L, and the detection wavelength was set at a fixed wavelength (0—50 min, 325 nm; 50—70 min, 260 nm; 70—76 min, 203 nm). The fingerprints of *Asteris Radix et Rhizoma* from different sources were constructed, and the contents of chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, quercetin, kaempferol and shionone were determined by similarity analysis and chemometrics analysis. **Results** The fingerprints of *Asteris Radix et Rhizoma* were established. A total of 17 common peaks were marked. Nine chromatographic peaks were identified by the comparison method of reference substances and MS identification, which were peak 1 (chlorogenic acid), peak 3 (caffeic acid), peak 5 (ferulic acid), peak 10 (quercetin), peak 11 (asterin), peak 12 (kaempferol), peak 13 (liquiritigenin), peak 16 (stigmaterol glucoside), and peak 17 (shionone). Eighteen batches of *Asteris Radix et Rhizoma* samples were divided into Hebei origin and Anhui origin by cluster analysis (CA). Principal component analysis (PCA) showed that there were differences among *Asteris Radix et Rhizoma* samples from different habitats. According to the VIP analysis under orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), peaks 11 (asterin), 12 (kaempferol), 1 (chlorogenic acid), 14, 10 (quercetin), 9, 13 (liquiritigenin), 17 (shionone) may be a marker affecting the quality of *Asteris Radix et Rhizoma* from different habitats and different processing methods. The contents of chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, kaempferol, quercetin and shionone ranged from 5.941 6—18.745 1, 0.477 2—1.046 6, 0.177 4—0.265 6, 1.135 8—1.720 7, 0.574 9—2.755 7, 148.3 408—252.1 639 μ g/g. According to the methodology, each component showed a good linear relationship. The content determination results showed that sulfur fumigation of *Asteris Radix et Rhizoma* had a great effect on the content of shionone, and the content of shionone decreased significantly. **Conclusion** The quality of *Asteris Radix et Rhizoma* from different habitats was distinguished by the evaluation method established by quantitative analysis of multi index components combined with chemometrics, and the content differences of chemical components in *Asteris Radix et Rhizoma* from different processing methods were evaluated, which could provide scientific basis and reference for the quality evaluation and control of *Asteris Radix et Rhizoma*.

Key words: *Asteris Radix et Rhizoma*; fingerprint; different producing areas; content determination; chemometrics; chlorogenic acid; caffeic acid; ferulic acid; quercetin; asterin; kaempferol; liquiritigenin; stigmaterol glucoside; shionone

紫菀 *Asteris Radix et Rhizoma* 又名青菀、还魂草等, 为菊科植物紫菀 *Aster tataricus* L. f. 的干燥根及根茎^[1]。紫菀的主要栽培产区有安徽亳州、河北安国^[2-3]等地。现代药理研究表明, 紫菀具有镇咳祛痰^[4]、抗肿瘤^[5]、抗菌^[6]、抗氧化^[7]、通便利尿^[8]的作用, 包括萜、肽、黄酮、蒽醌、香豆素、有机酸类等化学成分。其中槲皮素、山柰酚和阿魏酸是抗氧化活性和镇咳祛痰的主要化学成分, 咖啡酸、绿原酸有显著的抗菌作用, 紫菀酮作为《中国药典》2020年版评价紫菀质量的含量指标, 也是紫菀发挥抗氧化作用的有效活性物质之一^[9]。目前紫菀的研究主要集中在紫菀化学成分的研究^[10-11]、不同炮制方法对紫菀化学成分的影响^[12]、HPLC-MS/MS 法同时测定紫菀中化学成分的方法^[13]等方面, 缺少对紫菀整体质量的有效评价方法。

中药指纹图谱具有信息量大, 特征性强, 整体性强的特点, 能够直观地展现制剂中各药味的化学组成与分布, 为全面控制质量和深入药效研究提供了重要依据^[14]。化学计量学利用数学方法或统计方法处理化学体系中的定性或定量数据, 成为质量标准研究中不可缺少的技术手段^[15]。本研究采用

UPLC 建立了不同产地紫菀的指纹图谱, 同时对绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚、紫菀酮 6 种化学成分进行含量测定, 在此基础上结合聚类分析 (cluster analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等化学计量学方法筛选出不同产地紫菀药材的质量差异性成分, 以期全面、客观、准确地评价紫菀药材质量提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

H-Class 型超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), Triple-TOFTM6600⁺型四极杆串联飞行时间高分辨质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司): Analyst TF 1.8.1 数据采集软件、PeakView 1.2 数据处理软件, YB-150 型多功能粉碎机 (永康市速锋工贸有限公司), CPA225D 型电子天平、BSA224S-CW 型电子天平 (德国赛多利斯有限公司), KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), H2050R 型高速离心机 (湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品绿原酸(批号 BWC9013-2016, 质量分数 $\geq 98\%$)、阿魏酸(批号 BWJ4346-2016, 质量分数 $\geq 99\%$)、槲皮素(批号 BWC9014-2016, 质量分数 $\geq 98\%$)、山柰酚(批号 BWC9039-2016, 质量分数 $\geq 98\%$)购自北京北方伟业计量研究院, 咖啡酸(DSTDK001301, 质量分数 $\geq 98\%$)、紫菀酮(DST221008-033, 质量分数 $\geq 98\%$)购自乐美天有限公司。甲酸(色谱纯, 北京迪科马科技有限公司), 乙腈(色谱纯, 德国默克公司), 其他试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水。

1.3 药材

所用药材从河北安国药材市场购买, 经河北中医药大学侯芳洁副教授鉴定为菊科植物紫菀 *Aster tataricus* L. f. 的干燥根和根茎。其中, S1~S14 的加工方式为无硫, S15~S18 加工方式为熏硫。熏硫为产地药农加工, 熏硫方法为根茎开片, 燃硫磺熏硫, 晒干。其中 S12~S14 与 S16~S18 分别为同一批药材的无硫和熏硫样品。S15 为 S12 切片熏硫后晒干样品。样品信息见表 1。

表 1 紫菀样品采集信息

Table 1 Sample collection information of *Asteris Radix et Rhizoma*

编号	产地	规格	编号	产地	规格
S1	河北安国	无硫选货	S10	河北安国	无硫统货
S2	河北安国	无硫统货	S11	河北安国	无硫选货
S3	河北安国	无硫统货	S12	安徽亳州	无硫统货
S4	河北安国	无硫统货	S13	安徽亳州	无硫统货
S5	河北安国	无硫选货	S14	安徽亳州	无硫统货
S6	河北安国	无硫选货	S15	安徽亳州	过硫统货
S7	河北安国	无硫统货	S16	安徽亳州	过硫统货
S8	河北安国	无硫统货	S17	安徽亳州	过硫统货
S9	河北安国	无硫统货	S18	安徽亳州	过硫统货

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚、紫菀酮对照品适量, 加甲醇溶解, 制成单一对照品储备液。精密量取上述各对照品储备液适量, 加甲醇稀释, 制成质量浓度分别为 117.72、7.92、12.84、37.49、64.82、347.28 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取紫菀粉末(过 60 目筛) 2.0 g, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL 的甲醇, 称定质量, 超声处理(功率 250 W、频

率 40 kHz) 30 min, 静置至室温, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 UPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 菲罗门 Titank C₁₈ 色谱柱(150 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.2%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~3 min, 5%~9% B; 3~13 min, 9%~10% B; 13~15 min, 10%~16% B; 15~20 min, 16% B; 20~50 min, 16%~28% B; 50~54 min, 28%~51% B; 54~64 min, 51%~100% B; 61~74 min, 100% B; 74~76 min, 100%~5% B); 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 2 μL 。分时段波长如下: 325 nm (0~50 min), 260 nm (50~70 min), 203 nm (70~76 min)。

2.2.2 质谱条件 离子模式: 分别在正、负离子模式下分析检测样品。离子源(正离子模式): 电喷雾离子源(ESI); 雾化电压(ISVF): +5 500V; 雾化温度(TEM): 550 $^{\circ}\text{C}$; 解簇电压(DP): +80V; 碰撞能量(CE): +45 eV; 雾化气压力(Gas 1, N₂)、辅助气压力(Gas 2, N₂)、气帘气压力(Cur, N₂)分别为 344.74、379.21、241.32 kPa; 高分辨质谱扫描质量范围设置为 m/z 100~1 200, 累积时间 250 ms; 碎片离子扫描质量范围设置为 m/z 50~1 200, 累积时间: 100 ms。碰撞能量扩展(CES) 20 eV, 信息依赖获取(IDA)方式开启。离子源(负离子模式): ESI; 雾化电压(ISVF): -4 500 V; TEM: 550 $^{\circ}\text{C}$; DP: -80 V; CE: -45 eV; Gas 1、Gas 2、Cur 分别为 344.74、379.21、241.32 kPa; 其余各时间等参数同正离子模式保持一致。

2.2.3 精密度试验 取紫菀粉末(S18), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以 1 号峰(绿原酸)为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.05%~0.30%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取紫菀粉末(S18), 按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样, 以 1 号峰(绿原酸)为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.07%~1.59%, 表明该方法重复性良好。

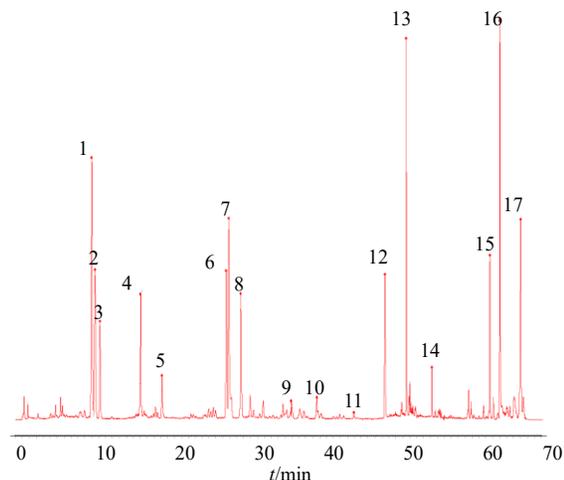
2.2.5 稳定性试验 取紫菀粉末(S18), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 以 1 号峰(绿原酸)为参照峰, 计算各共有峰的

相对保留时间的 RSD 为 0.13%~1.48%，结果表明样品溶液在 24 h 内相对稳定。

2.3 相似度评价

分别精密称取 18 批紫菀药材样品，按照“2.1.2”项下方法制成供试品溶液，并按“2.2.1”项下色谱条件分别进样分析，记录色谱图。将所得 18 批紫菀药材的图谱文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 A 版)，以 S1 为参照图谱，设置时间窗宽度为 0.1，并基于中位数法生成对照图谱，运用多点校正进行 Mark 色谱峰匹配，计算其相似度。相似度结果见表 2。结果表明，S1~S11 的相似度大于 0.950，差异性较小，为河北产地；S12~S18 的相似度在 0.904~0.940，为安徽产地。说明不同产地中的紫菀药材成分具有一定的差异性^[16]。共标定 17 个共有峰，见图 1。基于对照品比对法及质谱

鉴定指认出 9 个色谱峰，分别为 1 号峰绿原酸、3 号峰咖啡酸、5 号峰阿魏酸、10 号峰槲皮素、11 号峰 asterin^[17] (569 [M+H]⁺; 542 [M+H-CO]⁺; 485 [M+H-CO-NH-CHCH₂CH₃]⁺)、12 号峰山柰酚、13 号峰甘草素^[18] (255 [M-H]⁻; 213 [M-H-COCH₂]⁻; 145 [M-H-C₆H₅OH-O]⁻)、16 号峰豆甾醇葡萄糖苷^[19] (573 [M-H]⁻; 440 [M-H-C₅H₉O₄]⁻; 411 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻)、17 号峰紫菀酮。对照指纹图谱共有峰模式见图 2。



1-绿原酸; 3-咖啡酸; 5-阿魏酸; 10-槲皮素; 11-asterin; 12-山柰酚; 13-甘草素; 16-豆甾醇葡萄糖苷; 17-紫菀酮。
1-chlorogenic acid; 3-caffeic acid; 5-ferulic acid; 10-quercetin; 11-asterin; 12-kaempferol; 13-liquiritigenin; 16-stigmasterol glucoside; 17-shionone.

图 2 紫菀药材 UPLC 对照指纹图谱

Fig. 2 UPLC reference fingerprint of *Asteris Radix et Rhizoma*

表 2 18 批紫菀药材样品的相似度评价结果

Tab.2 Similarity evaluation results of 18 batches of *Asteris*

<i>Radix et Rhizoma</i>			
样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.983	S10	0.969
S2	0.952	S11	0.954
S3	0.960	S12	0.905
S4	0.960	S13	0.935
S5	0.987	S14	0.940
S6	0.983	S15	0.936
S7	0.985	S16	0.904
S8	0.982	S17	0.929
S9	0.980	S18	0.916

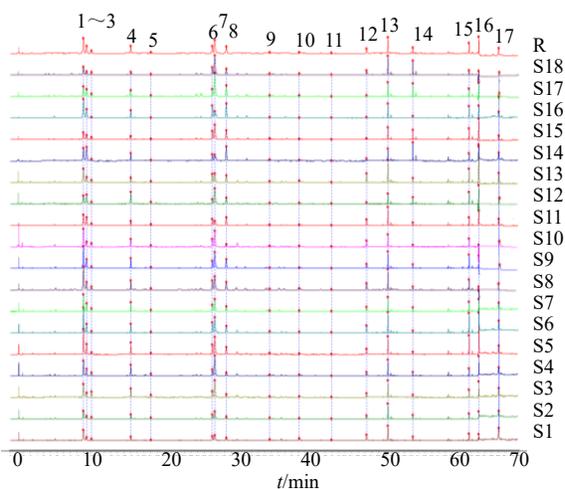


图 1 18 批紫菀样品的 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprint of 18 batches of *Asteris Radix et Rhizoma* samples

2.4 化学计量学分析

2.4.1 CA 以 18 批不同产地的紫菀药材指纹图谱中标定的 17 个共有峰峰面积为变量，建立数据并导入到 SPSS 26.0 统计软件，进行系统聚类分析。以系统连接中位数聚类法、平方欧氏距离生成谱系图。结果显示，当平方欧氏距离为 5 时，除 S10 外，17 批紫菀样品被聚为 2 大类，S1~S9、S11 聚为第一类，为河北产地；S12~S18 聚为第二类，为安徽产地。表明不同产地紫菀药材质量存在一定差异。具体结果见图 3。

2.4.2 PCA 为进一步比较不同产地紫菀间的质量差异，将 18 批紫菀样品的 17 个共有峰峰面积导入 SPSS 26.0 和 SIMCA 14.1 统计软件进行主成分分析。主成分的特征值及方差贡献率见表 3。前 6 个主成分的初始特征值依次为 5.518、2.996、2.319、

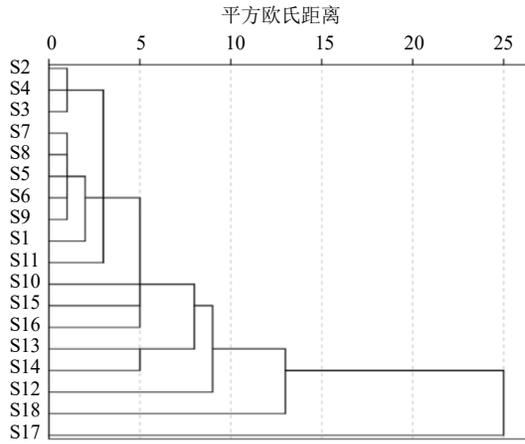


图3 18批紫菀样品的聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis diagram of 18 batches of *Asteris Radix et Rhizoma* samples

1.685、1.379、1.087，累积方差贡献率达到88.140%，符合SPSS主成分分析中累积贡献率>80%的要求^[20]，表明以上6个主成分能够较好地代表指纹图谱中的大部分信息。PCA得分图显示，除S3外，17批样品大致分成2类，样品S1~S11为第1类，样品S12~S18为第2类，第2类中又可细分为S12~S14（无硫）、S15~S18（过硫），与聚类分析一致，见图4。

2.4.3 OPLS-DA 不同于PCA，OPLS-DA是一种有监督的判别分析统计方法，该方法基于OPLS，使分类信息主要集中在主成分上，建立样品类别之间的关系模型，并且使模型易于解释，其判别效果及主成分得分图的可视化效果更加明显^[21]。以紫菀样品的17个共有峰峰面积为变量，运用SIMCA 14.1

表3 主成分分析特征值及方差贡献率

Table 3 Principal component eigenvalues and variance contribution rate of *Asteris Radix et Rhizoma*

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.518	32.461	32.461	5.518	32.461	32.461
2	2.996	17.623	50.085	2.996	17.623	50.085
3	2.319	13.641	63.726	2.319	13.641	63.726
4	1.685	9.910	73.636	1.685	9.910	73.636
5	1.379	8.112	81.748	1.379	8.112	81.748
6	1.087	6.392	88.140	1.087	6.392	88.140
7	0.731	4.300	92.440			
8	0.380	2.235	94.676			
9	0.305	1.794	96.470			
10	0.236	1.391	97.860			
11	0.161	0.946	98.806			
12	0.099	0.583	99.390			
13	0.084	0.493	99.882			
14	0.012	0.072	99.955			
15	0.007	0.039	99.994			
16	0.001	0.004	99.998			
17	0	0.002	100.000			

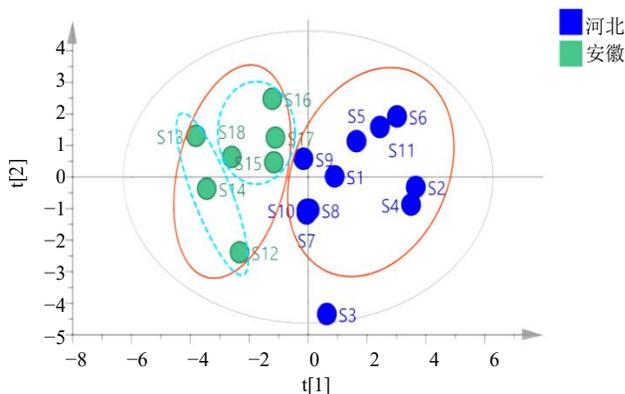


图4 18批紫菀药材的PCA得分图

Fig. 4 PCA score plot of 18 batches of *Asteris Radix et Rhizoma*

软件，采用有监督模式的OPLS-DA模型对不同产地紫菀样品进行分析。在OPLS-DA得分图中，18批紫菀可以很好地区分为河北（S1~S11）和安徽（S12~S18）2类，第2类安徽样品中可区分出无硫（S12~S14）和过硫（S15~S18）样品，且相较PCA区分度更大。在该模型中， R^2_x 为0.961， Q^2 为0.618（>0.5），表明模型拟合较好，同时具有良好的预测能力^[22]，结果见图5。

VIP值的大小代表了各指标成分对模型贡献率的大小，值越大表明该色谱峰对于紫菀分类贡献越大，同时也是导致紫菀样品相区分的差异成分^[23]。VIP的得分见图6。以VIP>1为界限进行筛选，筛

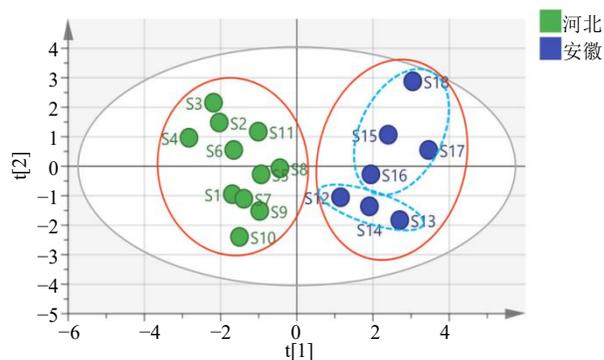


图5 18批紫菀药材的 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA scores of 18 batches of *Asteris Radix et Rhizoma*

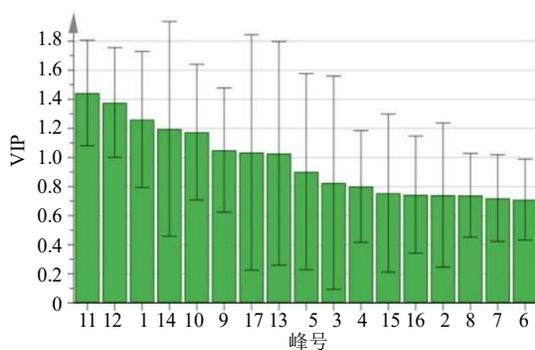


图6 18批紫菀药材中 17个化学成分的 VIP

Fig. 6 VIP values of 17 common peaks of 18 batches of *Asteris Radix et Rhizoma*

选出 VIP>1 的成分为峰 11 (asterin)、12 (山柰酚)、1 (绿原酸)、14、10 (槲皮素)、9、13 (甘草素)、17 (紫菀酮), 表明这些化合物可能是影响不同产地、不同加工方式紫菀质量差异的标志物。

2.5 指标成分的测定

现代药理研究表明, 酚酸类成分绿原酸具有镇咳平喘作用, 黄酮类成分槲皮素、山柰酚具有止咳、抗炎、抗氧化等作用^[24], 阿魏酸具有润肺止咳的作用^[25], 咖啡酸在止血、止咳和化痰方面效果显著^[26], 且紫菀酮为《中国药典》2020 年版指定的指标性成

分, 同时具有良好的止咳化痰作用, 这些成分均与紫菀的传统功效相关联。因此选取绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚和紫菀酮进行含量测定。

2.5.1 色谱条件 菲罗门 Titank C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.2%甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~3 min, 5%~9% B; 3~13 min, 9%~10% B; 13~16 min, 10%~16% B; 16~24 min, 16%~36% B; 24~34 min, 36%~41% B; 34~38 min, 41%~100% B; 38~50 min, 100% B; 50~52 min, 100%~5% B), 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 2 μL。分时段波长如下: 325 nm (0~25 min), 260 nm (25~46 min), 203 nm (46~52 min)。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、5.0 μL, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行线性回归, 得回归方程见表 4。结果表明 6 种化学成分在线性范围内呈良好线性关系。

2.5.3 精密度试验 取同一供试品溶液 (S18), 按“2.5.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录峰面积。以 1 号峰 (绿原酸) 为参照峰, 计算咖啡酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚、紫菀酮峰面积的 RSD 值, 结果分别为 0.53%、1.06%、0.83%、0.33%、1.57%。表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取 S18 紫菀药材粉末 6 份, 按照“2.1.2”项下平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定。以 1 号峰 (绿原酸) 为参照峰, 计算咖啡酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚、紫菀酮峰质量分数的 RSD 值, 结果分别为 1.00%、1.67%、1.15%、1.15%、1.93%。表明该方法的重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取 S18 紫菀药材粉末, 按照“2.1.2”项下制备供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样

表 4 线性关系考察结果

Table 4 Investigation results of linear relationship

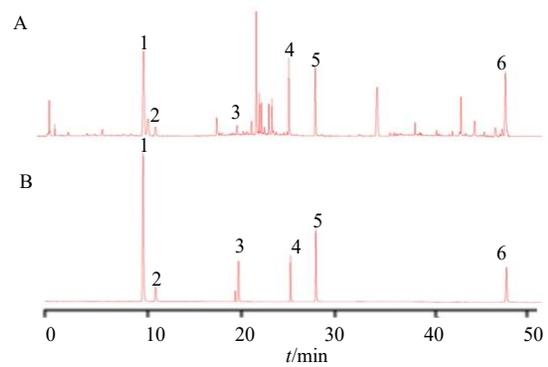
成分	回归方程	R ²	线性范围/μg
绿原酸	Y=8 955 048.94 X+122 042.81	0.989 9	0.023 5~0.586 6
咖啡酸	Y=16 623 951.45 X-1 964.33	1.000 0	0.001 6~0.039 6
阿魏酸	Y=17 480 863.37 X-4 281.50	1.000 0	0.002 6~0.064 2
槲皮素	Y=55 084 241.62 X-4 800.72	1.000 0	0.007 5~0.187 4
山柰酚	Y=6 677 434.10 X-12 276.55	1.000 0	0.013 0~0.324 1
紫菀酮	Y=1 987 867.02 X+1 052 979.33	0.964 8	0.069 5~1.736 4

测定。以1号峰(绿原酸)为参照峰,计算咖啡酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚、紫菀酮峰面积的RSD值,结果分别为0.42%、1.00%、0.66%、0.25%、1.15%。表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取S18紫菀药材粉末1.0 g,平行3组,每组3份,按1:0.8、1:1、1:1.2的比例加入对照品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液9份,按“2.5.1”项下色谱条件测定。计算绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚、紫菀酮的平均加样回收率分别为103.60%、99.47%、104.46%、97.23%、96.36%、95.34%,RSD值分别为0.49%、0.50%、2.72%、0.67%、1.89%。

2.5.7 样品含量测定 取18批紫菀药材样品,按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液3份,并按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,见图7。记录峰面积,计算各批次样品中6种待测成分的含量,结果见表5。结果表明18批紫菀样品中均能定量检测出上述6种成分,不同产地紫菀药材中6种成分具有一定的差异性。

为了进一步验证无硫与过硫紫菀中6种成分含量的差异性,采用SPSS 26.0对此进行统计检验。以安徽过硫组与无硫组各成分含量为变量分组,进



1-绿原酸; 2-咖啡酸; 3-阿魏酸; 4-槲皮素; 5-山柰酚; 6-紫菀酮。
1-chlorogenic acid; 2-caffeic acid; 3-ferulic acid; 4-quercetin;
5-kaempferol; 6-shionone

图7 供试品溶液(A)和混合对照品溶液(B)
Fig. 7 Chromatograms of sample (A) and mixed reference solution (B)

行正态性检验,经检验均符合正态分布。因此采用独立样本t检验分析二者是否存在显著性差异。显著性差异用P值表示,检验标准α为0.05, P<0.05表示差异具有统计学意义^[27]。结果见表6。由此可知,仅有紫菀酮的P=0.022 (<0.05),差异具有统计学意义。表明紫菀经硫熏后紫菀酮含量显著降低,熏硫对紫菀酮含量影响较大。

表5 18批紫菀药材含量测定结果

Table 5 Determination of components in 18 batches of *Asteris Radix et Rhizoma*

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	绿原酸	咖啡酸	阿魏酸	槲皮素	山柰酚	紫菀酮
S1	17.265 3	0.129 3	0.127 6	3.130 3	3.318 2	406.139 2
S2	6.691 2	0.404 0	0.167 2	1.401 7	2.006 5	209.352 3
S3	6.365 2	0.336 4	0.128 2	1.024 2	1.512 0	178.539 3
S4	11.169 7	0.594 6	0.405 2	2.007 1	2.214 6	262.256 9
S5	10.951 5	0.750 5	0.355 3	1.417 4	1.872 2	266.907 4
S6	18.745 1	1.046 6	0.265 6	1.720 7	2.755 7	252.163 9
S7	10.926 9	0.263 3	0.231 3	1.667 2	2.402 4	249.825 3
S8	15.574 0	0.247 4	0.224 5	2.121 6	3.039 1	310.027 9
S9	15.543 4	0.137 0	0.201 5	1.167 7	2.139 1	227.100 7
S10	15.914 7	0.387 9	0.247 6	1.213 1	3.164 0	246.691 2
S11	9.470 0	0.951 5	0.251 7	0.887 4	2.684 3	240.871 8
S12	7.837 9	1.088 2	0.250 2	1.020 6	0.611 7	233.958 6
S13	9.720 2	0.920 8	0.235 0	1.942 0	2.908 1	351.194 4
S14	11.642 1	1.672 7	0.199 7	1.241 9	1.343 0	243.504 2
S15	5.941 6	0.477 2	0.177 4	1.135 8	0.574 9	148.304 8
S16	16.894 5	1.011 4	0.128 6	0.724 9	0.455 3	175.943 1
S17	5.996 5	0.344 8	0.195 2	1.773 3	1.576 1	189.444 8
S18	8.670 5	0.895 9	0.234 9	0.895 4	0.530 4	130.691 1

表6 独立样本 *t* 检验Table 6 Independent sample *t* test

指标	<i>t</i>	自由度	<i>P</i>
绿原酸	0.112	5	0.915
咖啡酸	2.020	5	0.099
阿魏酸	1.393	5	0.222
槲皮素	0.752	5	0.486
山柰酚	1.293	5	0.253
紫菀酮	3.275	5	0.022

3 讨论

本实验对色谱条件进行了系统考察,包括不同柱温(20、30、40 °C),不同体积流量(0.2、0.3和0.4 mL/min)、不同进样量(1.5、2、3 μL)的考察,最终确定了紫菀药材分析的最佳色谱条件为柱温40 °C,体积流量0.3 mL/min,进样量2 μL。采用分时段定时波长,在同一色谱条件内同时把大极性成分、中等极性成分与极性极小的紫菀酮进行含量测定,相较于王蓉等^[28]、范玲等^[29]、郭伟娜等^[30]采用2个色谱条件分别测定紫菀酮和其他类成分的方法,本研究建立的测定方法更加便捷。

本研究收集18批不同产地的紫菀药材进行UPLC指纹图谱研究,通过运用CA和PCA对其进行综合的质量评价,结果表明CA能将18批药材清晰地分为2类,即河北产地和安徽产地。当平方欧氏距离为5时,除S10外,17批紫菀样品被聚为2大类,S1~S9、S11聚为第1类,为河北产地;S12~S18聚为第2类,为安徽产地。表明不同产地紫菀药材质量存在一定差异。通过PCA得分图,发现结果与聚类分析相同,且能区分开安徽无硫和过硫紫菀样品。

通过OPLS-DA结果显示,18批紫菀可以很好的区分为河北(S1~S11)和安徽(S12~S18)两类,安徽样品内部又可区分开无硫和过硫紫菀样品,且相较PCA区分度更大。以VIP>1为界限进行筛选^[31],得出峰11(asterin)、12(山柰酚)、1(绿原酸)、14、10(槲皮素)、9、13(甘草素)、17(紫菀酮),可能是影响不同产地、不同加工方式紫菀质量差异的标志性成分。11号峰(asterin)为环状五肽类结构,是紫菀属植物一类比较有特色的化学成分,具有显著的抗肿瘤活性^[32]。河北产地11号色谱峰平均峰面积是安徽产地3.2倍,12号色谱峰的平均峰面积是安徽产地的2.3倍,1号色谱峰的平均峰面积是安徽产地的1.6倍,提示其可能是区分不同产

地紫菀的关键性成分。

通过含量测定的结果可知,不同产地紫菀药材中6种成分具有一定的差异性。紫菀经硫熏后紫菀酮含量差异显著,平均降低40%左右,说明熏硫对紫菀酮含量影响较大。紫菀酮为三萜类成分,有研究表明^[33],在熏硫过程中,由于受光、热、pH的影响,容易产生电子转移,发生分子内重排反应,也容易发生加成、取代、脱水等反应,以上反应,会使紫菀酮结构改变,导致紫菀酮含量降低,可成为区别紫菀是否熏硫的依据。熏硫方法采用根茎开片熏硫与切片熏硫,经对比发现2种硫熏处理对成分影响并无太大差异,但因切片熏硫仅有一批样品,缺乏代表性与准确性,后续研究将扩大采样范围,增加样品批次,为进一步完善紫菀药材质量标准提供参考依据。

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: 177.
- [2] 王蓉, 郭伟娜, 刘倩倩, 等. 基于电子鼻和电子舌技术分析紫菀药材的气味特征 [J]. 中成药, 2022, 44(5): 1693-1697.
- [3] 余志媛, 马耿佳, 梁红英. 中药紫菀的本草考证 [J]. 中药材, 2023, 46(9): 2346-2352.
- [4] 魏文峰, 刘焯, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析大鼠口服芩苈清肺浓缩丸后肺组织中的化学成分 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1115-1122.
- [5] 史梦婷, 罗莉, 刘杰, 等. 国医大师刘尚义运用蜜紫菀-炒决明子药对治疗癌性便秘的经验举隅 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2023, 5(5): 37-41.
- [6] 唐小武, 刘湘新, 唐宇龙, 等. 紫菀有效成分分析及生物碱的提取与体外抑菌研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2006, 25(1): 16-18.
- [7] 蔡吉祥, 陈卓琳, 苏龙, 等. 响应面法优化紫菀多糖提取工艺及抗氧化活性 [J]. 广州化工, 2024, 52(6): 115-119.
- [8] 贾志新, 王世民, 冯五金, 等. 紫菀通便利尿作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(01): 109-111.
- [9] 董文阁, 胡营杰, 付芸芸, 等. 祛风宁肺散辅助丙酸氟替卡松治疗儿童咳嗽变异性哮喘风邪犯肺证的效果 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2024, 30(6): 1101-1105.
- [10] 王国艳, 吴弢, 林平川, 等. 紫菀三萜类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 14-15.
- [11] 王国艳, 吴弢, 林平川, 等. 紫菀酚类化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 33(10): 52-54.
- [12] 王隽, 刘耀, 李瑞, 等. 不同炮制方法对紫菀化学成分

- 的影响 [J]. 中药与临床, 2023, 14(6): 17-20.
- [13] 万昶宸, 刘艳艳, 杨浩天, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定紫菀中 9 种化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2534-2539.
- [14] 廖嘉穗, 付娟, 张日美, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学及多成分定量测定的腰痹通胶囊质量评价研究 [J]. 中草药, 2024, 55(8): 2579-2588.
- [15] 李振雨, 梁月仪, 吕渭升, 等. 马鞭草药材 UPLC 指纹图谱建立及指标性成分的测定 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(4): 551-561.
- [16] 邵远洋, 彭莲, 俞越童, 等. 基于高效液相色谱法指纹图谱技术的不同产地、不同生长方式喜马拉雅紫茉莉品质分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(8): 1709-1715.
- [17] 吴浩, 黄蓓蓓, 贾志鑫, 等. 基于 UHPLC-QTOF-MS/MS 和分子对接筛选紫菀中润肠通便的效应成分 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1377-1385.
- [18] 田苗, 沈彤, 王秀茹. 萎软紫菀化学成分的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 847-850.
- [19] 牛倩, 孙鹏, 张慢慢, 等. 中药紫菀的化学成分研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2016, 22(13): 30-31.
- [20] 吴明隆. 问卷统计分析实务: SPSS 操作与应用 [M]. 重庆: 重庆大学出版社, 2010: 350-380.
- [21] 刘天亮, 杨林林, 董诚明, 等. 基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4833-4843.
- [22] 郝壮壮, 曹宇欣, 刘朦朦, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定结合化学计量学的不同商品规格山慈姑质量差异分析 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1935-1945.
- [23] 宋驰, 葛威, 邹佳莉, 等. 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂质量差异性分析 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2331-2340.
- [24] 龚秀娟, 彭亮, 陈晓颖, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别评价蜜款冬花质量 [J]. 中草药, 2024, 55(18): 6344-6354.
- [25] 刘丽花, 王红丽. 多指标正交试验优选润肺止咳片的水提工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 42-44.
- [26] 刘莹. 浅谈蜂产品的化学成分和生物学功能 [J]. 中国蜂业, 2023, 74(12): 68-71.
- [27] 李燕. 基于 SERVQUAL 模型的 BC 农信联社服务质量研究 [D]. 绵阳: 西南科技大学, 2023.
- [28] 王蓉, 赵美英, 郭伟娜, 等. 药用部位和加工方法对紫菀药用成分含量的影响 [J]. 文山学院学报, 2020, 33(3): 12-17.
- [29] 范玲, 王鑫, 朱晓静, 等. 不同炮制方法对紫菀浸出物及主成分含量的影响 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(12): 1509-1514.
- [30] 郭伟娜, 程磊, 方成武. 紫菀母根结构、主要药用成分积累部位及含量研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2614-2616.
- [31] 倪兴婷, 孙细珍, 刘怀臣, 等. 浓香型白酒异嗅味-糠味物质解析 [J]. 中国酿造, 2024, 43(7): 41-49.
- [32] 库尔班江, 欧阳艳, 努尔买买提. 紫菀属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(2): 1-4.
- [33] 邓爱平, 康传志, 张悦, 等. 熏硫对中药化学成分及药理作用的影响 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(9): 1542-1559.

[责任编辑 时圣明]