

祁白芷 UPLC 指纹图谱的建立及其抗氧化谱效关系研究

段天华, 徐荣荣, 李蕊, 张泽昭, 姜晓娅, 刘思琪, 刘宸男, 王鑫国*, 冯薇* (河北中医药大学药学院, 河北省中药配方颗粒技术创新中心, 中药材品质评价与标准化河北省工程研究中心, 石家庄 050091)

摘要:目的 建立祁白芷超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)对共有峰进行成分鉴定,测定各批次祁白芷抗氧化活性,并探讨祁白芷的化学成分与抗氧化活性的谱效关系。方法 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立28批祁白芷的指纹图谱,确认共有峰并进行相似度评价,并对共有峰进行UPLC-Q-TOF-MS分析。以1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率为抗氧化指标,测定其抗氧化活性。采用灰色关联度和偏最小二乘回归分析祁白芷共有峰与抗氧化活性的谱效关系。结果 建立了28批祁白芷药材的指纹图谱,其相似度为0.910~0.997。聚类分析可将不同加工方式的祁白芷分为熏硫和无硫两大类,当平方欧氏距离为10时,可将无硫祁白芷进一步分为两类,与商品规格等级分类相符。共标定13个共有峰,利用对照品对比和UPLC-Q-TOF-MS解析指出共有峰分别为奎宁酸、二氢山芹醇、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、异茴芹内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素、8-氧甲基异欧前胡内酯、异欧前胡素、镰叶芹酮。通过清除DPPH自由基实验发现,28批祁白芷均有抗氧化能力,谱效分析结果显示,奎宁酸、佛手柑内酯、氧化前胡素、珊瑚菜素、异欧前胡素、镰叶芹酮等与抗氧化能力呈正相关。结论 本研究建立了基于化学成分和抗氧化活性的祁白芷质量评价模式,为阐明祁白芷药材中抗氧化活性成分及质量控制提供参考。

关键词:祁白芷;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱;指纹图谱;抗氧化;谱效关系

doi:10.11669/cpj.2024.10.006 中图分类号:R282 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)10-0896-08

Establishment of UPLC Fingerprint and Effects of Antioxidant Related to Its Spectrum Study of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi

DUAN Tianhua, XU Rongrong, LI Rui, ZHANG Zezhao, JIANG Xiaoya, LIU Siqi, LIU Chennan, WANG Xinguo*, FENG Wei* (Hebei Traditional Chinese Medicine Formula Granule Engineering and Technology Innovate Center, Quality Evaluation and Standardization Hebei Province Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish UPLC fingerprint of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi, identify the compounds of common peaks by UPLC-Q-TOF-MS technology, determine antioxidant activity of each batch and study the relationship between effects of antioxidant and spectrum of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi. **METHODS** The fingerprint of 28 batches of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi was established by the Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint (2012 edition), and the common peaks were identified and evaluated for similarity, and the common peaks were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS. The free radical scavenging rate of 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) was used as antioxidant index to determine its antioxidant activity. Grey correlation degree and partial least squares regression were used to analyze the spectral effect relationship between chemical constituents and antioxidant activities of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi. **RESULTS** The fingerprints of 28 batches of Radix *Angelica* were established, the similarity was 0.910–0.997. By cluster analysis, the different processing methods can be divided into two categories: sulfur fumigation and sulphur-free. When the square Euclidean distance is 10, the sulphur-free *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi can be further divided into two categories, which is consistent with the classification of commodity specifications. A total of 13 common peaks were identified. The common peaks were identified by comparison of standards and UPLC-Q-TOF-MS analysis as quinic acid, dihydrorosetolol, oxypeucedanin hydrate, byakangelicin, xanthotoxin, bergapten, isopimpinellin, oxypeucedanin, imperatorin, phellopterin, enidilin, isoimperatorin and falcarinolone. By scavenging DPPH free radicals, it was found that 28 batches of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi had antioxidant capacity. The spectral analysis results showed that the antioxidant capacity was positively related to quinic acid, bergapten, oxypeucedanin, phellopterin, isoimperatorin and falcarinolone. **CONCLUSION** In this study, a quality evaluation

基金项目:国家自然科学基金项目资助(82104358);河北省省级科技计划项目资助(21372503D,23372502D);河北省自然科学基金面上项目资助(H2021423066);大学生创新创业计划项目资助(202214432020,202314432017)

作者简介:段天华,女,硕士 研究方向:中药药效物质基础 *通讯作者:冯薇,女,博士,教授 研究方向:中药药效物质基础
Tel:(0311)85216828;王鑫国,男,学士,教授 研究方向:中药药效物质基础 Tel:(0311)89926208

model of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi based on chemical composition and activity is established, which provides a reference for elucidating the antioxidant active ingredients and quality control in *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi.

KEY WORDS: *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi; UPLC-Q-TOF-MS; fingerprint; antioxidant; spectrum-effect relationship

祁白芷,为伞形科植物祁白芷 [*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.] 的干燥根^[1],是河北安国地道药材,为八大祁药之一。祁白芷为市场上主流白芷品种之一,因其产量大且质量较优,被国内医药界熟知^[2-3]。本品作为白芷入药,具有散风除湿、通窍止痛、消肿排脓的功效^[1],并能长肌肤、润颜色^[4]。有研究表明,白芷能有效改善原发性痛经、延缓衰老和美白的作用机制可能与抗氧化活性有关^[4,6]。目前,祁白芷的研究主要集中在脂溶性成分和挥发油的定性分析^[7-8]及对欧前胡素这单一指标成分的含量测定^[9],针对祁白芷的多成分含量测定和谱效关系的研究未见报道。中药成分多样、作用机制复杂,单一指标难以全面反映药材质量。中药指纹图谱具有整体性和模糊性,可从整体上对中药材进行评价,能够全面评价中药的药效物质基础,现已被广泛用于评价和控制中药材品质^[10]。与高效液相色谱(HPLC)相比,超高效液相色谱(UPLC)具有更高的灵敏度和分离度,可提高分析效率,减少溶剂消耗,已广泛应用于中药物质基础的研究^[11]。谱效关系是中药药效物质基础的研究模式之一,运用统计学的手段将指纹图谱技术和药效评价系统相结合,可进一步明确其药效物质基础,评价中药质量^[12]。

本研究采用 UPLC 建立了祁白芷的指纹图谱,并结合聚类分析对祁白芷进行了质量评价,同时利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)和对照品比对,对共有峰进行了鉴定,利用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法检测体外抗氧化能力。通过谱效关系,初步揭示祁白芷抗氧化能力的活性物质,为祁白芷的质量控制及开发研究提供理论支持。

1 仪器与试剂

H-Class 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Triple-TOF™ 6600+ 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); ELx800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); 总抗氧化能力(DPPH 法)试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)。

对照品水合氧化前胡素(批号 DSTDS012301)、异茴芹内酯(批号 DST210426-189)、氧化前胡素(批号 DSTDY018401, ≥98%)(成都乐美天医药科技有限公司); 白当归素(批号 MUST-21111103)、佛手柑内酯(批号 MUST-21122413)(成都曼斯特生物科技有限公司); 欧前胡素(批号 CHB201201)(成都克洛玛生物科技有限公司); 异欧前胡素(批号 BWC9004-2016)(北京世纪奥科生物技术有限公司)。甲酸、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,实验用水为超纯水由 Milipore 超纯水系统制备。

白芷药材从河北安国药材市场购买,产地均为河北安国,经侯芳洁副教授鉴定为伞形科植物白芷 [*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.] 的干燥根。其中, S1 ~ S14 和 S17 ~ S28 加工方式为无硫晒干, S15 和 S16 加工方式为熏硫。熏硫为产地药农加工,熏硫方法为:燃硫熏硫,切片,晾干。其中 S15 与 S17、S16 与 S18 分别为同一批药材的无硫晒干和熏硫样品。28 批祁白芷药材的详细信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 祁白芷指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 菲罗门 Titank C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 6 min, 13% ~ 14% A; 6 ~ 13.5 min, 14% ~ 15.5% A; 13.5 ~ 20 min, 15.5% ~ 28% A; 20 ~ 26 min, 28% ~ 28.4% A; 26 ~ 33.5 min, 28.4% ~ 29.5% A; 33.5 ~ 35 min, 29.5% ~ 37% A; 35 ~ 39.5 min, 37% ~ 45% A; 39.5 ~ 41.5 min, 45% ~ 47.3% A; 41.5 ~ 44 min, 47.3% ~ 53% A; 44 ~ 54 min, 53% ~ 60% A; 54 ~ 55 min, 60% ~ 78% A; 55 ~ 63 min, 78% ~ 90% A; 63 ~ 65 min, 90% ~ 13% A), 流速 0.3 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 0.8 μL。分时段波长如下: 330 nm (0 ~ 19 min), 267 nm (19 ~ 30 min), 248 nm (30 ~ 43 min), 267 nm (43 ~ 52 min), 254 nm (52 ~ 65 min)。

表 1 28 批祁白芷药材的详细信息

Tab. 1 Information of 28 batches of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi

Sample No.	Collection time	Processing method	Specification grades	Sample No.	Collection time	Processing method	Specification grades
S1	2020-11	sulphur-free	selected first	S15	2020-11	sulfur fumigation	unified goods
S2	2020-11	sulphur-free	selected third	S16	2020-11	sulfur fumigation	unified goods
S3	2020-11	sulphur-free	selected first	S17	2020-11	sulphur-free	selected second
S4	2020-11	sulphur-free	selected first	S18	2020-11	sulphur-free	unified goods
S5	2020-11	sulphur-free	selected first	S19	2020-11	sulphur-free	selected second
S6	2020-11	sulphur-free	selected second	S20	2021-11	sulphur-free	selected second
S7	2020-11	sulphur-free	selected first	S21	2021-11	sulphur-free	selected second
S8	2020-11	sulphur-free	selected first	S22	2021-11	sulphur-free	selected first
S9	2021-11	sulphur-free	selected third	S23	2021-11	sulphur-free	selected first
S10	2021-11	sulphur-free	selected third	S24	2021-11	sulphur-free	selected second
S11	2021-11	sulphur-free	selected third	S25	2021-11	sulphur-free	unified goods
S12	2021-11	sulphur-free	selected third	S26	2021-11	sulphur-free	unified goods
S13	2021-11	sulphur-free	selected second	S27	2021-11	sulphur-free	selected first
S14	2021-11	sulphur-free	selected third	S28	2021-11	sulphur-free	selected third

注:加工方式 - 无硫,熏硫;规格等级 - 选货一等,选货二等,选货三等,统货。

Note: processing method - sulphur-free, sulfur fumigation; specification grades - selected first, selected second, selected third, unified goods.

2.1.2 对照品溶液制备 分别精密称取水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、异茴芹内酯、氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素对照品适量,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 68.72、26.71、15.80、5.18、164.25、129.41、54.13 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 取白芷粉末(过 60 目筛)2.0 g,精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 体积分数 70% 的甲醇,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)75 min,静置至室温,再称定质量,用体积分数 70% 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 指纹图谱方法学考察

2.2.1 精密度试验 取 S10 号白芷粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以 9 号峰(欧前胡素)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间的相对标准偏差(RSD)为 0.01% ~ 0.91%,相对峰面积的 RSD 分别为 0.65%、2.17%、0.84%、1.44%、0.93%、1.01%、0.84%、0.58%、0.16%、0.31%、1.45%、1.26%,均小于 2.17%,表明仪器精密度良好。

2.2.2 重复性试验 取 S10 号白芷粉末,按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.1.1”项下色谱条件测定,以 9 号峰(欧前胡素)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.01% ~ 0.13%,相对峰面积的 RSD 分别为

0.60%、2.53%、0.45%、1.42%、1.39%、0.98%、0.92%、0.54%、0.41%、1.01%、0.51%、3.00%,均小于 3.0%,表明该方法重复性良好。

2.2.3 稳定性试验 取 S10 号白芷粉末,按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液,分别在 0、2,4,8,12,24 h 按“2.1.1”项下色谱条件测定,以 9 号峰(欧前胡素)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.01% ~ 0.33%,相对峰面积的 RSD 分别为 1.81%、1.68%、0.69%、2.32%、1.06%、0.13%、2.17%、2.70%、0.24%、0.70%、0.25%、2.66%,均小于 2.70%,表明 24 h 内供试品溶液的成分稳定。

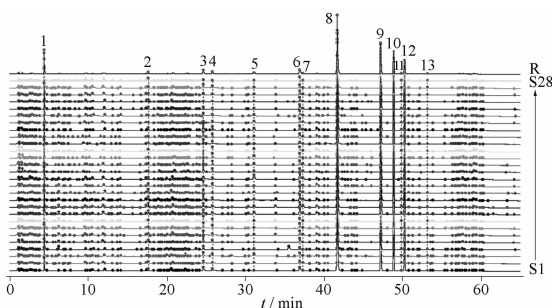
2.3 对照指纹图谱的生成与相似度分析

相似度评价: 取 28 批白芷样品适量按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件依次进样,记录色谱图。将 28 批药材样品的 UPLC 图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》软件,设定 S10 为参照色谱图,选取时间窗格宽度 0.1 min,通过中位数生成对照指纹图谱,运用多点校正对 Mark 色谱峰进行匹配,计算相似度。结果表明,除 S15、S16 的相似度为 0.913、0.910 外,其余批次样品与对照指纹图谱的相似度均大于 0.960,见表 2,说明熏硫对白芷药材质量影响较大,未熏硫样品相似度较高,化学成分相似,质量较稳定。共标定 13 个共有峰,见图 1。对照指纹图谱见图 2A,混合对照品溶液见图 2B。

表2 28批祁白芷药材样品的相似度评价结果

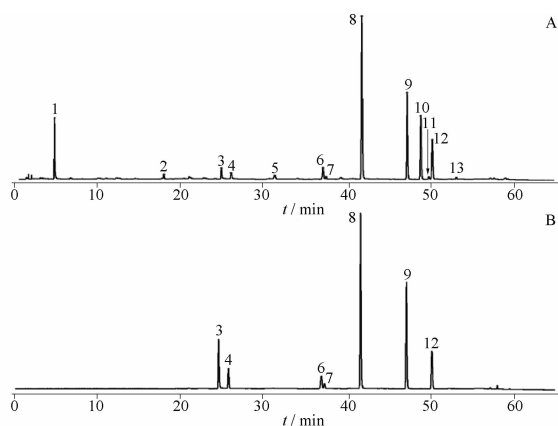
Tab. 2 Similarity evaluation results of 28 batches of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi

Sample No.	Similarity	Sample No.	Similarity
S1	0.989	S15	0.913
S2	0.994	S16	0.910
S3	0.986	S17	0.993
S4	0.978	S18	0.993
S5	0.990	S19	0.997
S6	0.997	S20	0.976
S7	0.966	S21	0.990
S8	0.988	S22	0.973
S9	0.995	S23	0.974
S10	0.963	S24	0.997
S11	0.976	S25	0.969
S12	0.988	S26	0.985
S13	0.994	S27	0.996
S14	0.988	S28	0.986



3 - 水合氧化前胡素; 4 - 白当归素; 6 - 佛手柑内酯; 7 - 异茴芹内酯; 8 - 氧化前胡素; 9 - 欧前胡素; 12 - 异欧前胡素。
3 - oxypeucedanin hydrate; 4 - byakangelicin; 6 - bergapten; 7 - isopimpinellin; 8 - oxypeucedanin; 9 - imperatorin; 12 - isoimperatorin.

图1 28批祁白芷样品的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱
Fig. 1 UPLC fingerprints of 28 batches of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi



3 - 水合氧化前胡素; 4 - 白当归素; 6 - 佛手柑内酯; 7 - 异茴芹内酯; 8 - 氧化前胡素; 9 - 欧前胡素; 12 - 异欧前胡素。
3 - oxypeucedanin hydrate; 4 - byakangelicin; 6 - bergapten; 7 - isopimpinellin; 8 - oxypeucedanin; 9 - imperatorin; 12 - isoimperatorin.

图2 祁白芷 UPLC 对照指纹图谱(A)及混合对照品 UPLC 图谱(B)
Fig. 2 UPLC chromatograms of control fingerprint of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi (A) and mixed reference substances (B)

2.4 聚类分析

将28批白芷样品的13个共有峰的峰面积导入SPSS 26.0,采用组间联接系统聚类法,在平方欧氏距离为15时,28批白芷样品聚为两大类,S15和S16聚为一类,其他批次聚为另一类。其中S15和S16均为熏硫祁白芷,与相似度结果一致。在平方欧氏距离为10时,28批白芷样品聚为三大类,S15和S16聚为一类,S1、S3~S8、S13、S17、S19~S24、S27聚为第二类,其余批次聚为第三类。其中,第二类中峰8(氧化前胡素)的面积占共有峰总面积的35%以上,第三类中峰8(氧化前胡素)的面积占共有峰总面积的35%以下,表明峰8(氧化前胡素)的峰面积占比会对祁白芷的质量造成影响。28批祁白芷的聚类分析树状图见图3。

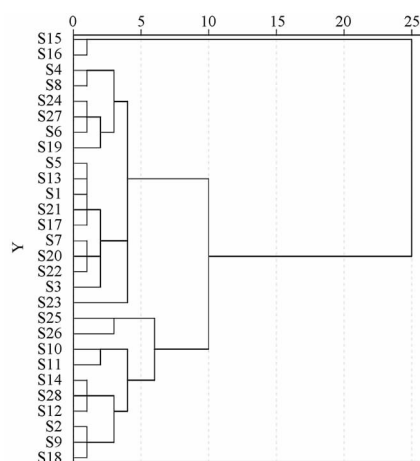


图3 28批祁白芷样品的聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis diagram of 28 batches of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi

2.5 指纹图谱中共有峰的鉴定

2.5.1 色谱条件 离子模式:分别在正、负离子模式下分析检测样品。

仪器参数优化后设置如下:离子源(正离子模式):电喷雾离子源(ESI);雾化电压(ISVF):+5 500 V;雾化温度(TEM):500 °C;解簇电压(DP):+80 V;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:0.34/0.38/0.24 MPa;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;ISVF:-4 500 V;

TEM:500 °C;DP: -80 V;CE: -45 eV;Gas 1、Gas 2、Cur 分别为:0.34、0.38、0.24 MPa;其余各时间等参数同正离子模式保持一致。

2.5.2 共有峰鉴定 按“2.1.3”制备供试品溶液、“2.1.1”项下液相条件和“2.5.1”项下色谱条件下获得祁白芷的正、负离子流图,通过采用 PeakView 1.2 软件中“XIC Manager”功能进行数据分析,通过比对精确相对分子质量和特征碎片离子,鉴定出祁白芷指纹图谱中共有峰的结构^[13-18],结果见表3。

表3 祁白芷共有峰的鉴定

Tab.3 Identification of common peaks of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi

Peak No.	Formula	Molecular ion peak	Observe mass(<i>m/z</i>) / × 10 ⁻⁶	δ	Predicted compounds	MS/MS fragments (<i>m/z</i>)	References
1	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M - H] ⁻	191.055 97	-0.8	Quinic acid	173[M - H - H ₂ O] ⁻ ;127[M - H - H ₂ O - CO ₂ - 2H] ⁻	[14]
2	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	[M + H] ⁺	247.096 4	-0.4	Dihydrooroseolol	175[M + H - H ₂ O - C ₄ H ₆] ⁺ ;147[M + H - H ₂ O - C ₄ H ₆ - CO] ⁺ ;131[M + H - H ₂ O - CH ₄ - C ₂ H ₂ - 2CO] ⁺	[15]
3 ¹⁾	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	[M + H] ⁺	305.102 21	0.8	Oxypeucedanin hydrate	203[M + H - C ₅ H ₁₀ O ₂] ⁺	[15]
4 ¹⁾	C ₁₇ H ₁₈ O ₇	[M + H] ⁺	335.112 46	-0.2	Byakangelicin	233[M + H - C ₅ H ₁₀ O ₂] ⁺ ;231[M + H - C ₅ H ₁₀ O ₂ - 2H] ⁺ ;215[M + H - C ₅ H ₁₀ O ₂ - H ₂ O] ⁺	[16]
5	C ₁₂ H ₈ O ₄	[M + H] ⁺	217.049 75	1	Xanthotoxin	161[M + H - CO - C ₂ H ₄] ⁺ ;145[M + H - CO - C ₂ H ₄ - O] ⁺	[15]
6 ¹⁾	C ₁₂ H ₈ O ₄	[M + H] ⁺	217.049 72	0.9	Bergapten	145[M + H - C ₂ H ₄ - CO ₂] ⁺	[15]
7 ¹⁾	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	[M + H] ⁺	247.060 27	0.7	Isopimpinellin	217[M + H - CO - 2H] ⁺	[15]
8 ¹⁾	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M + H] ⁺	287.091 56	0.6	Oxypeucedanin	203[M + H - C ₅ H ₈ O] ⁺ ;159[M + H - C ₅ H ₈ O - CO ₂] ⁺ ;131[M + H - C ₅ H ₈ O - CO ₂ - CO] ⁺	[13,17]
9 ¹⁾	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	[M + H] ⁺	271.096 79	1.1	Imperatorin	203[M + H - C ₅ H ₈] ⁺ ;185[M + H - C ₅ H ₈ - H ₂ O] ⁺	[17]
10	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	[M + H] ⁺	301.107 3	0.8	Phellopterin	233[M + H - C ₅ H ₈] ⁺ ;217[M + H - C ₅ H ₈ - O] ⁺ ;215[M + H - C ₅ H ₈ - H ₂ O] ⁺	[15,17]
11	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	[M + H] ⁺	301.107 41	1.2	Cnidilin	233[M + H - C ₅ H ₈] ⁺ ;217[M + H - C ₅ H ₈ - O] ⁺	[17]
12 ¹⁾	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	[M + H] ⁺	271.096 74	0.9	Isoimperatorin	203[M + H - C ₅ H ₈] ⁺	[15,17]
13	C ₁₇ H ₂₂ O	[M + H] ⁺	243.174 11	-1	Falcarinolone	171[M + H - C ₅ H ₁₂] ⁺ ;115[M + H - C ₅ H ₁₂ - C ₃ H ₄ O] ⁺ ;91[M + H - C ₅ H ₁₂ - C ₃ H ₄ O - CH ₂] ⁺	[18]

注:¹⁾通过对照品鉴定的化学成分。

Note:¹⁾the chemical component identified by reference substance.

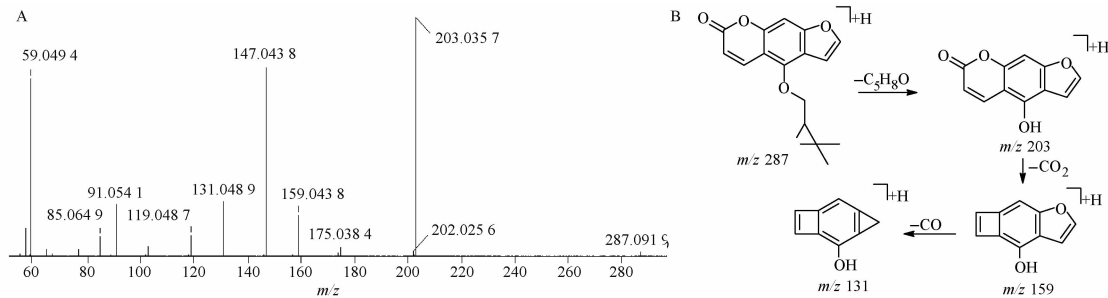


图4 氧化前胡素的二级质谱(A)和裂解过程(B)

Fig.4 MS spectra(A) and fragmentation pathways of oxypeucedanin(B)

2.6 抗氧化作用考察

DPPH 自由基清除率:取上述“2.1.3”项下供试品溶液 20 μ L 至 EP 管中,加入 380 μ L 的 DPPH 试剂,充分混匀,室温避光孵育 20 min,取 200 μ L 置 96 孔板中,即得样品溶液。平行试验重复 3 次。取 20 μ L 体积分数 70% 甲醇至 EP 管中,加入 380 μ L 的 DPPH 试剂,充分混匀,室温避光孵育 20 min,取

白芷的主要化学成分为香豆素类,共有峰的质谱鉴定以峰 8 (氧化前胡素)为例,在正离子模式下,其准分子离子峰为 m/z 287.09156 [M + H]⁺,质谱裂解过程中容易丢失 C₅H₈O 支链生成丰度最高的 m/z 287.09156 [M + H - C₅H₈O]⁺ 碎片离子,连续丢失 CO₂ 和 CO,生成碎片离子 m/z 159 [M + H - C₅H₈O - CO₂]⁺ 和 m/z 131 [M + H - C₅H₈O - CO₂ - CO]⁺,根据裂解方式及对对照品比对,推断峰 8 为氧化前胡素,其二级质谱和裂解过程见图 4^[13,17]。

200 μ L 置 96 孔板中,即得空白溶液。酶标仪 515 nm 下测定吸光度值。祁白芷的总抗氧化能力以自由基清除率表示见公式 1:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [(A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}) \div A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

公式(1)

抗氧化活性结果见图 5,28 批祁白芷均有抗氧化能力,且存在个体差异。除熏硫样品外,其他批次

祁白芷 DPPH 自由基清除率均大于 50% ,且 S15 和 S16 分别为样品 S17 和 S18 加工硫熏制得,更直观表明祁白芷熏硫会导致抗氧化作用降低。

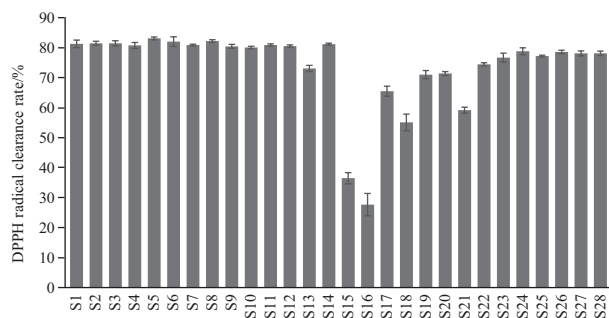


图 5 28 批祁白芷 DPPH 自由基清除率测定结果. $n=3, \bar{x} \pm s$
Fig. 5 Results of DPPH scavenging rate of 28 batches of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.7 灰色关联度分析

参考 Li 等^[19]的灰色关联分析方法,对原始数据进行无量纲化处理,采用初值法,以各批祁白芷药材 UPLC 指纹图谱共有峰峰面积数据为比较序列,抗氧化活性为参考序列,计算灰色关联系数(r)。

通过 r 可初步确定所对应的化学成分与抗氧化活性之间的联系。 r 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。

关联度计算结果见表 4,从关联度结果可知,祁白芷抗氧化作用受多种成分共同作用,各峰所代表的化学成分对其抗氧化活性的影响程度有所区别,其中 8 号峰(氧化前胡素)的影响最大,而 5 号峰(花椒毒素)对抗氧化活性的关联度较小。

表 4 祁白芷各共有峰与抗氧化活性间的灰色关联度

Tab. 4 Relevancy between each common peak and antioxidant effect of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi

Peak No.	r	Order	Peak No.	r	Order
1	0.879	10	8	0.968	1
2	0.909	8	9	0.941	5
3	0.899	9	10	0.962	2
4	0.912	6	11	0.827	12
5	0.714	13	12	0.957	3
6	0.909	7	13	0.956	4
7	0.861	11			

2.8 小二乘回归分析(PLS)

以各批祁白芷药材 UPLC 指纹图谱共有峰峰面积数据为自变量 x ,以祁白芷提取物抗氧化能力

为因变量 y ,导入 SIMCA 14.1 软件作 PLS 模型拟合,得到回归方程 $y = 0.31413x_1 + 0.022416x_2 + 0.034834x_3 + 0.054768x_4 - 0.033943x_5 + 0.065228x_6 - 0.1138x_7 + 0.250067x_8 + 0.021421x_9 + 0.12158x_{10} - 0.0380394x_{11} + 0.131583x_{12} + 0.179624x_{13}$,其中回归系数代表各自变量对总抗氧化能力的贡献大小,回归系数越大,对药效贡献越大。在回归方程中,系数为正值表明自变量与抗氧化能力呈正相关,系数为负值表明自变量与抗氧化能力呈负相关。回归系数见图 6。根据结果可知,峰 1、2、3、4、6、8、9、10、12、13 与药效呈正相关,贡献度依次为 $1 > 8 > 13 > 12 > 10 > 6 > 4 > 3 > 2 > 9$;峰 5、7、11 与药效呈负相关,贡献度依次为 $7 > 11 > 5$ 。

在偏小二乘回归分析中,变量重要性(VIP 值)越大,自变量 x 的解释能力越强。结果显示,峰 1、6、8、10、12、13 的 VIP 值大于 1,依次为 $1 > 8 > 13 > 10 > 12 > 6$ 。模型诊断参数为: $R^2 X = 0.926, R^2 Y = 0.979, Q^2 = 0.972$,说明该回归模型拟合解释能力以及模型预测能力均较强,变量重要性分析结果见图 7。

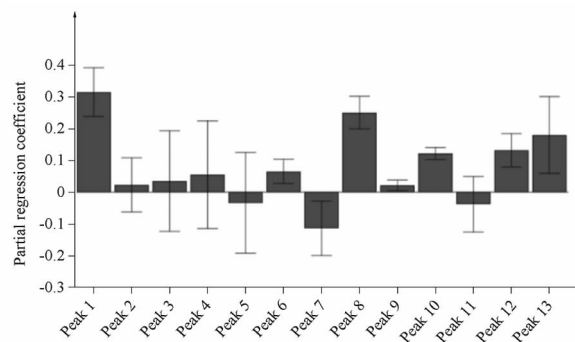


图 6 祁白芷各共有峰偏小二乘回归系数图. $n=28, \bar{x} \pm s$
Fig. 6 Partial least squares diagram of each common peak of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi. $n=28, \bar{x} \pm s$

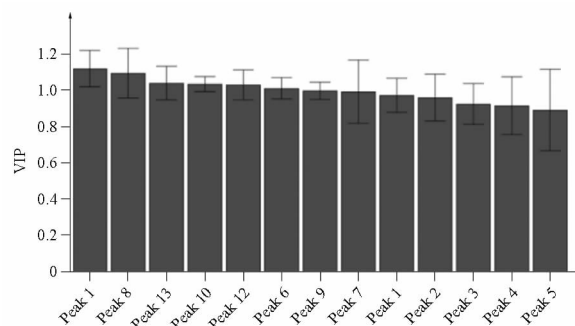


图 7 祁白芷各共有峰的变量重要性图. $n=28, \bar{x} \pm s$
Fig. 7 Variable importance in projection diagram of each common peak of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi. $n=28, \bar{x} \pm s$

3 讨论

实验前期考察了提取溶剂(体积分数 70%、85%、100% 甲醇),提取时间(45、60、75 min),料液体积比(1:5、1:10、1:20)对供试品溶液提取效果的影响,通过对比各样品色谱峰的数量和面积,最终确定白芷的最优提取工艺为:甲醇体积分数为 70%、料液比 1:10、提取时间为 75 min。采用二极管阵列检测器(PDA 检测器),对祁白芷药材供试品溶液在 210~400 nm 范围内进行全波长扫描,结果显示,检测波长为 330 nm(0~19 min),267 nm(19~30 min),248 nm(30~43 min),267 nm(43~52 min),254 nm(52~65 min)时,色谱图出峰较多,待测成分的响应值较大。中药指纹图谱是一种可以全面反映中药化学成分种类和数量的定性分析方法,目前采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》中的相似度算法进行相似度计算。然而,此算法对化学成分的含量并不敏感,不能反映中药在含量上的变化情况。因此,相似度高仅表示不同批次的样品在成分上相似,而不能表明各成分含量相近^[20-21]。在指纹图谱相似度评价中,有两批祁白芷样品指纹图谱相似度较低,分别为熏硫白芷 S15(0.913)和 S16(0.910),化学成分含量差异可能是造成相似度较低的原因。与其他批次相比,S15 和 S16 的峰 1(奎宁酸)和峰 8(氧化前胡素)峰面积较小。采用聚类分析,在平方欧氏距离为 15 时,28 批祁白芷聚为熏硫(S15、S16)和无硫两大类;平方欧氏距离为 10 时,将无硫祁白芷分为两类,一类为选货一等品和二等品(S1、S3~S8、S13、S17、S19~S24、S27),另一类为选货三等品和统货,此聚类结果与祁白芷商品规格等级划分吻合,表明祁白芷商品规格等级划分与峰 8(氧化前胡素)的峰面积占比有关,后续会将祁白芷的化学成分信息与此分类依据进行深入分析。其中,S15 和 S16 的抗氧化能力显著降低,可见祁白芷的抗氧化性与其聚类分析结果有一定的相关性。熏硫祁白芷(S15、S16)与同批次无硫祁白芷(S17、S18)相比,峰 1(奎宁酸)峰面积分别下降 89.51%、83.35%,峰 8(氧化前胡素)峰面积分别下降 50.27%、28.88%,抗氧化能力下降 44.27%、49.79%。由此可见,熏硫直接影响峰 1(奎宁酸)、峰 8(氧化前胡素)的含量,峰 1(奎宁酸)、峰 8(氧化前胡素)可能为祁白芷抗氧化活性的物质基础,佐证了上述灰色关联度和偏最小二乘回归的分析结果。

灰色关联度分析常被用来考察系统动态发展过程中的关联密切程度,若两者动态变化基本相似,则

关联度大;若两者动态变化相异,则关联度小^[22]。指纹图谱 13 个共有峰与抗氧化活性的关联度均大于 0.700,说明 13 个共有峰的峰面积与抗氧化活性的动态变化相似,表明祁白芷的抗氧化活性是多种成分共同作用的结果。灰色关联度虽然能识别出与抗氧化活性关联度较高的共有峰,但不能判定各共有峰对抗氧化活性是促进还是抑制作用。偏最小二乘法结合了主成分分析、典型相关分析和多元线性回归分析,是建立自变量和因变量线性回归模型的统计方法,其回归系数的正负能够反映与抗氧化活性为正相关或负相关^[23],实验结果表明,峰 1(奎宁酸)、峰 2(二氢山芹醇)、峰 3(水合氧化前胡素)、峰 4(白当归素)、峰 6(佛手柑内酯)、峰 8(氧化前胡素)、峰 9(欧前胡素)、峰 10(珊瑚菜素)、峰 12(异欧前胡素)、峰 13(镰叶芹酮)与药效呈正相关。综合以上 2 种统计模型,以灰色关联度 >0.7 ,VIP >1 且回归系数为正值为筛选条件^[22],可推测峰 1(奎宁酸)、峰 6(佛手柑内酯)、峰 8(氧化前胡素)、峰 10(珊瑚菜素)、峰 12(异欧前胡素)、峰 13(镰叶芹酮)是祁白芷发挥抗氧化活性主要成分。

氧化应激是机体众多疾病发生发展的基础,指非正常生理状态下,氧自由基的产生大于清除,造成氧化系统失衡,从而导致细胞或组织损伤的一种状态^[24]。现代药理研究表明,白芷可以用来改善糖尿病溃疡和急性肝损伤等疾病产生的氧化应激反应^[25-27]。本研究通过建立祁白芷指纹图谱及测定其抗氧化活性,将祁白芷中的化学成分与抗氧化活性联系起来,结果显示,奎宁酸^[28]、佛手柑内酯^[29]、氧化前胡素^[30]、珊瑚菜素^[31]、异欧前胡素^[32]、镰叶芹酮等成分含量越高,祁白芷抗氧化活性越强,抗氧化应激的作用越好。

REFERENCES

- [1] ZHANG L, YANG X W. Analysis of nine furanocoumarins in *Angelica Dahuricae Radix* from different regions by ultra-fast liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2018, 38(2): 214-220.
- [2] CHEN L, TANG Z S, SONG Z X, et al. Quantitative determination of nine furanocoumarins for quality evaluation of *Angelica dahurica* from different habitats [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2019, 44(14): 3002-3009.
- [3] SONG J N, HOU F J, WANG Q, et al. Analysis of the Accumulation of Coumarins in Chinese qi of *Angelica Dahurica* by Paraffin Sectioning [J]. *Guangzhou Chem Ind* (广东化工), 2017, 44(9): 95-96.
- [4] WANG F, WANG C. Study on the relationship between the anti-aging function and antioxidation of ethanol extract from *an-gelicoe Dahuricae Radix* [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2012, 23

- (7): 599-602.
- [5] WANG G H, CHEN C Y, TSAI T H, *et al.* Evaluation of tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of *Angelica dahurica* root extracts for four different probiotic bacteria fermentations [J]. *J Biosci Bioeng*, 2017, 123(6): 679-684.
- [6] XV S, LIU P Y, HE Q Z. Effect of Coumarin of *Angelica dahurica* on Dysmenorrhea Model Mice [J]. *J Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 2020, 37(5): 5-10.
- [7] ZHAO A H, YANG X W, YANG X B, *et al.* A new natural product from root of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37 (16): 2400-2407.
- [8] ZHAO A H, YANG X W, YANG X B, *et al.* GC-MS analysis of essential oil from root of *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36 (5): 603-607.
- [9] SONG J N, NIUL Y, HOU F J, *et al.* The content changes of index components of Anguo genuine medicinal materials *Angelica dahurica* cv. Qibaizhi at different sowing time and different harvest time [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2015, 26 (5): 1245-1246.
- [10] LIU X Y, JIANG W W, SU M, *et al.* Quality evaluation of traditional Chinese medicines based on fingerprinting [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(1): 6-17.
- [11] LIN S, SUN X G, ZHOU L J, *et al.* Determination of fifteen flavonol glycosides in Shuxuening Injection and establishment of its UPLC fingerprints [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2023, 45 (4): 1068-1073.
- [12] LI Y R, ZHOU W W, WANG Z Y, *et al.* Relationship between antioxidant activity and spectrum-effect of hawthorn leaf extracts [J]. *China Pharm J* (中国药理学杂志), 2020, 55(20): 1673-1679.
- [13] WANG X G, YANG H J, WANG S S, *et al.* Fragmentation pathways of five furocoumarin using line ion trap with orbitrap-mass spectrometry [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40(7): 1334-1341.
- [14] LIAO C P, ZHAO L, XIAO J L, *et al.* Based on UPLC-Q-TOF-MS / MS technology, the chemical constituents of Mongolian medicine Huanglumu were analyzed [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2020, 43 (10): 2459-2464.
- [15] DUNZHU C R, DENG M Z, ZHU G H, *et al.* Analysis of chemical constituents of coumarins in *Heraeleum millefolium* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2022, 33 (1): 105-114.
- [16] PENG L N. Study on the Relevance of *Angelicae Dahuricae Radix* and Tyrosinase Activity [D]. Zhengzhou: Henan University (河南大学), 2017.
- [17] JIANG H G, ZHAO X K, LIN W Y, *et al.* Qualitative Analysis of Multiple Coumarins in *Angelicae Sinensis Radix* Based on HPLC-Q-TOF-MS / MS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2019, 25 (13): 157-162.
- [18] WANG L Y, WANG B, PEI Y L, *et al.* Rapid identification on chemical constituents in volatile oil of *Saposhnikovia divaricate* by GC-Q/TOF MS [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2021, 40(12): 1697-1705.
- [19] Li Y Y. Grey correlation analysis of industrial structure and economic growth in Gansu province [J]. *Enterprise Economy* (企业经济), 2011, 30 (5): 20-23.
- [20] Chen S L, SUN Y, WEI C X, *et al.* Establishment of HPLC fingerprint, chemical pattern recognition analysis and content determination of three components in Houxue Zhitong Capsules [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2022, 42(3): 242-247.
- [21] LI L, WANG J H, LI C, *et al.* Study on the compatibility stability of salvianolic acids for injection mixed with sodium chloride injection [J]. *Tianjin Pharm* (天津药学), 2023, 35(1): 27-35.
- [22] LI Z. Study on the Difference in Chemical Composition and Spectrum-effect Relationship of Epimedium from Different Origins [D]. Changchun: Jilin University(吉林大学), 2023.
- [23] QIN H Z, LIN S, XIE F F, *et al.* Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprint and anti-inflammatory activity of *Viola inconspicua* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2023, 39(4): 68-74.
- [24] GUO X, LIN R, YE S P, *et al.* Extraction and separation of active components from cordyceps militaris and antioxidant effect *in vitro* [J]. *China Pharm J* (中国药理学杂志), 2022, 57(5): 357-362.
- [25] LEI S S. The effect and mechanism of *Angelica dahurica* (AD) on skin ulcer in type 2 diabetic mice [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2020.
- [26] Kaan K. Sinapic acid-loaded gel accelerates diabetic wound healing process by promoting re-epithelialization and attenuating oxidative stress in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114788.
- [27] HU Z H. Study on anti hepatic fibrosis of *Angelica dahurica* and its active component Bergapten [D]. Yanji: Yanbian University, 2023.
- [28] ZHANG W. Synthesis of Quinic Acid Starting from Shikimic Acid [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2015.
- [29] LATIF K, KHAN A U, IZHAR U H M, *et al.* Bergapten Attenuates Nitroglycerin-Induced Migraine Headaches through Inhibition of Oxidative Stress and Inflammatory Mediators [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(18): 3303-3313.
- [30] DU L. Anti-inflammatory and antioxidant effects and mechanisms of foxypucedanin on acute lung injury in mice [D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [31] LI H T, HE L, QIU J B. Effects of the Chinese herb component phellopterin on the increase in cytosolic free calcium in PC12 cells [J]. *Drug Dev Res*, 2007, 68(2): 79-83.
- [32] PIAO X L, PARK I H, BAEK S H, *et al.* Antioxidative activity of furanocoumarins isolated from *Angelicae dahuricae* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93(2-3): 243-246.

(收稿日期:2023-09-09)