DOI:10.11656/j.issn.1673-9043.2026.07.08

顶羽菊不同极性提取物高效液相指纹图谱与体外抗氧化活性谱效关系研究*

丁曼[1],毛艳[1],阿地娜•阿不都艾尼[1,2],王新堂[1]
(1.新疆维吾尔自治区药物研究院,新疆维吾尔药重点实验室,乌鲁木齐 830010;
2.新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011)

摘要:[目的] 建立顶羽菊不同极性提取物高效液相(HPLC)指纹图谱,并探讨其抗氧化谱效关系,初步明确其抗氧化活性的有效成分。**[方法]** 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法定性分析顶羽菊化学成分;采用HPLC法建立顶羽菊不同极性提取物的指纹图谱;结合1,1-二苯基-2-苦基肼基(DPPH)自由基清除率和总还原能力的测定方法评价不同提取物的抗氧化活性;利用灰色关联度法和偏最小二乘法联合分析共有峰与抗氧化活性的谱效关系,筛选出具有抗氧化活性的有效成分,并进行单体化合物体外抗氧化实验验证。**[结果]** 指纹图谱结果显示,顶羽菊8种不同极性提取物HPLC指纹图谱共确定22个共有峰,结合质谱结果指认出其中7个化学成分。抗氧化实验结果显示,不同极性提取物的抗氧化活性存在差异,其中50%乙醇提取物的乙酸乙酯部位和正丁醇部位抗氧化活性最强。谱效关系分析结果显示,1(新绿原酸)、2(绿原酸)、3(隐绿原酸)、5、7、13号共有峰所代表的化学成分对顶羽菊抗氧化活性贡献最大。抗氧化验证结果显示,绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸具有抗氧化活性且呈一定浓度依赖性。**[结论]** 顶羽菊的抗氧化活性是多成分共同起效的结果,有效成分主要为绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸,可以为顶羽菊药材的抗氧化药效物质基础、质量控制及开发利用提供参考。

关键词:顶羽菊;不同极性提取物;指纹图谱;抗氧化活性;谱效关系
中图分类号:R284 **文献标志码:**A
文章编号:1673-9043(2026)07-0812-09

菊科植物顶羽菊[*Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo]为多年生草本植物,又名“苦蒿”,来源于漏芦属植物顶羽菊(苦蒿)的地上部分[1],其味辛、苦,性寒,药用历史悠久,内服、外敷皆可,内服清热解毒、活血消肿,外用祛风除湿、通经活络,主治关节炎、痈肿疥疮、疟疾等症。常与骆驼蓬等量煎煮水洗患处,或与独活、防风、秦艽、车前草水煎服,用于治疗关节炎,具有较好的医学应用前景。目前中国对顶羽菊化学成分及药理作用的研究报道较少,主要含有倍半萜内酯类、生物碱类、黄酮类和挥发油类等化合物,具有抗氧化、抗炎、抗癌、抗菌等药理活性[2-3]。现代研究表明,这些活性与自由基氧化损伤关系密切,当自由基产生过多或机体清除自由基的能力下降时,产生的自由基及过氧化反应将会导致机体损伤,引发关节炎症反应,加剧组织及细胞损伤[4-5],因此亟需对顶羽菊抗氧化活性的化学成分进行系统研究。

近年来,随着中药指纹图谱广泛应用,应用最多的高效液相(HPLC)指纹图谱已经成为辨识中药整体质量的重要途径之一,它可以反映不同样品化学成分的相似性及质量一致性,具有整体性高、特征性强等优势[6]。然而,指纹图谱虽然是国内外广泛接受的一种中药质量评价方法,但它所反映的化学成分并不都是有效成分或指标成分,且未实现与药效相关联,以此评价中药质量的优劣存在较大的局限性和不准确性[7]。因此,积极探索药材中活性

***基金项目:**新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2022D01A304);新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(KY2024124,KY2025078,KY2026062)。
作者简介:丁曼(1990-),女,硕士,高级实验师,主要从事中药民族药新药研发及质量控制方向研究。
通信作者:毛艳,E-mail:maoyan7529@163.com;王新堂,E-mail:wangxintang620@126.com。
引用格式:丁曼,毛艳,阿地娜•阿不都艾尼,等.顶羽菊不同极性提取物高效液相指纹图谱与体外抗氧化活性谱效关系研究[J].天津中医药大学学报,2026,45(7):812-820.

成分的筛选情况，才能更加全面有效地评价中药质量。中药谱效学是针对中药多成分、多靶点、多途径协同作用发挥药效的特点，在中药指纹图谱研究建立的基础上，将指纹图谱的特征峰与药效水平相对应，将化学成分的变化与药效结果相关联，筛选出与药效关联密切的化学成分群[8]。本研究拟建立顶羽菊不同极性提取物的HPLC指纹图谱；通过测定1,1-二苯基-2-苦基肼基（DPPH）自由基清除率和总还原能力，对顶羽菊8种不同提取物的抗氧化活性进行评价；采用灰色关联度法（GRA）和偏最小二乘（PLS）分析法将顶羽菊不同提取物的指纹图谱共有峰峰面积与其抗氧化活性数据进行相关性分析，以期挖掘出顶羽菊抗氧化活性的有效成分，为其未来的资源开发与利用提供有效技术手段和科学依据。

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）；Thermo Ultimate 3000高效液相色谱仪（美国Thermo Scientific Technologies公司）；LTQ Orbitrap XL高分辨质谱仪（美国Thermo Fisher公司）；CPA-225D型十万分之一电子天平（德国Sartorius公司）；JY-5002型百分之一电子天平（上天精密仪器）；Cytation3型多功能酶标仪（美国热电公司）。

1.2 试药 新绿原酸（批号：DSTDX001504，纯度：98.80%）、隐绿原酸（批号：DST221220-035，纯度：99.17%）、1,5-二咖啡酰奎宁酸（批号：DSTDE000602，纯度：98.42%）、高车前素（批号：DSTDG002601，纯度：99.23%）购自成都德思特生物技术有限公司；绿原酸（批号：110753-202018，纯度：96.1%）、芹菜素（批号：111901-201102，纯度：99.6%）购自中国食品药品检定研究院；异绿原酸C（批号：MUST-21081010，纯度：99.77%）购自成都曼思特生物科技有限公司；DPPH购自北京索莱宝科技有限公司；乙腈（色谱纯）购自美国Fisher公司；超纯水为怡宝纯净水；其他化学试剂均为分析纯。

1.3 药材 顶羽菊药材于2021年9月3日采自新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市，由新疆维吾尔自治区药物研究院毛艳研究员鉴定为菊科漏芦属植物顶羽菊 *Rhaponticum repens*（L.）Hidalgo（苦蒿）的地上部分。

2 方法与结果

2.1 不同极性提取物的制备 称取切制为长段（1~1.5 cm）的顶羽菊药材250 g，平行5份，分别用12倍量水、30%乙醇、50%乙醇、75%乙醇、95%乙醇，加热回流提取2次，每次1.5 h，滤过，合并滤液，于50 ℃下减压浓缩，经冷冻干燥后研磨成粉末，即得5种顶羽菊提取物，记为S1~S5。再称取顶羽菊提取物（S3）30 g，加200 mL水溶解后，依次用乙酸乙酯、正丁醇各200 mL，振摇提取，分别合并乙酸乙酯液、正丁醇液和水液，减压浓缩，经冷冻干燥后研磨成粉末，即得3种顶羽菊提取物，记为S6~S8。制备得到的水提取物（S1）、30%乙醇提取物（S2）、50%乙醇提取物（S3）、75%乙醇提取物（S4）、95%乙醇提取物（S5）、50%乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位（S6）、50%乙醇提取物的正丁醇萃取部位（S7）、50%乙醇提取物的水混悬部位（S8），其得率依次为18.19%、19.86%、17.04%、13.27%、6.68%、1.39%、4.19%、6.97%。

2.2 超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）定性分析

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取顶羽菊提取物（S6）100 mg，置于10 mL量瓶中，加入50%甲醇适量，超声处理30 min（功率500 W，频率40 kHz，温度20 ℃），放冷，用50%甲醇稀释至刻度，摇匀，用0.20 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱：Hypersil GOLDTM C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.9 μm），流动相：0.1%甲酸溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~5 min，8%B；5~30 min，8%B→16.5%B；30~40 min，16.5%B；40~60 min，16.5%B→36.5%B；60~63 min，36.5%B→45%B；63~68 min，80%B；68~69 min，80%B→8%B；69~75 min，8%B）；柱温：25 ℃；进样量：5 μL；流速：0.4 mL/min；检测波长：330 nm。

2.2.3 质谱条件 电喷雾离子源（ESI）；正负离子扫描；高分辨数据采集（HRMS），分辨率30 000；离子传输管温度：375 ℃；喷雾电压：4.5 kV；离子传输管电压：60 V；套管镜头电压：80 V；鞘气：30 arb；辅助气：10 arb；扫描范围：50~1 000 m/z。

2.2.4 数据分析与结构鉴定 采用Compound Discoverer 3.3软件对质谱图进行分析，并应用相关天然产物库对质谱数据中可能存在的物质进行检索、匹配等对质谱数据峰进行鉴定，初步推断色谱峰对应化合物的信息。在顶羽菊提取物（S6）中鉴定和推测出13个化学成分，见表1。

2.3 HPLC指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱：Agilent Eclipse XDB-C_{18}

表1 顶羽菊UPLC-MS/MS分析结果

编号	保留时间(min)	分子式	离子模式	实测值(m/z)	理论值(m/z)	误差(×10⁻⁶)	碎片离子(m/z)	化合物
1	0.97	$C_6H_8O_7$	$[M-H]^-$	191.018 9	192.026 2	-4.26	111.01、87.01	柠檬酸
2	1.02	$C_4H_6O_4$	$[M-H]^-$	117.018 8	118.026 1	-4.03	99.01、72.90	琥珀酸
3*	1.82	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.086 3	354.093 6	-4.15	191.08	新绿原酸
4	1.82	$C_7H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	191.055 3	192.062 6	-4.31	127.04	D-(-)-奎宁酸
5*	3.28	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.086 3	354.093 6	-4.17	233.05、191.08	绿原酸
6*	3.87	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.086 3	354.093 6	-4.32	239.06、191.08、173.04	隐绿原酸
7	20.14	$C_{21}H_{18}O_{13}$	$[M-H]^-$	477.072 5	478.065 2	-4.70	301.04、151.01	槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷
8*	27.16	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.117 1	516.124 3	-1.18	443.11、433.08、397.10、353.09	1,5-二咖啡酰奎宁酸
9*	32.75	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.117 2	516.124 5	-1.67	106.00	异绿原酸C
10	33.06	$C_{21}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	431.096 6	432.103 9	-4.12	285.04	山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷
11	40.92	$C_{20}H_{24}O_9$	$[M-H]^-$	407.133 0	408.140 2	-4.39	247.20	紫花前胡苷
12*	49.62	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	269.044 4	270.051 7	-0.69	151.00、135.05	芹菜素
13*	50.56	$C_{16}H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	299.054 8	300.062 1	-4.24	284.03	高车前素

注:*为经对照品比对鉴定的化学成分。

(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min,5%B;5~15 min,5%B→10%B;15~20 min,10%B→14%B;20~80 min,14%B→26%B;80~113 min,26%B→38%B;113~113.01 min,38%B→5%B;113.01~120 min,5%B)[9];柱温:30 ℃;进样量:10 μL;流速:1.0 mL/min;检测波长:327 nm。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取顶羽菊提取物S1~S8各100 mg,分别置10 mL量瓶中,加50%甲醇适量,超声处理30 min(功率500 W,频率40 kHz,温度20 ℃),放冷,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3.3 混合对照品溶液的制备 精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸C、芹菜素、高车前素对照品适量,分别置于10 mL容量瓶中,加甲醇定容,制得各单一对照品贮备液。取上述各单一对照品贮备液适量,置于5 mL容量瓶中,加甲醇定容,得上述各成分质量浓度分别为4.34、51.13、11.04、51.70、11.62、109.35、100.23 μg/mL的混合对照品溶液。

2.3.4 方法学考察 以绿原酸为参照峰,计算各个共有峰的相对峰面积和相对保留时间的相对标准偏差(RSD),考察精密度、重复性和稳定性[10]。精密称取顶羽菊提取物(S3),精密度考察按照"2.3.2"项方法制备供试品溶液,按照"2.3.1"项色谱条件连续进样6次,计算得到各共有峰的相对保留时间RSD均<0.38%,相对峰面积RSD均<2.53%(n=6),表明仪器精密度良好;重复性考察按照"2.3.2"项方法平行制备6份供试品溶液,按照"2.3.1"项色谱条件进样测定,计算得到各共有峰的相对保留时间RSD均<0.34%,相对峰面积RSD均<2.98%(n=6),表明方法重复性良好;稳定性考察按照"2.3.2"项方法制备供试品溶液,按照"2.3.1"项色谱条件分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h进样测定,计算得到各共有峰的相对保留时间RSD均<0.33%,相对峰面积RSD均<2.90%(n=8),表明供试品溶液在室温下放置24 h稳定。

2.3.5 指纹图谱的建立及相似度评价 取"2.3.2"项制备的8种顶羽菊提取物供试品溶液,按照"2.3.1"项色谱条件进样,所得图谱文件以AIA格式导入"中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012版)"[11]进行相似度分析。S3样品设为参照图谱(中位数法、时间窗0.2),经多点校正和自动峰匹配后生成对照图谱(R),共标定22个共有峰(图1)。通过与对照品比对,指认出7个共有峰(图2),其中1号峰为新绿原酸,2号峰为绿原酸(参照峰),3号峰为隐绿原酸,10号峰为1,5-二咖啡酰奎宁酸,15号峰为异绿原酸C,20号峰为芹菜素,21号峰为高车前素。对照指纹图谱与不同极性提取物进行相似度分析,相似度为0.428~0.996(表2),表明其化学成分差异性较大。

2.4 顶羽菊提取物抗氧化活性研究

2.4.1 DPPH自由基清除率测定 参照文献[12-16]方法。将50%甲醇300 μL+0.04 mg/mL DPPH甲醇溶液750 μL(空白组)、不同质量浓度的顶羽菊提取物(0.03~0.50 mg/mL)300 μL+0.04 mg/mL DPPH甲醇

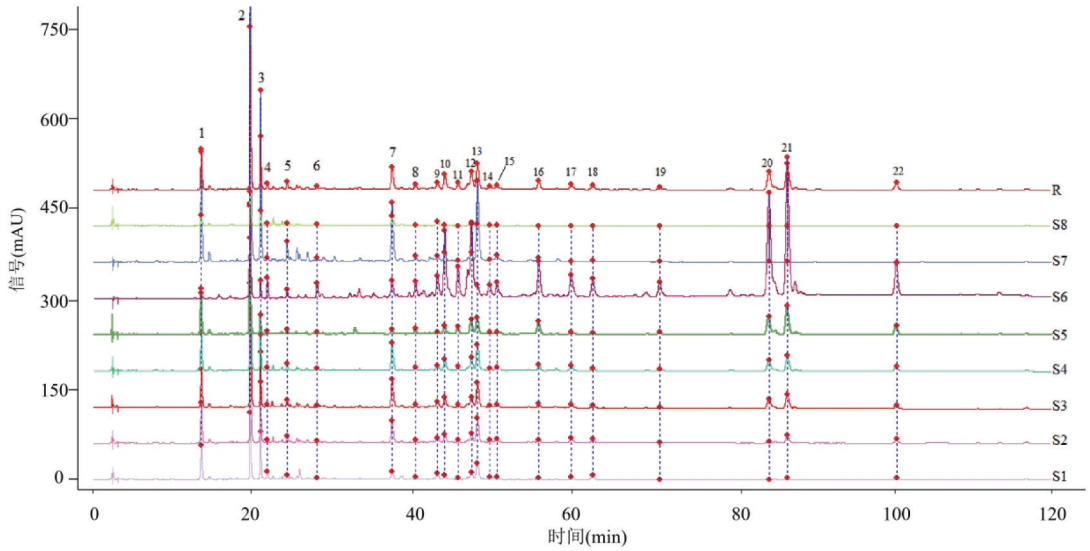
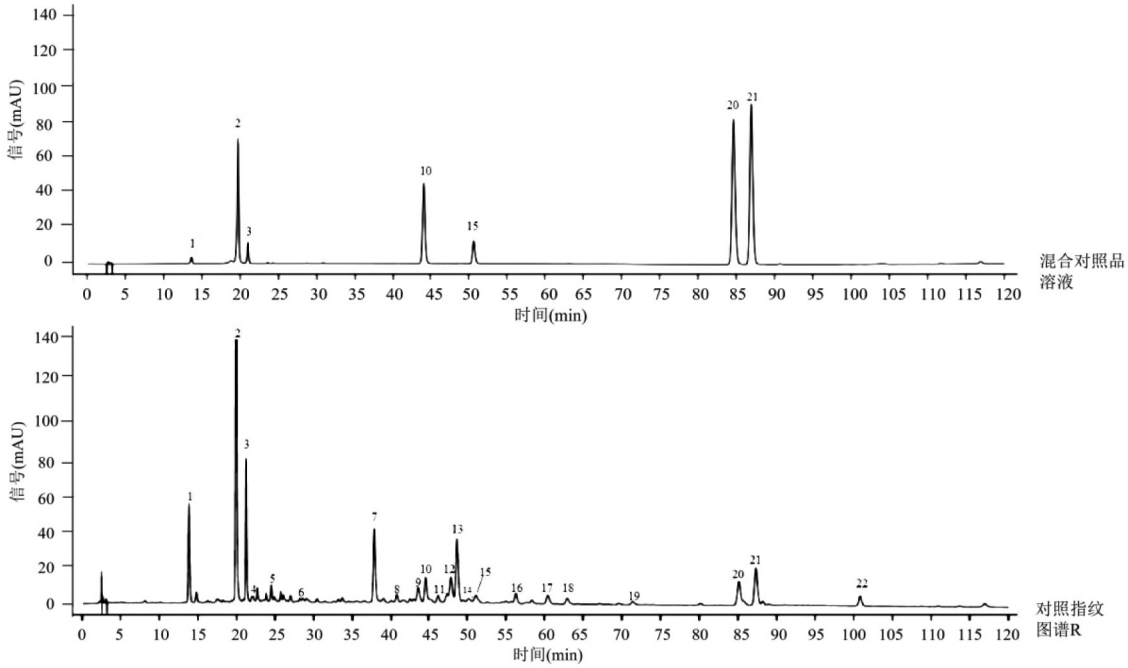


图1　顶羽菊提取物HPLC叠加图谱



注：1，新绿原酸；2，绿原酸；3，隐绿原酸；10，1，5-二咖啡酰奎宁酸；15，异绿原酸C；20，芹菜素；21，高车前素。

图2　混合对照品溶液和对照指纹图谱*R*的HPLC图

表2　顶羽菊提取物相似度分析结果

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.914	S5	0.917
S2	0.986	S6	0.428
S3	0.993	S7	0.963
S4	0.996	S8	0.923

溶液750 μL（供试品组）、不同质量浓度的顶羽菊提取物（0.03~0.50 mg/mL）300 μL+甲醇750 μL（本底组）各自混合均匀，各取200 μL加入96孔板中，在室温避光反应30 min。采用酶标仪测定各孔在517 nm波长处的吸光度（A）值，按照公式计算清除率（R）。R=[1-(A_1-A_2)/A_0]×100%（式中A_0为空白组吸光度值，A_1为供试品组吸光度值，A_2为本底组吸光度值）。每个样品平行测定3次，取平均值。按照公式计算DPPH自由基清除率，然后计算半数清除浓度（IC_{50}）。

结果显示，在0.03~ 0.50 mg/mL浓度，顶羽菊不同提取物对DPPH自由基均具有清除作用，且IC_{50}值越小，其清除DPPH自由基能力越强。通过对IC_{50}排序，发现其清除能力大小依次为S7>S6>S2>

S3>S4>S1>S5>S8，其中S7和S6的活性最强，其IC_{50}值分别为66.96、67.16 μg/mL。见表3。

2.4.2 总还原能力测定 参照文献[17-20]方法。取不同质量浓度的顶羽菊提取物（0.1~2.0 mg/mL）各2.5 mL，依次加入磷酸缓冲盐溶液（pH=6.6）2.5 mL和1%铁氰化钾溶液2.5 mL，混匀，50 ℃水浴20 min，立即置于冰水中冷却至室温，加入10%三氯乙酸溶液2.5 mL，混匀，取2.5 mL上清液，依次加入蒸馏水2.5 mL和0.1%三氯化铁溶液0.5 mL，混匀，静置10 min，取200 μL各混合溶液于96孔板中，在700 nm处测定吸光度值。以等量的50%甲醇作为空白对照，每个样品平行测定3次，取平均值。以各顶羽菊提取物浓度为横坐标，吸光度为纵坐标绘图，得到线性回归方程，计算浓度为1.0 mg/mL时的吸光度值。

表3显示，在0.1~2.0 mg/mL浓度，顶羽菊不同提取物均具有较强的还原能力，吸光度值越高说明还原能力越强。当浓度为1.0 mg/mL时，其还原能力大小依次为S6>S7>S3>S2>S4>S1>S8>S5，其中S6活性最强，吸光度值为0.861 5。

以上结果表明，顶羽菊不同极性提取物S1~S8均具有较好的抗氧化活性，其对DPPH自由基均具有清除作用，随浓度增加其清除自由基的能力也逐渐增强，其中顶羽菊50%乙醇提取物的正丁醇部位和乙酸乙酯部位活性最强；8种顶羽菊提取物均具有较强的还原能力，其中顶羽菊50%乙醇提取物的乙酸乙酯部位活性最强，表明顶羽菊提取物可以作为抗氧化剂提供电子，具有较强还原性。此外，顶羽菊不同提取物对DPPH自由基的清除能力和总还原能力均具有浓度依赖性。综上所述，顶羽菊50%乙醇提取物的乙酸乙酯部位和正丁醇部位抗氧化活性较好。

2.5 顶羽菊不同提取物指纹图谱与抗氧化作用的谱效关系研究

2.5.1 GRA分析 对指纹图谱中22个共有峰的峰面积与DPPH自由基清除率和总还原能力吸光度分别进行初值化处理。分别以DPPH自由基清除率和总还原能力吸光度为母序列，峰面积为子序列，计算得出顶羽菊各共有峰与DPPH自由基清除率和总还原能力吸光度之间的关联度，并对结果进行排序，得到关联序[21-22]。

GRA结果见表4，22个共有峰所代表的化学成分与DPPH自由基清除作用和总还原能力的关联度均大于0.7，说明顶羽菊的抗氧化活性是多成分共同起效的结果。其中2号峰（绿原酸）与DPPH自由基清除率和总还原能力吸光度的关联度均大于0.88，均排序前2位，说明2号峰（绿原酸）可能对顶羽菊的抗氧化活性起到重要作用。DPPH自由基清除率的关联度前6位的排序为1>2>7>13>3>5，总还原能力吸光度的关联度前6位的排序为5>2>7>13>3>1，均排序前6位的峰是1（新绿原酸）、2（绿原酸）、3（隐绿原酸）、5、7、13。

2.5.2 PLS分析 以指纹图谱共有峰的峰面积为自变量X，以DPPH自由基清除率和总还原能力吸光度值分别作为因变量Y，导入SIMCA 14.0软件，进行PLS相关性分析，计算得到共有峰的峰面积与DPPH自由基清除率及总还原能力吸光度的标准化回归系数（R^2）和变量投影重要性（VIP）值[23-26]。

根据PLS分析原理，通常认为VIP≥1时，自变量在解释因变量时具有显著重要性。结果表明峰1、2、3、5、7、9、13、8的DPPH自由基清除率的VIP值均大于1，且误差线不过原点，排序为1>7>2>5>9>3>13>8（见图3A）。R^2的正、负代表各峰与DPPH自由基清除率呈正相关或负相关，有18个共有峰与

表3 各组清除DPPH自由基、还原能力的实验结果

编号	DPPH自由基清除率		总还原能力	
	回归方程	IC_{50}（μg/mL）	回归方程	吸光度
S1	Y=0.158X+22.794，r=0.999 4	172.41	Y=0.344X−0.004，r=0.998 8	0.340 6
S2	Y=0.170X+35.251，r=0.992 0	86.91	Y=0.440X−0.009，r=0.999 8	0.431 1
S3	Y=0.212X+24.204，r=0.981 9	121.74	Y=0.458X−0.009，r=0.996 2	0.448 8
S4	Y=0.151X+26.684，r=0.977 1	154.62	Y=0.460X−0.058，r=0.999 8	0.402 9
S5	Y=0.170X+18.980，r=0.997 9	183.01	Y=0.310X−0.037，r=0.999 6	0.273 1
S6	Y=0.386X+24.083，r=0.988 3	67.16	Y=0.747X+0.114，r=0.995 1	0.861 5
S7	Y=0.388X+24.041，r=0.978 7	66.96	Y=0.713X−0.021，r=0.997 7	0.691 4
S8	Y=0.173X+11.297，r=0.998 6	224.11	Y=0.303X−0.029，r=0.997 9	0.274 0

表4 顶羽菊提取物中22个共有峰与抗氧化活性的GRA结果

峰号	DPPH自由基清除率 IC_{50}		总还原能力吸光度	
	关联度	关联序	关联度	关联序
1	0.921	1	0.814	6
2	0.905	2	0.883	2
3	0.883	5	0.835	5
4	0.789	11	0.775	12
5	0.881	6	0.899	1
6	0.787	13	0.794	9
7	0.896	3	0.869	3
8	0.821	8	0.792	10
9	0.860	7	0.773	13
10	0.763	19	0.766	15
11	0.766	18	0.736	18
12	0.776	16	0.781	11
13	0.885	4	0.858	4
14	0.798	10	0.770	14
15	0.818	9	0.807	7
16	0.781	15	0.730	19
17	0.786	14	0.799	8
18	0.788	12	0.757	16
19	0.749	21	0.725	20
20	0.738	22	0.721	22
21	0.750	20	0.724	21
22	0.775	17	0.747	17

DPPH自由基清除率呈正相关，相关性大小前6位依次为峰1（新绿原酸）、2（绿原酸）、7、3（隐绿原酸）、13、5（见图3B），对抗氧化活性的贡献较大。峰1、2、3、4、5、7、8、9、13、15的总还原能力吸光度的VIP值均大于1，排序为5>9>7>15>8>2>1>3>13>4（见图3C）。总还原能力22个共有峰的 R^2 均为正数，均与总还原能力呈正相关，相关性大小前6位依次为峰7、1（新绿原酸）、3（隐绿原酸）、2（绿原酸）、13、5（见图3D），表明这些成分对总还原能力具有明显贡献作用。

综合DPPH自由基清除率和总还原能力吸光度值的回归系数和VIP值两个指标，以 R^2 为正数，且VIP值>1为标准，推测峰1（新绿原酸）、2（绿原酸）、3（隐绿原酸）、5、7、13所代表的化学成分可能对顶羽菊抗氧化活性贡献较大，与GRA结果一致。

2.6 单体化合物抗氧化验证实验 为了验证谱效分析结果的可靠性，以维生素C作为阳性对照，对已经指认的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸进行抗氧化活性测定[27]。采用GraphPad和SPSS 27.0软件进行统计学分析。所有结果均为3次实验的平均值，数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.6.1 DPPH自由基清除率测定 以50%甲醇为溶剂，将维生素C、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸分别制成质量浓度为3、6、11、14、18 μg/mL的系列工作溶液，按照“2.4.1”项方法，与DPPH溶液进行反应，平行测定3次，得到DPPH自由基清除率。

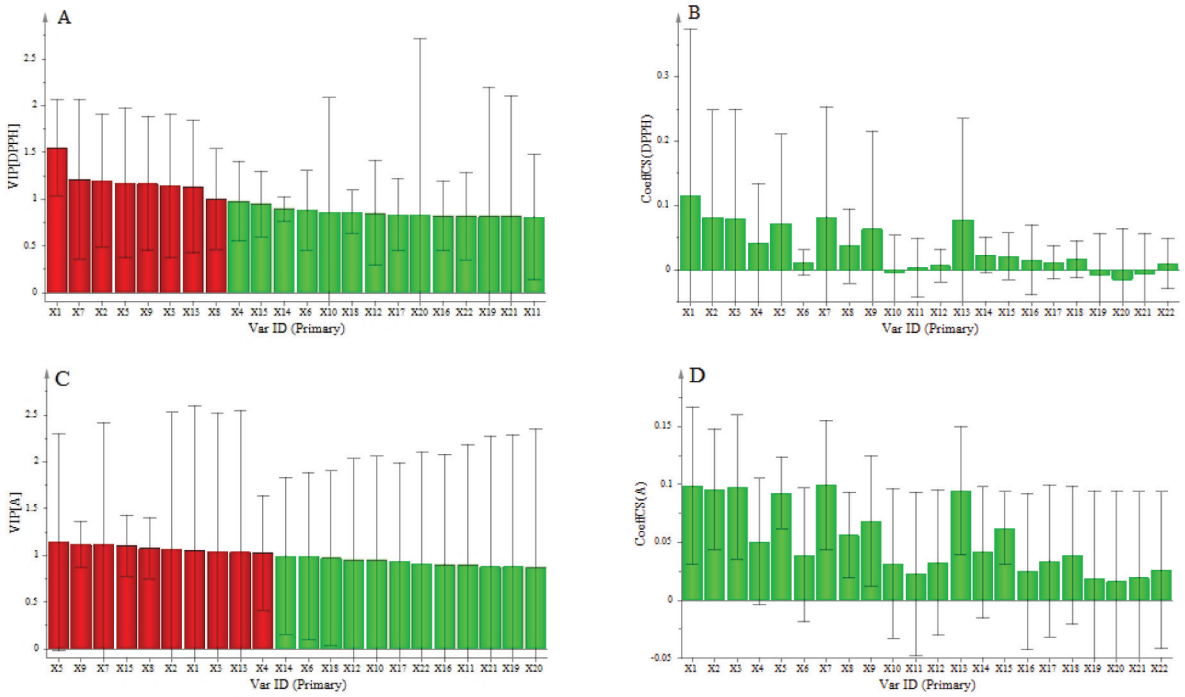
2.6.2 总还原能力测定 以50%甲醇为溶剂，将维生素C、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸分别制成质量浓度为0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL的系列工作溶液，按照“2.4.2”项方法，平行测定3次，得到吸光度值。

结果见图4，绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸均有较强的清除DPPH自由基的能力和还原能力，且呈剂量依赖关系，但较阳性对照维生素C稍弱。

3 讨论

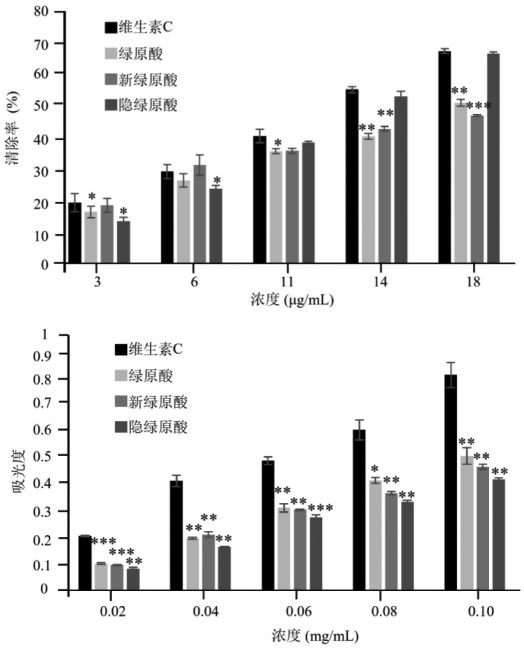
3.1 不同极性提取物制备方法的选择 据文献[3]报道，顶羽菊中含酚酸类、黄酮类，还包括倍半萜内酯类、生物碱类及挥发油类等化学成分。鉴于不同化学成分在极性溶剂中溶解性存在差异（酚酸类、黄酮苷元易溶于高浓度乙醇或乙酸乙酯，黄酮苷、皂苷可以溶于低浓度乙醇或正丁醇），为实现各类成分的全面提取，本研究采用不同浓度乙醇对药材进行差异化提取，制备5种不同浓度乙醇的顶羽菊提取物，并对其DPPH自由基清除率及总还原能力进行测定，评估其抗氧化活性。结果表明，50%乙醇提取物抗氧化能力较优。据此，对该提取物进一步萃取，最终获得8种不同极性的顶羽菊提取物。考虑到乙酸乙酯或正丁醇提取物对动物毒性较大，可能影响后续动物实验开展，因此本研究制备8种不同极性的顶羽菊提取物，并进行抗氧化活性谱效关系研究，旨在从复杂混合物中初步富集抗氧化活性物质，缩小活性成分研究范围，降低后续研究的盲目性，规避动物实验及单体分离可能带来的高成本与长周期问题。后续将通过动物实验进一步验证药效，完善顶羽菊抗氧化物质基础研究。

3.2 样品前处理及色谱条件选择 在指纹图谱研究中，对不同提取溶剂（50%甲醇和50%乙醇）、不同流动相组成（0.1%甲酸溶液、0.2%磷酸溶液、0.1%冰乙酸溶液）进行考察，以色谱峰个数、峰面积大小及分离度最终选定以50%甲醇作为提取溶剂、料液比1∶50、超声30 min作为样品的提取方法。由



注：图A，DPPH自由基清除率的VIP值；图B，DPPH自由基清除率的R^2；图C，总还原能力吸光度的VIP值；图D，总还原能力吸光度的R^2。

图3　顶羽菊提取物中22个共有峰与抗氧化活性的PLS分析结果



注：与维生素C比较，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。

图4　顶羽菊中化合物对DPPH自由基清除率和总还原能力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=5）

于该色谱洗脱方法流动相中水相比例较大，故选择了耐水性更好的Agilent Eclipse XDB-C_{18}色谱柱进行指纹图谱方法学考察；而在流动相、水相的选择中，当水相为0.1%甲酸溶液时，色谱峰的个数较多，分离效果和峰形良好，因此选择乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相。同时，分别考察检测波长为260、327、353和360 nm下样品的HPLC图谱，发现327 nm波长下色谱峰数量较多，且吸收率较高，最终选择327 nm作为检测波长。

3.3　谱效关系分析　当灰色关联度>0.8时，色谱峰和药效指标关联性较强[28]，GRA分析结果表明有7个共有峰与DPPH自由基清除率和总还原能力药效的关联度均>0.8，分别是色谱峰1、2、3、5、7、13、15，说明顶羽菊提取物是通过其内部“有效物质群”的协同作用达到抗氧化的效果。GRA在“谱-效”研究中扮演着重要角色，针对单体化合物数据缺失的研究现状，通过灰色关联度分析方法，建立化学组分丰度与活性强度的统计学关联模型，推测潜在活性贡献物质，为后续单体分离提供优先级排序依据，重点富集关联度显著的组分，但它并不能准确判断对药效存在促进或抑制作用。因此，本研究在GRA基础上进行PLS分析，获得了抗氧化活性较强且与DPPH自由基清除率和总还原能力吸光度呈正相关的6个色谱峰，即峰1、2、3、5、7、13，与GRA分析结果一致。结合GRA和PLSR两种化学计量学结果，初步推断峰1（新绿原酸）、2（绿原酸）、3（隐绿原酸）等酚酸类化合物发挥重要作用，同时明确了

各成分抗氧化活性的强弱，其中黄酮类成分对其抗氧化活性的贡献也不容小视。库尔班·吐松等[29]发现，顶羽菊良好的抗氧化能力与其所含黄酮类物质的含量呈正相关，表明顶羽菊是通过其内部“药效物质群”发挥抗氧化药效，这种“酚酸+黄酮”的复合体系可能通过多靶点协同作用增强抗氧化效果，而金银花、青蒿等中药的抗氧化成分以单一类别（酚酸或黄酮）为主[30-31]。另外，研究对抗氧化具有重要贡献的共有峰峰5、7、13未能识别，后期将利用其他分析与鉴别技术对其未知峰进行鉴定。此外，体外实验难以完全模拟体内代谢环境，未来需要结合动物实验验证药效，进一步完善顶羽菊的抗氧化物质基础研究。

4 小结

本研究首先采用HPLC法建立8种不同极性顶羽菊提取物指纹图谱，确定22个共有峰，指认了7个成分。其次，结合DPPH自由基清除率和总还原能力的测定方法评价不同提取物的抗氧化活性，得到能够揭示出体外抗氧化活性最强的药效信息。最后，根据生物信息学，将“谱”和“效”有机结合，确定活性成分。综合运用多种数学模型，既能达到优势互补、相互佐证，同时充分挖掘数据信息价值，精准评判顶羽菊抗氧化谱效相关性的程度与方向，为探究顶羽菊的抗氧化物质基础提供全面且可靠的实验支撑。整体而言，结合指纹图谱的完整性、药效反馈的契合性、谱效构建的全面性，深入分析中药“谱-效”关系，可以从“整体观”视角揭示中药化学成分与药效物质的联系，为中药质量控制与评价体系完善提供有力依据。

参考文献：

[1] 徐新，巴哈尔古丽·黄尔汗. 哈萨克药志(第一卷)[M]. 北京：民族出版社，2009：102.
[2] 余海涛，常一明，付慧敏，等. 顶羽菊生物活性及化学成分研究进展[J]. 甘肃农业科技，2022，53(9)：1-5.
[3] 赵东保，张卫，李明静，等. 顶羽菊化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2006，31(22)：1869-1872.
[4] 李淑娇，王宇卿. HPLC-ABTS-DAD-Q-TOF/MS在线筛选黄连抗氧化活性物质[J]. 中国中药杂志，2018，43(12)：2570-2574.
[5] 吕璐，姚小强，袁博，等. 氧化应激在类风湿关节炎炎症反应中的作用[J]. 中医学报，2024，39(7)：1448-1453.
[6] 高传源，孙会会，杜昆泽，等. 基于指纹图谱和多成分含量测定的莲房质量评价研究[J]. 天津中医药大学学报，2025，44(8)：708-714.
[7] 何江，尚芳红，李隆云，等. 佛手指纹图谱的建立及抗氧化谱效关系研究[J]. 中草药，2023，54(23)：7841-7852.
[8] 孟宪生，罗曦，贾梦楠，等. 中药质量评价研究现状及“质-量”双标评价方法探讨[J]. 中草药，2023，54(22)：7281-7286.
[9] 丁曼，毛艳，赵学佳，等. 基于指纹图谱和一测多评联合化学计量学及熵权TOPSIS法对顶羽菊药材质量评价[J]. 中草药，2024，55(16)：5627-5638.
[10] 刘萌，崔岩，杜昆泽，等. 基于UPLC指纹图谱结合化学计量学方法对旋覆花与水朝阳旋覆花的鉴别标志物筛选[J]. 天津中医药大学学报，2025，44(11)：995-1003.
[11] 李宇，刘芳，张美微，等. 清肺合剂薄层色谱鉴别、HPLC指纹图谱及多指标成分质量研究[J]. 天津中医药大学学报，2025，44(6)：495-501.
[12] 杨耘，卢雪蕊，宋平顺，等. 甘草HPLC指纹图谱及抗氧化活性的谱效关系[J]. 药物分析杂志，2022，42(4)：607-617.
[13] 杨明宇，李蒙禹，黄哲，等. 苗药地瓜藤UHPLC指纹图谱及抗氧化活性谱效关系研究[J]. 中国现代应用药学，2024，41(6)：787-796.
[14] 迟雪洁，张勇刚，宋文婷，等. 不同产地半枝莲指纹图谱的建立及抗氧化谱效关系研究[J]. 山西中医药大学学报，2026，27(6)：635-643.
[15] 彭倩，张蕾，乔羽君，等. 基于谱效关系的木蝴蝶体外抗氧化活性成分研究[J]. 中南药学，2026，24(3)：102-108.
[16] 张玉茹，孟雪，张红，等. 菝葜HPLC指纹图谱及抗氧化活性谱效关系研究[J]. 药物分析杂志，2026，46(1)：89-100.
[17] 南敏伦，尹涵，司学玲，等. 忍冬叶不同溶剂提取物与抗氧化的谱效关系研究[J]. 长春中医药大学学报，2022，38(10)：1102-1107.
[18] 成文荷，王小妹，王宁丽，等. 油橄榄叶中活性成分含量测定及抗氧化能力研究[J]. 中国油脂，2025，50(12)：89-95.
[19] 竹娟，王译晗，陈立莉，等. 芍药花提取物中黄酮的测定及其体外抗氧化和降脂活性研究[J]. 天然产物研究与开发，2024，36(11)：1838-1844，1899.
[20] 刘婵婵，崔丹丹，芦丹妮，等. 淫羊藿总黄酮超声波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发，2025，46(15)：92-97，130.
[21] 陈超，李娜，师伟，等. 经典名方桂枝茯苓方对子宫内膜间质细胞TNF-α表达的谱效关系及分子对接研究[J]. 中国医院药学杂志，2023，43(3)：243-251.
[22] 陶思雨，云鹭，彭一峰，等. 不同来源甘草地上部分提取物HPLC指纹图谱和抗氧化活性谱效关系的研究[J]. 西北药学杂志，2025，40(5)：47-54.
[23] 蒋盼云，熊慧利，林丽美，等. 不同产地大叶千斤拔指纹

图谱的建立及抑菌活性谱效关系研究[J].中国药学杂志,2025,60(6):569-578.
[24] 潘龙祥,高喜梅,乔萍,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术结合化学模式识别分析温胆汤不同工艺的差异性成分[J].中草药,2025,56(8):2811-2828.
[25] 王晶.不同产地枇杷叶抗氧化活性研究[D].重庆:重庆三峡学院,2024.
[26] 夏静静,李凤灵,张瑞莉,等.多元数据分析在天然产物谱-效关系研究中的应用进展[J].食品研究与开发,2025,46(23):194-202.
[27] 林希光,陈昕,孟江,等.基于谱效关系筛选橘核抗氧化活性质量标志物[J].中药材,2023,46(1):130-136.
[28] 周玲利,刘刚,刘育辰,等.中药谱效关系在中药中应用进展[J].中南药学,2024,22(9):2398-2404.
[29] 库尔班·吐松,展锐,张宏,等.顶羽菊抗氧化活性研究[J].生物技术通讯,2010,21(3):406-412.
[30] 陆远,张研,王莹,等.金银花化学成分及其抗氧化活性研究[J].中成药,2024,46(8):2638-2644.
[31] 赖立勇,夏天爽,徐圣焱,等.中药青蒿抗氧化活性的谱效关系研究[J].药学实践与服务,2024,42(5):203-210,216.

(收稿日期:2026-06-26)
(本文编辑:高树明)

Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprint and *in vitro* antioxidant activity of different polar extracts from Rhaponticum repens

DING Man[1], MAO Yan[1], ADINA Abuduaini[1,2], WANG Xintang[1]
(*1. Key Laboratory of Xinjiang Uygur Medicine, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830010, China;*
2. School of Pharmaceutical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract: [Objective] To establish the HPLC fingerprints of different polar extracts from Rhaponticum repens and investigate their spectrum-effect relationship with antioxidant activity, preliminarily identifying the effective components contributing to their antioxidant activity. **[Methods]** Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to qualitatively analyze the chemical components of Rhaponticum repens. HPLC was used to establish fingerprints of different polar extracts of Rhaponticum repens. The antioxidant activities of different extracts were evaluated by the DPPH radical scavenging rate and total reducing capacity assays. The relationships between common peaks and antioxidant activity were established by partial least squares analysis and gray relational analysis, the effective components of antioxidant activity were screened, and *in vitro* antioxidant validation tests were carried out. **[Results]** Twenty-two common peaks were identified from the fingerprint profiles of eight different polar extracts of Rhaponticum repens, and seven chemical components were identified based on mass spectrometry results. The antioxidant activity results showed that different polar extracts exhibited different antioxidant activities. Among them, the ethyl acetate fraction and n-butanol fraction of the 50% ethanol extract had the strongest antioxidant activity. Analysis of the spectrum-effect relationship showed that the chemical components represented by peaks 1 (neochlorogenic acid), 2 (chlorogenic acid), 3 (cryptochlorogenic acid), 5, 7, and 13 contributed the most to the antioxidant activity of Rhaponticum repens. The validation results of active ingredients showed that chlorogenic acid, neochlorogenic acid, and cryptochlorogenic acid possessed antioxidant activity in a concentration-dependent manner. **[Conclusion]** The antioxidant activity of Rhaponticum repens results from the synergistic effects of multiple components, with chlorogenic acid, neochlorogenic acid, and cryptochlorogenic acid being the primary active compounds. These findings provide a reference for elucidating the material basis of its antioxidant efficacy, as well as for quality control and further development and utilization of the medicinal material.

Keywords: Rhaponticum repens; different polar extract; fingerprint; antioxidant activity; spectrum-effect relationship