

菊苣中酚类化合物的 HPLC-ECD 指纹图谱 及抗氧化活性谱-效关系

邵起菊¹, 李玉琴¹, 曹莉¹, 杨煜垚², 任璠琦², 陈荣祥^{2,3*}, 袁晓艳^{1*}

(1. 遵义医科大学药学院, 贵州遵义 563000) (2. 遵义医科大学生命科学研究院, 贵州遵义 563000)

(3. 遵义市理化分析测试工程技术研究中心, 贵州遵义 563000)

摘要: 建立不同产地菊苣的高效液相色谱-电化学检测法 (High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detection, HPLC-ECD) 指纹图谱, 采用 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力和铁离子还原能力来评价菊苣的体外抗氧化活性, 并应用皮尔逊分析、灰色关联度分析和偏最小二乘法回归分析研究菊苣指纹图谱与抗氧化活性之间的“谱-效”关系, 探寻菊苣的抗氧化活性成分。该研究从建立的 21 批不同产地的菊苣指纹图谱中, 指认出 13 个酚类化学成分。菊苣提取物的最高总酚含量达 30.76 mg GAE/g, 其峰面积与抗氧化活性的相关系数大于 0.92, “谱-效”关系研究表明对抗氧化活性贡献较大的有菊苣酸、单咖啡酰酒石酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C, 表明其化学成分与抗氧化活性之间具有显著的相关性 ($P < 0.01$)。该研究建立的 HPLC-ECD 的菊苣指纹图谱结合统计分析方法研究“谱-效”, 既体现样品化学成分的差异性, 又可直接反映样品的抗氧化活性, 该方法简单、可靠, 为菊苣的质量评价及产品开发提供参考。

关键词: 菊苣; 高效液相色谱; 电化学检测器; 指纹图谱; 抗氧化活性; 谱-效关系

文章编号: 1673-9078(2023)09-113-122

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1179

HPLC-ECD Fingerprint of Phenolic Compounds in *Cichorium intybus* L. and Spectrum-effect Relationship of Their Antioxidant Activity

SHAO Qiju¹, LI Yuqin¹, CAO Li¹, YANG Yuyao², REN Fanyu², CHEN Rongxiang^{2,3*}, YUAN Xiaoyan^{1*}

(1. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

(2. Institute of Life Sciences, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

(3. Zunyi Engineering Technology Research Center of Physical and Chemical Analysis, Zunyi 563000, China)

Abstract: High performance liquid chromatography-electrochemical detection (HPLC-ECD) fingerprints of *Cichorium intybus* L. (chicory) of different origins were established. The antioxidant activities of chicory were evaluated in vitro by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (ABTS⁺) radical scavenging assays and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The "spectrum-effect" relationship between the fingerprint and antioxidant activities of chicory was analyzed using Pearson correlation analysis, partial least squares regression (PLSR) analysis, and gray correlation analysis (GRA) to identify the active antioxidant compounds. In total, 13 phenolic compounds were identified from the fingerprint of 21 batches of chicory from different regions. The total phenol content of chicory extract was up to 30.76 mg GAE/g, and the correlation coefficient between peak areas and antioxidant activity was > 0.92 . According to "spectrum-effect" relationship analyses, chicoric acid, caftaric acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A,

引文格式:

邵起菊, 李玉琴, 曹莉, 等. 菊苣中酚类化合物的 HPLC-ECD 指纹图谱及抗氧化活性谱-效关系[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 113-122

SHAO Qiju, LI Yuqin, CAO Li, et al. HPLC-ECD fingerprint of phenolic compounds in *Cichorium intybus* L. and spectrum-effect relationship of their antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 113-122

收稿日期: 2022-09-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81960707; 81760652); 遵义医科大学大学生创新创业项目 (ZYDC2022035; ZYDC2021152)

作者简介: 邵起菊 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品、药品色谱分析, E-mail: 2695524320@qq.com

通讯作者: 陈荣祥 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品药品色谱分析, E-mail: chenrongxiang2014@163.com; 共同通讯作者: 袁晓艳 (1980-), 女,

博士, 副教授, 研究方向: 药用植物活性成分分析, E-mail: yuanxiaoyan815@163.com

1,5-dicaffeoylquinic acid, and isochlorogenic acid C comprised the components primarily contributing to the antioxidant activity of chicory, indicating significant correlations between these chemical compounds and antioxidant activity ($P < 0.01$). The HPLC-ECD fingerprint of chicory established in this study combined with the statistical analysis method exploring the "spectrum-effect" not only indicate the differences in chemical compounds between samples but also directly demonstrate the antioxidant activity of samples. This method is simple and reliable, providing a reference for improving the quality evaluation and product development of chicory.

Key words: *Cichorium intybus* L. (chicory); high performance liquid chromatography; electrochemical detection; fingerprint; antioxidant activity; spectrum-effect relationship

菊苣 (*Cichorium intybus* L. Chicory) 属于菊科菊苣属草本植物, 广泛分布于世界各地, 为典型的药食两用型植物, 地上干燥部分及根部可以作为药材使用^[1]。菊苣中含有酚酸、黄酮、挥发油等多种有效成分^[2], 其中, 酚酸类化合物是菊苣中的主要活性成分, 而咖啡酸类衍生物是菊苣中酚酸类的核心成分, 包括菊苣酸、单咖啡酰酒石酸、绿原酸等^[3], 菊苣具有一定的抗氧化、抗尿酸、抗炎、保肝等药理作用^[4], 在食品领域中作为一种重要的工业作物, 用于提取膳食纤维、菊糖、工业香精^[5,6], 在日常中多作为有机蔬菜、饮料添加物等^[7,8]。

研究表明, 菊苣中的酚酸类化合物具有良好的抗氧化活性, 但针对菊苣中酚类成分与抗氧化活性相关性方面的分析较少, 大部分集中于菊苣的化学成分含量测定^[9,10]或者单独研究其抗氧化^[11]、抗炎^[12]、降血糖^[13]、抗尿酸活性^[14]等药理活性, 菊苣的化学成分与其抗氧化活性的关系尚未有明确报道。因菊苣的化学成分多且复杂, HPLC 指纹图谱技术能全面地反映样品化学成分全貌^[15], 更适应于研究不同来源的某一植物化学成分。此外, 为更好地研究菊苣的抗氧化活性成分, 本研究采用电化学检测器, 相较于其他检测器, 具有高灵敏度、高选择性等优点, 特别适合检测容易被氧化的物质, 由此可用来特异性筛查天然产物中的酚酸、黄酮、杂环类的抗氧化活性成分^[16,17]。

然而, 单独分析菊苣的化学成分或者活性, 不能对成分与活性之间的相关性有进一步明确说明。偏最小二乘回归 (Partial Least Squares Regression, PLSR) 分析主要用于研究自变量与因变量之间相关性的一项分析手段, 可以很好地表明化学成分对活性的相关作用程度^[18]; 而灰色关联度分析 (Gray Relational Analysis, GRA) 是一类对两个变量之间关联程度的统计学方法, 通过关联度来反应每个成分对活性的贡献大小^[19]; 皮尔逊分析 (Pearson Analysis) 则是基于研究两变量间相关联程度的一类多元统计分析手段, 其相关系数 P 越大, 表示其相关性越强^[20]。近年来, 多元统计分析方法普遍用于分析药用植物的化学成分与药效活性的相关性^[21-24], 采用以上三种多元统计分

析法可以多方位验证菊苣的化学成分和活性的相关性, 实现对 HPLC-ECD 指纹图谱与其抗氧化活性进行“谱-效”关系研究, 以进一步确定其主要抗氧化活性组分。从而为药物药效物质基础、药物质量控制的研究提供参考^[25,26], 可以更科学、合理地进行菊苣质量控制及评价。

综上, 本研究通过 ECD 筛查菊苣中抗氧化成分, 建立菊苣的 HPLC-ECD 指纹图谱, 进一步采用化学计量法分析研究指纹图谱与抗氧化作用的关系, 明确菊苣抗氧化的主要化学成分。为菊苣质量控制及评价提供参考, 并为完善菊苣的活性研究体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 样品来源

实验样品均选择新鲜、成熟的菊苣地上部分, 分别采集自四川省、广东省等 7 个省份共 21 批样品, 经遵义医科大学孟令杰博士鉴定为菊科菊苣属菊苣 (*Cichorium intybus* L.) 地上部分, 详细信息见表 1。

1.1.2 主要试剂

没食子酸 (纯度 $\geq 98\%$)、原儿茶酸 (纯度 $\geq 97\%$)、色氨酸 (纯度 $\geq 99\%$)、咖啡酸 (纯度 98%)、绿原酸 (纯度 98%)、异绿原酸 A (纯度 $\geq 98\%$)、异绿原酸 B (纯度 $\geq 98\%$)、均购自阿拉丁生化科技股份有限公司; 单咖啡酰酒石酸 (纯度 $\geq 98\%$)、购自成都普菲德生物技术股份有限公司; 菊苣酸 (纯度 $\geq 98\%$)、购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 1,5-二咖啡酰奎宁酸 (纯度 $\geq 98\%$)、购自成都德思特生物技术有限公司; 异绿原酸 C (纯度 $\geq 98\%$)、对香豆酸 (纯度 $\geq 98\%$)、购自阿玛达斯试剂有限公司; 甲醇、乙腈 (HPLC), [2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐] (ABTS)、2,4,6-三吡啶基三嗪 (TPTZ)、1,1-二苯基-2-三硝基苦肼 (DPPH) 均为分析纯, 购自阿拉丁生化科技股份有限公司; 实验室用水为超纯水。

1.1.3 主要仪器设备

Ultimate 3000 bio-RS 高效液相色谱仪 (配

ECD-3000RS 电化学检测器), Thermo Fisher; SB-800DTD 型超声波清洗机, 宁波新芝; Microfuge 20 centrifuge 型台式离心机, Beckman 公司; 1510 型酶标仪, Thermo Fisher。

表 1 菊苣样品信息

样品序号	产地	收集时间
S1	四川绵阳	2021.08
S2	四川绵阳	2021.08
S3	四川绵阳	2021.08
S4	广东茂名	2021.08
S5	广东茂名	2021.08
S6	湖南邵阳	2021.08
S7	福建漳州	2021.09
S8	河北保定	2021.09
S9	四川绵阳	2021.09
S10	广东茂名	2021.09
S11	河北保定	2021.09
S12	河北保定	2021.09
S13	黑龙江哈尔滨	2021.09
S14	黑龙江双鸭山	2021.09
S15	广东茂名	2021.09
S16	河北沧州	2021.09
S17	河北沧州	2021.09
S18	甘肃陇南	2021.09
S19	甘肃陇南	2021.09
S20	湖南邵阳	2021.09
S21	福建漳州	2021.09

1.2 方法

1.2.1 样品溶液的配制

将样品清洗后置于干燥箱中 50 °C 烘干, 粉碎后过 80 目筛。精密称取 1.0 g, 加入 20 mL 80% 甲醇 (V/V), 室温下超声 30 min, 离心 (9 000 r/min) 10 min 后取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液用于色谱分析。

1.2.2 对照品溶液的配制

分别精密称定没食子酸、原儿茶酸、色氨酸、单咖啡酰酒石酸、秦皮乙素、咖啡酸、绿原酸、对香豆酸、菊苣酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C 对照品, 分别采用甲醇溶解配制成 1 mg/mL 的标准品溶液, 置于 -20 °C 下保存备用。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: XBridge BEH Shield RP18 (3.0×150 mm, 2.5 μm); 流速: 0.6 mL/min; 柱温: 45 °C; 检测电压: 650 mV; 进样体积: 2 μL; 流动相: 乙腈(A)-50 mmol/L

柠檬酸缓冲盐 (pH 值 2.72, B), 梯度洗脱: 0~8 min, 2.5%~5% A; 8~16 min, 5%~10% A; 16~20 min, 10%~12% A; 20~32 min, 12%~20% A; 32~48 min, 20%~32% A; 48~50 min, 32%~70% A。

1.2.4 总酚含量 (Total Phenolics Content, TPC) 测定

总酚测定采用福林酚法^[27]。将“1.2.1 项”下样液稀释 60 倍, 向试管中加入 0.25 mol/L 福林酚溶液和稀释后的样液各 250 μL, 混匀后静置 3 min, 加入 500 μL 15% Na₂CO₃ 溶液 (m/V), 混匀后置于暗处反应 30 min, 离心 3 min 后取上清液在 760 nm 处测定吸光度值。以没食子酸标准溶液稀释成的不同浓度作为横坐标, 以没食子酸标准溶液的吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 菊苣总酚含量以没食子酸当量折算 (mg GAE/g)。

1.2.5 体外抗氧化活性测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除实验

根据文献^[28,29]稍作改进。实验组: 将“1.2.1”项滤液稀释 10 倍, 加 DPPH 工作液 (40 mg/L, 甲醇配制) 400 μL、稀释后的样液 40 μL 和 80% 甲醇 (V/V) 160 μL 混匀后置于暗处反应 30 min, 采用酶标仪在 517 nm 处测定吸光度值, 重复 3 次实验取平均值; 空白组: 取 80% 甲醇 (V/V) 代替实验组中的样液体积, 其他条件不变, 测定 A₀ 值。重复 3 次实验取平均值。按照公式 (1) 计算 DPPH 自由基清除率 C。

$$C = (1 - \frac{A_1}{A_0}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C——体外抗氧化自由基清除率, %;

A₁——实验组: 加入样液后的实验组所测吸光度值;

A₀——空白组: 加入 80% 甲醇代替样液所测定的吸光度值。

1.2.5.2 ABTS⁺自由基清除实验

根据文献^[30]稍作改进后, 将 3.75 mg/mL ABTS 水溶液与 0.67 mg/mL K₂S₂O₈ 水溶液按 1:1 比例混合均匀, 暗反应 12 h 后, 用 80% 甲醇 (V/V) 稀释至在 734 nm 处吸光度值在 0.70±0.02 范围即得 ABTS 工作液。实验组: 将“1.2.1”项下滤液稀释 25 倍后, 取 ABTS 工作液 400 μL、稀释后的样液 60 μL 和 80% 甲醇 (V/V) 140 μL 混匀后置于暗处反应 30 min, 采用酶标仪在 734 nm 处测定 A₁ 值; 空白组: 取 80% 甲醇 (V/V) 代替实验组中的样液体积, 其他条件不变, 测定 A₀ 值。重复 3 次实验取平均值。按照“1.2.5.1”项下公式 (1), 计算 ABTS⁺ 自由基清除率 C。

1.2.5.3 铁离子还原能力 (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power, FRAP)

参照文献^[31,32]稍作改进, 配制 TPTZ 工作液

(5 mg/mL FeCl₃ 水溶液: 3 mg/mL TPTZ 溶液: 40 mg/mL 醋酸钠缓冲液 (pH 值 3.6) =1:1:10)。实验组: 将“1.2.1”项下所得滤液稀释 10 倍, 取 TPTZ 工作液 400 μL、稀释后的样液 40 μL 和纯水 160 μL 混匀后置于暗处反应 30 min, 采用酶标仪在 595 nm 处测定其 A₁ 值, 重复 3 次实验取平均值。以 Trolox 标准溶液稀释成的不同浓度作为横坐标, 以 Trolox 标准溶液的吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 菊苣的铁离子还原能力以 Trolox 当量 (mg TE/L) 折算。

1.2.6 数据统计分析方法

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版本)》软件进行指纹图谱建立, 及相似度评价; 抗氧化实验数据的基本处理采用 Excel 软件进行分析; 采用 SPSS Statistics 软件对样品的共有峰面积与 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺ 自由基清除率、FRAP 值之间的相关性进行 GRA 及 Pearson 分析; 采用 SMICA 系统软件对菊苣提取物的抗氧化活性做 PLSR 分析。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 精密度

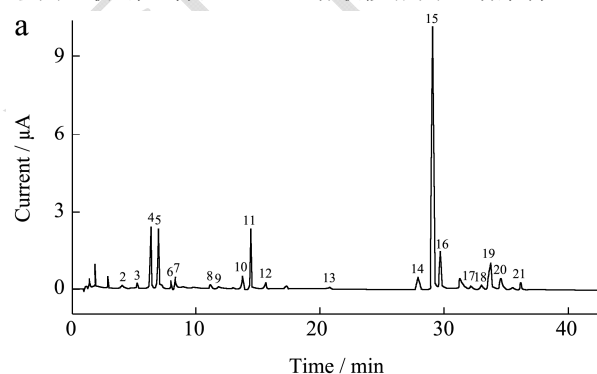
取同一份菊苣样品 (S1) 溶液按相同色谱条件, 连续进样 6 次, 以菊苣酸为参照, 其相对峰面积 RSD 值 ≤ 2.6%, 相对保留时间的 RSD 值 ≤ 0.21%, 精密度良好。

2.1.2 重复性

平行制备 6 份菊苣样品 (S1) 溶液按相同色谱条件进样, 以菊苣酸为参照, 其相对峰面积 RSD 值 ≤ 3.5%, 相对保留时间的 RSD ≤ 0.22%, 重复性良好。

2.1.3 稳定性

取同一份菊苣样品 (S1) 溶液按相同色谱条件,



每隔 4 h 进样一次, 进样 6 次, 以菊苣酸为参照, 其相对峰面积 RSD 值 ≤ 3.8%, 相对保留时间的 RSD 值 ≤ 0.26%, 24 h 内稳定性良好。

2.2 指纹图谱相似度评价

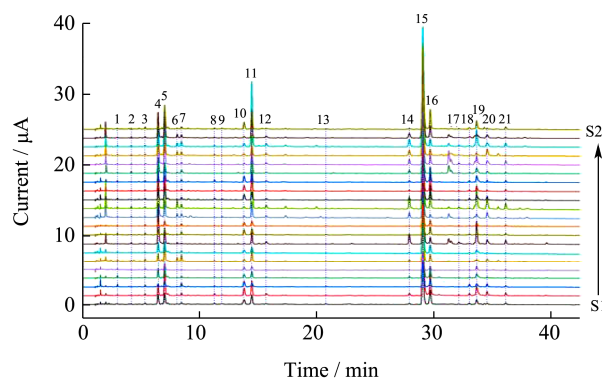


图 1 菊苣的 HPLC-ECD 指纹图谱叠加图

Fig.1 HPLC-ECD fingerprint of chicory

表 2 菊苣指纹图谱相似度评价

Table 2 Similarity evaluation results of 23 batches of the chicory samples

样品序号	对照相似度	样品序号	对照相似度
S1	0.97	S12	0.99
S2	0.98	S13	0.98
S3	0.95	S14	0.98
S4	0.98	S15	0.98
S5	0.96	S16	0.98
S6	0.99	S17	0.99
S7	0.98	S18	0.98
S8	0.97	S19	0.98
S9	0.97	S20	0.86
S10	0.97	S21	0.98
S11	0.96		

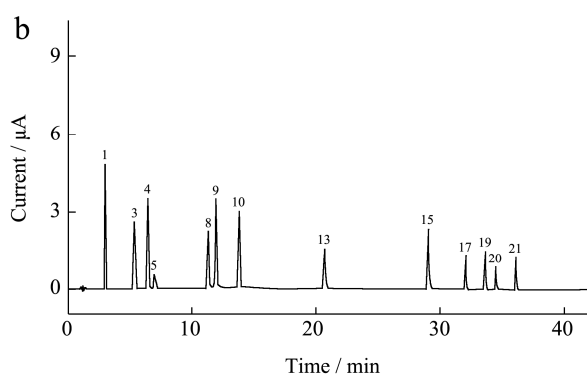


图 2 a 菊苣对照指纹图谱; b 混合标准品色谱图

Fig.2 a: The reference chromatogram of chicory; b: Chromatogram of the standard solution

注: 1 为没食子酸; 3 为原儿茶酸; 4 为色氨酸; 5 为单咖啡酰酒石酸; 8 为秦皮乙素; 9 为咖啡酸; 10 为绿原酸; 13 为对香豆酸; 15 为菊苣酸; 17 为异绿原酸 B; 19 为异绿原酸 A; 20 为 1,5-二咖啡酰奎宁酸; 21 为异绿原酸 C。

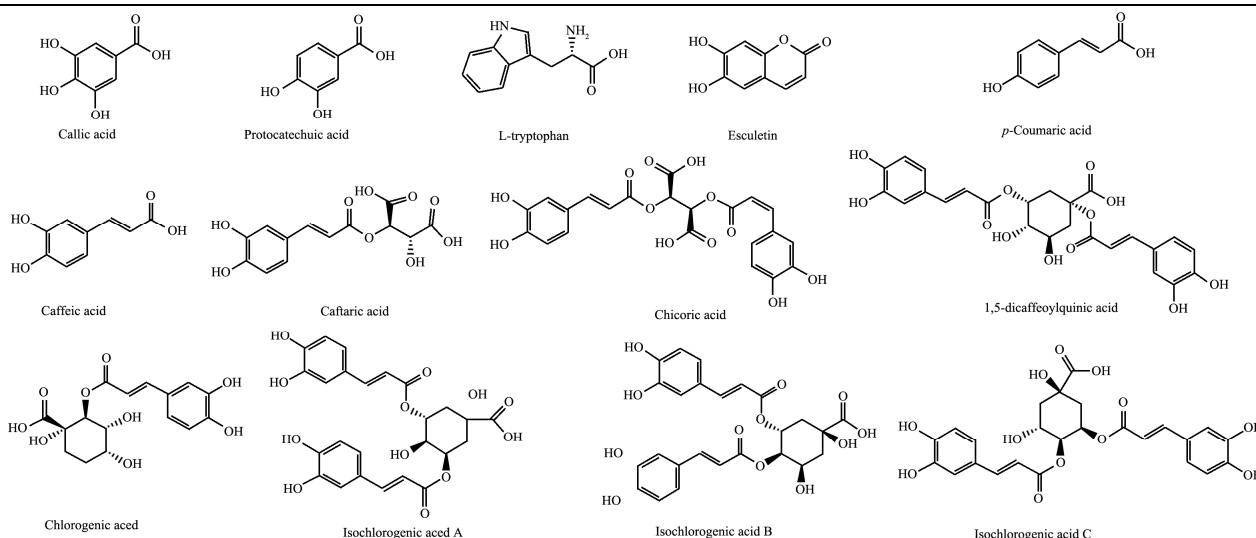


图 3 13 个成分的化学结构图

Fig.3 Chemical structure of the 13 compounds

表 3 总峰面积及抗氧化活性

Table 3 Total common peak areas and antioxidant activity

样品序号	总峰面积/(nA·min)	总酚(TPC)/(mg GAE/g)	DPPH·清除率/%	ABTS ⁺ ·清除率/%	FRAP 值/(mg TE/L)
S1	2 510.63	7.46±0.17	24.51±0.43	41.44±0.35	86.84±0.43
S2	4 869.19	9.99±0.29	42.00±0.69	62.37±0.45	166.89±0.23
S3	1 316.09	4.74±0.10	19.07±0.33	35.27±0.30	68.23±0.54
S4	2 636.00	4.79±0.48	18.85±1.34	38.28±0.86	96.48±0.53
S5	1 045.04	3.90±1.26	12.07±0.64	25.95±1.01	48.70±0.29
S6	2 429.08	6.66±0.30	21.15±0.67	89.54±2.19	81.47±0.21
S7	2 355.62	6.50±0.31	20.93±0.24	29.67±0.19	94.74±0.56
S8	4 737.51	11.43±0.41	41.39±1.11	53.86±0.91	160.29±0.33
S9	1 602.26	4.28±0.08	14.49±0.18	25.29±0.82	51.91±0.25
S10	1 195.85	4.86±1.29	19.02±0.38	25.41±0.76	40.60±0.37
S11	4 506.02	13.25±0.23	51.65±0.44	56.26±0.48	125.75±0.60
S12	8 247.70	30.76±0.11	82.62±0.22	87.10±1.09	275.48±0.80
S13	3 265.64	10.38±0.48	38.91±0.96	43.84±0.88	112.88±0.51
S14	2 670.55	6.45±0.24	36.78±0.40	41.29±1.04	87.28±0.63
S15	3 412.62	9.22±0.51	40.87±1.02	48.20±0.52	117.01±0.48
S16	2 646.15	7.60±0.46	19.83±0.37	33.87±1.21	69.90±0.85
S17	4 276.48	13.56±0.24	40.09±0.51	52.34±0.39	132.52±1.01
S18	4 120.81	12.14±0.32	40.40±0.11	48.58±0.70	117.39±0.32
S19	6 689.28	17.34±0.20	56.93±0.42	76.52±0.26	193.59±0.22
S20	2 621.42	12.29±0.42	26.38±0.38	51.22±0.72	106.14±0.67
S21	3 871.99	11.88±0.23	43.36±0.41	57.79±0.85	129.24±0.59

将 21 批菊苣样品的特征色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版本)》中, 以样品 S1 为参照图谱, 经过多点校正生成得菊苣的 HPLC-ECD 指纹图谱见图 1。选择平均数值法生成 21 批菊苣的共有模式对照图谱 R 见图 2a, 共确定 21 个共有峰 P1-P21。对比指纹图谱各色谱峰的相对保留时间, 确

认了 13 个酚类化合物, 指认的 13 个酚类化合物混合标准品色谱图见图 2b, 化合物结构图见图 3。21 批样品同对照指纹图谱的相似度结果见表 2, 由此可知 21 批菊苣与对照图谱的相似度均大于 0.86, 表明不同来源菊苣的化学成分具有较好的一致性。在菊苣 HPLC-ECD 的共有峰中, 所指认出的化学成分中有 8

种为咖啡酸类衍生物,包括咖啡酸的酒石酸衍生物(菊苣酸和单咖啡酰酒石酸)、奎尼酸衍生物(绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、1,5-二咖啡酰奎尼酸)。咖啡酸及其衍生物不仅在数量上占据优势,而且其峰面积也相对较大,鉴于 ECD 可以直接筛查菊苣中的抗氧化活性成分的优势,推测咖啡酸类衍生物可能是菊苣抗氧化的主要化学成分。

2.3 总酚含量及体外抗氧化活性测定

因不同产地间菊苣的抗氧化活性有一定程度上差异,即采取平均值±标准偏差代表其含量,具体结果

见表 3。结果中总酚含量在 3.90~30.76 mg GAE/g 之间, DPPH 自由基清除率为 12.07%~82.62%, ABTS⁺ 自由基清除率为 25.29%~87.10%, FRAP 值为 40.60~275.48 mg TE/L, 由此可推断出该 21 批菊苣的化学成分含量差异较大。为了更进一步验证 ECD 检测器的结果可信度,将 21 批菊苣样品的总共有峰面积与总酚含量、DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、FRAP 值分别进行线性拟合分析,相关系数(R)分别为 0.92、0.95、0.94、0.98,结果表明 21 个共有峰面积与抗氧化活性均有极显著的相关性。各参数之间的线性相关系数见表 4。

表 4 总共有峰峰面积与抗氧化活性、总酚含量线性相关系数

Table 4 Correlation coefficients between total common peak areas (A), antioxidant capacity and TPC

项目	总共有峰面积	总酚含量	DPPH·清除率	ABTS ⁺ ·清除率	FRAP 值
总共有峰面积	1.00	0.92	0.95	0.94	0.98
总酚含量	-	1.00	0.93	0.89	0.92
DPPH·清除率	-	-	1.00	0.91	0.93
ABTS ⁺ ·清除率	-	-	-	1.00	0.94
FRAP 值	-	-	-	-	1.00

2.4 谱-效关系分析

2.4.1 PLSR 分析

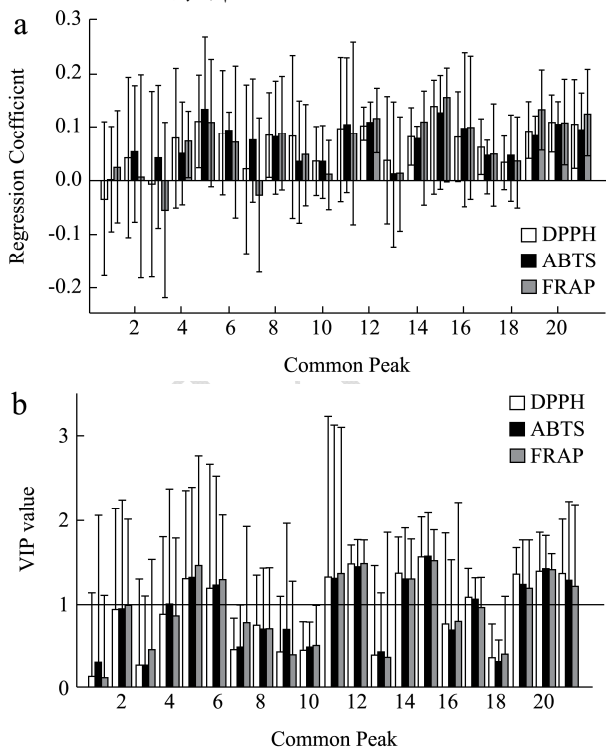


图 4 PLSR 分析结果: 标准回归系数 (a) 与 VIP 贡献 (b)

Fig.4 Standardization regression coefficients (a) and VIP contribution (b) of PLSR analysis

运用 SMICA 的偏最小二乘回归分析方法,以 21 个共有峰峰面积为自变量, DPPH 自由基清除率、

ABTS⁺自由基清除率、FRAP 值作为因变量,进行 PLSR 分析研究指纹图谱与抗氧化活性之间相关性。PLSR 分析的回归系数结果见图 4a,可知色氨酸(峰 4)、单咖啡酰酒石酸(峰 5)、秦皮乙素(峰 8)、咖啡酸(峰 9)、绿原酸(峰 10)、对香豆酸(峰 13)、菊苣酸(峰 15)、异绿原酸 B(峰 17)、异绿原酸 A(峰 19)、1,5-二咖啡酰奎宁酸(峰 20)、异绿原酸 C(峰 21)及未知峰 2、6、11、12、14、16、18,共 18 个共有峰对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、铁离子还原能力均起促进作用。由变量投影重要性 (Variable Importance In Projection, VIP) 结果(见图 4b)可知,单咖啡酰酒石酸(峰 5)、菊苣酸(峰 15)、异绿原酸 A(峰 19)、1,5-二咖啡酰奎宁酸(峰 20)、异绿原酸 C(峰 21)及未知峰 6、11、12、14,共 9 个共有峰 VIP 值大于 1,表明其与抗氧化活性呈现高度正相关,对清除 DPPH、ABTS⁺自由基,铁离子还原能力的解释有着显著重要性,异绿原酸 B(峰 17)对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基有显著相关性。

2.4.2 灰色关联度分析

灰色关联度分析 (Gray Relational Analysis, GRA) 是根据因素之间发展趋势的相似或相异程度,作为衡量因素间关联程度的一种方法,关联度等级越高,表明峰值活性关系越密切,关联度值超过 0.6 被认为有助于抗氧化活性^[33]。将菊苣提取物的抗氧化活性作为因变量,与其共有峰面积进行灰色关联分析,成分与活性进行回归分析筛选,将筛选出的成分进行关联度

排名,可综合分析出样品中的主要成分。21个成分与体外抗氧化活性的灰色关联度排名见表5,结果表明峰15(菊苣酸)对抗氧化能力贡献最大,已知成分的关联排名依次为菊苣酸>单咖啡酰酒石酸>异绿原酸C>异绿原酸A>1,5-二咖啡酰奎宁酸>秦皮乙素>

异绿原酸B>原儿茶酸>没食子酸>对香豆酸>色氨酸>咖啡酸>绿原酸,其关联度值均大于0.6,上述结果则表示菊苣的抗氧化活性强弱是各化学成分间的共同作用。

表5 菊苣灰度关联分析排名

Table 5 Gray relational analysis ranking of chicory

共有峰	DPPH·清除率	ABTS ⁺ ·清除率	FRAP 值	平均关联度	排名
P15 (菊苣酸)	0.86	0.90	0.92	0.89	1
P5 (单咖啡酰酒石酸)	0.90	0.87	0.88	0.88	2
P21 (异绿原酸 C)	0.84	0.84	0.83	0.84	3
P19 (异绿原酸 A)	0.82	0.83	0.83	0.83	4
P20 (1,5-二咖啡酰奎宁酸)	0.82	0.83	0.82	0.82	5
P12	0.80	0.83	0.83	0.82	6
P2	0.81	0.82	0.80	0.81	7
P7	0.81	0.79	0.79	0.79	8
P8 (秦皮乙素)	0.79	0.80	0.77	0.79	9
P11	0.78	0.79	0.79	0.79	10
P18	0.79	0.78	0.77	0.78	11
P16	0.78	0.78	0.78	0.78	12
P17 (异绿原酸 B)	0.75	0.79	0.76	0.77	13
P3 (原儿茶酸)	0.79	0.75	0.74	0.76	14
P1 (没食子酸)	0.77	0.75	0.74	0.76	15
P13 (对香豆酸)	0.75	0.77	0.74	0.75	16
P4 (色氨酸)	0.73	0.76	0.73	0.74	17
P14	0.71	0.76	0.72	0.73	18
P6	0.72	0.74	0.72	0.73	19
P9 (咖啡酸)	0.72	0.74	0.71	0.72	20
P10 (绿原酸)	0.70	0.72	0.70	0.71	21

2.4.3 Pearson 相关性分析

运用 SPSS Statistics 软件,以 21 批菊苣样品指纹图谱的共有峰面积与总酚含量、DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、FRAP 值做变量进行相关分析。分析结果可知共有单咖啡酰酒石酸(峰 5)、菊苣酸(峰 15)、异绿原酸 B(峰 17)、异绿原酸 A(峰 19)、1,5-二咖啡酰奎宁酸(峰 20)、异绿原酸 C(峰 21)和 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、FRAP 值皆极显著正相关($P<0.01$),结果见表 6。

2.4.4 与其他抗氧化活性筛查方法比较

菊苣在食品生产中的应用越来越广泛,文献报道菊苣具有优良的抗氧化能力,但有关抗氧化活性与成分的研究报道相对较少。研究表明,酚类化合物具有较低的氧化还原电位,可减少过氧化物,阻断自由基,可以作为很好的抗氧化剂。而菊苣中的酚类化合物具有较强的抗氧化能力,传统方法通过分离纯化后的单

体化合物单独研究其生物活性,例如研究较多的菊苣酸、单咖啡酰酒石酸已被证明具有良好的抗氧化活性^[9,34]。然而,药用植物的生物活性是多种化学成分共同作用的结果。目前,菊苣中其他化学成分的抗氧化作用研究较少,不同化学成分对于抗氧化活性的贡献程度仍不明确;另外,普遍的分离纯化单体化合物过程繁琐、致使工作量加重,且部分化合物稳定性较差。为了解决此问题,我们将色谱分离和抗氧化活性评价相结合。常用的体外总抗氧化活性评价方法如分光光度法,包括 DPPH 自由基清除法、ABTS⁺自由基清除法和铁离子还原能力法,均需和色谱分离单独进行测定,DPPH 自由基、ABTS⁺自由基清除能力和铁离子还原能力测定等常规抗氧化活性评价方法只能测定菊苣的总抗氧化能力,不能反应出各成分的抗氧化能力。如陈永平等^[35]、Khalaf 等^[36]对菊苣进行抗氧化能力测定,结果验证了菊苣具有较好的抗氧化能力,

但不能得知具体的活性成分。相比之下,电化学检测法能更直接、简便地反映其抗氧化活性^[17],可以直接筛查菊苣中的抗氧化活性成分,且可以直接和色谱分离相结合。本研究采用电化学检测器筛选菊苣中的抗氧化活性成分,色谱图的峰面积可对抗氧化能力有独特的反映,在建立菊苣的 HPLC-ECD 指纹图谱后,可对菊苣进行体外抗氧化活性研究,通过分光光度法进行体外抗氧化活性测定后,将菊苣的共有峰面积与抗氧化做相关性分析,发现其中存在极显著的相关性,进一步证实, HPLC-ECD 的结果也可以用来评价抗氧化活性且更有优势。相对于传统的分离单个化合物的

方法,采用 HPLC-ECD 指纹图谱结合 Pearson 分析、GRA、PLSR 分析,不但更容易发现菊苣抗氧化活性成分,并且可以明确不同化合物对于抗氧化活性的贡献。在之前的文献中,对于菊苣中化合物的研究多集中在其酒石酸衍生物,如菊苣酸和单咖啡酰酒石酸^[37-40],而本研究结果表明其奎尼酸类衍生物同样在抗氧化中发挥重要的作用。另外,本研究中对抗氧化有重要贡献的化学成分峰 2、峰 6、峰 11、峰 12、峰 14 未能识别,后期可利用其他分析与鉴别技术对其未知峰进行鉴定,继续完善对于菊苣的抗氧化物质基础研究。

表 6 皮尔逊相关性

Table 6 Pearson correlation coefficient

共有峰序号	总酚含量	DPPH·清除率	ABTS ⁺ ·清除率	FRAP 值
P1 (没食子酸)	-0.12	-0.05	-0.16	-0.05
P2	0.68**	0.55*	0.53*	0.57**
P3 (原儿茶酸)	0.19	0.101	0.11	0.27
P4 (色氨酸)	0.59**	0.53*	0.58**	0.51*
P5 (单咖啡酰酒石酸)	0.76**	0.80**	0.78**	0.86**
P6	0.85**	0.71**	0.724**	0.76**
P7	0.32	0.24	0.27	0.45*
P8 (秦皮乙素)	0.24	0.40	0.37	0.37
P9 (咖啡酸)	-0.12	0.00	0.13	-0.04
P10 (绿原酸)	-0.28	-0.12	-0.08	-0.10
P11	0.85**	0.80**	0.77**	0.81**
P12	0.88**	0.90**	0.85**	0.88**
P13 (对香豆酸)	-0.15	-0.07	-0.04	-0.12
P14	0.87**	0.83**	0.76**	0.77**
P15 (菊苣酸)	0.84**	0.95**	0.92**	0.89**
P16	0.25	0.39	0.35	0.38
P17 (异绿原酸 B)	0.68**	0.65**	0.61**	0.52*
P18	-0.07	0.02	0.01	0.03
P19 (异绿原酸 A)	0.72**	0.82**	0.72**	0.70**
P20 (1,5-二咖啡酰奎宁酸)	0.90**	0.85**	0.84**	0.84**
P21 (异绿原酸 C)	0.75**	0.83**	0.75**	0.72**

注:表中数值后的*表示显著性水平。*在 0.05 级别(双尾),相关性显著。**在 0.01 级别(双尾),相关性显著。

3 结论

本研究以菊苣为研究对象,建立了 21 批不同产地菊苣的 HPLC-ECD 指纹图谱,指出没食子酸、原儿茶酸、色氨酸、单咖啡酰酒石酸、秦皮乙素、咖啡酸、绿原酸、对香豆酸、菊苣酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C 共 13 个酚类化合物。菊苣的总峰面积与抗氧化活性之间具有显著的相关性,“谱-效”研究筛选出了对菊苣的抗氧化活性贡

献较大的成分为菊苣酸、单咖啡酰酒石酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C、秦皮乙素,该研究进一步确定了菊苣抗氧化活性的主要成分,可为菊苣质量评估及开发利用提供一定的参考。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Abbas Z K, Saggi S, Sakeran M I, et al. Phytochemical,

- antioxidant and mineral composition of hydroalcoholic extract of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves [J]. Saudi Journal of Biological Science, 2015, 22(3): 322-326.
- [3] Sinkovic L, Demsar L, Znidarcic D, et al. Phenolic profiles in leaves of chicory cultivars (*Cichorium intybus* L.) as influenced by organic and mineral fertilizers [J]. Food Chemistry, 2015, 166: 507-513.
- [4] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 323.
- [5] 柳溪, 王晓蕾. 新鲜菊苣提取和纯化菊粉的工艺[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(13): 37-40.
- [6] Hakkinen S T, Sokovic M, Nohynek L, et al. Chicory extracts and sesquiterpene lactones show potent activity against bacterial and fungal pathogens [J]. Pharmaceuticals, 2021, 14(9): 941.
- [7] 池惠武, 郭璞, 王运琦, 等. 菊苣的价值及研究现状分析[J]. 南方农业, 2018, 12(5): 9-10.
- [8] 张泽生, 卢亚莉, 高云峰, 等. 菊苣中苦味物质的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2015, 5: 174-178.
- [9] Briudes V, Angelis A, Vougianniopoulou K, et al. Phytochemical analysis and antioxidant potential of the phytonutrient-rich decoction of *Cichorium spinosum* and *C-intybus* [J]. Planta Medica, 2016, 82(11-12): 1070-1078.
- [10] 朱春胜, 林志健, 张冰, 等. 菊苣化学成分的 LC-MS/MS 定性分析与 HPLC 含量测定[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(3): 247-251.
- [11] Sinkovič L, Jamnik P, Korošec M, et al. *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant assays of chicory plants (*Cichorium intybus* L.) as influenced by organic and conventional fertilisers [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 36.
- [12] Moloudi M R, Hassanzadeh K, Abdi M, et al. Hepatoprotective effect of the hydroalcoholic extract of *Cichorium intybus* in a rat model of obstructive cholestasis [J]. Arab Journal of Gastroenterology, 2021, 22(1): 34-39.
- [13] Ferrare K, Bidel L P R, Awwad A, et al. Increase in insulin sensitivity by the association of chicoric acid and chlorogenic acid contained in a natural chicoric acid extract (NCRAE) of chicory (*Cichorium intybus* L.) for an antidiabetic effect [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 215: 241-248.
- [14] 吴美音, 陈淑宁, 高洁, 等. 菊苣、葛根、桑叶配方对高尿酸合并关节炎小鼠的降尿酸和痛风性关节炎的干预效果[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 308-313.
- [15] 陈万超, 张俊峰, 吴迪, 等. 鲍姆桑黄孔菌子实体 HPLC 指纹图谱及抗氧化活性谱效关系[J]. 菌物学报, 2021, 40(9): 2364-2375.
- [16] 张萍, 胡克特, 陈荣祥, 等. 超高效液相色谱-电化学检测法测定不同产地盐肤木中的酚类化合物[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2021, 41(1): 167-173.
- [17] Wang M Y, Zhang P, Zhang Y Z, et al. Chemical fingerprinting, quantification, and antioxidant activity evaluation of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour. flowers by UPLC-ECD [J]. International Journal of Food Properties, 2022, 25(1): 648-660.
- [18] Ibrahim R S, Khairy A, Zaatout H H, et al. Chemometric evaluation of alfalfa sprouting impact on its metabolic profile using HPTLC fingerprint-efficacy relationship analysis modelled with partial least squares regression [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 179: 112990.
- [19] Hong J Y, Mu T H, Sun H N, et al. Valorization of the green waste parts from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.): Nutritional, phytochemical composition, and bioactivity evaluation [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(8): 4086-4097.
- [20] Ali L, Khan S, Nazir M, et al. Chemical profiling, *in vitro* biological activities and Pearson correlation between phenolic contents and antioxidant activities of *Caragana brachyantha* Rech. F [J]. South African Journal of Botany, 2021, 140: 189-193.
- [21] 罗敏, 何婷, 龚磊, 等. 夏枯草中 16 种酚类化合物含量的测定及其与抗氧化活性的相关性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 299-306.
- [22] 路辉丽, 王亚平, 尹成华, 等. 小麦品质指标与面团流变学特性的多元回归分析[J]. 粮油食品科技, 2013, 21(1): 62-66.
- [23] Liu Z Y, Fang Y, Wu C, et al. The difference of volatile compounds in female and male buds of *Herpetospermum pedunculatum* based on HS-SPME-GC-MS and multivariate statistical analysis [J]. Molecules, 2022, 27(4): 1288.
- [24] Jiang Y L, Xu Z J, Cao Y F, et al. HPLC fingerprinting-based multivariate analysis of chemical components in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg: Correlation to their antioxidant and neuraminidase inhibition activities [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 205: 114314.
- [25] 林清霞, 王丽丽, 杨军国, 等. 基于 DPPH 法的茶叶儿茶素类抗氧化谱效关系研究[J]. 福建农业学报, 2020, 35(2): 210-216.
- [26] Zeb A. Chemo-metric analysis of the polyphenolic profile of *Cichorium intybus* L. Leaves grown on different water resources of Pakistan [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(1): 728-734.
- [27] Zhang P, Chun Z, Shao Q J, et al. Evaluation of the phytochemicals and antioxidant activity of *Lophatherum*

- gracile* Brongn based on chemical fingerprinting by HPLC with electrochemical detection [J]. Journal of Separation Science, 2021, 44(20): 3777-3788.
- [28] Riethmuller E, Konczol A, Szakal D, et al. HPLC-DPPH screening method for evaluation of antioxidant compounds in corylus species [J]. Natural Product Communications, 2016, 11(5): 641-644.
- [29] 周萌, 马玉荣, 黄惠华. 不同品种大豆中的生物活性成分及其抗氧化活性的比较分析[J]. 现代食品科技, 2015, 31(4): 137-143.
- [30] Rao S, Callcott E T, Santhakumar A B, et al. Profiling polyphenol composition and antioxidant activity in Australian-grown rice using UHPLC online-ABTS system [J]. Journal of Cereal Science, 2018, 80: 174-179.
- [31] De la Torre A, Henderson T, Nigam P S, et al. A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey [J]. Food Chemistry, 2015, 174: 119-123.
- [32] 陈涛林, 陈美丽, 葛智文, 等. 茶组植物新资源-元宝山茶的主要化学成分及其抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 87-96.
- [33] Wang S N, Hua Y J, Lin Y, et al. Dynamic changes of metabolite accumulation in *Scrophulariae Radix* based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with multivariate statistical analysis [J]. Journal of Separation Science, 2017, 40(14): 2883-2894.
- [34] Ma J, Li M R, Kalavagunta P K, et al. Protective effects of cichoric acid on H₂O₂-induced oxidative injury in hepatocytes and larval zebrafish models [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 104: 679-685.
- [35] 陈永平, 张艺麟, 吴雨龙, 等. 复合酶辅助超声波提取菊苣根总黄酮的工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 164-171.
- [36] Khalaf H A, El-Saadani R M, El-Desouky A I, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of gamma-irradiated chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves and roots [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12(3): 1843-1851.
- [37] Chadni M, Isidore E, Diemer E, et al. Optimization of extraction conditions to improve chlorogenic acid content and antioxidant activity of extracts from forced witloof chicory roots [J]. Foods, 2022, 11(9): 1217.
- [38] Yang M, Wu C, Zhang T X, et al. Chicoric acid: Natural occurrence, chemical synthesis, biosynthesis, and their bioactive effects [J]. Frontiers in Chemistry, 2022, 10: 888673.
- [39] Perovic J, Saponjac V T, Kojic J, et al. Chicory (*Cichorium intybus* L.) as a food ingredient-nutritional composition, bioactivity, safety, and health claims: A review [J]. Food Chemistry, 2021, 336: 127676.
- [40] Dalar A, Konczak I. *Cichorium intybus* from eastern anatolia: Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities [J]. Industrial Crops and Products, 2014, 60: 79-85.