

大蓟和小蓟药材UPLC特征图谱和多指标成分含量对比研究



冯涌微, 周 林, 刘晓霞, 段志文, 陈媛媛, 位翠杰, 何民友, 李振雨, 张 军, 陈向东, 孙冬梅

广东一方制药有限公司/广东省中药配方颗粒企业重点实验室 (广东佛山 528244)

【摘要】目的 建立大蓟和小蓟的超高效液相色谱 (UPLC) 特征图谱, 并结合多成分含量测定, 为区分大蓟和小蓟药材提供参考。**方法** 采用 Waters CORTEC setosum T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.30 mL/min, 检测波长为 330 nm, 柱温为 25℃, 进样量为 2 μL。分别建立 12 批大蓟和 9 批小蓟药材的特征图谱, 通过对照品比对和光谱分析鉴定共有峰, 并运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行相似度评价; 进一步通过层次聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 比较大蓟与小蓟的差异, 筛选差异性成分; 同时对比分析大蓟中 7 种有效成分与小蓟中 5 种有效成分的含量。**结果** 大蓟和小蓟特征图谱均标定 11 个共有峰, 其中大蓟指认 9 个、小蓟指认 7 个, 分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素。HCA 与 PCA 分析均将大蓟和小蓟大致分为两类, OPLS-DA 分析筛选出峰 7、蒙花苷和地奥司明 3 个差异性标志物。含量测定结果显示, 大蓟中地奥司明含量显著高于小蓟, 而蒙花苷含量显著低于小蓟, 且柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素仅在大蓟中检出, 小蓟中未检出。**结论** 所建立的方法可有效鉴别大蓟与小蓟的药材质量差异, 为其质量控制提供依据。

【关键词】 大蓟; 小蓟; 超高效液相色谱特征图谱; 多成分含量测定

【中图分类号】 R284.1

【文献标识码】 A

Comparative study on UPLC characteristic chromatograms and multi-component content of Cirsium japonicum and Cirsium setosum medicinal materials

FENG Yongwei, ZHOU Lin, LIU Xiaoxia, DUAN Zhiwen, CHEN Yuanyuan, WEI Cuijie, HE Minyou, LI Zhenyu, ZHANG Jun, CHEN Xiangdong, SUN Dongmei

Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, Guangdong Province, China

Corresponding author: ZHOU Lin, Email: zhoulin415@163.com

【Abstract】Objective To establish ultra-performance liquid chromatography (UPLC) characteristic chromatograms of Cirsium japonicum and Cirsium setosum, combine with multi-component content determination, and provide a reference for better differentiation between Cirsium japonicum and Cirsium setosum medicinal materials. **Methods** Using Waters CORTEC setosum T3 chromatographic column (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm), gradient elution was performed with acetonitrile 0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase, the flow rate was 0.30 mL/min, the detection

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202504058

基金项目: 2022 年佛山市南海区重点领域科技攻关专项 (南科 [2023] 20 号-18); 国家工信部 2022 年产业技术基础公共服务平台项目-中药全产业链质量技术服务平台 (2022-230-221)

通信作者: 周林, 副主任中药师, Email: zhoulin415@163.com

wavelength was 330 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 2 µL. The characteristic spectra of 12 batches of *Cirsium japonicum* and 9 batches of *Cirsium setosum* medicinal materials were established, common peaks were identified through comparison with reference standards and spectral analysis, and similarity evaluation was performed using a traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation system. The differences were compared between *Cirsium japonicum* and *Cirsium setosum* through hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), and the differential components were screened. The content of 7 active ingredients in *Cirsium japonicum* and 5 active ingredients in *Cirsium setosum* was comparatively analyzed. **Results** The characteristic chromatograms of both *Cirsium japonicum* and *Cirsium setosum* were calibrated with 11 common peaks, of which *Cirsium japonicum* identified 9 peaks and *Cirsium setosum* identified 7 peaks, namely neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, diosmin, apigenin-7-*O*-glucuronide, linarin, pectolinarin, and pectolinarigenin. HCA and PCA analyses roughly divided *Cirsium japonicum* and *Cirsium setosum* into two categories, while OPLS-DA analysis screened for three differential biomarkers: peak 7, linarin, and diosmin. The content determination results showed that the content of diosmin in *Cirsium japonicum* was significantly higher than that in *Cirsium setosum*, while the content of linarin was significantly lower than in *Cirsium setosum*. In addition, pectolinarin and pectolinarigenin were only detected in *Cirsium japonicum*, but not in *Cirsium setosum*. **Conclusion** The established method can effectively distinguish the quality differences between the medicinal materials of *Cirsium japonicum* and *Cirsium setosum*, providing a basis for their quality control.

【Keywords】 *Cirsium japonicum*; *Cirsium setosum*; Ultra-performance liquid chromatography characteristic chromatograms; Multi-component quantitative analysis

大蓟、小蓟始载于南朝梁时陶弘景《名医别录》，书中对两者的记载曰：“大蓟是虎蓟，小蓟是猫蓟，叶并多刺，相似，田野甚多”^[1]。大蓟为菊科植物蓟（*Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.）的干燥地上部分，主治凉血止血、散瘀解毒消痈，用于衄血、吐血、尿血、便血、崩漏、外伤出血、痈肿疮毒^[2]。小蓟为菊科植物刺儿菜 [*Cirsium setosum* (Wild.) MB.] 的干燥地上部分，主治凉血止血、散瘀解毒消痈，用于衄血、吐血、尿血、血淋、便血、崩漏、外伤出血、痈肿疮毒^[2]。大蓟的主要化学成分为黄酮类、甾醇类、木质素类、长链炔烯醇类、苷类和挥发油类化合物^[3]。小蓟的主要化学成分为黄酮类、萜类、甾体类以及含氮类物质^[4]。现代药理研究表明，大蓟具有凝血止血、抗肿瘤、抑菌、降血压、抗糖尿病等作用^[3]；小蓟具有促凝血、抗炎、抑菌、降压等作用^[4]。

大蓟和小蓟在历代本草中常见对比，二者性状相似，宋代寇宗奭《本草衍义》记载：“大小蓟皆相似，花如髻。但大蓟高三四尺，叶皱；小蓟高一尺许，叶不皱，以此为异”。《中国药典（2020年版）》指出二者主治功效相近，但

历代本草记载与现代研究均表明其临床用药有所区别：唐代苏敬《新修本草》明确称“大小蓟皆能破血，但大蓟兼疗痈肿，而小蓟专主血，不能消肿”；唐代苏恭《本草求真》亦区别道“小蓟力微，不如大蓟力迅，只可退热凉血，若大蓟则于退热之中，犹于气不甚伤也”。

不仅是历代本草文献对二者有所区分，现代研究也进一步明确了大蓟与小蓟在临床应用中的区别：在出血治疗方面，大蓟主要用于消化道出血及肺结核咳血等内出血证，而小蓟则更长于治疗产后子宫收缩不全及血崩；在炎症应用上，大蓟多用于乳腺炎，小蓟则主要用于外伤感染^[5]。此外，大蓟还可用于治疗结核病^[6]及荨麻疹^[7]，小蓟则常与侧柏叶、仙鹤草等配伍治疗肾性血尿^[8]。由此可见，对大蓟和小蓟进行准确区分，对临床合理用药具有重要意义。

目前关于小蓟和大蓟区别研究的文献相对较少，且多集中于显微鉴别与性状鉴别方面：梁鹏等^[9]在显微特征上对二者进行了详细区分，宋晓光等^[10]则从性状鉴别角度明确说明了大蓟与小蓟的差异。此外，张景景等^[11]利用内转录间隔区 2（internal transcribed spacer 2, ITS2）序列实现了

对大蓟和小蓟的有效分子鉴定。在指纹图谱和含量测定方面的区分研究较为有限,张诗华等^[12]采用中红外光谱结合化学计量学方法对二者进行鉴别;倪晓霓等^[13]则通过 HPLC 法建立了两者黄酮类化合物的指纹图谱。易炳学等^[14]研究了大蓟和小蓟的指纹图谱及含量测定,并分别指认了 6 个特征峰;相比之下,本研究在大蓟中指认了 9 个特征峰,在小蓟中指认了 7 个特征峰。

本研究选取大蓟及其近似种小蓟作为对比对象,通过建立二者的超高效液相色谱 (ultra-performance liquid chromatography, UPLC) 特征图谱,结合化学计量学方法系统分析药材间的化学成分差异,并对 7 种有效成分进行含量比较,以期为提升大蓟和小蓟的质量标准提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Waters 超高效液相色谱仪 (H-Class 系统,美国沃特世); Thermo 超高效液相色谱仪 (Vanquish 系统,美国赛默飞); ME204E 万分之一电子分析天平和 XP26 百万分之一电子分析天平均购自瑞士梅特勒-托利多公司; KQ500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); HWS28 恒温水浴锅 (上海一恒科技有限公司); Milli-Q Direct 超纯水系统 (默克股份有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

对照品:绿原酸 (批号:110753-202119,纯度 96.3%)、咖啡酸 (批号:110885-201703,纯度 99.7%)、蒙花苷 (批号:111528-202112,纯度 98.0%)、柳穿鱼叶苷 (批号:111728-201703,纯度 99.6%) 和地奥司明 (批号:101348-201802,纯度 97.3%) 均购自中国食品药品检定研究院;芹菜素-7-葡萄糖醛酸苷 (批号:21062901,纯度 98.29%) 和隐绿原酸 (批号:21061801,纯度 $\geq 98\%$) 购自成都格力普生物技术有限公司;新绿原酸 (批号:DSTD001501,纯度 $\geq 98\%$) 和柳川鱼黄素 (批号:DST200629-011,纯度 98.85%) 购自成都德思特生物技术有限公司;磷酸、甲醇和乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

本研究共收集 12 批大蓟药材和 9 批小蓟药材,所有样品均经广东一方制药有限公司孙冬梅

主任中药师鉴定,确认为菊科植物蓟 (*Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.) 的干燥地上部分及菊科植物刺儿菜 [*Cirsium setosum* (Willd.) MB.] 的干燥地上部分,详细样品信息见表 1。

表1 大蓟和小蓟药材详细信息

Table1. Sample detailed information table of *Cirsium japonicum* and *Cirsium setosum*

序号	品种	编号	产地
S1	大蓟	DJ01	安徽省滁州市
S2	大蓟	DJ02	安徽省滁州市
S3	大蓟	DJ03	安徽省滁州市
S4	大蓟	DJ04	江苏省徐州市
S5	大蓟	DJ05	江苏省徐州市
S6	大蓟	DJ06	江苏省徐州市
S7	大蓟	DJ07	江苏省徐州市
S8	大蓟	DJ08	江苏省徐州市
S9	大蓟	DJ09	江苏省徐州市
S10	大蓟	DJ10	江苏省淮安市
S11	大蓟	DJ11	江苏省淮安市
S12	大蓟	DJ12	江苏省淮安市
S13	小蓟	XJ01	江苏省徐州市
S14	小蓟	XJ02	江苏省徐州市
S15	小蓟	XJ03	江苏省徐州市
S16	小蓟	XJ04	江苏省宿迁市
S17	小蓟	XJ05	江苏省宿迁市
S18	小蓟	XJ06	江苏省宿迁市
S19	小蓟	XJ07	安徽省滁州市
S20	小蓟	XJ08	安徽省滁州市
S21	小蓟	XJ09	安徽省滁州市

2 方法与结果

2.1 指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件

采用 Waters CORTEC setosum T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μ m), 以乙腈 (A)-0.1% 磷酸溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0~3 min, 5% $\rightarrow$ 18% A; 3~5 min, 18% A; 5~10 min, 18% $\rightarrow$ 19% A; 10~20 min, 19% $\rightarrow$ 28% A; 20~30 min, 28% $\rightarrow$ 70% A), 流速为 0.30 mL/min, 检测波长为 330 nm, 柱温为 25 $^{\circ}$ C, 进样量为 2 μ L。

2.1.2 混合对照品溶液的制备

取对照品新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、地奥司明、蒙花苷、柳穿鱼叶苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、柳穿鱼黄素适量,精密称定,加 70% 甲醇制成每 1 mL 含新绿原酸 10.643 μ g、隐绿原酸 10.791 μ g、绿原酸 20.517 μ g、咖啡酸 10.983 μ g、地奥司明 20.532 μ g、蒙花苷

101.430 μg 、柳穿鱼叶苷 82.767 μg 、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 9.403 μg 、柳穿鱼黄素 9.358 μg 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过三号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定重量,加热回流 30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 精密度试验

取大蓟(编号:DJ02)及小蓟(编号:XJ06)的供试品溶液,按“2.1.1”项色谱条件分别连续进样 6 次,大蓟以峰 9 为参照峰,小蓟以峰 2 为参照峰,分别计算各药材其余特征峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积,并计算 RSD 值。结果显示,大蓟相对保留时间 RSD 在 0.13%~0.69% 之间($n=6$),相对峰面积 RSD 在 0.64%~1.48% 之间($n=6$);小蓟相对保留时间 RSD 在 0.11%~0.35% 之间($n=6$),相对峰面积 RSD 在 0.52%~1.87% 之间($n=6$),所有 RSD 值均小于 3%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验

取同一批大蓟(编号:DJ02)及小蓟(编号:XJ06)药材,按“2.1.3”项方法平行制备 6 份供试品溶液,并按“2.1.1”项色谱条件进样测定,相对保留时间和相对峰面积 RSD 的计算方法同“2.1.4”项。结果显示,大蓟相对保留时间 RSD 在 0.11%~0.50% 之间($n=6$),相对峰面积 RSD 在 0.21%~1.19% 之间($n=6$);小蓟相对保留时间 RSD 在 0.52%~1.08% 之间($n=6$),相对峰面积 RSD 在 1.20%~2.67% 之间($n=6$),所有 RSD 值均小于 3%,表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验

取同一大蓟(编号:DJ02)及小蓟(编号:XJ06)供试品溶液,室温放置,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按“2.1.1”项色谱条件进样测定,相对保留时间和相对峰面积 RSD 的计算方法同“2.1.4”项。结果显示,大蓟相对保留时间 RSD 在 0.70%~1.25% 之间($n=7$),相对峰面积 RSD 在 0.55%~1.81% 之间($n=7$);小蓟相对保留时间 RSD 在 0.75%~1.40% 之间($n=7$),相对峰面积 RSD 在 0.83%~2.50% 之间($n=7$),所有 RSD 值均小于 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 相似度评价

分别取 12 批大蓟和 9 批小蓟药材样品,按“2.1.3”项方法制备供试品溶液,并在“2.1.1”项色谱条件下进行测定,记录色谱图。将各样品特征图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版),以 S1 样品为参照进行多点校正和峰匹配,生成对照特征图谱,大蓟和小蓟均标识出 11 个共有特征峰。样品特征图谱叠加图见图 1,对照图谱见图 2。经计算,12 批大蓟样品与对照图谱的相似度在 0.912~0.998 之间,9 批小蓟样品与对照图谱的相似度在 0.997~1.000 之间,均大于 0.9,表明不同批次的大蓟和小蓟药材质量均一、稳定,且相似度较高。具体结果见表 2。

2.1.8 共有峰指认

取“2.1.2”项下对照品溶液,按“2.1.1”项

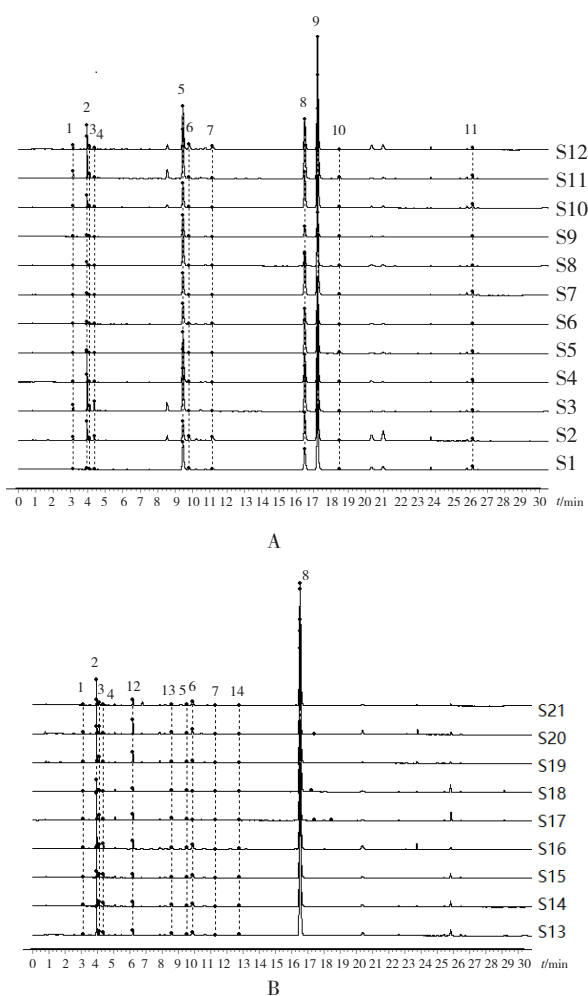


图1 大蓟和小蓟特征图谱叠加图

Figure 1. The characteristic chromatograms of different specifications of *Cirsium japonicum* and *Cirsium setosum*

注: A: 大蓟特征图谱; B: 小蓟特征图谱。

色谱条件进样分析，依据色谱峰保留时间及紫外3D 光谱图，对大蓟和小蓟特征图谱中的 11 个共有特征峰进行指认，确定峰 1 为新绿原酸、峰 2 为绿原酸、峰 3 为隐绿原酸、峰 4 为咖啡酸、峰 5 为地奥司明、峰 6 为芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸

苷、峰 8 为蒙花苷、峰 9 为柳穿鱼叶苷、峰 11 为柳穿鱼黄素。其中，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、峰 7 及蒙花苷为大蓟和小蓟的共有特征峰，结果见图 2。

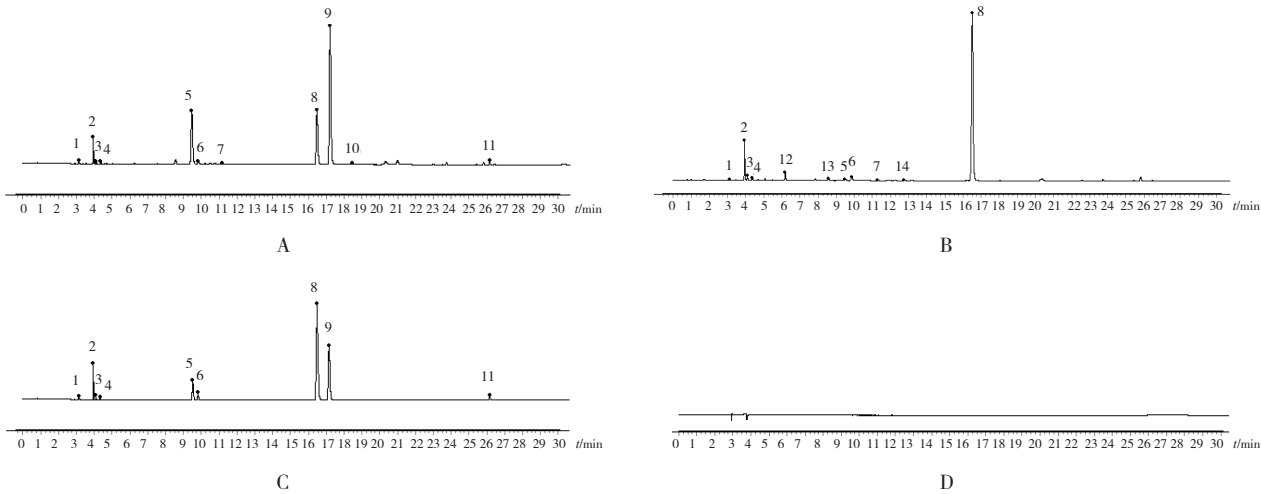


图2 大蓟和小蓟特征图谱峰指认

Figure 2. The characteristic chromatograms peak identification of Cirsium japonicum and Cirsium setosum
注：A. 大蓟对照图谱；B. 小蓟对照图谱；C. 混合对照品；D. 空白溶剂；1. 新绿原酸；2. 绿原酸；3. 隐绿原酸；4. 咖啡酸；5. 地奥司明；6. 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷；8. 蒙花苷；9. 柳穿鱼叶苷；11. 柳穿鱼黄素。

表2 大蓟和小蓟对照特征图谱相似度评价结果
Table 2. Evaluation results of the similarity of control characteristic chromatograms of Cirsium japonicum and Cirsium setosum

Cirsium setosum		
名称	编号	相似度
大蓟	DJ01	0.996
	DJ02	0.981
	DJ03	0.990
	DJ04	0.966
	DJ05	0.952
	DJ06	0.989
	DJ07	0.982
	DJ08	0.912
	DJ09	0.943
	DJ10	0.992
	DJ11	0.998
	DJ12	0.987
小蓟	XJ01	1.000
	XJ02	1.000
	XJ03	0.997
	XJ04	1.000
	XJ05	0.998
	XJ06	1.000
	XJ07	0.999
	XJ08	1.000
	XJ09	1.000

2.2 化学计量分析

2.2.1 层次聚类分析

采用 IBM SPSS 24.0 软件，以 12 批大蓟和 9 批小蓟的 8 个共有特征峰的峰面积积分值为变量进行层次聚类分析（hierarchical cluster analysis，HCA），当组间联接距离为 5~10 时，可将大蓟与小蓟分为两类，其中小蓟单独聚为一类，大蓟聚为另一类，结果见图 3。

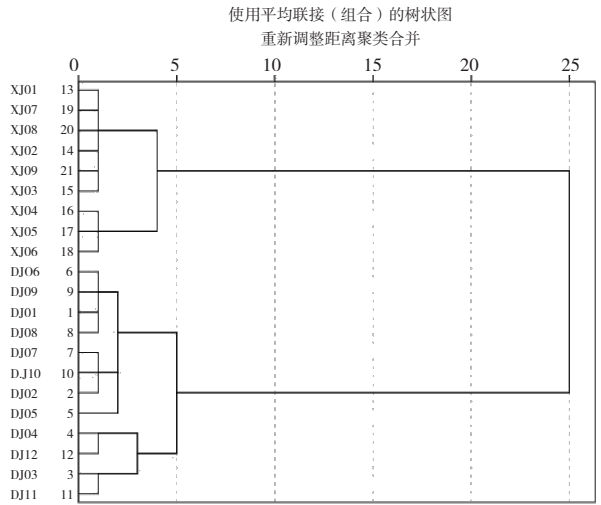


图3 21批大蓟药材和小蓟的HCA结果

Figure 3. HCA result of 21 batches of Cirsium japonicum and Cirsium setosum

2.2.2 主成分分析

采用 SIMCA 14.1 软件，以 12 批大蓟和 9 批小蓟的 8 个共有特征峰的峰面积积分值为变量进行主成分分析（principal component analysis, PCA），所建模型的 R^2X （表示模型在 X 轴方向上的累积解释能力）=0.937, Q^2 （表示模型的预测能力）=0.664（>0.5），表明模型有效。Scores 图（图 4）显示大蓟和小蓟基本分为两类，该结果与聚类分析基本一致。

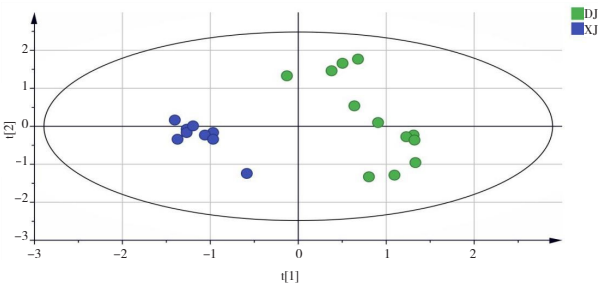


图4 21批大蓟药材和小蓟药材的PCA结果
Figure 4. PCA scores of 21 batches of Cirsium japonicum and Cirsium setosum

2.2.3 正交偏最小二乘法-判别分析

采用 SIMCA 14.1 软件，以共有指纹峰的峰面积积分值为变量进行正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA），所建模型参数 $R^2X=0.921$, $R^2Y=0.973$ （表示模型在 Y 轴方向上的累积解释能力）， $Q^2=0.952$ （大于 0.5），表明模型有效。Scores 图（图 5）显示大蓟和小蓟明显分为两类；通过置换检验（图 6）对该模型随机排列 200 次，结果显示置换检验参数 R^2 和 Q^2 的截距分别为 0.141 和 -0.598，且原始模型的 R^2 和 Q^2 值均位于置换分布右上方，高于随机排列后的数值，表明所建 OPLS-DA 模型未出现过拟合，可用于大蓟和小蓟药材的模式识别。变量投影重要性（variable importance in projection, VIP）图（图 7）显示各变量对分类的影响程度由大到小依次为：地奥司明>蒙花苷>峰 7>绿原酸>隐绿原酸>芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷>新绿原酸>咖啡酸。以 VIP 值大于 1.0 作为显著性标准，共筛选出 3 个差异标志物，分别为地奥司明、蒙花苷和峰 7。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件

同“2.1.1”项。

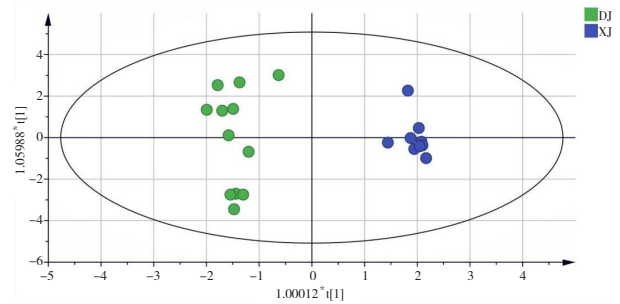


图5 21批大蓟药材和小蓟药材的OPLS-DA结果
Figure 5. OPLS-DA scores of 21 batches of Cirsium japonicum and Cirsium setosum

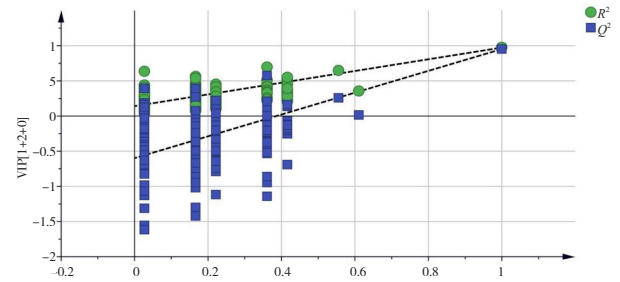


图6 OPLS-DA模型置换验证图
Figure 6. OPLS-DA model permutation test diagram

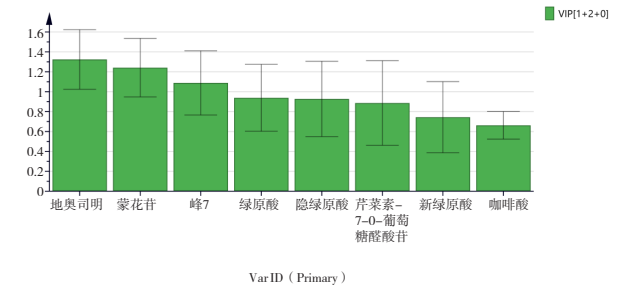


图7 差异性标志物VIP图
Figure 7. VIP map of different markers

2.3.2 混合对照品溶液的制备

取对照品绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素适量，精密称定，加 70% 甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 20.625 μg 、咖啡酸 11.135 μg 、地奥司明 21.278 μg 、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 10.245 μg 、蒙花苷 100.675 μg 、柳穿鱼叶苷 82.853 μg 、柳穿鱼黄素 10.135 μg 的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备

同“2.1.3”项。

2.3.4 线性关系考察

取绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL

含绿原酸 208.509 μg 、咖啡酸 5.709 μg 、地奥司明 593.958 μg 、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 75.762 μg 、蒙花苷 929.589 μg 、柳穿鱼叶苷 360.393 μg 和柳穿鱼黄素 12.312 μg 的对照品储备液。精密移取上述对照品储备液 0.04、0.5、2.0、6.0、8.0 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，得到系列浓度的对照品稀释液。

表3 含量测定线性考察结果

Table 3. Results of linear inspection of content determination

指标成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)
绿原酸	$Y=10\,288X-2\,089.2$	0.999 9	0.834~208.509
咖啡酸	$Y=33\,601X-1\,168.5$	0.999 7	0.023~5.709
地奥司明	$Y=3\,375.3X-11.245$	1.000 0	2.376~593.958
芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	$Y=3\,380.9X+265.42$	0.999 9	0.303~75.762
蒙花苷	$Y=11\,214X-20\,515$	0.999 9	3.718~929.589
柳穿鱼叶苷	$Y=15\,449X-16\,114$	1.000 0	1.442~360.393
柳穿鱼黄素	$Y=30\,649X-1\,131.6$	0.999 9	0.049~12.312

2.3.5 精密度试验

取“2.3.2”项混合对照品溶液，按“2.3.1”项色谱条件连续进样 6 次，分别测定绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷、柳穿鱼黄素峰面积，计算得各成分峰面积的 *RSD* 在 0.13%~1.14% 范围内 ($n=6$)，均小于 3%，表明该仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验

分别取同一大蓟（编号：DJ02）和小蓟（编号：XJ06）供试品溶液，室温放置，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 按“2.3.1”项色谱条件进样测定，计算得大蓟中绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素峰面积的 *RSD* 在 0.29%~1.96% 范围内 ($n=7$)，小蓟中绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷和蒙花苷面积的 *RSD* 在 0.45%~1.08% 范围内 ($n=7$)，均小于 3%，表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验

各取大蓟粉末（编号：DJ02）和小蓟粉末（编号：XJ06）约 0.5 g，精密称定，平行 6 份，按“2.3.3”项方法制备供试品溶液，并按“2.3.1”项色谱条件进样测定，计算得大蓟中绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素的平均含量分别为 0.736、0.058、5.928、0.317、

依次吸取对照品储备液及各稀释液，按“2.3.1”项色谱条件进样分析，以各对照品浓度 (X , $\mu\text{g/mL}$) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归。表 3 结果显示，绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素的 r 均大于 0.999 5，表明以上 7 种成分在相应浓度范围内，浓度与峰面积线性关系良好。

6.946、3.594、0.054 mg/g，*RSD* 在 0.12%~1.45% 范围内 ($n=6$)；小蓟中绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷和蒙花苷的平均含量分别为 0.875、0.029、0.354、0.197、9.216 mg/g，但未检出柳穿鱼黄素和柳穿鱼叶苷，*RSD* 在 0.75%~2.09% 范围内 ($n=6$)，均小于 3%，表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验

各取大蓟粉末（编号：DJ02）和小蓟粉末（编号：XJ06）约 0.25 g，精密称定，平行 9 份，按样品与对照品含量比为 0.5 : 1、1 : 1 和 1 : 1.5 的比例，加入绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素对照品，每种比例样品平行 3 份，按“2.3.1”项色谱条件进样测定，计算得大蓟中绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素的平均回收率分别为 100.23%、96.87%、100.71%、97.49%、99.34%、100.19%、98.28%，*RSD* 在 0.19%~2.71% 范围内 ($n=9$)；小蓟中绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷和蒙花苷含量的回收率均值分别为 101.37%，96.18%、99.76%、98.31%、99.13%，*RSD* 在 1.72%~2.11% 范围内 ($n=9$)；表明该方法回收率良好。

2.3.9 样品测定

取 12 批大蓟和 9 批小蓟药材样品，按“2.3.3”

项方法分别制备供试品溶液，每批平行 2 份，按“2.3.1”项色谱条件进样测定，采用外标法计算绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素的含量，结果见表 4。采用 SPSS 20.0 软件，以各共有成分含量为变量进行曼-惠特尼秩和检验，结果显示：绿原酸（ $P=0.028$ ）、地奥

司明（ $P<0.001$ ）、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷（ $P=0.049$ ）、蒙花苷（ $P=0.001$ ）、柳穿鱼叶苷（ $P<0.001$ ）和柳穿鱼黄素（ $P<0.001$ ）的 P 均小于 0.05，而咖啡酸（ $P=0.345$ ）无显著差异。在 $\alpha=0.05$ 检验水准下，除咖啡酸外，其余 6 种成分在大蓟与小蓟中的含量分布差异均具有统计学意义。

表4 样品含量测定结果 (mg/g, $n=2$)
Table 4. Results of sample determination (mg/g, $n=2$)

编号	绿原酸	咖啡酸	地奥司明	芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷	蒙花苷	柳穿鱼叶苷	柳穿鱼黄素
DJ01	0.074	0.008	8.856	0.114	1.924	3.325	0.084
DJ02	0.736	0.058	5.928	0.317	6.946	3.594	0.054
DJ03	2.327	0.129	13.313	0.026	13.853	8.248	0.031
DJ04	0.294	0.008	16.059	0.036	3.922	6.079	0.054
DJ05	0.053	0.003	1.202	0.023	3.272	5.511	0.053
DJ06	0.104	0.007	6.690	0.053	2.657	3.156	0.012
DJ07	0.084	0.004	6.937	0.007	2.310	3.699	0.093
DJ08	0.140	0.006	11.093	0.032	2.510	5.403	0.015
DJ09	0.069	0.002	6.863	0.025	2.368	3.906	0.029
DJ10	0.483	0.009	7.605	0.078	7.775	9.908	0.087
DJ11	1.570	0.010	15.442	0.103	8.941	9.630	0.076
DJ12	0.904	0.021	13.473	0.356	8.500	9.776	0.049
XJ01	0.889	0.035	0.220	0.134	8.819	未检出	未检出
XJ02	1.039	0.031	0.261	0.153	10.364	未检出	未检出
XJ03	1.742	0.052	0.305	0.272	12.857	未检出	未检出
XJ04	1.147	0.015	0.270	0.041	11.402	未检出	未检出
XJ05	0.354	0.003	0.310	0.046	9.131	未检出	未检出
XJ06	0.875	0.029	0.354	0.197	9.216	未检出	未检出
XJ07	1.125	0.006	0.386	0.132	10.154	未检出	未检出
XJ08	0.775	0.008	0.227	0.195	13.254	未检出	未检出
XJ09	0.978	0.009	0.245	0.227	9.950	未检出	未检出
$t_{(DJ)}$	0.570	0.022	9.455	0.098	5.415	6.020	0.053
$t_{(XJ)}$	0.992	0.021	0.286	0.155	10.572	未检出	未检出
P	0.028	0.345	0.000	0.049	0.001	0.000	0.000

3 讨论

3.1 供试品溶液制备

本研究通过单因素试验，以色谱峰“总峰面积/称样量”及绿原酸、地奥司明、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素的含量为综合评价指标，分别考察了提取溶剂（甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇）、提取方式（超声提取与加热回流）及提取时间（15、30、60 min）对特征图谱和各成分含量测定的影响，最终确定供试品溶液的最佳制备方法为甲醇加热回流提取 30 min。

3.2 特征图谱的建立及分析

特征图谱研究结果显示，大蓟的 UPLC 特征

图谱共标定 11 个共有峰，并通过对照品指认出其中 9 个特征性成分，分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素；小蓟的 UPLC 特征图谱同样标定 11 个共有峰，指认其中 7 个成分，分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷和蒙花苷。研究中分别考察了 3 种酸溶液（0.1% 磷酸溶液、0.5% 冰醋酸溶液、0.2% 甲酸溶液）、5 种不同型号色谱柱 [Waters CORTEC setosum T3（100 mm×2.1 mm，1.6 μm）、SHIMADZU Shim-pack Scepter C₁₈（100 mm×2.1 mm，1.9 μm）、YMC Triart C₁₈（100 mm×2.1 mm，1.9 μm）、Agilent ZORBAX

SB-C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 和 Waters HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)], 同时比较了不同检测波长 (254、310、330、370 nm)、流速 (0.28、0.30、0.32 mL/min) 及柱温 (23、25、27 °C) 对大蓟和小蓟特征图谱色谱行为的影响。最终确定采用 Waters CORTEC setosum T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm), 以 0.1% 磷酸溶液为水相, 在检测波长 330 nm、柱温 25 °C、流速 0.30 mL/min 的色谱条件下, 所得色谱峰分离度良好、基线平稳, 且色谱峰信息丰富, 信号响应较高。

3.3 大蓟和小蓟化学成分的区别

本研究建立了大蓟和小蓟药材的 UPLC 特征图谱。大蓟图谱共标定 11 个共有峰, 并通过对照品指认了其中 9 个成分, 分别为: 峰 1 (新绿原酸)、峰 2 (绿原酸)、峰 3 (隐绿原酸)、峰 4 (咖啡酸)、峰 5 (地奥司明)、峰 6 (芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷)、峰 8 (蒙花苷)、峰 9 (柳穿鱼叶苷) 和峰 11 (柳穿鱼黄素)。小蓟图谱同样标定 11 个共有峰, 指认其中 7 个成分, 分别为: 峰 1 (新绿原酸)、峰 2 (绿原酸)、峰 3 (隐绿原酸)、峰 4 (咖啡酸)、峰 5 (地奥司明)、峰 6 (芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷) 和峰 8 (蒙花苷)。大蓟色谱图中的峰 9、峰 10 和峰 11, 以及小蓟色谱图中的峰 12、峰 13 和峰 14 分别为两药材的特征峰, 但目前尚未明确这 6 个特征峰的具体成分。通过 HCA、PCA 和 OPLS-DA 分析, 均可实现大蓟与小蓟的明显区分; 进一步分析表明, 地奥司明、蒙花苷和峰 7 是区分两者的关键差异性成分, 后续可针对这 3 种成分作为鉴别大蓟和小蓟药材的重要切入点展开深入研究。

本研究对大蓟色谱图中分离度良好、稳定性高且纯度较高的 7 种化学成分 (绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素) 与小蓟色谱图中符合相同标准的 5 种成分 (绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷和蒙花苷) 进行了含量测定。黄酮类化合物作为大蓟和小蓟的主要有效成分, 本研究结果显示, 地奥司明和蒙花苷是区分两者的差异标志物: 大蓟中地奥司明含量显著高于小蓟, 而除个别批次外, 大蓟中蒙花苷含量多数低于小蓟。此外, 柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素仅在大蓟中检出。

3.4 小结

大蓟与小蓟虽性状相似且在现行药典中功效描述相近, 但结合历代本草记载与现代研究可知, 二者在主治功效、有效成分及临床应用方面均存在一定差异。本研究通过比较大蓟 7 种有效成分与小蓟 5 种有效成分的含量差异, 并结合二者药理作用与功效特点, 提示临床实践中应明确区分并分别标注大蓟与小蓟的使用, 以更精准地体现中医辨证施治原则, 提升治疗效果。同时, 当前中国药典中将大蓟与小蓟功效主治归为相近的表述不够严谨, 有待进一步深入研究与完善。

参考文献

- 1 肖培根, 主编. 新编中药志 (第三卷) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 5–11.
- 2 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 26, 50–51.
- 3 赵彧, 邱明阳, 刘玉婷, 等. 大蓟化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4584–4590. [Zhao Y, Qiu MY, Liu YT, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological of *Cirsium japonicum* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(21): 4584–4590.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.035](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.035).
- 4 郭建慧, 郝会军, 王裕, 等. 小蓟活性成分及作用研究进展 [J]. 现代食品, 2022, 28(18): 56–58. [Guo JH, Hao HJ, Wang Y, et al. Advances in active components and pharmacological effects of *Cirsium setosum* [J]. Modern Food, 2022, 28(18): 56–58.] DOI: [10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2022.18.014](https://doi.org/10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2022.18.014).
- 5 周京燕, 韩立新, 林晓兰. 临床应区别使用大蓟与小蓟 [J]. 首都医药, 2006, 13(16): 49–50. [Zhou JY, Han LX, Lin XL. Clinical differentiation between *Cirsium japonicum* and *Cirsium setosum* in application [J]. Capital Food Medicine, 2006, 13(16): 49–50.] DOI: [10.3969/j.issn.1005-8257.2006.16.036](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-8257.2006.16.036).
- 6 万成杰, 张春菁, 谢宗会, 等. 大蓟抗结核杆菌的活性成分及作用机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6561–6567. [Wan CJ, Zhang CJ, Xie ZH, et al. Component with activity against *Mycobacterium tuberculosis* from *Cirsium japonicum* and its anti-*M.tuberculosis* mechanism [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(21): 6561–6567.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.014](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.014).
- 7 张丹, 周洁. 大蓟临床应用浅析 [J]. 云南中医中药杂志, 2004, 25(3): 19. [Zhang D, Zhou J. Brief analysis of the clinical applications of *Cirsium japonicum* [J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2004, 25(3): 19.] DOI: [10.16254/j.cnki.53-1120/r.2004.03.024](https://doi.org/10.16254/j.cnki.53-1120/r.2004.03.024).
- 8 丁齐又, 魏秀秀, 顾成娟, 等. 仙鹤草、侧柏叶、小蓟治疗肾性血尿经验—全小林三味小方撷萃 [J]. 吉林中医药, 2020, 40(7): 850–853. [Ding QY, Wei XX, Gu XJ, et al. Herba agrimoniae, Cacumen platycladi, and Herba cirsii in the treatment of renal hematuria—three prescription by professor TONG

- Xiaolin[J]. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 40(7): 850–853.] DOI: [10.13463/j.cnki.jlzyy.2020.07.003](https://doi.org/10.13463/j.cnki.jlzyy.2020.07.003).
- 9 梁鹏, 康廷国. 大蓟与小蓟的显微鉴别研究[J]. 中药材, 2016, 39(4): 757–759. [Liang L, Kang TG. Microscopic identification study of *Cirsium japonicum* and *Cirsium setosum*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 39(4): 757–759.] DOI: [10.13863/j.issn1001-4454.2016.04.014](https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454.2016.04.014).
- 10 宋晓光, 刘晓静, 康帅, 等. 大蓟与小蓟饮片的鉴别研究[J]. 中国民族民间医药, 2024, 33(8): 54–60. [Song XG, Liu XJ, Kang S, et al. Study on the identification of traditional Chinese medicine pieces of *Cirsii japonici herba* and *Cirsii herba*[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2024, 33(8): 54–60.] DOI: [10.3969/j.issn.1007-8517.2024.08.zgmzmjyzz202408012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-8517.2024.08.zgmzmjyzz202408012).
- 11 张景景, 祁晓婷, 张超, 等. ITS2 序列鉴定大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品[J]. 世界中医药, 2016, 11(10): 81–84. [Zhang JJ, Qi XT, Zhang C, et al. Identification of *Cirsium japonicum*, *Cirsium setosum* and their adulterants based on ITS2 sequence[J]. World Chinese Medicine, 2016, 11(10): 81–84.] DOI: [10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.052](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.052).
- 12 张诗华, 郭朝辉, 倪琳, 等. 基于中红外技术的大蓟及小蓟鉴别研究[J]. 药学研究, 2023, 42(1): 28–32. [Zhang SH, Guo CH, Ni L, et al. Identification of *Cirsium japonicum* and *Cirsium setosum* based on mid infrared technology[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2023, 42(1): 28–32.] DOI: [10.13506/j.cnki.jpr.2023.01.006](https://doi.org/10.13506/j.cnki.jpr.2023.01.006).
- 13 倪晓霓, 许前辉. 大蓟小蓟的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(6): 929–932. [Ni XN, Xu QH. HPLC studies on fingerprints of *Cirsium japonicum* DC. and *Cephalanopossetum* (Bge) Kitam.[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2007, 27(6): 929–932.] DOI: [10.16155/j.0254-1793.2007.06.017](https://doi.org/10.16155/j.0254-1793.2007.06.017).
- 14 易炳学, 张崇佩, 李志林, 等. 不同产地大蓟、小蓟的指纹图谱研究[J]. 中医药导报, 2020, 26(13): 45–48, 53. [Yi BX, Zhang CP, Li ZL, et al. Study on the fingerprint of *Daji* (*Cirsii japonici herba seu radix*) and *Xiaoji* (*Cirsii herba*) from different habitats[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, 2020, 26(13): 45–48, 53.] DOI: [10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2020.13.010](https://doi.org/10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2020.13.010).
- 收稿日期: 2025 年 04 月 16 日 修回日期: 2025 年 05 月 20 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳