

基于多指标成分评价川西高原野生川赤芍的质量

曲别军长^{1,3,4}, 俸明康^{1,3,4}, 张绍山^{2,3,4}, 兰建龙^{1,3,4}, 海来约布^{1,3,4}, 黄艳菲^{2,3,4}, 杨正明^{2,3,4}, 李文兵^{2,3,4}, 陈晨^{2,3,4}, 李莹^{2,3,4}, 刘璇^{1,3,4*}, 刘圆^{3,4,5*}

1. 西南民族大药学院, 四川 成都 610041
2. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川 成都 610041
3. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225
4. 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川 成都 610225
5. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610225

摘要: 目的 研究川西高原上野生川赤芍 *Paeonia veitchii* 入药部位(根)和非入药部位(地上部分)中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸和丹皮酚 7 种化学成分的含量, 并综合评价其品质。方法 以上述 7 种成分为对照品, 采用高效液相色谱(HPLC)法, Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μL, 检测波长 230 nm, 乙腈-0.1%磷酸水梯度洗脱; 采用 2012 版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件构建指纹图谱; 采用聚类热图分析、相似度分析、主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘回归分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)等方法对各产地川赤芍进行评价。结果 野生川赤芍地上部分和根中均含有 7 种化学成分, 仅有 3 批次地上部分样品中芍药苷含量不符合《中国药典》2020 年版的要求。建立了野生川赤芍根和地上部分的 HPLC 指纹图谱, 二者均标定了 19 个相同的共有峰, 并指出其中的 7 个(没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、丹皮酚)。不同产地川赤芍的化学成分种类和含量存在一定差异且存在明显的区域一致性特征, 但芍药苷的差异相对较小。康定市老榆林、雅江县格宗、阿坝县查理加油站和若尔盖县巴西乡的川赤芍药材质量相对较好。结论 建立的 HPLC 方法可用于分析川赤芍中的主要化合物, 川西高原野生川赤芍药材质量符合《中国药典》要求, 川赤芍根和地上部分中化学成分的种类和含量相近, 地上部分具有开发利用的潜力。

关键词: 野生川赤芍; 高效液相色谱; 没食子酸; 氧化芍药苷; 儿茶素; 芍药内酯苷; 芍药苷; 苯甲酸; 丹皮酚; 品质评价

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)18-5842-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.027

Quality evaluation of wild *Paeonia veitchii* in Western Sichuan plateau based on multicomponents

QUBIE Jun-zhang^{1,3,4}, FENG Ming-kang^{1,3,4}, ZHANG Shao-shan^{2,3,4}, LAN Jian-long^{1,3,4}, HAILAI Yue-bu^{1,3,4}, HUANG Yan-fei^{2,3,4}, YANG Zheng-ming^{2,3,4}, LI Wen-bing^{2,3,4}, CHEN Chen^{2,3,4}, LI Ying^{2,3,4}, LIU Xuan^{1,3,4}, LIU Yuan^{3,4,5}

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China
2. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China
3. Sichuan Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology and Engineering Laboratory, Chengdu 610225, China
4. Key Laboratory of Tibetan Plateau Ethnic Medicinal Resources Protection and Utilization of National Ethnic Affairs Commission of the People's Republic of China, Chengdu 610225, China
5. Ethnic Medicine Institute, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China

Abstract: Objective To determine the contents of gallic acid, oxypaeoniflorin, catechin, albiflorin, paeoniflorin, benzoic acid and paeonol

收稿日期: 2022-02-06

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1708005); 四川省科技计划项目(重点研发项目-2021YFS0043); 西南民族大学 2022 年研究生创新型项目资助硕士重点项目(ZD2022491)

作者简介: 曲别军长(1998—), 男, 在读硕士, 主要从事民族药品种、品质评价及新药资源开发与利用研究。E-mail: 1756847031@qq.com

***通信作者:** 刘璇, 女, 主要从事民族药资源品质评价研究。E-mail: 642978155@qq.com

刘圆, 教授, 博士生导师, 从事民族药品种、品质评价及新药资源开发与利用研究。E-mail: 499769896@qq.com

of the roots and aerial parts of wild *P. veitchii* from the Western Sichuan plateau, and then comprehensively evaluate of the quality of *P. veitchii*.

Methods High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was used to analyze the samples with the following conditions: column type, agilent HC-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm); temperature, 30 °C; flow rate, 1 mL/min; injection volume, 10 μL; wavelength, 230 nm; and gradually diluted with acetonitrile-0.1% phosphoric acid water. The fingerprints were established by the Similarity Evaluation System of Traditional Chinese Medicine (version 2012). The comprehensive evaluation of the quality of *P. veitchii* was performed by the hierarchical clustering heat map analysis, similarity analysis, partial least squares discrimination analysis (PLS-DA) and principal component analysis (PCA).

Results The results showed that both roots and aerial parts of *P. veitchii* contained gallic acid, oxypaeoniflorin, catechin, albiflorin, paeoniflorin, benzoic acid and paeonol. And the content of paeoniflorin in only three samples did not meet the requirement of the 2020 edition of China Pharmacopoeia. The HPLC fingerprints of roots and aerial parts of *P. veitchii* were established respectively, and both of the two fingerprints had 19 common peaks, of which seven were identified as gallic acid, oxypaeoniflorin, catechin, albiflorin, paeoniflorin, benzoic acid and paeonol. The kinds and contents of chemical components in both roots and aerial parts of *P. veitchii* from different areas were variable, but the variation of paeoniflorin was relatively small. There was a feature of obvious regional consistency in the kinds and contents of chemical components of *P. veitchii*. Moreover, the rhizome (medicinal part) quality of *P. veitchii* from Laoyulin of Kangding City, Xianggezong of Yajiang County, Chali gas station of Aba County and Baxixiang of Ruogai County was relatively better. **Conclusion** HPLC method established in this study could simultaneously separate and analyze the main compounds in *P. veitchii*. The rhizome quality of *P. veitchii* from the Western Sichuan plateau met the requirement of Chinese Pharmacopoeia. Because the kinds and contents of chemical components in roots and aerial parts of *P. veitchii* were similar, the aerial parts had the potentiality of development and utilization.

Key words: wild *Paeonia veitchii* Lynch; high performance liquid chromatography; gallic acid; oxypaeoniflorin; catechin; albiflorin; paeoniflorin; benzoic acid; paeonol; quality evaluation

川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 为毛茛科芍药属多年生草本植物, 分布在中国西南和西北的高海拔山坡疏林中^[1], 与芍药 *P. lactiflora* Pall. 共同作为著名中药材“赤芍”的基原植物收录在《中国药典》2020 年版中, 具有活血化瘀、清热凉血的功效^[2]。化学成分和药理研究表明, 川赤芍具有抗炎、免疫调节、抗动脉粥样硬化、抗糖尿病、抗肿瘤、保护外周神经和保肝等多种药理作用^[3], 其主要生理活性成分包括单萜苷、酚酸及鞣质类成分^[4-5]。此外, 虽然芍药属植物中化学成分种类繁多, 但其主要且独特的成分为芍药苷及其衍生物, 因此《中国药典》选取芍药苷作为“赤芍”药材的质控指标成分, 规定芍药苷含量不得少于 1.8%^[2]。

Yuan 等^[6]对生态因子对川赤芍生物活性和化学成分影响的研究表明, 年平均气温、海拔、全钾和有机质含量对川赤芍的生物活性以及柚皮苷、没食子酸、苯甲酰芍药苷、芍药苷等成分的含量有重要影响。目前, 川赤芍尚无规模化人工栽培, 药材资源主要依靠野生, 理论上, 野外环境因子的差异会导致川赤芍药材质量的不稳定^[6-9]。《中国药典》1977 年版前的仅收录芍药作为“赤芍”的基原植物, 而芍药在我国栽培历史悠久、种植区域广泛、种植技术成熟、药材产量充沛, 以及以芍药为基原的“白芍”药用广泛。以上因素导致有关芍药的研究众多, 而针对川赤芍的研究鲜有报道。钟海蓉等^[10]利用超

高效液相色谱法 (UPLC) 法评价了 18 个不同产地的川赤芍质量, 但该研究仅测定了芍药苷、氧化芍药苷、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖 3 个化学成分, 且该研究的川赤芍样品主要来源于甘孜州康定县、道孚县、炉霍县、甘孜县及阿坝州汶川县和壤塘县; 此外, 川赤芍药材的品质评价也出现在部分已有的研究报道中, 但均是少量川赤芍与芍药一起综合评价^[11-12]。川赤芍为青藏高原东南缘特有高海拔植物种, 无雪期短导致植物生长期短, 种子自身繁殖率低、再生资源困难, 产量大幅减少, 资源日趋枯竭, 而其地上部分生物产量大。故本研究采用 HPLC 法对川西高原的野生川赤芍中芍药苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸、儿茶素、丹皮酚、苯甲酸 7 种主要成分进行含量测定, 并结合指纹图谱、相似度分析、聚类热图分析、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘回归分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA) 等方法多角度综合评价野生川赤芍的根和地上部分的药材质量, 对川赤芍的质控和资源综合开发利用提供科学依据。

1 仪器与材料

Waters2695 高效液相 (美国 Waters 公司); BP211D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); KQ-5200E 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); METTLERAE240 电子分析天平 (上海梅特勒-

托利多仪器有限公司)。乙腈为色谱纯(美国 Sigma 公司);水为屈臣氏蒸馏水;其余试剂为分析纯。

对照品没食子酸(批号 RP191126)、氧化芍药苷(批号 RP191206)、儿茶素(批号 RP200829)、芍药内酯苷(批号 RP191223)、芍药苷(批号 RP190519)、丹皮酚(批号 RP190)均购自成都麦德生科技有限公司,质量分数均 $\geq 98.00\%$;苯甲酸(批号 18020501)购于成都普菲德生物技术公司,

质量分数 98.76%。

样品于 2020 年 6 月采自四川省甘孜藏族自治州与阿坝藏族羌族自治州的不同县镇,所有样品均来源于野生环境,且经西南民族大学青藏高原研究院刘圆教授、张绍山助理研究员鉴定为毛茛科芍药属植物川赤芍 *P. veitchii* Lynch, 编号 S1~S22, 对应其根部和地上部分分别编号 G1~G22 和 DS1~DS22 信息见表 1。

表 1 川赤芍样品来源

Table 1 Origins of *P. veitchii*

编号	来源	海拔/m	采集日期
S1	四川省阿坝州马尔康县卓克基乡	3252	2020-06-20
S2	四川省阿坝州马尔康县卓克基乡	3267	2020-06-20
S3	四川省阿坝州阿坝县查理加油站	2985	2020-06-22
S4	四川省阿坝州阿坝县查理加油站	2987	2020-06-22
S5	四川省阿坝州若尔盖县巴西乡	2789	2020-06-26
S6	四川省阿坝州若尔盖县巴西乡	2786	2020-06-26
S7	四川省阿坝州若尔盖县巴西乡	2786	2020-06-26
S8	四川省阿坝州松潘县大岩坊	3296	2020-06-27
S9	四川省阿坝州松潘县大岩坊	3292	2020-06-27
S10	四川省阿坝州松潘县大岩坊	3292	2020-06-27
S11	四川省阿坝州黑水县达古冰川	3006	2020-06-28
S12	四川省阿坝州黑水县达古冰川	3015	2020-06-28
S13	四川省阿坝州黑水县西尔镇	2475	2020-06-28
S14	四川省阿坝州黑水县西尔镇	2477	2020-06-28
S15	四川省阿坝州马尔康县阿木果脚	3576	2020-10-26
S16	四川省甘孜州康定市折多山	4122	2020-06-20
S17	四川省甘孜州康定市老榆林	3150	2020-06-21
S18	四川省甘孜州雅江县格宗	4962	2020-06-22
S19	四川省甘孜州雅江县格宗	4966	2020-06-22
S20	四川省甘孜州雅江县麻格宗	4786	2020-06-22
S21	四川省甘孜州雅江县勒察卡	4526	2020-06-23
S22	四川省甘孜州雅江县勒察卡	4563	2020-06-23

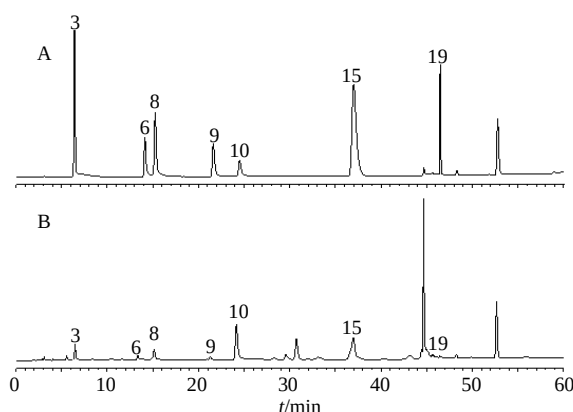
2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters 2695 高效液相色谱仪; Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 二元梯度洗脱程序: 0~5 min, 5%~10% A; 5~20 min, 10%~15% A; 20~25 min, 15%~17% A; 25~40 min, 17%~19% A; 40~45 min, 19%~40% A; 45~46 min, 40%~70% A; 46~60 min, 70% A; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L; 检测波长 230 nm。对照品及供试品色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、丹皮酚对照品适量, 加色谱甲醇制成含没食子酸 0.202 mg/mL、氧化芍药苷 0.201 mg/mL、儿茶素 0.206 mg/mL、芍药内酯



3-没食子酸 6-氧化芍药苷 8-儿茶素 9-芍药内酯苷 10-芍药苷 15-苯甲酸 19-丹皮酚
3-gallic acid 6-oxypaeoniflorin 8-catechin 9-albiflorin
10-paeoniflorin 15-benzoic acid 19-paeonol

图 1 混合对照品 (A) 和 S1 (根) 样品 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substances (A) and S1 (roots) sample (B)

苷 0.212 mg/mL、芍药苷 0.666 mg/mL、苯甲酸 0.221 mg/mL、丹皮酚 0.225 mg/mL 的混合对照品溶液，摇匀后经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.3 供试品溶液的制备

将干燥的待测川赤芍样品粉碎，过 40 目筛，称取药材粉末约 0.5 g，精密称定，置于 100 mL 锥形瓶中，按料液比 1:50 加入 80% 甲醇，摇匀，密封称定质量，浸泡 2 h 后，超声 45 min，冷却至室温，密封称定质量，用 80% 甲醇补足减失质量，摇匀后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 分别取供试品溶液（根、地上部分）和混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，得到特征峰，供试品溶液与杂质分离良好。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液适量，加色谱甲醇稀释成不同质量浓度，按“2.1”项下色谱条件测定。以对照品进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y），绘制标准曲线，并进行线性回归，得 7 种成分的回归方程与线性范围，见表 2。

表 2 7 种对照品的线性回归方程

Table 2 Calibration curve of seven reference substances

成分	回归方程	线性范围/μg	R ²
没食子酸	$Y=17\,772\,295.66X-62\,962.53$	0.020~2.02	0.999 9
氧化芍药苷	$Y=2\,462\,994.43X$	0.020~2.01	0.999 6
儿茶素	$Y=25\,820\,934.78X-209\,560.08$	0.026~2.06	0.999 8
芍药内酯苷	$Y=9\,597\,000X-120\,520$	0.021~2.12	0.999 6
芍药苷	$Y=12\,539\,991.54X-354\,074.85$	0.067~6.66	1.000 0
苯甲酸	$Y=72\,427\,705.98X-377\,916.90$	0.022~2.21	0.999 8
丹皮酚	$Y=10\,800\,009X-67\,412.62$	0.023~2.25	0.999 5

2.4.3 精密度试验 取 S1（G）批次供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录 7 个对照品色谱峰的峰面积。结果各对照品色谱峰的峰面积均 RSD<2%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 取 S1（G）批次药材按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录 7 个对照品色谱峰的峰面积。结果各对照品色谱峰的含量 RSD 均<2%，表明方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取 S1（G）批次供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录 7 个对照品色谱峰的峰面积。结

果各对照品色谱峰的峰面积均 RSD<2%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取已测定含量的 S1（G）批次样品 6 份，分别精密称量加入一定量的 7 个对照品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算回收率，没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、丹皮酚的加样回收率分别为 98.98%、96.48%、98.73%、95.98%、109.39%、105.39%、108.46%，RSD 分别为 0.96%、1.47%、0.86%、0.85%、1.62%、0.72%、2.23%。

2.5 样品含量测定

2.5.1 川赤芍不同部位含量测定结果 将“2.3”项下制得的 44 批（根和地上部分）供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，测定结果见表 3。由表 3 可知，川赤芍根样品中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、丹皮酚质量分数分别为 0.09%~0.31%、0.07%~0.88%、0.11%~0.44%、0.10%~1.10%、2.63%~5.67%、0.18%~0.69%、0.07%~0.16%；地上部分样品中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、丹皮酚质量分数分别为 0.03%~0.49%、0.09%~0.74%、0.08%~0.72%、0.10%~0.49%、0.13%~3.70%、0.08%~0.88%、0.04%~0.09%。芍药苷在药用部位（根）中的平均质量分数为 3.94%，且各样品均≥1.8%，符合药典规定；地上部分样品中芍药苷平均质量分数为 2.56%，其中 19 批次的含量达到了药典标准。

2.5.2 聚类热图分析 聚类热图可通过纵向聚类 and 横向聚类同时反映样品间和性状间的关系，以及可以利用热图颜色的深浅反映样品中相应性状的变化^[14-15]。为了直观地分析川赤芍根和地上部位中 7 种主要化学成分在不同产地中的含量变化，采用 Heml-1.0 软件进行聚类热图分析，结果如图 2 所示。聚类分析结果显示，川赤芍根样品可分为 3 类，S15、S16 和 S17 聚为一类，S18、S19 和 S22 号聚为一类，其他编号的聚为一类，其中 S16、S17、S18、S19 和 S22 均采自甘孜州；川赤芍地上部分也分为 2 类，S17、S18、S19、S20 和 S21 号聚为一类，其他编号的聚为一类。热图分析结果显示，“芍药苷”及其衍生物“氧化芍药苷”和“芍药内酯苷”的含量在川赤芍中存在此消彼长的关系，这与它们能相互生物转化的关系一致，同时也说明它们的总含量在川赤芍中维持着一定的平衡。

表 3 44 份样品中 7 种化学成分的含量结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Contents of seven components in 44 samples ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	部位	质量分数/%						
		没食子酸	氧化芍药苷	儿茶素	芍药内酯苷	芍药苷	苯甲酸	丹皮酚
S1	根	0.21±0.02	0.32±0.05	0.11±0.03	0.15±0.04	4.14±0.21	0.30±0.08	0.10±0.05
	地上	0.03±0.01	0.23±0.03	0.35±0.05	0.23±0.07	2.13±0.25	0.60±0.11	0.08±0.02
S2	根	0.15±0.01	0.10±0.01	0.17±0.06	0.12±0.03	4.29±0.30	0.33±0.10	0.08±0.03
	地上	0.19±0.03	0.20±0.02	0.18±0.04	0.12±0.06	1.22±0.11	0.32±0.07	0.06±0.02
S3	根	0.27±0.04	0.30±0.07	0.21±0.03	0.20±0.05	4.08±0.27	0.42±0.08	0.13±0.02
	地上	0.11±0.01	0.09±0.01	0.12±0.05	0.10±0.01	2.42±0.24	0.24±0.04	0.06±0.01
S4	根	0.28±0.05	0.59±0.12	0.35±0.08	0.26±0.07	4.06±0.34	0.46±0.09	0.07±0.01
	地上	0.16±0.02	0.17±0.02	0.10±0.06	0.11±0.05	2.98±0.27	0.26±0.06	0.06±0.02
S5	根	0.31±0.03	0.31±0.11	0.32±0.07	0.21±0.09	4.23±0.41	0.52±0.03	0.08±0.01
	地上	0.49±0.03	0.30±0.09	0.46±0.08	0.17±0.06	2.50±0.21	0.88±0.09	0.05±0.01
S6	根	0.09±0.01	0.09±0.02	0.13±0.02	0.17±0.04	2.97±0.32	0.19±0.07	0.08±0.02
	地上	0.12±0.02	0.17±0.03	0.09±0.01	0.11±0.05	2.47±0.30	0.16±0.04	0.05±0.01
S7	根	0.09±0.02	0.08±0.01	0.15±0.03	0.17±0.09	2.97±0.32	0.22±0.05	0.08±0.02
	地上	0.10±0.01	0.20±0.05	0.08±0.01	0.12±0.07	1.46±0.17	0.24±0.06	0.04±0.00
S8	根	0.23±0.04	0.29±0.09	0.33±0.06	0.16±0.05	5.67±0.50	0.39±0.05	0.08±0.02
	地上	0.21±0.02	0.39±0.08	0.17±0.03	0.19±0.07	3.29±0.35	0.21±0.04	0.05±0.01
S9	根	0.18±0.01	0.21±0.02	0.16±0.02	0.54±0.07	3.36±0.29	0.29±0.08	0.08±0.01
	地上	0.15±0.03	0.27±0.08	0.17±0.03	0.14±0.03	3.51±0.37	0.18±0.07	0.04±0.01
S10	根	0.16±0.02	0.20±0.02	0.23±0.05	0.30±0.02	4.67±0.62	0.20±0.09	0.07±0.02
	地上	0.14±0.01	0.15±0.01	0.11±0.02	0.29±0.05	3.70±0.41	0.11±0.04	0.08±0.01
S11	根	0.18±0.02	0.26±0.06	0.22±0.03	0.16±0.04	4.07±0.50	0.28±0.07	0.07±0.02
	地上	0.09±0.01	0.12±0.02	0.09±0.01	0.08±0.02	2.57±0.33	0.11±0.02	0.08±0.01
S12	根	0.19±0.02	0.44±0.10	0.31±0.07	0.45±0.07	4.17±0.42	0.35±0.06	0.08±0.02
	地上	0.14±0.01	0.18±0.04	0.13±0.03	0.20±0.05	3.31±0.60	0.23±0.05	0.08±0.01
S13	根	0.17±0.02	0.17±0.02	0.24±0.06	0.19±0.03	4.32±0.77	0.43±0.07	0.07±0.02
	地上	0.10±0.03	0.17±0.05	0.10±0.03	0.11±0.02	3.19±0.38	0.12±0.01	0.04±0.00
S14	根	0.16±0.01	0.12±0.03	0.20±0.04	0.10±0.03	3.68±0.45	0.31±0.08	0.08±0.03
	地上	0.17±0.02	0.31±0.03	0.16±0.05	0.11±0.01	3.61±0.62	0.18±0.02	0.04±0.01
S15	根	0.09±0.02	0.07±0.01	0.27±0.05	0.70±0.09	2.63±0.37	0.30±0.05	0.09±0.02
	地上	0.05±0.01	0.11±0.02	0.08±0.01	0.08±0.01	0.13±0.03	0.08±0.01	0.08±0.01
S16	根	0.12±0.02	0.28±0.04	0.44±0.07	0.44±0.07	3.77±0.52	0.55±0.10	0.07±0.02
	地上	0.31±0.03	0.36±0.02	0.29±0.05	0.30±0.05	1.94±0.36	0.47±0.07	0.06±0.01
S17	根	0.19±0.01	0.61±0.13	0.44±0.09	1.10±0.20	5.08±0.92	0.69±0.10	0.07±0.02
	地上	0.49±0.04	0.74±0.15	0.57±0.09	0.49±0.03	3.16±0.61	0.42±0.10	0.05±0.01
S18	根	0.23±0.05	0.78±0.18	0.31±0.07	0.50±0.06	3.39±0.48	0.43±0.07	0.08±0.01
	地上	0.26±0.02	0.48±0.04	0.33±0.06	0.24±0.02	2.12±0.32	0.51±0.08	0.04±0.01
S19	根	0.21±0.03	0.62±0.07	0.44±0.07	0.45±0.04	3.15±0.60	0.33±0.09	0.08±0.02
	地上	0.44±0.02	0.53±0.09	0.58±0.08	0.40±0.08	2.85±0.65	0.37±0.08	0.05±0.01
S20	根	0.18±0.01	0.38±0.05	0.33±0.07	0.46±0.07	3.90±0.59	0.28±0.06	0.08±0.01
	地上	0.46±0.03	0.58±0.07	0.72±0.10	0.21±0.03	3.01±0.66	0.51±0.10	0.08±0.00
S21	根	0.11±0.02	0.15±0.02	0.15±0.07	0.43±0.08	4.85±0.68	0.18±0.05	0.07±0.01
	地上	0.09±0.01	0.19±0.06	0.08±0.01	0.12±0.02	2.81±0.78	0.22±0.09	0.08±0.01
S22	根	0.22±0.01	0.88±0.16	0.31±0.07	0.40±0.05	3.22±0.94	0.41±0.23	0.16±0.05
	地上	0.31±0.02	0.39±0.08	0.24±0.03	0.30±0.07	1.98±0.48	0.63±0.20	0.09±0.02
平均值/%	根	0.18	0.33	0.26	0.35	3.94	0.36	0.08
	地上	0.21	0.29	0.24	0.19	2.56	0.32	0.06
RSD/%	根	33.27	70.39	38.48	67.93	18.92	35.55	25.47
	地上	69.17	59.31	79.56	56.70	33.76	64.31	27.34

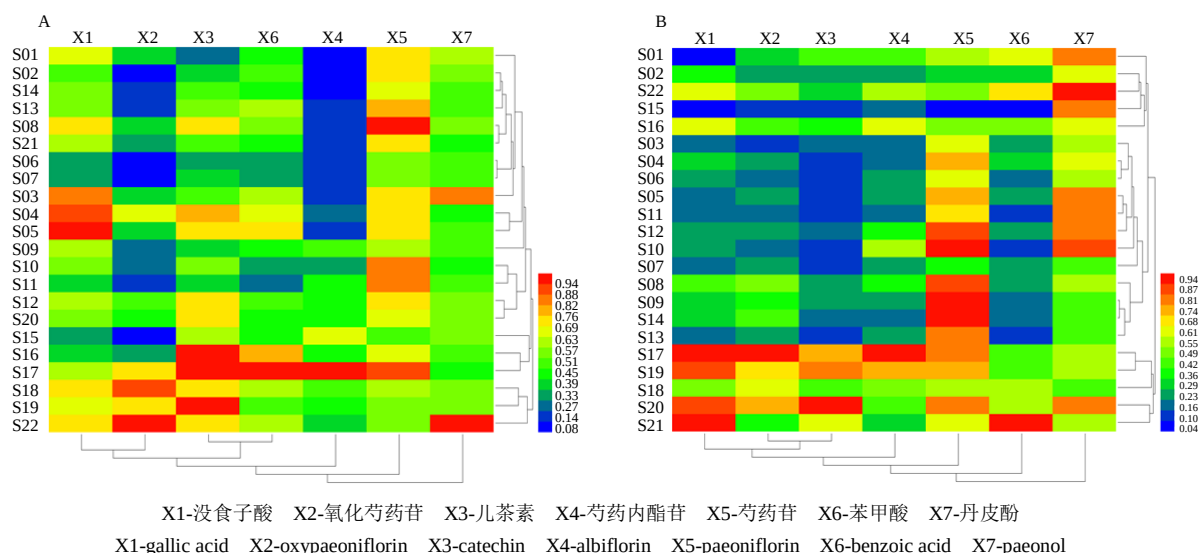


图 2 川赤芍根 (A) 和地上部分 (B) 中 7 种主要化学成分含量聚类热图

Fig. 2 Hierarchical clustering analysis and heat-map of content of seven reference substances in roots (A) and aerial parts (B) of *P. veitchii*

2.6 指纹图谱的建立与分析

中药色谱指纹图谱法是评价中药质量和稳定性的最优方法,具有综合、宏观、模糊等非线性特点^[16-18]。为了综合表征和评价各川赤芍样品的品质,故对各批次川赤芍样品建立色谱指纹图谱,从整体上分析其化学成分及其与产地等因素的关系。

2.6.1 指纹图谱的建立 分别将“2.5”项下 22 个产地的川赤芍根和地上部分的 HPLC 数据以 CDF 格式导入《2012 版中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件,分别以 G1 和 DS1 样品作为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度为 0.5,经过多点校正后,进行色谱峰的匹配,分别生成川赤芍根和地上部分的指纹图谱叠加图和对照图谱,分别见图 3 和 4。以 13 号峰作为对照峰,得到根和地上部分分别有 19 个共有峰,与对照品色谱图比对,共指认出 7 个共有峰,分别为没食子酸(3 号峰)、氧化芍药苷(6 号峰)、儿茶素(8 号峰)、芍药内酯苷(9 号峰)、芍药苷(10 号峰)、苯甲酸(15 号峰)、丹皮酚(18 号峰)。

2.6.2 相似度分析 利用《2012 版中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件分别对“2.6.1”项中川赤芍根和地上部分的色谱图与对照图谱进行相似度分析,结果见表 4。由表可知,22 批次川赤芍根样品中有 20 批次的相似度在 0.900~0.992,而 G11 和 G22 均低于 0.900,分别为 0.844 和 0.802;22 批次川赤芍地上部分样品中有 15 批次的相似度在 0.912~

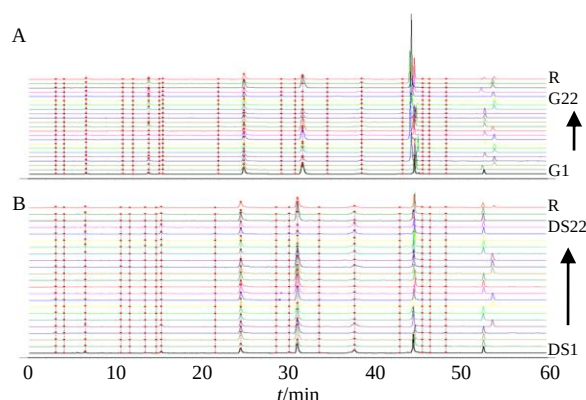


图 3 川赤芍根 (A) 和地上部分 (B) 指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprints of roots (A) and aerial parts (B) of *P. veitchii*

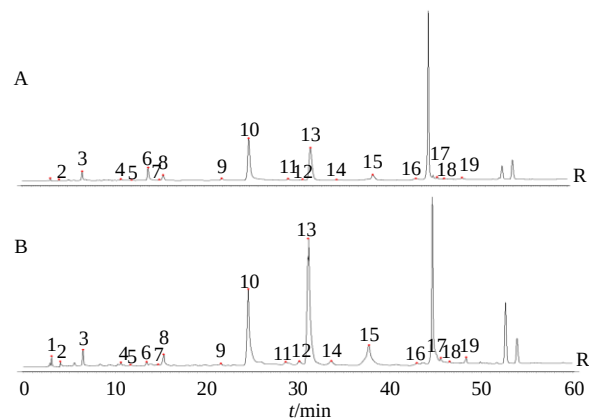


图 4 川赤芍根 (A) 和地上部分 (B) 对照指纹图谱

Fig. 4 Reference fingerprint of roots (A) and aerial parts (B) of *P. veitchii*

表 4 不同产地川赤芍相似度分析结果

Table 4 Similarity of *P. veitchii* from different habitats

编号	相似度	编号	相似度
G1	0.920	DS1	0.970
G2	0.977	DS2	0.988
G3	0.951	DS3	0.989
G4	0.986	DS4	0.966
G5	0.948	DS5	0.899
G6	0.945	DS6	0.995
G7	0.966	DS7	0.942
G8	0.956	DS8	0.965
G9	0.945	DS9	0.977
G10	0.992	DS10	0.965
G11	0.844	DS11	0.968
G12	0.911	DS12	0.978
G13	0.975	DS13	0.959
G14	0.944	DS14	0.978
G15	0.933	DS15	0.881
G16	0.915	DS16	0.784
G17	0.900	DS17	0.722
G18	0.919	DS18	0.912
G19	0.911	DS19	0.801
G20	0.927	DS20	0.755
G21	0.964	DS21	0.978
G22	0.802	DS22	0.811

0.995, 而 G5、G15~G17、G19、G20 和 G22 均低于 0.900, 分别为 0.899、0.881、0.784、0.722、0.801、0.755 和 0.811。说明各产地川赤芍根和地上部分的质量存在一定差异。

2.6.3 PCA 分析 采用 SPSS 23.0 软件, 以 19 个共有峰 (X1~X19) 峰面积为变量, 对川赤芍根、地上部分样品进行 PCA 分析, 川赤芍各样品主成分因子载荷矩阵、公因子方差、Norm 值以及主成分特征值、累积贡献率及主成分综合得分等分析结果见表 5。

川赤芍根中特征值>1 的主成分有 6 个, 累积贡献率为 83.4%, 总体上可以表征川赤芍根样本信息, 参考文献报道^[11, 19], 选取 6 个主成分中因子最大载荷矩阵值 10%范围内和最高 Norm 值 10%范围内的指标进入品质指标评价的最小数据库集 (minimum data set, MDS), 计算后选取共有峰 X1、X5、X6、X8、X10、X11、X17、X19 进入 MDS, 表明这些共有峰可以基本反映川赤芍根的品质信息。川赤芍地上部分中特征值>1 的主成分有 5 个, 累积贡献率为 82.623%, 基本可以反映川赤芍地上部分的品质信息, 计算后选取共有峰 X3、X4、X6、X7、X8、X10、X16、X18、X19 进入 MDS, 表明

这些共有峰可以基本反映川赤芍地上部分的品质信息。根据各样品主成分综合得分结果 (表 6), 川赤芍根的综合得分排名为 G17>G18>G4>G19>G5……G14>G7>G6, 表明康定市老榆林 (G17)、雅江县相格宗 (G18、G19)、阿坝县查理加油站 (G4)、若尔盖县巴西乡 (G5) 这 4 个产地的川赤芍根样品质量较好。川赤芍地上部分的综合得分排名为 DS19>DS17>DS20>DS16>DS18……DS1>DS2>DS12, 表明雅江县相格宗 (DS19)、康定市老榆林 (DS17)、雅江县麻格宗 (DS20)、康定市折多山 (DS16)、雅江县相格宗 (DS18) 这 5 个产地的川赤芍地上部分样品质量较好。

2.6.4 PLS-DA 分析 为了筛选引起川赤芍根和地上部分差异的标志性成分, 采用 SIMCA 14.0 软件分别对根和地上部分 HPLC 指纹图谱的共有峰峰面积 (X1~X19) 进行 PLS-DA 分析, 以 X1~X19 的 VIP 值>1 作为评价标准, 筛选引起差异的潜在化学成分。筛选结果 (图 5) 表明, 川赤芍根样品中共有峰 11、19、8、6、13、14、15、5、3 等的 VIP 值大于 1, 说明这些峰所代表的成分是造成不同产地川赤芍根样品差异的主要标志性物质。地上部分样品中色谱峰 15、3、8、11、16、19、17、6、9 等的 VIP 值大于 1, 说明这些峰所代表的成分是造成不同产地川赤芍地上部分样品差异的主要标志性物质。这些色谱峰中并不包含川赤芍的特征物质“芍药苷”, 表明芍药苷在样品采集地域中的含量稳定性较好, 这与含量测定结果中芍药苷含量的 RSD 值相对较小一致。

3 讨论

川赤芍为川产野生道地药材。在四川, 川赤芍主要分布在川西高原的甘孜州和阿坝州, 以往关于野生川赤芍质量评价的研究主要集中在川西高原上甘孜州康定县、道孚县、炉霍县、甘孜县及阿坝州汶川县和壤塘县, 以及一些未具体标注的地区^[10, 12, 19]。本研究对川西高原上阿坝州的马尔康县、阿坝县、若尔盖县、松潘县和黑水县以及甘孜州的康定市和雅江县的野生川赤芍进行了质量评价, 填补了这些川赤芍产区的数据空白, 为川产川赤芍药材的质量控制提供了更加全面的支撑。《中国药典》规定川赤芍干燥根茎中芍药苷含量 $\geq 1.8\%$, 而本研究川赤芍根茎中芍药苷含量均 $\geq 1.8\%$, 这与前人对四川省其他区域的检测结果一致^[11, 13, 20], 表明川产野生川赤芍根中芍药苷的含量符合药典规定。

表 5 川赤芍根和地上部分样品 PCA 结果

Table 5 Results of principal component analysis in roots and aerial parts of *P. veitchii*

共有峰	根								地上部分							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	公因子方差	Norm 值	F1	F2	F3	F4	F5	公因子方差	Norm 值	
X1	0.261	0.781	0.207	0.145	-0.423	-0.180	0.953	1.615	-0.197	0.659	0.021	0.423	0.286	0.734	1.501	
X2	-0.289	0.404	0.139	0.328	-0.429	-0.593	0.910	1.374	-0.118	0.494	0.427	0.263	0.214	0.555	1.214	
X3	0.727	0.441	-0.033	-0.435	0.078	-0.199	0.959	2.129	0.968	0.113	0.011	0.057	-0.095	0.961	2.682	
X4	0.018	0.220	0.097	-0.673	0.454	-0.175	0.747	1.118	-0.139	0.808	-0.134	-0.482	0.096	0.932	1.710	
X5	0.820	0.358	0.218	-0.101	-0.148	0.138	0.900	2.266	0.475	0.674	-0.159	-0.234	-0.206	0.803	1.888	
X6	0.902	-0.018	-0.009	0.041	-0.165	0.203	0.885	2.381	0.887	0.199	-0.186	-0.179	0.242	0.952	2.513	
X7	-0.606	0.455	-0.021	0.246	0.104	0.057	0.649	1.795	0.044	0.800	0.208	-0.089	0.088	0.700	1.570	
X8	0.849	-0.257	0.031	0.195	0.191	-0.193	0.900	2.300	0.938	0.110	-0.101	0.026	-0.107	0.915	2.603	
X9	0.575	-0.371	0.308	0.454	0.091	0.140	0.798	1.792	0.809	-0.118	0.118	-0.103	0.463	0.908	2.311	
X10	0.134	0.466	0.389	-0.039	0.488	0.134	0.644	1.193	-0.210	-0.042	-0.442	0.629	0.402	0.799	1.204	
X11	0.851	0.117	-0.322	0.277	0.062	-0.021	0.922	2.311	0.846	0.158	0.115	0.208	-0.287	0.879	2.393	
X12	-0.410	0.537	-0.335	0.225	0.373	-0.092	0.767	1.579	0.359	0.643	0.398	0.342	-0.217	0.864	1.733	
X13	-0.602	0.345	0.583	-0.097	-0.056	0.290	0.918	1.896	-0.580	0.401	0.358	-0.297	0.276	0.790	1.896	
X14	0.462	0.322	-0.473	0.397	0.202	0.220	0.788	1.602	0.291	-0.353	0.711	0.093	0.273	0.798	1.443	
X15	0.785	-0.102	-0.007	-0.053	0.232	-0.289	0.767	2.105	0.764	-0.037	0.150	0.304	-0.350	0.824	2.185	
X16	-0.086	0.642	-0.497	0.016	0.083	0.252	0.738	1.330	0.864	-0.261	0.048	-0.049	0.317	0.919	2.463	
X17	0.521	0.247	0.666	0.202	0.000	0.208	0.861	1.737	0.790	-0.246	-0.190	-0.093	0.295	0.816	2.271	
X18	0.207	0.065	-0.364	-0.400	-0.620	0.291	0.809	1.231	0.026	-0.558	0.573	-0.251	-0.092	0.711	1.349	
X19	0.921	0.139	-0.037	-0.224	-0.107	-0.045	0.933	2.445	0.888	0.084	-0.110	-0.169	0.045	0.839	2.468	
主成分特征值	6.860	2.806	1.971	1.637	1.560	1.011			7.612	3.677	1.729	1.438	1.243			
主成分贡献率/%	36.105	14.768	10.375	8.616	8.212	5.324			40.061	19.354	9.098	7.570	6.540			
主成分累积贡献率/%	36.105	50.873	61.248	69.864	78.076	83.400			40.061	59.415	68.513	76.083	82.623			

表 6 川赤芍根和地上部分主成分综合得分分析结果

Table 6 Results of comprehensive score of principal component analysis in roots and aerial parts of *P. veitchii*

编号	主成分		编号	主成分	
	F 值	排名		F 值	排名
G1	0.357	9	DS1	-1.035	20
G2	-1.429	19	DS2	-1.259	21
G3	0.313	10	DS3	0.088	9
G4	1.312	3	DS4	-0.858	18
G5	0.988	5	DS5	-0.303	12
G6	-2.220	22	DS6	-0.498	14
G7	-2.108	21	DS7	-0.110	11
G8	0.237	11	DS8	-0.370	13
G9	-0.372	15	DS9	0.175	8
G10	-0.581	16	DS10	-0.851	17
G11	-0.038	13	DS11	-0.829	16
G12	0.800	7	DS12	-1.531	22
G13	-0.178	14	DS13	0.052	10
G14	-1.474	20	DS14	-0.648	15
G15	-1.280	18	DS15	0.253	7
G16	0.062	12	DS16	1.246	4
G17	2.139	1	DS17	2.148	2
G18	1.957	2	DS18	1.060	5
G19	1.040	4	DS19	2.288	1
G20	0.422	8	DS20	1.411	3
G21	-0.751	17	DS21	-0.977	19
G22	0.807	6	DS22	0.549	6

药理研究表明,川赤芍中芍药苷、没食子酸及它们的衍生物等物质是川赤芍中的主要活性成分,具有镇静、镇痛、扩张血管、抗炎、抗溃疡、抗癌、抗病毒等生物活性^[20-22],本研究对川赤芍地上部分的检测结果中,芍药苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸等活性成分均被检测到,其中芍药苷的平均含量高达 2.56%;此外,传统入药部位“根茎”和“地上部分”的指纹图分析结果显示,川赤芍地下部分和地上部分的化学成分种类几乎一致。以上结果表明川赤芍地上部分存在潜在的药用价值,有待进一步的资源综合开发利用,如兽药或日化品等。

本研究建立的指纹图谱共匹配出 19 个共有峰,并指出其中的 7 个(芍药苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸、儿茶素、丹皮酚和苯甲酸),均是迄今已有川赤芍指纹图谱中最多的,表明本研究建立的高效液相色谱的分离分析方法最适合川赤芍的指纹图谱研究。相似度分析结果表明各产地川赤芍根和地上部分的相似度分别在 0.802~0.992 和 0.722~0.995,说明各产地川赤芍的化学成分存在一定差异,这与 Yuan 等^[7]发现生态因子(年平均气温、海拔、全钾和有机质含量)对川赤芍中没食子酸、

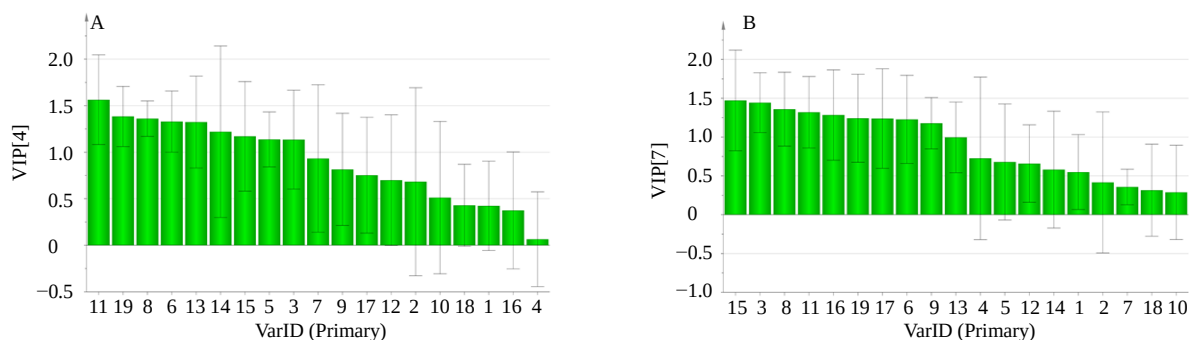


图 5 川赤芍根 (A) 和地上部分 (B) 的 HPLC 指纹图谱共有色谱峰的 PLS-DA VIP 值

Fig. 5 VIP values of common peaks of HPLC fingerprints from roots (A) and aerial parts of *P. veitchii* using PLS-DA method

苯甲酰芍药苷、芍药苷等成分的含量有重要影响的结论一致。此外，基于上述 7 个化学成分含量的聚类热图分析结果显示，川赤芍存在明显的区域一致性特征，这可能是这些区域的生态因子相对一致导致的，进一步支持了 Yuan 等^[6]的研究结果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hong D Y. Peonies of the world: Taxonomy and phytochemistry [M]. London: Royal Botanic Gardens, 2010.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 87.
- [3] Zhang Y, Liu P, Gao J Y, et al. *Paeonia veitchii* seeds as a promising high potential by-product: Proximate composition, phytochemical components, bioactivity evaluation and potential applications [J]. *Ind Crops Prod*, 2018, 125: 248-260.
- [4] 张海生. 基于多层次相互作用网络的赤芍抗肿瘤、抗氧化及降血脂协同作用药效成分的筛选 [D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
- [5] Shi Y H, Zhu S, Ge Y W, et al. Monoterpene derivatives with anti-allergic activity from red peony root, the root of *Paeonia lactiflora* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 108: 55-61.
- [6] Yuan M, Yan Z G, Sun D Y, et al. New insights into the impact of ecological factor on bioactivities and phytochemical composition of *Paeonia veitchii* [J]. *Chem Biodivers*, 2020, 17(12): e2000813.
- [7] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第二十七卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [8] 简在友, 王文全, 俞敬波. 赤芍野生资源调查及可持续利用技术途径探讨 [J]. *中国现代中药*, 2010, 12(5): 10-11.
- [9] 向楚兵, 刘友平, 陈鸿平, 等. 赤芍二萜源药材的 HPLC 指纹图谱鉴别及质量评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23): 43-48.
- [10] 钟海蓉, 张绍山, 肖芳, 等. 基于 UPLC 法测定指标成分结合指纹图谱评价不同产地川赤芍不同部位的质量 [J]. *中草药*, 2021, 52(7): 2062-2071.
- [11] 付士朋, 沈宏伟, 王谦博, 等. 指纹图谱结合灰色关联度分析法对不同产地赤芍质量的评价研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(23): 5865-5871.
- [12] 孙冬梅, 陈秋谷, 毕晓黎, 等. 二萜原赤芍 HPLC 指纹图谱的建立和 5 种成分的含量测定 [J]. *中药材*, 2018, 41(4): 898-903.
- [13] Moon J Y, Jung H J, Moon M H, et al. Heat-map visualization of gas chromatography-mass spectrometry based quantitative signatures on steroid metabolism [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20(9): 1626-1637.
- [14] 瞿城, 唐于平, 史旭芹, 等. 基于化学计量学和多指标综合指数法比较研究丹参-红花药对在不同制法活血化瘀作用 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(15): 3017-3025.
- [15] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 231-237.
- [16] Xie P S, Chen S B, Liang Y Z, et al. Chromatographic fingerprint analysis: A rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1112(1/2): 171-180.
- [17] Wagner H, Bauer R, Melchart D, et al. *Radix et Rhizoma Asari—Xixin* [A] // *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines* [C]. Vienna: Springer Vienna, 2011: 45-57.
- [18] 杨正明. 川产道地药材江油附子和川乌品质及其与土壤养分相关性研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- [19] 余捷婧, 吴金雄, 梁亚凤, 等. HPLC 同时测定赤芍和白芍中没食子酸等 6 种成分的量 [J]. *中草药*, 2015, 46(11): 1673-1677.
- [20] Zheng Y Q, Wei W, Zhu L, et al. Effects and mechanisms of Paeoniflorin, a bioactive glucoside from peony root, on adjuvant arthritis in rats [J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(5): 182-188.
- [21] Wang D, Tan Q R, Zhang Z J. Neuroprotective effects of paeoniflorin, but not the isomer albiflorin, are associated with the suppression of intracellular calcium and calcium/calmodulin protein kinase II in PC12 cells [J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 51(2): 581-590.
- [22] 陆小华, 马骁, 王建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 595-602.

[责任编辑 时圣明]