

• 药剂与工艺 •

基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的川芎炮制前后对比研究

裴科¹, 宁燕¹, 蔡皓^{2*}, 郭帅¹, 张秋月¹, 曹丽琬¹, 赵婷婷¹, 曹岗³, 张朔生¹, 王颖莉^{1*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西省现代中药工程实验室, 山西 晋中 030619

2. 南京中医药大学药学院, 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023

3. 浙江中医药大学药学院, 中药炮制研究中心, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 建立川芎生品和不同炮制程度的酒炙品 HPLC 指纹图谱, 通过指纹图谱动态变化, 从客观上确认最佳炮制时间, 同时结合化学模式识别方法比较酒炙前后化学成分指纹峰的差异, 寻找差异标志物, 为川芎的炮制工艺优化及炮制机制研究提供科学依据。方法 采用 HPLC 法, Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.3%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min, 全波长扫描, 检测波长 254 nm。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 计算相似度, 运用聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 对川芎生品与酒炙品进行化学模式识别研究。结果 建立了川芎生品和不同炮制程度酒炙品的指纹图谱, 共标定 22 个共有峰, 通过与对照品比对, 指认了 6 个成分, 分别为阿魏酸 (7 号峰)、洋川芎内酯 I (8 号峰)、阿魏酸松柏酯 (15 号峰)、洋川芎内酯 A (17 号峰)、藁本内酯 (19 号峰) 和丁烯基苯酞 (20 号峰); 通过指纹图谱动态变化监测, 确定了最佳炮制时间为 15~20 min; 通过 HCA、PCA 和 OPLS-DA 可明显将川芎生品与酒炙品分为 2 类, 藁本内酯、丁烯基苯酞等 6 个成分可能是影响二者质量的差异标志物。结论 建立的指纹图谱方法精密性、重复性、稳定性良好, 结合化学模式识别可用于川芎炮制前后整体质量控制, 进行炮制过程监测和炮制程度判断。

关键词: 川芎; 酒炙; 指纹图谱; HPLC; 化学模式识别; 差异标志物; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 藁本内酯; 丁烯基苯酞; 质量控制; 过程监测

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)05-1274-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.05.007

Comparative study of *Chuanxiong Rhizoma* before and after processing based on HPLC fingerprints combined with chemical pattern recognition

PEI Ke¹, NING Yan¹, CAI Hao², GUO Shuai¹, ZHANG Qiu-yue¹, CAO Li-long¹, ZHAO Ting-ting¹, CAO Gang³, ZHANG Shuo-sheng¹, WANG Ying-li¹

1. Shanxi Modern Chinese Medicine Engineering Laboratory, College of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Engineering Research Center for Standardization and Standardization of Chinese Medicine Processing, Ministry of Education, College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Research Center of TCM Processing Technology, College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

收稿日期: 2020-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703704); 国家自然科学基金资助项目 (81673600); 浙江省重点建设高校优势特色学科 (中药学) 开放基金项目 (ZYAOX2018023); 山西省应用基础研究项目 (201801D221436); 山西省脑病重点实验室开放课题 (CME-OP-201003); 山西省教育厅科技创新计划项目 (2019L0720); 山西省“1331”工程项目 (中药微乳与生物新制剂研发平台); 山西中医药大学研究生创新项目 (2020CX042)

作者简介: 裴科 (1986—), 女, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药炮制及中药分析。Tel: 18734116157 E-mail: peike_pk@126.com

***通信作者:** 蔡皓 (1966—), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事炮制机制及炮制配伍研究。E-mail: haocai_98@126.com

王颖莉 (1967—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: wyl@sxtcm.edu.cn

Abstract: Objective HPLC fingerprints of raw and processed *Chuanxiong Rhizoma* under different processing degrees were established. The dynamically changing of fingerprints could help to confirm the best processing time from an objective point of view, meanwhile chemical pattern recognition methods were combined to compare the differences of chemical components before and after processing, which provided scientific basis for the process optimization and processing mechanism of *Chuanxiong Rhizoma*. **Methods** A HPLC method was established on a Hypersil Gold C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.3% formic acid as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.8 mL/min, meanwhile, full wavelength scanning was used and chromatogram fingerprints was established at 254 nm. The fingerprints of raw and processed *Chuanxiong Rhizoma* were determined respectively and analyzed by the software of “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine”. The discriminant analysis of hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were employed to distinguish raw and wine processed *Chuanxiong Rhizoma*. **Results** The fingerprints of raw and processed *Chuanxiong Rhizoma* under different processing degrees were established, a total of 22 common peaks were marked. By comparison with the standard, six ingredients were identified, they were ferulic acid (F7), senkyunolide I (F8), coniferyl ferulate (F15), senkyunolide A (F17), ligustilide (F19) and butylidenephthalide (F20), respectively. The results of dynamically changing fingerprints showed that the optimal processing time was 15—20 min. The results of HCA, PCA and OPLS-DA demonstrated that there were obvious distinctions between raw and wine processed *Chuanxiong Rhizoma*. Six components containing ligustilide and butylidenephthalide may be the markers of quality difference between them. **Conclusion** The established fingerprint method is accurate, repeatable and reliable. Furthermore, combined with chemical pattern recognition, it could be used for the overall quality control of *Chuanxiong Rhizoma* before and after processing, and also could be used for processing monitoring and judgment.

Key words: *Chuanxiong Rhizoma*; processing with wine; fingerprint; HPLC; chemical pattern recognition; differential marker; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares discrimination analysis; ligustilide; butylidenephthalide; quality control; process monitoring

川芎 (*Chuanxiong Rhizoma*, CR) 为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 性温味辛^[1], 始载于《神农本草经》, 被列为上品, 具有活血行气、祛风止痛的功效。现代研究表明, 川芎具有保护心脑血管^[2]、抗肿瘤^[3]、抗炎^[4]、抗氧化^[5]、保护神经系统^[6]等药理作用, 主要含有苯酞类^[7]、生物碱类、有机酚酸及其酯类、多糖类等成分^[8]。现《中国药典》收载的川芎饮片为生品川芎 (raw *Chuanxiong Rhizoma*, rCR), 然而川芎的炮制历史悠久, 据本草考证, 酒炙川芎 (wine processed *Chuanxiong Rhizoma*, wpCR) 自宋代以来一直沿用至今, 酒炙能引药上行, 增强川芎活血行气、散瘀止痛的作用^[9-10]。川芎炮制后化学成分的变化是药效变化的重要因素^[11-12]。有关川芎的炮制方法及炮制品的质量标准, 《中国药典》还未进行收载, 而且在《全国中药炮制规范》和各省、市、自治区的中药饮片炮制规范中对于川芎酒炙品的制备也只是简单表述, 如黄酒拌匀, 闷透, 文火炒干。此外各地对于川芎酒炙过程中的监测指标及工艺的具体量化参数也没有统一标准。本研究根据“文火”的温度规定 (80~120 °C) 以及前期条件的摸索, 发现在实验条件下, 100 °C 下炒制酒川芎, 不易出现外焦

里湿现象, 且能达到饮片炒干颜色加深的效果。因此本实验的炮制不同程度均指 100 °C 下的不同炒制程度。

中药指纹图谱技术是一种有效的中药质量评价方法, 已被国内外广泛认可^[13-14]。模式识别技术 (pattern recognition) 是化学计量学的重要组成部分, 也是筛选中药质量标志物 (Q-markers) 的重要多元统计方法^[15]。指纹图谱结合模式识别可有效对中药炮制前后的生品及制品进行判别分析和质量评价, 并筛选出质量差异性成分^[16-17]。

关于川芎药材指纹图谱的研究已有报道^[18-20], 但通过指纹图谱方法对川芎的炮制程度进行质量控制, 并结合多元统计分析对生品和炮制品建模, 且应用于炮制程度的判断还未见报道。本实验利用 HPLC 法建立了川芎生品及不同程度炮制品的指纹图谱, 对炮制前后的 HPLC 指纹图谱进行对比, 从整体水平表征炮制前后化学成分发生的变化。同时利用聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等模式识别方法, 对生品和炮制品进行识别归类, 并筛

选导致二者差异性的主要标志物，为规范川芎炮制工艺提供新的视角，并为炮制品质量评价提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

e2695 高效液相色谱仪，包括 2998 型 PDA 检测器，Empower 工作站，美国 Waters 公司；Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），赛默飞世尔科技有限公司；HC-2518 高速离心机，安徽中科中佳科学仪器有限公司；EX225D 十万分之一电子天平，上海奥豪斯仪器有限公司。

1.2 试剂

对照品阿魏酸（批号 110773-201614，质量分数 99.0%）购自中国食品药品检定研究院；对照品丁烯基苯酞（批号 D-057-180321）、藁本内酯（批号 G-010-171216）、洋川芎内酯 A（批号 Y-083-181011）、洋川芎内酯 I（批号 Y-085-181011）、阿魏酸松柏酯（批号 A-001-171103），质量分数均>98.0%，均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。雕王黄酒（批号 GBIT13662，酒精度 12%），绍兴吴越酿酒有限公司。甲醇、乙腈均为色谱纯，赛默飞世尔科技有限公司；水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

1.3 试药

13 批生品川芎产地均为四川，来源于安国市万顺达药材行，批号分别为 20190516、20190522、20190613、20190715、20190803、20190814、20190825、20190912、20190919、20191001、20191021、20191213、20191227，分别编号为 rCR1~rCR13，其中 10 批 rCR1~rCR10 用来建立指纹图谱，并进行 HCA、PCA 建模以及 OPLS-DA 等，3 批 rCR11~rCR13 用来进行 PCA 模型的预测；制备上述生川芎对应的最佳炮制时间下的酒川芎，分别编号为 wpCR1~wpCR13，其中 10 批 wpCR1~wpCR10 用来建立指纹图谱，并进行 HCA、PCA 建模以及 OPLS-DA 等，3 批 wpCR11~wpCR13 用来进行 PCA 模型的预测；将批号为 20191021、20191213、20191227 的生川芎饮片分别制备炮制程度不及（炮制时间为 10 min）样品，编号分别为 wpCR11'~wpCR13'，以及炮制程度过度（炮制时间为 30 min）样品，编号分别为 wpCR14'~wpCR16'，用来进行炮制过程中炮制程度的建模控制。5 批市售酒川芎（marketed wine processed

Chuanxiong Rhizoma, mwpCR）产地也为四川，3 批来源于亳州市谯城区康美中药材交易中心，批号分别为 20201111、20201120、20201016，1 批来源于安徽广和中药股份有限公司，批号为 200618，1 批来源于揭阳市普宁市康美市场，批号为 20200806，分别编号为 mwpCR1~mwpCR5。植物基原经山西中医药大学中药与食品工程学院山西省现代中药工程实验室张朔生教授鉴定，均为伞形科藁本属植物川芎 *L. chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。

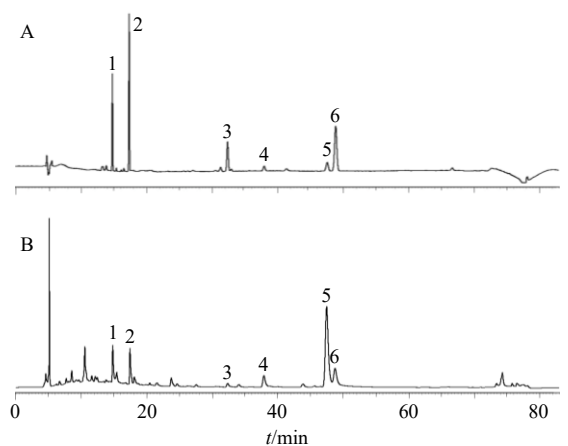
2 方法与结果

2.1 色谱条件

Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈-0.3%甲酸水溶液，梯度洗脱：0~10 min，5%~30%乙腈；10~16 min，30%~40%乙腈；16~19 min，40%乙腈；19~60 min，40%~55%乙腈；60~64 min，55%~60%乙腈；64~68 min，60%乙腈；68~72 min，60%~90%乙腈；72~73 min，90%~100%乙腈；73~78 min，100%~5%乙腈；78~83 min，5%乙腈；检测波长 254 nm；体积流量 0.8 mL/min；柱温 25 °C；进样量 10 μL。混合对照品及代表性样品（批号 20190516）色谱图见图 1。

2.2 酒炙川芎样品的制备

称取生川芎饮片约 200 g，加入黄酒拌匀，闷润至酒尽药透并分为 7 份，其中 1 份不经过加热炒制，在室温晾干（编号 wpCR0min），其余 6 份置于



1-阿魏酸 2-洋川芎内酯 I 3-阿魏酸松柏酯 4-洋川芎内酯 A
5-藁本内酯 6-丁烯基苯酞
1-ferulic acid 2-senkyunolide I 3-coniferyl ferulate
4-senkyunolide A 5-ligustilide 6-butylenephthalide

图 1 混合对照品 (A) 及川芎酒炙品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substances (A) and wine processed *Chuanxiong Rhizoma* (B)

100 ℃炒制容器中分别炒制 5、10、15、20、25、30 min, 取出放凉备用(相对应的酒炙川芎编号为 wpCR5min、wpCR10min、wpCR15min、wpCR20min、wpCR25min、wpCR30min)。不同炒制程度样品各制备 10 批。

2.3 对照品及供试品溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 取丁烯基苯酐、藁本内酯、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 I、阿魏酸、阿魏酸松柏酯对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释, 摇匀, 得到质量浓度分别为 14.15、10.44、13.10、17.95、13.35、16.05 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 精密称取川芎生品及不同炮制品粗粉各约 25 g, 置于 1000 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 90%乙醇溶液 500 mL, 浸泡 30 min, 加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 摇匀, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩, 定容至 50 mL 量瓶中, 精密量取 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度。进样前 13 000 r/min 离心 20 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份生川芎供试品(批号 20190516)溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。结果表明, 以保留时间、峰面积均适中且分离度较好的藁本内酯为参照峰, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均<3%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批生川芎样品(批号 20190516), 按“2.3.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果表明, 以藁本内酯为参照峰, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均<3%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份生川芎供试品(批号 20190516)溶液, 分别于制备后 0、2、4、6、8、16、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果表明, 以藁本内酯为参照峰, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均<3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立与分析

2.5.1 最佳炒制时间的确定 将“2.3.1”项下方法制备的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图; 将 10 批川芎生品及炒制不同时间的炮制品, 分别按“2.3.2”项下方法制备供试

品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 记录色谱图。将 10 批生品和不同炮制时间炮制品各 10 批的指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版)”软件, 采用中位数矢量法进行多点校正, 生成川芎生品及不同炮制程度酒炙品的对照指纹图谱, 结果见图 2。结果发现 9 个色谱峰响应值较大(占共有指纹峰面积的 80%), 且分离度较好, 将其作为共有色谱峰。随着炮制程度的改变, 其峰面积也发生改变。

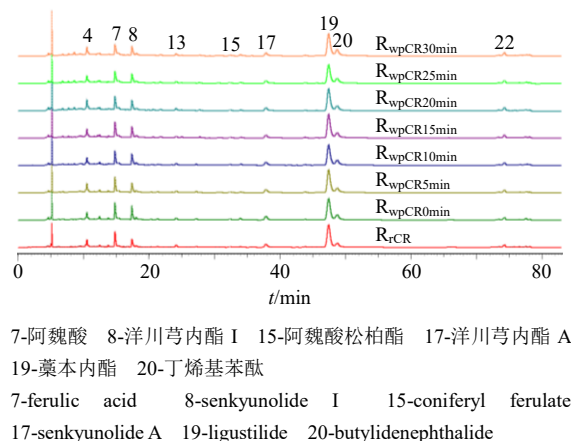


图 2 川芎生品及不同程度炮制品 HPLC 对照指纹图谱
Fig. 2 HPLC control fingerprints of *Chuanxiong Rhizoma* of raw and processed products at different degrees

将川芎生品及炮制品进行对比, 分别比较这 9 个共有色谱峰在生品及不同炮制品中的峰面积, 结果见表 1。随着炒制时间的延长, 除 17 号峰逐渐降低外, 其余峰多在 15~20 min 达到最大峰面积, 说明多数成分在炒制 15~20 min 时含量最大, 因此, 15~20 min 为最佳的炮制时间。以下生品川芎、酒炙品川芎指纹图谱比较分析、HCA、PCA 中的酒炙川芎均指炒制 20 min 下的川芎。

经与对照品比对, 指认出 6 个成分, 其中 7 号峰为阿魏酸, 8 号峰为洋川芎内酯 I, 15 号峰为阿魏酸松柏酯, 17 号峰为洋川芎内酯 A, 19 号峰为藁本内酯, 20 号峰为丁烯基苯酐。

2.5.2 川芎生品与酒炙品指纹图谱的比较 在最佳炮制时间确定的基础上, 本实验建立了川芎生品、酒炙品的指纹图谱并生成了各自的对照指纹图谱, 见图 3。生品指纹图谱标定了 19 个共有峰, 酒炙品标定了 20 个共有峰, 对所有共有峰编号并进行生品和酒炙品的比较。由二者的对照指纹图谱结合峰面积可知, 川芎经酒炙以后, 1~3 号峰为新检出色谱峰, 4、8(洋川芎内酯 I)、12、15(阿魏酸松柏酯)、

表 1 9 个指纹峰在川芎生品及不同炮制程度下酒炙品中的峰面积 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 Peak area of nine fingerprint peaks of *Chuanxiong Rhizoma* between raw and processed products at different processing degrees ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

峰号	峰面积			
	rCR	wpCR0min	wpCR5min	wpCR10min
4	897 746.2±162 199.8	995 468.3±135 420.9	1 181 545.4±229 167.7**	1 036 835.4±246 356.7
7	1 710 179.8±196 756.4	1 916 062.8±122 240.0*	1 768 630.7±213 696.9	1 807 539.4±144 483.0
8	1 341 837.1±97 962.2	1 518 012.6±152 002.2**	1 211 124.5±35 288.5**	1 527 409.2±92 622.9**
13	400 304.0±11 359.1	359 417.6±50 496.6*	317 109.8±93 587.9*	323 881.2±55 303.6**
15	209 184.6±62 542.2	222 238.0±6 356.9	216 305.2±33 740.4	247 006.4±24 402.0
17	941 800.1±124 061.2	985 487.4±132 843.2	925 339.6±73 253.5	876 019.1±156 326.7
19	6 912 455.7±927 359.9	6 719 164.7±391 452.1	7 068 139.7±1 221 254.0	6 344 215.5±242 050.6
20	1 817 607.9±265 369.0	1 802 105.9±226 549.3	1 558 787.2±115 934.8*	1 874 489.7±208 827.5
22	628 727.4±120 241.9	580 840.1±43 149.5	581 759.4±106 553.6	575 239.8±39 413.4

峰号	峰面积			
	wpCR15min	wpCR20min	wpCR25min	wpCR30min
4	1 289 916.4±253 443.9**	1 578 546.1±410 255.3**	908 832.8±188 411.9	1 480 660.7±314 192.4**
7	2 042 056.3±113 106.3**	1 781 396.4±264 463.1	1 397 926.2±118 631.4	1 834 371.1±203 602.1
8	1 861 399.2±240 334.6	1 356 227.2±107 028.6	1 289 924.5±358 803.8	1 317 435.5±449 963.8
13	301 671.2±51 769.2**	445 865.0±24 597.1**	352 077.1±32 956.8**	409 316.8±13 885.6
15	216 800.6±29 909.0	259 885.1±17 321.7*	216 200.3±61 591.0	234 090.3±62 420.3
17	811 084.5±104 353.8*	913 711.2±109 187.6	800 171.8±193 880.6	783 937.8±171 472.3*
19	7 302 510.7±516 312.0	6 861 068.1±291 437.1	5 959 126.0±804 666.5*	5 374 766.4±1 084 836.2**
20	1 960 608.2±217 992.2	1 759 509.4±109 521.4	1 833 330.1±433 787.7	1 433 020.4±395 260.1*
22	647 255.3±61 526.5	808 402.2±102 451.9**	658 737.0±48 194.0	732 714.3±92 909.5*

与 rCR 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs rCR

22 号峰的峰面积增加, 5、6、13 号峰的峰面积降低甚至消失。

将 10 批川芎生品及酒炙品指纹图谱分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版)”软件, 计算各批次样品指纹图谱与各自生成的对照图谱的相似度, 其相似度结果见表 2。由表可知, 10 批川芎生品指纹图谱以及 10 批川芎酒炙品指纹图谱的相似度均较好, 均在 0.98 以上。

2.6 化学模式识别研究

2.6.1 HCA 以生川芎和酒川芎共有峰的相对峰面积为变量, 导入 SPSS 26.0 统计软件进行聚类分析。Z 标准化后采用瓦尔德法, 以平方欧式距离作为样品相似度的距离公式, 结果见图 4。聚类分析结果表明, 当平方欧式距离为 10 时, 川芎样品可分为 2 类, rCR1~rCR10 号川芎生品聚为一类, wpCR1~wpCR10 号酒炙品聚为一类。说明川芎生

品与酒炙品的化学指纹峰差异, 可以采用聚类方式进行识别, 并进行分类。

2.6.2 PCA 将 10 批生川芎和酒川芎作为研究对象, 把共有峰的相对峰面积作为变量导入 SIMCA 14.1 统计软件进行无监督模式的 PCA 建模, 分析结果见图 5。由图 5 可知, 生川芎和酒川芎沿着 t1 轴方向各自聚为一类, 生川芎位于得分图的左边, 酒川芎位于得分图的右边, 与聚类分析结果相互佐证, 说明炮制处理对川芎化学成分的总体特征构成了明显影响。前 5 个主成分的累积贡献率 R^2_x 达到 93.842%, 预测能力参数 Q^2 为 0.754, 说明该模型的拟合程度和预测程度都较好, 通过 PCA 降维处理后所提取的主成分能反映川芎指纹图谱中 22 个共有峰的主要信息。成分载荷矩阵可说明各个变量对主成分的贡献率, 载荷的绝对值越大, 对主成分的贡献越大, 主成分载荷矩阵见表 3。第 1 主成分

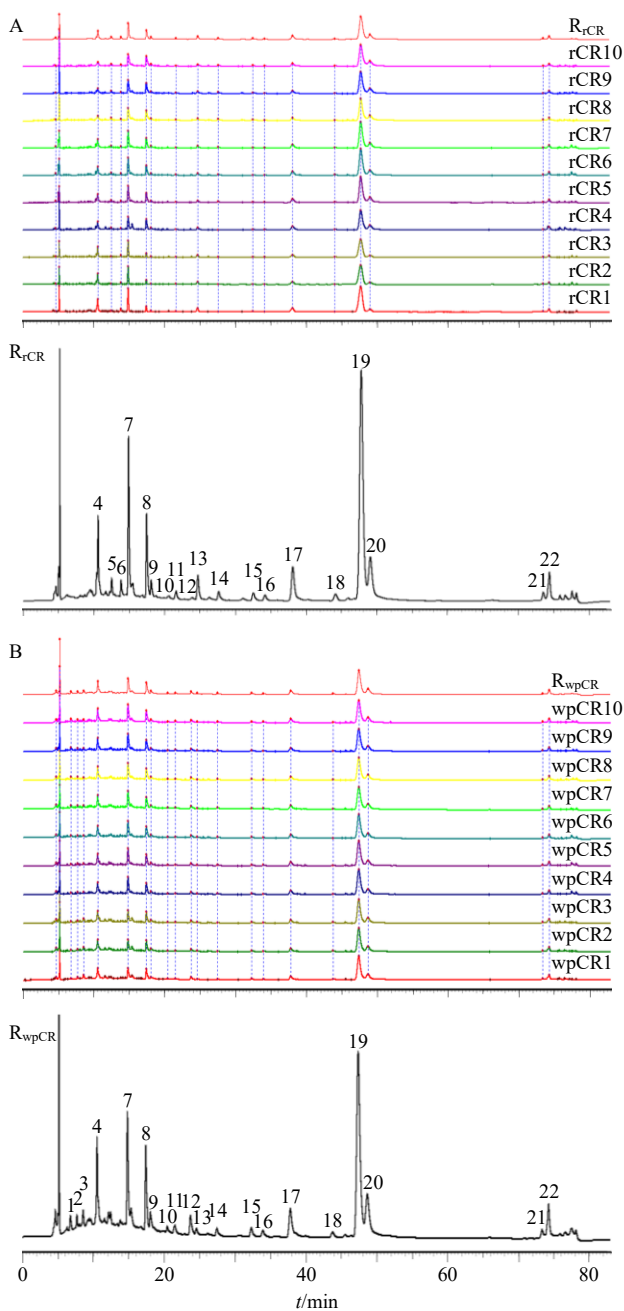


图 3 10 批生川芎 HPLC 指纹图谱 (A) 及其对照指纹图谱 (R_{rCR}) 和 10 批酒炙川芎 HPLC 指纹图谱 (B) 及其对照指纹图谱 (R_{wpCR})

Fig. 3 HPLC fingerprints (A) and control fingerprints (R_{rCR}) of 10 batches of raw *Chuanxiong Rhizoma*, and HPLC fingerprints (B) and control fingerprints (R_{wpCR}) of 10 batches of wine processed *Chuanxiong Rhizoma*

(PC1) 信息量最大, 独立贡献率为 50.771%, 峰 12 (0.296)、峰 1 (0.295)、峰 13 (-0.293)、峰 2 (0.289) 和峰 3 (0.289) 载荷值较大。第 2 主成分 (PC2) 独立贡献率为 20.253%, 峰 15 (0.376)、峰 18 (-0.356)、峰 11 (0.298)、峰 4 (-0.295) 和峰 22

表 2 10 批川芎生品和酒炙品指纹图谱相似度结果
Table 2 Fingerprint similarity results of 10 batches raw and wine processed *Chuanxiong Rhizoma*

编号	相似度		编号	相似度	
	生川芎	酒川芎		生川芎	酒川芎
1	0.987	0.987	6	0.997	0.997
2	0.988	0.989	7	0.997	0.997
3	0.988	0.989	8	0.993	0.995
4	0.984	0.996	9	0.992	0.995
5	0.997	0.996	10	0.991	0.994

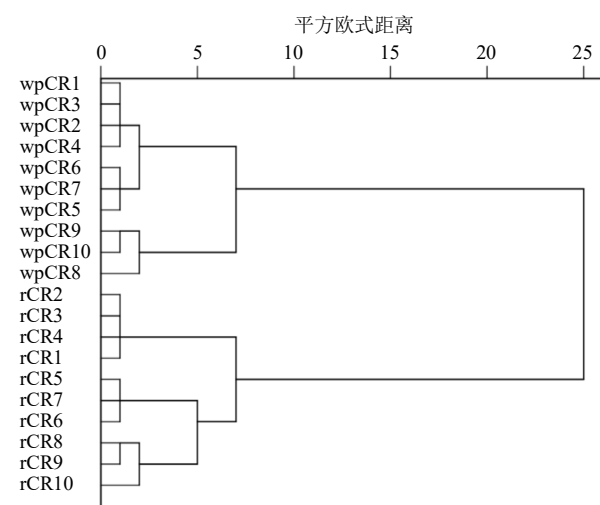


图 4 川芎生品和酒炙品聚类分析

Fig. 4 HCA of raw and wine processed *Chuanxiong Rhizoma*

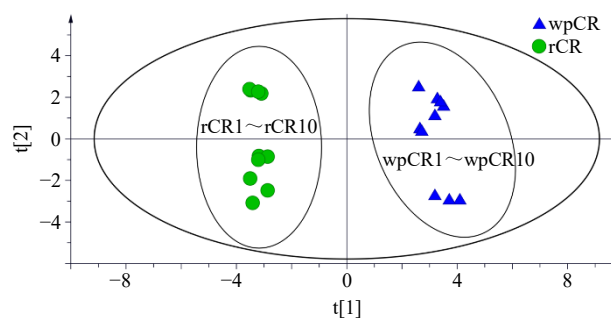


图 5 川芎生品和酒炙品 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plot of raw and wine processed *Chuanxiong Rhizoma*

(-0.293) 载荷值较大。第 3 主成分 (PC3) 独立贡献率为 9.851%, 峰 21 (0.429)、峰 8 (0.394)、峰 9 (0.394)、峰 19 (-0.390) 和峰 16 (0.311) 载荷较大。第 4 主成分 (PC4) 独立贡献率为 8.811%, 峰 17 (0.526)、峰 7 (0.340) 和峰 15 (-0.333) 有较大载荷。第 5 主成分 (PC5) 独立贡献率为 4.156%, 峰 9 (0.681)、峰 7 (0.362) 和峰 15 (-0.312) 的

表 3 主成分载荷

Table 3 Principal component load

峰号	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	峰号	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
1	0.295	0.018	0.013	0.021	0.018	14	-0.246	0.224	0.147	0.113	-0.072
2	0.289	-0.004	0.059	-0.005	0.137	15	0.058	0.376	0.027	-0.333	-0.312
3	0.289	0.001	0.003	0.023	0.057	16	0.176	0.267	0.311	0.223	-0.106
4	0.209	-0.295	-0.081	-0.164	-0.011	17	-0.169	-0.094	0.071	0.526	-0.025
5	-0.245	0.043	0.164	-0.239	0.033	18	-0.177	-0.356	-0.097	0.050	-0.113
6	-0.234	-0.203	0.221	0.098	0.129	19	-0.232	0.067	-0.390	0.057	0.186
7	-0.143	0.279	-0.029	0.340	0.362	20	-0.200	0.262	-0.013	-0.222	-0.290
8	-0.204	0.192	0.394	-0.066	-0.128	21	0.059	-0.264	0.429	0.254	-0.202
9	-0.013	0.107	0.394	-0.276	0.681	22	0.099	-0.293	0.299	-0.189	-0.037
10	0.224	0.156	0.143	0.224	-0.214	特征值	10.200	4.050	1.970	1.760	0.831
11	0.201	0.298	-0.134	0.225	0.057	贡献率/%	50.771	20.253	9.851	8.811	4.156
12	0.296	0.038	0.025	0.045	0.070	累积贡献率/%	50.771	71.024	80.875	89.686	93.842
13	-0.293	-0.048	0.062	0.041	-0.084						

载荷较大。结果表明,多种化学成分共同引起川芎的质量差异。

为分析炮制过程中成分变化的整体规律,将 10 批川芎生品和不同炮制程度酒炙品作为研究对象,把共有峰的相对峰面积作为变量导入 SIMCA 14.1 统计软件进行无监督模式的 PCA 建模分析,结果见图 6。由图可知,随着炮制程度的加深,从生品到不同炮制程度酒炙品的 PCA 得分图基本呈顺时针方向迁移,炮制过程中虽然各个化学成分的变化趋势不尽相同,整体体现一定的复杂性,但 PCA 可将这种复杂性变得较为简单和可视化,可以体现化学成分的整体变化特征。

2.6.3 采用 PCA 模型进行酒炙工艺预测 在以上 PCA 的基础上,另外制备生品 3 批,分别为 rCR11~rCR13; 制备上述最优炮制程度下酒炙品 3 批,分别为 wpCR11~wpCR13; 制备市售酒川芎 5 批,分别为 mwpCR1~mwpCR5, 此 11 批样品作为预测集。采用“2.6.2”项下建立的 PCA 模型对 3 批生品、3 批酒炙品以及 5 批市售酒炙品进行预测,预测得分图见图 7-A。由图可知,3 批生品和 3 批自制酒炙品分别落在了 PCA 模型的生品和酒炙品的范围内,说明建模良好,可以用于炮制品工艺预测。市售 5 批酒炙品,有 3 批落在酒炙品范围内,2 批落在了生品和酒炙品之间,说明 3 批工艺与本实验的

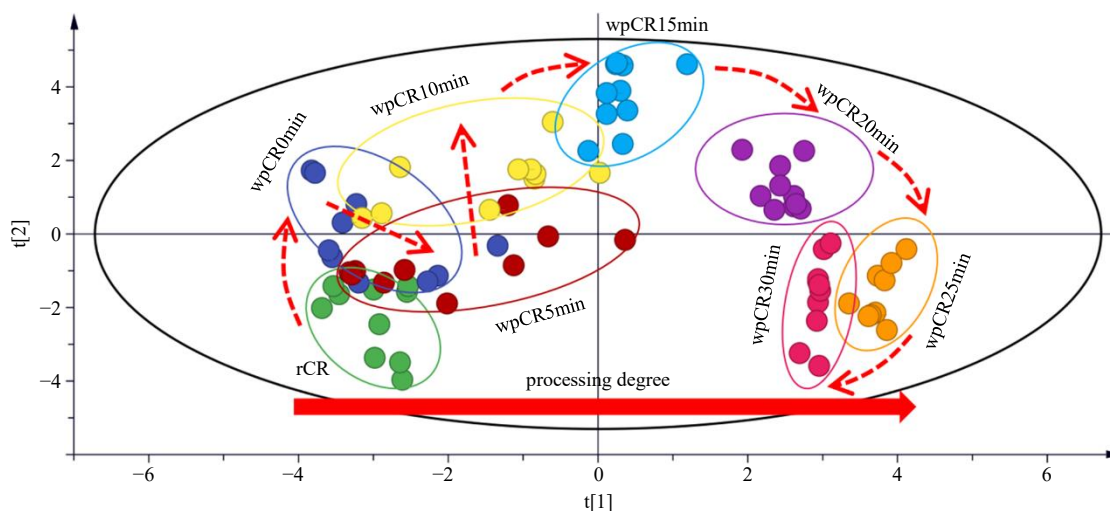


图 6 川芎生品及不同炮制程度酒炙品的 PCA 得分图

Fig. 6 PCA score plot of raw and processed *Chuanxiong Rhizoma* at different processing degrees

工艺相符合, 2 批与本实验的工艺存在一定的差异, 此 2 批川芎的来源以及炮制工艺均有可能是造成差异的原因。

为了对炮制过程中的炮制程度进行控制, 及时发现不合格炮制品, 用最佳炮制程度下的 10 批样品指纹图谱共有峰进行建模, 对 3 批炮制时间为 10 min (炮制程度不及, wpCR11'~wpCR13')、3 批炮制时间为 30 min (炮制程度过度, wpCR14'~wpCR16') 的酒炙品进行预测, 其 DModX 图见图 7-B, 由图可以发现此 6 批样品均偏离了最佳炮制程度下的 10 批样品, 说明炮制不及和过度均不得当。

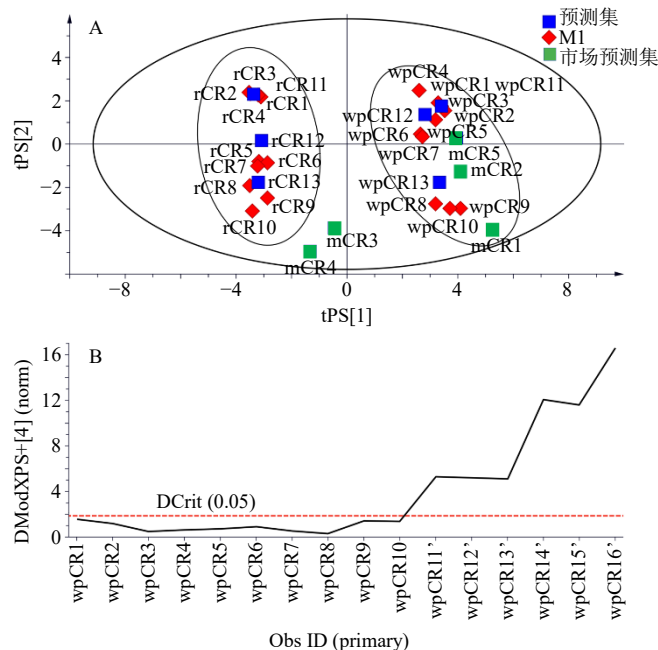


图 7 川芎生品、酒炙品和市售酒炙品 PCA 预测得分 (A) 及酒炙工艺预测 DModX (B) 图
Fig. 7 Predicted PCA of raw, wine processed and market *Chuanxiong Rhizoma* (A) and DModX of wine processing prediction (B)

2.6.4 OPLS-DA 分析 将川芎生品和酒炙品作为研究对象, 以共有峰的相对峰面积作为变量, 导入 SIMCA 14.1 进行有监督模式的 OPLS-DA 分析, 获得相应的模型, 见图 8-A。结果表明累积解释能力参数 (R^2_X) 为 0.738, 累积解释能力参数 (R^2_Y) 为 0.994, 预测能力参数 (Q^2) 为 0.988, 均大于 0.5, 表明该模型稳定可靠、预测能力强, 可用于区别生川芎与酒川芎。由 OPLS-DA 得分图可知, 生川芎和酒川芎明显分为 2 类, 说明川芎酒炙前后化学成分的含量存在差异。

对建立的 OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验,

结果见图 8-B。由图可知, 位于最右边的 R^2 和 Q^2 值均大于 0.9, 高于左边的 R^2 和 Q^2 值, 且 Q^2 回归线的截距为负值, 表明所构建的 OPLS-DA 模型没有出现拟合, 具有较好的预测能力, 能够用于川芎生品和酒炙品的判别分析。

S-Plot 图 (图 8-C) 体现了各变量的贡献度与样品间的相关性, 图中每个点代表 1 种化合物, 对角线两端的变量是影响 2 样本差异性的潜在标志物。由图 8-C 可知, 峰 1~4、12、13、19 (藁本内

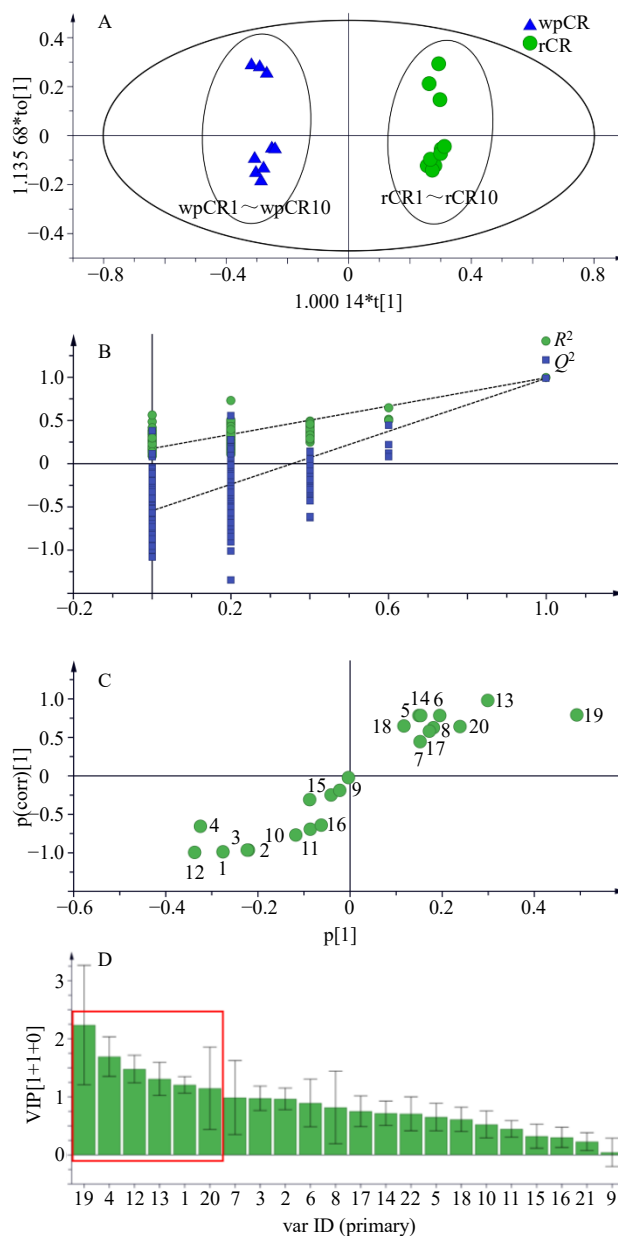


图 8 川芎生品与酒炙品的 OPLS-DA 得分 (A)、模型的置换检验 (B)、S-plot (C) 及 VIP 值图 (D)
Fig. 8 OPLS-DA score plot (A), permutation test (B), S-plot (C) and VIP (D) of raw and wine processed *Chuanxiong Rhizoma*

酯)、20(丁烯基苯酞)可能是引起川芎生品和酒炙品质量差异的标志化合物。其中,1~3 号峰为酒炙后新增加的峰。

提取 OPLS-DA 模型中变量重要性投影(VIP)图,见图 8-D。对 22 个共有峰峰面积 VIP 值大小进行排列,以 VIP 值>1.0 为标准筛选质量差异标志物,共得到 6 个 VIP 值大于 1 的共有峰,分别为 19 号峰(藁本内酯, VIP 值为 2.237)、4 号峰(VIP 值为 1.693)、12 号峰(VIP 值为 1.479)、13 号峰(VIP 值为 1.309)、1 号峰(VIP 值为 1.208)、20 号峰(丁烯基苯酞, VIP 值为 1.147)。说明这些化学成分对川芎生品和酒炙品分类具有显著影响,是引起川芎酒炙前后质量差异的主要潜在标志性成分。因此,在建立川芎酒炙品质量标准时,此差异标志性成分可以考虑作为指标成分,来控制酒炙品的质量。

3 讨论

本实验对川芎生品以及酒炙品进行全波长扫描,提取各个波长下的指纹图谱进行比较,发现在 254 nm 波长下各色谱峰响应较高,峰数目较多,峰形对称,各色谱峰分离度较好,基线较平稳。因此,确定 254 nm 作为建立川芎生品及酒炙品指纹图谱的检测波长。在建立提取方法时,前期实验比较了水提法以及醇提法,发现在 200~400 nm 全波长扫描下,水提样品指纹峰的数目较醇提少,为了获得更多的指纹峰,选择乙醇提取,并比较了不同浓度乙醇提取的效果,最终确定提取浓度为 90%的乙醇。

《中国药典》没有收载川芎炮制品,各地方标准对川芎炮制品的质量标准没有具体规定,因此不能有效控制川芎炮制品的质量。本研究采用 HPLC 法,建立了川芎生品及其炮制品随炒制时间的动态变化指纹图谱,选择峰面积较大的 9 个共有峰,通过 9 个峰的动态变化,最终确定在本实验条件下,最佳炮制时间为 15~20 min。其原因为,可以观察到大多数色谱峰在炒制 15~20 min 时,含量达到最大,在超过 20 min 时,可观察到峰面积的降低。虽然指纹图谱具有其自身的缺陷,不同产地川芎建立的指纹图谱也会有一定的差异,甚至可能会超过炮制造成的差异,但实验中进行炮制程度控制时,是在生品指纹图谱的基础上进行同批炮制,建立炮制过程中的动态指纹图谱,指纹图谱动态变化的影响因素只来自炮制过程,因此,各个时间点间的指纹图谱具有一定的可比性。

通过对川芎生品及最佳炮制时间酒炙品的指纹

图谱进行比较,发现川芎经酒炙以后,有新产生的色谱峰,可能为黄酒中带入的新成分,也可能由部分消失成分转化而来。通过 OPLS-DA 进行差异性标志物的筛选,这些新产生的成分也在其差异性质量标志物中,所有的差异性质量标志物都可能与酒炙川芎增加活血化瘀作用有关,但未知成分及新生成分的定性尚待进一步研究。

本实验通过 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别方法揭示了川芎炮制前后化学成分的变化规律,为酒炙川芎可能发生的药效变化提供化学基础,也为川芎及其炮制品的质量评价及炮制过程的在线控制提供思路和方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 40-41.
- [2] Liu Z K, Ng C F, Shiu H T, et al. A traditional Chinese formula composed of *Chuanxiong Rhizoma* and *Gastrodiae Rhizoma* (Da Chuanxiong Formula) suppresses inflammatory response in LPS-induced RAW 264.7 cells through inhibition of NF- κ B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 196: 20-28.
- [3] Liu X, Li X Z, Ji S G, et al. Screening of bioactive ingredients in *Ligusticum chuanxiong* Hort. for protection against myocardial ischemia [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3/4): 770-780.
- [4] Huang J, Lu X Q, Zhang C, et al. Anti-inflammatory ligustilides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. *Fitterapia*, 2013, 91: 21-27.
- [5] Huang C, Cao X Y, Chen X F, et al. A pectic polysaccharide from *Ligusticum chuanxiong* promotes intestine antioxidant defense in aged mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 174: 915-922.
- [6] Lu C, Zhang J, Shi X P, et al. Neuroprotective effects of tetramethylpyrazine against dopaminergic neuron injury in a rat model of Parkinson's disease induced by MPTP [J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(4): 350-357.
- [7] 胡春兰, 杨冬丽, 张东阁, 等. 两种方法提取川芎挥发油指纹图谱对比 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 88-91.
- [8] 蒲忠慧, 蒙春旺, 周彦希, 等. 川芎化学成分研究 [J]. 中药材, 2016, 39(11): 2529-2531.
- [9] 谢仲德, 易东阳, 方应权, 等. 川芎炮制历史沿革及现代研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 290-293.
- [10] Ning Y, Pei K, Cao G, et al. Comparative study on pharmacokinetics of four active compounds in rat plasma

- after oral administration of raw and wine processed *Chuanxiong Rhizoma* [J]. *Molecules*, 2019, 25(1): E93.
- [11] 钟凌云, 崔美娜, 杨明, 等. 炮制影响中药药性的现代研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(23): 5109-5113.
- [12] 贾天柱. 中药炮制药性变化论 [J]. 中成药, 2019, 41(2): 470-471.
- [13] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [14] 南洋, 徐鹏, 丁宏, 等. 现代分析技术在中药质量评价中的应用 [J]. 环球中医药, 2015, 8(11): 1421-1424.
- [15] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [16] 赵婧, 田俊娜, 王佳敏, 等. 基于 FTIR 与 HPLC 分析的远志散胶囊化学模式识别 [J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(6): 456-462.
- [17] 杨冰月, 彭亮, 颜永刚, 等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别分析不同产地款冬花生品与蜜炙品 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 4991-4997.
- [18] 石海培, 包贝华, 黄胜良, 等. 川芎饮片的 HPLC 指纹图谱建立、聚类分析及偏最小二乘判别分析 [J]. 中国药房, 2019, 30(8): 1066-1071.
- [19] 冯玉, 甄亚钦, 田伟, 等. 基于 UPLC 指纹图谱和化学计量学相结合的川芎质量研究 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(23): 2903-2908.
- [20] 刘娟, 冯芮, 蒲忠慧, 等. 指纹图谱结合 HPLC 定量分析在中药川芎质量评价中的应用研究 [J]. 中药材, 2019, 42(2): 353-357.

[责任编辑 郑礼胜]