

• 药材与资源 •

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

钟海蓉¹, 张绍山^{2,4}, 肖芳¹, 海来约布¹, 曲别军长¹, 李奕松¹, 杨正明^{2,4*}, 刘圆^{3,4*}

1. 西南民族大学药学院, 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. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610041

4. 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

摘要: 目的 采用超高效液相色谱法 (UPLC) 分别对 18 个产地川赤芍 *Paeonia veitchii* 的根、茎和叶中的芍药苷、氧化芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖 3 种成分进行含量测定, 并建立其指纹图谱, 基于多元统计法综合分析川赤芍根、茎和叶中主要化学成分的整体分布以及在不同部位中的差异性, 并对川赤芍品质进行综合评价。方法 采用 UPLC 法, 色谱条件: C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 体积流量 0.2 mL/min, 进样量 1 μL, 检测波长 230 nm; 采用 2012 版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件建立图谱; 并采用差异分析、相似度分析、主成分分析 (PCA)、TOPSIS 分析和偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 对川赤芍品质进行综合评价。结果 根据含量测定结果, 川赤芍中氧化芍药苷含量大小为根>茎>叶; 芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖含量大小为根>叶>茎。其中, 根样品中的芍药苷含量均大于 1.8%, 符合《中国药典》2020 年版规定; 茎、叶中芍药苷含量与根较为接近。并建立了根、茎、叶的 UPLC 指纹图谱, 共标定了 17 个共有峰, 并指出 3 个共有峰 (芍药苷、氧化芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖)。相似度评价结果显示, 不同产地川赤芍根、茎、叶的相似度均较好, 质量稳定。结论 指纹图谱可有效评价不同产地川赤芍品质。川赤芍茎、叶中芍药苷含量与根中相近, 基于《中国药典》2020 年版以芍药苷为质量控制指标, 为综合评价川赤芍的品质和开发新的入药部位等研究提供相关理论基础。

关键词: 川赤芍; 指纹图谱; 芍药苷; 氧化芍药苷; 主成分分析; 品质评价; 资源开发

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)07-2062-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.023

Comprehensive evaluation on quality of different habitats and parts of *Paeonia veitchii* based on UPLC fingerprint and multicomponent determination

ZHONG Hai-rong¹, ZHANG Shao-shan^{2,4}, XIAO Fang¹, HAILAI Yue-bu¹, QUBIE Jun-zhang¹, LI Yi-song¹, YANG Zheng-ming^{2,4}, LIU Yuan^{3,4}

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

3. Ethnic Medicine Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

4. Sichuan Provincial Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology and Engineering Laboratory, Chengdu 610225, China

Abstract: Objective To determine the content of paeoniflorin, oxypaeoniflorin and 1,2,3,4,6-O-pentagalloyl glucose in different parts of 18 batches of *Paeonia veitchii* and establish an UPLC method for the fingerprint analysis to make a

收稿日期: 2020-08-09

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1708005); 四川省科技农村领域重点研发 (2019YFN0089); 中央高校基本科研业务费专项资金研究类项目 (2020NGD01)

作者简介: 钟海蓉 (1994—), 女, 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。Tel: 18328092180 E-mail: 392009773@qq.com

***通信作者:** 杨正明, 助理研究员, 主要从事民族药资源品质评价及其生理生态与栽培研究。Tel: (028)85528812 E-mail: 790721918@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。Tel: (028)85528812
E-mail: 499769896@qq.com

comprehensive analysis on the overall distribution and the differences of the main chemical components in different parts based on the multivariate statistical analysis, which was used to evaluate the medicinal materials quality of *P. veitchii*.

Methods The separation was performed on a chromatographic Diamonsil C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as the mobile phase for gradient elution. Column temperature was 30 °C. Volume flow rate was 0.2 mL/min. Injection was 1 μL and the detection wavelength was 230 nm. The fingerprints were established and evaluated by the Similarity Evaluation System of TCM (version 2012). Difference analysis, similarity analysis (SA), principal component analysis (PCA), TOPSIS analysis, and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to comprehensively evaluate the quality of *P. veitchii*. **Results** According to the content determination results, the content of oxypaeoniflorin in *P. veitchii* was as follows: root>stem>leaf, and the content of paeoniflorin, 1,2,3,4,6-O-pentagalloyl glucose was as follows: root>leaf>stem. Among them, the content of paeoniflorin in root samples was more than 1.8%, which was in line with the provisions of the 2020 edition of China Pharmacopoeia. The content of paeoniflorin in stems and leaves was close to that of in roots. In this study, the UPLC fingerprint of roots, stems and leaves was established, a total of 17 common peaks were identified, and three common peaks (paeoniflorin, paeoniflorin, 1,2,3,4,6-O-pentagalloyl glucose) were identified. The results of similarity evaluation showed that the similarity of roots, stems and leaves of *P. veitchii* from different habitats was good and the quality was stable. **Conclusion** Fingerprint could effectively evaluate the quality of *P. veitchii* from different habitats. Based on the quality control index of paeoniflorin (C₂₃H₂₈O₁₁) in the 2020 edition of the China Pharmacopoeia, the content of paeoniflorin in the stems and leaves of *P. veitchii* was similar to that of in the roots, this study provided relevant theoretical basis for the comprehensive evaluation of the quality of *P. veitchii* and the development of new medicinal parts.

Key words: *Paeonia veitchii* Lynch; fingerprints; oxypaeoniflorin; principal component analysis; quality evaluation; resource development

川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 为毛茛科芍药属多年生草本植物, 以其根入药, 为《中国药典》2020 年版所收载赤芍的来源之一。赤芍为传统常用中药材, 用途广泛, 具有清热凉血、散瘀止痛的功效^[1]。川赤芍化学成分主要为苷类、酚类、黄酮类化合物, 其质量评价多以单萜苷类成分芍药苷为指标, 《中国药典》2020 年版规定芍药苷不得少于 1.8%^[2-3]。

川赤芍主产地为四川西部, 集中生长在青藏高原的边缘地带。其生长环境苛刻, 通常为海拔 2650~3750 m 的高原和峡谷地, 在生态脆弱的青藏高原, 川赤芍的自我再生非常缓慢, 目前人工种植尚未起步; 多个主产区的川赤芍野生资源蕴藏量逐年减少, 上市量随之锐减, 野生川赤芍已呈濒危之势^[4-5]。

近年来, 指纹图谱法在中药研究中应用较多^[6-7], 作为评价药材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^[8-11]。有相关文献报道^[12-14], 根据 2 种基原的赤芍指纹图谱, 可快速、准确地鉴别 2 种赤芍, 综合评价二基原赤芍药材的质量。目前, 前人对以芍药为基原的赤芍研究较多, 但是对于川赤芍的研究较少。本研究采用指纹图谱、相似度分析、聚类分析等方法从多角度分析, 综合评价不同产地、不同部位的川赤芍质量。从中药资源的综合利用和药材质量评价角度出发, 采用 UPLC 法对 18 批不同产地川赤芍的不同植物部位中芍药苷、氧化芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖等 3 种成分进行含量测

定, 并建立了根、茎、叶的化学成分指纹图谱, 通过多元统计分析, 研究川赤芍根、茎、叶中化学成分的整体分布和含量变化及定量比较, 以期最大化的综合利用野生川赤芍资源, 对评价川赤芍品质和开发新的入药部位等研究具有一定的参考意义。

1 仪器、试剂与材料

WatersAcquityUPLC®超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 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)。

对照品芍药苷(批号 18012305)、氧化芍药苷(批号 18082704)、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖(批号 19010904)均购自成都格利普生物科技有限公司, 质量分数均≥98.0%; 乙腈为色谱纯(美国 Sigma 公司); 甲醇为分析纯(成都市科隆化工试剂厂); 水为屈臣氏蒸馏水; 其余试剂为分析纯。

本课题组在全国第四次中药资源普查工作中, 对汶川县和壤塘县进行中药资源调查, 分别于 2017—2018 年于四川省甘孜藏族自治州各地与阿坝藏族羌族自治州沿途采集川赤芍样品。经西南民族大学青藏高原研究院刘圆教授鉴定为毛茛科芍药属植物川赤芍 *P. veitchii* Lynch, 川赤芍样品信息见表 1。

表1 川赤芍样品来源

Table 1 Information of *P. veitchii* Lynch

编号	样品部位	来源	海拔/m	采集日期
S1	根、茎、叶	四川省甘孜州康定县新榆林村	2850	2017-07-10
S2	根、茎、叶	四川省甘孜州道孚县沙湾村	3310	2017-07-11
S3	根、茎、叶	四川省甘孜州道孚县各卡乡冷冷村	3320	2017-07-11
S4	根、茎、叶	四川省甘孜州炉霍县益娘村	3240	2017-07-12
S5	根、茎、叶	四川省甘孜州炉霍县俄米村	3130	2017-07-12
S6	根、茎、叶	四川省甘孜州炉霍县学海村	3125	2017-07-12
S7	根、茎、叶	四川省甘孜州炉霍县雪同镇小同村	3120	2017-07-12
S8	根、茎、叶	四川省甘孜州甘孜县日都村	3610	2017-07-13
S9	根、茎、叶	四川省甘孜州甘孜县呷戈村	3560	2017-07-13
S10	根、茎、叶	四川省甘孜州甘孜县塔拖村	3530	2017-07-13
S11	根、茎、叶	四川省甘孜州甘孜县格仁达村	3540	2017-07-13
S12	根、茎、叶	四川省阿坝州汶川县耿达镇巴郎山	4237	2018-05-25
S13	根、茎、叶	四川省阿坝州壤塘县岗木达乡阳培村	3455	2018-07-01
S14	根、茎、叶	四川省阿坝州壤塘县吾依乡卡龙村	3272	2018-07-02
S15	根、茎、叶	四川省阿坝州壤塘县茸木达乡洞窝村	3280	2018-07-03
S16	根、茎、叶	四川省阿坝州壤塘县岗木达乡达日村	3308	2018-07-07
S17	根、茎、叶	四川省阿坝州壤塘县岗木达乡泽木达村	3257	2018-07-07
S18	根、茎、叶	四川省阿坝州壤塘县浦西乡小伊里村	2961	2018-07-10

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Acquity UPLC®超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0~5 min, 5%~8% A; 5~8 min, 8%~12% A; 8~13 min,

12%~15% A; 13~23 min, 15%~20% A; 23~27 min, 20%~22% A; 27~33 min, 22%~75% A; 33~34 min, 75%~100% A; 柱温 30 ℃; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 1 μL; 检测波长 230 nm。供试品及对照品色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液制备

分别精密称取芍药苷、氧化芍药苷、1,2,3,4,6-O-

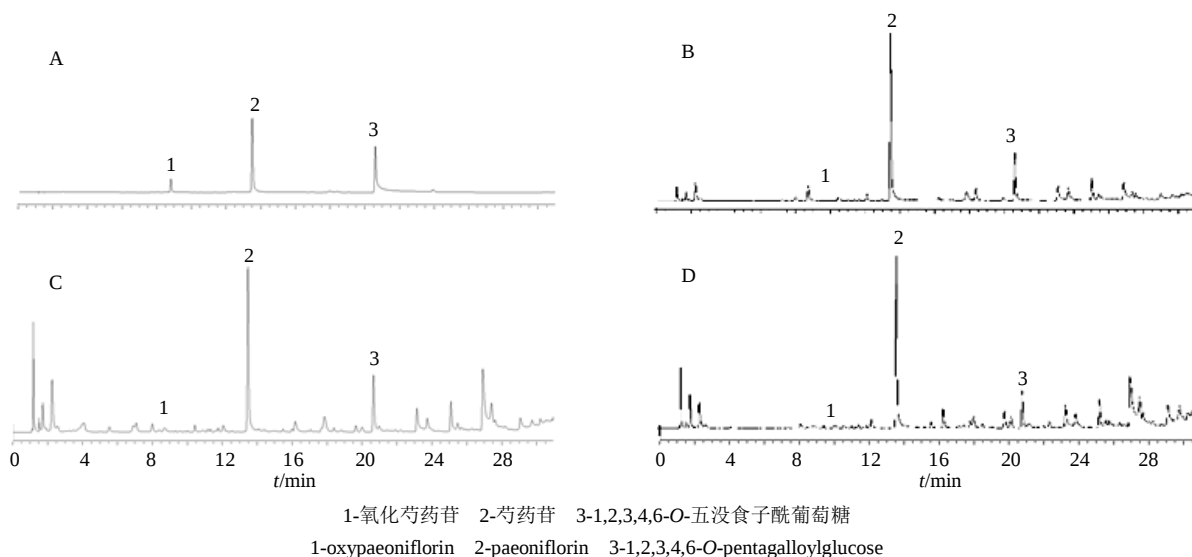


图1 混合对照品溶液(A)和川赤芍根(B)、茎(C)、叶(D)的UPLC图

Fig. 1 Ultra performance liquid chromatography of the mixed reference (A) and root (B), stem (C), leaf (D)

五没食子酰葡萄糖对照品适量，加甲醇制成含芍药苷 1.017 mg/mL、氧化芍药苷 0.200 mg/mL、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖 0.296 mg/mL 的混合对照品溶液，摇匀，即得。

2.3 供试品溶液制备

称取药材粉末（过 3 号筛）约 0.5 g，精密称定，置于 100 mL 锥形瓶中，加入甲醇 25 mL，摇匀，密封称定质量，超声 75 min 后，冷却，密封称定质量，用甲醇补足减少的质量，滤过，续滤液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 分别取供试品溶液（根、茎、叶）和混合对照品溶液“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，无干扰。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液，稀释成 6 个不同浓度，按“2.1”项下色谱条件测定，并记录峰面积。以对照品浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y），绘制标准曲线，并进行线性回归，得 3 种成分的回归方程与线性范围，见表 2。

表 2 回归方程与线性范围

Table 2 Regression equation and linear ranges

成分	线性回归方程	R^2	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
氧化芍药苷	$Y=8.5 \times 10^6 X-12\ 022$	0.999 1	2.00~30.00
芍药苷	$Y=1.2 \times 10^7 X-1.0 \times 10^6$	0.999 3	10.17~125.50
1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖	$Y=3.0 \times 10^6 X+190\ 407$	0.999 2	2.96~44.40

2.4.3 精密度试验 取混合对照品溶液连续进样 6 次，按“2.1”项下色谱条件测定，计算峰面积的 RSD 值，氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖峰面积 RSD 值分别为 0.71%、0.26%、1.98%。

2.4.4 重复性试验 精密称取同一药材样品，共 6 份，制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，得氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖质量分数 RSD 分别是 1.45%、1.31%、1.08%。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于 6、12、18、24、32、40、48 h 进样，按“2.1”项下色谱条件测定，得氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖峰面积 RSD 分别是 2.75%、0.83%、1.26%。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取已测定的样品 0.25 g，共 6 份，分别添加一定浓度的芍药苷、氧化芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖对照品溶液，依照“2.3”项方法制备样品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，芍药苷、氧化芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖加样回收率在 98.72%~101.41%，RSD 在 1.49%~2.68%。

2.5 不同产地川赤芍多成分含量测定

2.5.1 川赤芍不同植物部位含量测定结果及化学成分定量比较 18 批川赤芍不同植物部位含量测定结果见表 3。由表 3 可知，川赤芍根样品中氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖含量分别为 0.14%~0.85%、1.79%~4.11%、0.20%~0.80%；茎样品中氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-O-

五没食子酰葡萄糖含量分别为 0.10%~0.32%、1.08%~1.96%、0.09%~0.58%；叶样品中氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖质量分数分别为 0.02%~0.18%、1.13%~5.40%、0.11%~0.70%。根中芍药苷平均含量为 3.20%，均大于 1.8%，符合药典规定；18 批次叶样品的平均含量为 2.19%，大部分达到了《中国药典》2020 年版标准，且 1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖平均含量与根相近；茎中芍药苷平均质量分数为 1.45%，接近《中国药典》标准。因此，考虑可将茎叶作为芍药苷的开发部位使用。

2.5.2 差异性分析 川赤芍根、茎、叶样品中氧化芍药苷、芍药苷和 1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖含量范围、均值及差异性分析结果见图 2。

由图 2 可知，川赤芍中氧化芍药苷含量大小为根>茎>叶，芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖含量大小为根>叶>茎。川赤芍根、茎、叶中氧化芍药苷和芍药苷含量差异极显著，1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖含量差异显著。

2.5.3 TOPSIS 分析 根据氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖权重结果（以变异系数法计算，表 4），以标准化的数据采用 DPS 软件进行 TOPSIS 分析^[15]，得川赤芍根（G1~18）、茎（J1~18）、叶（Y1~18）结果见表 5。结果表明，以氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖为评价指标，根据最优值相对接近度（CI）排名，3 号川赤芍根样品质量最优、6 号川赤芍茎样品质量最优、6 号川赤芍叶样品质量最优。

表 3 川赤芍根、茎和叶中 3 种化学成分的含量测定结果

Table 3 Determination of 3 components in root, stem and leaf of *P. veitchii* Lynch

编号	根			茎			叶		
	A/%	B/%	C/%	A/%	B/%	C/%	A/%	B/%	C/%
S1	0.14	3.59	0.80	0.14	1.43	0.24	0.04	2.70	0.43
S2	0.68	3.93	0.37	0.24	1.42	0.26	0.08	1.76	0.27
S3	0.76	4.11	0.61	0.20	1.08	0.42	0.06	1.13	0.11
S4	0.15	2.38	0.74	0.15	1.19	0.22	0.03	2.23	0.14
S5	0.66	3.34	0.55	0.26	1.33	0.45	0.10	2.04	0.31
S6	0.85	3.23	0.45	0.32	1.60	0.58	0.18	5.40	0.64
S7	0.40	1.79	0.24	0.30	1.13	0.42	0.11	2.40	0.46
S8	0.44	3.43	0.41	0.21	1.57	0.32	0.03	2.88	0.54
S9	0.48	3.54	0.45	0.32	1.81	0.29	0.14	2.31	0.70
S10	0.46	3.49	0.55	0.27	1.66	0.30	0.03	2.80	0.40
S11	0.42	2.86	0.57	0.30	1.66	0.27	0.12	2.18	0.35
S12	0.46	2.73	0.24	0.10	1.96	0.34	0.15	1.90	0.42
S13	0.58	3.31	0.35	0.20	1.08	0.42	0.11	2.23	0.51
S14	0.70	3.81	0.44	0.20	1.54	0.27	0.04	2.92	0.70
S15	0.63	3.25	0.45	0.19	1.82	0.25	0.09	1.52	0.27
S16	0.56	3.36	0.26	0.15	1.32	0.09	0.02	2.29	0.12
S17	0.43	2.69	0.20	0.27	1.34	0.19	0.03	3.10	0.18
S18	0.57	2.75	0.20	0.19	1.16	0.20	0.07	1.20	0.28
平均值	0.52	3.20	0.44	0.22	1.45	0.31	0.08	2.39	0.38
RSD/%	35.88	18.03	40.38	29.49	18.57	37.64	60.82	39.31	49.67

A-氧化芍药苷 B-芍药苷 C-1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖

A-oxypaeoniflorin B-paeoniflorin C-1,2,3,4,6-O-pentagalloylglucose

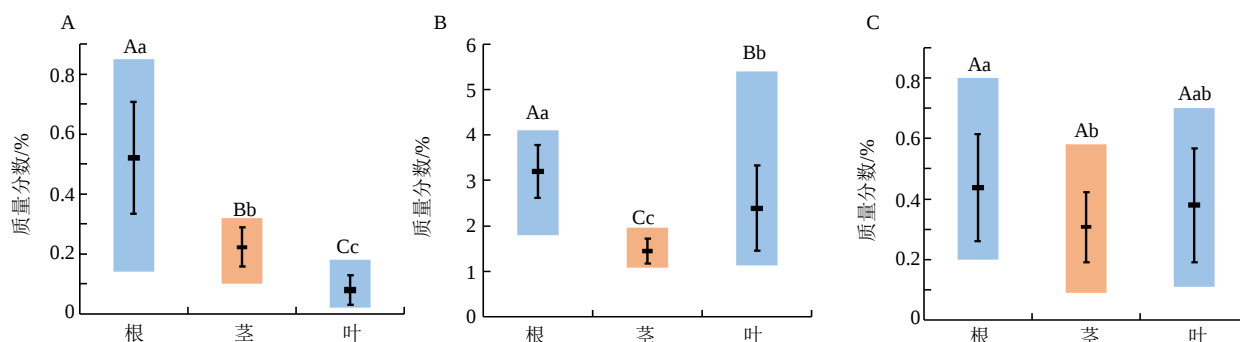
小写字母表示显著性 $\alpha=0.05$, 大写字母表示显著性 $\alpha=0.01$ Lowercase letters indicate significance $\alpha=0.05$, uppercase letters indicate significance $\alpha=0.01$

图 2 川赤芍根、茎、叶中的芍药内酯 (A)、芍药苷 (B) 和 1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖 (C) 含量范围、均值及差异性分析
 Fig. 2 Contents range, mean value and difference analysis of oxypaeoniflorin (A), paeoniflorin (B) and 1,2,3,4,6-O-pentagalloyl glucose (C) in the root, stem and leaf of *P. veitchii* Lynch

2.6 指纹图谱的建立与分析

中药化学成分种类繁多复杂,测定单一成分或几种成分很难表征其药材质量,因此本研究对 18 批川赤芍药材建立指纹图谱,从整体上分析其化学成分。

2.6.1 指纹图谱的建立 按照“2.1”项下条件依次测定,“2.3”项下条件制备供试品,将 18 个产地的川赤芍 UPLC 数据以 AIA 格式导入 2012 版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件中,分

别以 G1、J1 和 Y1 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、茎和叶指纹图谱叠加图(图 3)。以 5 号峰作为对照峰,共确定 17 个共有峰,用对照品对所得色谱峰进行比对,共指认出 3 个峰,分别为氧化芍药苷(3 号峰)、芍药苷(5 号峰)、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖(10 号峰)。

表 4 3 种成分的含量 RSD 与权重结果

Table 4 Variation coefficient and weights analysis of three components

成分	根		茎		叶	
	RSD	权重	RSD	权重	RSD	权重
氧化芍药苷	0.358 8	0.380 5	0.294 9	0.344 1	0.608 2	0.406 0
芍药苷	0.180 3	0.191 2	0.185 7	0.216 7	0.393 1	0.262 4
1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖	0.403 8	0.428 3	0.376 4	0.439 2	0.496 7	0.331 6

表 5 川赤芍不同部位 TOPSIS 分析结果

Table 5 TOPSIS result about different parts of *P. veitchii* Lynch

样本	指标 CI	排名	样本	指标 CI	排名	样本	指标 CI	排名
G1	0.518 9	8	J1	0.287 9	15	Y1	0.331 9	10
G2	0.555 2	6	J2	0.427 8	11	Y2	0.284 1	13
G3	0.782 4	1	J3	0.546 9	6	Y3	0.151 9	16
G4	0.461 4	12	J4	0.244 8	17	Y4	0.150 1	17
G5	0.655 4	2	J5	0.676 1	2	Y5	0.373 3	9
G6	0.646 4	3	J6	0.884 9	1	Y6	0.950 5	1
G7	0.229 4	18	J7	0.642 5	3	Y7	0.483 7	5
G8	0.429 2	13	J8	0.485 4	9	Y8	0.380 8	8
G9	0.486 0	10	J9	0.575 2	4	Y9	0.615 6	2
G10	0.542 4	7	J10	0.533 7	7	Y10	0.310 4	11
G11	0.500 5	9	J11	0.525 3	8	Y11	0.450 5	7
G12	0.308 1	16	J12	0.446 3	10	Y12	0.524 5	3
G13	0.466 0	11	J13	0.546 9	5	Y13	0.491 6	4
G14	0.608 6	4	J14	0.405 1	12	Y14	0.460 3	6
G15	0.558 2	5	J15	0.404 7	13	Y15	0.302 6	12
G16	0.409 9	14	J16	0.132 7	18	Y16	0.146 1	18
G17	0.274 3	17	J17	0.384 6	14	Y17	0.252 9	14
G18	0.364 5	15	J18	0.269 0	16	Y18	0.236 4	15

G-根 J-茎 Y-叶, 下同

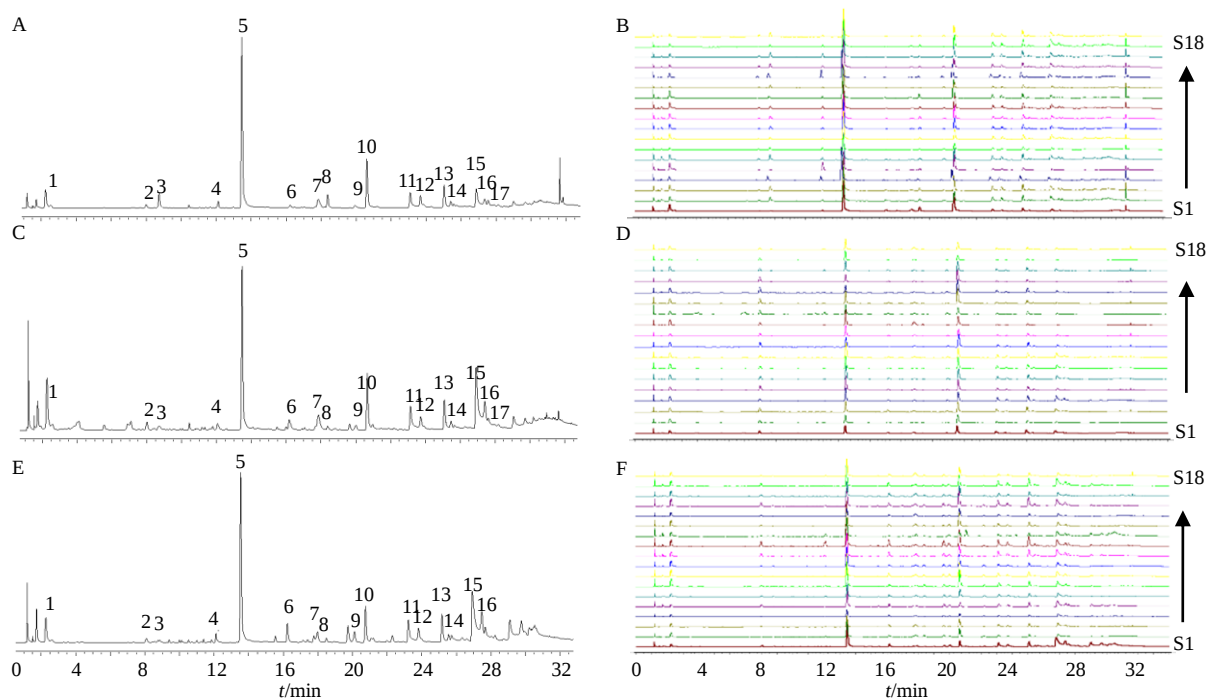
G-root J-stem Y-leaves, same as below

2.6.2 相似度分析 分别对川赤芍根、茎和叶样品的指纹图谱与对照指纹图谱进行相似度评价 (表 6), 结果显示, 18 批川赤芍根、茎和叶 UPLC 指纹图谱相似度系数相似度均在 0.905 之上, 说明各产地川赤芍质量稳定。

2.6.3 主成分分析 采用 SPSS 19.0 软件, 以 17 个共有峰 (X1~X17) 峰面积为变量, 对川赤芍根、茎、叶样品进行主成分分析。参考文献报道^[16-17], 选取每个主成分因子最大荷载值 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)。将 18 个产地川赤芍不同部位 (根、茎、叶) 样品的共有峰峰面积导入 SPSS 19.0 软件, 对各共有峰峰面积进行 Z 标准化处理, 计算主成分特征值、累积贡献率及主成分综合得分等^[18]。

川赤芍各样品主成分因子载荷矩阵、公因子方

差和 Norm 值见表 7。川赤芍根样品各共有峰的公因子方差 ≥ 0.518 (X4 的公因子方差最小, 为 0.518; X11 的公因子方差最大, 为 0.965), 特征值 >1 的主成分有 3 个, 且累积贡献率达 84.262%, 基本可以客观反映川赤芍根样本信息。选取共有峰 X2、X10~X17 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。川赤芍茎样品各共有峰的公因子方差 ≥ 0.539 (X6 的公因子方差最小, 为 0.539; X15 的公因子方差最大, 为 0.986), 特征值 >1 的主成分有 4 个, 且累积贡献率达 88.975%, 基本可以客观反映川赤芍茎样本信息。选取共有峰 X2、X4、X8~X17 进入 MDS, 表明这些共有峰可以基本反映川赤芍茎的品质信息。川赤芍叶样品各共有峰的公因子方差 ≥ 0.546 (X7 的公因子方差最小, 为 0.539; X11 的公因子方差最大, 为 0.986), 特征值 >1 的主成分有 3 个, 且累积贡献率达 87.922%,



A-川赤芍根对照图谱 B-川赤芍根叠加图 C-川赤芍茎对照图谱 D-川赤芍茎叠加图 E-川赤芍叶对照图谱 F-川赤芍叶叠加图

A-reference fingerprint of roots of *P. veitchii* Lynch B-fingerprint of roots of *P. veitchii* Lynch C-reference fingerprint of stems of *P. veitchii* Lynch

D-fingerprint of stems of *P. veitchii* Lynch E-reference fingerprint of leaves of *P. veitchii* Lynch F-fingerprint of leaves of *P. veitchii* Lynch

图3 18批川赤芍共有模式

Fig. 3 Mutual mode of UPLC fingerprints of 18 batches of *P. veitchii* Lynch

表6 18批川赤芍相似度结果

Table 6 Similarity of *P. veitchii* Lynch from 18 different areas

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
G1	0.963	J1	0.979	Y1	0.921
G2	0.989	J2	0.986	Y2	0.972
G3	0.998	J3	0.986	Y3	0.987
G4	0.993	J4	0.943	Y4	0.979
G5	0.905	J5	0.988	Y5	0.956
G6	0.987	J6	0.988	Y6	0.998
G7	0.993	J7	0.989	Y7	0.976
G8	0.995	J8	0.957	Y8	0.992
G9	0.996	J9	0.983	Y9	0.986
G10	0.997	J10	0.979	Y10	0.990
G11	0.990	J11	0.935	Y11	0.966
G12	0.984	J12	0.954	Y12	0.984
G13	0.982	J13	0.959	Y13	0.981
G14	0.990	J14	0.958	Y14	0.938
G15	0.991	J15	0.910	Y15	0.965
G16	0.994	J16	0.996	Y16	0.979
G17	0.969	J17	0.937	Y17	0.978
G18	0.993	J18	0.973	Y18	0.976

基本可以客观反映川赤芍叶样本信息。选取共有峰 X2、X4、X9~X17 进入 MDS, 表明这些共有峰可以基本反映川赤芍叶的品质信息。根据各样品主成分综合得分结果(表8), 川赤芍根的综合得分排名为 G17>G3>G2>G6>G16……G5>G13>G7, 表明岗木达村(G17)、冷冷村(G3)、沙湾村(G2)、学海村(G6)、达日村(G16)这5个产地的川赤芍根样品质量较好。川赤芍茎的综合得分排名为 J12>J6>J16>J8>J3……J15>J10>J17, 表明巴朗山(J12)、学海村(J6)、达日村(J16)、日都村(J8)、冷冷村(J3)这5个产地的川赤芍茎样品质量较好。川赤芍叶的综合得分排名为 Y11>Y15>Y17>Y10>Y7……Y2>Y14>Y4, 表明仁达村(Y11)、洞窝村(Y15)、岗木达村(Y17)、塔拖村(Y10)、小同村(Y7)这5个产地的川赤芍叶样品质量较好。

2.6.4 TOPSIS 分析 根据川赤芍不同部位共有峰权重结果, 将标准化的数据采用 DPS 软件进行 TOPSIS 分析^[15], 以共有峰面积做评价指标, 根据最优值相对接近度(CI)排名(表8)。结果表明,

表 7 川赤芍各部位样品主成分因子载荷矩阵、公因子方差和 Norm 值

Table 7 Factor loading matrix, communalities and norm of the principal component in different parts of *P. veitchii* Lynch

共有峰	根						茎						叶					
	F ₁	F ₂	F ₃	公因子方差	Norm 值		F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	公因子方差	Norm 值		F ₁	F ₂	F ₃	公因子方差	Norm 值
X1	-0.221	0.772	0.291	0.730	1.869 9		0.591	0.355	0.562	-0.060	0.795	1.946 1		0.618	0.638	0.275	0.864	2.328 3
X2	0.532	-0.63	0.455	0.887	2.125 0		0.131	-0.773	0.447	-0.332	0.924	1.391 8		0.91	-0.081	-0.054	0.837	2.918 2
X3	0.766	-0.363	0.349	0.840	2.334 7		0.771	-0.393	0.221	0.168	0.827	2.337 8		0.635	0.548	-0.309	0.799	2.300 7
X4	-0.288	-0.049	0.658	0.518	1.135 7		0.078	-0.436	0.306	0.794	0.921	1.504 4		0.636	0.094	-0.733	0.951	2.198 7
X5	0.655	0.501	0.117	0.694	2.157 0		0.310	0.689	0.373	0.101	0.720	1.660 1		0.856	0	-0.361	0.863	2.769 7
X6	0.043	0.824	0.137	0.699	1.856 9		0.632	0.019	0.298	0.225	0.539	1.920 7		0.870	0.097	-0.043	0.768	2.791 9
X7	0.153	0.873	-0.067	0.789	2.003 5		-0.288	0.542	0.602	0.273	0.815	1.722 1		0.021	0.653	0.344	0.546	1.276 6
X8	-0.083	0.904	0.137	0.843	2.044 8		0.157	0.614	0.722	-0.105	0.934	1.590 9		0.396	0.800	0.027	0.797	1.957 2
X9	0.446	-0.709	0.400	0.862	2.077 8		0.643	-0.498	0.278	0.473	0.962	2.229 8		0.94	-0.111	-0.112	0.908	3.019 4
X10	-0.214	0.841	0.388	0.904	2.031 3		0.278	-0.232	0.569	-0.714	0.964	0.596 9		0.665	0.657	0.207	0.917	2.466 7
X11	0.956	0.227	-0.001	0.965	2.728 5		0.962	0.059	-0.160	-0.172	0.983	2.623 8		0.967	-0.081	0.210	0.986	3.108 6
X12	0.906	0.239	0.095	0.887	2.598 8		0.916	0.171	-0.183	-0.126	0.917	2.530 2		0.972	-0.084	0.085	0.960	3.117 6
X13	0.977	0.06	0.073	0.963	2.744 3		0.959	-0.147	-0.056	-0.141	0.964	2.625 4		0.979	-0.008	0.104	0.969	3.136 8
X14	0.961	0.101	0.087	0.941	2.706 2		0.776	-0.534	0.118	-0.077	0.907	2.327 4		0.975	0.031	0.118	0.965	3.125 1
X15	0.891	0.132	-0.325	0.918	2.546 0		0.877	0.308	-0.346	0.050	0.986	2.568 8		0.693	-0.626	0.254	0.937	2.522 5
X16	0.901	0.171	-0.31	0.938	2.582 4		0.871	0.317	-0.348	0.046	0.982	2.555 8		0.673	-0.641	0.251	0.927	2.479 3
X17	0.968	-0.018	-0.086	0.944	2.716 6		0.898	0.270	-0.308	0.106	0.986	2.617 2		0.736	-0.641	-0.013	0.954	2.642 0
主成分特征值	7.863	5.017	1.445				7.679	3.124	2.583	1.739				10.252	3.472	1.222		
主成分贡献率/%	46.253	29.509	8.5				45.173	18.378	15.192	10.232				60.308	20.426	7.187		
主成分累积贡献率/%	46.253	75.762	84.262				45.173	63.55	78.743	88.975				60.308	80.734	87.922		

表 8 川赤芍不同部位主成分分析与 TOPSIS 分析结果

Table 8 Result of PCA and TOPSIS in different parts of *P. veitchii* Lynch

编号	主成分		TOPSIS		编号	主成分		TOPSIS		编号	主成分		TOPSIS	
	F	排名	指标 CI	排名		F	排名	指标 CI	排名		F	排名	指标 CI	排名
G1	-0.663 6	15	0.421 9	10	J1	-1.268 3	15	0.288 1	11	Y1	-0.231 6	9	0.370 4	5
G2	1.435 0	3	0.504 0	6	J2	-1.184 7	14	0.220 4	14	Y2	-1.920 5	16	0.167 1	14
G3	2.486 8	2	0.514 2	4	J3	0.988 1	5	0.402 1	6	Y3	-1.657 4	14	0.166 5	15
G4	0.025 6	10	0.424 4	9	J4	0.931 5	6	0.529 3	2	Y4	-3.519 8	18	0.064 4	18
G5	-2.811 1	16	0.386 0	13	J5	-0.007 3	11	0.278 9	13	Y5	-1.434 5	13	0.251 3	11
G6	1.415 1	4	0.531 8	3	J6	1.281 3	2	0.483 5	3	Y6	-1.898 0	15	0.158 6	16
G7	-3.593 4	18	0.212 1	18	J7	-0.164 2	12	0.352 8	9	Y7	1.266 8	5	0.356 1	6
G8	0.030 2	9	0.386 4	12	J8	1.044 2	4	0.472 9	4	Y8	0.922 3	6	0.320 2	8
G9	-0.637 9	14	0.326 5	16	J9	0.541 4	8	0.370 4	8	Y9	-0.506 5	10	0.232 4	12
G10	-0.511 1	13	0.363 7	15	J10	-1.411 6	17	0.172 8	17	Y10	1.702 9	4	0.436 1	4
G11	-0.022 9	11	0.408 2	11	J11	0.921 7	7	0.310 9	10	Y11	5.630 0	1	0.821 7	1
G12	0.992 7	6	0.482 6	7	J12	1.516 6	1	0.545 8	1	Y12	-1.015 2	11	0.338 2	7
G13	-2.851 3	17	0.223 8	17	J13	0.540 8	9	0.287 6	12	Y13	0.070 4	8	0.259 8	10
G14	0.457 2	8	0.563 8	1	J14	0.356 5	10	0.374 0	7	Y14	-2.043 8	17	0.153 7	17
G15	-0.25 9	12	0.385 4	14	J15	-1.381 5	16	0.193 9	16	Y15	3.578 8	2	0.467 6	2
G16	1.079 0	5	0.512 6	5	J16	1.164 9	3	0.453 2	5	Y16	0.075 7	7	0.277 6	9
G17	2.803 8	1	0.563 3	2	J17	-2.952 6	18	0.031 8	18	Y17	2.072 1	3	0.447 1	3
G18	0.624 7	7	0.453 0	8	J18	-0.916 8	13	0.217 6	15	Y18	-1.091 9	12	0.229 9	13

14 号川赤芍根样品质量最优、12 号川赤芍茎样品质量最优、11 号川赤芍叶样品质量最优。

2.6.5 偏最小二乘回归 (PLS-DA) 分析 为了进一步筛选引起不同产地川赤芍不同部位 (根、茎、叶) 质量特征差异的标志性成分, 采用 SIMCA 13.0 软件对 18 批不同产地川赤芍不同部位 (根、茎、叶) UPLC 指纹图谱的原始数据进行 PLS-DA 分析, 进而提取 PLS-DA 模型中 17 个变量的 VIP 值 (图 4), 以变量的 VIP>1 作为评价标准, 筛选引起不同产地川赤芍不同部位 (根、茎、叶) 质量差异的潜在化学成分^[19]。筛选结果表明, 川赤芍根样品色谱峰 1、

15、5、17、4 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; 川赤芍茎样品色谱峰 12、15、16、17、11、5、13 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茎样品差异的主要标志性物质; 川赤芍叶样品色谱峰 5、7、1、15 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叶样品差异的主要标志性物质; 其中 5 号峰为芍药苷, 其他几个还有待鉴别。因此, 芍药苷是影响产地差异的主要评价因素, 这与药典选取芍药苷为指控标志相一致。

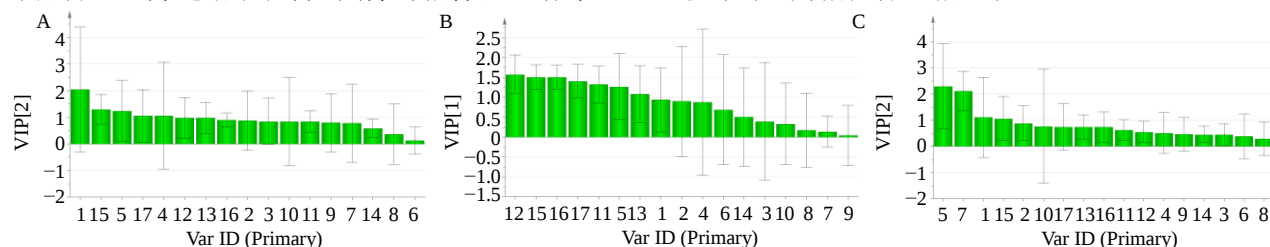


图 4 川赤芍根 (A)、茎 (B)、叶 (C) 的 UPLC 指纹图谱共有色谱峰的 PLS-DA VIP 值

Fig. 4 VIP values of common peaks of the UPLC fingerprints from root (A), stem (B), leaf (C) of *P. veitchii* Lynch by using PLS-DA method

3 讨论

本研究为了优化供试品制备的提取条件, 分别考察了提取溶剂 (甲醇、50%甲醇、乙醇、50%乙醇)、提取方法 (回流提取法和超声提取法)、提取时间 (30、45、60、75、90、120 min)、料液比 (1:10、1:25、1:50、1:75) 对提取效果的影响, 确定最佳提取条件为: 以甲醇为溶剂, 超声提取 75 min。建立的 UPLC 测定方法操作简单、准确可靠, 精密度、稳定性和重复性良好。

川赤芍主要含有苷类和没食子酸及其衍生物两大类成分, 具有镇静、镇痛、扩张血管、抗炎、抗溃疡、抗癌、抗糖尿病等生物学活性^[20-24]。本研究所选芍药苷、氧化芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖为川赤芍的主要活性成分, 根据刘昌孝院士提出的质量标志物原则^[25], 以上 3 种成分均与川赤芍功能密切相关, 同时可以定性鉴别和定量测定。因此, 本研究选择以上 3 种成分作为质量标志物科学而合理, 符合中医药研究理论。

综合多元统计分析结果, 基于不同产地、不同部位川赤芍定量分析和指纹图谱, 本课题组所建立的多元统计分析方法可用于提高川赤芍的质量控制和质量标准, 可作为不同产地、不同部位中药材间的质量评价方法。

目前, 川赤芍主要为生态脆弱的青藏高原野生资源, 且分布范围广, 尚未有人工栽培。本研究对不同产地川赤芍不同植物部位化学成分进行了比较。UPLC 指纹图谱相似度评价结果显示, 川赤芍各部位的化学成分极为相似, 且茎和叶化学成分含量较接近, 说明不同产地川赤芍根药材质量存在显著差异。《中国药典》2020 年版规定川赤芍主要的入药部位为根, 且以芍药苷含量作为主要质控指标。本研究结果表明, 川赤芍根中芍药苷平均含量为 3.20%, 均符合药典规定。川赤芍茎和叶均含有芍药苷, 其中叶中芍药苷平均含量高达 2.19%, 大部分达到药典规定; 茎中芍药苷含量虽未达药典标准, 但其含量可观。因此, 建议在对川赤芍茎叶做进一步药效学研究, 考虑是否可将川赤芍茎叶与根同等入药或者川赤芍的茎叶作为新的入药部位, 综合利用已渐濒危之势的川赤芍野生资源。

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. 2020: 87.
- [2] 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.
- [3] 冀兰鑫, 黄浩, 李长志, 等. 赤芍药理作用的研究进展

- [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 233-236.
- [4] 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.
- [5] 向楚兵, 刘友平, 陈鸿平, 等. 赤芍二基源药材的 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.
- [6] 瞿领航, 曹国胜, 涂济源, 等. 基于灰色关联度与正交偏最小二乘法分析的苍术挥发油燥性谱效关系研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 150-156.
- [7] 徐珍珍, 史星星, 樊旭蕾, 等. 基于灰色关联度法和 FCM 算法的木香质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5916-5922.
- [8] 聂磊, 胡震, 罗国安, 等. 中药指纹图谱的融合技术 [J]. 分析化学, 2005, 33(6): 898.
- [9] 曹瑞竹. 木香顺气丸 HPLC 特征指纹图谱研究及多成分含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 1127-1134.
- [10] 黄萌萌, 唐颂豪, 陈彦, 等. 排石颗粒 HPLC 指纹图谱及化学模式识别分析 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6): 2768-2772.
- [11] 李莉娜, 杨淑婷, 杨健, 等. 生芪消渴胶囊 UPLC 指纹图谱建立及 6 种成分含量测定 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(18): 2196-2202.
- [12] 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.
- [13] 孙冬梅, 陈秋谷, 毕晓黎, 等. 二基原赤芍 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.
- [14] 向楚兵, 刘友平, 陈鸿平, 等. 赤芍二基源药材的 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.
- [15] 杨正明, 刘哲, 邓秋林, 等. 四川道地产区江油附子和川乌中 4 种核苷类成分含量测定及多元统计分析 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5657-5664.
- [16] 吴玉红, 田霄鸿, 同延安, 等. 基于主成分分析的土壤肥力综合指数评价 [J]. 生态学杂志, 2010, 29(1): 173-180.
- [17] 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.
- [18] 张文霖. 主成分分析在 SPSS 中的操作应用 [J]. 市场研究, 2005(12): 31-34.
- [19] 陶晓赛, 龚海燕, 谢彩侠, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地盾叶薯蓣药材质量 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 227-233.
- [20] 张晔, 文继红. 芍药苷抗抑郁作用及机制的实验研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(12): 78-81.
- [21] 李惠晨, 胡伟, 丁井永. 五没食子酰基葡萄糖抗肿瘤的作用研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(9): 2255-2258.
- [22] 张建博, 谢雨, 杨浩然, 等. 五没食子酰基葡萄糖治疗 2 型糖尿病及其并发症药效机制研究进展 [J]. 药学研究, 2015, 34(6): 344-348, 352.
- [23] 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.
- [24] Hino H, Takahashi H, Suzuki Y, et al. Anticonvulsive effect of paeoniflorin on experimental febrile seizures in immature rats: Possible application for febrile seizures in children [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42920.
- [25] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.

[责任编辑 时圣明]