

基于 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量分析的不同产地当归质量特征研究

杨 燕, 于春强, 郭子娴, 王梦月*, 李晓波*

上海交通大学药学院, 上海 200240

摘要: 目的 建立不同产地当归 *Angelicae sinensis* 的 HPLC 指纹图谱并测定其主要成分的含量, 结合化学计量学分析, 建立各产地当归的“识别标志”。方法 采用 HPLC-DAD 方法建立甘肃、四川和云南等地当归的指纹图谱, 并对指标成分进行含量测定。进行相似度评价结合主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)、Fisher 线性判别 (fisher linear discrimination analysis, FLDA) 等模式识别技术进行分析。结果 HPLC 指纹图谱共标定了不同产地当归中的 13 个共有峰, 指认出绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、阿魏酸松柏酯、*E*-藁本内酯、*E*-丁烯基苯酞、*Z*-藁本内酯 8 个色谱峰, 样品相似度均在 0.90 以上。绿原酸、洋川芎内酯 I、*E*-丁烯基苯酞、总阿魏酸 (阿魏酸与阿魏酸松柏酯换算后总量)、*Z*-藁本内酯 6 个指标成分含量测定变化范围分别为 0.10~0.52 mg/g、0.10~0.24 mg/g、0.19~0.54 mg/g、1.42~2.66 mg/g、21.75~29.15 mg/g。PCA、PLS-DA 分析结果表明, *Z*-藁本内酯、*E*-藁本内酯、阿魏酸松柏酯、阿魏酸在不同产地当归的中变化显著, *Z*-藁本内酯、*E*-丁烯基苯酞、总阿魏酸分别可作为甘肃当归、四川当归、云南剑川当归的成分识别标志。逐步线性判别验证当归产地其中自身判别正确率为 96.3%, 交叉验证正确率为 92.3%。结论 建立的 HPLC 指纹图谱结合含量测定、PCA、PLS-DA 客观、全面、有效地对不同产区当归质量特征进行探究, 确认各产地当归的标志成分, 为当归的产地溯源及质量控制提供科技支撑。

关键词: 当归; 高效液相色谱; 指纹图谱; 绿原酸; 阿魏酸; 洋川芎内酯 I; 洋川芎内酯 H; 阿魏酸松柏酯; 化学计量学
中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)15-4666-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.025

Quality characteristics of *Angelicae Sinensis Radix* from different producing areas based on HPLC fingerprint and multi-component quantitative analysis

YANG Yan, YU Chun-qiang, GUO Zi-xian, WANG Meng-yue, LI Xiao-bo

School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Objective To establish fingerprints of Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*, ASR) from different producing areas and determine the contents of its main components, combined with chemometric analysis, to establish "identification marks" of *Angelicae Sinensis Radix* from different producing areas. **Methods** The fingerprints of *Angelicae Sinensis Radix* in Gansu, Sichuan and Yunnan were established by HPLC-DAD method, and the content of index components was determined. On this basis, the similarity evaluation system software (2012 version) combined the principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), and fisher linear discrimination analysis (FLDA) and other chemometric methods were used for the pattern recognition research. **Results** The fingerprints were co-calibrated with 13 common peaks in *Angelicae Sinensis Radix* from different regions. Eight chromatographic peaks were identified by reference. The 27 batches of *Angelicae Sinensis Radix* samples had similarities above 0.90; The contents variation ranges of chlorogenic acid, ligustilide I, *E*-butenylphthalide, total ferulic acid (total amount of ferulic acid and coniferyl ferulate converted), and *Z*-ligustilide were 0.10—0.52 mg/g, 0.10—0.24 mg/g, 0.19—0.54 mg/g, 1.42—2.66 mg/g, 21.75—29.15 mg/g, respectively. PCA and PLS-DA results showed that *Z*-ligustilide, *E*-ligustilide, coniferyl ferulate, and ferulic acid were the different components of ASR from different places of origin, among which *Z*-ligustilide can be used as the component identification mark of Gansu ASR, *E*-butenyl phthalide can be used as the component identification mark of Sichuan ASR; total ferulic acid can be used as the component identification mark of Yunnan Jianchuan ASR. The content of the index

收稿日期: 2020-12-03

作者简介: 杨 燕 (1996—), 女, 云南大理人, 硕士研究生, 从事生药学研究。Tel: (021)34205222 E-mail: yysweet@sjtu.edu.cn

*通信作者: 李晓波 (1963—), 女, 博士, 教授, 从事生药学研究。Tel: (021)34204806 E-mail: xbli@sjtu.edu.cn

王梦月 (1973—), 男, 博士, 副教授, 从事生药学研究。Tel: (021)34205222 E-mail: mywang@sjtu.edu.cn

components was linearly discriminant. The correct rate of self-discrimination was 96.3% and the correct rate of cross-validation was 92.3%. **Conclusion** The established HPLC fingerprint is combined with content determination, PCA and PLS-DA indicators to comprehensively and effectively explore the quality characteristics of *Angelicae Sinensis Radix* in different production areas, confirm the iconic ingredients of *Angelicae Sinensis Radix* from various production areas, and provide technical support for the production area origin and quality control of *Angelicae Sinensis Radix*.

Key words: *Angelicae Sinensis Radix*; HPLC; fingerprint; chlorogenic acid; ferulic acid; senkyunolide I; senkyunolide H; coniferyl ferulate; chemometric

当归 *Angelicae Sinensis Radix* 为伞形科植物 *Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 为常用中药, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效^[1]。作为药食同源之品, 当归也常入饮食保健^[2]。当归富含挥发油、有机酸、多糖、黄酮等化学成分^[3-4], 具有降压平喘、调节肠胃、抗动脉硬化、抑菌、调节机体免疫功能等药理活性^[5-8]。依据目前已形成的道地产区, 可将当归分为岷归(甘肃)、云归(云南)、川归(四川)、窑归(湖北) 4 个大类^[9]。中药材中化学成分复杂, 同时药材栽培地域的地理条件、采收时间及贮藏方法等都会对其质量造成影响^[10]。因此, 研究不同产地当归品质差异对于当归规范化种植、保障药材质量以及临床疗效均具有重要意义。

HPLC 指纹图谱能够有效地反映中药中的化学成分信息, 宏观可量化, 已成为评价和控制中药质量的常用方法^[11-13]。当归药材的质量控制, 除了对常规指标成分(阿魏酸, 藁本内酯等)进行定量分析外, 目前还进行了指纹图谱结合主成分分析、聚类分析等化学计量学研究^[14-16]。然而, 迄今为止, 对不同商品当归的质量特征缺乏系统研究。本研究基于 HPLC 指纹图谱及多成分定量分析, 结合主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)、Fisher 线性判别(fisher linear discrimination analysis, FLDA)等化学计量学方法, 对不同产地当归质量特征进行了分析, 从化学成分角度阐明不同产地当归药材的质量特征, 为当归的产地溯源识别及质量控制提供了科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

27 批当归样品产于甘肃、云南、四川, 均为全归, 经上海交通大学王梦月副教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根(表 1)。样品存放于上海交通大学药学院李晓波教授实验室。

表 1 不同产地 27 批次当归药材样品的基本信息

Table 1 Detailed information of 27 batches of *Angelicae Sinensis Radix* samples from different producing areas

编号	产地	样品提供单位	采收时间
S1	甘肃岷县麻子川	自采	2018-09-20
S2	甘肃岷县蒲麻镇	自采	2018-09-25
S3	甘肃岷县中都乡	自采	2018-09-15
S4	甘肃岷县秦许乡	自采	2017-10-20
S5	甘肃岷县十里镇	自采	2017-10-30
S6	四川绵阳盐亭县	自采	2018-10
S7	四川绵阳盐亭县	自采	2018-11
S8	四川绵阳盐亭县	自采	2018-11
S9	四川绵阳平武县	自采	2017-11
S10	四川绵阳平武县	自采	2017-11
S11	云南丽江玉龙县	自采	2018-09
S12	云南丽江玉龙县	自采	2018-09
S13	云南丽江玉龙县	自采	2018-09
S14	云南丽江	滇本草药业	2017-12
S15	云南曲靖	北京时珍堂	2016
S16	云南迪庆维西县	自采	2017-12
S17	云南曲靖	北京时珍堂	2017-10
S18	云南大理鹤庆马厂	上海交通大学云南研究院	2016-10
S19	云南大理洱源	自采	2017
S20	云南大理剑川	上海交通大学云南研究院	2016
S21	云南大理剑川羊岑	滇本草药业	2017-12
S22	云南大理剑川象图	自采	2017-12
S23	云南大理剑川	自采	2018-12
S24	云南大理鹤庆	自采	2017
S25	云南大理剑川	自采	2018-11
S26	云南大理剑川马登	自采	2018-11
S27	云南大理剑川象图	上海交通大学药学院	2018-11

1.2 试剂

对照品阿魏酸(批号 wkq18042309)、阿魏酸松柏酯(批号 wkq18102206)、绿原酸(批号 wkq18022809)、Z-藁本内酯(批号 wkq18110502)、洋川芎内酯 I(批号 wkq18041806)、E-丁烯基苯酞(批号 wkq18092104)均购至四川维克奇生物技术有限公司, 质量分数均大于 98%; 磷酸(色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 乙腈(色谱纯, 北京百灵威科技有限公司); 甲醇(色谱纯, 北京百灵威科技有限公司); 超纯水。

1.3 仪器

SB-5200 DTD 型超声波清洗仪(宁波新芝生物技术有限公司); BS-500A 型电子分析天平[赛多利

斯科学仪器(北京)有限公司]; BJ-500A 型粉碎机(拜杰公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(DAD 检测器)(美国安捷伦公司); Agilent Eclipse XDB-C18 (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱(美国安捷伦公司)。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的制备

取阿魏酸、绿原酸、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯 I、丁烯基苯酞、Z-藁本内酯适量, 精密称定, 加入甲醇配置成质量浓度分别为 0.666、0.724、0.770、0.696、0.664、0.536 mg/mL 的混合对照品溶液, 保存于冰箱备用。

2.2 供试品溶液的制备

取当归药材约 0.1 g, 精密称定, 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 5 mL 甲醇, 称定质量; 试管置于烧杯中, 超声 1 h, 取出后放凉至室温, 再次称定质量, 用甲醇进行补足, 摇匀滤过, 取续滤液高效液相进样分析。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸溶液(A)-乙腈(B), 体积流量 1 mL/min; 梯度洗脱, 0~20 min, 5%~30% B; 20~40 min, 30%~65% B; 40~45 min, 65% B; 45~50 min, 65%~100% B; 50~53 min, 100% B; 53~58 min, 100%~5% B, 58~65 min, 5% B; 检测波长 254、278、316、327 nm; 柱温 35 ℃; 进样量 10 μL。

2.4 不同产地当归样品 HPLC 指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验 选取编号为 S27 的当归样品约 0.1 g, 精密称定, 按“2.2”项下条件制备供试品溶液, 测定方法条件同“2.3”项下, 连续进样 6 次, 分别计算各共有峰的保留时间与峰面积。结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD<0.85%, 各共有峰相对峰面积的 RSD<2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 选取编号为 S27 的当归样品约 0.1 g, 精密称定, 平行 6 份, 按“2.2”项下条件制备供试品溶液, 测定方法条件同“2.3”项下, 分别计算各共有峰的保留时间与峰面积, 结果表明各共有峰的相对保留时间的 RSD<1.0%, 各共有峰的相对峰面积的 RSD<1.2%。表明本方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 选取编号为 S27 的当归样品约 0.1 g, 精密称定, 按“2.2”项下条件制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样, 测定方法

条件同“2.3”项下, 计算各共有峰的保留时间及峰面积。结果各共有峰的相对保留时间的 RSD<1.8%, 各共有峰的相对峰面积的 RSD<2.5%。表明供试品在 24 h 内稳定。

2.4.4 指纹图谱的建立及化学计量学分析 分别精密称取 27 批当归药材粉末, 按“2.2”项下条件制备成全归供试品溶液, 测定方法条件同 2.3 项下。将所得的样品数据全谱导入国家药典委员会组织定型的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》软件中, 采用中位数法, 时间窗口设定为 0.5 min, 选取 S1 作为参照图谱(R), 生成当归药材中药指纹图谱, 并进行相似度计算。将得到的 13 个共有峰的峰面积导入 SPSS (23.0 版本)、SIMCA-P (13.0 版本) 进行 PCA 统计分析、逐步线性判别, 使用 SIMCA-P 进行有监督模式的 PLS-DA 分析, 进行自动拟合求解。使用 Prism GraphPad 8.0 作图。

2.5 指标成分含量测定

2.5.1 方法学考察

(1) 线性关系: 将“2.1”项下配制的混合对照品溶液进行梯度稀释, 配制为 6 份不同浓度的混合对照品溶液。按照“2.3”项下条件进行测定, 以对照品质量浓度为横坐标(X), 以各对照品峰面积为纵坐标(Y) 绘制标准曲线, 计算回归方程及相关系数(r), 结果见表 2, 各成分在浓度范围内线性关系良好。

(2) 最低检测限(LOD): 将对照品溶液稀释多份, 按照“2.3”项下条件进行测定, 以信噪比(S/N) 为 3:1 时的溶液浓度作为 LOD, 结果见表 2。

(3) 最低定量限(LOQ): 将对照品溶液稀释多份, 按照“2.3”项下条件进行测定, 以信噪比(S/N) 为 10:1 时的溶液浓度作为 LOQ, 结果见表 2。

(4) 精密度试验: 选取编号 S27 的当归样品约 0.1 g, 精密称定, 按“2.2”项下条件制备供试品溶液, 测定方法条件同“2.3”项下, 连续进样 6 次, 分别计算各共有峰的保留时间与峰面积。结果表明阿魏酸、阿魏酸松柏酯、绿原酸、Z-藁本内酯、洋川芎内酯 I、E-丁烯基苯酞 RSD 依次为 0.67%、0.63%、0.43%、0.98%、1.20%、0.48%, 表明仪器精密度良好。

(5) 重复性试验: 选取编号 S27 的当归样品约 0.1 g, 精密称定, 平行 6 份, 按“2.2”项下条件制备供试品溶液, 测定方法条件同“2.3”项下, 分别计算各共有峰的保留时间与峰面积, 结果表明各共

表 2 线性关系、LOD 和 LOQ 考察结果

Table 2 Detailed information of standard curve, LOD and LOQ

对照品	标准曲线	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
阿魏酸	$Y=35.3 X-40.8$	0.999	2.66~666	0.006 2	0.016 6
阿魏酸松柏酯	$Y=31.0 X-57.5$	0.999	3.10~770	0.039 8	0.120 7
绿原酸	$Y=22.5 X-61.4$	0.998	2.90~724	0.014 6	0.036 5
Z-藁本内酯	$Y=14.1 X+6.00$	0.998	2.14~664	0.059 6	0.177 4
洋川芎内酯 I	$Y=41.9 X-17.5$	0.999	2.78~696	0.016 5	0.052 3
E-丁烯基苯酐	$Y=18.7 X-17.5$	0.996	2.66~664	0.026 7	0.085 4

有峰的相对保留时间的 $\text{RSD}<1.0\%$, 各共有峰的相对峰面积的 $\text{RSD}<1.2\%$ 。表明本方法重复性良好。

(6) 稳定性试验: 选取编号为 S27 的当归样品约 0.1 g, 精密称定, 按“2.2”项下条件制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测定方法条件同“2.3”项下, 计算各共有峰的保留时间及峰面积。结果各共有峰的相对保留时间的 $\text{RSD}<1.8\%$, 各共有峰的相对峰面积的 $\text{RSD}<2.5\%$ 。表明供试品在 24 h 内稳定。

(7) 加样回收率试验: 取 S27 号当归样品约 0.1 g, 精密称定, 共计 6 份, 每份都大致以 1:1 的比例加入相应化学成分的对照品, 按“2.2”项下条件制备供试品溶液, 测定方法条件同“2.3”项下, 分别记录各共有峰的保留时间与峰面积, 计算各成分的加样回收率和 RSD 值。阿魏酸、阿魏酸松柏酯、绿原酸、Z-藁本内酯、洋川芎内酯 I、E-丁烯基苯酐的加样回收率分别为 95.5%、93.2%、95.4%、95.0%、91.1%、93.2%; RSD 值分别为 1.28%、1.17%、2.01%、0.77%、3.37%、2.18%。

2.5.2 样品测定: 取当归样品约 0.1 g, 精密称定, 按“2.2”项下条件制备供试品溶液, 测定方法条件同“2.3”项下, 记录峰面积, 按标准曲线计算各待测成分的含量。

3 结果与分析

3.1 HPLC 指纹图谱的建立

将 27 批次样品色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”, 建立 27 批样品的 HPLC 指纹图谱 (图 1), 以 S1 为参照图谱, 时间窗口设定为 0.5 min, 以中位数法建立对照图谱 (图 2), 共得到稳定性较好的 13 个色谱峰作为共有峰。取当归对照品溶液, 按照“2.3”项下分析条件进样测定, 通过与混合对照品溶液色谱图比对、查阅文献资料共指认出 8 个色谱峰, 其中 2 号峰为绿原酸, 3 号峰为阿魏酸, 4 号峰为洋川芎内酯 I, 5 号峰为洋川芎内酯 H, 9 号峰为阿魏酸松柏酯, 10 号峰为 E-藁本内

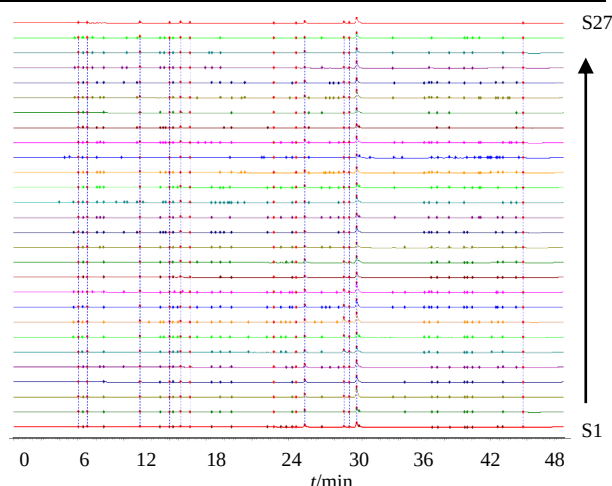
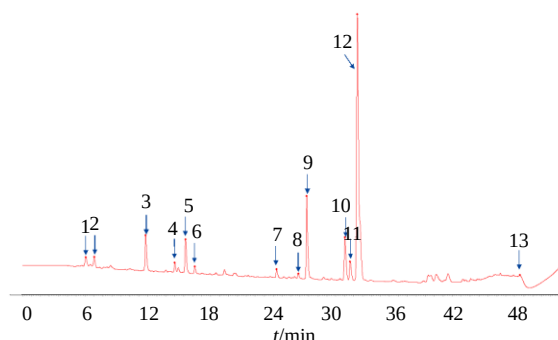


图 1 27 批次当归 HPLC 指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprint of 27 batches of *Angelicae Sinensis Radix*



2-绿原酸 3-阿魏酸 4-洋川芎内酯 I 5-洋川芎内酯 H 9-阿魏酸松柏酯 10-E-藁本内酯 11-E-丁烯基苯酐 12-Z-藁本内酯
2-chlorogenic acid 3-ferulic acid 4-senkyunolide I
5-senkyunolide H 9-coniferylferulate 10-E-ligustilide
11-butyldenephthalide 12-Z-ligustilide

图 2 当归药材 HPLC 对照指纹图谱 (中位数法)

Fig. 2 Reference HPLC fingerprint of *Angelicae Sinensis Radix* (median method)

酯, 11 号峰为 E-丁烯基苯酐, 12 号峰为 Z-藁本内酯。藁本内酯的出峰时间稳定且峰面积占比较大, 作为参比峰, 计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。

3.2 不同产地当归的化学模式识别

3.2.1 相似度评价 采用《中药色谱特征图谱相似度评价系统软件(2012版)》对27批次的当归药材色谱数据进行分析,生成指纹图谱(图1),并计算得到相似度评价结果,结果表明27批次当归药材各色谱图相似度在0.900~0.998。各批次药材与参照图谱S1比较时,S6、S7、S15、S18、S20、S21、S24、S26相似度较为离散,表明各个产地当归之间存在一定差异。

3.2.2 PCA 通过主成分分析共提取了4个特征值大于1的主成分,由当归药材指纹图谱共有峰特征值(表4)可知,4个主成分的累积方差贡献率达到85.260%,说明4个主成分在反映3个产地的当归样品共有成分的关系中起到主导作用。

其中第1个主成分贡献率为34.751%;第2个主成分贡献率为31.718%;第3、4个主成分贡献率分别为10.595%、8.197%。由主成分矩阵(表5)可知各个共有峰对4个主成分不同的贡献率,第1主成分主要代表了峰2~4、10~12;第2主成分主要代表了峰4~8、13;第3主成分的信息主要来自峰9、12、13;第4主成分的信息主要来自峰1。同时采用多元统计分析软件SIMCA-P 14.0对13个共有峰进行PCA分析(图3),可见样品被分为3类:第1类为S1~S5,第2类为S6~S10,第3类为S11~S27,此分类结果与按当归产地分类结果一致,表明前4个主成分可以代表27批次样品的整体质量。

表4 当归药材指纹图谱共有峰特征值

Table 4 Characteristic values of common peaks in HPLC fingerprint of *Angelicae Sinensis Radix*

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比/%	累积方差贡献率/%	总计	方差百分比/%	累积方差贡献率/%
1	4.518	34.751	34.751	4.518	34.751	34.751
2	4.123	31.718	66.469	4.123	31.718	66.469
3	1.377	10.595	77.064	1.377	10.595	77.064
4	1.066	8.197	85.260	1.066	8.197	85.260
5	0.619	4.762	90.022			
6	0.449	3.458	93.480			
7	0.327	2.513	95.993			
8	0.221	1.701	97.693			
9	0.117	0.903	98.597			
10	0.087	0.673	99.270			
11	0.053	0.405	99.675			
12	0.025	0.193	99.868			
13	0.017	0.132	100.000			

表5 共有峰成分矩阵

Table 5 Component matrix of common peaks

峰号	共有峰	主成分			
		1	2	3	4
1	未指认	0.369	-0.632	0.214	0.561
2	绿原酸	0.769	-0.141	-0.327	-0.019
3	阿魏酸	0.833	-0.204	0.128	0.419
4	洋川芎内酯 I	0.702	0.493	-0.439	-0.082
5	洋川芎内酯 H	-0.292	0.820	-0.156	0.224
6	未指认	-0.318	0.852	-0.040	0.176
7	未指认	0.280	0.856	-0.010	0.010
8	未指认	-0.170	0.873	0.086	0.271
9	阿魏酸松柏酯	0.441	0.243	0.501	-0.617
10	E-藁本内酯	0.931	0.165	-0.133	-0.131
11	E-丁烯基苯酞	0.867	0.351	-0.160	0.024
12	Z-藁本内酯	0.680	0.142	0.630	0.073
13	未指认	-0.110	0.545	0.539	0.096

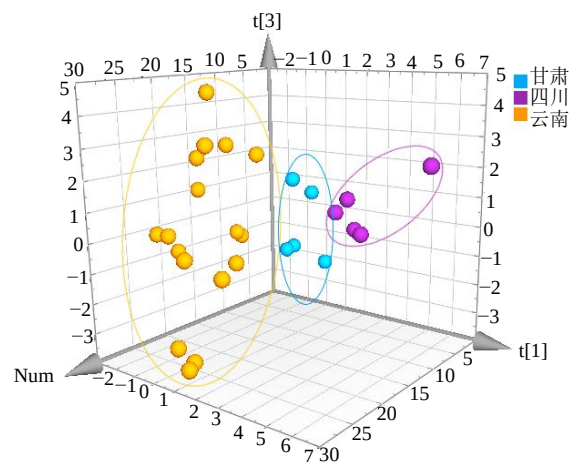


图3 27批次当归主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of 27 batches of *Angelicae Sinensis Radix*

3.2.3 PLS-DA 由 PLS-DA 三维得分图 (图 4) 可知, 3 个产区当归可明显区分, 与 PCA 结果一致, 且组间分离效果更加显著, 进一步通过计算各个共有峰的变量重要性投影 (Variable importance in the projection, VIP) 值 (图 5), 以 VIP 值大于 1 为标准, 筛选可以作为产地间相互区分的差异性指标, 结果显示 Z-藁本内酯 (VIP=2.08), E-藁本内酯 (VIP=1.83), 阿魏酸松柏酯 (VIP=1.75), 绿原酸 (VIP=1.00) 4 个成分是可以作为组间区分的潜在指标, 与主成分分析结果也较为接近。

3.3 不同产地当归的化学成分含量测定及判别分析验证

3.3.1 当归中 6 个指标成分含量测定 由当归 HPLC 指纹图谱共指认出 13 个共有化学成分, 存在 VIP 值大于 1 的 4 个差异性成分, 其中藁本内酯中 Z 型相比 E 型为优势构象, 比 E 型更加稳定, 在中药材中含量也相对较高; 阿魏酸松柏酯由于不稳定易转化为阿魏酸与松柏醇, 在实验中将阿魏酸松柏

酯含量换算为等量阿魏酸, 并与本身测定的阿魏酸之和计入总量, 以“总阿魏酸”表示。因此本试验主要测定了当归样品中总阿魏酸、Z-藁本内酯、绿原酸的含量, 同时考虑到当归中的洋川芎内酯 I, E-丁烯基苯酐也是主要有效成分, 因此一并纳入进行含量测定, 结果见表 6, 可见不同产地当归中化学成分含量存在明显差异。通过分析含量测定结果箱线图 (图 6), 可明确各产地当归中代表性化学成分。四川当归中的绿原酸量均在 0.30 mg/g 以上, 整体高于其他产地 ($P<0.05$), 可作为区分四川当归与其他产地当归的一个指标成分; 洋川芎内酯 I 在云南迪庆维西县采收的当归中质量分数最高, 达到 0.24 mg/g; 四川产区的当归中 E-丁烯基苯酐量基本都在 0.50 mg/g 以上, 高于其他产地当归 ($P<0.0001$), 也可作为区分四川当归与其他产地当归的一个指标成分, 甘肃岷县当归中含量在 0.2~0.3 mg/g, 组内差异不明显, 云南产区的 S16、S18、S19、

表 6 当归中指标成分测定结果

Table 6 Determination results of marker components in *Angelicae Sinensis Radix*

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	绿原酸	洋川芎内酯 I	E-丁烯基苯酐	总阿魏酸 (阿魏酸+阿魏酸松柏酯)	Z-藁本内酯
S1	0.28	0.12	0.30	1.90	29.15
S2	0.21	0.18	0.23	1.58	27.39
S3	0.16	0.15	0.28	2.46	27.12
S4	0.14	0.17	0.20	1.80	24.55
S5	0.25	0.15	0.27	2.19	25.06
S6	0.45	0.10	0.50	1.83	24.28
S7	0.52	0.14	0.53	1.49	22.93
S8	0.41	0.16	0.54	2.66	27.20
S9	0.38	0.12	0.48	2.39	26.02
S10	0.39	0.14	0.54	2.45	27.26
S11	0.11	0.11	0.21	1.42	23.61
S12	0.23	0.18	0.31	2.14	25.08
S13	0.30	0.11	0.21	1.96	23.34
S14	0.11	0.20	0.34	1.84	24.69
S15	0.12	0.18	0.24	1.82	22.31
S16	0.26	0.24	0.39	2.09	25.41
S17	0.15	0.20	0.29	1.98	22.77
S18	0.22	0.18	0.42	1.73	23.98
S19	0.10	0.17	0.31	2.21	21.75
S20	0.20	0.10	0.36	1.64	23.47
S21	0.20	0.20	0.38	2.04	24.70
S22	0.13	0.17	0.19	2.12	22.14
S23	0.27	0.13	0.23	2.58	23.37
S24	0.18	0.12	0.45	1.80	26.01
S25	0.19	0.15	0.29	2.54	24.91
S26	0.21	0.19	0.25	2.57	23.40
S27	0.51	0.17	0.20	2.58	23.92

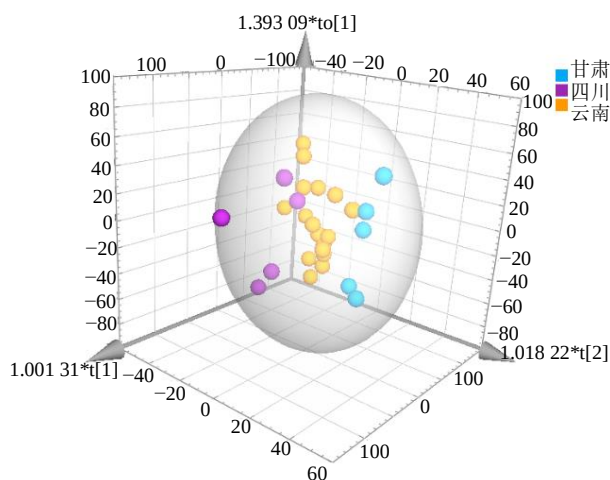


图 4 27 批次当归 PLS-DA 得分图

Fig. 4 PLS-DA scores of 27 batches of *Angelicae Sinensis Radix*

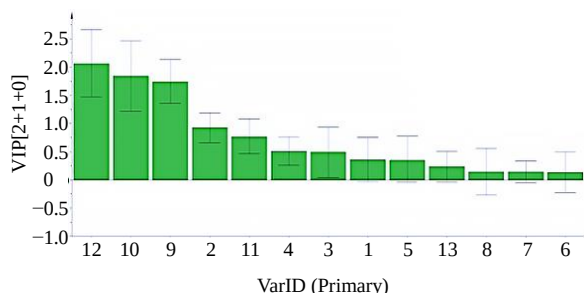


图 5 27 批次当归 13 个共有峰 VIP 值

Fig. 5 VIP values of 13 common peaks of 27 batches of *Angelicae Sinensis Radix*

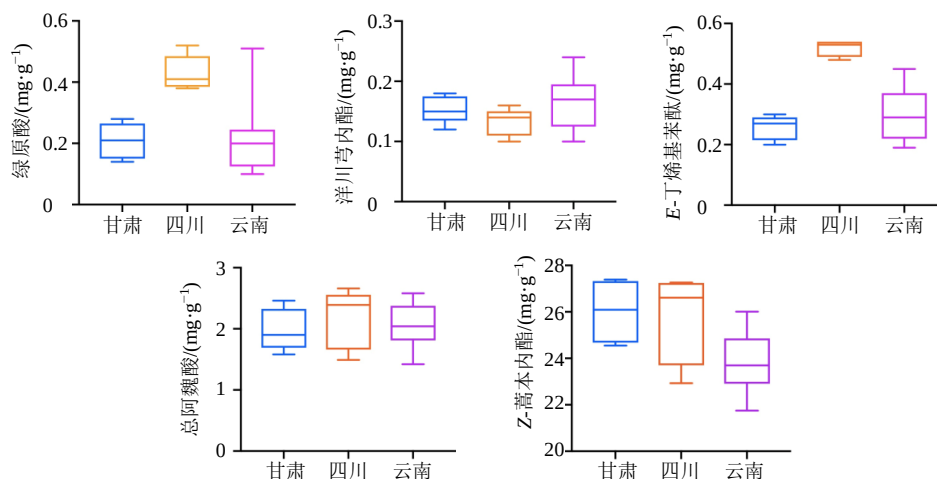


图 6 HPLC 指纹图谱各指标成分含量测定箱线图

Fig. 6 Determination results of marker components of HPLC fingerprint from *Angelicae Sinensis Radix*

S20、S21、S24 号当归 *E*-丁烯基苯酚含量高于云南产地的其他批次当归；27 批次当归中总阿魏酸的质量分数均在 1.42~2.58 mg/g，其中 S8、S23、S25、S26、S27 5 个批次中总阿魏酸的含量均达到了 2.50 mg/g 以上，剑川当归中阿魏酸含量明显高于其他产区 ($P < 0.05$)，可作为区分云南剑川当归与其他产地当归的差异性成分；7 个批次的云南剑川当归中 *Z*-藁本内酯基本都在 23.00 mg/g 以上，云南大理洱源批次当归则为最低，甘肃岷县麻于乡的当归中质量分数最高，达到 29.15 mg/g，岷县蒲麻镇与中都乡产地当归的质量分数也均在 27.00 mg/g 以上，高于其他产地 ($P < 0.05$)，可作为区分甘肃当归与其他产地当归的差异性成分。

3.3.2 FLDA 利用 SPSS 23.0 统计软件的 Fisher 线性判别分析验证指标成分可以作为当归产地识别的适用性，对来自甘肃、四川以及云南的 27 个样本按地区进行分组建模，以绿原酸、洋川芎内酯 I、*E*-丁烯基苯酚、总阿魏酸、*Z*-藁本内酯作为判别变量，根据 Wilks' Lambda 统计量，当被加入的变量 F 值 > 3.84 时，该变量则可以保留在函数中建立判别函数，最终提取到绿原酸(a)、*E*-丁烯基苯酚(b)、*Z*-藁本内酯(c) 3 个变量，建立 2 个判别函数 (discriminant function, DF)。

$$DF(1) = 7.545a - 14.631b - 0.377c + 2.584$$

$$DF(2) = 3.136a - 3.1844b - 0.693c - 16.806$$

DF(1) 携带原始信息的 83.6%，DF(2) 携带原始信息的 16.4%。以 2 个判别函数得分作图，获得典则质心图 (图 7)，可以看出各产地样

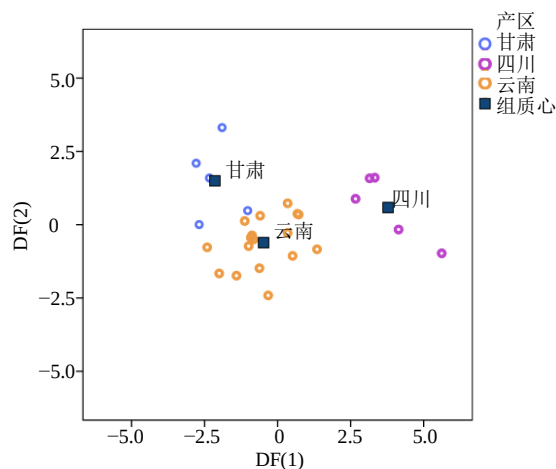


图 7 判别分析典则质心图

Fig. 7 Centroid of canonical discriminant function

本之间各自聚为一类，且存在组间距离，3 个成分对当归产地溯源具备区分潜力。由样本自身验证及交叉验证结果，自身验证判别中只有甘肃产地中一个样本被误判为云南产地，样本总正确判别率达 96.3%；样本交叉验证结果中甘肃产地中一个样本被误判为云南产地，云南产地中一个样本被误判为四川当归样本，样本总正确判别率达 92.6%。表明绿原酸、*Z*-藁本内酯、*E*-丁烯基苯酚可以作为产地区分的指标成分，这一结果与 PLS-DA 分析、及含量测定分析结果基本一致。

4 讨论

本实验利用二极管阵列检测器对当归样品供试液进行全波长扫描，获得 3D 图谱，查看色谱峰的紫外吸收光谱，结果表明当检测波长设定为 254 nm

时, 色谱基线平稳, 色谱峰分离度良好, 色谱峰数目多。通过设计正交试验, 考察超声提取条件。以阿魏酸、阿魏酸松柏酯、绿原酸、*E*-丁烯基苯酐、洋川芎内酯 I、*Z*-藁本内酯的峰面积为评价指标, 对原始数据均值化, 然后取 6 个指标的平均值作为每次试验的试验结果。结果显示, 50 倍的 100% 甲醇超声 60 min 为最优提取条件。

当归品质的形成与非生物因素息息相关, 如水分、光照、海拔等。据考证, 当归最早的出产地在今甘肃宕昌一带, 是公认的当归道地产区^[17], 随着栽培技术的发展, 云南、四川等地的当归产量也逐步提升, 但单纯从当归的外观性状、HPLC 指纹图谱中很难明确其产地来源及内在质量差异。《中国药典》2015 年版中将当归药材的阿魏酸含量作为质量控制指标^[1]。但是在当归中的阿魏酸有 2 种来源, 一是植物本身含有的阿魏酸, 即游离阿魏酸, 另一种是由其他化合物经过某些途径转化为阿魏酸, 阿魏酸松柏酯性质很不稳定, 在甲醇、强酸性、强碱性、光照及高温等环境下易转化为阿魏酸与松柏醇^[18], 药典中测定的阿魏酸含量会高于当归本身含有的阿魏酸, 它实际上包括了游离阿魏酸以及由阿魏酸松柏酯转化而来的阿魏酸的总量; 同时在考察当归样品提取的提取工艺时, 若采用回流提取, 阿魏酸松柏酯会由于受热不稳定分解, 导致样品重现性较差; 采用超声提取, 可减少阿魏酸松柏酯由于加热造成分解挥发, 并将阿魏酸及阿魏酸松柏酯以总阿魏酸的量计入, 可避免由于环境条件改变造成阿魏酸含量发生改变, 含量测定不准确的情况。此外, 当归中还存在其他活性成分, 如苯酐类的藁本内酯、丁烯基苯酐, 有机酸类的阿魏酸、绿原酸等成分均表现出较强的药理活性作用^[11-13], 仅测定阿魏酸的含量, 当归质量特征得不到全面的表征与反映。

本研究结果表明, 云南产区当归中总阿魏酸的含量整体高于其他产区, 特别是剑川当归中总阿魏酸的含量均在 2.00 mg/g 以上, 可作为云南剑川当归区别于其他产区的特异性指标成分, 相似结论也有研究报道^[19-20]。当归中的挥发性成分种类繁多, 主要包括藁本内酯、正丁烯基内酯等, 现代医学认为, 当归挥发性成分在解痉、阵痛、抗炎、抑制血小板聚集等方面都有药理活性^[5]。甘肃产区当归中挥发性成分 *Z*-藁本内酯可作为甘肃当归的成分识别标志; 四川当归中除了 *E*-丁烯基苯酐之外、绿原酸含量也明显高于其他产区, 可作为四川当归的成

分识别标志。本实验注重于不同产区当归内在质量差异, 由 PCA、PLS-DA 寻找到的潜在性差异性成分可实现不同产地当归的区分溯源, 并对各个产地当归的特异性识别成分进行归属, 并经由判别分析验证结果可靠性, 寻找到不同产地当归的“识别标志”, 以期能为当归药材的质量控制及产地识别提供依据, 对于当归规范化种植、提升药材质量和临床疗效上也有积极意义。

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: 133-134.
- [2] 王华, 孙娜. 当归的有效化学成分及药理作用研究进展分析 [J]. 山东化工, 2017, 46(18): 59-60.
- [3] 黄红泓, 覃日宏, 柳贤福. 中药当归的化学成分分析与药理作用探究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(58): 127.
- [4] Zhang Y, Zhou T, Luo L, et al. Pharmacokinetics, biodistribution and receptor mediated endocytosis of a natural *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(Sup1): 254-263.
- [5] 王志旺, 李荣科, 蔺兴遥, 等. 当归主咳逆上气的中医药理论及现代研究与应用 [J]. 新中医, 2016, 48(1): 4-6.
- [6] 曹颜冬. 当归化学成分及药理作用的分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(2): 93.
- [7] Lai P, Liu Y X. *Angelica sinensis* polysaccharides inhibit endothelial progenitor cell senescence through the reduction of oxidative stress and activation of the Akt/hTERT pathway [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(12): 1842-1849.
- [8] Fraternali D, Flamini G, Ricci D. Essential oil composition of *Angelica archangelica* L. (Apiaceae) roots and its antifungal activity against plant pathogenic fungi [J]. *Plant Biosyst - Int J Deal Aspects Plant Biol*, 2016, 150(3): 558-563.
- [9] 孙红梅. 当归药材资源调查与品质特征的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2010: 20.
- [10] Xie P S, Leung A Y. Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of Chinese materia medica [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1933-1940.
- [11] Liu J, Zhou J, Zhang Q Q, et al. Monosaccharide analysis and fingerprinting identification of polysaccharides from *Poria cocos* and *Polyporus umbellatus* by HPLC combined with chemometrics methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 406-411.

- [12] Huang Y L, Huang Z P, Watanabe C, et al. Authentication of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenantherae* in Chinese patent medicines by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and fingerprint analysis [J]. *J Anal Appl Pyrolysis*, 2019, 137: 70-76.
- [13] Wang X, Li B Q, Xu M L, et al. Quality assessment of Traditional Chinese Medicine using HPLC-PAD combined with Tchebichef image moments [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1040: 8-13.
- [14] Wang Z Z, Shao S J. Evaluation of the quality of *Angelica sinensis* by high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Lett*, 2014, 47(18): 2857-2870.
- [15] Li Y, Wang S W, Tu H H, et al. Simultaneous quantification of six main active constituents in Chinese *Angelica* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector [J]. *Pharmacogn Mag*, 2013, 9(34): 114-119.
- [16] Qian Y Y, Wang Y L, Sa R N, et al. Metabolic fingerprinting of *Angelica sinensis* during growth using UPLC-TOFMS and chemometrics data analysis [J]. *Chem Cent J*, 2013, 7(1): 42.
- [17] 武延安, 陈秀实. 古本草中当归产地的商榷与新考 [J]. *中国现代中药*, 2016, 18(10): 1354-1358.
- [18] Lu G H, Chan K, Leung K, et al. Assay of free ferulic acid and total ferulic acid for quality assessment of *Angelica sinensis* [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1068(2): 209-219.
- [19] 吴雪荣. 当归中有效成分含量与不同产地的相关性分析 [J]. *中医临床研究*, 2015, 7(28): 15-16.
- [20] 苏华丽, 谭梅英, 张诚光. 不同产地当归中阿魏酸的含量分析 [J]. *湖南中医杂志*, 2013, 29(7): 126-128.

[责任编辑 时圣明]