

白术饮片的指纹图谱形状特征与质量标志物 (Q-Marker) 研究

谭小娟^{1,2,4}, 李世雄^{1,4#}, 李璎峪^{1,4}, 赵靖^{1,4}, 李原华^{1,4}, 刘瑞连³, 刘文龙^{1,4*}, 张喜利^{1,4*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
2. 浏阳市中医医院, 湖南 浏阳 410300
3. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410208
4. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 根据白术 *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* 指纹图谱形状特征, 建立一种快速精准辨识不同产地与炮制品的方法。方法 建立 45 批不同产地与炮制法的白术 UPLC 指纹图谱库, 运用总量统计矩及相似度法、正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 法辨析此指纹图谱的形状特点, 捕获其特征指纹图谱及特征峰。结果 生品、麸炒、土炒白术 UPLC 指纹图谱的共有峰 16 个; 安徽与湖南、安徽与浙江、湖南与浙江产地的生白术的总量统计矩相似度分别为 0.774~0.982、0.799~0.969、0.788~0.886; 3 产地的生品与麸炒、生品与土炒、麸炒与土炒白术的总量统计矩相似度中最大值为 0.990, 最小值为 0.774。再结合 OPLS-DA 法中变量重要性投影 (variable importance for the projection, VIP) 分析获得其中 1~3、6、16 号为区分贡献度最大的 5 个标志峰, 确认 6 号峰为白术内酯 II。结论 这 5 个标志峰对应物质可认定白术的潜在质量标志物 (Q-Marker), 为白术的产地、炮制法的精准识别及其质量控制与评价提供理论与实验依据, 同时也为中药指纹图谱辨形论质做了积极探索。

关键词: 白术; 指纹图谱; 辨形论质; 总量统计矩相似度法; OPLS-DA; 质量标志物; 炮制; 质量控制

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-4844-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.009

Study on fingerprint shape characteristics and quality markers of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*

TAN Xiao-juan^{1, 2, 4}, LI Shi-xiong^{1, 4}, LI Ying-yu^{1, 4}, ZHAO Jing^{1, 4}, LI Yuan-hua^{1, 4}, LIU Rui-lian³, LIU Wen-long^{1, 4}, ZHANG Xi-li^{1, 4}

1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Liuyang Hospital of Chinese Medicine, Liuyang 410300, China
3. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
4. Hunan Key Laboratory of Drug Gability and Preparation Modification of TCM, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To establish a rapid and accurate identification method for different processed products and producing areas based on the fingerprint shape characteristics of Baizhu [*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* (AMR)]. **Methods** A UPLC fingerprint database of 45 batches of AMR from different producing areas and processing methods was established. The shape characteristics of the fingerprint were analyzed by presidential statistical moment similarity method and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) method, and the characteristic fingerprint and characteristic peaks were captured. **Results** There were 16 common peaks in UPLC fingerprints of AMR, bran-processed AMR, soil-processed AMR; The presidential moment similarity between Anhui and Hunan, Anhui and Zhejiang, Hunan and Zhejiang were 0.774—0.982, 0.799—0.969 and 0.788—0.886, respectively. The maximum and minimum of the presidential moment similarity of crude products and bran-processed, crude

收稿日期: 2021-04-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874344); 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ40220); 湖南省自然科学基金资助项目 (2021JJ30514); 湖南省中管局项目 (2021204); 湖南省中管局项目 (2021073); 湖南省教育厅项目 (19A366); 湖南省教育厅项目 (19A382); 湖南省教育厅项目 (19C1435); 长沙市科技计划项目 (kq1907136); 湖南省一流学科开放基金项目 (2018YX11)

作者简介: 谭小娟, 女, 硕士研究生, 从事中药质量研究。Tel: 18711012368 E-mail: 18711012368@163.com

***通信作者:** 刘文龙, 教授, 博导, 从事中药质量与药剂学等研究工作。Tel: 13974821547 E-mail: dragon5240@126.com

张喜利, 女, 副教授, 从事中药成药性研究。Tel: 18229764227 E-mail: xiaoli610@126.com

#并列第一作者: 李世雄, 男, 硕士研究生, 从事中药质量研究。Tel: 15339772189 E-mail: 576555387@qq.com

products and soil-processed, bran-processed and soil-processed AMR from the three areas were 0.990 and 0.774, respectively. Combined with VIP analysis (variable importance for the projection) by OPLS-DA method, 1—3, 6, 16 peaks were the five marker peaks with the largest contribution to discrimination. Peak 6 was identified as atractylenolide II. **Conclusion** The corresponding substances of these five marker peaks can be identified as the potential quality markers of AMR, which provides theoretical and experimental basis for accurate identification areas, processing method, quality control and evaluation of AMR, and makes active exploration on the quality of TCM fingerprint.

Key words: *Atractylodes Macrocephalae Rhizoma*; fingerprint; quality by distinguishing shape; presidential moment similarity; OPLS-DA; quality markers; processing drugs; quality control

中药指纹图谱具有整体性的特点，突出中药的完整面貌，在中药及其复方的质量研究中已逐渐展现出独特的优势^[1-10]。中药整张指纹图谱的形状特征能够全面反映所含成分的种类与含量，欲从宏观上评价控制中药质量，需对其形状特征进行定性定量分析。常见的指纹图谱分析法有夹角余弦法、相关系数法、主成分分析法等。总量统计矩相似度法是本实验团队早期建立的定性定量辨识中药指纹图谱形状特征的新方法^[11]。该方法在指纹图谱的数学分析方面有其独特优势，不仅具有抗干扰性，能够降低各峰分离状态、形状等测试方法的要求，并且具有加合运算的特征，能消除溶剂干扰，获得纯品的总量统计矩参数；能与多维向量偶联构成多维曲线中心矩及偏差分析。其中总量零阶矩为定量分析参数，总量一阶矩与总量二阶矩为定性分析参数^[12-15]。

白术为菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz.的干燥根茎。味苦、甘，温。归脾、胃经。有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎功效^[16]。白术在《神农本草经》中被列为上品，主产于南方各地，其中浙江地区产量最大，质量最好^[17]。麸炒法和土炒法为白术现代炮制的常用方法，且《中国药典》2020年版收载了白术和麸炒白术2种饮片规格。研究表明，麸炒白术能够“减酮减燥，增酯增效”，减少对胃肠的刺激性，缓和药性^[18-19]；土炒白术有提高机体抗炎和抗癌效果，增强抗氧化、免疫能力等功效^[20]。

中药质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 能够以整体、系统、量化的标准对中药质量进行综合性评价，其与中药的本身属性、炮制工艺、药理作用、生物代谢等息息相关^[21]。近年来有关白术的药理作用、化学成分等研究较为全面，而指纹图谱研究更多针对于单一产地或单一炮制品，未曾系统建立白术的 UPLC 指纹图谱库，缺乏系统内部比较与大数据更难以寻找 Q-Marker，且缺乏一种快速精准判断的方法。本研究将基于总量统计矩相似度法

及正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 法分析指纹图谱，通过辨析白术饮片指纹图谱形状特点，评论生白术、麸炒白术、土炒白术3种炮制品，安徽、湖南、浙江3个产地白术饮片之间的质量异同，获得白术饮片的特征指纹图谱，锁定其质量标志物，为白术的产地、炮制的精准识别及其质量控制与评价提供新思路与方法。最终为中药质量控制与评价提供新视野与实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Acquity UPLC H-Class 系统，四元溶剂泵、自动进样装置、在线真空脱气装置、PDA 检测器、Empower3 色谱工作站、柱温箱，美国沃特世公司；MS205DU 电子分析天平，Mettler Toledo 集团；JCS-31002C 电子天平，哈尔滨众汇衡器有限公司；SHZ-D (III) 循环水式真空泵，巩义市予华仪器有限责任公司；DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱，杭州蓝天化验仪器厂；SB-5200 DTD 超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 药材与试剂

白术原药材来源于安徽、湖南、浙江当地药材市场，经湖南中医药大学中药鉴定教研室石继连教授鉴定为菊科植物白术 *A. macrocephala* Koidz. 的干燥根茎，批号及产地见表1。

对照品白术内酯 I (批号 DST181006-014，质

表1 白术原药材产地批次信息
Table 1 Origin batches of AMR

编号	批号	产地	编号	批号	产地	编号	批号	产地
AH1	200116	安徽	HN1	190310	湖南	ZJ1	190310	浙江
AH2	200518		HN2	190412		ZJ2	190412	
AH3	200319		HN3	190510		ZJ3	190510	
AH4	200119		HN4	190612		ZJ4	190612	
AH5	200315		HN5	190712		ZJ5	190712	

量分数 $\geq 99\%$)、白术内酯 II(批号 DST180122-015, 质量分数 $\geq 99\%$), 成都德斯特生物技术有限公司; 磷酸, 重庆川东化工有限公司, 分析纯, 批号 20140801; 乙腈(批号 19035217)、甲醇(批号 20035265), 色谱纯, 美国天地公司; 麦麸, 中粮面业(濮阳)有限公司; 灶心土为湖南当地采购; 水为怡宝纯净水; 0.22 μm 微孔滤膜。

2 方法与结果

2.1 麸炒白术、土炒白术的制备

2.1.1 麸炒白术 取安徽、湖南、浙江共 15 批白术饮片, 按《全国中药炮制经验与规范集成(增修版)》麸炒白术(湖南 2010)^[22]进行麸炒白术的炮制。取净白术片, 按白术-麦麸 10:1 比例, 将麦麸撒入热铁锅内, 待冒烟时, 投入白术片, 不断翻炒, 炒至白术呈黄棕色, 偶见焦斑。略有焦香气。筛去麦麸即可。安徽产地对应编号为 AH6~AH10, 湖南产地对应编号为 HN6~HN10, 浙江产地对应编号为 ZJ6~ZJ10。

2.1.2 土炒白术 取安徽、湖南、浙江共 10 批白术饮片, 按《全国中药炮制经验与规范集成(增修版)》土炒白术(湖南 2010)^[22]进行土炒白术的炮制。取净白术片, 按白术-灶心土 4:1 比例, 将土粉置铁锅内, 用中火加热, 炒至土呈灵活状态时, 投入白术片, 炒至白术表面均匀挂土粉时, 筛去土粉即可。安徽产地对应编号为 AH11~AH15, 湖南产地对应编号为 HN11~HN15, 浙江产地对应编号为 ZJ11~ZJ15。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取白术内酯 I 对照品 1.13 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇制成 226 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 即得; 精密称取白术内酯 II 对照品 2.40 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成 96 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 即得。取白术内酯 I、II 对照品溶液各 500 μL , 制成混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取白术饮片粉末(过四号筛)约 2 g, 称定后置 50 mL 锥形瓶中, 加入甲醇 35 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件

Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.05%磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~4 min, 5%~48%乙腈; 4~

15 min, 48%~49%乙腈; 15~28 min, 49%~95%乙腈; 28~30 min, 95%~5%乙腈; 柱温 28 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 2 μL ; 全波长扫描 200~400 nm, 通过比对, 选取 240 nm。

2.4 精密度试验

取 ZJ2 白术药材粉末, 按“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件重复进样 6 次, 记录指纹图谱, 以白术内酯 I 为参比峰, 计算图谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.88%, 相对峰面积 RSD 为 0.20%~3.08%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.5 重复性试验

取 ZJ2 白术药材粉末 6 份, 按“2.2.2”项方法平行制备供试品溶液 6 份, 按上述色谱条件测定, 记录色谱图, 以白术内酯 I 色谱峰为参比峰, 计算各主要色谱峰相对峰面积和相对保留时间。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.66%, 相对峰面积 RSD 为 1.42%~4.73%, 表明实验重复性良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.6 稳定性试验

取 ZJ2 白术药材粉末, 按“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件下分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行测定, 记录色谱图, 以白术内酯 I 色谱峰为参照峰, 计算各主要色谱峰相对峰面积和相对保留时间。结果在 0~24 h 内, 各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.28%, 相对峰面积 RSD 为 0.89%~4.91%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 白术、麸炒白术、土炒白术 HPLC 指纹图谱的建立

将 45 批白术及炮制品药材样品, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按照“2.3”项下的色谱条件进样, 记录各样品溶液的色谱图。将 45 批白术及其炮制品指纹图谱数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度软件评价系统(2012版)”, 以中位数法, 时间窗宽度为 0.5 min, 经多点校正后, 分别生成生白术、麸炒白术、土炒白术的对照指纹图谱。

通过比对筛选确定生白术、麸炒白术土炒白术共有 16 个共有标志峰。经过色谱比对, 指出其中 6 号峰为白术内酯 II, 10 号峰为白术内酯 I, 且峰 6、10 分离度均大于 1.5。45 批白术及炮制品指纹图谱叠加见图 1, 生白术、麸炒白术、土炒白术对照指

纹图谱及白术内酯 I、白术内酯 II 混合对照品溶液
图谱见图 2。

2.8 不同产地白术药材分析

2.8.1 指纹图谱总量统计矩相似度法分析 总量统

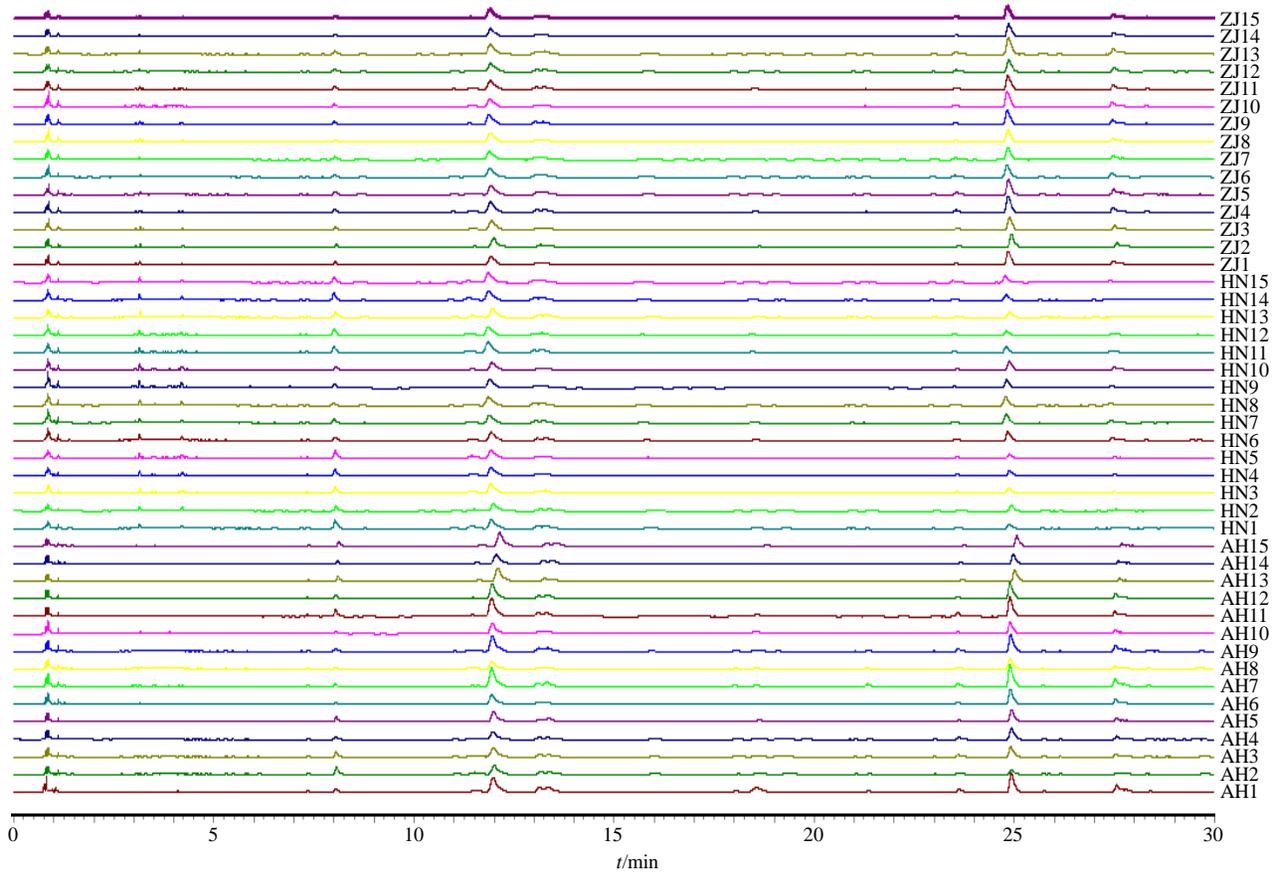


图 1 45 批白术饮片 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprint of 45 batches of AMR

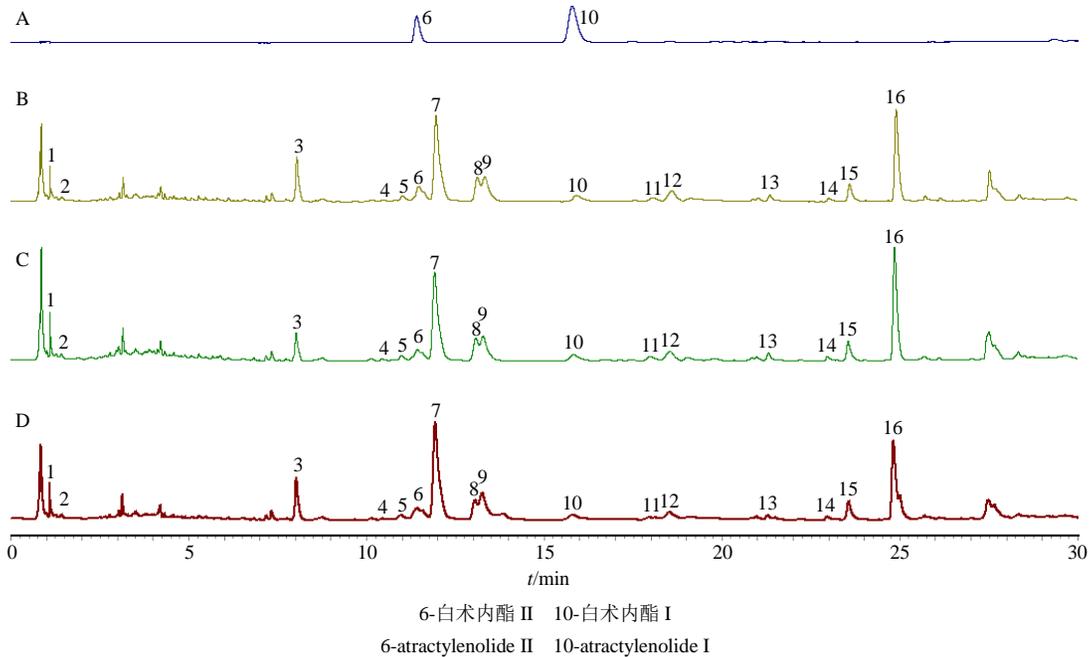


图 2 混合对照品 HPLC 图 (A) 及白术 (B)、麸炒白术 (C)、土炒白术 (D) 对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC of mixed reference substances (A), and fingerprints of AMR (B), bran-processed AMR (C) and soil-processed AMR (D)

计矩相似度法计算 3 产地 15 批白术 UPLC 指纹图谱相似度, 其相似度结果见表 2。安徽白术与湖南白术相似度为 0.774~0.982, 安徽白术与浙江白术相似度为 0.799~0.969, 湖南白术与浙江白术相似度为 0.788~0.886, 结果表明, 3 产地之间的相似度明显较低, 尤其是湖南与浙江的白术相似度没有高

于 0.89 的样品。表明白术不同产地之间成分群含量差异明显。

2.8.2 OPLS-DA 将 15 批 3 产地白术指纹图谱 16 个特征峰峰面积数据导入 SMICA 13.0 中进行 OPLS-DA, 根据白术 UPLC 指纹图谱 16 个特征峰峰面积得到得分图结果见图 3。依据得分图, 生白

表 2 3 产地 15 批白术指纹图谱总量统计矩相似度

Table 2 Presidential moment similarity of fingerprint of 15 batches of AMR from three regions

样品	指纹图谱总量统计矩相似度														
	AH1	AH2	AH3	AH4	AH5	HN1	HN2	HN3	HN4	HN5	ZJ1	ZJ2	ZJ3	ZJ4	ZJ5
AH1	1.000	0.820	0.913	0.910	0.913	0.798	0.835	0.781	0.806	0.774	0.937	0.930	0.937	0.951	0.935
AH2	0.820	1.000	0.872	0.865	0.875	0.982	0.944	0.981	0.959	0.974	0.811	0.835	0.828	0.799	0.815
AH3	0.913	0.872	1.000	0.980	0.983	0.883	0.922	0.866	0.893	0.860	0.937	0.960	0.954	0.926	0.941
AH4	0.910	0.865	0.980	1.000	0.963	0.878	0.917	0.861	0.889	0.856	0.945	0.969	0.961	0.932	0.949
AH5	0.913	0.875	0.983	0.963	1.000	0.885	0.922	0.868	0.893	0.861	0.928	0.949	0.945	0.920	0.932
HN1	0.798	0.982	0.883	0.878	0.885	1.000	0.960	0.982	0.977	0.975	0.823	0.847	0.839	0.810	0.827
HN2	0.835	0.944	0.922	0.917	0.922	0.960	1.000	0.944	0.971	0.938	0.862	0.886	0.879	0.849	0.867
HN3	0.781	0.981	0.866	0.861	0.868	0.982	0.944	1.000	0.969	0.992	0.806	0.830	0.822	0.793	0.811
HN4	0.806	0.959	0.893	0.889	0.893	0.977	0.971	0.969	1.000	0.966	0.834	0.858	0.851	0.821	0.839
HN5	0.774	0.974	0.860	0.856	0.861	0.975	0.938	0.992	0.966	1.000	0.801	0.824	0.817	0.788	0.805
ZJ1	0.937	0.811	0.937	0.945	0.928	0.823	0.862	0.806	0.834	0.801	1.000	0.976	0.983	0.984	0.995
ZJ2	0.930	0.835	0.960	0.969	0.949	0.847	0.886	0.830	0.858	0.824	0.976	1.000	0.992	0.963	0.981
ZJ3	0.937	0.828	0.954	0.961	0.945	0.839	0.879	0.822	0.851	0.817	0.983	0.992	1.000	0.971	0.986
ZJ4	0.951	0.799	0.926	0.932	0.920	0.810	0.849	0.793	0.821	0.788	0.984	0.963	0.971	1.000	0.980
ZJ5	0.935	0.815	0.941	0.949	0.932	0.827	0.867	0.811	0.839	0.805	0.995	0.981	0.986	0.980	1.000

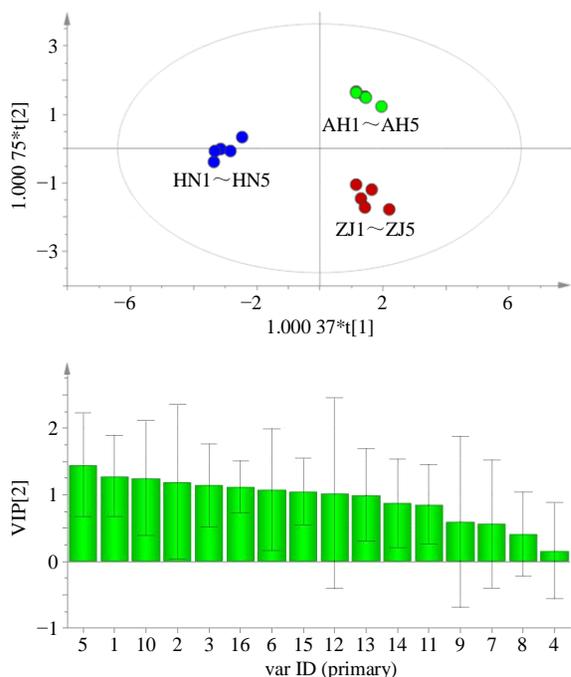


图 3 3 产地白术 OPLS-DA 得分图和 VIP 图

Fig. 3 OPLS-DA diagram and VIP diagram of AMR from three areas

术饮片按照产地不同, 依据本方法可以明显的区分为 3 类, 即安徽、湖南、浙江。其中该模型的主成分回归系数 $Q^2_Y=0.894>0.5$, 说明模型的预测能力较强, 表明样本间具有明显分离的趋势; $R^2_Y=0.971$, 说明自变量(共有峰)的变化能够解释导致 97.1% 不同分类(因变量)的发生, 表明模型的拟合度较好。其分离程度明显也与相似度差异较大相佐证。16 个特征峰在区别白术不同产地的贡献程度, 按照变量重要性投影(variable importance for the projection, VIP) 值 >1 为原则, 得出 1~3、5、6、10、12、15、16 峰对区分样品作用较大, 是区分不同产地间样品的关键峰。

2.9 不同白术炮制品分析

2.9.1 总量统计矩相似度法分析 总量统计矩方法计算 45 批白术及其炮制品的 UPLC 指纹图谱相似度, 其总量统计矩参数结果见表 3。总量零阶矩 (AUC_T), 总量一阶矩 (λ_T), 总量二阶矩 (σ_T^2) 依据总量统计矩相似度法^[11-15]计算, 15 批白术指纹图谱的总量统计矩相似度为 0.800~0.998, 15 批麸炒

白术相似度为 0.847~0.995, 15 批土炒白术相似度为 0.907~0.998。15 批白术与麸炒白术的相似度为 0.746~0.990, 白术与土炒白术相似度为 0.789~0.990, 麸炒白术与土炒白术相似度为 0.760~0.989, 不同炮制品之间相似度下降, 白术与各炮制品之间存在差异性。

2.9.2 不同炮制品指纹图谱分析 以白术、麸炒白术、土炒白术的对照指纹图谱为依据进行分析可知, 麸炒白术、土炒白术与白术指纹图谱差异不大, 但其中化学成分的含量发生明显的变化, 其含量变化也是区分不同炮制品的关键方向。结果见图 4。白术麸炒后, 峰 1、7 有所增加, 峰 16 含量有了明显

的增加; 峰 3、6 含量有明显的减少。白术土炒后、峰 8、9 含量有所增加, 峰 7、16 有明显增加, 其余峰含量与白术相近。通过图 4 可明显看出, 峰 7、15、16 的相对峰面积, 均为白术炮制后(麸炒、土炒) > 炮制前(生品), 且变化较为明显, 峰 5、6、12 的相对峰面积均为白术炮制前(生品) > 炮制后(麸炒、土炒), 其中峰 12 减少较为明显, 其余峰炮制前后峰面积相近。白术内酯 I 炮制前后含量并没有明显改变, 表明其作为评价研究不同炮制品的属性差异作用较小。白术内酯 II 在土炒后含量变化较小, 但麸炒之后白术内酯 II 的含量有明显的减少。

2.9.3 OPLS-DA 将白术炮制品指纹图谱 16 个特

表 3 45 批白术、麸炒白术、土炒白术总量统计矩参数

Table 3 Presidential moment parameters of 45 batches of AMR, bran-processed AMR and soil-processed AMR

样品	AUC _T	λ _T /min	σ _T ² /min ²	样品	AUC _T	λ _T /min	σ _T ² /min ²	样品	AUC _T	λ _T /min	σ _T ² /min ²
AH1	9.163×10 ⁶	16.885	65.671	HN1	6.941×10 ⁶	15.472	84.561	ZJ1	9.710×10 ⁶	16.227	67.897
AH2	6.014×10 ⁶	12.569	64.063	HN2	1.088×10 ⁷	15.789	79.317	ZJ2	7.968×10 ⁶	15.904	70.035
AH3	6.117×10 ⁶	15.161	76.894	HN3	5.731×10 ⁶	14.364	95.206	ZJ3	6.654×10 ⁶	15.407	67.864
AH4	5.410×10 ⁶	15.252	83.277	HN4	9.615×10 ⁶	15.109	80.629	ZJ4	5.471×10 ⁶	15.151	71.455
AH5	6.548×10 ⁶	15.109	71.734	HN5	8.550×10 ⁶	12.649	81.850	ZJ5	6.747×10 ⁶	15.111	63.497
AH6	7.195×10 ⁶	12.701	68.826	HN6	8.305×10 ⁶	12.296	85.053	ZJ6	9.154×10 ⁶	14.632	86.237
AH7	5.735×10 ⁶	13.443	76.015	HN7	8.527×10 ⁶	11.771	82.886	ZJ7	7.807×10 ⁶	14.641	92.224
AH8	7.490×10 ⁶	12.324	68.509	HN8	7.646×10 ⁶	12.431	82.261	ZJ8	8.637×10 ⁶	14.464	90.752
AH9	7.127×10 ⁶	12.812	75.586	HN9	1.710×10 ⁷	11.320	95.749	ZJ9	8.387×10 ⁶	14.344	90.622
AH10	6.918×10 ⁶	12.174	69.470	HN10	8.809×10 ⁶	15.134	99.448	ZJ10	7.051×10 ⁶	13.032	70.863
AH11	7.087×10 ⁶	16.517	84.543	HN11	7.158×10 ⁶	15.015	89.782	ZJ11	6.935×10 ⁶	16.673	85.817
AH12	6.742×10 ⁶	15.971	83.728	HN12	7.205×10 ⁶	15.463	88.900	ZJ12	6.676×10 ⁶	15.858	85.941
AH13	6.721×10 ⁶	16.136	82.465	HN13	7.454×10 ⁶	14.907	92.588	ZJ13	7.846×10 ⁶	17.007	81.918
AH14	7.610×10 ⁶	16.792	80.469	HN14	7.763×10 ⁶	15.342	87.631	ZJ14	6.497×10 ⁶	16.694	86.990
AH15	7.561×10 ⁶	16.411	85.074	HN15	7.705×10 ⁶	15.545	94.268	ZJ15	7.148×10 ⁶	16.082	82.563

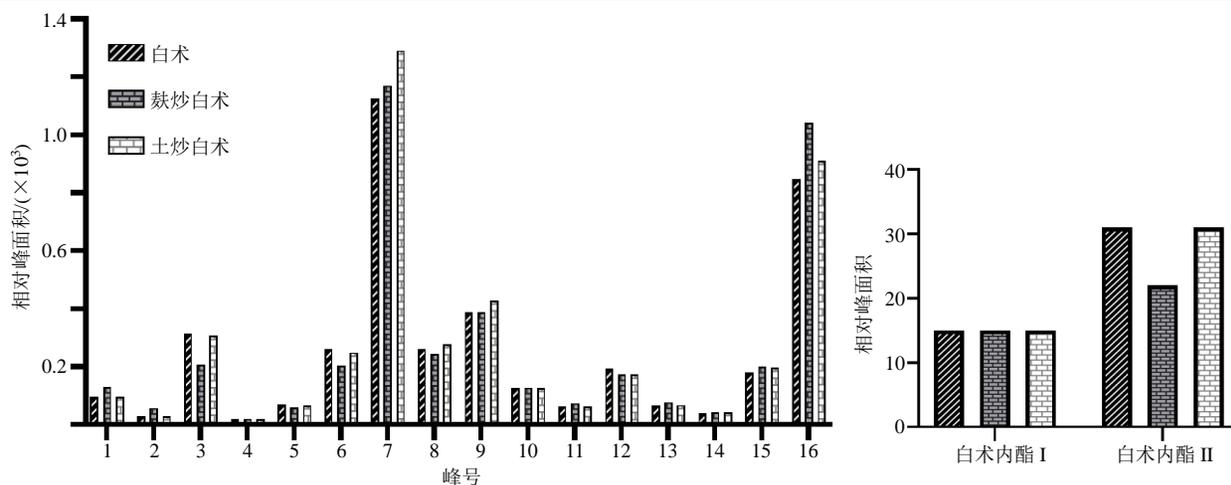


图 4 白术炮制前后共有峰峰面积及白术内酯 I、白术内酯 II 含量变化

Fig. 4 Changes of peak area and content of atractylenolide I and atractylenolide II before and after AMR processing

征峰峰面积数据导入 SMICA 13.0 中, 按照 3 个产地分别进行 OPLS-DA, 根据白术炮制品 UPLC 指纹图谱 16 个特征峰峰面积得到 OPLS-DA 得分图结果见图 5。根据 OPLS-DA 得分图, 3 个产地中的白术炮制品均可以明显的区分为 3 类, 即白术、麸炒白术、土炒白术, 表明白术炮制前后具有明显的差异性, 该结果具有规律性, 且与相似度分析佐证。

16 个特征峰在区别白术炮制前后的贡献程度, 按照 VIP>1 为原则, 综合 3 个产地的结果得出 1~3、6、16 峰对区分样品作用大, 是区分样品的关键色谱峰, 其中峰 6 即为白术内酯 II。

结合“2.8.2”项中区分不同产地的关键峰, 得出 1~3、6、16 峰既是区分不同炮制品, 又是区分不同产地的关键峰。

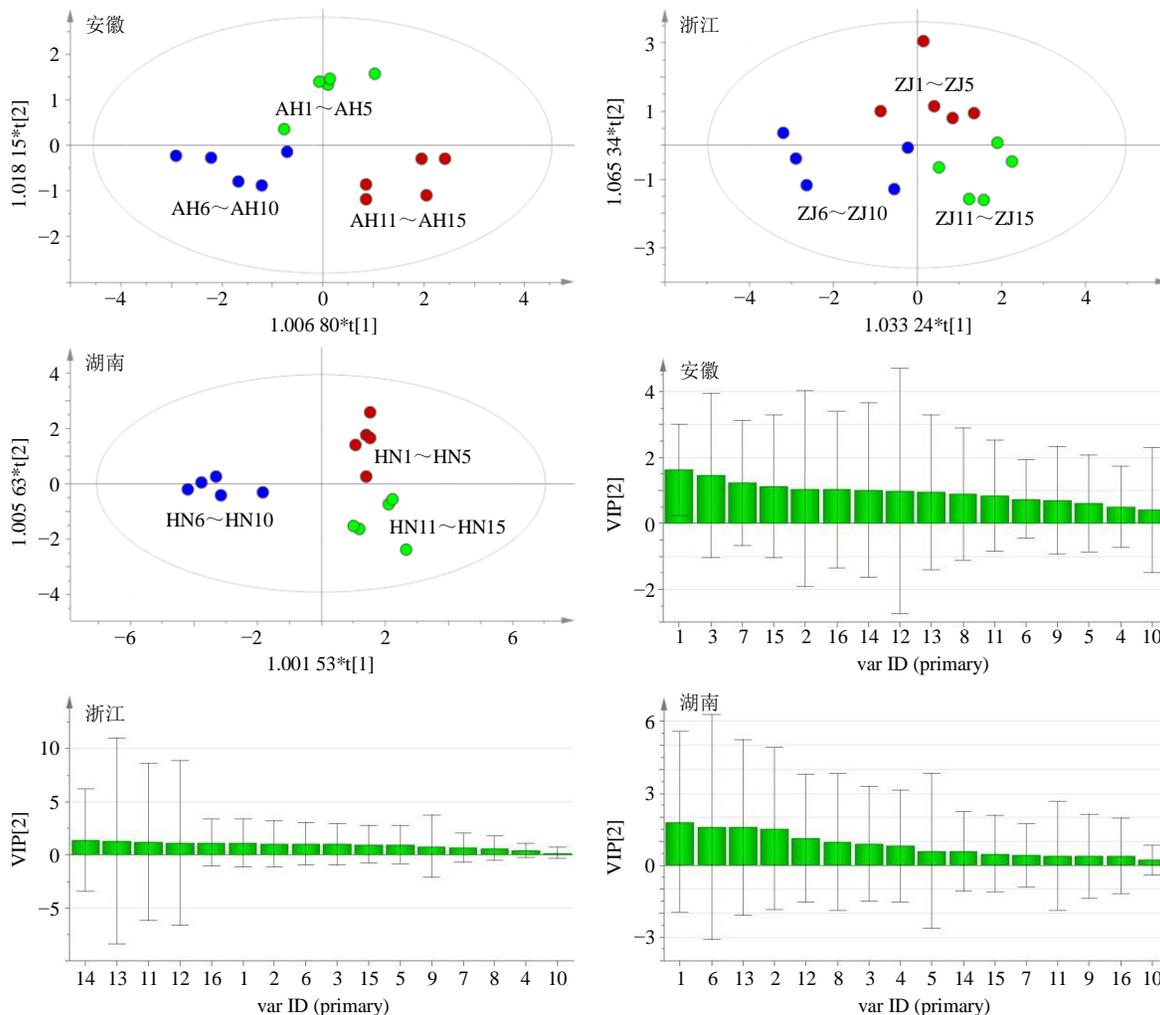


图 5 3 产地白术 3 种炮制品指纹图谱 OPLS-DA 图和 VIP 图

Fig. 5 OPLS-DA diagram and VIP diagram of three AMR processed products from three areas

3 讨论

在白术饮片指纹图谱探索中, 流动相共研究了水-甲醇、水-乙腈、0.05%磷酸水溶液-乙腈, 发现 0.05%磷酸水溶液-乙腈按照洗脱程序洗脱时, 色谱峰分离度较好, 出峰稳定, 峰形较好, 故流动相选用 0.05%磷酸水溶液-乙腈; 柱温考察了 28、30、35 °C, 发现柱温为 28 °C 时, 色谱峰分离度较好, 出峰时间适中, 故柱温选择了 28 °C。体积流量考察了 0.1、0.2、0.3、0.4 mL/min, 发现体积流量为 0.3 mL/min 时, 出峰时间适中, 色谱峰分离度较好, 且考虑到

时间成本等关系, 故体积流量选择了 0.3 mL/min。

本研究采用 UPLC 技术, 建立了白术、麸炒白术、土炒白术的指纹图谱, 研究辨析不同产地、不同炮制品的中药指纹图谱的形状特点, 标定出 16 个指纹图谱特征峰, 指认出白术内酯 I、白术内酯 II 2 个色谱峰, 并基于本团队总量统计矩相似度计算相似度, 结合 OPLS-DA 法发现不同炮制方法、不同产地的白术饮片及其炮制品均具有明显差异性, 且不同产地的白术饮片相似度更低, 分离趋势更为明显。表明相比较于炮制方法因素, 产地因素

对于白术饮片质量的影响更明显。盲法选取不同产地或炮制方法的白术样品,按照本研究所建立的方法进行实验验证,即依次采用液相指纹图谱的总量统计矩相似度法、OPLS-DA法统计分析,白术样品分别落在了OPLS-DA图所对应的不同产地或不同炮制方法区域内,表明可以快速精准地识别所不同产地和炮制法的白术。值得一提的是,需要进一步药效学实验研究才能探究本实验确定的5个质量标志物与白术的功效,如提高机体抗炎和抗癌效果等的内在关联性。

本研究所建立的方法能够明显的按照不同产地、不同炮制方法将白术样品进行分类,在现有缺乏快速精准识别药材产地、炮制品方法的情况下,该法为进行产地、炮制的精准识别及其质量控制与评价提供一个新的理论与实验的思路。本研究寻找到白术内这5种成分可作为后续的质量属性研究、质量评价与控制的关键性物质Q-Marker。本研究应用了肖小河教授团队的大质量观理念^[23],结果表明整体辨析中药指纹图谱的形状特点,能精准辨析白术的不同产地与炮制品,助力了中药质量研究新进程。后续可利用UPLC-MS、药效学、药物代谢动力学等进一步探究本方法所筛选出的5个白术质量标志物的化学成分、药理作用、性味归经等相关内容,并可以此中药为基础,针对不同产地、炮制方法建立一整套质量控制评价体系模板。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 曹宁宁,杨文静,林映仙,等.经典名方泽泻汤的HPLC指纹图谱及多指标含量测定研究[J].中草药,2020,51(10):2773-2780.

[2] 高小惠,胡燕琴,王洪静,等.复方甘草片HPLC指纹图谱及7成分测定[J].天然产物研究与开发,2020,32(5):734-741.

[3] 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.

[4] 黄萌萌,王琪,李晓琦,等.基于全-精细指纹图谱与多元统计分析的栀子炒制前后差异评价[J].中草药,2020,51(9):2460-2466.

[5] 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.

[6] 张晓男,魏惠珍,张丹,等.基于化学计量学分析的桃

仁炮制前后指纹图谱研究[J].中国现代应用药学,2020,37(8):971-976.

[7] 吴建雄,秦建平,刘峰,等.坤宁颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].现代药物与临床,2020,35(3):447-449.

[8] 孙莹莹,孙巍,王萍,等.基于UPLC指纹图谱的逍遥片批次一致性评价研究[J].中草药,2020,51(20):5154-5165.

[9] Yao Z R, Yu J G, Tang Z S, et al. Multi-evaluating strategy for siji-kangbingdu mixture: Chemical profiling, fingerprint characterization, and quantitative analysis [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3545.

[10] Chen D D, Zhou P, Bai G G, et al. Discussion of HPLC fingerprint of traditional Chinese medicine of *Corydalis yanhusuo* and its preparation [J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, 40(12): 2470-2473.

[11] 贺福元,周宏灏,邓凯文,等.指纹图谱的一种定性定量研究新方法:总量统计矩分析法[J].药学学报,2008,43(2):195-201.

[12] 刘惠,杨姣,朱志飞,等.基于总量统计矩分析法的金银花、山银花HPLC指纹图谱评价[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(21):132-139.

[13] 贺福元,邓凯文,刘文龙,等.中药复方药物动力学总量统计矩法的实验验证研究[J].中国中药杂志,2013,38(2):253-262.

[14] 周晋,邓凯文,贺福元,等.指纹图谱总量统计矩法对补阳还五汤分煎与合煎提取成分变化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(9):79-82.

[15] 朱志飞,樊启猛,刘有志,等.基于信息熵最大化原则优化经典名方身痛逐瘀汤UPLC指纹图谱[J].中草药,2020,51(12):3173-3179.

[16] 中国药典[S].一部.2020:107.

[17] 张诚光,孙冬梅,毕晓黎,等.不同产地麸炒白术指纹图谱及同时测定3种白术内酯成分含量的方法研究[J].广东药科大学学报,2019,35(3):358-363.

[18] 翁萍,王文凯,张晓婷.白术不同炮制品对脾虚小鼠胃肠功能的影响[J].江西中医药,2015,46(5):30-32.

[19] 赵文龙,吴慧,单国顺,等.麸炒白术“减酮减燥,增酯增效”炮制理论的再印证[J].中国中药杂志,2013,38(20):3493-3497.

[20] 陈鸿平,刘友平,刘承萍,等.不同土炒白术中白术内酯III和白术多糖的含量比较[J].中国药房,2010,21(39):3680-3683.

[21] 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.

[22] 曹晖,付静.全国中药炮制经验与规范集成[M].增修本.北京:北京科学技术出版社,2017:116-117.

[23] 肖小河,金城,鄢丹,等.中药大质量观及实践[J].中草药,2010,41(4):505-508.

[责任编辑 郑礼胜]