

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

李 洋^{1,2,3}, 陈 健^{2,3}, 张 越^{2,3}, 李俊松^{2,3}, 狄留庆^{2,3}, 李 文^{1*}, 王洪兰^{2,3*}

1. 南京中医药大学附属南京中医院 药剂科, 江苏 南京 210001

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

3. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘 要: 目的 建立白芍药材 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法, 为白芍药材质量控制及临床应用提供参考。方法 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为固定相, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 0~17 min 和 22~45 min, 244 nm; 17~22 min, 280 nm, 柱温 30 ℃; 对 16 批白芍药材进行指纹图谱构建, 基于指纹图谱相似度分析结合聚类分析与主成分分析, 同时测定没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷的含量。结果 16 批白芍药材的相似度均在 0.86 以上, 共标定了 9 个共有峰, 指出 5 个色谱峰, 分别为没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷。聚类分析将 16 批白芍药材分为 2 类; 经主成分分析, 主成分 1~3 是影响药材样品质量评价的主要因子。16 批白芍药材中没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷质量分数范围分别为 0.09%~0.27%、0.21%~0.35%、0.22%~2.50%、2.74%~5.63%、0.06%~0.28%。经方法学考察, 各成分在线性关系良好 ($r^2 \geq 0.999$), 平均回收率为 92.07%~100.70%。结论 建立的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法稳定、可靠, 可为白芍药材的质量评价提供依据。

关键词: 白芍; HPLC 指纹图谱; 相似度评价; 聚类分析; 主成分分析; 定量测定

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)01-0231-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.026

Determination of multi-components of *Paeoniae Alba Radix* based on fingerprints and chemical pattern recognition

LI Yang^{1,2,3}, CHEN Jian^{2,3}, ZHANG Yue^{2,3}, LI Jun-song^{2,3}, DI Liu-qing^{2,3}, LI Wen¹, WANG Hong-lan^{2,3}

1. Department of Pharmacy, Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, China

2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints and multi-components determination method of Baishao (*Paeoniae Radix Alba*), and provide reference for the quality control and clinical application of *Paeoniae Radix Alba*. **Methods** Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used as stationary phase and acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution was used as mobile phase for gradient elution, with the flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 244 nm at 0—17 min and 22—45 min; 280 nm at 17—22 min and column temperature was 30 ℃. The fingerprints of 16 batches of *Paeoniae Radix Alba* were constructed. Based on the similarity analysis of fingerprints, cluster analysis and principal component analysis, the content of gallic acid, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin and benzoylpaeoniflorin were determined. **Results** The similarity of 16 batches of *Paeoniae Radix Alba* was more than 0.86, and nine common peaks were identified. The 16 batches of *Paeoniae Radix Alba* were divided into two categories by cluster analysis. According to the principal component analysis, the principal components 1—3 were the main factors affecting the quality evaluation of the samples. The contents of gallic acid, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin

收稿日期: 2021-09-06

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化项目 (ZYBZH-C-JS-30); 南京市医学科技发展项目 (YKK16173); 江苏省科技成果转化专项资金项目 (BA2016104)

作者简介: 李 洋 (1996—), 男, 在读硕士, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (025)85811517 E-mail: liyang3207778@163.com

*通信作者: 李 文 (1966—), 女, 主任中医师, 硕士生导师, 主要从事中药鉴定与中药制剂研究。E-mail: njzyliwen@sohu.com

王洪兰 (1977—), 副教授, 博士, 主要从事中药及复方药效物质基础研究。Tel: (025)85811512 E-mail: honglanwang2004@163.com

and benzoylpaeoniflorin in 16 batches of *Paeoniae Radix Alba* were 0.09%—0.27%, 0.21%—0.35%, 0.22%—2.50%, 2.74%—5.63%, 0.06%—0.28%, respectively. The results showed that the linear relationship between the components was good ($r^2 \geq 0.999$), the average recovery was 92.07%—100.7%. **Conclusion** The established HPLC fingerprints and multi-components determination method are stable and reliable, which can provide theoretical guidance for the establishment of quality standards of *Paeoniae Radix Alba*.

Key words: *Paeoniae Radix Alba*; HPLC fingerprints; similarity evaluation; cluster analysis; principal component analysis; content determination

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。首载于《神农本草经》，被列为中品，是中医临床常用中药之一，具有养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳的作用。临床上主要用于血虚萎黄、月经不调、自汗、盗汗、胁痛、腹痛、四肢挛痛、头痛眩晕等症^[1]。现代药理研究表明，白芍具有保护肝脏^[2]、止痛^[3-4]、抗炎^[5-6]及免疫调节^[7-8]等作用，白芍总苷是其发挥药效的重要物质基础。

白芍质量优劣对临床用药的有效性和安全性有较大影响。目前，全国药用芍药主产区为安徽亳州、浙江磐安、四川中江和山东菏泽，所产白芍分别习称亳白芍、杭白芍、川白芍和菏泽白芍^[9]。由于白芍应用广泛，不免出现伪品、次品，存在不同产地药材质量不一、硫熏导致药材质量下降等问题^[10]。因此，建立全面合理的白芍药材质量评价方法来规范其临床应用非常重要。

中药指纹图谱中潜藏着大量反映中药内在化学物质信息的数据和变量，对其挖掘和评价尤为关键。近年来，有文献对白芍饮片^[11]、标准汤剂^[12]、配方颗粒^[13]进行指纹图谱研究并结合含量测定评价样品质量，也有对白芍药材醋酸乙酯提取部位进行指纹图谱研究^[14]，但所得苷类成分种类较少，对于白芍药材的整体质量评价研究较少。本研究建立了白芍药材指纹图谱，并对 16 批白芍药材指纹图谱进行聚类分析(cluster analysis, CA)及主成分分析(principal component analysis, PCA)，而基于化学模式识别能够特征性的识别指纹图谱数据和变量，在此基础上测定了其中主要苷类成分的含量，较为全面地对白芍药材进行质量控制，旨在为白芍药材质量标准的建立提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Alliance 2695 HPLC(美国 Waters 公司)，配 Waters 2998 PDA 检测器，Empower 色谱工作站；XP/XS 型微量分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)；CPA225D 型电子分析天平(南京以马内仪器设备有限公司)；KH-500DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)；Anke TGL-18C-C 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)；Milli-Q®型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

没食子酸(批号 110831-201605，质量分数≥90.8%)、氧化芍药苷(批号 JBZ-0922，质量分数≥98%)、芍药内酯苷(批号 JBZ-1076，质量分数≥98%)、苯甲酰芍药苷(批号 JBZ-0047，质量分数≥98%)均购于南京金益柏有限公司。芍药苷对照品(批号 110736-201842，质量分数≥97.4%)购于中国食品药品检验研究院。乙腈、甲醇均为色谱纯，美国天地有限公司；磷酸(色谱纯)；水为超纯水。

本实验所用白芍药材分别购于安徽、浙江、四川，经南京中医药大学刘训红教授鉴定为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 的干燥根。16 批药材信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 无机物检查

按照《中国药典》2020 年版一部附录方法测定了收集的 16 批白芍药材的水分、总灰分、重金属及有害元素、二氧化硫残留量。结果，16 批白芍药材水分在 12.46%~13.98%，不超过 14.0%；总灰分在

表 1 16 批药材产地信息

Table 1 Origin information of 16 batches of medicinal materials

编号	批号	产地	采收时间	产地加工
B1~B5	2019040501~2019040505	安徽亳州谯城区十九里镇	2018-09	煮后去皮烘干
B6~B10	2019040506~2019040510	安徽亳州谯城区大寺镇	2018-09	煮后去皮烘干
B11、B12	2019040802、2019040803	浙江金华市磐安县	2018-08	不煮直接去皮烘干
B13~B16	2019040401~2019040404	四川中江县集凤镇	2018-09	煮后去皮烘干

2.14%~3.84%，不超过 4.0%；重金属及有害元素、二氧化硫残留量检测合格，符合药典标准。

2.2 浸出物

按照《中国药典》2020 年版四部水溶性浸出物测定法（通则 2201）进行测定。结果，16 批白芍药材水溶性浸出物含量在 25.91%~34.88%，不少于 22.0%，符合药典标准。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 固定相为 Kromasil C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~10 min，10%~15%乙腈；10~25 min，15%~30%乙腈；25~35 min，30%~60%乙腈；35~37 min，60%~10%乙腈；37~45 min，10%乙腈；体积流量 1.0 mL/min；检测波长：0~17 min 和 22~45 min，244 nm；17~22 min，280 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 取没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度分别为 77.34、75.62、708.86、1 171.40、71.92 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取白芍药材样品粉末（过三号筛）约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50%甲醇 25 mL，密塞，称定质量，超声 45 min，放置室温后补足失重，摇匀，14 000 r/min 离心 10 min，取上清，即得。

2.3.4 参照峰的选择 在实验所建立的指纹图谱中芍药苷的色谱峰分离良好，具有较大的峰面积、适中的保留时间且为所有样品共有，因此，选择芍药苷为参照峰。

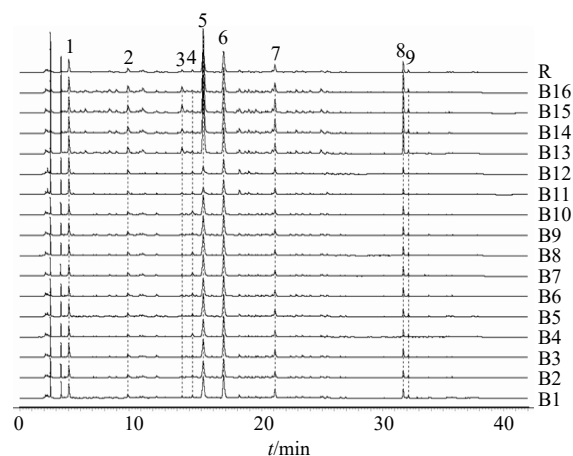
2.3.5 精密度试验 取白芍药材（批号 2019040501），按“2.3.3”项下方法制备得白芍供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样，连续进样 6 次，记录 HPLC 图，以芍药苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果，计算得到各共有峰的相对保留时间的 RSD 值小于 0.21%，相对峰面积的 RSD 值小于 0.49%，表明该仪器的精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取白芍药材（批号 2019040501），按“2.3.3”项下方法制备得白芍供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件，分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样，记录 HPLC 图，以芍药苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面

积。结果，计算得到各共有峰的相对保留时间的 RSD 值小于 0.11%，相对峰面积的 RSD 值小于 1.21%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取白芍药材（批号 2019040501）6 份，按“2.3.3”项下样品处理方法制备白芍供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样，记录 HPLC 图，以芍药苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果，计算得到各共有峰的相对保留时间的 RSD 值小于 0.24%，相对峰面积的 RSD 值小于 1.08%，表明本方法重复性良好。

2.3.8 指纹图谱的建立及相似度评价 取不同产地的 16 批白芍药材，按“2.3.3”项下样品处理方法制备白芍供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样检测，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 版，以 S1 图谱为参照图谱，时间宽度设定为 0.50 min，采用平均数法，以 Mark 峰进行峰匹配，得 16 批白芍药材 HPLC 指纹图谱（B1~B16）及对照图谱（R），见图 1。经 Mark 峰（5 号峰）匹配后标定了 9 个共有峰，通过与对照品 PDA 光谱图及保留时间对照，指出 5 个共有峰，即 1 号峰为没食子酸、2 号峰为氧化芍药苷、5 号峰为芍药内酯苷、6 号峰为芍药苷、8 号峰为苯甲酰芍药苷。相似度结果见表 2，结果显示，以白芍药材指纹图谱共有模式为对照指纹图谱，16 批白芍药材的相似度在 0.869~



1-没食子酸 2-氧化芍药苷 5-芍药内酯苷 6-芍药苷
8-苯甲酰芍药苷
1-gallic acid 2-oxypaeoniflorin 5-albiflorin 6-paeoniflorin
8-benzoyl paeoniflorin

图 1 16 批白芍药材 HPLC 指纹图谱及对照图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 16 batches of *Paeoniae Radix Alba* (B1—B16) and its reference fingerprint (R)

表 2 16 批次白芍药材相似度

Table 2 Similarity of 16 batches of *Paeoniae Radix Alba*

编号	批号	相似度值
B1	2019040501	0.991
B2	2019040502	0.980
B3	2019040503	0.987
B4	2019040504	0.991
B5	2019040505	0.983
B6	2019040506	0.987
B7	2019040507	0.869
B8	2019040508	0.876
B9	2019040509	0.972
B10	2019040510	0.977
B11	2019040802	0.969
B12	2019040803	0.967
B13	2019040401	0.981
B14	2019040402	0.976
B15	2019040403	0.964
B16	2019040404	0.975

0.991, 相似度良好。说明, 所选产地白芍药材指纹图谱稳定, 利用指纹图谱相似度可以较好地评价其质量。

2.4 化学模式识别分析

2.4.1 CA 使用 SPSS 24.0 版软件, 以 16 批白芍指纹图谱的 9 个共有峰峰面积为变量, 采用组间平均连接法, 以欧氏距离平方作为样品的测度, 对 16 批药材采用系统聚类分析法进行模式识别分析, 探讨不同批次之间样本数据的一致性, 结果见图 2。当距离刻度为 25 时, 16 批样品聚为 2 类, B1~B12 聚为一类, B13~B16 聚为一类。当距离刻度为 10 时, B1~B12 聚为 2 类, 其中 B3、B4 聚为一类, B1、B2 和 B5~B12 聚为一类。

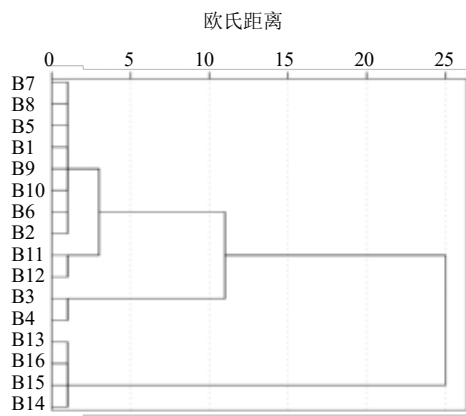


图 2 不同产地白芍聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of *Paeoniae Radix Alba* from different cultivation places

2.4.2 PCA 使用 SPSS 24.0 版软件, 以 16 批白芍的 9 个共有峰峰面积为变量, 以特征值大于 1 为主成分因子的筛选标准进行主成分分析, 在尽可能保留原有信息量的前提下, 通过降维构建少数几组起主导作用、互不相关的主成分, 以此反映出决定类别的关键因素。分别得到特征值和方差贡献率, 见表 3; 初始因子载荷矩阵和主成分因子载荷图, 见表 4、图 3。

由表 3 可知, PCA 共提取出 3 个主成分, 累计方差贡献率达到 88.711%, 表明提取出的 3 个主成分可以代表样品大部分信息内容。

表 3 特征值和累积方差贡献率

Table 3 Eigen value and cumulative variance contribution rate

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.337	53.687	53.687
2	1.445	19.890	73.576
3	1.202	15.135	88.711

表 4 初始因子载荷矩阵

Table 4 Loading factor of principal components

共有峰号	载荷		
	1	2	3
9	0.979	0.100	-0.025
6	0.954	-0.081	0.121
5	0.921	0.338	-0.018
1	0.814	0.533	-0.076
3	0.811	0.322	-0.172
7	0.737	0.523	0.073
2	0.189	0.934	0.028
8	0.216	-0.143	0.897
4	0.409	-0.339	-0.708

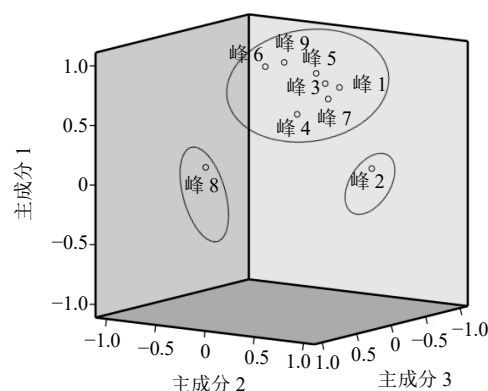


图 3 主成分因子载荷图

Fig. 3 Principal component factor load chart

由表 4、图 3 可知, 9 个共有成分对 3 个主成分的贡献。第 1 主成分主要反映了指纹图谱中的 1、3、5、6、7、9 号峰的信息, 这 6 个共有峰面积的变化可反映样品共有峰的整体变化 (特别是 5 号、6 号和 9 号共有峰), 表明样品中 1 (没食子酸)、3、5 (芍药内酯苷)、6 (芍药苷)、7、9 号共有峰对应成分的含量变化是导致药材质量差异的重要因素。第 2 主成分主要反映了指纹图谱中氧化芍药苷的信息。第 3 主成分主要反映了指纹图谱中苯甲酰芍药苷的信息。因此, 在制定白芍药材的质量标准时, 建议对其中的多指标成分进行质量控制。

2.5 多成分含量测定

2.5.1 系统适应性考察 按“2.3.2”项下制备混合对照品溶液; 取同一批白芍药材, 按“2.3.3”项下样品处理方法制备白芍供试品溶液; 精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L, 按“2.3.1”项下色谱条件分别进样, 得到白芍混合对照品 HPLC 图和白芍样品溶液 HPLC 图, 见图 4。结果显示, 没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷之间分离度良好, 相邻色谱峰间分离度均大于 1.5, 样品测定无干扰。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取“2.3.2”项下混合对照品储备液, 用倍比稀释法制成系列对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件分别进样, 记录各峰面积值, 以进样质量浓度为横坐标 (x), 峰面积为纵坐

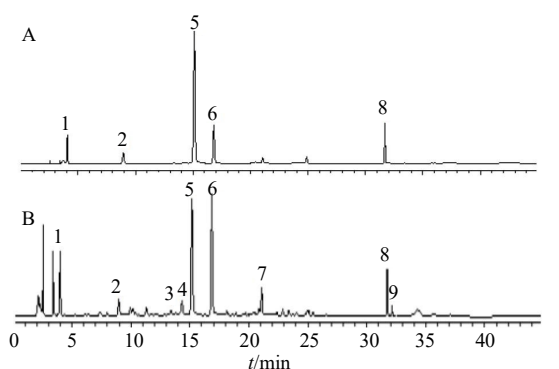
标 (y), 进行线性回归, 得到各成分的回归方程及线性范围。没食子酸的回归方程为 $y=4\ 838.1x+5\ 743.3$, $r^2=0.999\ 5$, 线性范围 4.53~77.34 μ g/mL; 氧化芍药苷的回归方程为 $y=3\ 635.5x+2\ 865.9$, $r^2=0.999\ 6$, 线性范围 4.43~75.62 μ g/mL; 芍药内酯苷的回归方程为 $y=4\ 476.1x+38\ 684$, $r^2=0.999\ 7$, 线性范围 41.49~708.86 μ g/mL; 芍药苷的回归方程为 $y=697.21x+7\ 868.8$, $r^2=0.999\ 9$, 线性范围 68.56~1\ 171.40 μ g/mL; 苯甲酰芍药苷的回归方程为 $y=6\ 690.4x+4\ 698.9$, $r^2=0.999\ 9$, 线性范围 4.21~71.92 μ g/mL。结果表明, 没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷在各自检测质量浓度范围内线性关系良好。

2.5.3 精密度试验 取同一批白芍药材, 按“2.3.3”项下样品处理方法制备白芍供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样, 连续进样 6 次, 记录峰面积。结果, 没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷的 RSD 值分别为 0.18%、0.49%、0.44%、0.17%、0.08%, 表明该仪器的精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取同一批白芍药材, 按“2.3.3”项下样品处理方法制备白芍供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录峰面积。结果, 没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷的 RSD 值分别为 1.03%、0.58%、0.28%、0.27%、0.31%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 取同一批白芍药材 6 份, 按“2.3.3”项下样品处理方法制备白芍供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样, 平行 2 针, 记录峰面积, 计算峰面积/取样量的值。结果, 氧化芍药苷、没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷峰面积取样量的 RSD 值分别 2.17%、1.74%、2.80%、2.63%、2.53%, 表明本方法重复性良好。

2.5.6 加样回收率试验 取同一批白芍药材样品粉末 (过三号筛) 约 0.25 g, 精密称定, 平行 6 份, 分别加入约与样品中没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷含量相同的对照品, 按“2.3.3”项下制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 计算没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷峰面积, 计算平均加样回收率。没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷平均回收率分别为 95.11%、94.82%、93.74%、100.7%、92.07%。RSD 值分别为 1.38%、1.96%、



1-没食子酸 2-氧化芍药苷 5-芍药内酯苷 6-芍药苷 8-苯甲酰芍药苷
1-gallic acid 2-oxypaeoniflorin 5-albiflorin 6-paeoniflorin 8-benzoyl paeoniflorin

图 4 混合对照品溶液 (A) 和白芍药材 (B) HPLC 图
Fig. 4 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample of *Paeoniae Radix Alba* (B)

1.62%、1.02%、1.09%。

2.5.7 样品测定 取 16 批白芍药材样品粉末（过三号筛），按“2.3.3”项下样品处理方法制备白芍供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样分析，每个样品测定 2 次。计算没食子酸、氧化芍药苷、芍

药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷的含量。结果，16 批白芍药材样品中没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷的平均含量分别为 0.14%、0.26%、1.07%、4.29%、0.13%，各成分相对平均偏差均小于 3.0%。样品含量测定结果见表 5。

表 5 药材含量测定结果 ($n=2$)

Table 5 Content determination results of medicinal materials ($n=2$)

编号	药材批次	质量分数/%				
		没食子酸	氧化芍药苷	芍药内酯苷	芍药苷	苯甲酰芍药苷
B1	2019040501	0.10	0.25	0.67	4.25	0.09
B2	2019040502	0.11	0.21	0.66	4.38	0.08
B3	2019040503	0.09	0.26	0.61	4.49	0.09
B4	2019040504	0.09	0.21	0.60	4.34	0.08
B5	2019040505	0.10	0.25	0.82	4.61	0.08
B6	2019040506	0.09	0.21	0.69	4.26	0.10
B7	2019040507	0.11	0.21	0.75	4.45	0.10
B8	2019040508	0.13	0.23	0.83	4.50	0.10
B9	2019040509	0.10	0.23	0.67	4.05	0.09
B10	2019040510	0.10	0.21	0.72	4.11	0.09
B11	2019040802	0.10	0.28	0.23	2.87	0.06
B12	2019040803	0.12	0.30	0.22	2.74	0.06
B13	2019040401	0.24	0.34	2.26	4.17	0.27
B14	2019040402	0.23	0.35	2.37	5.63	0.28
B15	2019040403	0.27	0.32	2.50	5.58	0.28
B16	2019040404	0.27	0.31	2.48	4.17	0.27

3 讨论

3.1 指纹图谱测定条件优化

本实验以峰面积与取样量的比值为考察指标，分别考察了供试品提取溶剂（超纯水、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇）、供试品提取方式（超声、回流）、提取料液比（1:100、1:50、1:25，g:mL）、提取时间（30、45、60 min），综合考虑单位质量各个成分色谱峰峰面积，结果显示最佳提取条件为用 50%甲醇，料液比为 1:50，超声提取 45 min。在确定了洗脱系统、供试品溶液制备方法的基础上，对梯度洗脱程序进行了反复的摸索，确定了最佳的洗脱程序。在测定波长的选择上，综合各成分吸收最大的波长，选择检测波长为 0~17 min 和 22~45 min, 244 nm; 17~22 min, 280 nm 进行测定。在此条件下，白芍药材色谱峰较多，能够较为全面地体现出白芍中的化学成分信息。

3.2 指纹图谱及模式识别分析

本实验对于多批次药材指纹图谱的评价不仅仅局限于相似度评价，还采用了 CA 及 PCA 法，更加全面客观地评价药材质量。在 16 批药材指纹图谱相似度分析中，14 批样品相似度高于 0.96，表明白芍药材的化学成分组成较为相似，但各批次药材中化学成分含量存在一定差异。有 2 批样品相似度低于 0.9，可能与生长年限、栽培及贮藏等因素有关，需进一步分析。CA 中，当距离刻度为 25 时，CA 将 16 批药材聚为 2 类，B13~B16 为一类，且产地均为四川；B1~B12 为一类，产地为安徽和浙江，说明安徽和浙江的白芍药材质量较为接近。当距离刻度为 5 时，将药材 B1~B12 又聚为 2 类，B3、B4 为一类，产地为安徽，剩余批次聚为一类，产地为安徽和浙江，说明同一产地药材质量存在差异性并且不同产地药材质量亦具有相似性。PCA 共提取出 3 个主成分，累积方差贡献率达到 88.711%，可反

映出样品的大部分信息, 可为进一步的多成分含量测定提供参考。

3.3 多成分含量测定

本实验基于 PCA 结果及考虑所选指标的峰面积大小作为选择药材含量测定指标的依据。PCA 分析, 发现 9、6 (芍药苷)、5 (芍药内酯苷)、1 (没食子酸) 号峰最能代表第 1 主成分, 但 9 号峰峰面积较小; 2 号峰 (氧化芍药苷) 最能代表第 2 主成分; 8 号峰 (苯甲酰芍药苷) 最能代表第 3 主成分。同时, 文献表明, 芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷为白芍主要活性成分—白芍总苷中重要成分^[15]。因此, 化学模式识别与成分药效相结合, 选择芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷作为药材含量测定指标, 指标选择更合理, 能较为科学、全面地反映药材质量。本实验建立的方法操作简便、重复性好, 对白芍药材质量标准的提升具有重要意义。

不同产地的白芍药材多成分含量测定结果表明, 芍药苷和芍药内酯苷的含量相对较高。不同产地的药材各成分含量差异较大, 相同产地同一成分含量较为接近。在白芍药材 3 个产地中, 浙江产地的芍药苷含量小于 3.0%, 安徽和四川产地所选批次芍药苷含量均大于 4.0%。分析可能与产地或者产地加工不同有关, 浙江产地白芍药材不煮直接去皮烘干, 安徽和四川产地白芍药材煮后去皮烘干, 即白芍煮制后芍药苷的含量高于煮制前, 这与文献研究结果一致^[16], 其具体原因需进一步分析。

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: 45.
- [2] 吴修红, 胡妮娜, 李宝龙, 等. 赤芍与白芍脐中穴给药的药理作用比较研究 [J]. 针灸临床杂志, 2014, 30(5): 54-56.
- [3] Yu H Y, Liu M G, Liu D N, *et al.* Antinociceptive effects of systemic paeoniflorin on bee venom-induced various

- 'phenotypes' of nociception and hypersensitivity [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007, 88(2): 131-140.
- [4] Zhang X J, Li Z, Leung W M, *et al.* The analgesic effect of paeoniflorin on neonatal maternal separation-induced visceral hyperalgesia in rats [J]. *J Pain*, 2008, 9(6): 497-505.
- [5] Zhou Z, Lin J P, Huo R F, *et al.* Total glucosides of paeony attenuated functional maturation of dendritic cells via blocking TLR4/5 signaling *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(3): 275-282.
- [6] Zheng Y Q, Wei W. Total glucosides of paeony suppresses adjuvant arthritis in rats and intervenes cytokine-signaling between different types of synoviocytes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(10): 1560-1573.
- [7] 王洪志, 刘朝东, 韦超. 白芍总苷对慢性非细菌性前列腺炎大鼠 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-10 表达影响的实验研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(2): 231-234.
- [8] 吴慧丽, 李慧. 白芍总苷对溃疡性结肠炎大鼠细胞因子影响的研究 [J]. 中南药学, 2010, 8(2): 128-131.
- [9] 查良平, 杨俊, 彭华胜, 等. 四大产地白芍的种质调查 [J]. 中药材, 2011, 34(7): 1037-1040.
- [10] 严倩茹, 邬伟魁. 白芍饮片的质量现状与质量控制方法研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 229-232.
- [11] 金林, 赵万顺, 郭巧生, 等. 白芍 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3564-3569.
- [12] 赵园园, 梁德勤, 金传山, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的亳白芍不同炮制品标准汤剂 7 个成分含量测定 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(3): 404-411.
- [13] 陈巧华, 范世明, 许春芳, 等. 白芍配方颗粒指纹图谱及 7 种主要成分含量测定研究 [J]. 中外医学研究, 2017, 15(36): 123-126.
- [14] 谭菁菁, 范艳华, 任天舒, 等. 中药白芍的高效液相色谱指纹图谱及其主要成分含量测定 [J]. 国际药学研究杂志, 2014, 41(2): 238-243.
- [15] 苟丽琼, 姜媛媛, 吴一超, 等. 芍药有效成分与药理活性研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(9): 4022-4029.
- [16] 周学刚, 张丽萍, 王艳芳, 等. 煮制对白芍中芍药苷含量的影响 [J]. 医药导报, 2011, 30(1): 82-85.

[责任编辑 时圣明]