

基于药材-饮片-标准汤剂质量传递过程的白芍质量标志物研究

岳倩侠^{1,2}, 孙叶芬^{1,2}, 杨爽¹, 杜倩倩¹, 金传山^{1,2*}, 张伟^{1,2}, 程世云³, 朱月健⁴, 王翔⁴

1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012

2. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012

3. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051

4. 安徽济人药业股份有限公司, 安徽 亳州 236800

摘要:目的 通过建立白芍药材、饮片、标准汤剂 HPLC 特征图谱对白芍生产过程的共有峰进行定性分析, 结合白芍药材-饮片-标准汤剂质量传递过程筛选白芍质量标志物(Q-Marker)。方法 采集 10 批白芍鲜药材, 制备为药材、饮片和标准汤剂, 采用 HPLC 建立白芍药材-饮片-标准汤剂特征图谱, 结合相似度评价及正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等分析初步确定的指标成分在药材-饮片-标准汤剂过程的含量及转移率, 探究白芍生产过程中的质量传递规律, 综合筛选白芍 Q-Marker。结果 白芍药材、饮片、标准汤剂特征图谱的共有峰有 9 个, 组内相似度较高, OPLS-DA 结果显示, 9 号共有峰不能稳定传递; 白芍药材-饮片传递过程中, 没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖、苯甲酰芍药苷 8 种成分转移率大于 70%, 可以传递稳定; 饮片-标准汤剂传递过程中, 芍药苷、芍药内酯苷、没食子酰芍药苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷等单萜及其苷类成分含量稳定且转移率大于 60%, 可以传递稳定; 没食子酸转移率大于 200%, 未能充分体现白芍饮片中没食子酸的传递情况; 儿茶素和 1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖 2 种成分转移率小于 25%。结论 结合白芍药材、饮片和标准汤剂中特征图谱、含量及转移率变化等, 综合筛选确定氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、苯甲酰芍药苷 5 种成分作为白芍 Q-Marker。

关键词: 白芍; 标准汤剂; 质量传递; 质量标志物; 特征图谱; 化学计量学; 正交偏最小二乘-判别分析; 没食子酸; 氧化芍药苷; 儿茶素; 芍药内酯苷; 芍药苷; 没食子酰芍药苷; 1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖; 苯甲酰芍药苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0553-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.022

Study on quality marker of *Paeoniae Radix Alba* based on quality transfer process of medicinal materials-decoction pieces-standard decoctions

YUE Qian-xia^{1,2}, SUN Ye-fen^{1,2}, YANG Shuang¹, DU Qian-qian¹, JIN Chuan-shan^{1,2}, ZHANG Wei^{1,2}, CHENG Shi-yun³, ZHU Yue-jian⁴, WANG Xiang⁴

1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology, Hefei 230012, China

3. Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China

4. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

Abstract: Objective To qualitatively analyze the co-peaks in the production process of Baishao (*Paeoniae Radix Alba*, PRA) by HPLC specific chromatogram established by PRA medicinal materials, decoction pieces and standard decoctions, and screen Q-Marker of PRA combining the quality transfer process of medicinal materials, decoction pieces and standard decoctions. **Methods** Collecting 10 batches of PRA and preparing them as medicinal materials, decoction pieces and standard decoctions, HPLC was adopted to establish the specific chromatogram of medicinal materials, decoction pieces and standard decoctions of PRA, combined

收稿日期: 2022-08-12

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1711505); 安徽省重点研发项目(202104h04020029); 亳州市科技重大项目专项(bzzd2020002)

作者简介: 岳倩侠(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制与中药饮片质量。E-mail: 2503987101@qq.com

*通信作者: 金传山(1963—), 男, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药炮制与中药饮片质量。E-mail: jcs4@sohu.com

with the similarity evaluation and OPLS-DA, the content and transfer rate of the preliminarily determined indicator components in the process of medicinal materials, decoction pieces and standard decoctions were analyzed, the quality transfer law in the production process of PRA was explored, and the Q-Marker of PRA was comprehensively screened. **Results** There were nine co-peaks in the HPLC specific chromatogram of decoction pieces and standard decoctions of PRA and the intragroup similarity was high. OPLS-DA results showed that No. 9 co-peak cannot be transmitted stably. In the process of medicinal materials-decoction pieces, the transfer rate of gallic acid, oxypaeoniflorin, catechin, albiflorin, paeoniflorin, gallophilyl paeoniflorin, 1,2,3,4,6-*O*-pentagalloglucose, benzoylpaeoniflorin was more than 70%, which can transfer stability. In the process of decoction pieces-standard decoctions, the transfer rate of oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, gallophilyl paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin mainly monoterpenes and their glycosides was stable and the transfer was more than 60%, which can transfer stability; The transfer rate of gallic acid was more than 200%, the transmission of gallic acid in the decoction pieces of PRA was not fully reflected. The contents of catechin, 1,2,3,4,6-*O*-pentagalloglucose were unstable and the transfer rate was less than 25%. **Conclusion** Combined with the HPLC specific chromatogram, content and transfer rate of components in PRA medicinal materials, decoction pieces and standard decoctions, five components of oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, gallophilyl paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin were determined by comprehensive screening as Q-Marker of PRA.

Key words: *Paenonia Radix Alba*; standard decoction; quality transfer; quality marker; specific chromatogram; chemometrics; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; gallic acid; oxypaeoniflorin; catechin; albiflorin; paeoniflorin; gallophilyl paeoniflorin; 1,2,3,4,6-*O*-pentagalloglucose; benzoylpaeoniflorin

中药经历采收加工、炮制及制药工艺过程的物质传递和化学变化,最终以复方制剂的形式通过药物传输过程发挥临床疗效,而汤剂是主要的应用形式。中药质量标志物(quality marker, Q-Marker)概念着眼于中药生产全过程中物质基础的特有、差异、动态变化和质量的传递性、溯源性,建立 Q-Marker 中药产业链全过程控制体系,有利于建立中药全程质量控制及质量溯源体系^[1]。中药 Q-Marker 识别的第一步就是要系统地辨识中药形成过程中各环节化学物质组及传递变化的规律,通过特征图谱建立定性检测方法,结合化学计量学分析,为中药全程质量控制提供方法和参考^[2]。白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paenonia lactiflora* Pall. 的干燥根,其气微,味微苦、酸,归肝、脾经,具有养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳的功效,为临床常用中药^[3]。白芍含有多种化学成分,包括单萜及其苷类、三萜类、黄酮类、鞣质类和多糖等^[4]。《中国药典》2020 年版仅采用单一成分芍药苷作为其质量控制标准,难以全面评价白芍质量以及临床应用。为进一步提升白芍质量评价体系,本团队在安徽省亳州市 2021 年重大科技专项“基于中药质量标志物的亳白芍生产全过程质量控制体系构建及其产业化示范”支撑下,系统开展白芍 Q-Marker 的研究。研究初步筛选出白芍中芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、没食子酰芍药苷、苯甲酰芍药苷、儿茶素、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖(1,2,3,4,6-*O*-pentagalloglucose, PGG)、没食子酸 8 个化学成分

可能是白芍发挥传统功效的药效物质基础,可作为白芍 Q-Marker^[5]。在此基础上,本实验以 10 批亳白芍鲜药材制备的药材、饮片和标准汤剂作为样品,基于 HPLC 建立白芍特征图谱,采用化学计量学对药材-饮片-标准汤剂不同阶段白芍 3 种类型样品的共有峰进行相似性和差异性分析,筛选出白芍生产过程的共有物质基础,再结合各成分在药材-饮片-标准汤剂传递过程的含量变化情况,深入探究该 8 种成分在生产过程中的传递情况,依据 Q-Marker “五原则”,综合筛选确定白芍 Q-Marker,为白芍饮片质量标准建立提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,包括二元泵,自动进样器, G1316B、DAD 检测器, G1314F 色谱工作站,安捷伦科技有限公司; MCM36 型赛多利斯 Sartorius 百万分之一电子天平,德国 Sartorius 公司; JK-300DB 型数控超声波清洗器,上海望标仪器有限公司。

1.2 样品与试剂

对照品没食子酸(批号 C17D10C105977,质量分数 $\geq 98\%$)、氧化芍药苷(批号 M19S10S97994,质量分数 $\geq 98\%$)、儿茶素(批号 P02A9F57645,质量分数 $\geq 98\%$)、芍药内酯苷(批号 P26N11F132310,质量分数 $\geq 91.4\%$)、芍药苷(批号 X12A8C33672,质量分数 $\geq 98\%$),购自上海源叶生物科技有限公司;对照品 PGG(批号 21052707,质量分数 \geq

98.15%)、苯甲酰芍药苷(批号 21091008, 质量分数 $\geq 98.4\%$), 购自成都普菲德生物技术有限公司; 对照品没食子酰芍药苷(批号 P02D7F26004, 质量分数 $\geq 98\%$), 购自成都德斯特生物技术有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯, 购自美国 TEDIA 公司; 水为娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司; 分析纯乙醇、磷酸均购自国药集团化学试剂有限公司。

2021 年 10 月于安徽省亳州市谯城区十八里镇普康中药材种植基地采集 10 批亳白芍鲜药材, 经安徽中医药大学药学院俞年军教授鉴定, 10 批白芍鲜药材均为毛茛科芍药属植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 的干燥根。按照传统加工方法, 将鲜白芍洗净, 除去头尾和细根, 置沸水中煮后除去外皮, 晒干加工为白芍药材; 白芍药材经润透软化, 切薄片, 干燥加工为白芍饮片; 取白芍饮片 100 g, 加 7 倍量水, 浸泡 30 min, 加热回流 60 min, 趁热滤过, 药渣加 6 倍量水加热回流 40 min, 合并 2 次滤液, 浓缩定容至 500 mL, 即得质量浓度为 0.2 g/mL 的白芍标准汤剂^[6-7]; 备用。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取对照品没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、PGG 和苯甲酰芍药苷适量于 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇定容至刻度, 得质量分数分别为 48.048、139.132、46.606、25.711、13.958、72.856、27.867、68.635 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2 白芍药材、饮片供试品溶液的制备

精密称定各批次白芍药材、饮片样品粉末(过四号筛) 0.5 g, 置 25 mL 量瓶中, 加入 15 mL 稀乙醇, 超声处理(功率 240 W、频率 45 kHz) 30 min, 放冷, 加稀乙醇定容至刻度, 摇匀, 以 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 得白芍药材供试品溶液(S1~S10), 白芍饮片供试品溶液(Y11~Y20)。

2.3 白芍标准汤剂供试品溶液的制备

取白芍标准汤剂 1 mL, 加甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 静置 20 min, 分出上清液, 以 0.45 μm 有机滤膜滤过, 即得标准汤剂供试品溶液(B21~B30)。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Waters Tnature C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 美国 Waters 公司; 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 二元梯度洗脱程序: 0~5 min, 5%~9% 乙腈; 5~8 min, 9%~15% 乙腈; 8~23 min,

15%~25% 乙腈; 23~28 min, 25%~35% 乙腈; 28~35 min, 35%~90% 乙腈; 检测波长 230 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL 。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度考察 取白芍药材样品(S1) 供试品溶液, 按“2.4”项色谱条件重复进样 6 次, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.04%~0.38%, 相对峰面积的 RSD 为 0.51%~1.08%, 结果表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性考察 取同一白芍药材样品(S1) 供试品溶液, 按“2.4”项色谱条件分别在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样测定, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.08%~0.45%, 相对峰面积的 RSD 为 0.37%~1.29%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性考察 取同一白芍药材样品(S1) 6 份, 按“2.2”项方法制备成供试品溶液, 按“2.4”项色谱条件进行含量测定, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.05%~0.42%, 相对峰面积的 RSD 为 0.51%~1.49%, 结果表明该方法重复性良好。

2.6 白芍特征图谱的建立及分析

2.6.1 白芍特征图谱的建立 分别精密称取白芍药材、饮片、标准汤剂样品, 按“2.2”和“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件测定, 记录色谱图。将 10 批白芍药材(S1~S10) 的 HPLC 色谱图以 AIA 文件格式依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)”软件, 以 S1 为参照图谱, 多点校正法进行匹配, 以中位数法生成白芍药材对照图谱(R1)。白芍饮片、标准汤剂的对照图谱建立同药材, 对照图谱分别为 R2、R3。将 30 批白芍样品的 HPLC 色谱图依次导入, 生成白芍样品对照图谱(R)。样品叠加图谱见图 1, 对照图谱见图 2。

2.6.2 特征峰的指认 通过分析确定 10 批白芍药材、饮片、标准汤剂的共有峰有 9 个, 经与混合对照品色谱图(图 3) 比对, 指认其中 8 个特征峰: 1 号峰为没食子酸, 2 号峰为氧化芍药苷, 3 号峰为儿茶素, 4 号峰为芍药内酯苷, 5 号峰为芍药苷, 6 号峰为没食子酰芍药苷, 7 号峰为 PGG, 8 号峰为苯甲酰芍药苷。在 30 批白芍样品特征图谱中, 5 号峰

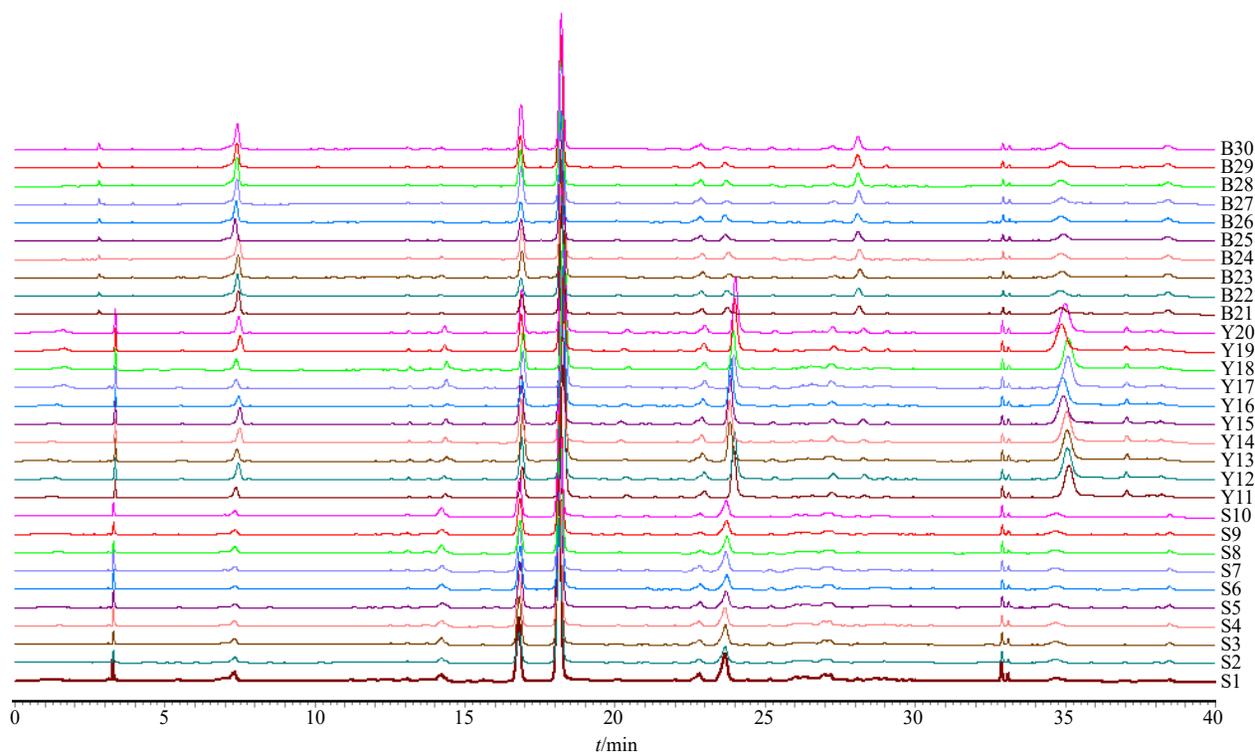


图1 白芍药材 (S1~S10)、饮片 (Y11~Y20)、标准汤剂 (B21~B30) 样品的 HPLC 叠加色谱图

Fig. 1 HPLC overlay chromatogram of medicinal material (S1—S10), decoction pieces (Y11—Y20), and standard decoction (B21—B30) of PRA

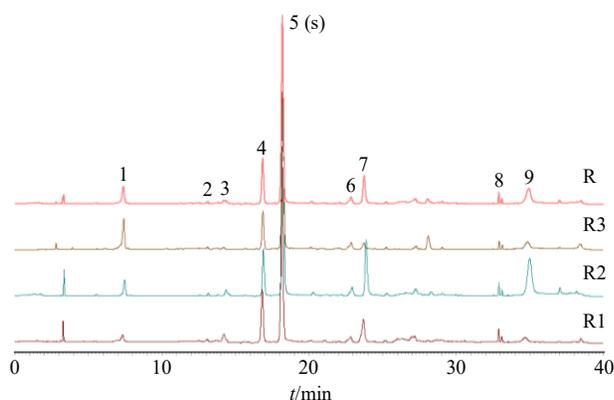
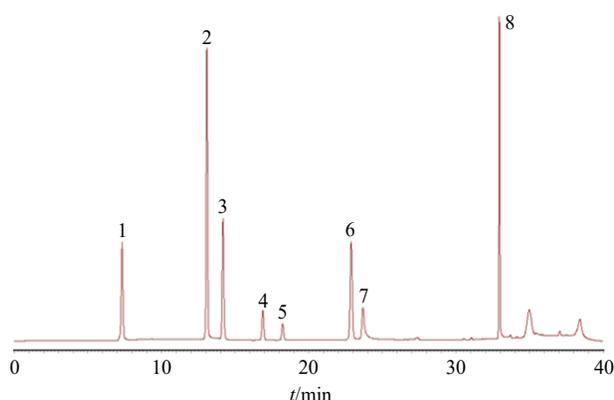


图2 白芍药材 (R1)、饮片 (R2)、标准汤剂 (R3) 对照图谱及白芍总样品 (R) 对照图谱

Fig. 2 Control characteristic chromatograms of medicinal materials (R1), decoction pieces (R2), and standard decoctions (R3) of PRA and total PRA samples (R)

的分离度大、对称性良好、峰面积较大且为所有样品共有,因此选取5号峰(芍药苷)作为参照峰(s),其保留峰面积为1,计算30批白芍样品各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。30批白芍样品的9个共有峰相对保留时间的RSD均小于2.00%,相对峰面积的RSD为14.58%~76.45%,说明不同批次样品中各成分含量有差异,存在传递性差异。相对峰面积结果见表1。



- 1-没食子酸 2-氧化芍药苷 3-儿茶素 4-芍药内酯苷 5-芍药苷 6-没食子酰芍药苷 7-PGG 8-苯甲酰芍药苷
- 1-gallic acid 2-oxypaeoniflorin 3-catechin 4-albiflorin 5-paeoniflorin 6-gallophilyl paeoniflorin 7-PGG 8-benzoylpaeoniflorin

图3 混合对照品 HPLC 色谱图

Fig. 3 Chromatogram of mixed reference substances

2.6.3 相似度评价 将白芍药材、饮片、标准汤剂和30批总样品的图谱数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版本)”软件,生成相对应的对照图谱,计算各色谱图组内的相似度,相似度结果见表2。结果显示,白芍药材与饮片之间的相似度为0.976~0.982,白芍饮片与标准

表1 白芍样品特征图谱共有峰的相对峰面积

Table 1 Relative peak area of common peaks in specific chromatogram of PRA

批次	相对峰面积								
	1号峰	2号峰	3号峰	4号峰	5号峰	6号峰	7号峰	8号峰	9号峰
S1	0.088 5	0.013 6	0.037 3	0.224 7	1.000 0	0.063 2	0.277 5	0.023 8	0.094 5
S2	0.081 1	0.013 3	0.037 0	0.222 9	1.000 0	0.062 4	0.276 9	0.023 8	0.094 3
S3	0.056 0	0.015 8	0.057 1	0.205 3	1.000 0	0.044 6	0.204 0	0.025 9	0.092 6
S4	0.056 1	0.015 9	0.056 9	0.205 4	1.000 0	0.044 6	0.202 2	0.025 9	0.091 0
S5	0.060 0	0.015 1	0.063 1	0.245 1	1.000 0	0.047 0	0.246 4	0.029 2	0.087 8
S6	0.063 6	0.016 1	0.066 2	0.248 4	1.000 0	0.046 7	0.248 1	0.029 2	0.089 6
S7	0.057 9	0.014 1	0.045 6	0.209 2	1.000 0	0.048 8	0.282 6	0.029 1	0.085 9
S8	0.056 0	0.013 6	0.046 4	0.207 1	1.000 0	0.053 1	0.282 7	0.029 2	0.084 0
S9	0.067 1	0.017 7	0.060 3	0.239 8	1.000 0	0.051 2	0.280 4	0.028 2	0.089 6
S10	0.065 7	0.014 4	0.057 8	0.234 1	1.000 0	0.054 0	0.279 8	0.028 1	0.089 9
Y11	0.105 2	0.011 3	0.034 1	0.229 8	1.000 0	0.050 8	0.168 0	0.021 8	0.400 7
Y12	0.066 3	0.010 5	0.040 2	0.199 6	1.000 0	0.041 9	0.086 6	0.023 9	0.398 7
Y13	0.058 5	0.013 3	0.050 8	0.182 9	1.0000	0.051 8	0.211 5	0.024 5	0.401 2
Y14	0.070 5	0.012 3	0.049 6	0.194 6	1.000 0	0.053 4	0.181 7	0.024 4	0.389 6
Y15	0.091 9	0.012 7	0.038 8	0.281 7	1.000 0	0.062 6	0.312 1	0.023 3	0.431 2
Y16	0.065 0	0.014 4	0.049 5	0.165 7	1.000 0	0.065 4	0.369 7	0.030 4	0.534 5
Y17	0.086 9	0.009 7	0.023 8	0.168 0	1.000 0	0.069 3	0.294 7	0.030 8	0.477 5
Y18	0.107 7	0.012 4	0.043 6	0.223 0	1.000 0	0.048 8	0.248 3	0.025 9	0.404 0
Y19	0.103 1	0.011 4	0.033 6	0.186 6	1.000 0	0.063 2	0.240 3	0.022 5	0.400 0
Y20	0.109 4	0.010 2	0.039 7	0.222 6	1.000 0	0.052 1	0.342 3	0.026 9	0.383 1
B21	0.214 0	0.008 1	0.006 6	0.178 4	1.000 0	0.071 7	0.092 3	0.024 9	0.131 4
B22	0.226 0	0.010 1	0.010 7	0.247 5	1.000 0	0.069 1	0.063 0	0.019 4	0.101 7
B23	0.216 7	0.010 1	0.011 1	0.323 3	1.000 0	0.067 4	0.033 9	0.017 8	0.107 9
B24	0.210 1	0.009 0	0.013 5	0.208 1	1.000 0	0.050 9	0.060 4	0.020 3	0.099 6
B25	0.206 4	0.011 3	0.011 6	0.228 5	1.000 0	0.053 2	0.070 3	0.022 9	0.098 8
B26	0.250 8	0.010 5	0.015 2	0.177 8	1.000 0	0.074 5	0.079 4	0.023 6	0.139 0
B27	0.194 7	0.010 2	0.016 3	0.198 4	1.000 0	0.060 6	0.044 4	0.020 5	0.104 9
B28	0.195 5	0.010 4	0.016 9	0.207 8	1.000 0	0.060 3	0.067 7	0.021 4	0.095 1
B29	0.194 2	0.010 4	0.011 6	0.209 2	1.000 0	0.067 3	0.073 2	0.019 0	0.095 9
B30	0.197 6	0.010 4	0.012 9	0.229 9	1.000 0	0.062 0	0.047 6	0.021 2	0.097 6
RSD/%	55.63	19.51	53.09	15.21	0.00	15.85	55.42	14.58	76.45

汤剂之间的相似度为 0.968~0.973, 白芍药材与标准汤剂之间的相似度为 0.946~0.975, 白芍总样品之间的相似度为 0.935~0.984, 说明白芍在生产过程中各阶段样品差异不大。采用相似度评价虽能较好地反映生产过程中各阶段样品特征图谱中主要峰群的相似程度, 但从白芍相似度结果并不能体现出白芍生产过程的差异性, 因此, 需要进一步采用化学计量学分析其共有峰的差异。

2.6.4 正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 将白芍药材、饮片、标准汤剂样品的 9 个共有峰相对峰面积导入 SIMCA 14.1 软件, 采用 OPLS-DA 方法对白芍生产药材、饮片、标准汤剂的组间差异进行分析。在建立的 OPLS-DA 模型中 $R^2_{Y\text{ cum}}=0.963$, $R^2_{Y\text{ cum}}=1$, $Q^2_{\text{cum}}=0.94$, 均大于 0.5, 说明建立的 OPLS-DA 模型解释率和预测力可靠、良好。OPLS-

表 2 30 批白芍样品的相似度分析

Table 2 Similarity analysis of 30 batches of PRA

批次	相似度	批次	相似度	批次	相似度
S1	0.981	Y11	0.982	B21	0.980
S2	0.980	Y12	0.979	B22	0.984
S3	0.977	Y13	0.972	B23	0.977
S4	0.976	Y14	0.949	B24	0.978
S5	0.978	Y15	0.950	B25	0.979
S6	0.978	Y16	0.974	B26	0.973
S7	0.979	Y17	0.972	B27	0.977
S8	0.980	Y18	0.935	B28	0.981
S9	0.979	Y19	0.975	B29	0.980
S10	0.979	Y20	0.975	B30	0.981

DA 得分图显示, 30 批样品分为 3 组, 药材、饮片、标准汤剂各为一组, 结合变量重要性投影值 (variable importance projection, VIP, 图 4) 可知, 9 号峰的 VIP > 1, 说明 9 号峰在不同类型样品中的含量差异较大, 是白芍生产过程中的差异性成分。

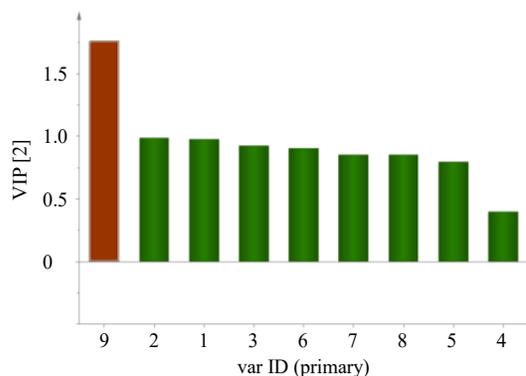


图 4 30 批白芍样品 OPLS-DA 的 VIP 图

Fig. 4 VIP value from OPLS-DA load diagram of 30 batches of PRA

2.7 白芍药材-饮片-标准汤剂质量传递性分析

由“2.6”项化学计量学结果可知, 9 号峰相对峰面积 RSD 值为 76.45%, 标准汤剂中的相对峰面积相当于药材的 97.91%、相当于饮片的 19.72%、且是 VIP > 1 的差异性成分, 根据 Q-Marker 的“五要素”要求, 为体现中药成分的专属性、传递性^[8-9], 9 号峰不适合作为白芍生产过程中标准控制的特征指标。没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、PGG、苯甲酰芍药苷 8 种成分是白芍生产过程能稳定传递的物质基础, 与徐佳新^[5]预测分析的 Q-Marker 基本一致。在此基础上, 再结合各成分在药材-饮片-标准汤剂传递过程的含量变化情况, 深入探究该 8 种成分在生

产过程中的传递情况, 依据 Q-Marker “五原则”, 综合筛选确定白芍 Q-Marker。

2.7.1 线性关系考察 分别取适量的 8 种成分对照品, 用 70% 甲醇溶解定容, 并将其稀释成 5 个梯度, 取各梯度对照品溶液 10 μ L, 按照“2.4”项下色谱条件分别进样, 记录其峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 建立各成分的标准曲线, 得到 8 种成分的回归方程, 结果分别为没食子酸 $Y=20.874 X+5.891 3$, $r=0.999 8$, 线性范围 5.253~105.056 μ g/mL; 氧化芍药苷 $Y=12.064 X-0.303 1$, $r=0.999 9$, 线性范围 0.578~11.564 μ g/mL; 儿茶素 $Y=22.33 X-0.612 9$, $r=0.999 9$, 线性范围 1.960~39.200 μ g/mL; 芍药内酯苷 $Y=11.042 X+3.242 3$, $r=0.999 9$, 线性范围 18.298~365.968 μ g/mL; 芍药苷 $Y=12.770 X+37.471$, $r=0.999 8$, 线性范围 72.750~1 455.006 μ g/mL; 没食子酰芍药苷 $Y=13.185 X-1.172 7$, $r=0.999 9$, 线性范围 3.739~74.774 μ g/mL; PGG $Y=19.902 X-14.585$, $r=0.999 8$, 线性范围 15.900~318.006 μ g/mL; 苯甲酰芍药苷 $Y=19.614 X-1.023 9$, $r=0.999 9$, 线性范围 1.294~25.879 μ g/mL。

2.7.2 精密度考察 取混合对照品溶液, 按“2.4”项色谱条件重复进样 6 次, 测得没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、PGG 和苯甲酰芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.59%、0.24%、1.56%、0.69%、0.83%、0.61%、2.53%、0.38%, 结果表明仪器精密度良好。

2.7.3 稳定性考察 取同一白芍药材样品 (S1) 供试品溶液, 按“2.4”项色谱条件分别在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样测定, 记录峰面积。结果显示, 白芍饮片中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、PGG 和苯甲酰芍药苷峰面积的 RSD 分别为 1.92%、1.18%、1.64%、0.95%、0.29%、0.84%、1.74%、0.22%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.4 重复性考察 取同一白芍药材样品 (S1) 6 份, 按“2.2”项方法制备成供试品溶液, 按“2.4”项色谱条件进行含量测定, 白芍饮片中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、PGG 和苯甲酰芍药苷质量分数的 RSD 依次为 1.23%、1.10%、0.48%、1.48%、0.79%、0.65%、1.11%、0.80%, 结果表明该方法重复性良好。

2.7.5 加样回收率考察 精密称取已知测定含量的

白芍药材样品(S1)粉末约0.25 g, 每份精密加入相当于0.25 g样品含量的6种对照品溶液, 按“2.2”项下方法操作制备供试品溶液, 按“2.4”项中色谱条件进样分析, 计算回收率及RSD。结果白芍药材样品中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、PGG和苯甲酰芍药苷的平均加样回收率分别为96.08%、100.01%、90.96%、100.32%、98.81%、99.74%、92.45%、90.25%, RSD分别为0.32%、0.46%、1.59%、0.26%、1.07%、0.31%、1.54%、0.37%, 说明该方法准确度较好。

2.7.6 白芍药材-饮片-标准汤剂 8 种成分含量测定及转移率分析 根据“2.2”“2.3”项下方法制备白芍药材、饮片、标准汤剂供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进样, 记录数据, 测得白芍药材、饮片、标准汤剂中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、PGG和苯甲酰芍药苷的质量分数。根据如下公式计算白芍8个成分转移率^[10]。

白芍药材-白芍饮片转移率=白芍饮片中指标成分的含量/白芍药材中指标成分的含量

白芍饮片-白芍标准汤剂转移率=白芍标准汤剂中指标

成分的含量/白芍饮片中指标成分的含量

10批白芍药材、饮片、标准汤剂中8种成分的平均含量见表3, 平均转移率结果见表4。结果显示, 白芍药材-饮片传递过程中, 8种成分平均转移率均大于70%, 说明在药材加工为饮片过程中, 8种成分含量传递较稳定; 白芍饮片-标准汤剂传递过程中, 芍药苷、芍药内酯苷、没食子酰芍药苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷等单萜及其苷类成分平均转移率均大于60%, 显示此5种成分可以稳定传递; 鞣质类成分没食子酸含量转移率大于200%, 未能充分显示白芍饮片中没食子酸的传递情况; 儿茶素和PGG 2种成分含量较低且转移率小于25%。

依据中药Q-Marker质量传递与溯源、化学成分特有性、有效性、可测性以及复方配伍环境等原则, 没食子酸、儿茶素和PGG 3种成分在饮片-标准汤剂过程中不能稳定传递, 故不适合作为白芍Q-Marker, 而芍药苷、芍药内酯苷、没食子酰芍药苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷等单萜及其苷类成分从药材到标准汤剂过程中一直稳定传递, 表明这些成分能在一定程度上体现生产过程对白芍质量的影响。

表3 白芍药材、饮片、标准汤剂含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Content results of PRA medicinal materials, decoction pieces and standard decoctions ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

样品	质量分数/%							
	没食子酸	氧化芍药苷	儿茶素	芍药内酯苷	芍药苷	没食子酰芍药苷	PGG	苯甲酰芍药苷
药材	0.16±0.03	0.04±0.01	0.10±0.02	0.88±0.08	3.48±0.14	0.15±0.02	0.60±0.13	0.06±0.01
饮片	0.17±0.05	0.03±0.01	0.07±0.02	0.75±0.17	3.33±0.46	0.14±0.02	0.53±0.13	0.05±0.01
标准汤剂	0.35±0.03	0.02±0.01	0.02±0.01	0.59±0.15	2.56±0.36	0.13±0.02	0.11±0.03	0.03±0.01

表4 白芍药材-饮片转移率和饮片-标准汤剂转移率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Content results of transfer rate of medicinal materials-decoction pieces and decoction pieces-standard decoction of PRA ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

样品	转移率/%							
	没食子酸	氧化芍药苷	儿茶素	芍药内酯苷	芍药苷	没食子酰芍药苷	PGG	苯甲酰芍药苷
药材-饮片	114.39±0.47	74.68±0.11	70.29±0.13	80.54±0.23	90.56±0.14	97.32±0.09	103.53±0.30	94.03±0.13
饮片-标准汤剂	225.17±0.63	61.98±0.11	23.87±0.04	78.95±0.04	76.80±0.03	89.57±0.08	21.57±0.07	59.94±0.06

3 讨论

本实验建立了白芍药材、饮片、标准汤剂和30批白芍总样品的特征图谱, 共9个共有峰, 采用OPLS-DA对30批样品的9个共有峰峰面积进行化学计量学分析, 结果显示芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸、氧化芍药苷、没食子酰芍药苷、苯甲酰芍药苷、PGG、儿茶素8种成分, 可以在药材-饮片-

标准汤剂过程中传递, 9号峰不适合作为白芍生产过程中标准控制的特征指标; 通过药材-饮片-标准汤剂过程中8种可传递成分的含量和转移率变化情况, 芍药苷、芍药内酯苷、没食子酰芍药苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷等单萜及其苷类成分含量稳定, 在药材-饮片-标准汤剂过程中平均转移率均大于60%, 可以稳定传递。文献资料显示, 白芍

中芍药苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、没食子酰芍药苷 5 种单萜苷类成分具有保肝、抗抑郁、抗炎镇痛、神经保护等药理作用, 是白芍的药效物质基础, 也是白芍药对和方剂中的入血成分^[11-14], 体现了 Q-Marker 的质量传递与溯源、化学成分特有性、有效性、可测性以及复方配伍环境“五原则”要求, 5 种成分可以作为白芍 Q-Marker。

然而, 白芍饮片-标准汤剂传递过程中, 没食子酸平均转移率为 225.17%, PGG 平均转移率为 21.57%, 且 2 种成分在药材-饮片-标准汤剂过程中转移率标准偏差大于 30%, 不能稳定传递, 可能原因是 PGG 在白芍样品制备和贮藏过程中不稳定, 会逐步向 1,2,3,6-O-四没食子酰葡萄糖和没食子酸等成分进行转化^[15-18]。

儿茶素在煎煮过程中易受热分解^[19], 在白芍饮片-标准汤剂传递过程中平均转移率为 23.87%, 标准汤剂中含量仅为 0.02%, 属于微量成分。由于煎煮过程中没食子酸、儿茶素和 PGG 等鞣质类成分容易发生水解、氧化、聚合以及分解等反应, 导致鞣质类成分在饮片-标准汤剂传递过程中含量变化较大不能稳定传递, 因此, 没食子酸、儿茶素和 PGG 3 种成分不适合作为白芍的 Q-Marker。

本实验在前期白芍 Q-Marker 预测的基础上, 进一步建立白芍药材、饮片、标准汤剂 HPLC 特征图谱对白芍生产过程的共有峰进行定性分析, 深入探究该 8 种成分在白芍药材-饮片-标准汤剂过程的质量传递情况, 依据 Q-Marker “五原则”^[20]综合筛选确定白芍 Q-Marker, 为白芍饮片标准质量的科学评价提供科学依据, 也为中药 Q-Marker 的筛选提供新的研究思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] 赵鸿鹏, 许浚, 张洪兵, 等. 基于质量传递与溯源的中药质量标志物 (Q-Marker) 的发现策略及应用 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2557-2565.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 108.
- [4] 徐佳新, 许浚, 曹勇, 等. 中药白芍现代研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5486-5495.
- [5] 徐佳新. 白芍药性物质基础及质量标准研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [6] 陈士林, 刘安, 李琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1375.
- [7] 梁德勤, 赵园园, 罗云, 等. 不同加工方式亳白芍的高效液相指纹图谱及多成分含量比较 [J]. 安徽中医药大学学报, 2018, 37(2): 85-89.
- [8] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, et al. A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [9] 刘耀晨, 许浚, 张洪兵, 等. 基于化学成分特有性的质量标志物发现策略及应用 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2548-2556.
- [10] 林杰, 梁德勤, 罗云, 等. 白芍饮片厚度对其损耗及标准汤剂转移率和出膏率的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(1): 74-78.
- [11] 江华娟, 李敏敏, 何瑶, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和化学模式识别的经典名方桃红四物汤制备过程质量评价研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1000-1010.
- [12] 何艳梅, 林虢, 王雪, 等. 基于 UPLC 测定桂枝茯苓胶囊中 8 种活性成分的溶出度 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 14-19.
- [13] 尹权微, 李家春, 秦建平, 等. UPLC/Q-TOF-MS 快速分析桂枝茯苓胶囊的入血成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 83-86.
- [14] 陈永财, 钱江辉, 王彬辉, 等. “桂枝与白芍”药对入血成分 UPLC-Q/TOF-MS 分析 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1707-1711.
- [15] Parker S, May B, Zhang C, et al. A pharmacological review of bioactive constituents of *Paeonia lactiflora* Pallas and *Paeonia veitchii* Lynch [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(9): 1445-1473.
- [16] Krook M A, Hagerman A E. Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system [J]. *Food Res Int*, 2012, 49(1): 112-116.
- [17] 张艳娇, 杨玲, 向润清, 等. 不同 pH 条件下五倍子中 β -PGG 水解产物分析及其含量研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(8): 54-58.
- [18] 刘文豪. 五没食子酰葡萄糖 (PGG) 降解产物的分离鉴定及生物活性研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
- [19] 聂颖. 光、热诱导儿茶素类化合物化学转变及机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [20] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511-2518.

[责任编辑 郑礼胜]