

• 药剂与工艺 •

基于指纹图谱与化学计量学的白芍酒炙前后差异性标志物研究

李鹏飞¹, 岳倩侠¹, 孙叶芬¹, 江栋梁¹, 佟沫儒¹, 金传山^{1,2,3,4*}, 张伟^{1,2,3,4*}, 李培培¹, 罗云^{4,5}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

2. 安徽中医药大学 国家中医药管理局中药炮制传承基地, 安徽 合肥 230012

3. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽 合肥 230012

4. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012

5. 安徽协和成药业饮片有限公司, 安徽 亳州 236800

摘要: 目的 基于 HPLC 指纹图谱与化学计量学探究白芍 *Paeoniae Radix Alba* 酒炙前后化学成分的差异性, 筛选差异性标志物, 为探究白芍酒炙前后炮制机制及建立质量控制标准提供参考。方法 采用 HPLC 建立白芍饮片酒炙前后指纹图谱, 标定共有峰并进行指认与相似度评价, 以白芍饮片酒炙前后共有峰峰面积为指标, 运用层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等方法对白芍酒炙前后进行区分, 并筛选出差异性标志物进行定量分析。结果 生白芍与酒白芍 HPLC 指纹图谱相似度较高, 但其酒炙前后峰面积有所差异; HCA 与 PCA 可明显把生白芍与酒白芍分为 2 类, 表明白芍酒炙前后化学成分存在一定差异; 根据 OPLS-DA 分析筛选出峰 1 (没食子酸)、2 (氧化芍药苷)、3、7 (芍药苷)、8 (没食子酰芍药苷) 为酒炙前后主要差异性标志物; 对其中可指认且含量较高的 3 个差异性标志物进行定量研究, 结果显示, 白芍经酒炙后没食子酸含量显著性增加, 芍药苷、没食子酰芍药苷含量显著性减少, HCA 可明显把白芍与酒白芍分为 2 类, 进一步证实了选择该 3 种成分作为白芍酒炙前后差异性标志物的合理性。结论 白芍酒炙前后差异性标志物的研究可以为完善白芍与酒白芍饮片的质量控制和品质评价提供参考。

关键词: 白芍; 酒白芍; 指纹图谱; 化学计量学; 质量控制; HPLC; 层次聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘-判别分析; 没食子酸; 氧化芍药苷; 芍药苷; 没食子酰芍药苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)08-2398-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.006

Study on differential markers of *Paeoniae Radix Alba* herbal pair before and after wine processing based on fingerprint and chemometrics

LI Peng-fei¹, YUE Qian-xia¹, SUN Ye-fen¹, JIANG Dong-liang¹, TONG Mo-ru¹, JIN Chuan-shan^{1,2,3,4}, ZHANG Wei^{1,2,3,4}, LI Pei-pei¹, LUO Yun^{4,5}

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

2. Anhui University of Chinese Medicine State Administration of Traditional Chinese Medicine Traditional Chinese Medicine Processing and Inheritance Base, Hefei 230012, China

3. MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012, China

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

5. Anhui Xiehecheng Pharmaceutical Pieces Co., Ltd., Bozhou 236800, China

收稿日期: 2022-11-01

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); 基于血清代谢组学变化的白芍酒炙增效机制研究 (YJS20210491)

作者简介: 李鹏飞 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制与中药饮片质量。E-mail: 1246557833@qq.com

***通信作者:** 金传山 (1963—), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药炮制及中药药效物质基础研究。E-mail: jcs4@sohu.com

张伟 (1985—), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药炮制及中药药效物质基础研究。E-mail: zhangwei@ahcm.edu.cn

Abstract: Objective Based on HPLC fingerprinting and chemometrics, we investigated the differences in chemical composition of Baishao (*Paeoniae Radix Alba*) with wine before and after processing, and screened the difference markers to provide reference for exploring the mechanism of the preparation of *Paeoniae Radix Alba* with wine before and after processing and establishing quality control standards. **Methods** HPLC was used to establish fingerprints of *Paeoniae Radix Alba* prepared slices before and after wine processing, to identify common peaks and evaluate the similarity. The peak areas of peaks shared before and after wine processing of *Paeoniae Radix Alba* prepared slices were used as indicators, and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were applied to differentiate *Paeoniae Radix Alba* before and after wine processing. The above methods were used to differentiate between before and after wine processing of *Paeoniae Radix Alba*, and the differential markers were screened for quantitative analysis. **Results** The HPLC fingerprints of *Paeoniae Radix Alba* and wine-processed *Paeoniae Radix Alba* were similar, but their peak areas before and after wine roasting were different; HCA and PCA can clearly divide *Paeoniae Radix Alba* and wine-processed *Paeoniae Radix Alba* into two categories, indicating that there are some differences in the chemical composition of *Paeoniae Radix Alba* before and after wine processing; Peak 1 (gallic acid), 2 (oxidized paeoniflorin), 3, 7 (paeoniflorin) and 8 (gallic acyl paeoniflorin) were screened according to OPLS-DA analysis as markers of variability *Paeoniae Radix Alba* herbal pair with wine before and after processing; A quantitative study of three of these identifiable and high differential markers showed that the content of gallic acid was significantly increased and paeoniflorin and gallic acyl paeoniflorin were significantly decreased in *Paeoniae Radix Alba* prepared slices after wine processing. HCA could clearly divide *Paeoniae Radix Alba* prepared slices into two categories with wine-processed *Paeoniae Radix Alba* prepared slices, further confirming the rationality of selecting these three components as markers of the differences between *Paeoniae Radix Alba* prepared slices before and after wine processing. **Conclusion** The study on the differential markers of *Paeoniae Radix Alba* herbal pair with wine before and after processing can provide a reference for improving the quality control and quality evaluation of the prepared slices of *Paeoniae Radix Alba* and wine-processed *Paeoniae Radix Alba*.

Key words: *Paeoniae Radix Alba*; wine-processed *Paeoniae Radix Alba*; fingerprint; chemometrics; quality control; HPLC; hierarchical cluster analysis; principal components analysis; partial least squares-discriminant analysis; gallic acid; oxypaeoniflorin; paeoniflorin; galloylpaeoniflorin

白芍 *Paeoniae Radix Alba* 作为大宗中药品种, 始载于《神农本草经》, 其味苦、酸, 性微寒, 具有养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳等功效^[1]。由于白芍“酸寒伐生发之气”, 易使寒症加重, 故脾胃虚寒、血虚兼凝血者不宜服用, 因此, 在临床应用中通常需通过酒炒、清炒、土炒等炮制方法改变或缓和其酸寒药性, 其中酒炙白芍, 可借酒温升散寒, 降低其酸寒伐肝之性, 在《本草纲目》中有记载: “芍药……性味酸寒, 冬月必以酒炒, 凡腹痛多是血脉凝涩, 亦必酒炒用”^[2]。现代研究亦表明, 酒白芍与其他炮制品在临床功效以及药理作用上与白芍生品相比均有所差异^[3-4], 表明其炮制前后的化学成分也有所不同。

目前, 对白芍的研究多集中在不同的加工方式与药材品质之间的关系^[5-6], 以及产地不同的药材其质量的相互比较等方面^[7], 对于其酒炙前后化学成分与功效变化等相关研究不充分, 不利于白芍酒炙前后的区分以及其临床上用药质量的控制。基于此, 本实验以生白芍与酒白芍饮片为研究对象, 建立 HPLC 指纹图谱, 结合化学计量学对白芍酒炙前后进行区分, 筛选酒炙前后主要差异性标志物, 并进

行定量分析, 对白芍酒炙前后的化学成分变化进行初步研究, 从而为后续白芍酒炙炮制机制、质量控制, 以及其在临床上应用等方面的研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

EX125DZH 型万分之一电子天平, 美国奥豪斯仪器有限公司; EX-H3052 型百万分之一微量分析天平, 上海赞衡仪器有限公司; Thermo Fisher Ulti Mate3000 高效液相色谱仪, LPG-3400SDN 四元泵, DAD-3000 检测器, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; JK-300DB 型超声波清洗器, 合肥金尼克机械制造有限公司。

1.2 药材

10 批生白芍饮片经安徽中医药大学俞年军教授鉴定, 均为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根加工炮制品, 部分酒白芍饮片参考《中国药典》2020 年版^[1]由实验室自行炮制, 含水量均小于 14%, 符合《中国药典》2020 年版规定, 样品信息详见表 1, 编号 B1~B10 为生白芍饮片, 编号 J1~J10 为酒白芍饮片。其中 B1 炮制为 J3、J4, B2 炮制为 J5, B3 炮制为 J6, B4 炮制为 J7,

表 1 样品来源信息

Table 1 Information of sample source

编号	批号	来源
B1	21120201	安徽惠丰国药有限公司
B2	20211001	桂林中南(亳州)药业科技有限公司
B3	211101	大连火红堂(亳州)药业有限公司
B4	A211206	亳州市永刚饮片厂有限公司
B5	2021042801	亳州药材大市场收集
B6	2021042901	亳州学院中药炮制实验室
B7	2021042902	亳州学院中药炮制实验室
B8	P21031302	安徽济人药业有限公司
B9	P21032601	安徽济人药业有限公司
B10	P21031301	安徽济人药业有限公司
J1	22010201	安徽惠丰国药有限公司
J2	210501	大连火红堂(亳州)药业有限公司
J3	自制	B1
J4	自制	B1
J5	自制	B2
J6	自制	B3
J7	自制	B4
J8	自制	B5
J9	自制	B5
J10	自制	B7

B5 炮制为 J8、J9, B7 炮制为 J10, 其余饮片均为购买所得。

1.3 试剂

对照品没食子酸(批号 DSTDM000802, 质量分数 99.99%)、氧化芍药苷(批号 DST220707-074, 质量分数 99.57%)、芍药内酯苷(批号 DST220412-071, 质量分数 98.18%)、没食子酰芍药苷(批号 DST220520-064, 质量分数 98.68%)、芍药苷(批号 DSTDS007002, 质量分数 98.71%)、苯甲酰芍药苷(批号 DST220601-053, 质量分数 98.79%)、1,2,3,4,6-O-五没食子酰基葡萄糖(批号 DSTDW000102, 质量分数 99.33%), 以上对照品均购自成都德思特生物技术有限公司。

乙腈和甲醇为色谱纯, 购于美国 Tedia 公司; 水为娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司; 其余试剂均为分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取对照品没食子酸、氧

化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、1,2,3,4,6-O-五没食子酰基葡萄糖和苯甲酰芍药苷适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇溶解并定容至刻度, 得每 1 mL 含没食子酸 50.2 μg、氧化芍药苷 107.2 μg、芍药内酯苷 105.8 μg、芍药苷 100.6 μg、没食子酰芍药苷 100.4 μg、1,2,3,4,6-O-五没食子酰基葡萄糖 120 μg、苯甲酰芍药苷 107.4 μg 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液^[8] 精密称定各批次生、酒白芍饮片样品粉末(过四号筛) 0.1 g, 置 50 mL 量瓶中, 加稀乙醇 35 mL, 超声处理(功率 240 W、频率 45 kHz) 30 min, 放冷, 加稀乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 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: 0~5 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; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 进样量为 10 μL; 采用切换波长法, 1~12.85 min 检测波长为 257 nm, 12.85~35 min 检测波长为 230 nm。色谱图见图 1。

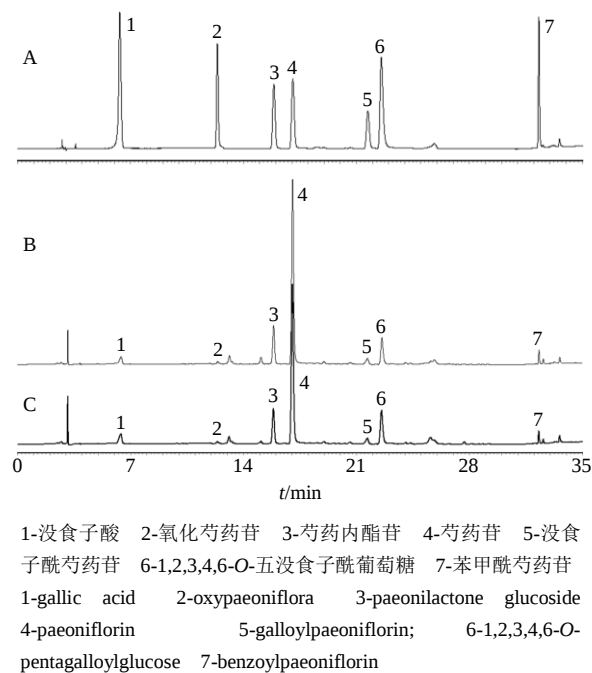


图 1 混合对照品 (A)、生白芍饮片样品 (B)、酒白芍饮片样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), *Paeoniae Radix Alba* slices sample (B), wine-processed *Paeoniae Radix Alba* slices sample (C)

2.3 白芍酒炙前后指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取生白芍饮片样品 (B1), 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 以芍药苷 (峰 7) 为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.01%~0.06%, 相对峰面积 RSD 为 1.01%~2.73%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取生白芍饮片样品 (B1), 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录色谱图, 以芍药苷 (峰 7) 为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.01%~0.06%, 相对峰面积 RSD 为 1.27%~2.29%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取生白芍饮片样品 (B1) 6 份, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 以芍药苷 (峰 7) 为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.01%~0.08%, 相对峰面积 RSD 为 0.59%~2.79%, 表明此方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立及共有峰的标定 分别将 10 批生白芍 (B1~B10)、酒白芍 (J1~J10) 饮片, 以“2.1.2”项下的步骤配置为待测样品, 进行检测, 将得到的各样品图谱分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版) 软件进行图谱分析。分别以 B1 和 J1 作为参照图谱, 采用“中位数法”, 时间宽度设定为 0.1 min, 进行多点校正和全谱峰匹配, 生成对照色谱图 (R), 最终分别建立生、酒白芍饮片样品指纹图谱。其中 10 批生白芍与酒白芍指纹图谱中均标定 10 个主要共有峰 (主要共有峰的总面积均占样品总峰面积的 80% 以上), 结果如图 2 所示。

2.3.5 相似度评价^[8-10] 10 批生白芍 (B1~B10)、酒白芍 (J1~J10) 指纹图谱, 以对照图谱 R 为参照, 其相似度分别为 0.999、0.999、0.999、0.998、0.998、0.998、0.999、1.000、0.999、0.999 和 0.999、0.999、0.997、0.999、0.998、0.996、0.999, 分别在 0.998~1.000 与 0.996~1.000, 相似度均大于 0.99, 可分别表明二者品质均较为一致, 相对稳定。

同时再运用相似度评价软件, 将白芍酒炙前后所有批次饮片样品 (B1~J10) 色谱图导入其中, 计算其相似度分别为 0.998、0.998、0.997、0.999、0.998、0.996、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、

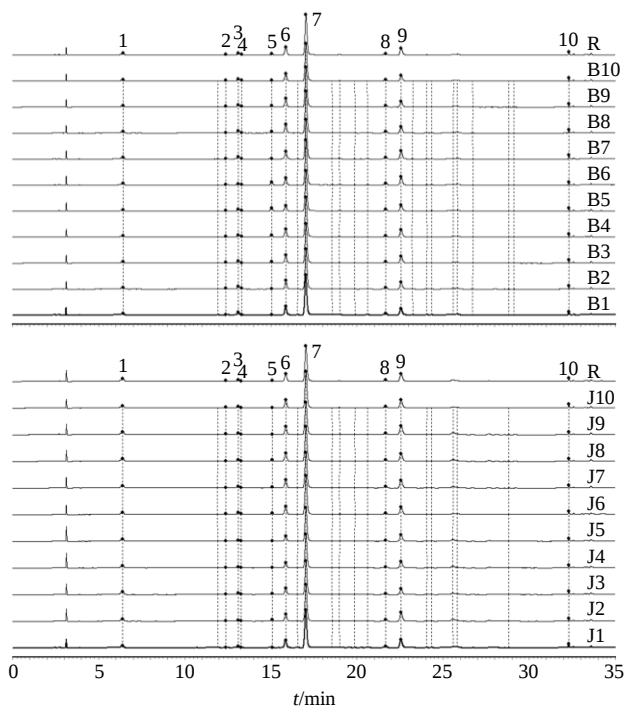


图 2 10 批生白芍 (B1~B10) 和酒白芍 (J1~J10) 的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 2 HPLC fingerprint of 10 batches of *Paeoniae Radix Alba* (B1—B10) and wine-processed *Paeoniae Radix Alba* (J1—J10) and its reference fingerprint (R)

0.997、0.998、0.998、0.998、0.999、0.999、0.998、0.992、0.999, 均大于 0.9, 表明白芍酒炙前后二者各自指纹图谱相似性较好, 但不能体现出白芍酒炙前后的区分性及质量差异, 无法有效区分生白芍饮片和酒白芍饮片。由于指纹图谱中主要峰群的整体相似, 因此需要进一步分析其共有峰以及采用化学计量学分析其差异与主要差异性标志物。

2.3.6 生白芍与酒白芍指纹图谱共有峰的差异性分析 通过与混合对照品色谱图中各色谱峰保留时间进行比对, 指认出生白芍与酒白芍指纹图谱中的 7 个共有峰, 分别为峰 1 (没食子酸)、2 (氧化芍药苷)、6 (芍药内酯苷)、7 (芍药苷)、8 (没食子酰芍药苷)、9 (1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖)、10 (苯甲酰芍药苷)。生白芍与酒白芍饮片指纹图谱中共有峰的相对峰面积见表 2, 所得结果采用 SPSS 24.0 软件进行独立样本 *t* 检验, 并运用 GraphPad Prism 8 软件, 绘制小提琴图 (violin plot, 图 3), 可直观形象地观察和对比出白芍饮片酒炙前后 10 个共有峰的峰面积变化。由图 3 结果可得, 白芍酒炙后峰 1 与峰 9 的峰面积呈现出不同程度地增加趋势, 且峰 1 具有显著性变化差异; 其余峰的峰面积

表2 白芍酒炙前后样品共有峰相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks in samples of *Paeoniae Radix* before and after *Alba* wine processing

样品	相对峰面积									
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10
B1	8.634	2.162	4.546	0.586	3.318	27.494	141.332	6.781	24.161	5.382
B2	9.742	2.019	4.434	0.449	5.299	30.800	148.765	6.984	25.997	5.056
B3	11.250	2.393	4.523	0.486	5.264	26.590	143.955	7.934	35.463	6.203
B4	10.334	2.206	5.676	0.377	1.171	24.170	166.704	8.301	34.882	4.607
B5	7.241	2.184	2.922	0.899	9.516	19.572	148.044	8.024	26.121	4.228
B6	9.401	2.064	4.195	0.596	9.771	29.094	147.199	7.494	31.248	4.746
B7	9.918	2.421	4.832	0.340	6.595	32.254	148.942	7.713	29.898	5.588
B8	8.775	1.801	4.811	0.326	6.339	25.268	144.999	7.534	29.163	5.014
B9	9.144	2.031	6.414	0.375	0.963	34.100	150.177	8.008	27.579	5.897
B10	9.354	1.921	6.366	0.383	0.942	31.920	148.155	6.745	25.971	4.977
J1	12.394	1.737	3.626	0.408	1.690	27.174	134.499	6.695	35.060	5.747
J2	11.013	1.538	2.467	0.266	5.944	23.623	134.569	7.015	35.436	4.049
J3	10.492	1.740	2.619	0.218	2.674	27.368	130.314	6.568	33.320	4.534
J4	13.088	1.683	3.511	0.385	4.276	29.171	132.354	5.809	33.403	4.720
J5	12.271	1.603	4.856	0.369	1.406	29.338	130.887	6.610	34.544	4.282
J6	13.852	1.571	3.835	0.191	2.549	25.220	133.907	6.971	31.965	4.205
J7	12.935	1.288	3.849	0.392	1.561	29.322	126.979	7.098	42.209	4.474
J8	10.422	1.352	2.623	0.235	5.967	18.484	122.531	5.634	28.187	3.825
J9	18.671	1.113	3.219	0.331	5.610	18.925	132.910	6.086	32.152	4.948
J10	15.378	1.546	3.508	0.503	1.684	21.899	118.054	5.346	23.273	4.547

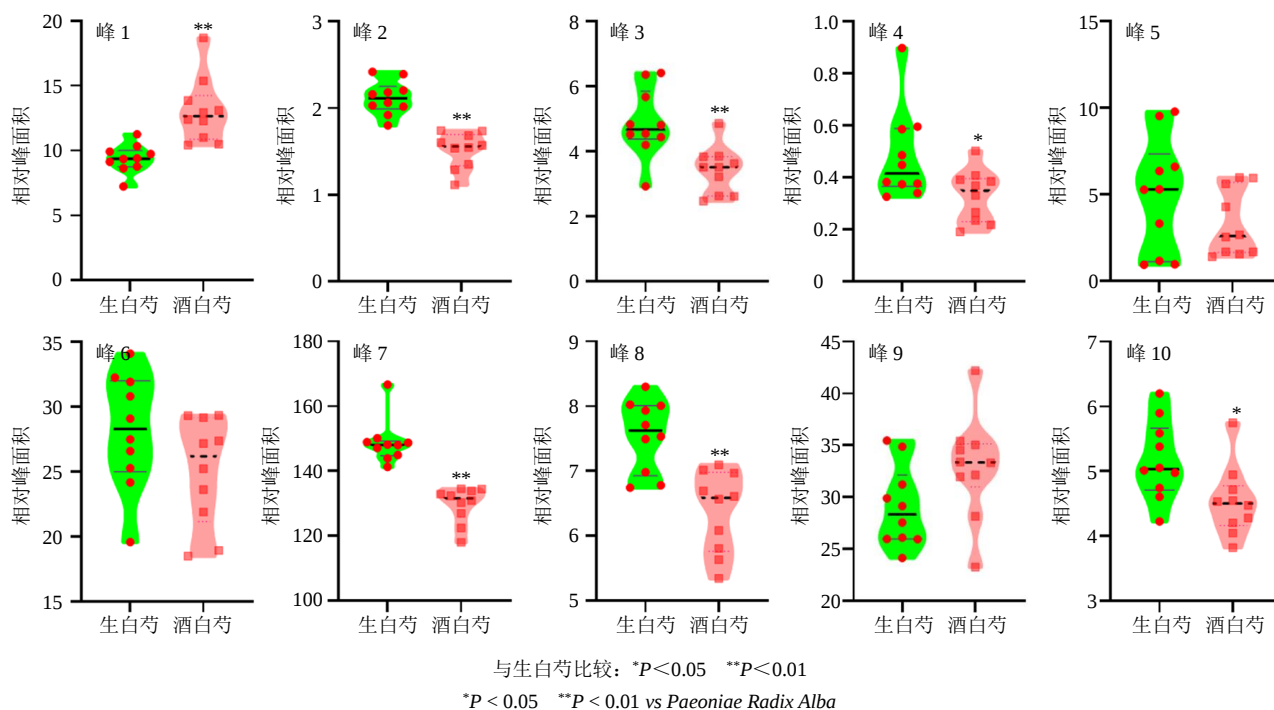


图3 白芍酒炙前后共有峰相对峰面积的小提琴图

Fig. 3 Violin plot of common peak relative peak area of *Paeoniae Radix Alba* before and after wine processing

呈现出不同程度地减少趋势, 其中峰 2~4、7、8、10 具有显著性变化差异。

2.4 化学计量学分析

2.4.1 层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 白芍饮片酒炙前后的差异^[11-12] 采用 SIMCA 14.1 对所有样品 10 个共有峰相对峰面积为变量, 进行 HCA, 所得结果如图 4 所示。当聚类距离为 20~25 时, 20 批样品可明显聚为生白芍及酒白芍 2 类, 其中 B1~B10 为一类, J1~J10 为一类, HCA 结果表明, 白芍酒炙前后可明显分为 2 类, 其成分含量存在一定差异, 而在其中生白芍与酒白芍各自不同批次之间又存在一定差异, 其原因可能与饮片药材收集的原产地、采收时间以及其炮制工艺存在一定的差异。

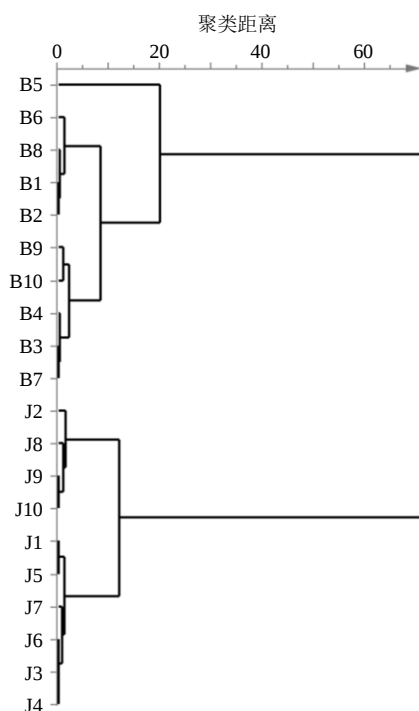


图 4 生白芍、酒白芍样品聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis diagram of *Paeoniae Radix Alba* and wine-processed *Paeoniae Radix Alba* samples

2.4.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 白芍饮片酒炙前后的差异^[13-14] 采用 SPSS 24.0 和 SIMCA 14.1 统计软件, 以上述 B1~J10 白芍酒炙前后样品 10 个共有峰相对峰面积为变量, 进行 PCA, 得 B5 批次样品分析结果在置信区间之外, 故 PCA 暂将 B5 样品剔除不作分析。其余样品分析后可得抽样适合性检验 (Kaiser Meyer Olkin, KMO, 检验值 ≥ 0.6) 和巴特利特球形检验 (Bartlett, 检验值 ≤ 0.05), 表明本研究所得结果可以用于进行

PCA; 其主成分特征值和贡献率, 以及主成分矩阵所得结果如表 3、4 所示。

由表 3 可得, 特征值大于 1 时, 可得出主成分 3 个, 累积方差贡献率为 72.930%, 说明这 3 个主成分可以客观的反映生白芍和酒炙白芍与 10 个共有峰之间的关系。由表 4 可知, 主成分 1 与峰 1~3、6~8、10 有较好的相关性, 主成分 2 与峰 4、9 有较好的相关性, 主成分 3 与峰 5 有较好的相关性, 因此, 在 PCA 中其 3 个主成分能够较好地代表生白芍与酒白芍样品饮片中大部分成分的信息, 故选取主成分 1~3 进行 PCA, 得其主成分得分图, 结果见如图 5。由图 5 可得, 白芍酒炙前后样品总体可明显聚为 2 类。其中 B1~B10 为一类 (未含 B5), J1~J10 为一类, 其结果与上述 HCA 结果一致, 表明白芍酒炙前后存在一定差异。

表 3 主成分特征值和贡献率

Table 3 Characteristic values and contribution rates of principal components

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.607	46.070	46.070
2	1.411	14.106	60.175
3	1.276	12.755	72.930

表 4 主成分矩阵

Table 4 Matrix of principal components

峰号	主成分			峰号	主成分		
	1	2	3		1	2	3
1	-0.705	0.062	-0.239	6	0.723	0.168	-0.253
2	0.903	-0.151	0.144	7	0.857	0.159	0.202
3	0.821	0.124	-0.382	8	0.798	0.419	0.323
4	0.456	-0.580	-0.141	9	-0.194	0.762	0.302
5	-0.007	-0.446	0.842	10	0.694	-0.151	-0.150

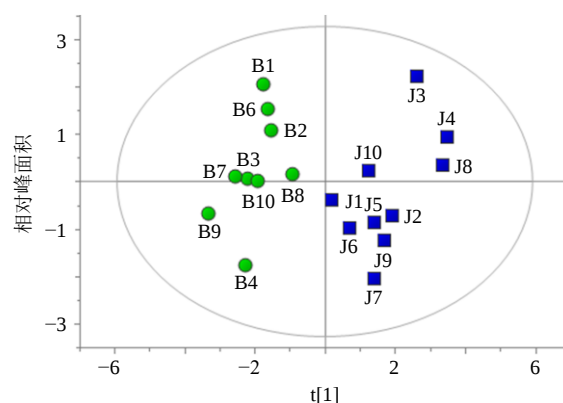


图 5 主成分得分图

Fig. 5 Principal component score

2.4.3 正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 白芍饮片酒炙前后主要差异性标志物^[15-16] 采用 SIMCA 14.1 对所有样品 10 个共有峰相对峰面积为变量, 进行 OPLS-DA, 以确定白芍饮片酒炙前后的主要差异成分, 结果见图 6、7。如图 6 所示, 白芍酒炙前后样品, 可明显分为 2 组, 生白芍 B1~B10 与酒炙白芍 J1~J10 各为 1 组, 这与 PCA 结果一致; 如图 7 所示, 峰 1 (没食子酸)、2 (氧化芍药苷)、3、7 (芍药苷)、8 (没食子酰芍药苷) 的变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值大于 1, 提示以上 5 种成分为白芍饮片酒炙前后的主要差异成分, 且通过上述 Violin Plot 可得, 该 5 种成分在白芍饮片酒炙前后均会发生显著性变化, 即 $P < 0.05$, 可作为白芍酒炙前后的差异性标志物。

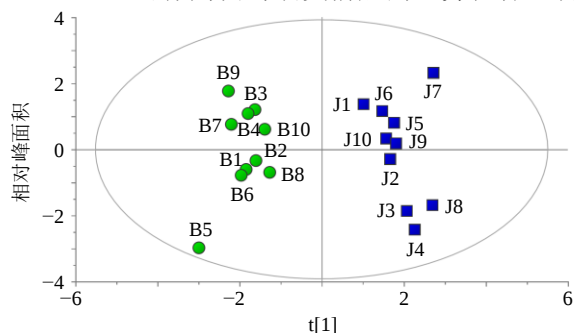


图 6 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA scores chart

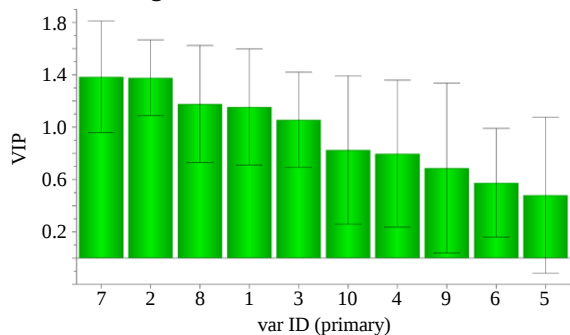


图 7 生白芍与酒白芍样品 OPLS-DA 的 VIP 图

Fig. 7 VIP value from OPLS-DA load diagram of *Paeoniae Radix Alba* and wine-processed *Paeoniae Radix Alba* samples

2.5 差异性标志物 (可测性) 含量测定

综合上述分析, 筛选得 5 种差异性标志物, 其中可指出 4 种差异性标志物分别为没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、没食子酰芍药苷; 而在白芍饮片中氧化芍药苷含量过低, 不易准确测定, 故后续选取其可指出且含量较高可准确测定的没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷等 3 种成分进行定量分析。

以期相对全面、客观地分析白芍酒炙前后差异性标志物变化情况。

2.5.1 线性关系考察 取 3 种成分对照品, 精密称定, 以“2.1.1”项下步骤配制 6 个不同质量浓度的对照品溶液。按“2.2”项下色谱条件检测, 分别以峰面积与质量浓度为纵、横坐标进行线性回归, 得回归方程分别为没食子酸 $Y = 0.1143X + 3.6738$, $R^2 = 0.9992$, 线性范围 2.53~101.00 $\mu\text{g/mL}$; 芍药苷 $Y = 0.2256X - 0.0517$, $R^2 = 0.9999$, 线性范围 5.06~101.20 $\mu\text{g/mL}$; 没食子酰芍药苷 $Y = 0.0488X - 0.0274$, $R^2 = 0.9996$, 线性范围 2.04~40.80 $\mu\text{g/mL}$; 结果可得各对照品线性关系良好, R^2 均在 0.999 以上。

2.5.2 精密度试验 取对照品没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷质量浓度分别为 50.2、100.6、100.4 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 得没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.790%、0.951%、0.503%, 表明仪器具有良好的精密度。

2.5.3 稳定性试验 取生白芍饮片样品 (B1), 按照“2.1.2”项下方法步骤配制供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 检测进样。其结果可得, 没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷峰面积的 RSD 依次为 0.658%、1.154%、0.785%, 得其溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取同一批生白芍饮片样品 (B1) 6 份, 按照“2.1.2”项下的步骤方法配制供试品溶液, 之后进样。其结果可得, 没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷质量分数平均值依次为 0.165%、2.844%、0.135%, RSD 分别为 1.979%、1.356%、2.320%, 表明此方法具有良好的重复性。

2.5.5 加样回收率试验 取已测定 3 种指标成分含量的样品 (B1) 6 份, 每份约 0.05 g, 精密称定, 以 1:1 比例加入没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷对照品适量, 之后进样检测, 得加样回收率考察结果。结果没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷的平均加样回收率分别为 98.82%、102.50%、103.00%, RSD 分别为 2.94%、2.15%、2.08%, 可得此方法具有良好的准确度。

2.5.6 样品测定 对 10 批生白芍饮片样品与 10 批酒白芍饮片样品进行含量测定, 按照“2.1”项下步骤方法配制对照品溶液和供试品溶液, 按“2.2”项下所述的色谱条件进样分析, 计算供试品溶液中 3

种可指认且含量较高可准确测定的主要差异性标志物没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷的含量，结果见表 5。

同时将测定结果导入微生信在线平台（www.bioinformatics.com.cn），绘制聚类热图^[17]，同时结合 SPSS 24.0 软件对其进行独立样本 t 检验分析，结果见图 8，可直观形象地观察和对比白芍饮片酒炙前后该 3 种成分含量变化趋势，区分生白芍与酒炙白芍饮片的质量差异。结果显示，白芍酒炙后没食子酸含量显著性升高，芍药苷、没食子酰芍药苷含量显著性下降，该 3 种成分酒炙前后呈现出明显差异（ $P<0.01$ ），同时通过聚类热图可将白芍酒炙前后分为两类，分类结果与 HCA 结果一致，表明该 3 种成分可以作为区分生白芍与酒白芍质量控制与鉴别的质控指标。

表 5 含量测定结果

Table 5 Content determination results

样品	质量分数/%			样品	质量分数/%		
	没食子酸	芍药苷	没食子酰芍药苷		没食子酸	芍药苷	没食子酰芍药苷
B1	0.171	2.790	0.138	J1	0.246	2.655	0.139
B2	0.193	2.937	0.143	J2	0.218	2.657	0.146
B3	0.223	2.842	0.164	J3	0.208	2.573	0.137
B4	0.205	3.291	0.172	J4	0.370	2.624	0.126
B5	0.143	2.923	0.167	J5	0.243	2.584	0.138
B6	0.186	2.906	0.154	J6	0.275	2.644	0.145
B7	0.197	2.941	0.158	J7	0.256	2.507	0.148
B8	0.174	2.863	0.155	J8	0.207	2.419	0.117
B9	0.181	2.965	0.164	J9	0.259	2.613	0.121
B10	0.185	2.925	0.138	J10	0.305	2.331	0.111

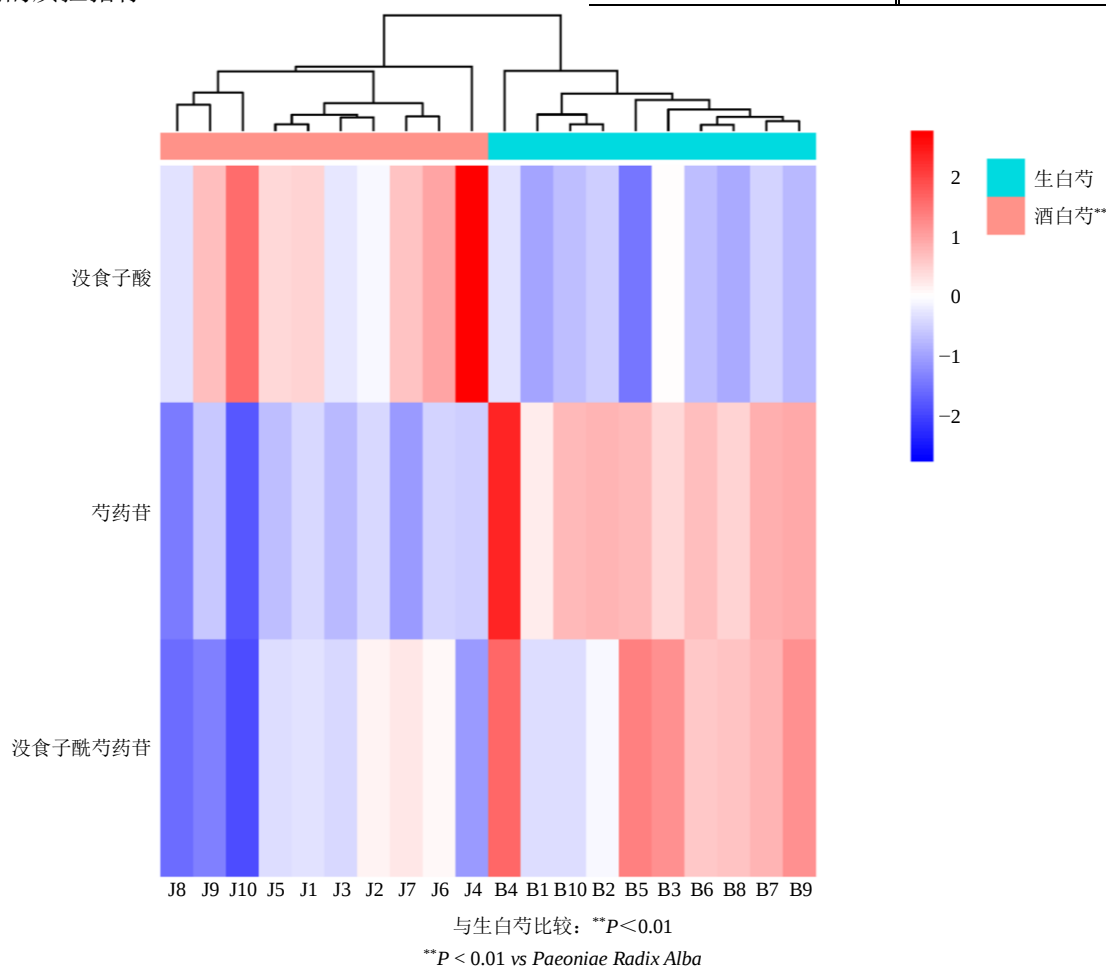


图 8 白芍酒炙前后差异性标志物含量聚类热图

Fig. 8 Cluster heat map of content of different markers before and after *Paeoniae Radix Alba* wine processing

3 讨论

3.1 指纹图谱差异性研究

本研究建立了生白芍饮片与酒炙白芍饮片的

HPLC 指纹图谱，通过相似度评价可得，单独生白芍饮片与酒炙白芍饮片整体质量相对稳定，但无法反映白芍酒炙前后的区分性及质量差异；后续进行

共有峰差异性分析得出白芍酒炙前后各共有峰峰面积的差异性变化,并进一步利用化学计量学等方法,分析白芍饮片酒炙前后指纹图谱差异,通过 HCA 可明显把生白芍与酒炙白芍分为 2 类,其结果与 PCA 结果互相印证,表明白芍酒炙前后存在一定差异, OPLS-DA 结果表明峰 1 (没食子酸)、2 (氧化芍药苷)、3、7 (芍药苷)、8 (没食子酰芍药苷) 为二者质量差异的主要代表成分,且通过酒炙前后均会发生显著性变化,即 $P < 0.05$,可作为区分生白芍饮片与酒炙白芍饮片的差异性标志物。

其中,对白芍酒炙前后各共有峰差异变化进行分析,发现白芍酒炙后,除峰 1 (没食子酸) 与峰 9 (1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖) 峰面积增加外,其余成分峰面积均呈现下降趋势;结合 Xiong 等^[18]采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 对中药白芍中鞣质进行鉴定的报道中发现白芍中含有多种水解鞣质,可在酸、碱、酶等条件下逐步发生水解,因此推测本实验中鞣质类成分峰 1 (没食子酸) 与峰 9 (1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖) 峰面积增加,其原因可能是,在酒炙过程中某一可水解类鞣质水解,使之有所增加,同时峰 1 (没食子酸) 增加具有显著性,可能为白芍在炮制过程中,黄酒中原有成分的引入以及部分峰 9 (1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖) 可继续水解产生峰 1 (没食子酸),进而使其显著性增加。而其余成分峰面积呈现下降的趋势,可能原因为在酒炙过程中,受热不稳定,使其结构遭到了破坏,进而使其响应值降低,如白芍中所含的化学成分峰 7 (芍药苷) 以及其相似的化合物,峰 8 (没食子酰芍药苷) 等,可能在炒制过程中,其高温条件下分别使其醚苷键与酯苷键断裂,而生成其他化合物^[19-20]; 该些成分以及发生转化的具体机制还有待进一步验证研究。

3.2 差异标志物含量研究

白芍所含化学成分繁杂多样^[21],研究发现其所含成分芍药苷可减少炎症因子的生成,并可使正常的细胞信号传导得到恢复,从而发挥抗炎的作用,同时还可通过腺苷 A1 受体发挥镇痛作用,此外,芍药苷还可抑止活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成和 NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 的表达,并通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路,使得核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor- κ B-related factor 2, Nrf2) 表达上调,进而通过抗氧化

机制缓解胆汁淤积,进而起到保肝等药理作用^[22-24],为白芍发挥柔肝止痛功效的主要物质基础之一;所含成分没食子酰芍药苷与没食子酸,则分别可通过抑制血管内皮细胞的增殖进而抑制血栓的形成与舒张血管^[25-26],发挥白芍养血活血等功效,同时没食子酸还可降低其肝脏中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量,提高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力进而具有一定的保肝作用。该 3 种成分与白芍功能主治密切相关,且在白芍酒炙前后主要差异标志物中含量较高,因此,对筛选出的此 3 种主要差异标志物进行定量分析。根据含量测定结果与聚类热图可直观得出,白芍酒炙后没食子酸含量显著性升高,芍药苷与没食子酰芍药苷的含量显著性下降; 3 种成分均有显著性差异变化,同时通过聚类热图仍可将白芍酒炙前后分为 2 类,与化学计量学分析结果一致,进一步证实了选择该 3 种成分作为白芍酒炙前后差异性标志物的合理性,可为后续进一步探究功效变化机理与酒炙前后质量控制提供科学参考。

4 结论

白芍作为大宗中药品种,酒炙是其主要的炮制方法之一,借助酒温升散寒,缓和其酸寒伐肝之性,增强其养血调经、柔肝止痛等功效。现有研究表明,生物碱和苷类成分是具有苦寒之性药物的物质基础^[22],而白芍中富含单萜苷类成分,结合本研究中发现白芍酒炙后会使单萜苷类成分芍药苷、没食子酰芍药苷等成分含量降低,推测这可能与白芍酒炙后寒性下降有着一定的联系,其炮制机制,有待进一步深入探究;同时没食子酸有一定的活血与保肝的作用,酒炙后其在饮片中的含量升高,与白芍酒炙后养血保肝等功效的增强具有一定的相关性,其含量升高可能与没食子酸鞣质类成分在酒炙过程中水解有关。

本研究对于白芍酒炙前后化学成分的辨析尚存在不足,暂未明确峰 3、4、5 所对应的化学成分,后期将采用色谱-质谱联用等方法进一步对未知成分进行鉴定;同时结合药理药效实验进一步研究白芍酒炙前后成分变化及其功效变化的相关性。综上所述,本研究基于指纹图谱结合化学计量学对比研究了白芍酒炙前后的差异性,并筛选出二者差异性标志物,可为白芍酒炙前后饮片的质量控制和品质评价提供参考,同时对二者差异性标志物进行定量分析,对白芍酒炙前后中化学成分变化情况进行了

初步探究,为白芍酒炙前后炮制机制及临床应用的深入研究提供科学依据。

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: 108.
- [2] 明·李时珍. 本草纲目: 校点本 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 42.
- [3] 刘延欣, 魏会勤. 白芍不同炮制品芍药苷含量测定及其镇痛作用的比较研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(2): 88.
- [4] 李颖, 魏新智. 白芍不同炮制品的镇痛、镇静、抗炎作用比较 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(4): 39-41.
- [5] 赵秋龙, 杨沛文, 钱大玮, 等. 不同加工干燥方法对白芍药材中化学成分的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5839-5847.
- [6] 俞叶飞, 王盼, 陈子林, 等. 不同干燥方法对白芍药材初加工过程中品质的影响 [J]. 浙江中医杂志, 2020, 55(12): 922-923.
- [7] 张生杰, 田志梅, 曹雪芹, 等. 基于 HPLC 指纹图谱与多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地白芍的质量 [J]. 中医药导报, 2021, 27(1): 51-57.
- [8] 熊瑞, 武娟, 张兴兴, 等. 基于化学计量学的重楼(加格略)生品和蒸制品饮片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5663-5672.
- [9] 孙梓玮, 崔伟亮, 王杨, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及化学计量学筛选个青皮、四花青皮质量标志物 [J]. 中药材, 2022, 45(3): 647-651.
- [10] 赵宏苏, 赵茹, 乔金为, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别绿萼梅质量标志物的评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1345-1353.
- [11] Dong H J, Zhang Z J, Yu J, et al. Chemical fingerprinting of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees by HPLC and hierarchical clustering analysis [J]. *J Chromatogr Sci*, 2009, 47(10): 931-935.
- [12] 田婷婷, 马英华, 解伟伟, 等. LC-MS/MS 同时测定蓝萼香菜中 4 种二萜类成分及其聚类分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 250-256.
- [13] 林秀敏, 张振凌, 王胜超, 等. 白芍饮片的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析 [J]. 中国药房, 2019, 30(24): 3375-3382.
- [14] 李洋, 陈健, 张越, 等. 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 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 231-237.
- [15] Ma Q D, Chen X X, Zhang K, et al. Chemical fingerprint analysis for discovering markers and identifying *Saussurea involucreata* by HPLC coupled with OPLS-DA [J]. *J Anal Methods Chem*, 2020, 2020: 7560710.
- [16] Huang B M, Zha Q L, Chen T B, et al. Discovery of markers for discriminating the age of cultivated *ginseng* by using UHPLC-QTOF/MS coupled with OPLS-DA [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45: 8-17.
- [17] 孙梦梅, 王瑞生, 张振凌, 等. 基于指纹图谱及化学计量学研究不同发酵程度建曲中成分变化 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4340-4349.
- [18] Xiong P, Qin S H, Li K L, et al. Identification of the tannins in traditional Chinese medicine *Paeoniae Radix Alba* by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS [J]. *Arab J Chem*, 2021, 14(11): 103398.
- [19] 杨艳玲, 刘彩凤, 黄嘉怡, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的白芍及酒白芍比较分析 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(8): 1374-1379.
- [20] 姚玲玲. LC-MS 技术在不同炮制程度甘草、白芍质量标志物的发现及肠道菌对人参皂苷代谢转化研究中的应用 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [21] 岳倩侠, 孙叶芬, 杨爽, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 553-560.
- [22] Zhang L, Yu J, Wang C, et al. The effects of total glucosides of paeony (TGP) and paeoniflorin (*Pae*) on inflammatory-immune responses in rheumatoid arthritis (RA) [J]. *Funct Plant Biol*, 2019, 46(2): 107-117.
- [23] Yin D, Liu Y Y, Wang T X, et al. Paeoniflorin exerts analgesic and hypnotic effects via adenosine A₁ receptors in a mouse neuropathic pain model [J]. *Psychopharmacology*, 2016, 233(2): 281-293.
- [24] Ma X, Zhang W W, Jiang Y X, et al. Paeoniflorin, a natural product with multiple targets in liver diseases-a mini review [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 531.
- [25] 戴淑萍, 颜勤明. 白芍总苷在心血管疾病模型动物中的药理研究进展 [J]. 中国药房, 2015, 26(10): 1418-1420.
- [26] de Oliveira L M, de Oliveira T S, da Costa R M, et al. The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and -independent mechanisms [J]. *Vasc Pharmacol*, 2016, 81: 69-74.

[责任编辑 郑礼胜]