

基于指纹图谱结合化学模式识别法对不同种质白芍质量评价

杜倩倩¹, 张铁军², 谢冬梅^{1,3}, 张伟^{1,3}, 汪天明^{1,3}, 孙叶芬¹, 岳倩侠¹, 杨爽¹, 马磊⁴, 俞年军^{1,3*}, 曹勇^{5,6*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012
2. 天津药物研究院, 天津 300301
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. 安徽普康中药资源有限公司, 安徽 亳州 236800
5. 中药提取安徽省技术创新中心, 安徽 亳州 236800
6. 安徽济人药业股份有限公司, 安徽 亳州 236800

摘要:目的 采用指纹图谱与化学模式识别方法,以质量标志物(quality marker, Q-Marker)为指标,评价不同种质白芍 *Paeoniae lactiflora* 的质量。方法 采用 HPLC 法,以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,柱温 30 ℃,体积流量 1 mL/min,检测波长 230 nm;绘制 40 批白芍样品的指纹图谱,结合相似度分析、聚类分析(cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法(orthogonal partial least square, OPLS-DA)等化学模式识别技术,对不同种质的白芍样品进行质量评价。结果 从质量传递与溯源,植物亲缘性及化学成分的特有性、有效性及可测性等方面对白芍 Q-Marker 的选择进行了分析,推测白芍中芍药苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、芍药内酯苷、儿茶素、没食子酰芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖和没食子酸可作为白芍的 Q-Marker。以 40 批白芍 HPLC 指纹图谱标定白芍的 Q-Marker,相似度在 0.892~1.000;聚类分析初步区分出了不同种质的白芍,四川中江、浙江杭州和河北安国的白芍样品质量较为相近;PCA 和 OPLS-DA 结果显示,筛选出的 Q-Marker 可作为不同种质白芍的特征化学成分;对 Q-Marker 进行含量测定,结果不同种质样品间差异较大;TOPSIS 分析结果表明山西运城的白芍质量排名最高,人工培育的杂花白芍质量排名最低。结论 通过指纹图谱结合化学模式识别技术,以白芍 Q-Marker 为评价指标能较为全面地反映白芍的质量,可以为白芍优质种质资源的选育和育种提供参考。

关键词: 白芍;种质资源;质量标志物;HPLC;指纹图谱;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;化学模式识别

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)10-3292-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.026

Evaluation of quality markers of *Paeoniae Radix Alba* in different germplasm based on fingerprint and chemical pattern recognition

DU Qian-qian¹, ZHANG Tie-jun², XIE Dong-mei^{1,3}, ZHANG Wei^{1,3}, WANG Tian-ming^{1,3}, SUN Ye-fen¹, YUE Qian-xia¹, YANG Shuang¹, MA Lei⁴, YU Nian-jun^{1,3}, CAO Yong^{5,6}

1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China
3. MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012, China
4. Anhui Pukang traditional Chinese Medicine Resources Co., Ltd., Bozhou 236800, China
5. Anhui Innovation Center of Extraction Technology of Chinese Medicinal Materials, Bozhou 236800, China
6. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

Abstract: Objective To evaluate the quality of different germplasms of Baishao (*Paeoniae Radix Alba*) taking quality marker

收稿日期: 2022-10-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1701600); 国家重点研发计划项目(2017YFC1701602); 2021 年安徽省重点研发项目(202104h04020029); 亳州市科技重大专项(BZSKXJSJ2020-59)

作者简介: 杜倩倩(1997—),女,安徽省肥西县,硕士研究生,研究方向为中药资源与质量评价。Tel: 13739292310 E-mail: 1009347120@qq.com

*通信作者: 俞年军,教授,研究方向为中药生物技术及栽培药材质量等。Tel: (0551)68129173 E-mail: ynj2005288@sina.com

曹勇,副研究员,研究方向为中药质量控制及新药研发。E-mail: caoyong20021226@163.com

(Q-Marker) as indicators by using fingerprint and chemical pattern recognition methods. **Method** Using the HPLC method, acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution was used as mobile phase for gradient elution, column temperature 30 °C, volume flow rate 1 mL/min, detection wavelength 230 nm. The fingerprints of 40 batches of *Paeoniae Radix Alba* were drawn, combined with chemical pattern recognition techniques such as similarity analysis, cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least square (OPLS-DA). The quality of different germplasm samples of *Paeoniae Radix Alba* was evaluated. **Results** The selection of Q-Marker of *Paeoniae Radix Alba* was analyzed from the aspects of quality transfer and traceability, plant relationship, and chemical composition specificity, effectiveness and detectability. It was suggested that paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoyl paeoniflorin, albiflorin, catechin, gallic paeoniflorin, 1,2,3,4, 6-penogalylglucose and gallic acid in paeony could be used as Q-Marker of *Paeoniae Radix Alba*. The HPLC fingerprints of 40 batches of *Paeoniae Radix Alba* were used to calibrate the Q-Marker of *Paeoniae Radix Alba*, and the similarity was between 0.892 and 1. Cluster analysis preliminarily distinguished the *Paeoniae Radix Alba* of various germplasms. The quality of samples from Zhongjiang in Sichuan, Hangzhou in Zhejiang, and Anguo in Hebei was similar. The results of PCA and OPLS-DA showed that the selected Q-Marker could be used as the characteristic chemical constituents of different germplasm *Paeoniae Radix Alba*. The content of Q-Marker varied greatly among different germplasm samples. The results of TOPSIS analysis showed that the quality of *Paeoniae Radix Alba* in Yuncheng, Shanxi was the highest, and the quality of *Paeoniae Radix Alba* in Zahua was the lowest. **Conclusion** Through fingerprint combined with chemical pattern recognition technology, taking the Q-Marker of *Paeoniae Radix Alba* as an evaluation index can comprehensively reflect the quality of *Paeoniae Radix Alba*, which can provide a reference for the breeding and breeding high-quality germplasm resources of *Paeoniae Radix Alba*.

Key words: *Paeoniae Radix Alba*; germplasm resources; quality marker; HPLC fingerprint; gallic acid; oxidized paeoniflorin; catechin; albiflorin; paeoniflorin; galloyl paeoniflorin; PGG; benzoyl paeoniflorin; chemical pattern recognition

白芍 *Paeoniae Radix Alba* 为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 有养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳的功能^[1], 是中医临床常用的大宗药材之一。现代药理研究表明, 白芍有免疫调节^[2]、抗炎^[3]、肝脏保护^[4]、心血管保护^[5]、脑保护^[6]和神经保护^[7-8]等作用, 临床用于治疗多种自身免疫性疾病^[9-10]、肝损伤^[11-13]、帕金森病^[14-15]和抑郁症^[16-17]等。近年, 山东省菏泽市、安徽省亳州市、浙江省磐安县及四川省中江县等已成为我国药用白芍的主要产区^[18-19]。白芍的质量问题一直深受重视, 产地^[20]、加工^[21]、种质^[22]及硫熏^[23]等是造成市场上白芍药材质量良莠不齐的主要因素。目前, 人工栽培是满足白芍市场需求的主要途径, 经长期栽培后, 白芍的遗传特性发生明显变异, 形成了各个产地的不同种质^[24-25]。种质是影响中药材质量和产量的重要因素^[26], 选育优良品种是提高白芍质量和产量的有效途径。现行白芍的质量评价及质量控制方法多是以芍药苷作为指标, 但中药材具有化学成分复杂、多成分协同作用的特点, 单一的指标可能难以反映白芍的内在品质。

中药质量是中药有效性、安全性的关键因素, 是中药临床疗效的根本保证^[27-29]。由刘昌孝院士^[30]提出的中药质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 以整体观为指导, 有利于使中药变得更加安全有效、质量可控且机制明确。王倩等^[31]通过比较白芍、赤

芍的功能主治、化学成分、药理作用的异同, 认为白芍、赤芍中所含有的单萜及其苷类及鞣质类成分较为活跃, 可作为预测白芍、赤芍 Q-Marker 的主要选择对象。徐佳新等^[32]总结了白芍的化学成分、药理作用和质量控制方法的研究进展, 从质量传递与溯源, 植物亲缘性及化学成分的特有性、有效性及可测性等方面对白芍 Q-Marker 的选择进行了分析, 推测白芍中芍药苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、芍药内酯苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4,6-pentagalloylglucose, PGG) 和没食子酸等化合物可作为白芍的 Q-Marker。

本课题组前期利用液质联用技术、计算机模拟分子对接技术、网络药理学和体外炎症模型等研究, 初步筛选出芍药苷、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、PGG 和没食子酸 8 种成分作为白芍的 Q-Marker。指纹图谱是实现鉴别中药真实性、评价质量一致性和产品稳定性的可行模式, 能较全面地反映药材所含化学成分的相对关系^[33-35], 指纹图谱结合化学模式识别技术能够科学、有效地反映药材的内在质量^[36-37]。本研究初步筛选出来的白芍 Q-Marker 为指标, 利用指纹图谱结合化学模式识别技术评价不同种质白芍的质量。

1 材料

1.1 仪器

Agilent Infinity 1260 型高效液相色谱仪 (美国

Agilent 公司), PALL Cascada III 超纯水一体化系统 (美国 PALL 公司), CP214 型 1/1 万电子天平 (美国 OHAUS 公司), AE240 型 1/10 万电子天平 (美国 Mettler-Toledo 公司); 高速多功能打粉机 (上海赛耐机械有限公司); AS30600BT 型系列超声波清洗仪 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

没食子酸 (批号 C17D10C105977, 质量分数 $\geq 98\%$), 儿茶素 (批号 P21J11F118380, 质量分数 $\geq 98\%$), 芍药内酯苷 (批号 DST190120-071, 质量分数 $\geq 91.4\%$), PGG (批号 G16M11L113433, 质量分数 $\geq 99\%$), 苯甲酰芍药苷 (O11G1B163260, 质量分数 $\geq 99\%$), 没食子酰芍药苷 (P16A11S111470, 质量分数 $\geq 98\%$) 购于上海源叶生物科技有限公司; 芍药苷 (批号 110736-201842, 质量分数 $\geq 98\%$) 购于中国食品药品检定研究院, 氧化芍药苷 (批号 21092304, 质量分数 $\geq 98\%$) 购于成都普菲德生物技术有限公司; 乙腈 (瑞典 OCEANPAK, 色谱纯); 磷酸 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 甲醇 (国药集团化学试剂有限公司, 色谱纯); 超纯水、蒸馏水 (自制)。

1.3 药材

基因型决定药用植物合成次生代谢产物, 而环境条件影响其次生代谢产物合成的数量^[38]。本研究将不同种质白芍的种苗集中栽培, 在排除栽培环境因素的基础上评价其质量, 为种质筛选和种苗繁育奠定基础。2016 年, 分别收集安徽亳州、四川中江、山东菏泽、山西运城、浙江杭州、河北安国和四川成都的药用芍药的芽头, 采用芽头繁殖的方式, 在安徽省亳州市谯城区十河镇试验田进行统一栽培管理。2021 年 9 月对以上药材进行采样。此外, 采集相同生长年限的安徽亳州试培育品种“杂花芍药”, 即农户人工培育的新品种。本实验所用白芍药材经安徽中医药大学前年军教授鉴定为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 的干燥根。40 批药材信息见表 1。

2 方法

2.1 色谱条件

安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为 0.1% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 9% B; 5~8 min, 9%~15% B; 8~23 min, 15%~25% B; 23~28 min, 25%~35% B; 28~35 min, 35%~90% B。体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 230

表 1 白芍采样情况

Table 1 Sampling conditions of *Paeoniae Radix Alba*

编号	种质来源	编号	种质来源
S1	安徽亳州	S21	浙江杭州
S2	安徽亳州	S22	浙江杭州
S3	安徽亳州	S23	浙江杭州
S4	安徽亳州	S24	浙江杭州
S5	安徽亳州	S25	浙江杭州
S6	四川中江	S26	河北安国
S7	四川中江	S27	河北安国
S8	四川中江	S28	河北安国
S9	四川中江	S29	河北安国
S10	四川中江	S30	河北安国
S11	山东菏泽	S31	四川成都
S12	山东菏泽	S32	四川成都
S13	山东菏泽	S33	四川成都
S14	山东菏泽	S34	四川成都
S15	山东菏泽	S35	四川成都
S16	山西运城	S36	杂花芍药
S17	山西运城	S37	杂花芍药
S18	山西运城	S38	杂花芍药
S19	山西运城	S39	杂花芍药
S20	山西运城	S40	杂花芍药

nm, 进样量 10 μ L, 进样前在其初始条件下平衡 5 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 样品采集回实验室, 洗净后置于沸水中煮至透心, 捞出, 去皮, 60 $^{\circ}$ C 烘干。将干燥品打粉过四号筛 (65 目)。

精密称定本品粉末 0.5 g, 倒入 25 mL 的量瓶中, 加稀乙醇 15 mL, 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, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 制成供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、没食子酰芍药苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、PGG 和没食子酸对照品适量, 加入甲醇 (色谱纯) 溶液, 超声 30 min (功率 240 W、频率 45 kHz), 使其溶解完全后振荡摇匀, 制成没食子酸、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浓度分别为 0.154、0.127、0.121、0.720、0.985、0.132、0.210、0.209 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围 精密吸取混合对照品溶液适量, 用甲醇溶液稀释制成不同浓度的混合对照品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进样分析, 平行进样 3 次, 测得峰面积。以各对照品质量浓度为横坐标 (X),

峰面积为纵坐标 (Y), 求得回归方程, 绘制标准曲线, 见表 2。结果表明, 各待测成分在相应质量范围内线性关系良好。

2.3.2 精密度试验 取 S1 样品粉末, 照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下条件连续进样 6 次分析, 结果没食子酸、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 8 个成分的相对保留时间的 RSD 分别为 0.35%、0.22%、0.27%、0.12%、0.12%、0.11%、0.19%和 0.01%, 峰面积的 RSD 分别为 0.84%、2.83%、0.79%、0.96%、2.08%、0.87%、2.72%、0.38%, RSD 均<3%, 表明仪器精密度良好。

表 2 回归方程及线性范围

Table 2 Regression equation and linear range

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(mg·L ⁻¹)
没食子酸	$Y=16.600 X+23.27$	0.999 9	2.41~123
氧化芍药苷	$Y=3.173 2 X+3.070$	0.999 1	1.98~127
儿茶素	$Y=26.719 X+17.62$	0.999 9	1.89~121
芍药内酯苷	$Y=10.322 X+55.36$	0.999 8	11.3~720
芍药苷	$Y=13.453 X-8.380$	0.999 7	15.4~985
没食子酰芍药苷	$Y=17.994 X+9.810$	0.999 5	2.06~132
PGG	$Y=4.962 4 X+212.9$	0.999 7	3.28~210
苯甲酰芍药苷	$Y=21.512 X+28.01$	0.999 7	3.27~209

2.3.3 重复性试验 取 S1 样品粉末, 按照“2.2.1”项下方法平行制备 6 份制备供试品溶液, 按“2.1”项下条件进样, 结果没食子酸、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 8 个成分的相对保留时间的 RSD 分别为 0.40%、0.25%、0.27%、0.17%、0.20%、0.22%、0.35%和 0.01%, 峰面积的 RSD 分别为 0.09%、2.52%、0.48%、0.28%、1.94%、0.50%、0.92%和 0.11%, 表明方法重复性好。

2.3.4 稳定性试验 取 S1 样品粉末, 按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下条件分别于供试品溶液制备后 0、2、4、8、10、12、14、16、24 h 进样分析, 结果没食子酸、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 8 个成分的相对保留时间的 RSD 分别为 0.68%、0.29%、0.39%、0.22%、0.22%、0.20%、0.32%和 0.01%, 峰面积的 RSD 分别为 1.64%、2.79%、2.32%、0.81%、0.69%、0.84%、2.90%和 1.12%。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取已知各指标成分含量的白芍样品 (S1) 8 份, 每份 0.25 g, 分别加入与样品中各成分含量相等的对照品溶液, 按“2.2.1”项下条件制备供试品溶液, 按“2.1”项下条件进行测定, 计算各成分含量^[39], 得到 8 个成分的平均加样回收率及 RSD。结果没食子酸、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 96.76%、91.46%、96.17%、102.39%、101.92%、96.36%、100.17%和 98.04%, 保留时间 RSD 依次为 0.32%、0.27%、0.16%、0.08%、0.08%、0.10%、0.18%、0.01%, 表明该方法准确可靠。

2.4 数据分析

利用“中药色谱指纹图谱相似系统 (2012 版)”软件绘制 40 批白芍样品的指纹图谱, 并进行相似度评价分析。利用 SPSS 23.0 软件以白芍 Q-Marker 含量为指标, 采用平均联接法, 选择平方欧氏距离为测度对样品数据进行聚类分析 (cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和优劣解距离法分析 (TOPSIS)。利用 SIMCA 14.1 软件进行不同种质白芍的 PCA 分析和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least square, OPLS-DA) 分析。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱的建立

分别混合对照品溶液和 40 批白芍样品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进行分析, 将 HPLC 图谱以 AIA 格式导入“中药色谱指纹图谱相似系统 (2012.130723)”软件。将 S1 白芍样品的 HPLC 图设为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗宽度为 0.1 min, 经多点校正后匹配, 生成 40 批白芍样品的指纹图谱, 见图 1。

在指纹图谱中, 保留时间 2~35 min 内共出现了 11 个共有峰, 与混合对照品的色谱峰进行比较, 指认了 8 个色谱峰, 2 号峰为没食子酸, 4 号峰为氧

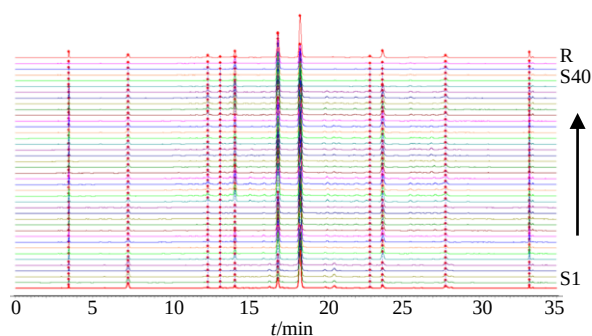


图 1 40 批白芍样品的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of 40 batches of *Paeoniae Radix Alba*

化芍药苷, 5 号峰为儿茶素, 6 号峰为芍药内酯苷, 7 号峰为芍药苷, 8 号峰为没食子酰芍药苷, 9 号峰为 PGG, 11 号峰为苯甲酰芍药苷, 见图 2。对 40 批白芍药材指纹图谱进行相似度评价分析, 结果除 S36~S40 样品外, 其余样品的相似度均大于 0.95, 见表 3。结果表明杂花芍药与其他种质的样品具有明显差异, 而各个种质的白芍指纹图谱相似度较高, 说明各个种质的药材质量较为稳定和均一。

3.2 含量测定结果

按照“2.1”项下条件测定白芍样品, 每个样品平行测定 3 次, 结果显示, 不同种质白芍样品之间的 Q-Marker 含量有较大差异, 见表 4。

3.3 HCA

HCA 可将样本分为不同的类别^[40]。40 批白芍样品 HPLC 指纹图谱中的 Q-Marker 的峰面积经标准化处理后, 运用 SPSS 23.0 进行 HCA, 选择以组

表 3 40 批白芍样品相似度评价结果

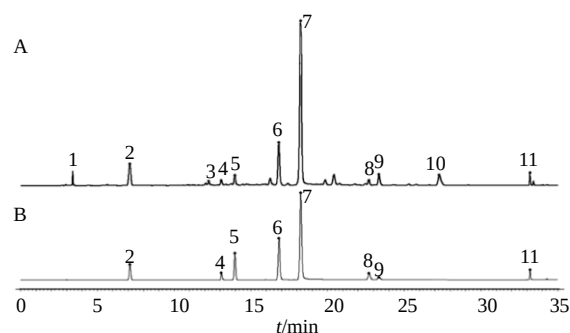
Table 3 Similarity evaluation results of 40 batches of *Paeoniae Radix Alba*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.953	S21	0.999
S2	0.954	S22	0.999
S3	0.953	S23	1.000
S4	0.953	S24	0.999
S5	0.954	S25	0.999
S6	0.989	S26	0.995
S7	0.989	S27	0.996
S8	0.988	S28	0.996
S9	0.992	S29	0.995
S10	0.991	S30	0.995
S11	0.984	S31	0.987
S12	0.983	S32	0.988
S13	0.984	S33	0.985
S14	0.984	S34	0.985
S15	0.984	S35	0.985
S16	0.984	S36	0.894
S17	0.985	S37	0.896
S18	0.984	S38	0.894
S19	0.984	S39	0.893
S20	0.985	S40	0.892

间连接作为聚类方法, 绘制树状图, 见图 3。当分类距离为 25 时, 白芍样品分为 2 类, S36~S40 聚为一类, S1~S35 聚为一类。当分类距离为 5 时白芍样品分为 6 类, S6~S10 和 S21~S30 聚为一类, 其他样品按照来源各自聚为一类。结果表明, HCA 可大致区分出各种质白芍, 其中四川中江、浙江杭州和河北安国的样品质量较为相近。

3.4 PCA

将 40 批白芍样品的 Q-Marker 的峰面积导入 SPSS 23.0 统计软件进行 PCA, 结果显示 KMO 为 0.615, 大于 0.6, 满足 PCA 的前提要求; Bartlett 球形度检验 $P < 0.05$, 说明研究数据适合进行 PCA。以特征值大于 1 为提取标准, 筛选得到 3 个主成分 (碎石图见图 4), 累积贡献率大于 90%, 即提取的 3 个主成分包含了白芍 Q-Marker 的 95.877% 的信息, 结果见表 5。将得到的成分矩阵进行正交旋转得到 8 个共有峰成分在 3 个主成分中的旋转矩阵, 权重值越大表明该成分在决定样品区分中的作用越大^[41], 见表 6。结果显示第 1 个主成分信息主要来自苯甲酰芍药苷、芍药苷、没食子酰芍药苷和 PGG, 第 2 个主成分信息主要来自氧化芍药苷、儿茶素和芍药内酯苷, 第 3 个主成分信息主要来自没食子酸。根据各主要化学成分在不同因子上的载荷, 可确定白芍 Q-Marker 的 8 种化学成分均可作为不同种质白



2-没食子酸 4-氧化芍药苷 5-儿茶素 6-芍药内酯苷 7-芍药苷
 8-没食子酰芍药苷 9-PGG 11-苯甲酰芍药苷
 2-gallic acid 4-oxidized paeoniflorin 5-catechin 6-albiflorin
 7-paeoniflorin 8-galloyl paeoniflorin 9-PGG 11-benzoyl paeoniflorin

图 2 白芍样品 (A) 和混合对照品 (B) HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of *Paeoniae Radix Alba* sample (A) and mixed reference substance (B)

表 4 不同种质白芍 Q-Marker 的含量

Table 4 Q-Marker content of different germplasms of *Paeoniae Radix Alba*

编号	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/%
S1	0.270	0.239	0.060	0.688	2.357	0.050	0.230	0.051
S2	0.268	0.211	0.063	0.715	2.440	0.051	0.245	0.053
S3	0.271	0.259	0.058	0.668	2.248	0.048	0.191	0.051
S4	0.271	0.259	0.059	0.683	2.331	0.049	0.226	0.051
S5	0.270	0.224	0.062	0.705	2.411	0.051	0.252	0.052
S6	0.154	0.234	0.141	1.658	3.299	0.070	0.707	0.157
S7	0.155	0.200	0.137	1.591	3.273	0.066	0.696	0.153
S8	0.152	0.196	0.135	1.584	3.261	0.065	0.639	0.152
S9	0.154	0.080	0.141	1.677	3.249	0.072	0.730	0.154
S10	0.156	0.229	0.138	1.649	3.318	0.068	0.700	0.154
S11	0.139	0.040	0.065	1.105	2.391	0.053	0.728	0.120
S12	0.151	0.107	0.069	1.113	2.454	0.064	0.784	0.122
S13	0.145	0.120	0.069	1.138	2.495	0.054	0.752	0.125
S14	0.139	0.114	0.065	1.105	2.410	0.060	0.665	0.121
S15	0.140	0.040	0.065	1.096	2.393	0.063	0.703	0.118
S16	0.165	0.510	0.325	2.679	2.677	0.069	0.897	0.116
S17	0.165	0.510	0.328	2.672	2.698	0.073	0.904	0.115
S18	0.160	0.497	0.319	2.638	2.602	0.065	0.858	0.112
S19	0.164	0.509	0.325	2.680	2.670	0.071	0.875	0.115
S20	0.168	0.521	0.332	2.739	2.759	0.071	0.901	0.118
S21	0.154	0.263	0.169	1.754	2.760	0.047	0.771	0.097
S22	0.156	0.245	0.175	1.889	2.785	0.068	0.780	0.102
S23	0.155	0.237	0.169	1.833	2.704	0.065	0.739	0.099
S24	0.150	0.253	0.165	1.732	2.696	0.044	0.731	0.095
S25	0.160	0.274	0.177	1.849	2.885	0.048	0.784	0.101
S26	0.174	0.329	0.155	1.673	2.917	0.066	0.864	0.100
S27	0.171	0.318	0.154	1.671	2.918	0.069	0.826	0.100
S28	0.174	0.320	0.152	1.669	2.921	0.066	0.812	0.100
S29	0.172	0.317	0.151	1.638	2.888	0.065	0.846	0.098
S30	0.172	0.293	0.152	1.644	2.894	0.068	0.818	0.100
S31	0.127	0.406	0.269	2.437	2.476	0.052	0.682	0.072
S32	0.124	0.397	0.257	2.311	2.396	0.050	0.671	0.068
S33	0.121	0.406	0.256	2.391	2.365	0.054	0.686	0.069
S34	0.122	0.410	0.262	2.447	2.422	0.055	0.683	0.071
S35	0.122	0.415	0.261	2.414	2.378	0.054	0.712	0.069
S36	0.071	0.216	0.156	2.145	1.172	0.015	0.091	0.047
S37	0.062	0.195	0.146	2.013	1.112	0.014	0.081	0.044
S38	0.068	0.212	0.159	2.186	1.198	0.015	0.086	0.048
S39	0.071	0.208	0.156	2.162	1.181	0.014	0.063	0.047
S40	0.068	0.202	0.151	2.109	1.140	0.015	0.099	0.046

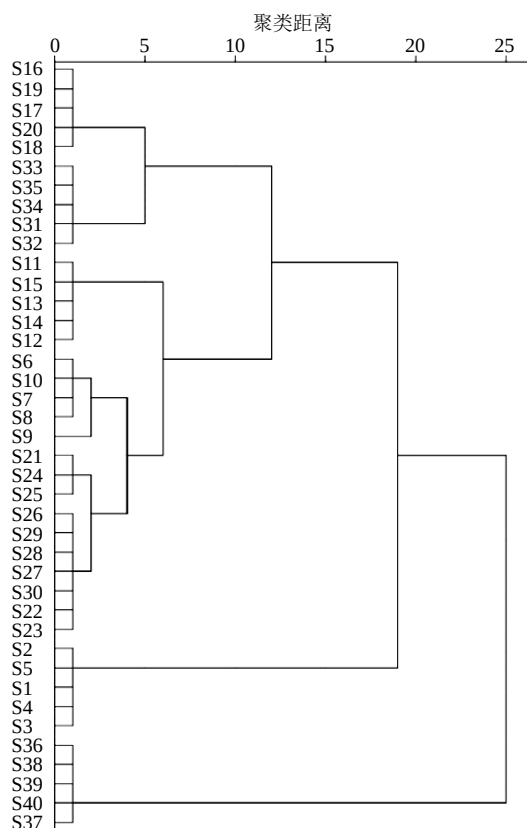


图 3 样品 HCA 树状图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis of samples

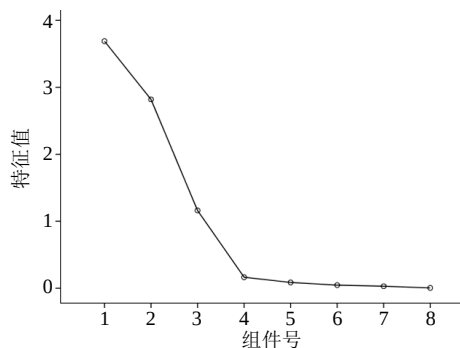


图 4 40 批白芍药材的 Q-Marker PCA 碎石图

Fig. 4 Principal component analysis of Q-Markers of 40 batches of *Paeoniae Radix Alba*

表 5 特征值及方差贡献率

Table 5 Eigenvalue and variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	3.689	46.116	46.116
2	2.820	35.247	81.363
3	1.161	14.513	95.877

表 6 旋转后的成分矩阵

Table 6 Rotated composition matrix

共有峰	主成分		
	1	2	3
苯甲酰芍药苷	0.937	-0.128	-0.202
芍药苷	0.908	0.024	0.333
没食子酰芍药苷	0.896	0.153	0.359
PGG	0.888	0.336	-0.034
氧化芍药苷	0.055	0.968	0.206
儿茶素	0.153	0.956	-0.220
芍药内酯苷	0.039	0.850	-0.515
没食子酸	0.161	-0.153	0.967

芍的特征化学成分。将白芍样品 Q-Marker 的峰面积导入 SIMCA 14.1 软件绘制 40 批不同种质白芍样品的 PCA 得分图 (图 5), 结果显示 3 个主成分能反映不同种质白芍的主要特征。

3.5 OPLS-DA

为更好地观察不同种质样本间的组间差异, 采用 SIMCA 14.1 软件对 40 批样品进行 OPLS-DA 分析, 将样品的 Q-Marker 的数据导入, 建立 OPLS-DA 模型, 模型得分见图 6。模型分析验证参数可知, $R^2_X(\text{cum})=1$, $R^2(\text{cum})=0.881$, $Q^2(\text{cum})=0.819$, $R^2_Y(\text{cum})=1$, 均大于 0.5 且接近于 1, 说明模型稳定且具有良好、可靠的预测准确性。为避免模型过度拟合造成结果假阳性, 设置分类 Y 矩阵变量随机排列 200 次做置换检验^[42], 检验图见图 7。 R^2 回归线在 Y 轴截距为 0.079 9、 Q^2 回归线在 Y 轴截距为 -0.483, 说明模型没有出现过拟合现象, 可用于判别分析 40 批样品的组间差异。OPLS-DA 模型中的 VIP 值显示, 在 95% 置信区间内, 筛选

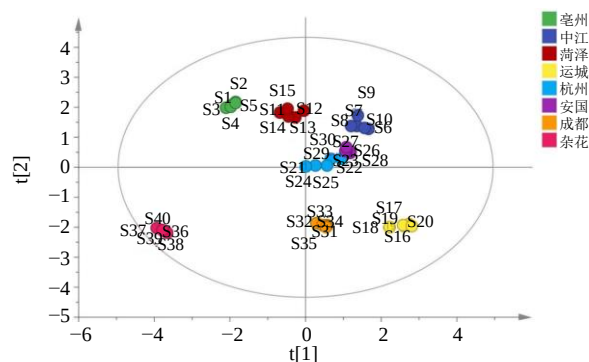


图 5 40 批白芍 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score chart of 40 batches of *Paeoniae Radix Alba*

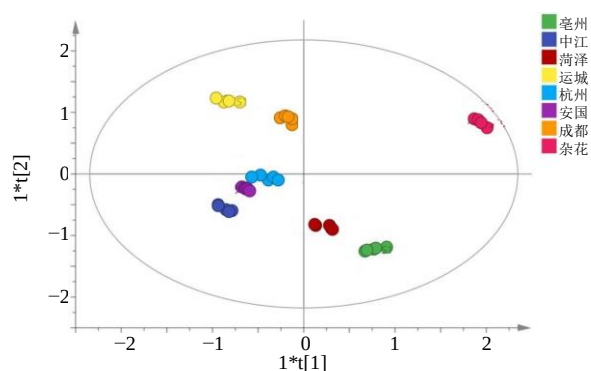


图 6 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA score chart

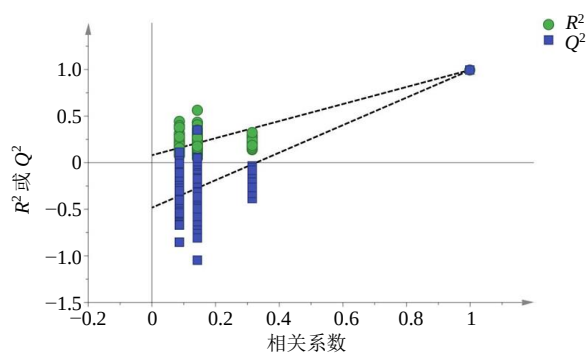


图 7 OPLS-DA 置换检验图

Fig. 7 OPLS-DA replacement inspection diagram

出 $VIP > 1.0$ 的差异标志物为芍药苷、芍药内酯苷和 PGG，见图 8。计算差异标志物峰面积占共有峰峰面积占比，可知 40 批样品的差异标志物中芍药苷平均占比最高，为 48.82%，芍药内酯苷占比其次，为 28.12%，且这些成分 RSD 均大于 23.64%，表明这些成分在各批次间含量差异较大。

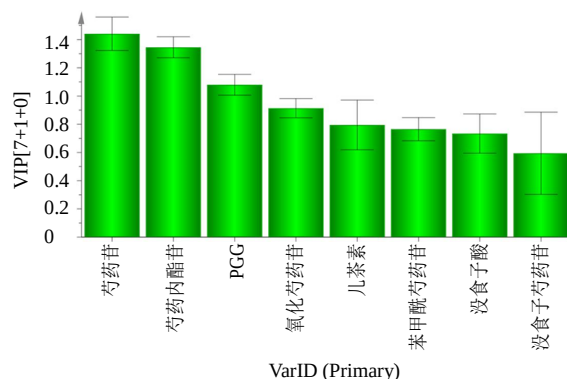


图 8 VIP 得分图

Fig. 8 VIP score chart

3.6 TOPSIS

将白芍 Q-Marker 的峰面积作为原始数据，Zscore 标准化处理后进行 TOPSIS 分析，以分析和比较不同种质白芍的质量差异，结果见表 7。由结果可知，S16~S20 位列前 5 名，综合比较后本研究认为以 Q-Marker 为评价指标，山西运城的白芍的综合品质较优异且稳定，其次是四川中江与河北安国的白芍评价较好，人工培育的杂花芍药的质量最次，指纹图谱 Q-Marker 的数据可作为白芍质量评价的依据，TOPSIS 分析可用于白芍的质量评价^[43]。

表 7 TOPSIS 评价结果

Table 7 Results of TOPSIS evaluation

编号	正理想解距离	负理想解距离	相对接近度	排序结果
S1	6.748	5.162	0.433	33
S2	6.697	5.168	0.436	31
S3	6.837	5.093	0.427	34
S4	6.738	5.186	0.435	32
S5	6.683	5.205	0.438	30
S6	4.285	6.963	0.619	6
S7	4.513	6.680	0.597	13
S8	4.618	6.543	0.586	17
S9	4.988	6.826	0.578	19
S10	4.316	6.883	0.615	8
S11	6.485	4.781	0.424	35
S12	5.941	5.371	0.475	26
S13	5.981	5.074	0.459	27
S14	6.132	4.914	0.445	28
S15	6.424	5.007	0.438	29
S16	2.568	8.233	0.762	3
S17	2.555	8.343	0.766	2
S18	2.793	7.896	0.739	5
S19	2.587	8.214	0.760	4
S20	2.425	8.455	0.777	1
S21	4.637	5.545	0.545	24
S22	4.268	6.187	0.592	14
S23	4.451	5.905	0.570	22
S24	4.837	5.299	0.523	25
S25	4.326	5.878	0.576	20
S26	4.021	6.507	0.618	7
S27	4.082	6.487	0.614	9
S28	4.075	6.406	0.611	10
S29	4.150	6.373	0.606	11
S30	4.186	6.372	0.604	12
S31	4.350	6.285	0.591	15
S32	4.606	5.973	0.565	23
S33	4.539	6.137	0.575	21
S34	4.424	6.272	0.586	16
S35	4.471	6.260	0.583	18
S36	8.241	2.985	0.266	37
S37	8.525	2.688	0.240	40
S38	8.228	3.038	0.270	36
S39	8.298	2.976	0.264	38
S40	8.352	2.862	0.255	39

4 讨论

本实验分别考察了提取溶剂（甲醇、乙醇和稀乙醇）、提取溶剂浓度（30%、40%、45%、50%和70%）、检测波长（230、245、270 nm 等）等条件，确定了以 50%稀乙醇超声提取 30 min 为最佳提取条件。提取的样品在 230 nm 下检测所得图谱的色谱峰较多且分离度较好，整体代表性较强。

本研究所建立的指纹图谱主要针对不同种质白芍的 Q-Marker 8 种成分，相似度评价结果显示 40 批样品的相似度在 0.892~1.000，其中杂花芍药的 5 批样品相似度低于 0.9，且芍药苷的含量低于药典规定的 1.6%，这种人工培育的种质是否能作药用还有待进一步研究。不同种质白芍的 Q-Marker 含量有较大差异，在本实验条件设计下可以排除生长环境和栽培年限因素的影响^[44]，差异的产生主要来源于种质的不同，即原种质遗传物质的差异。在 HCA 中，40 批白芍样品分为了 6 类，四川中江白芍、浙江杭州白芍和河北安国白芍聚为一类，其他种质白芍各自聚为一类，与指纹图谱相似度评价结果一致，表明 8 个种质白芍样品既存在相似性又存在差异性。PCA 结果可知本研究使用的白芍 Q-Marker 的 8 种成分均可作为影响不同种质白芍质量的特征化学成分。OPLS-DA 结果表明，芍药苷、芍药内酯苷和 PGG 在各批次间含量差异较大，可以作为不同种质白芍差异性分析的表征化合物。TOPSIS 排序结果表明以 Q-Marker 为指标，山西运城的白芍较为优质且质量稳定，杂花芍药的质量较差，结果提示山西运城的种质可为白芍种质资源的筛选和优化提供材料。

通过指纹图谱结合化学模式识别以 Q-Marker 为指标评价不同种质的白芍，实验结果表明，选用这 8 种成分作为白芍的 Q-Marker 较为合理科学，通过 HPLC 指纹图谱对白芍 Q-Marker 进行宏观整体表征，能够较为全面的反映白芍的化学信息。采用化学模式识别技术对 Q-Marker 的 8 种成分的峰面积数据进行分析，结果表明筛选出的 Q-Marker 具有较好的代表性，有利于白芍质量评价标准的研究，促进资源的开发利用。

环境因素和基因型是影响道地药材形成的主要外在因素和内部因素，生长环境不同造就了道地药材独特的化学物质基础^[45-46]，遗传变异和自然选择促进药材在特定环境下形成优良种质资源^[47]。优良的种质资源是药材质量稳定的基础^[48]，其优劣对中

药的产量和质量有决定性的作用^[49]，关系到药用植物的确切疗效和疗效的重现性，进而直接影响到中药制剂的质量^[50]。从各主产地引种的道地白芍种质在换了栽培环境后，药效物质的含量仍优于人工育成品种，表明道地白芍种质稳定而优质，人工培育的种质是否能作为中药材使用应谨慎。白芍新品种的选育，应基于现有种质资源的特有基因中发现^[51-52]。对白芍种质资源进行综合分析，可以为白芍种质资源评价提供一定的参考，为白芍优良种质的选育和育种奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 余婧萍, 宋祯彦, 李富周, 等. 芍药苷通过促进细胞自噬抑制 H₂O₂ 诱导的 SH-SY₅Y 细胞的氧化损伤 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(6): 653-659.
- [2] 李娴, 王国芬, 詹雅萍. 白芍总苷对系统性红斑狼疮患者肝损伤的保护效果分析 [J]. 现代实用医学, 2020, 32(6): 637-639.
- [3] 章丽. 基于“品种-ITS2 序列—成分—药效”关联性探究丹皮、赤芍、白芍功效差异的科学内涵 [D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [4] 史丽璞. 白芍总苷加来氟米特治疗类风湿关节炎时肝保护及对炎性因子的影响: 中国, CN 107225636 [P]. 2010-08-08.
- [5] 吕仕超, 王云姣, 张婉勤, 等. 白芍总苷的心血管保护效应及其作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(1): 207-210.
- [6] 王丽. 白芍总苷对缺血性脑损伤大鼠脑保护作用的研究 [J]. 医学研究杂志, 2020, 49(11): 91-95.
- [7] 陈恒石, 蒋磊. 白芍总苷胶囊对 4-VO 诱导的 MCAO 大鼠的神经保护作用及其机制探究 [J]. 医学综述, 2020, 26(13): 2675-2680.
- [8] 杨山景, 封安杰, 孙越, 等. 白芍总苷的药理作用及机制研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(13): 1627-1633.
- [9] 汪娟, 王芳. 白芍总苷治疗自身免疫性疾病的研究进展 [J]. 医学综述, 2021, 27(22): 4481-4485.
- [10] 郑寅涛, 曹岗, 吴鑫. 山茱萸-白芍酒炙配伍前后通过调节 OPG/RANKL/RANK 信号通路抗类风湿性关节炎药效机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3084-3092.
- [11] 王继萱, 艾宗雄, 谢晶日. 土鳖虫、姜黄、鳖甲、白芍治疗肝纤维化经验 [J]. 环球中医药, 2021, 14(2): 306-308.
- [12] Shin M R, Lee S H, Roh S S. The potential hepatoprotective effect of *Paeoniae Radix Alba* in thioacetamide-induced acute liver injury in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7904845.
- [13] 贾岚, 王蕾蕾, 孟靓, 等. 白芍总苷对大鼠化学性肝损伤与肝阴虚证结合模型的影响和机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1885-1892.

- [14] 王文鑫. 中药白芍在帕金森领域的应用及临床研究进展 [J]. 医学食疗与健康, 2021, 19(15): 226-227.
- [15] 吴林, 陈静, 唐秀松, 等. 基于网络药理学探讨白芍治疗帕金森病的作用机制 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(4): 1-5.
- [16] 张景霞, 赵重博, 李凡, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的白芍治疗抑郁症作用机制探讨 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(9): 1582-1589.
- [17] 李添, 李肖, 田俊生, 等. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 肝脏代谢组学的白芍抗抑郁作用研究 [J]. 中医药学报, 2021, 49(8): 17-26.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 严倩茹, 邹伟魁. 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.
- [21] 王金丹. 不同的炮制方法对白芍质量的影响 [J]. 当代农机, 2021(10): 63-64.
- [22] 孟肖, 李靖季, 姚洁, 等. 不同因素对白芍药材产量及品质的影响研究进展 [J]. 现代农业科技, 2020(20): 59-62.
- [23] 游广娇, 刘亚男, 任晓亮, 等. 基于主成分分析-分组分析模型的白芍/硫熏白芍模式识别研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2315-2320.
- [24] 查良平, 王德群, 彭华胜, 等. 中国药用芍药栽培品种 [J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(5): 70-73.
- [25] 姚杰, 王文娟, 郭盛磊, 等. 白芍与赤芍种质问题探讨 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(11): 1933-1937.
- [26] 黄文静, 熊乐文, 张龙霏, 等. 不同种质金银花发育过程中黄酮类成分含量变化规律研究 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3156-3164.
- [27] 张铁军, 王杰, 陈常青, 等. 基于中药属性和作用特点的中药质量标志物研究与质量评价路径 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1051-1060.
- [28] 阳长明, 杨平, 刘乐环, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究进展及对中药质量研究的思考 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2519-2526.
- [29] 叶霖, 李睿旻, 曾华武, 等. 基于整体观中药质量标志物的发现及研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4529-4537.
- [30] 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.
- [31] 王倩, 李柳潼, 马永桦, 等. 白芍与赤芍化学成分和药理作用比较研究及质量标志物的预测分析 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(12): 1093-1098.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [35] 严辉, 谢舒平, 濮宗进, 等. 基于 UPLC-PDA 指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价大黄质量 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4755-4762.
- [36] 杨玉莹, 张丹丹, 罗心遥, 等. 指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地青钱柳质量 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 1082-1088.
- [37] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [38] 杨利民, 张永刚, 林红梅, 等. 中药材质量形成理论与控制技术研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2): 119-124.
- [39] 史素影. 栽培芍药加工成赤芍药材的合理性研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 谢苏梦, 季巧遇, 吕尚, 等. 不同产地野菊花 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7616-7623.
- [43] 李学学, 曹亚楠, 苏宏娜, 等. 西南委陵菜质量标志物初步研究及指纹图谱结合多元统计综合评价其质量 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3696-3704.
- [44] 周学刚, 陈淑欣, 魏东华, 等. 不同种质和不同部位白芍原植物中芍药苷和芍药内酯苷的含量测定 [J]. 医药导报, 2011, 30(11): 1477-1480.
- [45] 马晓晶, 郭娟, 唐金富, 等. 论中药资源可持续发展的现状与未来 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 1887-1892.
- [46] 车欣, 于雪冬, 郑翔宇, 等. 我国道地药材适生区研究应用现状 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 121-124.
- [47] 袁媛, 黄璐琦. 道地药材分子生药学研究进展和发展趋势 [J]. 科学通报, 2020, 65(12): 1093-1102.
- [48] 杨成民, 魏建和, 隋春, 等. 我国中药材新品种选育进展与建议 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(9): 727-737.
- [49] 侯嘉. 不同产地川芍种质资源的品质研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2007.
- [50] 孟祥才, 曹伍林, 宋琦, 等. 谈种质在中药资源开发中的意义 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(1): 29-32.
- [51] 李隆云, 钟国跃, 卫莹芳, 等. 中国中药种质资源的保存与评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(9): 641-645.
- [52] 王继永, 郑司浩, 曾燕, 等. 中药材种质资源收集 保存与评价利用现状 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(3): 311-321.

[责任编辑 时圣明]