

## 基于多成分含量测定和化学计量学的不同基原白芷药材质量评价研究

石 欢<sup>1,2</sup>, 封 燮<sup>1,2</sup>, 常雅晴<sup>1,2</sup>, 张 丹<sup>1,2</sup>, 王 蕾<sup>1,2</sup>, 郑玉光<sup>1,3</sup>, 郑 倩<sup>4\*</sup>, 郭 龙<sup>1,2\*</sup>

1. 河北中医学院 河北省中药炮制技术创新中心, 河北 石家庄 050200

2. 河北省中药资源利用与质量评价国际联合研究中心, 河北 石家庄 050200

3. 河北化工医药职业技术学院, 河北 石家庄 050026

4. 石家庄市中医院, 河北 石家庄 050051

**摘要:** **目的** 采用指纹图谱、多成分含量测定结合化学计量学方法分析和比较不同基原白芷药材(白芷 *Angelica dahurica* 和杭白芷 *Angelica dahurica* var. *formosana*)的化学成分,为白芷药材的质量控制提供技术方法及数据支撑。**方法** 采用高效液相色谱法对白芷和杭白芷药材化学成分进行分析,建立不同基原白芷药材化学指纹图谱;在此基础上,对白芷和杭白芷药材中的花椒毒酚、水合氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素9种香豆素类成分进行含量测定;进一步应用聚类分析、主成分分析及偏最小二乘判别分析等化学计量学方法对白芷与杭白芷进行区分与比较,寻找差异化合物。**结果** 建立了不同基原白芷药材的化学指纹图谱,共标定了11个共有峰,所建立的化学指纹图谱专属性良好,可用于白芷药材的质量评价;多成分含量测定和化学计量学结果表明,白芷和杭白芷药材中所含香豆素类成分种类无差异,但香豆素类成分含量有明显差异;佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素、氧化前胡素和花椒毒素为白芷和杭白芷药材间的差异性化合物,可以作为区分和鉴别二者的质量标志物。**结论** 基于指纹图谱、多成分含量测定和化学计量学方法,明确了白芷和杭白芷药材化学成分差异,为不同基原白芷药材的质量控制和基原鉴定提供了分析方法和科学依据。

**关键词:** 白芷; 杭白芷; 指纹图谱; 佛手柑内酯; 珊瑚菜素; 异欧前胡素; 氧化前胡素; 花椒毒素; 化学计量学

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)11-3676-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.029

## Quality evaluation of *Angelicae Dahuricae Radix* based on quantitative analysis of multi-component determination and chemometrics

SHI Huan<sup>1,2</sup>, FENG Xie<sup>1,2</sup>, CHANG Ya-qing<sup>1,2</sup>, ZHANG Dan<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>1,2</sup>, ZHENG Yu-guang<sup>1,3</sup>, ZHENG Qian<sup>4</sup>, GUO Long<sup>1,2</sup>

1. Hebei Traditional Chinese Medicine Processing Technology Innovation Center, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

2. Hebei International Joint Research Center on Resource Utilization and Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

3. Hebei Chemical and Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China

4. Chinese Traditional Medicine Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050051, China

**Abstract: Objective** To compare the chemical composition and find the chemical makers for quality evaluation of *Angelica dahurica* and *Angelica dahurica* var. *formosana* by fingerprint, multi-component determination and chemometrics, so as to provide technical methods and data support for the quality control of Baizhi (*Angelicae Dahuricae Radix*). **Methods** In this present study, an accurate and reliable fingerprint of *Angelicae Dahuricae Radix* was established based on HPLC. Furthermore, nine bioactive coumarins, including xanthotoxin, oxypeucedanin hydrate, byakangelicin, xanthotoxin, bergapten, oxypeucedanin, imperatorin, phellopterin and isoimperatorin in *A. dahurica*

收稿日期: 2022-11-05

**基金项目:** 河北省自然科学基金资助项目(H2021423004); 河北省中医药管理局科研计划项目(Z2022019, 2022100); 河北省第二期现代农业产业技术体系创新团队项目(HBCT2018060205); 第四次全国中药资源普查(Z135080000022); 河北省省级科技计划(223777127D); 中央引导地方科技发展资金项目(226Z7714G)

**作者简介:** 石 欢, 硕士研究生, 主要从事中药质量评价与控制研究。E-mail: shihuan\_sh123@163.com

**\*通信作者:** 郭 龙, 硕士生导师, 副教授, 主要从事中药药效物质基础及质量评价研究。E-mail: guo\_long11@163.com

郑 倩, 硕士生导师, 主任中医师, 主要从事中药质量评价与控制研究。E-mail: 394012759@qq.com

and *A. dahurica* var. *formosana* samples were simultaneously determined. Moreover, chemometrics method, such as hierarchical clustering analysis, principal component analysis and partial least squares discriminant analysis were performed to compare and discriminate *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* samples, and explore the chemical marks for quality evaluation of *Angelicae Dahuricae Radix*.

**Results** The specific fingerprints of *Angelicae Dahuricae Radix* were obtained, and a total of 11 common peaks were marked. The established fingerprint method could be used for quality control of *Angelicae Dahuricae Radix*. The quantitative and chemometrics analysis results indicated the contents of bioactive coumarins were notably different between *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* samples, and five coumarins including bergapten, phellopterin, isoimperatorin, oxypeucedanin and xanthotoxin were selected as quality markers for responsible for the significant differences between *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana*, which could be used for the quality evaluation of *Angelicae Dahuricae Radix*. **Conclusion** The differences of chemical components of *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* were determined based on fingerprint, multi-component determination and chemometrics, which might provide detailed information and acceptable analysis methods for the identification of botanical origins and quality evaluation of *Angelicae Dahuricae Radix*.

**Key words:** *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.; *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan; fingerprint; isoimperatorin; oxypeucedanin; xanthotoxin; chemometrics

白芷是临床治疗感冒头痛、眉棱骨痛、鼻塞流涕、鼻渊、鼻渊、牙痛、带下、疮疡肿痛的常用中药材。辛，温；归胃、大肠、肺经；具有解表散寒、祛风止痛、宣通鼻窍、燥湿止带、消肿排脓的功效。白芷为多基原药材，《中国药典》2020 年版收载白芷的两个基原为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 或杭白芷 *A. dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根<sup>[1]</sup>。市场中白芷药材根据基原不同一般分为白芷和杭白芷药材。目前，对于白芷药材化学成分分析相关报道主要集中在指纹图谱和含量测定方面。已有研究采用指纹图谱和多成分含量测定方法对不同产地和不同采收期白芷药材的化学成分及质量进行比较<sup>[2-3]</sup>。截止目前对于白芷药材的两种基原白芷和杭白芷的化学成分及质量差异的研究未见报道，因此需要建立合理可行的分析方法对不同基原的白芷药材进行分析与比较，为不同基原白芷药材的质量控制提供方法和数据支撑。

白芷化学成分复杂，主要含有香豆素、多糖、挥发油、生物碱、微量元素等成分<sup>[4-5]</sup>。研究表明香豆素类成分为白芷药材的主要活性成分。现代药理研究表明，白芷药材中含有的香豆素类成分，如欧前胡素、异欧前胡素等，具有抗氧化、抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗过敏、抑菌等多种药理作用<sup>[6-9]</sup>。因此，对白芷和杭白芷药材中活性香豆素类成分比较分析，将有助于全面地反映不同基原白芷药材的差异，为白芷药材的质量评价提供科学依据。

因此，本研究拟运用高效液相色谱法，对不同基原白芷药材化学成分进行分析，建立化学指纹图谱；在此基础上，建立白芷药材中花椒毒酚、水合

氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素 9 种香豆素类成分的含量测定方法，对不同批次白芷和杭白芷药材进行多成分含量测定；基于多成分含量测定结果，结合聚类分析、主成分分析及偏最小二乘判别分析等化学计量学方法对白芷和杭白芷药材化学进行比较分析，寻找质量标志物。通过以上研究，以期分析和比较白芷和杭白芷药材的化学成分差异，为不同基原白芷的质量控制和评价提供分析方法和数据支撑。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Shimadzu LC-2030 型高效液相色谱仪，Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> 色谱柱(50 mm×4.6 mm, 1.8 μm)，Sartorius 型电子分析天平(德国赛多利斯)；JP-060S 型超声波清洗机(深圳洁盟清洗设备有限公司)；HH35000310 型多功能酶标仪(德国珀金埃尔默)，DHP-9082 型电热恒温培养箱(中仪国科科技有限公司)。

### 1.2 材料

不同基原的白芷药材，白芷(B1~B10)和杭白芷(H1~H10)药材收集于河北安国、安徽亳州、四川等，药材具体信息见表 1。白芷和杭白芷药材经郑玉光教授鉴定为伞形科植物白芷 *A. dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 和杭白芷 *A. dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根。药材标本保存于河北中医学院河北省中药炮制技术创新中心。

对照品氧化前胡素(批号 PS 210331-02)、白当归素(批号 PS 011381)、欧前胡素(批号 PS 010561)、

表 1 白芷和杭白芷药材样品信息

Table 1 Sources of *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana*

| 样品编号 | 产地信息 | 采收时间    | 基原 | 样品编号 | 产地信息 | 采收时间    | 基原  |
|------|------|---------|----|------|------|---------|-----|
| B1   | 安徽亳州 | 2020-09 | 白芷 | H1   | 四川   | 2020-09 | 杭白芷 |
| B2   | 安徽亳州 | 2020-09 | 白芷 | H2   | 四川   | 2020-08 | 杭白芷 |
| B3   | 安徽亳州 | 2020-09 | 白芷 | H3   | 四川   | 2020-09 | 杭白芷 |
| B4   | 河南   | 2020-09 | 白芷 | H4   | 四川   | 2020-09 | 杭白芷 |
| B5   | 湖北   | 2020-09 | 白芷 | H5   | 四川   | 2020-08 | 杭白芷 |
| B6   | 河北安国 | 2020-09 | 白芷 | H6   | 四川   | 2020-09 | 杭白芷 |
| B7   | 河北安国 | 2020-09 | 白芷 | H7   | 四川   | 2020-08 | 杭白芷 |
| B8   | 河北安国 | 2020-09 | 白芷 | H9   | 四川   | 2020-09 | 杭白芷 |
| B9   | 河北安国 | 2020-08 | 白芷 | H8   | 四川   | 2020-08 | 杭白芷 |
| B10  | 河北安国 | 2020-08 | 白芷 | H10  | 四川   | 2020-09 | 杭白芷 |

水和氧化前胡内酯(批号 PS 011398)、异欧前胡素(批号 PS 010956)、佛手柑内酯(批号 PS 010563)、花椒毒酚(批号 PS 011082)、珊瑚菜素(批号 PS 000818)、白当归脑(批号 PS 000107)、花椒毒素(批号 PS 010573) 购于成都普思生物科技股份有限公司,质量分数均大于 98%。乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> 色谱柱(50 mm×4.6 mm, 1.8 μm)。流动相为 0.1%甲酸-水(A)和乙腈(B);梯度洗脱,洗脱程序为:0~5 min, 10%~20% B; 5~15 min, 20%~35% B; 15~30 min, 35%~60% B; 30~35 min, 60%~70% B; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 25 ℃; 进样量 5 μL; 检测波长 310 nm。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品花椒毒酚、水合氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素适量,置 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,配制成含花椒毒酚 0.85 mg/mL、水和氧化前胡内酯 1.15 mg/mL、白当归素 1.20 mg/mL、花椒毒素 1.20 mg/mL、佛手柑内酯 0.60 mg/mL、氧化前胡素 4.00 mg/mL、欧前胡素 2.20 mg/mL、珊瑚菜素 2.55 mg/mL 和异欧前胡素 2.60 mg/mL 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

精密称取白芷和杭白芷药材粉末(过 65 目筛) 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 80%甲醇 15 mL,称定质量,80 kHz 超声提取 50 min,室温下冷却,补足减失质量,在 13 000 r/min 下离心 10 min,取上清液,过 0.22 μm 滤膜,即得。

### 2.4 白芷和杭白芷化学指纹图谱研究

为了全面分析白芷和杭白芷药材中化学成分,为其质量控制提供依据,首先采用高效液相色谱法对 10 批白芷和 10 批杭白芷药材化学成分进行分析,建立其化学指纹图谱。

**2.4.1 精密度试验** 取白芷药材 B1 样品,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,连续进样 6 次,记录色谱图,以欧前胡素色谱峰为参照,计算指纹图谱中 11 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积,考察所建立指纹图谱方法的精密度。结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.1%,各共有峰峰面积的 RSD 值均小于 1.3%,本实验精密度良好。

**2.4.2 稳定性试验** 取白芷药材 B1 供试品溶液,分别放置 0、2、4、8、12、24 h 后按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以欧前胡素色谱峰为参照峰,计算指纹图谱中 11 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.2%,各共有峰相对峰面积的 RSD 值均小于 1.7%。

**2.4.3 重复性试验** 精密称取白芷材料 B1 样品粉末 6 份,每份 0.5 g,按“2.1”项下方法平行制备供试品溶液,进样分析,以欧前胡素色谱峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.2%,各共有峰相对峰面积的 RSD 值均小于 2.0%,本实验重复性良好。

**2.4.4 不同基原白芷药材化学指纹图谱的建立及相似度评价** 将 10 批白芷和 10 批杭白芷药材,共 20 批样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,进行色谱分析,将所得色谱数据导入“中药色谱指纹图

谱相似度评价系统(2012 版)”,以 B1 样品色谱图作为参照图谱,采用中位数法,时间窗设为 0.1 min,经多点校正后,进行色谱峰的匹配,生成对照指纹图谱。9 号峰(欧前胡素)稳定性好,且峰面积较大,因此以保留时间为 28.76 min 的 9 号作为参照峰,最终确定了 11 个共有峰。通过对照品比对,共指出 9 个共有峰,分别为花椒毒酚、水合氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素。不同批次白芷和杭白芷药材色谱图见图 1,对照指纹图谱见图 2。

将 10 批白芷和 10 批杭白芷药材图谱与对照图谱进行相似度评价。由相似度评价结果可知各批白芷和杭白芷药材的相似度良好,相似度结果均大于 0.930(表 2),所建立的指纹图谱方法可用于不同基原白芷药材的整体质量控制。

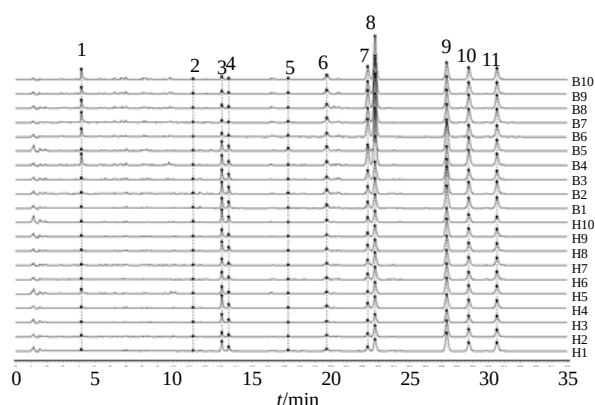
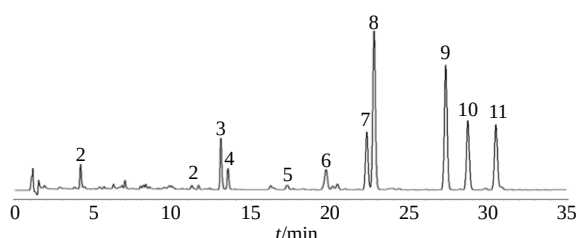


图 1 10 批白芷和 10 批杭白芷药材化学指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 10 batches of *A. dahurica* and 10 batches of *A. dahurica* var. *formosana*



2-花椒毒酚 3-水合氧化前胡内酯 4-白当归素 5-花椒毒素  
6-佛手柑内酯 8-氧化前胡素 9-欧前胡素 10-珊瑚菜素  
11-异欧前胡素,图 3 同  
2-xanthotoxol 3-oxypeucedanin hydrate 4-byakangelicin  
5-xanthotoxin 6-bergapten 8-oxypeucedanin 9-phellopterin  
10-imperatorin 11-imperatorin, same as Fig.3

图 2 对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint

表 2 药材指纹图谱相似度评价

Table 2 Similarity of 10 batches of *A. dahurica* and 10 batches of *A. dahurica* var. *formosana*

| 样品编号 | 相似度   | 样品编号 | 相似度   |
|------|-------|------|-------|
| B1   | 0.952 | H1   | 0.956 |
| B2   | 0.951 | H2   | 0.963 |
| B3   | 0.983 | H3   | 0.940 |
| B4   | 0.939 | H4   | 0.956 |
| B5   | 0.930 | H5   | 0.959 |
| B6   | 0.952 | H6   | 0.979 |
| B7   | 0.952 | H7   | 0.984 |
| B8   | 0.950 | H8   | 0.970 |
| B9   | 0.970 | H9   | 0.949 |
| B10  | 0.955 | H10  | 0.955 |

## 2.5 不同基原白芷药材多成分含量测定

采用 HPLC 法建立了不同基原白芷药材的化学指纹图谱,确定了 11 个共有峰并指出其中 9 个共有峰。由白芷和杭白芷药材指纹图谱(图 1)可知,白芷和杭白芷药材色谱图较为相似,所含化学成分种类基本一致,均含有所指认的 9 个香豆素类成分;但是,白芷和杭白芷药材各共有峰的高度上有一定差异,提示白芷和杭白芷药材所含活性香豆素类成分的含量有差异。为了进一步明确白芷和杭白芷药材中香豆素类成分的具体含量,采用 HPLC 法建立了白芷和杭白芷药材多成分含量测定方法,对所指认的 9 个香豆素类成分,包括花椒毒酚(2 号峰)、水合氧化前胡内酯(3 号峰)、白当归素(4 号峰)、花椒毒素(5 号峰)、佛手柑内酯(6 号峰)、氧化前胡素(8 号峰)、欧前胡素(9 号峰)、珊瑚菜素(10 号峰)和异欧前胡素(11 号峰)进行含量测定。

**2.5.1 线性关系、定量限和检测限** 将混合对照品溶液用甲醇稀释成一系列的梯度浓度溶液后,按“2.1”项下色谱条件进样分析,以待测化合物峰面积对浓度进行线性回归,得到各成分标准曲线。另以适宜浓度的对照品溶液逐级稀释后进样分析,分别测定各待测成分信噪比(信噪比为 10 和 3 时的浓度为定量限和检测限)。实验结果见表 3,结果表明在线性范围内所测定的 9 种香豆素类成分的线性良好( $R^2 > 0.9990$ )。

**2.5.2 精密度试验** 取混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录各个成分的峰面积,用标准曲线法计算各香豆素类成分的含量,并计算含量测定结果的 RSD,结果表明花椒毒酚、水

表 3 9 种香豆素类成分回归方程、相关系数 ( $R^2$ )、线性范围、定量限及检测限Table 3 Regression equations, correlation coefficients ( $R^2$ ), linear ranges, limit of quantification and limit of detection of the nine quantified coumarins compounds

| 成分       | 回归方程                              | $R^2$   | 线性范围/(mg·L <sup>-1</sup> ) | 定量限/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 检测限/(μg·mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|-----------------------------------|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 花椒毒酚     | $Y=9.95 \times 10^6 X+7\ 731.06$  | 0.999 0 | 0.66~85.00                 | 0.18                       | 0.06                       |
| 水合氧化前胡内酯 | $Y=2.82 \times 10^6 X-7\ 045.11$  | 0.999 8 | 0.90~115.00                | 0.09                       | 0.04                       |
| 白当归素     | $Y=2.45 \times 10^7 X+3\ 132.25$  | 0.999 9 | 0.94~120.00                | 0.23                       | 0.09                       |
| 花椒毒素     | $Y=2.67 \times 10^6 X+27\ 132.45$ | 0.999 1 | 0.94~120.00                | 0.20                       | 0.06                       |
| 佛手柑内酯    | $Y=3.39 \times 10^7 X+16\ 064.48$ | 0.999 2 | 0.47~60.00                 | 0.21                       | 0.06                       |
| 氧化前胡素    | $Y=2.28 \times 10^7 X+71\ 903.53$ | 0.999 2 | 3.13~400.00                | 0.17                       | 0.06                       |
| 欧前胡素     | $Y=1.06 \times 10^7 X+38\ 394.67$ | 0.999 2 | 1.72~220.00                | 0.28                       | 0.09                       |
| 珊瑚菜素     | $Y=2.34 \times 10^7 X+47\ 383.07$ | 0.999 2 | 1.99~255.00                | 0.35                       | 0.16                       |
| 异欧前胡素    | $Y=2.83 \times 10^7 X+56\ 286.43$ | 0.999 3 | 2.03~260.00                | 0.15                       | 0.06                       |

合氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素的 RSD 值分别为 1.13%、1.00%、1.03%、0.99%、1.02%、1.00%、1.19%、0.99%、0.99%。

**2.5.3 稳定性试验** 取白芷药材 B1 供试品溶液，分别放置 0、2、4、8、12、24 h 后按“2.1”项下色谱条件进样分析，用标准曲线法计算各香豆素类成分的含量，并计算含量测定结果的 RSD，考察方法稳定性。结果表明花椒毒酚、水合氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素的 RSD 值分别为 1.25%、0.37%、0.47%、0.48%、0.24%、0.48%、0.40%、0.38%、1.84%，表明供试品溶液在 24 h 之内具有良好的稳定性。

**2.5.4 重复性试验** 精密称取白芷 B1 样品粉末 6 份，每份 0.5 g，按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液，进样分析，标准曲线法计算各香豆素类成分的含量，并计算含量测定结果的 RSD，考察重复性。结果显示花椒毒酚、水合氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素的 RSD 值分别为 0.45%、0.37%、0.41%、0.30%、0.19%、0.25%、0.17%、0.16%、2.11%，表明所建方法具有良好的重复性。

**2.5.5 加样回收率试验** 精密称取白芷 B1 样品粉末 6 份，每份 0.25 g，分别加入 9 种香豆素类成分对照品适量，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样分析，记录各化学成分的峰面积，计算各成分的含量。加样回收率考察结果显示花椒毒酚、水合氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、

氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素的平均加样回收率分别为 101.69%、98.25%、99.56%、102.11%、104.47%、101.79%、100.47%、101.97%、102.79%，RSD 值分别为 1.43%、1.38%、0.81%、0.81%、1.47%、1.54%、2.73%、1.43%、1.34%，表明所建立的含量测定方法准确性良好。

**2.5.6 样品含量测定** 按照“2.3”项下方法制备 10 批白芷 (B1~B10) 和 10 批杭白芷 (H1~H10) 样品供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进行分析，分别测定花椒毒酚、水合氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素的含量。白芷、杭白芷药材和混合对照品的 HPLC 如图 3 所示，白芷和杭白芷药材多成分含量测定结果见表 4 和图 4。

由测定结果可知，白芷和杭白芷药材样品中均含有所测定的 9 种香豆素类成分。所测定的 9 种香豆素

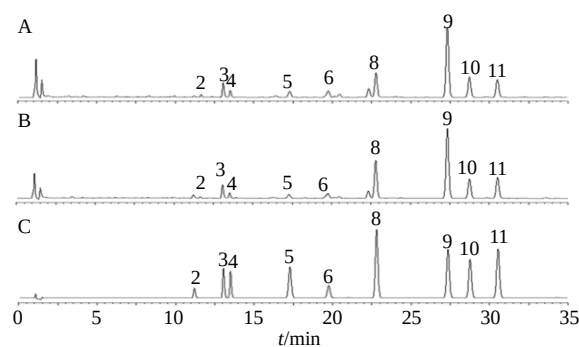


图 3 白芷 (A)、杭白芷 (B) 和混合对照品 (C) 色谱图  
Fig. 3 HPLC chromatograms of *A. dahurica* (A) and *A. dahurica* var. *formosana* (B) and mixed standards solution (C)

表 4 白芷和杭白芷药材中 9 种香豆素类成分含量测定结果 (n=3)

Table 4 Contents of nine coumarins compounds in *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* samples (n = 3)

| 批次  | 质量分数/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |          |        |        |        |          |          |          |          | 总含量       |
|-----|------------------------------------------|----------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|-----------|
|     | 花椒毒酚                                     | 水合氧化前胡内酯 | 白当归素   | 花椒毒素   | 佛手柑内酯  | 氧化前胡素    | 欧前胡素     | 珊瑚菜素     | 异欧前胡素    |           |
| B1  | 469.65                                   | 645.51   | 611.66 | 102.45 | 294.21 | 1 642.37 | 5 691.50 | 1 239.08 | 921.78   | 11 618.22 |
| B2  | 496.01                                   | 738.29   | 648.06 | 126.15 | 346.03 | 1 961.28 | 6 883.41 | 1 443.99 | 1 101.52 | 13 744.75 |
| B3  | 442.12                                   | 605.20   | 519.61 | 73.95  | 218.66 | 2 061.89 | 5 162.80 | 1 169.35 | 762.40   | 11 015.96 |
| B4  | 442.40                                   | 631.63   | 441.52 | 80.77  | 305.15 | 6 947.19 | 4 784.03 | 1 877.81 | 1 001.00 | 16 511.51 |
| B5  | 312.95                                   | 549.30   | 418.43 | 205.48 | 312.36 | 1 717.43 | 7 312.96 | 1 667.82 | 924.41   | 13 421.14 |
| B6  | 371.13                                   | 282.65   | 212.57 | 143.16 | 305.48 | 5 361.88 | 4 365.30 | 1 470.96 | 1 011.73 | 13 524.85 |
| B7  | 379.48                                   | 194.13   | 134.92 | 91.39  | 340.62 | 5 875.63 | 4 720.28 | 1 726.26 | 1 189.05 | 14 651.77 |
| B8  | 340.14                                   | 242.67   | 211.06 | 77.62  | 298.77 | 6 012.90 | 4 696.76 | 1 700.18 | 1 183.33 | 14 763.42 |
| B9  | 386.18                                   | 245.33   | 189.05 | 132.38 | 299.90 | 4 598.73 | 4 415.78 | 1 420.20 | 1 038.83 | 12 726.37 |
| B10 | 389.72                                   | 240.84   | 163.40 | 101.93 | 315.93 | 5 262.69 | 4 330.59 | 1 513.83 | 1 037.75 | 13 356.67 |
| H1  | 223.38                                   | 535.54   | 348.47 | 31.13  | 154.46 | 1 347.75 | 4 494.09 | 1 022.54 | 731.37   | 8 888.73  |
| H2  | 362.62                                   | 314.61   | 266.54 | 54.97  | 119.98 | 1 253.84 | 3 996.48 | 927.49   | 579.39   | 7 875.92  |
| H3  | 57.24                                    | 461.66   | 204.08 | 15.45  | 80.26  | 863.16   | 3 036.99 | 749.40   | 551.58   | 6 019.81  |
| H4  | 75.77                                    | 707.78   | 326.95 | 32.74  | 169.55 | 1 302.53 | 3 390.77 | 1 020.66 | 694.61   | 7 721.34  |
| H5  | 258.99                                   | 437.60   | 177.91 | 49.84  | 123.86 | 1 329.32 | 4 077.61 | 1 008.15 | 692.24   | 8 155.52  |
| H6  | 120.41                                   | 413.56   | 210.64 | 29.52  | 139.50 | 1 454.09 | 3 982.60 | 920.02   | 675.45   | 7 945.79  |
| H7  | 342.34                                   | 430.44   | 246.31 | 43.96  | 152.77 | 1 486.23 | 3 761.74 | 950.85   | 664.74   | 8 079.39  |
| H8  | 236.42                                   | 519.68   | 308.99 | 29.60  | 157.27 | 1 284.89 | 3 759.81 | 956.43   | 622.26   | 7 875.36  |
| H9  | 266.92                                   | 424.90   | 199.24 | 41.50  | 136.77 | 1 228.76 | 4 544.95 | 1 019.15 | 640.28   | 8 502.47  |
| H10 | 282.50                                   | 705.62   | 468.20 | 26.00  | 175.55 | 1 288.09 | 3 602.52 | 951.33   | 478.52   | 7 978.32  |

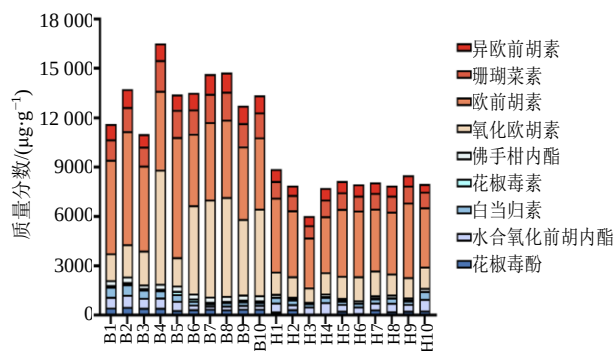


图 4 白芷和杭白芷药材中 9 种香豆素类成分的含量

Fig. 4 Contents of nine coumarins compounds in *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* samples

类成分中, 欧前胡素的质量分数在白芷和杭白芷药材中均最高, 分别为 4 330.59~7 312.96  $\mu\text{g}/\text{g}$  和 3 036.99~4 544.95  $\mu\text{g}/\text{g}$ ; 而白芷和杭白芷药材中花椒毒酚的量最低, 分别为 73.95~205.48  $\mu\text{g}/\text{g}$  和 15.45~54.97  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。进一步计算了白芷和杭白芷药材中 9 种香豆素的总量, 结果表明二者之间存在明显差异, 白芷药材 (11 015.96~14 763.42  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) 的香豆素类成分的

总量显著高于杭白芷药材 (6 019.81~8 888.73  $\mu\text{g}/\text{g}$ )。

## 2.6 基于化学计量学的不同基原白芷药材分析与比较

为了进一步对白芷和杭白芷两个不同基原白芷药材进行比较, 明确二者之间的差异, 寻找质量标志物, 在多成分定量分析的基础上, 运用层聚类分析、主成分分析和偏最小二乘判别分析等化学计量学方法, 以所测定的 9 种香豆素类成分的含量作为变量, 对白芷和杭白芷药材进行分析与比较。

**2.6.1 聚类分析** 聚类分析是一种常见的无监督的化学计量学方法, 是按“物以类聚”原则研究事物分类的一种多元统计分析方法, 可将相似程度较大的样品聚合为一类, 该方法被广泛用于中药的区分与鉴别中<sup>[10]</sup>。为比较白芷和杭白芷 2 个不同基原白芷药材之间的差异, 以白芷及杭白芷药材的 9 个香豆素类成分含量测定结果为变量, 将数据导入 SPSS 19.0 软件, 采用组间连接, 分类依据为平方欧氏距离, 对白芷和杭白芷样品进行聚类分析, 结



果见图 5。由聚类分析结果可得, 20 批样品主要聚为 2 大类, 白芷药材 (B1~B10) 为一类, 杭白芷药材 (H1~H10) 为另一类, 提示白芷和杭白芷药材化学成分之间有差异, 白芷药材化学成分含量与其基原因素有关。

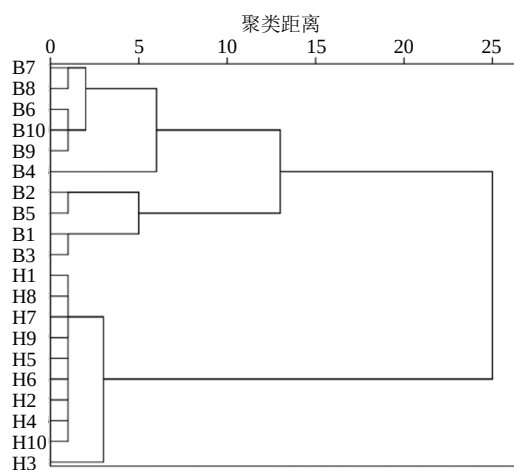


图 5 白芷和杭白芷药材聚类分析树状图

Fig. 5 Dendrogram of cluster analysis of *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* samples

**2.6.2 主成分分析** 主成分分析是一种非监督的多元统计分析方法, 可将多变量数据集可视化, 在不丢失太多信息的基础上, 通过线性变换, 将原始众多相关性的指标重新组合成新的相互独立的综合指标 (主成分) 来代替原始指标充分反映原始数据的信息, 可用于对药材的区分与鉴别<sup>[11]</sup>。为了进一步比较白芷和杭白芷药材之间的差异, 采用 SIMCA 14.1 软件, 以测得的 9 个香豆素类成分含量测得结果为变量, 建立主成分分析模型, 绘制主成分分析得分图。由主成分分析结果可知, 前 2 个主成分累积贡献率为 84.24%, 其中第 1 主成分贡献率为 57.69%, 第 2 主成分贡献率为 26.55%。从所得的方差贡献率来看, 建立的模型累计解释能力参数  $R^2_X$  和预测能力参数  $Q^2$  分别为 0.913 和 0.651, 说明所建立的主成分分析模型的区分度和预测程度都较好, 前 2 个主成分已基本能反映出不同基原白芷样品的主要特征。以前 2 个主成分建立坐标系, 得到 20 批白芷和杭白芷样品的主成分分析得分图 (图 6), 由主成分分析结果可知, 白芷 (B1~B10) 和杭白芷 (H1~H10) 样品明显分别集中于 2 个区域, 结果与聚类分析分类结果一致, 提示不同基原白芷药材在化学成分含量上存在明显的差异性。

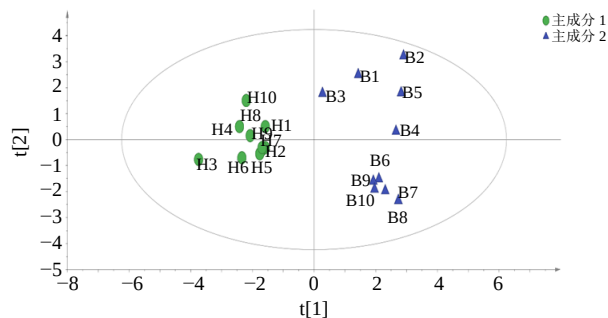


图 6 白芷和杭白芷药材主成分分析得分图

Fig. 6 Principal component analysis scores plot of *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* samples

**2.6.3 偏最小二乘判别分析** 为了进一步区分与比较白芷和杭白芷药材, 寻找二者之间的差异标志物, 在进行了无监督的主成分分析基础上, 进一步采用有监督的偏最小二乘判别分析, 最大化地凸显模型内部不同组别之间的差异<sup>[12]</sup>。采用 SIMAC 14.1 软件, 以 9 个香豆素类成分的含量测定结果, 建立偏最小二乘判别分析模型, 偏最小二乘判别分析得分图见图 7。建立的模型的累计解释能力参数  $R^2_X$  和  $R^2_Y$  分别为 0.887、0.921, 预测能力参数  $Q^2$  为 0.859, 说明模型稳定且具有良好的预测准确性。20 批白芷和杭白芷样品可分为 2 类, B1~B10 为白芷样品分布趋势较为集中, 聚为一组, H1~H10 为杭白芷样品分布趋势较为集中, 聚为一组。不同基原的白芷药材, 分布在中线 2 侧, 偏最小二乘判别分析与聚类分析及主成分分析结果一致。

进一步根据模型中各化学成分在 S-plot 图中的分布和变量权重重要性排序 (variable importance in projection, VIP) 预测值来筛选差异性化合物, 9 种香豆素类成分的 S-plot 图及 VIP 值如图 8 所示。

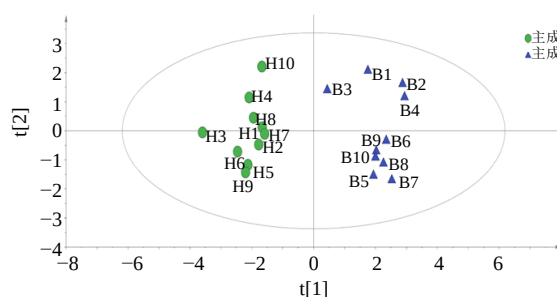


图 7 白芷和杭白芷药材偏最小二乘判别分析得分图

Fig. 7 Partial least squares discriminant analysis scores plot of *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* samples

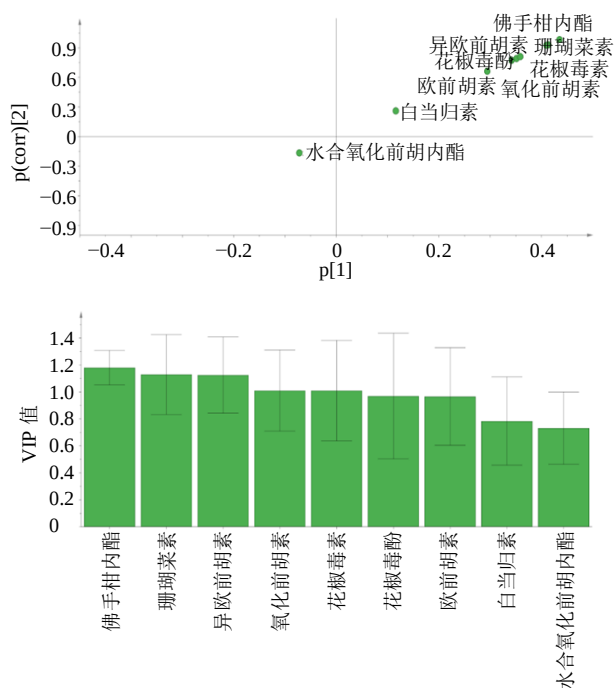


图 8 基于偏最小二乘判别分析白芷和杭白芷药材的 S-plot 图和 VIP 图

Fig. 8 S-polit and VIP diagrams of *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* samples based on partial least squares discriminant analysis

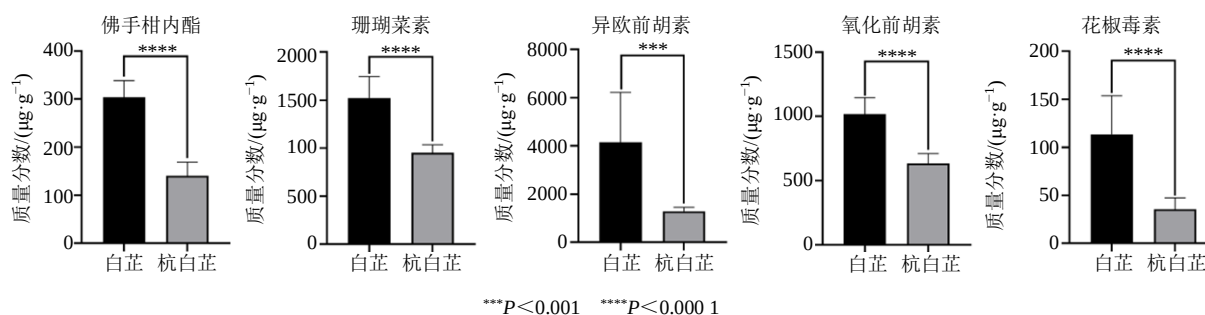


图 9 白芷和杭白芷药材中佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素、氧化前胡素和花椒毒素的平均质量分数

Fig. 9 Average contents of bergapten, phellopterin, isoimperatorin, oxypeucedanin and xanthotoxin in *A. dahurica* and *A. dahurica* var. *formosana* samples

作为指纹图谱及含量测定的检测波长。进一步比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-甲酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液等为流动相的分离效果，结果表明乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相时色谱基线平直，灵敏度高，分离效果最佳。另外，对白芷和杭白芷药材的提取方法进行了优化，以 9 个香豆素类成分总含量为优化指标，分别比较了不同提取溶剂（100%、90%、80%、70%、60% 甲醇）、不同超声时间（20、30、40、50、60 min）和不同料液比（1：10、1：20、1：

一般认为在 95% 的置信区间内，VIP>1.0 的化合物在两组分类中贡献比较大。由偏最小二乘判别分析的 S-plot 图和 VIP 值可知，佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素、氧化前胡素和花椒毒素的 VIP 值均大于 1，对区分白芷和杭白芷药材发挥着重要作用。由含量测定结果可知（图 9），白芷药材中佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素、氧化前胡素和花椒毒素的平均质量分数分别为（ $303.71 \pm 34.55$ ）、（ $1522.95 \pm 222.32$ ）、（ $1017.18 \pm 128.26$ ）、（ $4144.20 \pm 2069.26$ ）、（ $113.53 \pm 40.17$ ）μg/g，明显高于杭白芷药材中佛手柑内酯（ $141.00 \pm 27.97$ ）μg/g、珊瑚菜素（ $952.60 \pm 81.68$ ）μg/g、异欧前胡素（ $633.04 \pm 76.98$ ）μg/g、氧化前胡素（ $1283.87 \pm 169.11$ ）μg/g 和花椒毒素（ $35.47 \pm 11.93$ ）μg/g 的平均含量（ $P < 0.001$ ），这 5 个香豆素类成分可以认为是白芷药材和杭白芷药材的差异性化合物。

### 3 讨论

为了研究和比较不同基原白芷药材（白芷和杭白芷）化学成分，首先采用高效液相色谱法对白芷和杭白芷药材进行了指纹图谱分析及多成分含量测定研究。在分析之前，对高效液相色谱条件进行了优化，采用二极管阵列检测器对白芷和杭白芷药材样品在 210~400 nm 进行全波段扫描，选择 310 nm

30、1：40、1：50）的提取效果，结果表明在料液比为 1：30，超声时间 50 min，80% 甲醇为提取溶剂的条件下对白芷和杭白芷药材中香豆素类成分提取率最高。

香豆素类成分为白芷药材的主要活性成分，但《中国药典》2020 年版中仅以欧前胡素和异欧前胡素 2 种香豆素类成分作为白芷药材质量控制的指标性成分，不能全面反映白芷药材的质量及白芷和杭白芷的质量差异<sup>[1]</sup>。因此，需要建立更加全面的质



量评价方法,对不同基原白芷和杭白芷药材进行分析与比较。本研究采用所建立的高效液相色谱法分析了 10 批白芷及 10 批杭白芷药材样品,建立了不同基原白芷药材的化学指纹图谱,各批次样品与对照指纹图谱相似度较高,均在 0.930 以上。由指纹图谱分析可知 2 个不同基药材白芷和杭白芷所含化学成分种类一致,但峰面积大小有差异,提示两者成分含量之间可能存在一定差异性。为了更好地鉴别和区分白芷和杭白芷药材,在指纹图谱分析的基础上,进一步测定了白芷和杭白芷药材中花椒毒酚、水合氧化前胡内酯、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、珊瑚菜素和异欧前胡素 9 种香豆素类成分的含量。所测定的 9 个香豆素类成分中以欧前胡素的含量最高。对比白芷和杭白芷药材中香豆素类成分含量发现,白芷药材中香豆素类成分总含量明显高于杭白芷药材。

为了进一步区分白芷和杭白芷药材,寻找质量标志物,在含量测定的基础上,采用聚类分析、主成分分析及偏最小二乘判别分析等化学计量学方法对白芷与杭白芷药材进行了区分与比较。结果表明,基于 9 种香豆素类成分的定量结果,可以将不同基原白芷药材区分开来。由 9 种香豆素类成分在 S-plot 图中的分布和 VIP 值可知(图 8),佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素、氧化前胡素和花椒毒素 5 个香豆素类成分为白芷和杭白芷药材之间的差异性化合物。所筛选得到的 5 个差异化合物在白芷药材中的含量明显高于杭白芷药材(图 9),可以作为白芷药材的质量控制指标,也可作为区分和鉴别白芷和杭白芷药材的指标性化合物。

本研究采用 HPLC 法对白芷及杭白芷药材化学成分进行了分析,建立了白芷和杭白芷药材化学指纹图谱和多成分含量测定方法;在此基础上,采用化学计量学方法对白芷和杭白芷药材进行了区分与比较。所建立的分析方法简便、准确,有助于更好地了解白芷药材 2 个基原白芷与杭白芷之间的香豆素类成分化学

含量差异,为不同基原白芷药材质量的综合评价与控制提供了方法保障和数据支撑。

**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: 109.
- [2] 李乾, 刘洁, 李月婷, 等. UPLC-FLD 法同时测定不同产地白芷中 5 种香豆素 [J]. 中成药, 2020, 42(9): 2357-2362.
- [3] Liang W H, Chang T W, Charng Y C. Influence of harvest stage on the pharmacological effect of *Angelica dahurica* [J]. *Bot Stud*, 2018, 59(1): 14.
- [4] 吉庆, 马宇衡, 张烨. 白芷的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 食品与药品, 2020, 22(6): 509-514.
- [5] 练有扬, 杨娜, 赵雨晴, 等. 白芷的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 科学技术创新, 2019(3): 36-37.
- [6] Thuong P T, Hung T M, Ngoc T M, et al. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(1): 101-106.
- [7] 于定荣, 麻印莲, 顾雪竹, 等. 不同提取方法对白芷中香豆素成分欧前胡素、异欧前胡素的影响及镇痛作用的比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2405-2407.
- [8] Chen L L, Xu W H, Yang Q J, et al. Imperatorin alleviates cancer cachexia and prevents muscle wasting via directly inhibiting STAT3 [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104871.
- [9] Li D, Wu L. Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* cause anti-allergic inflammation [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 874-880.
- [10] 杨贵雅, 薛紫鲸, 张丹, 等. 基于指纹图谱和多成分含量测定的丹参药材皮部和木部化学成分比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5328-5335.
- [11] 付小梅, 孙菡, 刘婧, 等. 基于聚类分析和主成分分析的栀子指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4653-4661.
- [12] 李晶峰, 杨海南, 鄧慧, 等. 不同产地槐角 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6677-6682.

[责任编辑 时圣明]