

基于 HPLC 指纹图谱和一测多评法的升麻饮片质量评价

余武^{1,2,3}, 丁婵^{1,3,4}, 彭思源^{1,3,4}, 龚婕^{1,3,4}, 厉晓^{1,3,4}, 浦子牛^{1,3,4}, 王炜^{1,3,4*}, 崔培梧^{1,3,4*}

1. 湖南中医药大学药学院 中药民族药物创新发展国际实验室, 湖南 长沙 410208
2. 常德职业技术学院 药理学系, 湖南 常德 415000
3. 湖南中医药大学药学院 菌物药研究室, 湖南 长沙 410208
4. 国家中医药管理局中药药性与药效三级科研实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: **目的** 建立升麻饮片的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱和分析其 5 种成分含量的一测多评 (quantitative analysis of multicomponents by single-marker, QAMS) 方法, 实现对升麻饮片质量的系统评价。 **方法** 采用 HPLC 法建立升麻饮片指纹图谱, 运用相似度评价、聚类分析 (cluster analysis, CA)、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) 等化学模式识别对指纹图谱进行分析; 以异阿魏酸为内参物, 建立分析咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、升麻素含量的 QAMS 法, 并与外标法 (external standard method, ESM) 测定结果进行比较。 **结果** 12 批升麻饮片的 HPLC 指纹图谱中有 13 个共有峰, 指认了该指纹图谱中的 5 个成分, 分别为咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素, 12 批升麻饮片相似度为 0.92~1.00, CA、PCA 和 OPLS-DA 分析表明, 供试升麻饮片可分为 2 类, 差异性成分为峰 2、3、4、7 (阿魏酸)、8 (异阿魏酸)、9 (升麻素); 建立了分析所指认的 5 种成分含量的 QAMS 方法, 分析结果与 ESM 法测定的相应成分含量无显著差异。 **结论** 所建立的 HPLC 指纹图谱和 QAMS 法操作简便、高效、经济、可靠, 可为升麻饮片及其衍生产品的质量评价提供参考和依据。

关键词: 升麻饮片; 指纹图谱; 一测多评法; 外标法; 质量评价; 咖啡酸; 升麻素苷; 阿魏酸; 异阿魏酸; 升麻素

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)22-7828-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.025

Quality evaluation of *Cimicifugae Rhizoma* decoction pieces based on HPLC fingerprint and quantitative analysis of multicomponents by single-marker method

YU Wu^{1,2,3}, DING Chan^{1,3,4}, PENG Siyuan^{1,3,4}, GONG Jie^{1,3,4}, LI Xiao^{1,3,4}, PU Ziniu^{1,3,4}, WANG Wei^{1,3,4}, CUI Peiwu^{1,3,4}

1. Traditional Chinese Medicine and Ethnomedicine Innovation & Development International Laboratory, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Department of Pharmacy, Changde Vocational and Technical College, Changde 415000, China
3. Fungal Medicine Research Lab, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
4. Tertiary Research Lab of Traditional Chinese Medicine Property & Efficacy, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective A method combining high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint with quantitative analysis of multicomponents by single-marker (QAMS) was established to analyze the contents of five components in Shengma (*Cimicifugae Rhizoma*, CR) and realize the systematic evaluation of the quality of CR decoction pieces. **Methods** The HPLC fingerprint of CR decoction pieces was explored through HPLC analysis and comprehensively evaluated through a series of analytical methods including similarity evaluation, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant

收稿日期: 2024-05-06

基金项目: 2023 年度国家药品标准修订研究课题 (2023Z03); 国家自然科学基金资助项目 (81973211/C0033375); 湖南中医药大学研究生创新课题 (校行研字 [2023] 21 号-2023CX139); 湖南中医药大学“十四五”重点学科-生物工程学科 (校行发规字 [2023] 2 号)

作者简介: 余武, 男, 讲师, 硕士, 湖南中医药大学访问学者, 研究方向为中药质量标准。E-mail: yuwu90@126.com

*通信作者: 崔培梧, 副教授, 硕士生导师, 从事微生物次级代谢产物挖掘及生物合成研究。E-mail: cuipeiwu@126.com

王炜, 教授, 博士生导师, 从事天然产物化学成分与活性研究。E-mail: wangwei402@hotmail.com

analysis (OPLS-DA). Isoferulic acid was selected as the internal reference standard for the exploration of the QAMS method, which was then applied to determine the content of caffeic acid, cimicifugoside, ferulic acid, and cimifugin in CR. The analytical results calculated by QAMS were subsequently compared with those from the external standard method (ESM). **Results** In the established fingerprints for 12 batches of CR decoction pieces, thirteen common peaks were identified and five peaks of them were confirmed, which were caffeic acid, cimicifugoside, ferulic acid, isoferulic acid, and cimifugin, respectively. The similarity scores for 12 batches of CR decoction pieces were ranged from 0.92 to 1.00. According to the further calculation of the fingerprints through CA, PCA, and OPLS-DA, the tested CR decoction pieces can be categorized into two distinct groups. The differential components among the tested samples were identified as peak 2, peak 3, peak 4, peak 7 (ferulic acid), peak 8 (isoferulic acid), and peak 9 (cimifugin), respectively. The QAMS method for quantitative analysis of five confirmed components in CR decoction pieces was established, and there were no significant difference between the analytical results through QAMS and ESM. **Conclusion** The established HPLC fingerprint and QAMS were found to be simple, efficient, economical and reliable, which can provide a reference and basis for quality control of CR decoction pieces and the derived products.

Key words: *Cimicifugae Rhizoma* decoction pieces; fingerprint; multicomponents by single-marker; external standard method; quality evaluation; caffeic acid; cimicifugoside; ferulic acid; isoferulic acid; cimifugin

升麻 *Cimicifugae Rhizoma* 是毛茛科植物兴安升麻 *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim.、大三叶升麻 *C. heracleifolia* Kom.或升麻 *C. foetida* L.的干燥根茎,除去杂质,略泡、洗净、润透、切厚片之后干燥,即得升麻饮片^[1],在我国主要产于黑龙江、辽宁、吉林、内蒙古、河北、四川等地^[2]。升麻的药用记载最早见于《神农本草经》,历代本草学专著也多有记载,其性辛、微甘、微寒,具有发表透疹、清热解毒、升举阳气之功效,临床上常用于风热头痛、咽喉肿痛、麻疹不透、子宫脱垂等症治疗^[3]。

升麻的主要活性成分有酚酸、三萜及其苷类、色原酮类化合物等^[4-6],药效学研究表明升麻所含的异阿魏酸、阿魏酸、咖啡酸、升麻素等成分可发挥抗炎^[7]、抗氧化^[8]、抗病毒^[9]、抗肿瘤^[10]等活性,但《中国药典》2020年版尚未收录升麻饮片标准,各生产企业参照升麻药材质量标准,以阿魏酸、异阿魏酸为指标进行鉴别,以异阿魏酸为指标进行含量测定,这无法反映升麻炮制过程中相关成分的变化^[11-12]。基于上述现状,升麻药材和饮片中多成分的分析方法相关研究虽已引起重视,但当前报道的相关分析方法在经济性和对升麻饮片质量的系统评价方面存在一定不足^[13-14],而结合中药多成分、多靶点特征开发的指纹图谱分析技术和一测多评法(quantitative analysis of multicomponents by single-marker, QAMS)可快速实现对中药复杂成分的系统评价,已被广泛应用于中药质量控制研究过程^[15-16],这为升麻饮片的质量评价研究提供了重要参考。

结合上述分析,为建立适用于升麻饮片质量系统评价的分析方法,提高检测效率、降低成本,本研究拟在基于变波长策略的高效液相色谱法(HPLC)基础上建立升麻饮片 HPLC 指纹图谱,并建立 QAMS 法同时测定升麻饮片中咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸和升麻素含量,为升麻饮片质量标准的提升提供参考和依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);Wayeal 3100 型高效液相色谱仪(安徽皖仪科技股份有限公司);EX224ZH 型万分之一电子分析天平(美国奥豪斯公司);JA1100B 精密电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);Agilent Zorbox SB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国安捷伦科技公司);Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国沃特世公司);SHIMSEN Superb II C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 日本岛津公司);JS-40 型超声波清洗仪(常州鸿泽实验科技有限公司);SCI-12 型台式高速小型离心机(美国 SCIOLOGEX 公司);SU-20UVFB 型实验室纯水系统(骇思仪器科技有限公司)。

1.2 材料

甲醇、乙腈均为色谱纯,水为怡宝纯净水,其余试剂为分析纯;对照品升麻素苷(批号 C15736664,质量分数≥98%)购自上海麦克林生化科技股份有限公司,异阿魏酸(批号 S22071D5826,质量分数 98%)购自上海士锋生物科技有限公司,

阿魏酸(批号 RP190616, 质量分数 99.97%)、咖啡酸(批号 RP190614, 质量分数 $\geq 99\%$) 购自成都麦德生科技有限公司, 升麻素(批号 AFDC0460, 质量分 98%) 购自成都埃法生物科技有限公司。升麻饮片来源信息见表 1, 经湖南中医药大学药学院王智副教授鉴定为大三叶升麻 *C. heracleifolia* Kom. 和升麻 *C. foetida* L.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Zorbox SB C₁₈ (250 mm×4.6 mm,

5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-磷酸水溶液(0.1%, B) 为流动相, 梯度洗脱(0~19 min, 2%~7%A; 19~20 min, 7%~12%A; 20~31 min, 12%; 31~32 min, 12%~15%A; 32~53 min, 15%A; 53~54 min, 15%~23%A; 54~76 min, 23%~24%A; 76~78 min, 24%~60%A; 78~83 min, 60%A; 83~90 min, 60%~2%A), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为变波长程序(0~10 min, 230 nm; 10~21 min, 280 nm; 21~34 min, 330 nm; 34~56 min, 300 nm; 56~90 min, 370 nm; 90 min, 230 nm), 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 20 μL 。

表 1 升麻饮片样品信息

Table 1 Sample information of *Cimicifugae Rhizoma* decoction pieces

| 编号 | 品种 | 生产企业 | 产地 | 批号 |
|-----|-------|-----------------|-----|--------------|
| S1 | 大三叶升麻 | 广西紫云轩中药科技有限公司 | 吉林 | 22030131 |
| S2 | 大三叶升麻 | 上海德大堂国药有限公司 | 吉林 | 22101702 |
| S3 | 大三叶升麻 | 湖南振兴中药有限公司 | 黑龙江 | 22022502 |
| S4 | 升麻 | 湖南振兴中药有限公司 | 黑龙江 | 23091308 |
| S5 | 升麻 | 长沙新林制药有限公司 | 黑龙江 | 230801 |
| S6 | 大三叶升麻 | 湖南三湘中药饮片有限公司 | 黑龙江 | 2022092601 |
| S7 | 大三叶升 | 河北楚风中药饮片有限公司 | 河北 | B23041101-01 |
| S8 | 大三叶升麻 | 河北楚风中药饮片有限公司 | 河北 | B22090703-01 |
| S9 | 大三叶升麻 | 上海万仕域国药制品有限公司 | 河北 | 20230807-1 |
| S10 | 大三叶升麻 | 四川新荷花中药饮片股份有限公司 | 辽宁 | 2303072 |
| S11 | 大三叶升麻 | 江西樟树天齐堂中药饮片有限公司 | 辽宁 | 2306002 |
| S12 | 大三叶升麻 | 康美(亳州)世纪国药有限公司 | 辽宁 | 230500119 |

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素对照品适量, 精密称定, 用 50% 甲醇溶解制成含咖啡酸 53.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、升麻素苷 59.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、阿魏酸 107.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、异阿魏酸 138.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、升麻素 133.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液, 充分混匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取升麻饮片粉末(过 2 号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 10% 乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声(频率 40 kHz, 功率 240 W) 提取 30 min, 放冷至室温后再称定质量, 用 10% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 经 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 指纹图谱分析

2.3.1 专属性考察 取上述混合对照品溶液、供试品溶液和空白溶剂(10% 乙醇), 按“2.1”项下色谱条件进样, 结果显示, 空白溶剂在各对照品成分的出现位置上无吸收, 溶剂对色谱峰无影响, 混合对

照品溶液及供试品溶液中各对照品成分色谱峰的分离度良好, 该方法专属性良好。色谱图见图 1。

2.3.2 精密度试验 取升麻饮片(S3) 供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以 8 号异阿魏酸色谱峰为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间 $\text{RSD} \leq 1.20\%$, 相对峰面积 $\text{RSD} \leq 3.00\%$, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取升麻饮片(S3) 供试品粉末 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备得到供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样分析, 以 8 号异阿魏酸色谱峰为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间 $\text{RSD} \leq 1.00\%$, 相对峰面积 $\text{RSD} \leq 3.00\%$, 表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取升麻饮片(S3) 供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别于制备后 0、2、4、8、12、16、24 h 进样测定, 以 8 号异阿魏酸色谱峰为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间 $\text{RSD} \leq 1.20\%$, 相对峰面积 $\text{RSD} \leq 3.00\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

程度可将 12 批样品分为 2 大类, 结合升麻饮片批次信息, CA 结果与产地信息一致。同一产地升麻饮片的化学成分之间仍具有一定的差异性, 这可能与基原品种、产地生态环境、加工炮制条件等因素有关, 因而《中国药典》2020 年版中仅仅依靠产地、性状及单一成分含量等指标评价中药材及饮片质量的方法不全面, 有待完善提升^[1]。当前基于特征图谱结合化学计量学和多策略定量分析的方法^[17-18]已较多地为中药的质量评价提供快速、准确的分析策略。

2.3.8 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 为了评价不同产地之间的升麻饮片的质量差异, 以 12 批升麻饮片指纹图谱中 13 个共有峰的峰面积作为原始数据导入 SIMCA14.1 软件进行 PCA, 分析结果 (图 5) 显示, 模型的拟合参数 R^2_X 为 0.938, 模型预测参数 Q^2 为 0.527, 均大于 0.5, 说明该模型预测能力较好, 确认该分析结果可接受。PCA 分析将不同产地的升麻饮片分为 2 类, 产地为吉林和黑龙江及河北和辽宁的升麻饮片分别归为一类。与上述 CA 结果一致, 提示不同类别产地之间的升麻饮片在化学成分含量上存在负相关, 有较大的差异。

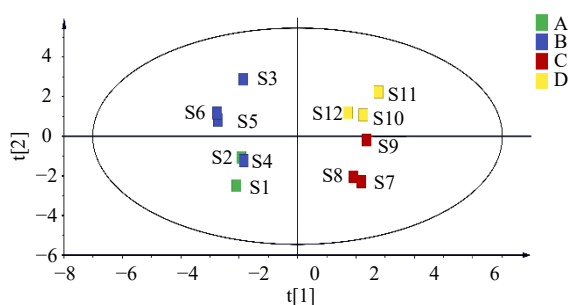


图 5 PCA 得分图

Fig. 5 PCA scores

2.3.9 正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 为了从成分上区分上述 CA 和 PCA 结果中的 2 类升麻饮片, 将 12 批升麻饮片 HPLC 图谱的 13 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件建立有监督模式的 OPLS-DA 模型进行判别分析。分析结果显示, 模型的自变量 (R^2_X) 和因变量 (R^2_Y) 拟合参数分别为 0.529、0.987, 模型预测参数 (Q^2) 为 0.956, 均大于 0.5, 说明该模型预测能力较好^[19], 确认该分析结果可接受, 见图 6-A。OPLS-DA 模型

的 200 次置换检测结果显示, 所有排列在左边的 R^2 和 Q^2 值都低于右边的原始点, 并且 Q^2 点的蓝色回归线与 Y 轴相交于负轴 (图 6-B), 模型未出现过拟合的情况, 所建立的模型可以基于 13 种成分判别 12 批次升麻饮片的质量差异。结合变量重要性投影值 (variable importance in projection, VIP) (图 6-C) 可知 $VIP > 1$ 的色谱峰 (数值由高到低) 分别为峰 3、4、8 (异阿魏酸)、9 (升麻素)、2、7 (阿魏酸), 这些成分对不同产地升麻饮片的质量差异具有更大贡献。

2.4 一测多评含量测定

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.1、0.25、0.5、1.25、2.5 mL, 用 50% 甲醇定容至 5.00 mL, 摇匀, 即得系列浓度的混合对

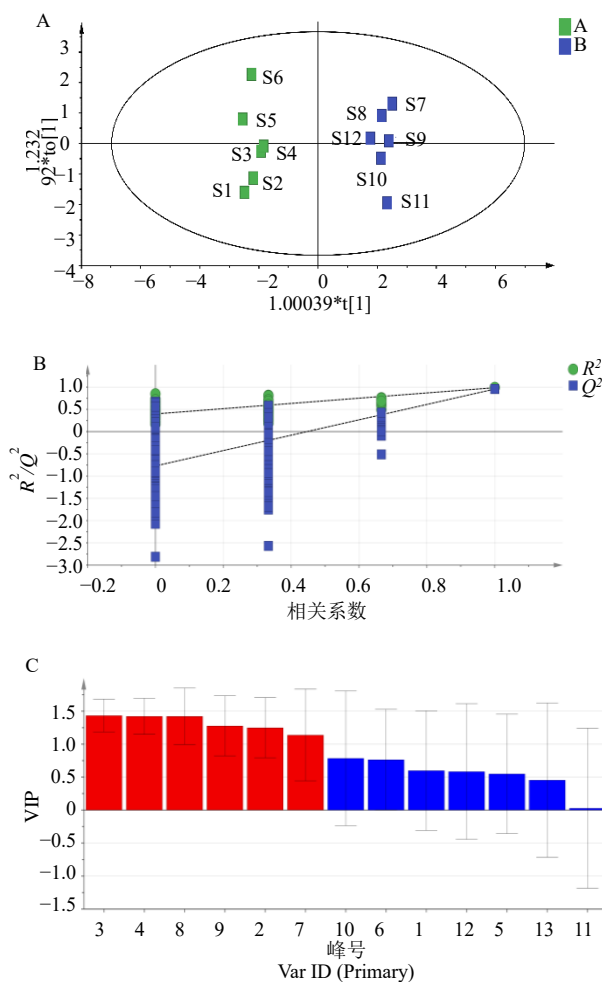


图 6 OPLS-DA 得分图 (A)、置信检测图 (B) 和结合变量重要性投影值图 (C)

Fig. 6 OPLS-DA score plot (A), confidence detection plot (B) and VIP plot (C)

照品溶液；分别取上述混合对照品溶液和系列浓度的混合对照品溶液，分别按“2.1”项下色谱条件进样分析，测定色谱峰面积。分别以各对照品峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X），绘制标准曲线，得到升麻饮片中 5 个成分的线性回归方程及浓度范围，结果见表 2。在相应的浓度范围内，各成分峰面积与质量浓度线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取升麻饮片（S3）供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素的峰面积，计算得到其 RSD 均小于 2.34%，表明仪器精

密度良好。

2.4.3 重复性试验 取升麻饮片（S3）供试品粉末 6 份，按“2.2.2”项下方法制备得到供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样分析，记录咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素的峰面积，计算得到其质量分数的 RSD 均小于 2.49%，表明方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取升麻饮片（S3）供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别于制备后 0、2、4、8、12、16、24 h 进样测定，记录咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素的峰面积，计算得到其 RSD 均小于 3.00%。

表 2 升麻饮片中 5 种成分的线性回归方程

Table 2 Linear regression equations of five components in *Cimicifugae Rhizoma* decoction pieces

| 成分 | 回归方程 | R ² | 线性范围/(μg·mL ⁻¹) |
|------|----------------------|----------------|-----------------------------|
| 咖啡酸 | Y=85.111 X-7.325 2 | 1.000 0 | 1.062~53.12 |
| 升麻素苷 | Y=30.606 X-0.005 323 | 0.999 9 | 1.182~59.12 |
| 阿魏酸 | Y=93.698 X-21.522 | 1.000 0 | 2.155~107.8 |
| 异阿魏酸 | Y=82.626 X-28.481 | 0.999 9 | 2.765~138.2 |
| 升麻素 | Y=46.773 X-6.937 2 | 1.000 0 | 2.665~133.2 |

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的升麻饮片粉末（S3）0.25 g，共 6 份，精密称定，按照样品中各成分含量与对照品含量比值 1:1 加入各指标成分，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分析，依据色谱峰面积计算咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素的加样回收率和 RSD，结果显示，咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素的加样回收率分别为 98.5%、96.9%、101.3%、100.1%、101.0%，RSD 分别为 2.48%、1.00%、0.55%、1.63%、1.03%，表明该分析方法的准确度良好。

2.4.6 相对校正因子（f_{ci}）的测定 以异阿魏酸为内参物，根据“2.4.1”项下线性关系考察结果，分别计算内参物异阿魏酸与咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、升麻素的 f_{ci}^[20]，结果见表 3。结果显示，咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、升麻素的平均值分别为 0.984 6、0.379 9、1.134 5、0.561 1，RSD 均小于 2.00%。

$$f_{ci} = f_c/f_i = C_c \times A_i / (C_i \times A_c)$$

A_c 为内参物峰面积，C_c 为内参物浓度，A_i 为其他成分 i 的峰面积，C_i 为其他成分 i 的浓度

2.4.7 f_{ci} 耐用性考察

(1) 不同高效液相色谱仪和色谱柱对 f_{ci} 的影

表 3 4 种成分的 f_{ci} 测定结果

Table 3 Relative correction factors of four components

| 编号 | f _{异阿魏酸/咖啡酸} | f _{异阿魏酸/升麻素苷} | f _{异阿魏酸/阿魏酸} | f _{异阿魏酸/升麻素} |
|-------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | 1.000 6 | 0.366 2 | 1.159 0 | 0.561 4 |
| 2 | 1.002 4 | 0.375 8 | 1.125 8 | 0.572 1 |
| 3 | 1.016 6 | 0.372 1 | 1.142 3 | 0.553 9 |
| 4 | 1.020 9 | 0.369 1 | 1.119 0 | 0.548 4 |
| 5 | 1.025 6 | 0.366 4 | 1.124 9 | 0.565 3 |
| 6 | 1.030 0 | 0.369 6 | 1.136 1 | 0.565 9 |
| 平均值 | 1.016 0 | 0.369 9 | 1.134 5 | 0.561 2 |
| RSD/% | 1.19 | 0.98 | 1.29 | 1.54 |

响：试验分别考察了安捷伦 1200 型和皖仪 3100 型 2 种不同的高效液相色谱仪以及 Agilent Zorbax SB C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）（美国沃特世公司）；SHIMSEN Superb II C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）（日本岛津公司）3 种不同的色谱柱对 f_{ci} 的影响，见表 4。不同仪器之间和不同色谱柱之间 f_{ci} 的 RSD 均低于 2.5%，表明 4 种成分的 f_{ci} 在不同的色谱系统中具有良好的耐用性。

(2) 不同色谱柱柱温对 f_{ci} 的影响：试验分别考察了不同色谱柱柱温（20、25、30、35 °C）对 f_{ci}

的影响,见表 5。结果显示,不同色谱柱柱温之间 $f_{c/i}$ 的 RSD 均低于 1.00%,表明 4 种成分的 $f_{c/i}$ 在不同的色谱柱柱温 (20~35 °C) 下具有良好的耐用性。

(3) 不同体积流量对 $f_{c/i}$ 的影响: 试验分别

测得了不同体积流量 (0.8、1.0、1.2 mL/min) 下 4 种成分的 $f_{c/i}$, 见表 6。结果显示,不同体积流量之间 $f_{c/i}$ 的 RSD 均低于 1.00%,表明 4 种成分的 $f_{c/i}$ 在不同体积流量 (0.8~1.2 mL/min) 下具有良好的耐用性。

表 4 不同仪器和色谱柱对 $f_{c/i}$ 的影响

Table 4 Effects of different instruments and columns on relative correction factors

| 仪器 | 色谱柱 | $f_{\text{异阿魏酸/咖啡酸}}$ | $f_{\text{异阿魏酸/升麻素苷}}$ | $f_{\text{异阿魏酸/阿魏酸}}$ | $f_{\text{异阿魏酸/升麻素}}$ |
|----------|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 安捷伦 1200 | Agilent Zorbox SB C ₁₈ | 1.022 8 | 0.364 2 | 1.134 8 | 0.565 1 |
| | Waters-Symmetry-C ₁₈ | 1.019 4 | 0.362 8 | 1.134 4 | 0.557 6 |
| | SHIMSEN Superb II C ₁₈ | 1.014 3 | 0.361 6 | 1.119 3 | 0.564 3 |
| 皖仪 3100 | Agilent Zorbox SB C ₁₈ | 1.027 5 | 0.373 9 | 1.124 7 | 0.563 0 |
| 平均值 | - | 1.021 0 | 0.365 6 | 1.128 3 | 0.562 5 |
| RSD/% | - | 0.91 | 2.38 | 0.34 | 0.16 |

表 5 不同色谱柱柱温对 $f_{c/i}$ 影响

Table 5 Effects of different column temperatures on relative correction factors

| 柱温/°C | $f_{\text{异阿魏酸/咖啡酸}}$ | $f_{\text{异阿魏酸/升麻素苷}}$ | $f_{\text{异阿魏酸/阿魏酸}}$ | $f_{\text{异阿魏酸/升麻素}}$ |
|-------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 20 | 1.016 5 | 0.358 9 | 1.125 8 | 0.559 8 |
| 25 | 1.022 8 | 0.364 2 | 1.134 8 | 0.565 1 |
| 30 | 1.016 1 | 0.360 0 | 1.128 0 | 0.563 1 |
| 35 | 1.012 6 | 0.359 9 | 1.124 6 | 0.561 0 |
| 平均值 | 1.017 2 | 0.361 4 | 1.129 1 | 0.563 0 |
| RSD/% | 0.51 | 0.68 | 0.46 | 0.36 |

表 6 不同体积流量对 $f_{c/i}$ 影响

Table 6 Effects of different flow rate on relative correction factors

| 体积流量/(mL·min ⁻¹) | $f_{\text{异阿魏酸/咖啡酸}}$ | $f_{\text{异阿魏酸/升麻素苷}}$ | $f_{\text{异阿魏酸/阿魏酸}}$ | $f_{\text{异阿魏酸/升麻素}}$ |
|------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0.8 | 1.017 0 | 0.364 7 | 1.122 0 | 0.562 2 |
| 1.0 | 1.022 8 | 0.364 2 | 1.134 8 | 0.565 1 |
| 1.2 | 1.013 7 | 0.364 3 | 1.121 8 | 0.562 1 |
| 平均值 | 1.017 8 | 0.364 4 | 1.126 2 | 0.563 1 |
| RSD/% | 0.46 | 0.07 | 0.66 | 0.30 |

2.4.8 色谱峰定位 QAMS 中最常用的色谱峰定位方法是相对保留时间 ($t_{i/c}$) 法^[18,21]。试验采用 $t_{i/c}$ 法进行 4 种成分的色谱峰定位, 分别计算咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、升麻素对参照物异阿魏酸的相对保留时间 ($t_{i/c}$), 见表 7。结果显示, 咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、升麻素对参照物异阿魏酸的相对保留时间 ($t_{i/c}$) 分别为 0.606、0.801、0.915、1.074, RSD 均小于 0.20%, 表明采用相对保留时间 ($t_{i/c}$) 法进行色谱峰定位具有可行性。

2.4.9 样品含量测定及比较 取 12 批次升麻饮片样品, 按“2.2.2”项下方法制备得到供试品溶

液, 采用“2.1”项下色谱条件进样分析, 分别采用 ESM 和 QAMS 计算样品中 5 种成分的含量(其中异阿魏酸作为内参物通过 ESM 测定含量), 并比较 2 种方法测定结果的 RSD, 同时运用 SPSS 24.0 统计软件中独立样本 T 检验方法对每一组分 2 种方法所得数据进行分析, 以 P 值大小考察 2 种方法所得结果的差异程度, 见表 8。结果显示 P 值均 > 0.05, 表明 2 种方法分析的结果无明显差异; 2 种方法测定结果的 RSD 均小于 3.50%, 说明 QAMS 测定升麻饮片中 5 种成分含量的方法准确度良好。

表 7 4 种成分的相对保留时间测定结果

Table 7 Relative retention time of four components

| 编号 | <i>t</i> _{咖啡酸/异阿魏酸} | <i>t</i> _{升麻素苷/异阿魏酸} | <i>t</i> _{阿魏酸/异阿魏酸} | <i>t</i> _{升麻素/异阿魏酸} |
|-------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 | 0.607 | 0.800 | 0.916 | 1.074 |
| 2 | 0.606 | 0.800 | 0.915 | 1.073 |
| 3 | 0.605 | 0.800 | 0.916 | 1.075 |
| 4 | 0.606 | 0.802 | 0.915 | 1.074 |
| 5 | 0.605 | 0.800 | 0.915 | 1.074 |
| 6 | 0.605 | 0.801 | 0.915 | 1.076 |
| 平均值 | 0.606 | 0.801 | 0.915 | 1.074 |
| RSD/% | 0.15 | 0.08 | 0.04 | 0.08 |

3 讨论

本研究根据不同波长 (230、280、300、330、370 nm) 下升麻饮片指纹图谱中色谱峰的丰富程度确定了变波长策略, 同时考虑到色谱分析时间及分析效率, 并以指纹图谱中的共有色谱峰峰形、分离度及峰面积为指标, 对进样量、洗脱梯度、流速及流动相组成等色谱条件进行了优化。结果显示优化色谱条件后的指纹图谱中色谱峰丰富程度更高、共有色谱峰峰形及分离度更好。

研究过程依据指纹图谱中色谱峰的丰富程度

表 8 QAMS 与 ESM 含量测定结果

Table 8 Content determination results of QAMS and ESM

| 编号 | 异阿魏酸/% | 咖啡酸/% | | | 升麻素苷/% | | | 阿魏酸/% | | | 升麻素/% | | |
|-----|---------|---------|---------|------|---------|---------|------|---------|---------|------|---------|---------|------|
| | | ESM | QAMS | RSD | ESM | QAMS | RSD | ESM | QAMS | RSD | ESM | QAMS | RSD |
| S1 | 0.149 0 | 0.015 0 | 0.015 9 | 1.93 | 0.012 1 | 0.012 0 | 0.54 | 0.025 1 | 0.025 8 | 1.85 | 0.060 0 | 0.060 5 | 0.66 |
| S2 | 0.147 1 | 0.014 8 | 0.015 7 | 1.94 | 0.005 3 | 0.005 3 | 0.54 | 0.021 6 | 0.022 3 | 2.26 | 0.070 5 | 0.071 0 | 0.55 |
| S3 | 0.137 8 | 0.011 3 | 0.012 1 | 2.38 | 0.009 4 | 0.009 3 | 0.59 | 0.015 3 | 0.016 1 | 3.38 | 0.086 5 | 0.087 0 | 0.40 |
| S4 | 0.151 3 | 0.015 1 | 0.016 0 | 1.93 | 0.001 7 | 0.001 7 | 0.51 | 0.023 6 | 0.024 3 | 2.03 | 0.025 6 | 0.026 2 | 1.60 |
| S5 | 0.152 0 | 0.014 2 | 0.015 0 | 2.03 | 0.009 7 | 0.009 6 | 0.52 | 0.019 8 | 0.020 6 | 2.52 | 0.073 1 | 0.073 7 | 0.55 |
| S6 | 0.158 8 | 0.014 4 | 0.015 3 | 2.03 | 0.000 8 | 0.000 8 | 0.44 | 0.021 4 | 0.022 1 | 2.33 | 0.046 5 | 0.047 1 | 0.90 |
| S7 | 0.117 1 | 0.015 2 | 0.016 0 | 1.73 | 0.001 6 | 0.001 6 | 0.69 | 0.016 4 | 0.017 1 | 2.98 | 0.017 9 | 0.018 4 | 2.09 |
| S8 | 0.117 5 | 0.014 8 | 0.015 7 | 1.77 | 0.007 0 | 0.007 0 | 0.71 | 0.016 3 | 0.017 0 | 3.02 | 0.012 9 | 0.013 5 | 2.97 |
| S9 | 0.115 2 | 0.013 5 | 0.014 3 | 1.91 | 0.003 2 | 0.003 1 | 0.72 | 0.015 2 | 0.016 0 | 3.26 | 0.017 8 | 0.018 3 | 2.10 |
| S10 | 0.115 2 | 0.013 3 | 0.014 1 | 1.93 | 0.002 7 | 0.002 7 | 0.71 | 0.015 6 | 0.016 4 | 3.16 | 0.013 9 | 0.014 5 | 2.72 |
| S11 | 0.104 6 | 0.010 8 | 0.011 5 | 2.26 | 0.003 0 | 0.003 0 | 0.80 | 0.014 6 | 0.015 3 | 3.35 | 0.011 8 | 0.012 3 | 3.17 |
| S12 | 0.117 1 | 0.012 6 | 0.013 4 | 2.04 | 0.002 8 | 0.002 8 | 0.70 | 0.016 9 | 0.017 7 | 2.87 | 0.016 0 | 0.016 6 | 2.36 |

及以咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素含量为指标, 依次对提取方式 (超声 30 min、超声 60 min、水浴加热 1 h、水浴加热 2.5 h)、提取溶剂 (10%乙醇、30%乙醇、50%乙醇)、料液比 (1:30、1:40、1:50、1:60) 进行了考察, 同时在实验过程发现水浴加热温度高会导致异阿魏酸含量升高, 而峰 13 的峰高逐渐降低, 可能是峰 13 对应成分在高温下发生水解而生成异阿魏酸所致^[12]。提取工艺优化结果显示以 10%乙醇为提取溶剂、超声 30 min、料液比 1:40 时, 指纹图谱中色谱峰的丰富程度更佳、且 5 种目标成分的含量更稳定、提取效率更高、提取方法也更简便, 因此, 确定“2.2.2”项下方法为供试品溶液制备方法。

基于上述实验条件, 本研究建立了基于 HPLC 法及变波长策略下的 12 批次升麻饮片指纹图谱, 确定了 13 个共有峰, 各批次之间的相关性在 0.92~1.00, 说明基于 13 个共有峰分析的升麻饮片质量差

异性较小, 所建立的指纹图谱特征性可靠, 可用于升麻饮片的真伪鉴别和质量评价。通过 CA、PCA 和 OPLS-DA 分析, 12 批升麻饮片可分为 2 类, 结果与产地相符, 其中产地为吉林和黑龙江及河北和辽宁的升麻饮片分别归为一类; 不同类别升麻饮片中成分含量差异较大, 且相同产地的升麻饮片也具有差异性, 这可能与药材基源品种^[14]、产地生态环境^[22]、加工炮制条件^[23]等因素有关。

为进一步评价升麻饮片质量, 本研究指认了升麻饮片指纹图谱中的 5 种成分, 分别为咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素, 并建立了以异阿魏酸为内参物的评价升麻饮片中上述 5 种成分的 QAMS 分析方法。该方法在不同的仪器、色谱柱、柱温、体积流量下的耐用性良好, 可更加经济、高效、简便地评价升麻饮片质量。

中药质量控制和评价是制约中药现代化发展的关键问题之一, 《中国药典》2020 年版中部分中

药饮片的质量评价标准仍不完善,在一定程度上制约了中药的现代化发展及国际化进程^[24]。近年来快速发展的指纹(特征)图谱技术和 QAMS 法为更加全面、系统评价中药质量提供了新模式和新方法,也逐渐得到了国内外药典的关注和应用^[25-26]。本研究建立的升麻饮片 HPLC 指纹图谱和 QAMS 法可为全面提升升麻饮片的质量评价体系及中药饮片质量标准相关研究提供了参考。

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: 75.
- [2] 靳波, 刘友平, 陈鸿平. 毛茛科升麻属植物资源概述 [J]. 江苏中医药, 2010, 42(8): 78-79.
- [3] 翁倩倩, 赵佳琛, 林王敏, 等. 经典名方中升麻类药材的本草考证 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(8): 1230-1237.
- [4] Li J X, Yu Z Y. *Cimicifugae Rhizoma*: From origins, bioactive constituents to clinical outcomes [J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(24): 2927-2951.
- [5] 刘垠泽, 慕雪, 李沛樞, 等. 升麻化学成分及现代药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2023, 42(5): 1-8.
- [6] 陈李乙, 李佳欣, 张美晴, 等. 升麻药材化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1685-1704.
- [7] Hu X Q, Qi C, Feng F, et al. Combining network pharmacology, RNA-seq, and metabolomics strategies to reveal the mechanism of *Cimicifugae Rhizoma* - *Smilax glabra Roxb* herb pair for the treatment of psoriasis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 105: 154384.
- [8] Lim JO, Song KH, Lee IS, et al. *Cimicifugae rhizoma* extract attenuates oxidative stress and airway inflammation via the upregulation of Nrf2/HO-1/NQO1 and downregulation of NF- κ B phosphorylation in ovalbumin-induced asthma [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(10): 1626.
- [9] Ma Y P, Cong W J, Huang H, et al. Identification of fukinolic acid from *Cimicifuga heracleifolia* and its derivatives as novel antiviral compounds against enterovirus A71 infection [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2019, 53(2): 128-136.
- [10] Jia H, Wang X Y, Liu W W, et al. *Cimicifuga dahurica* extract inhibits the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 277: 114057.
- [11] 祝婧, 童恒力, 黄佳兰, 等. 升麻炮制历史沿革的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(8): 3054-3064.
- [12] 康璐, 李钰洁, 王晓, 等. 兴安升麻 UPLC 指纹图谱及 4 种酚酸类质量标志物测定 [J]. 中成药, 2022, 44(2): 469-474.
- [13] 周湘媛, 陈万发, 丁青, 等. 基于 UPLC 指纹图谱和多成分定量评价不同产地升麻药材质量 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5497-5503.
- [14] 姜柔齐, 常丽静, 李明月, 等. 不同基原升麻饮片 HPLC 指纹图谱研究及 4 个成分含量测定 [J]. 中药材, 2021, 44(5): 1161-1167.
- [15] 李灿琳, 刘海洋, 李思, 等. 一测多评法测定大花龙胆中环烯醚萜类和黄酮类成分的含量 [J]. 中草药, 2024, 55(2): 614-621.
- [16] 孟俊华, 刘媛, 占慧慧, 等. 基于特征图谱结合化学计量学和一测多评法的薤白质量评价 [J]. 中草药, 2023, 54(21): 7176-7185.
- [17] 纪国力, 周伟, 巴然然, 等. 双标多测法测定丹参配方颗粒中 6 个酚酸类成分 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43(8): 1326-1333.
- [18] 彭思源, 邓元辉, 丁婵, 等. 基于 HPLC 指纹图谱与一测多评法结合的桑黄品质评价研究 [J]. 中国药理学杂志, 2024, 59(6): 531-540.
- [19] 邵淑贤, 王淑燕, 王丽, 等. 基于 ATD-GC-MS 技术的不同品种白牡丹茶香气成分分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 261-268.
- [20] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [21] 张立军, 张新玥, 李鹏, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合一测多评法的葛花质量控制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(2): 233-242.
- [22] 张明惠, 朱田田, 晋玲, 等. 基于 HPLC 多指标成分测定及指纹图谱多模式识别的不同产地不同品种当归质量差异分析 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6187-6199.
- [23] 张权, 荆文光, 程显隆, 等. 基于 9 种成分测定的厚朴炮制过程质量传递规律研究 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 647-652.
- [24] 肖小河. 走向精准的中药质量评价与控制 [J]. 药学报, 2019, 54(12): 2139-2140.
- [25] 鄢海燕, 邹纯才. 《中国药典》(2010 年版~2020 年版)中药指纹(特征)图谱应用进展与展望 [J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(1): 150-155.
- [26] 闫艳, 杜晨晖. 一测多评法在中药质量控制中的应用及研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(6): 2378-2387.

[责任编辑 时圣明]