

基于 UPLC 指纹图谱及多指标成分定量和化学计量学的白前质量评价

刘世红¹, 张红杨¹, 冯书敏¹, 黄必胜¹, 陈 诚², 刘大会¹, 雷 咪^{1*}

1. 湖北时珍实验室/湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065

2. 新乡园农业科技发展有限责任公司, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 建立白前 *Cynanchum stauntonii* 色谱指纹图谱定性、多组分定量与化学计量学的整合分析方法, 评价野生与栽培白前的质量差异。方法 采用 infinity LabPoroshell 120 Aq-C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈 (B) -0.1%磷酸水溶液 (A), 梯度洗脱, 检测波长为 260 nm (0~14 min)、274 nm (14~52 min)、210 nm (52~70 min), 体积流量为 0.5 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 7 μL。以对照药材为参照, 建立了白前的超高效液相色谱法 (UPLC) 指纹图谱, 结合聚类分析 (cluster analysis, CA), 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 对 20 批白前进行质量评价, 开发并验证了 6 种指标成分的含量测定分析方法。结果 指纹图谱及含量测定的方法学验证均良好, 20 批白前与对照药材的指纹图谱相似度均大于 0.737, 共标定 14 个共有峰, 并指认了对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、anhydrohirsutigenin 3-O-α-L-diginopyranosyl-(1→4)-β-D-cymaropyranosyl-(1→4)-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-β-D-thevetopyranoside (A-O-DCDT) 6 种指标成分; 主成分得分结果与聚类分析结果一致, 可将 20 批白前样品聚为 2 类, 野生白前聚为一类, 栽培白前聚为一类, OPLS-DA 筛选出引起野生与栽培白前质量差异的 5 个差异性标志物, 分别为色谱峰 7、8、11、12、14; 同时, 多成分定量测定结果表明, 野生栽培白前中 6 个指标成分之间存在明显差异。结论 建立的 20 批白前 UPLC 指纹图谱、多指标成分含量测定和化学计量学相结合的质量评价方法, 高效、准确、特征性强、重复性和稳定性好, 可为白前质量评价体系的完善提供参考。关键词: 白前; 指纹图谱; 多成分定量; 化学计量学分析; 质量评价; 对羟基苯甲酸; 香草酸; 丁香酸; 4-羟基苯乙酮; 2,4-二羟基苯乙酮

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)22-7837-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.026

Quality evaluation of *Cynanchum stauntonii* by UPLC fingerprint combined with multi-component quantification and chemometrics

LIU Shihong¹, ZHANG Hongyang¹, FENG Shumin¹, HUANG Bisheng¹, CHEN Cheng², LIU Dahui¹, LEI Mi¹

1. Hubei Shizhen Laboratory/Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Xinxiangyuan Agricultural Science and Technology Development Co., Ltd., Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To establish an integrated analysis method of chromatographic fingerprint, multi-component quantification and chemometrics, and to evaluate the quality difference between wild and cultivated Baiqian (*Cynanchum stauntonii*). **Methods** The infinity LabPoroshell 120 AQ-C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) column was used for the analysis, with an acetonitrile (B) -0.1% phosphoric acid water solution (A) serving as the mobile phase. The detection wavelengths were 260 nm (0—14 min), 274 nm (14—52 min) and 210 nm (52—70 min), flow rate of 0.5 mL/min, a column temperature of 30 °C, and injection volume of 7 μL. In this study, the ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of *C. stauntonii* was established with reference to traditional Chinese medicinal materials, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to evaluate the quality of 20 batches of *C. stauntonii*. A method for the determination of six index components of *C. stauntonii* was developed and validated. **Results** The methodological verification of fingerprint and content determination was good. The similarity of fingerprints between 20 batches of samples and the reference traditional Chinese medicinal materials of *C. stauntonii* was greater than 0.737. A total of 14 common peaks were calibrated, and six index components of

收稿日期: 2024-05-02

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFC3503804); 中央本级重大增减支项目 (2060302)

作者简介: 刘世红 (2000—), 女, 河南焦作人, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制与评价。E-mail: 13223921539@163.com

*通信作者: 雷 咪 (1986—), 女, 湖北松滋人, 高级实验师, 硕士生导师, 博士, 主要从事中药质量控制与评价研究。

E-mail: 191041507@qq.com

p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, 4-hydroxyacetophenone, 2,4-dihydroxyacetophenone and A-*O*-DCDT were identified. The results of principal component score were consistent with the results of cluster analysis. The 20 batches of samples were clustered into two categories, wild *C. stauntonii* was clustered into one category, and cultivated *C. stauntonii* was clustered into another category. A total of five differential biomarkers causing differences in the quality of wild and cultivated *C. stauntonii* were screened using OPLS-DA, namely chromatographic peaks 7, 8, 11, 12, and 14. Meanwhile, the results of multi-component quantitative analysis showed that there were significant differences in the six indicator components between wild and cultivated *C. stauntonii*. **Conclusion** The quality evaluation method, which combines UPLC fingerprinting, multi-component quantification, and chemometrics for 20 batches of *C. stauntonii*, is efficient, accurate, highly characteristic, reproducible, and stable. It can provide reference for the improvement of the quality evaluation system for *C. stauntonii*.

Key words: *Cynanchum stauntonii* (Decne.) Schltr. ex H. Lévl.; fingerprint; multi-component quantification; chemometric analysis; quality evaluation; *p*-hydroxybenzoic acid; vanillic acid; syringic acid; 4-hydroxyacetophenone; 2,4-dihydroxyacetophenone

白前为萝藦科植物柳叶白前 *Cynanchum stauntonii* (Decne.) Schltr. ex H. Lévl.或芫花叶白前 *C. glaucescens* (Decne.) Hand. -Mazz.的干燥根茎和根^[1], 因善降气祛痰而止咳, 被称为“肺家之要药”^[2-3]。近年来, 随着呼吸系统疾病频发, 白前作为常用的止咳化痰类药物, 临床需求也在逐年增长^[4]。随着社会经济不断发展, 白前的生长环境遭到了严重破坏, 野生资源锐减, 因此湖北农科院率先于 1984 年在新洲、团风二地开展柳叶白前野生转家种的试验^[5], 此后该地区逐渐成为我国柳叶白前集中产区 and 加工销售集散地, 截至 2023 年底, 湖北省柳叶白前集中种植面积已有 2 666.7 hm² (4 万余亩), 产量占市场份额 90%以上, 已成为全国白前的主产区, 栽培品逐渐替代野生品成为了市场流通的主流。鉴于其人为介入, 大量农药、化肥、生长激素等的投入, 改变了药材固有“野性”^[6], 因此迫切需要开展野生与栽培白前的质量评价研究。

目前白前的质量评价标准尚不完善, 《中国药典》2020 年版白前项下除炮制、性状、水分检查等指标外, 无其他质控标准, 查阅文献可知关于白前中有关物质成分的研究, 仅有朱丽等^[7]、田效民等^[8]、张玺雅等^[9]建立了柳叶白前中多种成分的含量测定方法, 不能反映药材整体特征, 具有一定的局限性。中药指纹图谱作为一种综合、量化的色谱鉴定手段, 可以较全面地反映中药材及制剂的化学成分及特征, 进而评价其质量稳定性及一致性^[10], 且白前中含有的化学成分如对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、anhydrohirundigenin 3-*O*- α -*L*-diginopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -*D*-cymaropyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -*D*-digitoxopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -*D*-thevetopyranoside (A-*O*-DCDT) 等均被证实具有多种生物学活性^[11-16]。上述物质因化学结

构不同导致其紫外吸收强度差异明显^[12,17], 因此, 本研究以柳叶白前为研究对象, 以对照药材为参照, 采用 UPLC-DAD 法建立其中药特征指纹图谱, 并结合多指标成分含量信息, 对白前进行系统的质量评价, 为野生与栽培白前的品质差异评价提供了数据支撑, 为白前药材质量标准的完善提供技术手段, 为促进白前产业可持续发展提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 仪器

1290 Infinity II 型超高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); EX125DZH 型十万分之一分析天平 (奥豪斯仪器常州有限公司); AL204 型万分之一电子天平 (梅特勒-托利多国际贸易有限公司); WGL-65B 型电热恒温鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); KUDOS SK250H 型数控超声波清洗机 (上海科导超声仪器有限公司);

1.2 材料

对羟基苯甲酸 (批号 B20328, 质量分数 99.99%)、香草酸 (批号 B21361, 质量分数 97%) 购于上海源叶生物科技有限公司, 丁香酸 (批号 PS010564, 质量分数 98%)、4-羟基苯乙酮 (批号 PS020038、质量分数 98%)、2,4-二羟基苯乙酮对照品 (批号 PS211008-02、质量分数 98%)、A-*O*-DCDT (批号 PS013711、质量分数 80%) 购于成都普思生物科技有限公司, 白前 (柳叶白前) 对照药材 (批号 121442-202104, 中国食品药品检定研究院)。甲醇、乙腈均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。20 批白前样品来源信息见表 1, 经湖北中医药大学刘大会教授鉴定为萝藦科植物柳叶白前 *C. stauntonii* (Decne) Schltr. ex Levi 的根和根茎, 洗净干燥后, 粉碎过 60 目筛备用。

表 1 20 批白前样品信息

Table 1 Sample information of 20 batches *C. stauntonii*

样品编号	产地	经度 (E) / (°)	纬度 (N) / (°)	来源
S1	湖北省武汉市新洲区	114.932977	30.840523	栽培
S2	湖北省武汉市新洲区	114.807543	30.847243	栽培
S3	湖北省武汉市新洲区	114.947682	30.849227	栽培
S4	湖北省武汉市新洲区	114.834341	30.799711	栽培
S5	湖北省武汉市新洲区	114.828727	30.806261	栽培
S6	湖北省黄冈市团风县	115.017949	30.778168	栽培
S7	湖北省黄冈市团风县	115.011626	30.784531	栽培
S8	湖北省武汉市麻城市	115.229697	31.326059	栽培
S9	湖北省黄冈市麻城市	115.060572	30.987735	栽培
S10	湖北省黄冈市麻城市	115.036971	31.032397	栽培
S11	湖北省黄冈市麻城市	115.120319	31.038154	栽培
S12	湖北省黄冈市罗田县	115.222776	30.871158	栽培
S13	湖北省黄冈市罗田县	115.196462	30.825275	栽培
S14	湖北省黄冈市罗田县	115.346433	30.955400	栽培
S15	湖北省黄冈市团风县	115.019569	30.779055	野生
S16	广西桂林市龙胜县	110.011238	25.797931	野生
S17	湖南省怀化市通道侗族自治县	109.781561	26.153039	野生
S18	四川省乐山市金口河区	103.085393	29.250803	野生
S19	湖北省黄冈市麻城市	115.122909	31.502687	野生
S20	湖北省黄冈市红安县	114.628653	31.245171	野生

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Infinity LabPoroshell 120 AQ-C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相为乙腈 (B) -0.1% 磷酸水溶液 (A), 梯度洗脱 (0~5 min, 10% B; 5~12 min, 10%~12% B; 12~16 min, 12% B; 16~35 min, 12%~30% B; 35~49 min, 30%~53% B; 49~65 min, 53%~82% B; 65~69 min, 82%~10% B; 69~70 min, 10% B); 检测波长: 260 nm (0~14 min)、274 nm (14~52 min)、210 nm (52~70 min); 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 30 °C; 进样量 7 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、A-O-DCDT 6 个对照品适量, 加甲醇溶解, 配制成质量浓度分别为 20.6、101.6、153.1、20.8、71.2、116.8 μg/mL 的混合对照品溶液, 摇匀备用。

2.3 供试品溶液的制备

取白前粉末约 1 g (过 60 目筛), 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入水饱和醋酸乙酯 20.0 mL, 密塞, 称定质量, 静置 12 h 后超声处理

40 min, 放冷, 再称定质量, 用水饱和醋酸乙酯补足损失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液蒸干后用 2 mL 甲醇溶解, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验 取本品粉末 1.0 g (S2), 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液 1 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 连续进样 6 次, 记录色谱图。3 号色谱峰 (香草酸) 峰形较佳, 分离度较好, 峰面积稳定, 因此选为参照峰。以 3 号色谱峰为参考, 计算各共有峰相对保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.01%~0.09%、0.67%~1.12%, 说明该精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取本品粉末 1.0 g (S2), 精密称定, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以 3 号峰为参照峰, 计算得到各共有峰相对保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.04%~0.27%、0.33%~1.39%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取本品粉末 1.0 g (S2), 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液 1 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 分别在制备后 0、2、

4、8、12、24 h 进样，以 3 号峰为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.04%~0.17%、0.21%~1.18%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 指纹图谱的建立及相似度评价 取 20 批样品制备的供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，获得各批次样品的指纹图谱。将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，以白前对照药材（S）的色谱图作为参照图谱，分别对 20 批样品 UPLC 色谱图进行多点校正，时间窗宽度设置为 0.1，通过 Mark 峰匹配模式生成叠加图谱，采用中位数法生成对照图谱（R），共标定共有峰 14 个，其峰面积之和占总峰面积的 70%以上，见图 1。将共有模式与对照药材特征图谱进行比对，供试品色谱中应呈现的 14 个特征峰与对照药材色谱图对照药材色谱图中的 14 个特征峰保留时间相对应，

见图 2。并经过与对照品 UPLC 色谱图（图 3）及保留时间对比指认出 6 个色谱峰，峰 2 为对羟基苯甲酸、峰 3 为香草酸、峰 4 为丁香酸、峰 5 为 4-羟基苯乙酮、峰 6 为 2,4-二羟基苯乙酮、峰 11 为 A-O-DCDT。相似度评价结果见表 2，各批白前样品指纹图谱相似度均大于 0.737，其中 14 批栽培白前与对照药材图谱的相似度均 >0.900，表明栽培白前与对照药材品质最为接近，且相对稳定，栽培白前中 S1~S5 与对照药材图谱的相似度普遍较高，为 0.959~0.992，为新洲产白前，S8~S11 与对照药材图谱的相似度较低，为 0.925~0.971，为麻城产白前。6 批野生白前与对照图谱的相似度为 0.737~0.926，表明其品质较不稳定，其中 S17 与对照药材图谱的相似度最高，采集地为湖南省通道侗族自治县，S20 与对照药材图谱的相似度最低，采集地为湖北省红安县。

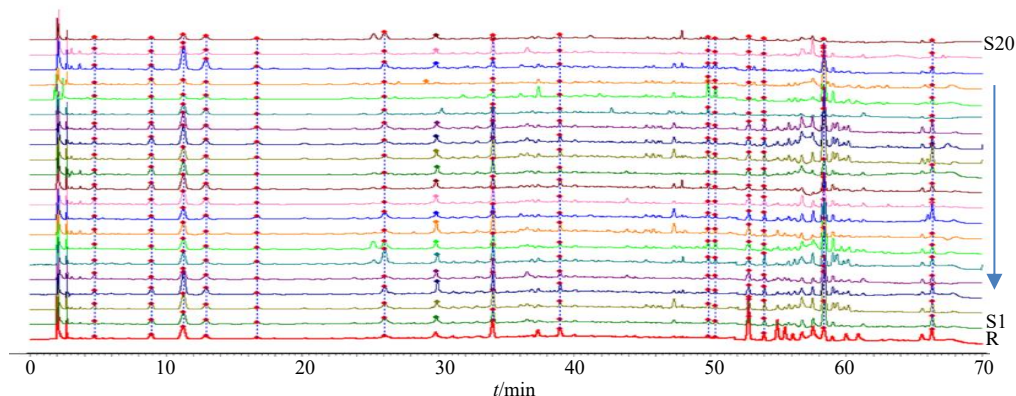


图 1 20 批白前样品 UPLC 叠加图谱 (S1~S20) 及对照药材图谱 (R)

Fig. 1 UPLC superimposed fingerprint (S1—S20) and reference traditional Chinese medicinal materials fingerprint (R) of 20 batches *C. stauntonii*

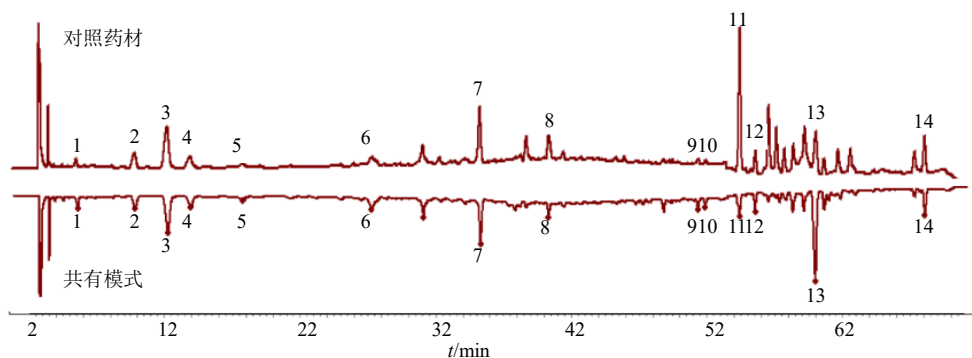
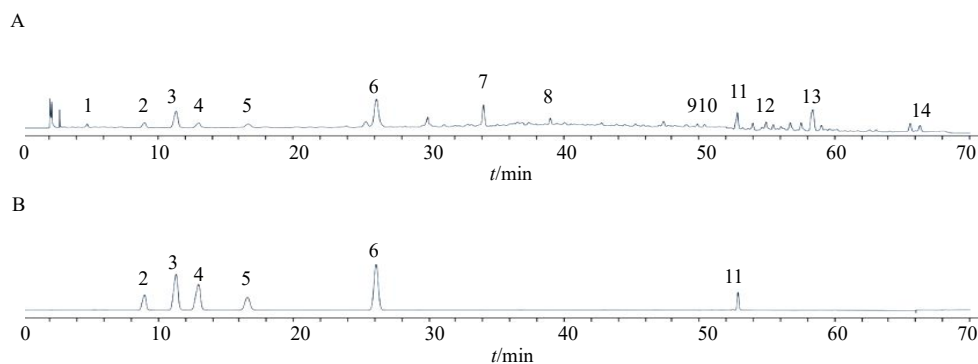


图 2 白前对照药材特征图谱及供试药材共有模式图

Fig. 2 Characteristic chromatogram of reference traditional Chinese medicinal materials and common model of tested traditional Chinese medicinal materials



2-对羟基苯甲酸; 3-香草酸; 4-丁香酸; 5-4-羟基苯乙酮; 6-2,4-二羟基苯乙酮; 11-A-O-DCDT。
2-*p*-hydroxybenzoic acid; 3-vanillic acid; 4-syringic acid; 5-4-hydroxyacetophenone; 6-2,4-dihydroxyacetophenone; 11- A-O-DCDT.

图3 供试品溶液 (A) 和混合对照品溶液 (B) UPLC 图谱

Fig. 3 UPLC sample (A) and chromatograms of mixed reference solution (B)

表2 20批白前样品指纹图谱相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation of fingerprints of 20 batches

<i>C. stauntonii</i>			
编号	相似度	编号	相似度
S1	0.992	S11	0.941
S2	0.990	S12	0.945
S3	0.962	S13	0.992
S4	0.985	S14	0.996
S5	0.959	S15	0.874
S6	0.949	S16	0.848
S7	0.962	S17	0.926
S8	0.971	S18	0.858
S9	0.955	S19	0.903
S10	0.925	S20	0.737

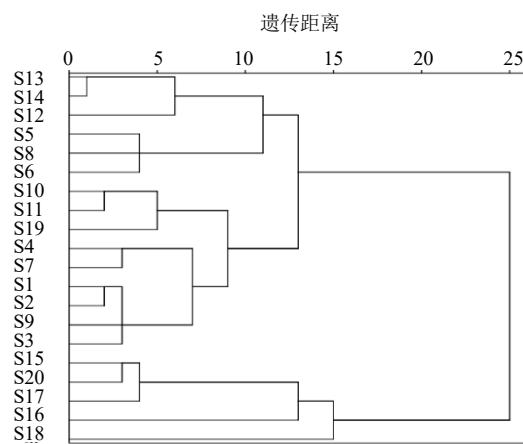


图4 20批白前样品聚类分析图

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis of 20 batches *C. stauntonii*

2.5 基于化学计量学的白前质量分析

2.5.1 聚类分析 (cluster analysis, CA) 采用 SPSS 26.0 软件, 以 14 个共有峰的峰面积为变量, 以平方欧式距离作为样品的测度, 采用组间联接法进行聚类分析, 结果见图 4。当类间距为 20 时, 20 批白前样品被分为 2 类, 其中 S1~S14 聚为一类, 为栽培白前; S15~S20 聚为一类, 为野生品。因此, 通过聚类分析可将野生与栽培白前进行区分。

2.5.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 采用 SIMCA 14.1 软件, 以 14 个共有峰的峰面积为变量进行 PCA, 模型 R^2_X 为 0.998, Q^2 为 0.608, 得分图及载荷图见图 5。20 批白前可分为 2 类, 与聚类分析结果一致。对主成分 1 的影响权重大小依次为峰 7 > 峰 12 > 峰 11 (A-O-DCDT) > 峰 8 > 峰 14, 对主成分 2 的影响权重大小依次为峰 9 > 峰 13 > 峰 3 (香草酸) > 峰 4

(丁香酸) > 峰 10。

2.5.3 正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 结合聚类分析与 PCA 结果, 以 14 个共有峰的峰面积为变量进行 OPLS-DA, 模型稳定性 R^2_Y 为 0.858, 模型解释率 R^2_X 为 0.561, 预测力 Q^2 为 0.53, 表明该模型具有较好的解释和预测率。对 OPLS-DA 模型进行置换检验 (200 次), 得置换检验图, 见图 6-A, OPLS-DA 模型的原始 R^2 和 Q^2 均大于左边随机排列后的 R^2 和 Q^2 , 表明建立的 OPLS-DA 模型无过度拟合现象。OPLS-DA 得分图见图 6-B。结果表明, 20 批白前样品分为 2 类, 以 $VIP > 1.0$ 为标准, 得到 5 个差异标志物, 分别为峰 12、7、11 (A-O-DCDT)、8、14, 提示这 5 个成分对区分野生与栽培白前的贡献较大, 见图 6-C。

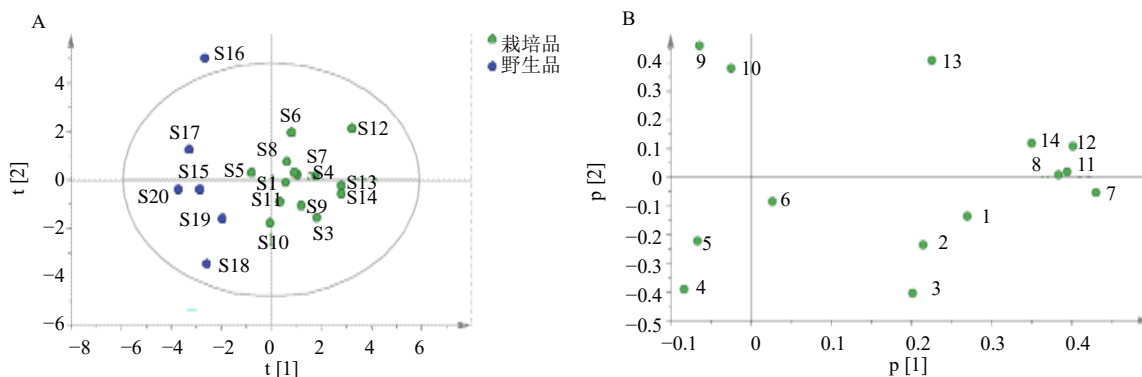


图 5 20 批白前样品 PCA 得分图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 5 PCA score diagram (A) and load diagram (B) of 20 batches *C. stauntonii*

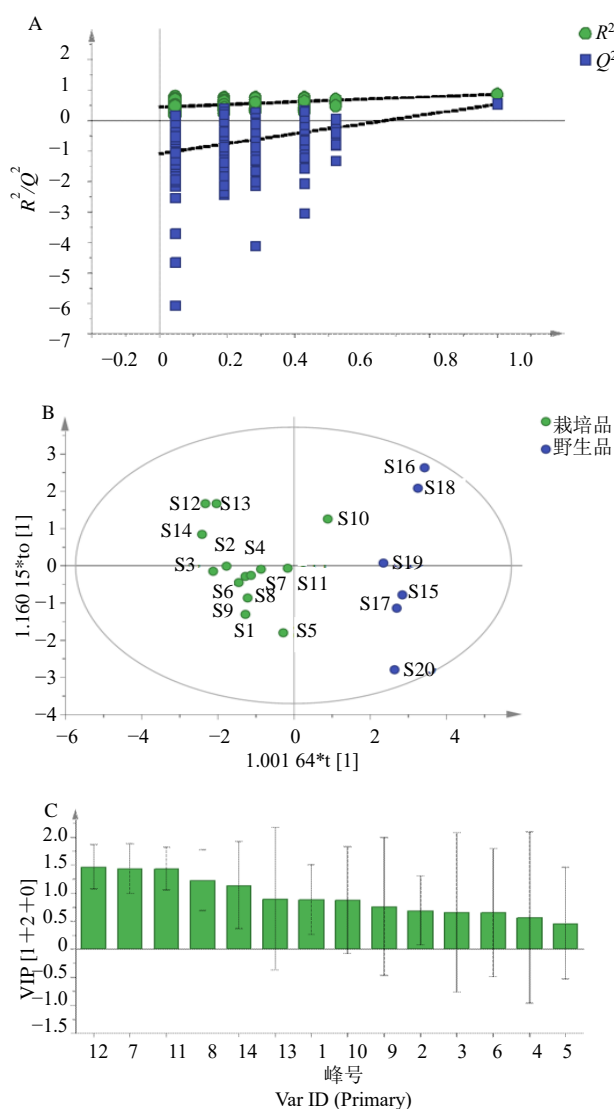


图 6 20 批白前样品 OPLS-DA 置换检验图 (A)、得分图 (B)、VIP 值图 (C)

Fig. 6 OPLS-DA permutation test diagram(A), score diagram(B),VIP value plot(C) of 20 batches *C. stauntonii*

2.6 多指标成分的含量测定

2.6.1 色谱条件 同“2.2”项。

2.6.2 系统适用性考察 按“2.3”项下方法制备供试品溶液，取“2.2”项下制备的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别进样分析，分析结果显示 6 种待测成分的色谱峰对称性良好，分离度均大于 1.5，且理论塔板数均不低于 8 000，见图 3。

2.6.3 线性关系考察及检测限、定量限的确定 分别吸取混合对照品溶液 7、25、50、200、400、800、1 000 μL 加甲醇稀释至 1 mL，按“2.1”项下色谱条件测定峰面积；以各对照品浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，各被测成分回归方程、线性范围、检测限、定量限见表 3。结果表明，6 个成分在测定范围内线性关系良好。

2.6.4 精密度试验 精密吸取“2.2”项下制备的混合对照品溶液 7 μL ，连续进样 6 次，记录峰面积。结果对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、A-O-DCDT 峰面积的 RSD 分别为 0.70%、0.75%、0.87%、0.69%、0.67%、1.12%，表明该仪器精密度良好。

2.6.5 重复性考察 取本品粉末 1.0 g (S2)，精密称定，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、A-O-DCDT 峰面积的 RSD 分别为 1.30%、0.39%、1.18%、0.33%、0.33%、1.58%，表明该方法重复性良好。

2.6.6 稳定性考察 取本品粉末 1.0 g (S2)，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液 1 份，按“2.1”项下色谱条件进样分析，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，测定并计算得到对羟基苯甲酸、香

表3 20批白前中6种指标成分的线性关系考察及检测限、定量限结果

Table 3 Linear relationship test and limit of detection and limit of quantitation results of six index components of 20 batches

C. stauntonii						
成分	回归方程	R ²	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	
对羟基苯甲酸	Y=88.675 X-4.749 6	0.999 6	0.000 5	0.001 9	0.15~20.68	
香草酸	Y=48.642 X-10.039	0.999 6	0.001 3	0.004 4	0.73~101.60	
丁香酸	Y=25.546 X-17.355	0.999 7	0.003 0	0.009 9	1.09~153.10	
4-羟基苯乙酮	Y=101.36 X-3.825 8	0.999 6	0.001 1	0.003 6	0.15~20.80	
2,4-二羟基苯乙酮	Y=88.049 X-8.150 1	0.999 6	0.001 1	0.003 6	0.51~71.20	
A-O-DCDT	Y=8.578 3 X-1.46	0.999 6	0.040 0	0.150 0	0.83~116.80	

草酸、丁香酸、4-羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、A-O-DCDT 峰面积的 RSD 分别为 0.29%、0.21%、1.18%、0.34%、0.29%、0.26%。

2.6.7 加样回收率考察 取本品粉末 0.5 g (S2), 精密称定, 平行 6 份, 分别精密加入与样品中含量相当的对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、A-O-DCDT 对照品溶液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 计算平均加样回收率及 RSD, 对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、

4-羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、A-O-DCDT 的回收率分别为 102.81%、98.80%、101.21%、102.33%、97.74%、101.54%, RSD 值分别为 1.68%、1.05%、0.97%、1.18%、0.58%、1.50%。

2.6.8 样品含量测定 取 20 批白前样品粉末, 按“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, 计算样品中 6 种指标成分的含量, 结果见表 4。对野生、栽培白前中 6 种指标成分的含量进行比较, 结果见图 7。结果表明, 14 批栽培

表4 20批白前样品中6种成分的含量测定结果 (x̄ ± s, n = 3)

Table 4 Content determination results of six components of 20 batches C. stauntonii (x̄ ± s, n = 3)

样品编号	质量分数/(μg·g ⁻¹)					
	对羟基苯甲酸	香草酸	丁香酸	4-羟基苯乙酮	2,4-二羟基苯乙酮	A-O-DCDT
S1	5.14±0.04	30.43±0.23	22.20±0.25	2.40±0.02	10.26±0.06	66.94±0.85
S2	5.81±0.11	33.28±0.32	22.34±0.18	1.56±0.00	8.20±0.03	21.78±0.33
S3	6.77±0.08	47.76±0.95	31.75±0.25	2.51±0.02	10.64±0.16	73.13±0.16
S4	2.45±0.03	25.65±0.25	20.47±0.36	1.51±0.01	4.76±0.01	73.15±0.60
S5	3.31±0.02	26.12±0.04	19.25±0.25	3.79±0.04	17.92±0.03	33.04±0.20
S6	3.50±0.03	26.42±0.35	16.22±0.12	2.18±0.01	11.76±0.00	69.70±0.34
S7	4.61±0.05	27.40±0.53	15.25±0.10	1.85±0.03	3.10±0.03	68.16±0.59
S8	3.76±0.05	28.26±0.43	20.67±0.31	3.77±0.07	10.92±0.15	68.99±0.30
S9	5.83±0.05	31.51±0.27	27.46±0.32	2.09±0.01	3.97±0.02	75.26±1.14
S10	7.13±0.01	36.60±0.06	31.39±0.30	2.15±0.02	3.11±0.05	35.98±0.15
S11	8.14±0.16	30.09±0.84	18.50±0.30	1.41±0.03	2.02±0.07	49.45±1.93
S12	4.68±0.01	27.73±0.34	16.66±0.32	2.15±0.05	4.89±0.10	61.09±4.31
S13	7.44±0.08	42.05±0.73	22.65±0.41	2.51±0.02	8.45±0.02	56.22±1.63
S14	7.50±0.03	40.32±0.16	22.11±0.26	2.86±0.08	11.71±0.37	52.41±7.52
S15	3.54±0.04	26.52±0.38	25.68±0.23	1.48±0.01	6.35±0.06	16.48±0.28
S16	3.19±0.06	12.05±0.26	19.18±0.15	1.74±0.03	2.74±0.02	19.95±0.36
S17	5.69±0.03	11.40±0.27	15.02±0.20	2.83±0.88	4.58±0.05	22.86±0.08
S18	5.36±0.07	57.65±0.98	56.23±0.92	5.23±0.12	10.38±0.02	21.35±0.26
S19	4.27±0.08	29.58±0.95	24.84±0.53	3.02±0.08	6.18±0.13	26.70±0.34
S20	2.24±0.01	13.30±0.04	19.31±0.00	1.99±0.01	10.16±0.02	25.38±0.11

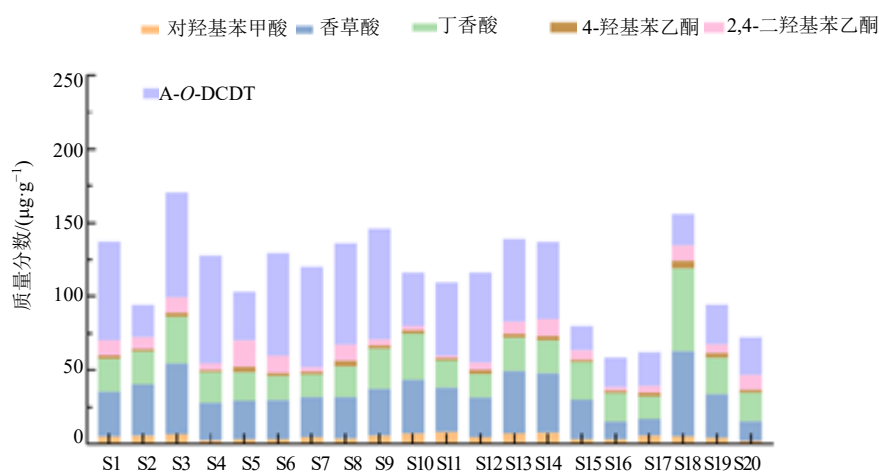


图 7 20 批白前样品中 6 种指标成分含量测定结果

Fig. 7 Content determination results of six index components of 20 batches *C. stauntonii*

白前样品中各成分含量稳定，A-O-DCDT 含量最高，其次为香草酸、丁香酸、对羟基苯甲酸和 2,4-二羟基苯乙酮，4-羟基苯乙酮含量最少，而 6 批野生白前中各成分含量较不稳定；栽培白前中大多数成分含量较高，野生白前中大多数成分含量较低，其中野生与栽培白前中 A-O-DCDT 含量差异显著，与 OPLS-DA 筛选出其为区分野生与栽培白前的差异性标志物之一的结果一致。

3 讨论

随着中药产业的快速发展，对药材的需求量也逐年攀升。赖以野生药材为原料的传统供应模式难以满足快速增长的中药工业和健康需求，由此推动了人工种植药材产业的发展。但中药材的种植长期以来缺乏专业的技术指导，在实际生产中往往存在管理过程不规范^[18]、采收初加工方法落后^[19]、质量标准缺乏等系列问题，导致药材质量和产量难以保障。而随着工业化城市的发展，野生药材生长环境遭到了破坏，土壤、水环境的污染^[20]及病虫害影响^[21]也极大的影响了药材的品质和安全。白前，作为市场上广泛使用的止咳药物主要成分，在湖北地区有着自然条件优越、区位优势明显和栽培历史悠久的优势，因此本研究以湖北道地药材白前为研究对象，从指纹图谱、化学成分、化学计量学等方面入手，建立白前栽培与野生品的系统质量评价方法，为白前产业可持续发展提供科学支撑。

中药中酚酸类成分（对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸）具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒的作用^[22]，

苯乙酮类成分具有利胆、改善血脂紊乱等药理作用^[23]，A-O-DCDT 具有抗炎活性^[24]，与白前泻肺降气、下痰止嗽的传统功效密切相关。因此本研究以对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、A-O-DCDT 作为白前质量评价指标具有一定的科学依据的。同时笔者在前人的研究基础上^[25-26]，系统优化了分析流程与影响因素，包括样品制备、流动相组成、洗脱梯度及检测条件等，结果显示：将样品加入水饱和乙酸乙酯静置 12 h 后超声处理 40 min，以乙腈-0.1% 磷酸水溶液体系得到的色谱峰峰形及分离度较好；将供试品溶液在波长 190~400 nm 内扫描，确定了可变波长的参数。采用 UPLC-DAD 双波长法首次建立了白前中 6 种化合物的含量测定方法，方法学验证结果表明该方法高效、准确、特征性强、重复性和稳定性好，为完善白前质量评价手段提供了技术支撑和科学依据。

中药指纹图谱能够全面、综合地反映中药的化学成分分布状况及其含量，从整体上评价中药的质量，具有特征性明显、信息量丰富、专属性强^[10]等优点。将 20 批药材与对照药材进行对照分析，得到白前中药特征指纹图谱以及相似度评价结果，可知栽培白前与对照药材间的相似度均高于 0.90，且其中 10 批样品相似度在 0.95 以上，白前栽培品特征峰化学成分基本一致，表明所采集栽培白前整体质量相对稳定；野生白前与对照药材间相似度差异较大，推断与其药材生长环境有关^[27]，且 S17、S19 相似度在 0.9 以上，与栽培白前相似度接近，数据结

果不足以将野生与栽培白前区分开,考虑后期加大样本量,以便更加全面的提取特征信息,对其进行整体的差异性分析。

继续采用 CA、PCA、OPLS-DA 等化学计量学方法充分挖掘区分野生与栽培白前的关键成分,CA 和 PCA 分析结果表明,野生与栽培白前基本可以区分开,OPLS-DA 分析共找到 5 个差异性标志物,并通过对照品指认出一种成分 A-O-DCDT。继续对白前中 6 种指标成分同时进行测定,结果表明,在栽培白前中 A-O-DCDT 含量最高,4-羟苯基乙酮含量最低,且各成分含量差异较小,各批次样品之间成分含量差异可能与土壤、气候、采收时间、耕作方式以及施肥技术^[28-29]等有关。实际生产中应对其产地、采收时间以及种植技术进行严格控制,从而确保白前整体质量的稳定性。而野生白前中各成分含量差异均较大;其中,A-O-DCDT 在野生与栽培白前中含量差异显著,含量差异 1~4 倍左右,造成差异性的原因可能与产地、环境、地理位置^[30]有关,同时与相似度、OPLS-DA 的结果一致,因此推测其可能为区分野生与栽培白前的关键成分。

综上,通过 UPLC 指纹图谱对白前主要化学成分进行宏观整体表征,较为全面的反映白前化学信息,同时采用化学模式识别技术对指纹图谱中提取共有峰进行整合分析,筛选了潜在的差异性标志物,为构建白前药材质量评价标准和资源开发利用提供技术参考;同时结合有效成分的含量信息对白前进行了质量评价,为湖北白前产业的健康、有序发展提供了科学指导。但在筛选的 5 个差异性标志物中,但仅指认出 1 种成分,因此有必要进一步对白前化学成分进行分离纯化,采用 LC-MS 等手段探究剩余 4 个峰所表征的物质,并对于更加全面的、客观评价白前的质量具有重要意义,同时药材质量是疗效的根本,其质量均质性的结论仍需结合药理学来综合评价。

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: 398.
 [2] 明·皇甫嵩,明·皇甫相著. 李玉清,向楠校注. 本草发明 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 102.
 [3] 明·缪希雍撰. 夏魁周,赵瑗校注. 神农本草经疏 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 140.
 [4] 柳伏雯,李睿,罗寅珠,等. 白前化学成分和药理活性

研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(8): 17-28.
 [5] 陈宏康,万美亮,刘国杜,等. 提高柳叶白前产量和质量探讨 [J]. 中国中药杂志, 1995(4): 204-207.
 [6] 孟祥才,邓代千,杜虹韦,等. 高品质道地药材的科学内涵 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 939-947.
 [7] 朱丽,武艳桃,叶欣,等. 顶空固相微萃取-气质联用技术分析白前及其炮制品挥发性成分 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(2): 152-156.
 [8] 田效民,李凤,黄顺菊,等. 柳叶白前挥发性成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 111-113.
 [9] 张玺雅,董征艳,王雅婷,等. 柳叶白前含量测定方法的建立及其不同蜜制品的渗透性评价研究 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(12): 2919-2922.
 [10] Zhan C J, Wang H, Wang Y. Quality evaluation of *Atractylodes Macrocephalae Rhizoma* through fingerprint qualitative analysis and quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 219: 114899.
 [11] 林源,陈静. 常用民族药植物中酚酸类化合物的提取、纯化及生物活性研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(9): 39-41.
 [12] 王琳,杨微,姚强,等. 香草酸对朊病毒感染细胞 PrP^{Sc} 沉积抑制和细胞保护作用研究 [J]. 病毒学报, 2022, 38(4): 896-904.
 [13] 杨铭,李欣,杨庆雄. “一测多评”法测定青阳参中 3 个苯乙酮类化合物的含量 [J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2018, 36(3): 40-45.
 [14] 管珂,黄莉莉,刘杰,等. HPLC 法同时测定民族药材青阳参中 6 种酚类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1447-1452.
 [15] 阙金花,黄鸣清,郑海音,等. 复方熊胆茵陈颗粒的保肝、降血脂、抗脂肪肝药理学研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(19): 1736-1740.
 [16] Lai C Z, Liu H B, Liu J X, et al. Hirundigenin type C₂₁ steroidal glycosides from *Cynanchum stauntonii* and their anti-inflammatory activity [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(64): 59257-59268.
 [17] 牛伟,瞿伟菁,曹群华,等. RP-HPLC 比较蒺藜全草和果实中的主要甾体皂苷元成分 [J]. 中成药, 2005, 27(4): 456-458.
 [18] 马新辉. 中药种植的现状与优化对策 [J]. 农业灾害研究, 2024, 14(4): 55-57.
 [19] 饶伟文,周文杰. 中药产地加工规范化研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(2): 106-109.
 [20] 毕礼明,陆曙,奉典旭. 对现代种植中药的认识与思考 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5261-5264.
 [21] 徐红梅. 中药材常见病虫害的防治策略分析 [J]. 农业

- 开发与装备, 2022(3): 229-231.
- [22] 林焜, 陈静. 常用民族药植物中酚酸类化合物的提取、纯化及生物活性研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(09): 39-41.
- [23] 张瑛, 贺兴冬, 季申, 等. 对羟基苯乙酮降血脂作用的研究 [J]. 世界临床药物, 2010, 31(10): 599-602.
- [24] 赖长志. 柳叶白前 C₂₁ 甾体苷类成分及其抗炎活性初步研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2016.
- [25] 黄平, 毛坤军, 周慧云, 等. 断节参的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(12): 2616-2619.
- [26] 姜誉弘, 刘史佳, 刘志辉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱分析不同炮制方式对九制白首乌化学成分的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(14): 1574-1580.
- [27] 郭兰萍, 周良云, 康传志, 等. 药用植物适应环境胁迫的策略及道地药材“拟境栽培” [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(9): 1969-1974.
- [28] 武孔云, 孙超. 中药材品质及提高中药材品质的途径 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1210-1215.
- [29] 李聪, 黄诗雨, 陈丽华, 等. 药材部位、产地及采收期对中药挥发油成分的差异性分析 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5395-5404.
- [30] 赵露颖, 施梦瑶, 张巧艳, 等. 道地药材品质特征及形成机制研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(21): 6931-6947.

[责任编辑 时圣明]