

不同等级白芷饮片 HPLC 指纹图谱

王佳琪¹, 江宇勤¹, 罗 婷¹, 张春玲¹, 李文兵^{2,3}, 余凌英^{1*}
(1. 成都中医药大学, 中药材标准化项目重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验
室培育基地, 四川 成都 611137; 2. 国家中医药管理局“中药配方颗粒治疗与疗效评价”重点实验室,
四川 成都 611900; 3. 四川新绿色药业科技发展有限公司, 四川 成都 611900)

摘要: **目的** 建立不同等级的白芷饮片行 HPLC 指纹图谱。**方法** 白芷饮片甲醇溶液的分析采用 Global
Chromatography C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-四氢呋喃-水, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min;
柱温 25 ℃; 检测波长 305 nm。**结果** 63 批样品指纹图谱中有 9 个共有峰。不同等级白芷饮片, 在化学成分上类
似, 但在其含有量上有一定差异。一等白芷饮片相似度 0.715~0.935; 二等白芷饮片相似度 0.717~0.929; 三等白
芷饮片相似度介于 0.716~0.928。**结论** 性状与化学成分相结合的等级标准, 可为饮片质量的一致性及临床应用提
供依据。

关键词: 白芷饮片; 等级; 指纹图谱; HPLC
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)12-2964-06
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.12.027

HPLC fingerprints of *Angelica dahurica* herbal slices of different grades

WANG Jia-qi¹, JIANG Yu-qin¹, LUO Ting¹, ZHANG Chun-ling¹, LI Wen-bing^{2,3},
YU Ling-ying^{1*}
(1. Research and Development of Chinese Medicine Resource System, State Key Laboratory Breeding Base, Ministry of Education, Key Laboratory of Chi-
nese Medicinal Materials Standardization Project, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Key Laboratory of
Chinese Medicine Formula Granule Treatment and Efficacy Evaluation, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611900, China;
3. Sichuan New Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Chengdu 611900, China)

KEY WORDS: *Angelica dahurica* herbal slices; grade; fingerprints; HPLC

白芷白芷为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. 或杭白芷 *A. dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根^[1]。味辛, 性温, 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。以条粗壮、体质量大、粉性足、香气浓郁者为佳。白芷饮片为类圆形的厚片, 切面白色或灰白色, 外表皮灰棕色或黄棕色, 具粉性, 皮部散有多数棕色油点, 气芳香^[1]。目前, 市场上白芷饮片等级规格划分不一且没有统一标准。大多采用产地及大小

颜色等经验进行划分。建立白芷饮片科学分级有利于市场的优质优价管理, 也有利于临床应用。而白芷饮片的等级规格标准除传统鉴别外, 还应结合其已知有效成分含有量高低对其等级规格进行综合评价, 建立不同等级白芷饮片的质量标准。指纹图谱具有整体性特点, 使得中药材由少数几个指标成分的分析发展成为对中药材的评价进行综合分析^[2-5]。前期指纹图谱研究各产地的药材具有较高的均一性^[6-9]。为真实反映其不同等级的饮片中的化学成分组成及含有量的差异, 寻找其变化规律, 现收集不同药材市场及企业白芷饮片并对其辨状论

收稿日期: 2018-12-11
基金项目: 国家标准化项目 (ZYBZH-Y-SC-4)
作者简介: 王佳琪 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药炮制学和中药新制剂新技术研究。Tel: 17828160135, E-mail: 1318501884@qq.com
* 通信作者: 余凌英 (1973—), 副教授, 研究生导师, 从事中药炮制学原理研究。E-mail: yuly26@163.com

质分为 3 个等级^[10]，建立不同等级白芷饮片的对照图谱，以期为建立等级标准及饮片质量的一致性和临床应用提供依据。

1 材料

Agilent1200 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；FA1204C 型电子分析天平（上海越平科学仪器有限公司）；Global Chromatography C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm；苏州环球色谱有限公司）。欧前胡素对照品（批号 110826-201616）、异欧前胡素对照品（批号 110827-201611）均购于中国食品药品检定研究院；氧化前胡素对照品（批号 Y26A6S2757）、佛手柑内酯对照品（批号 RF0224FA14）、水合氧化前胡素（批号 Y07M9H55367）均购于上海源叶生物科技有限公司，质量分数均达到 98% 以上。甲醇、四氢呋喃为色谱纯；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

从多家饮片厂家收集 23 批白芷饮片，依据传统经验鉴别分为 3 个等级共 63 批。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱分析

2.1.1 色谱条件 Global Chromatography C₁₈ 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相甲醇（A）-四氢呋喃（B）-水（C），梯度洗脱（0~10 min，32% A，8% B；10~55 min，53% A，12% B；55~60 min，32% A，8% B）；柱温 25℃；检测波长 305 nm；体积流量 1.0 mL/min；进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 分别精密称取欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素、佛手柑内酯、水合氧化前胡素适量，分别制成质量浓度为 325、55、380、63、73 μg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 取样品粉末（过 2 号筛）2 g，精密称定，置于 100 mL 锥形瓶中，精密加入 50 mL 甲醇。称定质量，超声（功率 300 W、频率 50 kHz）1 h，冷却后再次称定质量，用甲醇补足减失质量，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.2 指纹图谱建立

2.2.1 精密度试验 精密吸取同一份白芷饮片（样品 S1）供试品溶液 10 μL，在“2.1.1”项色谱条件下，连续进样 6 次，以欧前胡素为参照峰，得各共有峰相对峰面积、相对保留时间 RSD 分别<2%、<0.2%，表明仪器精密度良好。

2.2.2 重复性试验 精密称取白芷饮片（样品 S1）粉末 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶

液，在“2.1.1”项色谱条件下进样，以欧前胡素为参照峰，得各共有峰相对峰面积、相对保留时间 RSD 分别<2.9%、<0.2%，表明该方法重复性良好。

2.2.3 稳定性试验 精密吸取同一份白芷饮片（样品 S1）供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下，分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样，以欧前胡素为参照峰，得各共有峰相对峰面积、相对保留时间 RSD 分别<1.8%、<0.2%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3 对照图谱建立 将 63 批样品指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2.0 版）”分别生成对照图谱（R）及 R（一等），R（二等），R（三等）。将 63 批白芷饮片分别与各等级白芷饮片的对照图谱进行相似度评价，确定 9 个共有峰，见图 1~2。共指认出 5 种香豆素类成分^[11-12]，峰 2 为水合氧化前胡素，峰 4 为佛手柑内酯，峰 6 为氧化前胡素，峰 7 为欧前胡素，峰 8 为异欧前胡素。峰 7 含有量稳定，保留时间适中，且欧前胡素为中国药典对白芷饮片含有量测定的成分，故选择其作为参照峰（S），对照品色谱图见图 3。

21 批一等白芷饮片（样品 1~21）、21 批二等白芷饮片（样品 22~42）和 21 批三等白芷饮片（样品 43~63）相似度分别介于 0.715~0.935、0.717~0.929，除样品 32（0.692）、34（0.696）外、0.716~0.928 除样品 55（0.689），见表 1，表明除二等样品 32、34 与三等样品 55，白芷饮片等级无统一标准，在市场上较为混乱，在化学成分种类整体上有一定差异但随其等级变化较小，并无显著相关。

21 批一等白芷饮片（样品 1~21）与 R（一等）的相似度介于 0.816~0.995，与 R（二等）的相似度介于 0.602~0.910，与 R（三等）的相似度介于 0.708~0.947。表明一等与三等在整体化学成分组成及含有量有一定相似性，而与二等整体化学成分组成及含有量存在一定差异；21 批二等白芷饮片（样品 22~42）与 R（一等）的相似度介于 0.615~0.951，与 R（二等）的相似度介于 0.701~0.992，与 R（三等）的相似度介于 0.514~0.955。表明二等饮片整体化学成分组成及含有量差异相对较大，与其他等级饮片在化学成分组成及含有量上具有较大差异；21 批三等白芷饮片（样品 43~63）与 R（一等）的相似度介于

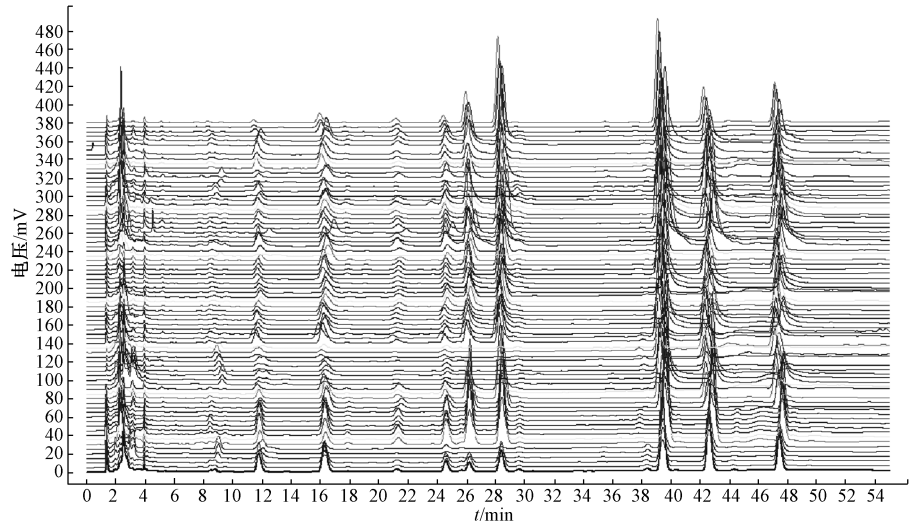


图 1 63 批样品 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprints of sixty-three batches of samples

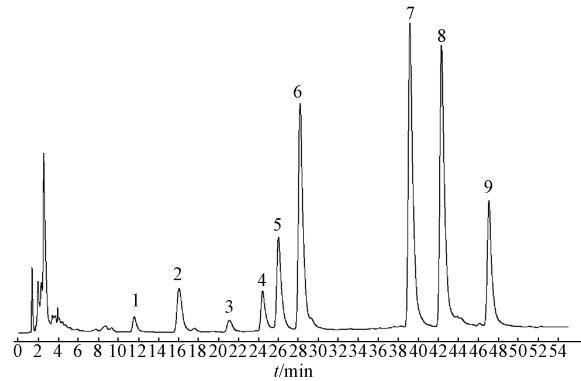
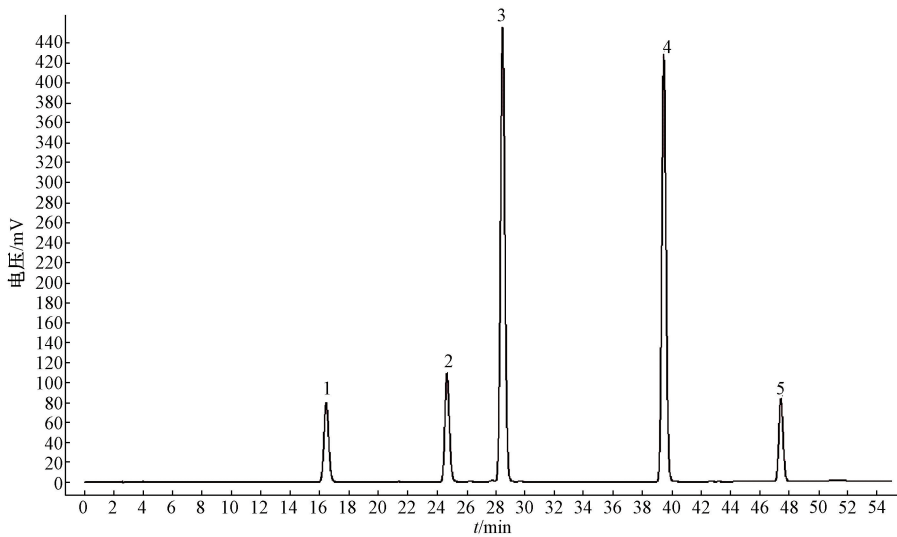


图 2 63 批样品对照图谱
Fig. 2 HPLC reference spectrum of sixty-three batches of samples



1. 水合氧化前胡素 2. 佛手柑内酯 3. 氧化前胡素 4. 欧前胡素 5. 异欧前胡素
1. hydration oxidation of prehornin 2. bergamot lactone 3. oxygenin 4. euglandin 5. isopropafenin

图 3 各成分 HPLC 色谱图
Fig. 3 HPLC chromatograms of various constituents

表 1 63 批样品相似度 (n=3)
Tab. 1 Similarities of sixty-three batches of samples (n=3)

编号	等级	产地	相似度			
			R1	R2	R3	R
1	一等	四川	0.936	0.824	0.876	0.848
2	一等	四川	0.864	0.730	0.783	0.730
3	一等	四川	0.968	0.920	0.927	0.928
4	一等	四川	0.970	0.888	0.907	0.897
5	一等	四川	0.969	0.879	0.936	0.919
6	一等	四川	0.971	0.892	0.901	0.784
7	一等	四川	0.862	0.724	0.905	0.750
8	一等	四川	0.816	0.791	0.768	0.630
9	一等	四川	0.669	0.670	0.934	0.935
10	一等	四川	0.886	0.920	0.918	0.715
11	一等	四川	0.972	0.655	0.913	0.926
12	一等	四川	0.863	0.900	0.947	0.908
13	一等	四川	0.995	0.903	0.924	0.742
14	一等	四川	0.991	0.694	0.935	0.893
15	一等	四川	0.884	0.894	0.924	0.932
16	一等	四川	0.938	0.890	0.892	0.741
17	一等	四川	0.961	0.674	0.869	0.896
18	一等	四川	0.848	0.880	0.895	0.912
19	一等	四川	0.937	0.910	0.874	0.903
20	一等	四川	0.991	0.602	0.865	0.897
21	一等	四川	0.992	0.866	0.941	0.899
22	二等	四川	0.868	0.832	0.874	0.851
23	二等	四川	0.728	0.737	0.617	0.741
24	二等	四川	0.895	0.909	0.900	0.911
25	二等	四川	0.951	0.920	0.955	0.929
26	二等	四川	0.933	0.897	0.935	0.887
27	二等	四川	0.792	0.707	0.793	0.762
28	二等	四川	0.799	0.701	0.643	0.736
29	二等	四川	0.703	0.727	0.912	0.914
30	二等	四川	0.642	0.744	0.613	0.717
31	二等	四川	0.918	0.919	0.939	0.914
32	二等	四川	0.610	0.768	0.932	0.913
33	二等	四川	0.935	0.895	0.368	0.692
34	二等	四川	0.927	0.907	0.587	0.911
35	二等	四川	0.666	0.792	0.899	0.696
36	二等	安徽	0.621	0.594	0.598	0.916
37	二等	安徽	0.909	0.890	0.937	0.738
38	二等	四川	0.696	0.763	0.529	0.699
39	二等	四川	0.932	0.992	0.514	0.876
40	二等	四川	0.687	0.749	0.536	0.693
41	二等	四川	0.634	0.898	0.898	0.841
42	二等	四川	0.615	0.779	0.799	0.711
43	三等	四川	0.875	0.827	0.905	0.847
44	三等	四川	0.752	0.588	0.798	0.755
45	三等	四川	0.887	0.869	0.918	0.900
46	三等	四川	0.933	0.906	0.961	0.912
47	三等	四川	0.930	0.909	0.932	0.926
48	三等	四川	0.704	0.623	0.941	0.771
49	三等	四川	0.714	0.615	0.751	0.669
50	三等	四川	0.797	0.579	0.724	0.716
51	三等	四川	0.715	0.806	0.953	0.820
52	三等	四川	0.707	0.785	0.846	0.884
53	三等	四川	0.938	0.797	0.997	0.896
54	三等	四川	0.766	0.906	0.958	0.915
55	三等	四川	0.939	0.604	0.960	0.689
56	三等	四川	0.934	0.858	0.950	0.914
57	三等	四川	0.776	0.834	0.955	0.928
58	三等	四川	0.908	0.528	0.946	0.878
59	三等	四川	0.907	0.842	0.956	0.926
60	三等	四川	0.914	0.893	0.937	0.915
61	三等	四川	0.924	0.879	0.929	0.907
62	三等	四川	0.762	0.861	0.947	0.898
63	三等	四川	0.901	0.974	0.948	0.900

0.704~0.939, 与 R (二等) 的相似度介于 0.579~0.974, 与 R (三等) 的相似度介于 0.724~0.997。表明三等与一等饮片在整体化学成分组成及含有量上相似性大于三等与二等饮片在整体化学成分组成及含有量的相似性。

2.4 主成分分析 采用 SPSS 21.0 统计软件对 63 批样品指纹图谱的 9 个共有峰峰面积进行主成分分析, 以特征值>1 为提取标准, 得到 1 个贡献率为 75.95% 的主成分, 以每个样本该主成分的得分绘制散点图, 见图 4。结果发现不同等级的白芷饮片变化范围较大, 相同等级的饮片难以和其他等级区分开, 表明白芷饮片传统性状等级高低与其化学成分含有量大小不一致, 饮片等级间差异模糊。

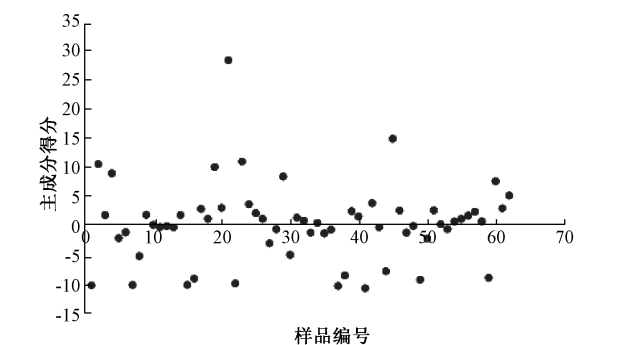


图 4 63 批样品主成分分析散点图

Fig. 4 Scatter diagram of principal component analysis of sixty-three batches of samples

为进一步阐明不同等级白芷饮片之间化学成分的差异, 利用 SPSS 21.0 对共有峰总峰面积与指认的 5 种香豆素类成分峰面积之和做折线图, 见图 5。用各等级共有峰面积百分比及 5 种香豆素峰面积做折线图, 见图 6。结果发现相同等级共有峰总面积和与 5 种香豆素类成分峰面积和波动相对较大, 而不同等级共有峰总面积和与 5 种香豆素类成分峰面积和波动相对较小, 5 种香豆素类成分峰面积和 9 个共有峰总峰面积变化趋势相同。表明其相同等级及整体上白芷饮片的化学成分含有量波动较大, 白芷饮片在市场上没有统一标准, 质量参差不齐; 不同等级间化学成分含有量波动较小, 表明按照其外在性状特征划分的白芷饮片在化学成分组成及含有量上的等级间差异不明显。

3 讨论

本研究收集不同饮片厂白芷饮片 23 批, 并根据其大小、颜色、气味等外在性状分为 3 个等级共 63 批。建立了不同等级白芷饮片的对照图谱, 并对其指纹图谱进行相似度评价, 发现各等级间指纹

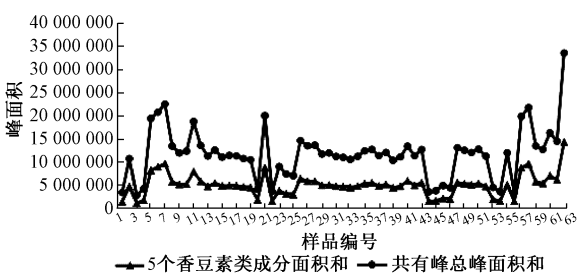


图 5 共有峰总面积和与各成分峰面积和的变化曲线

Fig. 5 Total area of the common peak and the variation curve with the sum of the peak areas of various constituents

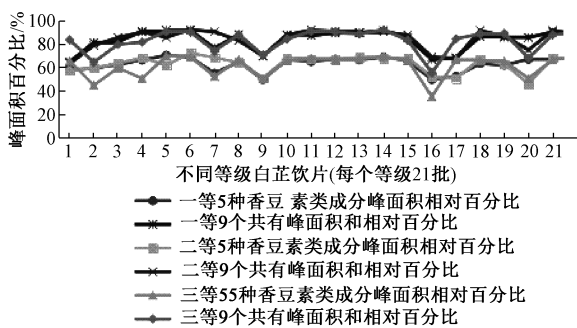


图 6 各等级共有峰面积百分比及各成分峰面积百分比变化曲线

Fig. 6 Percentage of peak area shared by each grade and the percentage change curve of peak area of various constituents

图谱相似度较为接近, 没有明显分级趋势, 指认出的 5 种香豆素类成分峰面积之和与共有峰总面积存在一定的相关性。

白芷饮片指纹图谱分析出的整体化学成分含有量及指认出的 5 种香豆素类成分含有量与传统等级均无显著相关, 白芷饮片传统性状等级高低与其化学成分含有量大小不一致。这一结果与前期研究一致^[13]。也可考虑与其根部解剖特征有关, 前期研究发现白芷的香豆素类成分主要存在于根皮部的分泌组织中, 根越细, 皮部所占比例越大^[14]且氧化前胡素含有量等受硫熏程度影响^[15], 其硫熏程度也会影响其化学成分含有量。

药材及饮片等级形成的原因繁多而复杂, 产地, 采收时间, 净选干燥切制, 炮制, 分选甚至人为掺假等都有可能形成不同的规格等级。中药饮片的规格等级与其有效成分含有量的多少的关系并不明确^[16-19]。如何将两者更好的结合为临床用药服务, 尚待研究。中药材又有农副产品属性, 单唯成分论与市场现状不符, 也不利于推广。遂白芷饮片

的分级还需加大不同产地不同市场的样本，结合其有效成分含有量测定，药效与市场需求等进行更进一步的研究。本研究从整体水平研究白芷饮片中与饮片等级划分相关的化学成分，后续将继续进行多指标成分测定以鉴别白芷饮片质量优劣，最终制定科学的白芷饮片等级标准。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：105-106.

[2] 孙国祥，闫 波，侯志飞，等. 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展[J]. 中南药学，2015，13(7)：673-681.

[3] 景晓琦，陈彤垚，张福生，等. 不同商品等级远志药材的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(24)：31-37.

[4] 郭慧清，李娅琦，王梓轩，等. 不同商品规格羌活药材的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(7)：184-188.

[5] 张藏蔓，卢敬光，谢启师，等. 基于 UHPLC-TOF-MS 技术建立金线莲的指纹图谱及金线莲苷的含量测定方法[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(1)：31-37.

[6] 雷 云，王 威，史 洋，等. 基于化学指纹图谱和多指标成分含量测定的白芷质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21(2)：36-39.

[7] 张超云，高 丽，刘建勇. 11 批次白芷药材的 HPLC 和 GC 指纹图谱实验研究[J]. 科学技术与工程，2018，18(3)：195-199.

[8] 郭丁丁，马逾英，吕 强，等. 不同产地白芷中欧前胡素含量及 HPLC 指纹图谱的对比研究[J]. 中药材，2010，33(1)：22-25.

[9] 吴晓毅，巢志茂，王 淳，等. HPLC 指纹图谱法评价白芷饮片质量的一致性[J]. 中国中医药信息杂志，2015，22(2)：74-78.

[10] 李京生，武 博，曹正青，等. 中药材商品规格的变迁[J]. 首都医药，2012，19(3)：41-42.

[11] 周 冰，刘 培，陈 京，等. 不同产地白芷药材中香豆素类及多糖类化学成分的分析评价[J]. 南京中医药大学学报，2015，31(1)：68-73.

[12] 史 洋，雷 云，许海玉，等. 白芷中 3 个主要活性成分含量测定及其质量评价研究[J]. 中国中药杂志，2015，40(5)：915-919.

[13] 马 俊，曹 赞，陈 玲，等. 基于 UPLC 及一测多评法测定不同等级白芷药材中 4 种香豆素类成分[J]. 中药材，2018，41(10)：2372-2376.

[14] 贾敏如. 川芎、白芷生产质量管理规范（GAP）的研究[M]. 成都：四川科技出版社，2007：121.

[15] 卢晓琳，马逾英，张福卓，等. 不同硫磺熏蒸程度白芷二氧化硫残留量与有效成分含量的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(9)：139-142.

[16] 蒋舜媛，孙洪兵，孙 辉，等. 羌活药材商品规格与质量等级的对应分析[J]. 中国中药杂志，2016，41(5)：793-801.

[17] 施学骄，陈 林，彭 成. 川芎不同商品规格化学成分比较研究[J]. 四川中医，2011，29(4)：58-61.

[18] 吴珊珊，胡 麟，龚晓猛，等. HPLC 法同时测定不同等级黄柏饮片中多指标成分的含量[J]. 中国药房，2016，27(15)：2135-2137.

[19] 吕非非，胡昌江，吴珊珊，等. 不同等级川芎饮片中藁本内酯和阿魏酸含量对比[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(20)：52-54.