

# 川芎饮片的HPLC指纹图谱建立、聚类分析及偏最小二乘判别分析<sup>Δ</sup>

石海培<sup>1\*</sup>, 包贝华<sup>1</sup>, 黄胜良<sup>2</sup>, 汪国强<sup>2</sup>, 左武朋<sup>2</sup>, 严辉<sup>1,3</sup>, 张丽<sup>1,3#</sup>(1.南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2.江苏融煜药业有限公司, 江苏淮安 223001; 3.江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 南京 210023)

中图分类号 R931.5; R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1066-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.11

**摘要** 目的:建立川芎饮片的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并进行聚类分析和偏最小二乘判别(PLS-DA)分析。方法:采用HPLC法,色谱柱为Waters Symmetry C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.5%醋酸水溶液(梯度洗脱),流速为1 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。以藁本内酯为参照,绘制21批样品(S1~S21)的HPLC图谱;采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 A版)进行相似度评价,确定共有峰;采用SPSS 19.0软件进行聚类分析,并结合PLS-DA分析区分样品。结果:21批样品的HPLC图谱有25个共有峰,并指认了其中9个共有峰;相似度为0.769~0.989,其中基地、传统药用部位样品(S1~S10)相似度均大于0.970。21批样品可聚为3类,S1~S10聚为一类,S15~S16、S19~S20聚为一类,其余聚为一类。PLS-DA分析确定了11个分类标志物,并指认了阿魏酸、阿魏酸松柏酯、正丁基苯酚、藁本内酯、洋川芎内酯A等5个色谱峰,这5个色谱峰可有效区分非市售、基地样品(S1~S10)与市售、非基地样品(S11~S21),与聚类分析结果一致。结论:所建指纹图谱、聚类分析及PLS-DA分析结果可为川芎饮片的质量评价提供参考。

**关键词** 川芎; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析; 偏最小二乘判别分析

## Establishment of HPLC Fingerprint, Cluster Analysis and PLS-DA of *Ligusticum chuanxiong* Decoction Pieces

SHI Haipei<sup>1</sup>, BAO Beihua<sup>1</sup>, HUANG Shengliang<sup>2</sup>, WANG Guoqiang<sup>2</sup>, ZUO Wupeng<sup>2</sup>, YAN Hui<sup>1,3</sup>, ZHANG Li<sup>1,3</sup>  
(1. School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China. 2. Jiangsu Rongyu Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Huai'an 223001, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing 210023, China)

- (NP) associated with polymeric forms of NP[J]. *Virology*, 2008. DOI:10.1186/1743-422X-5-37.
- [11] ROVITO HA, OBLONG JE. Nicotinamide preferentially protects glycolysis in dermal fibroblasts under oxidative stress conditions[J]. *Br J Dermatol*, 2013. DOI: 10.1111/bjd.12365.
- [12] LIN CC, YEN MH, LO TS, et al. Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activity of *Boehmeria nivea*, var. *nivea*, and *B. nivea*, var. *tenacissima*[J]. *J Ethnopharmacol*, 1998, 60(1): 9-17.
- [13] 关文达, 杨子峰, 刘妮, 等. 白藜芦醇对多种呼吸道病毒作用体外实验研究[J]. *中药材*, 2008, 31(9): 1388-1390.
- [14] NENCIONI L, DE CG, SGARBANTI R, et al. Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus: impact on virally induced apoptosis and viral replication[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(23): 16004-16015.
- [15] 张贤. 苎麻根黄酮类成分分离纯化及抗氧化活性研究[D]. 武汉: 武汉纺织大学, 2011.
- [16] 贺波. 苎麻叶黄酮的提取、分离纯化、结构及抗氧化活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [17] CHEN R, LIU Z, ZHAO J, et al. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*[J]. *Food Chem*, 2011, 127(2): 434-440.
- [18] BOULO S, AKARSU H, RUIGROK RW, et al. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes[J]. *Virus Res*, 2007, 124(1/2): 12-21.
- [19] 许本善, 雷宁, 吕亚丽, 等. 雪灵芝醇提物不同极性萃取部分的体外抗氧化活性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(2): 61-64.
- [20] 张彦, 郭增军, 张寒, 等. 八种植物挥发油的抗氧化活性比较研究[J]. *中国食品添加剂*, 2017(8): 49-54.

Δ 基金项目: 国家中药标准化项目(No.ZYBZH-C-JS-34); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(No.CARS-21)

\* 硕士研究生。研究方向: 中药炮制与质量控制。电话: 025-85811519。E-mail: 1161059084@qq.com

# 通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药炮制与质量控制。电话: 025-85811519。E-mail: zhangli@njucm.edu.cn

(收稿日期: 2018-03-01 修回日期: 2019-03-03)

(编辑: 段思怡)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprints of *Ligusticum chuanxiong* decoction pieces, and to conduct cluster analysis and PLS-DA analysis. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters Symmetry C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% acetic acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm, and the column temperature was 30 °C. The sample size was 10 μL. Using ligustilide as control, HPLC chromatograms of 21 batches of samples (S1-S20) were determined. The similarity evaluation was conducted by using *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM* (2012 edition) to determine common peak. Cluster analysis was conducted by using SPSS 19.0 software and PLS-DA was used to distinguish the samples. RESULTS: There were 25 common peaks in HPLC chromatograms for 21 batches of samples, and 9 common peaks were identified. The similarity of samples was between 0.768-0.989, and the similarity of base and traditional medicinal part samples (S1-S10) were more than 0.970. The 21 batches of samples were clustered into 3 categories, in which S1-S10 were category I; S15-S16, S19-S20 were category II; other were category III. By PLS-DA analysis, 11 classification markers were identified as well as 5 chromatogram peaks were identified, such as ferulic acid, pine cyperyl ferulate, *n*-butyl phthalide, ligustilide, ligustilide A, which could be used to distinguish base and non-marketed samples (S1-S10) from marketed and non-base samples (S11-S21), which were consistent with the results of cluster analysis. CONCLUSIONS: Established fingerprint, cluster analysis and PLS-DA analysis can provide reference for quality evaluation of *L. chuanxiong* decoction pieces.

**KEYWORDS** *Ligusticum chuanxiong*; HPLC; Fingerprint; Cluster analysis; PLS-DA

川芎为伞形科植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)的干燥根茎,原名芎藭<sup>[1]</sup>,主产于四川彭州、都江堰、什邡等地<sup>[2]</sup>。川芎辛温,具有活血行气、祛风止痛的功效<sup>[3]</sup>。有研究报道,川芎含有苯胺类<sup>[4-5]</sup>、有机酸类<sup>[5-6]</sup>、多糖类<sup>[5-7]</sup>、生物碱类<sup>[5-6]</sup>等成分,具有抗血小板聚集<sup>[2,8]</sup>、抗血栓形成<sup>[9]</sup>、止痛<sup>[7]</sup>等作用。

川芎作为新生化颗粒的重要原料,旨在活血行气、去除体内淤血,其饮片质量的稳定、优质与新生化颗粒的质量息息相关,故有必要对川芎饮片的质量进行全面、综合的评价。2015年版《中国药典》(一部)以水溶性成分阿魏酸的含量作为川芎质量控制的指标<sup>[3]</sup>。虽然也有学者对川芎中的多种成分同时进行了定量分析<sup>[10-11]</sup>,但仍无法全面地评价川芎饮片的质量。

中药指纹图谱具有整体性、相似性的特点,能突出中药的完整面貌,可依据相似度的特点实现对中药内在化学成分的综合评价和整体质量的全面控制<sup>[12]</sup>。近年来,已广泛用于药材饮片的质量评价<sup>[13-14]</sup>。为此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立了21批样品的指纹图谱,并采用聚类分析和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)对川芎饮片进行综合评价,同时结合模型变量投影(VIP)参数区分各批样品,以期为其质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

2695-2998型HPLC仪,包括四元高压溶剂管理系统、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、真空脱气机、Empower色谱工作站(美国Waters公司);MS-105DU型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);D3024型台式高速微量离心机(美国Scilogex公司);XFB-200型高速中药粉碎机(吉首市中诚制药机械厂);KH-500DB型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110773-201614,纯度:≥99%);绿原酸对照品(批号:Y24J7K16726,纯度:≥98%);阿魏酸松柏酯对照品(批号:Z02S8B42740,纯度:≥98%);洋川芎内酯A对照品(批号:P31AIF42747,纯度:≥98%)均由上海源叶生物科技有限公司提供;洋川芎内酯I对照品(批号:JBZ-1468,纯度:≥98%);洋川芎内酯H对照品(批号:JBZ-1467,纯度:≥98%);正丁基苯酚对照品(批号:JBZ-1641,纯度:≥98%);丁烯基苯酚对照品(批号:JBZ-0285,纯度:≥98%);藁本内酯对照品(批号:JBZ-0405,纯度:≥98%)均由南京金益柏生物技术有限公司提供;乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);冰乙酸(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);无水甲酸(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);水为超纯水。

### 1.3 药材

共收集21批样品,经南京中医药大学药学院严辉副教授鉴定为伞形科植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)的干燥根茎。样品来源见表1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%醋酸水溶液(B),梯度洗脱(0~25 min, 5% A→45% A; 25~35 min, 45% A→55% A; 35~45 min, 55% A; 45~55 min, 55% A→95% A; 55~60 min, 95% A; 60~65 min, 95% A→5% A);检测波长:254 nm;柱温:30 °C;流速:1 mL/min;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯I、洋川芎内酯H、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯A、正丁基苯酚、藁本内酯、丁烯基苯酚对照品适量,分别

表1 样品来源

Tab 1 Sample sources

编号	产地或来源	炮制加工来源	部位	采集时间
S1	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S2	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S3	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S4	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S5	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S6	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S7	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S8	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S9	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S10	四川省什邡市隐峰镇	非市售、基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S11	四川省什邡市隐峰镇	市售、非基地、非传统药用部位样品	川芎根	2017年6月
S12	四川省什邡市隐峰镇	市售、非基地、非传统药用部位样品	川芎根	2017年6月
S13	四川省什邡市隐峰镇	市售、非基地、非传统药用部位样品	川芎珠子	2017年6月
S14	四川省成都市荷花池药材专业市场	市售、非基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年9月
S15	安徽亳州药材市场	市售、非基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年9月
S16	安徽亳州药材市场	市售、非基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年9月
S17	四川省彭州市敖平镇	市售、非基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S18	四川省彭州市敖平镇	市售、非基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S19	四川省彭州市眉山镇	市售、非基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S20	四川省彭州市眉山镇	市售、非基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月
S21	四川省都江堰市	市售、非基地、传统药用部位样品	川芎根茎	2017年6月

置于10 mL棕色量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度,得单一对照品贮备液。取上述各单一对照品贮备液适量,置于同一10 mL棕色量瓶中,加乙腈定容至刻度,制成含绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯I、洋川芎内酯H、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯A、正丁基苯酞、藁本内酯、丁烯基苯酞质量浓度分别为48.60、45.60、47.60、36.50、53.30、55.73、202.70、591.20、32.10  $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(过三号筛)约0.5 g,精密称定,置于50 mL具塞锥形瓶中,加5%甲酸甲醇溶液25 mL,称定质量,超声(功率:250 w,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,用5%甲酸甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S9)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以藁本内酯峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,25个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.7% ( $n=6$ ),相对峰面积的RSD均小于4.2% ( $n=6$ ),表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S9)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以藁本内酯峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,25个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.1% ( $n=6$ ),相对峰面积的RSD均小于5.3% ( $n=6$ ),表明供试品溶液于室温下放置24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取样品粉末(编号:S9)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按

“2.1”项下色谱条件进样测定,以藁本内酯峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,25个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.1% ( $n=6$ ),相对峰面积的RSD均小于5.7% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.4 HPLC 指纹图谱的生成与相似度、共有峰相关分析

2.4.1 HPLC 指纹图谱的生成 取21批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 A版)对各批样品的HPLC指纹图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

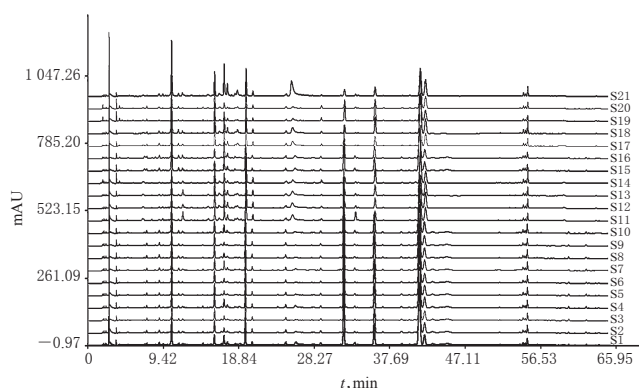


图1 21批样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superposed fingerprints of 21 batches of samples

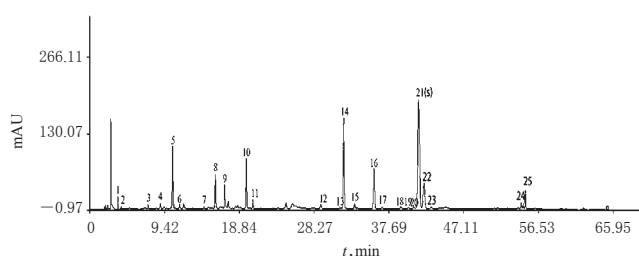


图2 样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprint of samples

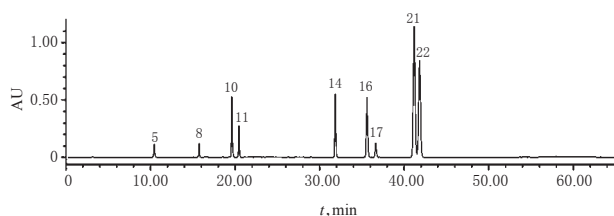
2.4.2 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 A版)对样品进行相似度分析,以传统药用部位18批样品(编号:S1~S10、S14~S21)为对照,进行整体相似度评价。结果显示,21批样品的相似度为0.769~0.989,其中市售、非基地、非传统药用部位样品(编号:S11~S13)相似度为0.848~0.872,表明其与非市售、基地、传统药用部位样品(编号:S1~S10)比较,两者的化学成分存在一定差异。编号为S21批样品相似度仅为0.769,主要为绿原酸、9号峰、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯A、藁本内酯峰的峰面积差异较大导致。18批样品(编号:S1~S10、S14~S21)中,除S17、S18、S21批样品相似度较低( $<0.90$ )外,其余15批样品相似度均大于0.90,表明部分市售、非基地、传统药用部位样品(编号:S14~S16、S19~S20)与非市售、基地、传统药用部位样品(编号:S1~S10)具有较好的相似性,详见表2。

表2 21批样品相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation results of 21 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.988	S12	0.872
S2	0.979	S13	0.861
S3	0.980	S14	0.916
S4	0.984	S15	0.989
S5	0.975	S16	0.984
S6	0.980	S17	0.894
S7	0.978	S18	0.883
S8	0.979	S19	0.972
S9	0.982	S20	0.943
S10	0.989	S21	0.769
S11	0.848		

2.4.3 共有峰的指认及相关分析 21批样品共有25个共有峰,通过与混合对照品溶液HPLC图(见图3)对比,指出5号峰为绿原酸、8号峰为阿魏酸、10号峰为洋川芎内酯I、11号峰为洋川芎内酯H、14号峰为阿魏酸松柏酯、16号峰为洋川芎内酯A、17号峰为正丁基苯酞、21号峰为藁本内酯、22号峰为丁烯基苯酞。由于藁本内酯峰(21号峰)信号强、峰形好,故以其保留时间和峰面积为参照,计算其他峰相对于藁本内酯峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表3~表6。



注:5.绿原酸;8.阿魏酸;10.洋川芎内酯I;11.洋川芎内酯H;14.阿魏酸松柏酯;16.洋川芎内酯A;17.正丁基苯酞;21.藁本内酯;22.丁烯基苯酞

Note: 5. chlorogenic acid; 8. ferulic acid; 10. senkyunolide I; 11. senkyunolide H; 14. coniferyl ferulate; 16. senkyunolide A; 17. butylphthalide; 21. ligustilide; 22. butylidenephthalide

图3 混合对照品的HPLC图

Fig 3 HPLC chromatograms of mixed control

表3 10批非市售、基地样品(S1~S10)HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of 10 batches of base and non-marketed samples(S1-S10)

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086
2	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096
3	0.178	0.178	0.178	0.178	0.178	0.178	0.178	0.178	0.178	0.178
4	0.216	0.216	0.216	0.215	0.216	0.216	0.216	0.216	0.216	0.216
5	0.253	0.253	0.253	0.253	0.253	0.253	0.253	0.253	0.253	0.253
6	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274
7	0.347	0.347	0.347	0.347	0.347	0.347	0.347	0.347	0.347	0.347
8	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382
9	0.411	0.411	0.411	0.411	0.411	0.411	0.411	0.411	0.411	0.411

续表3

Continued tab 3

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
10	0.475	0.475	0.475	0.475	0.475	0.475	0.475	0.475	0.475	0.475
11	0.496	0.496	0.496	0.496	0.496	0.495	0.496	0.496	0.496	0.496
12	0.702	0.702	0.702	0.702	0.702	0.702	0.702	0.702	0.703	0.702
13	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761
14	0.772	0.772	0.772	0.772	0.772	0.772	0.772	0.772	0.772	0.772
15	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805
16	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864
17	0.889	0.889	0.889	0.889	0.890	0.890	0.890	0.889	0.890	0.889
18	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946
19	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969
20	0.986	0.985	0.986	0.985	0.986	0.986	0.986	0.986	0.986	0.985
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016
23	1.040	1.040	1.039	1.040	1.039	1.040	1.039	1.039	1.040	1.040
24	1.312	1.312	1.312	1.312	1.312	1.312	1.312	1.313	1.313	1.313
25	1.325	1.325	1.325	1.325	1.326	1.325	1.326	1.326	1.326	1.326

表4 11批市售、非基地样品(S11~S21)HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 4 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of 11 batches of marketed and non-base samples(S11-S21)

峰号	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21
1	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086
2	0.095	0.096	0.096	0.095	0.096	0.096	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095
3	0.177	0.178	0.178	0.178	0.178	0.178	0.177	0.177	0.178	0.178	0.178
4	0.214	0.215	0.215	0.215	0.216	0.216	0.215	0.214	0.215	0.215	0.214
5	0.252	0.252	0.252	0.252	0.253	0.253	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252
6	0.272	0.273	0.272	0.273	0.274	0.274	0.272	0.272	0.273	0.272	0.273
7	0.347	0.347	0.347	0.347	0.347	0.347	0.346	0.347	0.347	0.346	0.347
8	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382
9	0.410	0.410	0.410	0.410	0.411	0.411	0.410	0.410	0.410	0.410	0.410
10	0.476	0.476	0.476	0.476	0.475	0.475	0.476	0.476	0.476	0.476	0.476
11	0.497	0.497	0.496	0.497	0.496	0.496	0.496	0.496	0.496	0.496	0.497
12	0.703	0.703	0.703	0.703	0.702	0.702	0.703	0.703	0.703	0.703	0.703
13	0.761	0.762	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761	0.761	0.762
14	0.771	0.772	0.772	0.772	0.772	0.772	0.772	0.772	0.773	0.772	0.772
15	0.805	0.806	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805	0.805
16	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864	0.864
17	0.889	0.889	0.889	0.889	0.889	0.889	0.889	0.889	0.890	0.890	0.889
18	0.945	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946	0.946
19	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969
20	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.986	0.985	0.985	0.986	0.985	0.985
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016
23	1.035	1.036	1.035	1.036	1.040	1.039	1.036	1.036	1.036	1.036	1.036
24	1.310	1.310	1.310	1.310	1.312	1.313	1.310	1.310	1.310	1.310	1.310
25	1.323	1.323	1.323	1.323	1.326	1.326	1.323	1.323	1.323	1.323	1.323

2.5 聚类分析

以各共有峰的绝对峰面积为指标,采用SPSS 19.0软件,结合平均连接法以欧氏距离为测度进行聚类分析,详见图4。由图4可知,21批样品可聚为3类:S1~S10聚为一类,S15~S16、S19~S20聚为一类,其余聚为一类。S15~S16、S19~S20批样品与10批非市售、基地、传统药用部位样品(编号:S1~S10)距离接近,与相

表5 10批非市售、基地样品(S1~S10) HPLC图谱共有峰的相对峰面积

Tab 5 Relative peak are of common peaks in HPLC chromatograms of 10 batches of base and non-marketed samples(S1-S10)

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.016	0.015	0.016	0.015	0.014	0.017	0.014	0.016	0.019	0.015
2	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.007	0.005	0.006	0.008	0.006
3	0.014	0.016	0.016	0.014	0.015	0.017	0.015	0.016	0.017	0.018
4	0.024	0.021	0.022	0.022	0.020	0.024	0.020	0.024	0.025	0.024
5	0.223	0.132	0.142	0.165	0.131	0.158	0.181	0.163	0.141	0.203
6	0.019	0.013	0.014	0.016	0.013	0.016	0.015	0.017	0.015	0.019
7	0.011	0.007	0.007	0.010	0.006	0.007	0.008	0.006	0.005	0.006
8	0.082	0.083	0.080	0.091	0.074	0.086	0.076	0.081	0.092	0.090
9	0.079	0.040	0.035	0.066	0.032	0.039	0.063	0.040	0.029	0.070
10	0.134	0.136	0.129	0.132	0.124	0.136	0.114	0.129	0.149	0.159
11	0.025	0.025	0.024	0.025	0.023	0.025	0.022	0.024	0.028	0.029
12	0.019	0.016	0.015	0.014	0.015	0.015	0.015	0.015	0.016	0.018
13	0.009	0.009	0.008	0.009	0.009	0.009	0.008	0.009	0.010	0.009
14	0.577	0.599	0.578	0.589	0.622	0.619	0.644	0.621	0.590	0.581
15	0.029	0.015	0.016	0.018	0.017	0.014	0.023	0.016	0.016	0.026
16	0.266	0.267	0.269	0.274	0.281	0.283	0.273	0.279	0.276	0.240
17	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.012	0.011	0.011	0.012	0.013
18	0.019	0.018	0.017	0.018	0.018	0.017	0.018	0.017	0.017	0.016
19	0.013	0.011	0.011	0.012	0.011	0.012	0.012	0.012	0.012	0.014
20	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.016	0.017	0.017	0.016
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	0.177	0.159	0.156	0.167	0.153	0.161	0.152	0.158	0.172	0.190
23	0.035	0.032	0.033	0.031	0.029	0.033	0.029	0.030	0.033	0.033
24	0.021	0.022	0.023	0.022	0.022	0.022	0.025	0.022	0.022	0.029
25	0.049	0.051	0.050	0.051	0.051	0.051	0.051	0.052	0.050	0.062

似度评价结果基本一致。

## 2.6 PLS-DA分析

对21批样品进行PLS-DA分析,以25个共有峰的峰面积(X)为自变量、样品(Y)为因变量,绘制PLS-DA模型得分图,详见图5。由图5可知,非市售、基地、传统药用部位样品(编号:S1~S10)集中分布在模型得分图的左侧,其余样品(编号:S11~S21)零散分布在右侧;S15~S16、S19~S20聚为一类,与非市售、基地、传统药用部位样品(编号:S1~S10)距离较近,该结果与聚类分析、相似度评价结果基本一致。PLS-DA模型中变量的解释度( $R^2Y$ )=0.930,模型的预测度( $Q^2$ )=0.869,均接近1,表明所建模型可靠。进一步对模型变量投影(VIP)进行分析,筛选影响样品分类的变量色谱峰,以VIP>1为筛选标准,共得到贡献相对较大的11个变量色谱峰,依次为14号峰(阿魏酸松柏酯, VIP=1.563)、17号峰(正丁基苯酐, VIP=1.533)、21号峰(藁本内酯, VIP=1.516)、16号峰(洋川芎内酯A, VIP=1.468)、18号峰(VIP=1.453)、23号峰(VIP=1.453)、20号峰(VIP=1.316)、3号峰(VIP=1.231)、19号峰(VIP=1.187)、9号峰(VIP=1.055)、8号峰(阿魏酸, VIP=1.032),详见图6。

表6 11批市售、非基地样品(S11~S21) HPLC图谱共有峰的相对峰面积

Tab 6 Relative peak are of common peaks in HPLC chromatograms of 11 batches of marketed and non-base samples(S11-S21)

峰号	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21
1	0.047	0.023	0.044	0.056	0.026	0.044	0.029	0.017	0.041	0.044	0.024
2	0.011	0.006	0.018	0.021	0.011	0.023	0.012	0.004	0.024	0.025	0.005
3	0.004	0.005	0.007	0.007	0.018	0.018	0.023	0.018	0.016	0.025	0.013
4	0.037	0.032	0.041	0.022	0.033	0.036	0.060	0.044	0.013	0.025	0.064
5	0.464	0.331	0.406	0.188	0.358	0.386	0.622	0.781	0.179	0.305	0.940
6	0.038	0.031	0.039	0.018	0.031	0.043	0.048	0.053	0.014	0.027	0.056
7	0.009	0.012	0.012	0.010	0.009	0.006	0.015	0.017	0.016	0.019	0.013
8	0.293	0.342	0.381	0.223	0.097	0.121	0.310	0.299	0.206	0.236	0.383
9	0.354	0.272	0.306	0.153	0.154	0.119	0.225	0.201	0.109	0.073	0.571
10	0.675	0.591	0.655	0.419	0.138	0.111	0.319	0.252	0.181	0.225	0.444
11	0.153	0.114	0.129	0.080	0.028	0.020	0.062	0.050	0.032	0.041	0.084
12	0.044	0.037	0.037	0.053	0.019	0.030	0.034	0.030	0.040	0.041	0.022
13	0.033	0.027	0.032	0.013	0.006	0.003	0.011	0.011	0.004	0.004	0.012
14	0.212	0.174	0.196	0.124	0.462	0.473	0.080	0.131	0.291	0.134	0.167
15	0.277	0.066	0.062	0.027	0.037	0.015	0.020	0.018	0.016	0.021	0.039
16	0.322	0.290	0.365	0.322	0.217	0.405	0.227	0.295	0.381	0.172	0.231
17	0.021	0.018	0.021	0.014	0.010	0.016	0.010	0.010	0.015	0.010	0.013
18	0.015	0.015	0.018	0.016	0.021	0.020	0.016	0.016	0.018	0.017	0.019
19	0.039	0.028	0.032	0.018	0.016	0.013	0.017	0.016	0.013	0.014	0.024
20	0.035	0.030	0.042	0.032	0.016	0.025	0.021	0.021	0.021	0.022	0.021
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	0.655	0.646	0.684	0.383	0.200	0.146	0.411	0.376	0.275	0.314	0.623
23	0.010	0.010	0.012	0.009	0.039	0.033	0.006	0.008	0.005	0.005	0.011
24	0.056	0.059	0.071	0.055	0.029	0.023	0.043	0.051	0.027	0.031	0.056
25	0.156	0.156	0.184	0.152	0.060	0.049	0.103	0.124	0.063	0.068	0.144

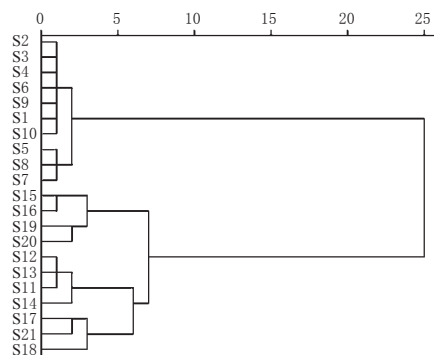


图4 21批样品聚类分析树状图

Fig 4 Cluster analysis dendrogram of 21 batches of samples

## 2.7 分类标志物相对峰面积比值分析

以变量色谱峰作为分类标志物,得到11个分类标志物,其中14号峰(阿魏酸松柏酯, VIP=1.563)VIP值最大。进一步比较非市售、基地、传统药用部位样品(编号:S1~S10),市售、非基地、非传统药用部位样品(编号:S11~S13),市售、非基地、传统药用部位样品(编号:S14~S21)中16号峰(洋川芎内酯A)与14号峰的相对峰面积比值,分别为 $0.450 \pm 0.018$ 、 $1.685 \pm 0.172$ 、 $1.625 \pm 0.848$ ;17号峰(正丁基苯酐)与14号峰的相对峰面积比值分别为 $0.019 \pm 0.002$ 、 $0.103 \pm 0.005$ 、 $0.072 \pm$

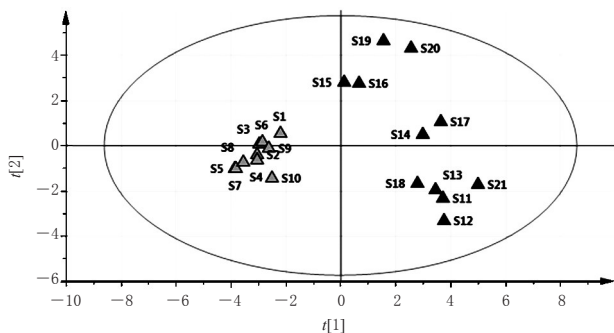


图5 21批样品 PLS-DA 模型得分图

Fig 5 PLS-DA score plot of 21 batches of samples

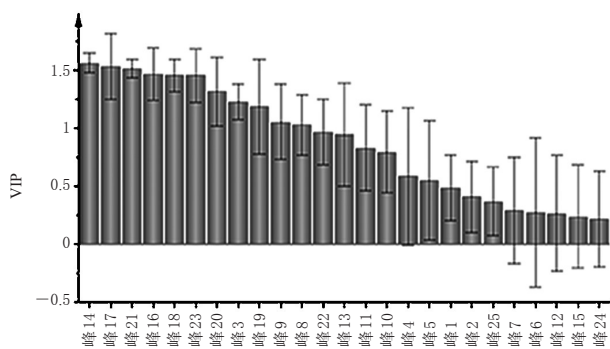


图6 PLS-DA 模型中各共有峰的VIP值

Fig 6 VIP value of common peaks in PLS-DA model

0.036;21号峰(藁本内酯)与14号峰相对峰面积比值分别为  $1.663 \pm 0.062$ 、 $5.195 \pm 0.529$ 、 $6.177 \pm 3.544$ 。这提示,分类标志物的相对峰面积比值可进一步明显区分非市售、基地、传统药用部位样品(编号:S1~S10)与市售、非基地、非传统药用部位样品(编号:S11~S13)及市售、非基地、传统药用部位样品(编号:S14~S21)。

### 3 讨论

本研究建立的HPLC指纹图谱能较好地反映川芎饮片的整体特征,并指出9个共有峰,分别为绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯I、洋川芎内酯H、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯A、正丁基苯酞、藁本内酯、丁烯基苯酞。

笔者在前期试验中,将供试品溶液于全波长(190~400 nm)扫描,发现在254、280 nm波长下色谱图基线较平稳,色谱峰数目相当,但在280 nm波长下参照峰(藁本内酯峰)响应较高,故选择254 nm为检测波长。笔者参考相关文献<sup>[15]</sup>,发现阿魏酸松柏酯峰在乙腈、5%甲酸甲醇溶液中相对稳定,故以此为提取溶剂进行考察;同时又比较了不同超声时间(30、45、60 min)、不同色谱柱(Waters Symmetry C<sub>18</sub>、Hanbon Sci & Tech)对色谱行为的影响,结果以Waters Symmetry C<sub>18</sub>为色谱柱、5%甲酸甲醇溶液为提取溶剂、超声处理30 min时,色谱峰峰形较好、色谱峰数目相对较多。

相似度评价、聚类分析、PLS-DA分析结果显示,市售、非基地、传统药用部位样品(编号:S15~S16、S19~

S20)的相似度与非市售、基地、传统药用部位样品(编号:S1~S10)较为接近。VIP分析得到11个分类标志物,通过与混合对照品比对,指认了阿魏酸、阿魏酸松柏酯、正丁基苯酞、藁本内酯、洋川芎内酯A等5个色谱峰,这5个色谱峰可有效区分非市售、基地样品与市售、非基地样品;而对于其他未明确的成分,仍有待后续研究进一步探讨。

### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,2009:5164.
- [2] 梅超南,曾瑾,张了云,等.不同产地川芎对家兔血小板聚集、小鼠凝血功能及血瘀大鼠血液流变性的品质评价研究[J].中药药理与临床,2014,30(2):110-112.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:40-41.
- [4] CHANG XL,JIANG ZY,MA YB,et al. Two new compounds from the roots of Ligusticum chuanxiong[J]. *J Asian Nat Prod Res*,2009,11(9):805-810.
- [5] CHEN ZJ,ZHANG C,GAO F,et al. A systematic review on the rhizome of Ligusticum chuanxiong Hort. (Chuanxiong) [J]. *Food Chem Toxicol*,2018. DOI: 10.1016/j.fct.2018.02.050.
- [6] LI WX,TANG YP,CHEN YY,et al. Advances in the Chemical Analysis and Biological Activities of Chuanxiong[J]. *Molecules*,2012,17(9):10614-10651.
- [7] 韩炜.川芎的化学成分与药理作用研究进展[J].中国现代中药,2017,19(9):1341-1349.
- [8] 张丽娟,刘继勇,姚翀,等.洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展[J].中国药理学杂志,2015,50(13):1081-1084.
- [9] 赵润英,郝伟,孟祥军,等.阿魏酸川芎嗪抗血栓形成作用及其对血小板中性粒细胞黏附的影响[J].中国医科大学学报,2012,41(10):900-903,925.
- [10] 梁乙川,郭换,刘素娟,等.一测多评法测定川芎中7种成分含量[J].中药材,2018,41(1):140-143.
- [11] 王娣,刘玉红,刘云华,等.川芎药材及饮片质量标准提升研究[J].亚太传统医药,2017,13(5):34-38.
- [12] 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.
- [13] 高微,陈明生,韦广辉,等.尖尾风药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析[J].中国药房,2018,29(16):2215-2219.
- [14] 黎理,曾祥燕,谢凤凤,等.竹节蓼药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析[J].中国药房,2018,29(12):1640-1643.
- [15] 马云桐,徐世军,廖海浪,等. HPLC同时测定川芎、当归SFE-CO<sub>2</sub>萃取物中7种成分含量及阿魏酸松柏酯稳定性考察[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(9):24-29.

(收稿日期:2018-10-17 修回日期:2019-02-22)

(编辑:陈宏)