

怀牛膝饮片的质量标准及指纹图谱研究[△]

王小燕^{1*}, 常军民^{1#}, 郭常润², 陈丽²(1.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2.中国药科大学中药学院, 南京 211198)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)24-3000-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.24.09

摘要 目的:建立怀牛膝饮片的质量评价标准并建立不同产地饮片的指纹图谱。方法:采用薄层色谱法(TLC)鉴别怀牛膝饮片;按2015年版《中国药典》(四部)方法检查怀牛膝饮片的水分、总灰分、醇溶性浸出物的含量;采用紫外分光光度法测定总甾酮的含量;采用高效液相色谱法(HPLC)测定 β -蜕皮甾酮的含量;采用HPLC法建立10批怀牛膝饮片的指纹图谱,以 β -蜕皮甾酮(10号峰)为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行相似度评价,确定共有峰;采用SPSS 21.0软件进行聚类分析、主成分分析以评价怀牛膝饮片的综合质量。结果:TLC鉴别结果显示,在供试品色谱中,与 β -蜕皮甾酮、人参皂苷Ro对照品色谱相应位置上有相同颜色的斑点。10批怀牛膝饮片的平均水分含量为4.07%~6.33%,总灰分含量为5.04%~6.43%,醇溶性浸出物含量为6.57%~11.12%。总甾酮(以 β -蜕皮甾酮计)、 β -蜕皮甾酮检测质量浓度的线性范围分别为0.01~0.08、68.5~479.5 $\mu\text{g/mL}$ (R^2 均大于0.999),精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%,平均加样回收率分别为98.85% (RSD=1.89%, $n=6$)、100.34% (RSD=2.12%, $n=9$),平均含量分别为0.34%~0.56%、0.07%~0.09%。10批怀牛膝饮片共有24个共有峰,相似度均大于0.900。聚类分析结果显示,10批怀牛膝饮片可聚为4类,其中S1、S3、S6、S10为一类,S2、S7、S8为一类,S4、S9为一类,S5为一类。主成分分析结果显示,前4个主成分因子的累积方差贡献率为86.774%。综合质量高低依次为S8>S5>S9>S4>S3>S7>S6>S10>S2>S1。结论:所建质量标准、含量测定方法和HPLC指纹图谱稳定、准确性好,可用于全面评价怀牛膝饮片的质量。
关键词 怀牛膝饮片;薄层色谱法;高效液相色谱法;含量测定;指纹图谱;聚类分析;主成分分析

Study on the Quality Standard and Fingerprint of *Achyranthes bidentata* Decoction Pieces

WANG Xiaoyan¹, CHANG Junmin¹, GUO Changrun², CHEN Li² (1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. College of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: The establish the quality standard of *Achyranthes bidentata* decoction pieces and establish the fingerprint of decoction pieces of different origins. METHODS: TLC method was used to identify *A. bidentata* decoction pieces. The contents of water, total ash and ethanol-soluble extract in *A. bidentata* decoction pieces were determined according to the method in 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (part IV). UV spectrophotometry was used to determine the content of total steroid. The content of β -ecdysterone in *A. bidentata* decoction pieces was determined by HPLC. HPLC method was used to establish the fingerprint of 10 batches of *A. bidentata* decoction pieces. Using β -ecdysterone (No. 10 peak) as reference, similarity evaluation was conducted by using *Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprints* (2012 edition), and the common peaks were determined. SPSS 21.0 software was used for cluster analysis and principal component analysis so as to evaluate the comprehensive quality of *A. bidentata* decoction pieces. RESULTS: Results of TLC identification showed that the spots with the same color on the corresponding positions of β -ecdysterone and ginsenoside Ro control in chromatogram of test sample. The average water content of 10 batches of *A. bidentata* decoction pieces was 4.07% -6.33%. The total ash content was 5.04% -6.43%. The ethanol-soluble extract was 6.57% -11.12%. The linear range of total sterone (by β -ecdysterone) and β -ecdysterone were 0.01-0.08 mg/mL and 68.5-479.5 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2>0.999$), respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 3%. The average recovery rates were 98.85% (RSD=1.89%, $n=6$) and 100.34% (RSD=2.12%, $n=9$), respectively. The average contents were 0.34%-0.56% and 0.07%-0.09%, respectively. There were 24 common peaks in 10 batches of *A. bidentata* decoction pieces, and the similarity was all over 0.900. Cluster analysis results showed that 10 batches of *A. bidentata* decoction pieces could be grouped into 4 categories, among which S1, S3, S6 and S10 were one category, S2, S7 and S8 were one category, S4 and S9 were one category, and S5 was one category. The results of principal component analysis showed that the cumulative variance contribution rate of the first four principal components was 86.774%. The order of comprehensive quality is S8>S5>S9>S4>S3>S7>S6>S10>S2>S1. CONCLUSIONS: The established quality standard, content determination method and HPLC fingerprint are stable and accurate, and can be used for the quality evaluation of *A.*

bidentata decoction pieces.

KEYWORDS *Achyranthes bidentata* decoction pieces; TLC; HPLC; Content determination; Fingerprint; Cluster analysis; Principal component analysis

[△] 基金项目:国家科技部重点研发计划(No.2018YFC1707105)

* 硕士研究生。研究方向:中药质量控制。E-mail:995354085@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:天然药物分析。E-mail:1617265908@qq.com

牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根,其性平,味苦、甘、酸,具有逐瘀通经、补肝肾、强筋骨、利尿通淋、引血下行的功效,常用于治疗经闭、痛经、腰膝酸痛、筋骨无力等^[1]。牛膝主产于我国河南、河北、山东、山西、内蒙、安徽等地,其中河南焦作的武陟、温县、博爱、沁阳以及新乡的辉县等地所种植的牛膝又被称为怀牛膝^[2],已成为道地药材品种“四大怀药”之一^[3]。有研究发现,怀牛膝除含有皂苷类、甾酮类、多糖类等主要化学成分外,还含有少量生物碱类、黄酮类成分^[4]。甾酮类成分具有促进骨质增生、调节糖代谢、抗脂质过氧化等作用^[5];β-蜕皮甾酮作为该药材主要的甾酮类成分之一,具有抑制破骨细胞分化、促成骨样细胞增殖活性,促进蛋白质的合成,抑制由药物引起的血糖升高和降胆固醇的作用,与牛膝“补肝肾、强筋骨”功效相吻合^[6-7]。

中药饮片是指基于中医药理论,依据药物效用、应用方式,对药材进行炮制处理,使其变成具备一定规格及形状的成品^[8]。目前,关于怀牛膝质量控制的研究主要集中于原药材的含量测定和指纹图谱研究方面^[7,9-10],关于饮片质量评价的研究较少;加之中药饮片的质量检测基本上还沿袭传统的饮片检测标准,其检验方法相对简单,仅通过外观、气味、口尝等方式检测,无法实现对中药饮片有效成分及整体质量的评价^[11]。指纹图谱是目前中药饮片质量控制的有效手段,可全面反映中药饮片炮制前后的变化,能有效控制中药饮片的质量,具有特征性和整体性^[11]。目前,关于怀牛膝饮片质量标准的研究较少且不全面,仇立志^[12]仅探讨了硫磺熏蒸对怀牛膝饮片质量的影响;王博等^[13]虽然采用高效液相色谱(HPLC)指纹图谱技术对不同厂家怀牛膝饮片进行了质量评价,但缺乏详细的分析,信息量有限。为此,本研究采用薄层鉴别法(TLC)对怀牛膝饮片进行鉴别,按2015年版《中国药典》(四部)方法对其水分、总灰分、醇溶性浸出物等进行考察;采用紫外分光光度法(UV)测定总甾酮含量,采用HPLC法测定β-蜕皮甾酮含量;同时建立怀牛膝饮片的指纹图谱,并进行聚类分析和主成分分析,旨在为怀牛膝饮片的质量标准完善和总体质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1800 PC型UV计(上海菁华科技仪器有限公司);1260型HPLC仪,包括G1312C型双元泵、G1329B型检测器、G1316A型柱温箱、G1315D型进样器(美国Agilent公司);QE-300型万能粉碎机(浙江屹立工贸有限公司);DZF-6020型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);BSA124S型电子天平[赛多利斯科技仪器(北京)有限公司];SX2型箱式电阻炉(上海博讯实业有限公

司);KQ-250E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);硅胶G薄层板(粒径:10~40 μm;青岛海洋化工有限公司);D101型大孔吸附树脂[粒径范围:(0.3~1.25) mm ≥95%;蚌埠市天星树脂有限责任公司]。

1.2 药品与试剂

β-蜕皮甾酮对照品(南京森贝伽生物科技有限公司,批号:111903-201805,纯度:≥98%);人参皂苷Ro对照品(南京森贝伽生物科技有限公司,批号:111638-201907,纯度:≥98%);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。10批怀牛膝饮片(编号:S1~S10),经中国药科大学中药学院杨中林教授鉴定为苋科植物牛膝 *A. bidentata* Bl. 的干燥根(去芦头后润软,切3 mm厚片,低温烘干^[10])后,将样品粉碎,过40目筛,粉末密封于自封袋中,置于干燥器内保存于中国药科大学中药学院)。样品信息来源见表1。

表1 样品信息来源

Tab 1 Sample information source

编号	品名	产地	规格	批号	生产厂家
S1	怀牛膝	河南博爱县	头肥	190712	先声再康江苏药业有限公司
S2	怀牛膝	河南沁阳县	段	190724	浙江景岳堂药业有限公司
S3	怀牛膝	河南武陟县	统段	190701	安徽佳凯药业股份有限公司
S4	怀牛膝	河南武陟县	统段	190501	安徽佳凯药业股份有限公司
S5	怀牛膝	河南武陟县	统段	190712	亳州市永刚饮片厂有限公司
S6	怀牛膝	河南焦作县	统	190119	河北金草药业有限公司
S7	怀牛膝	河南温县	段	190123	安徽省六安市绿丰中药材有限公司
S8	怀牛膝	河南沁阳县	段	191112	六品叶商贸有限公司
S9	怀牛膝	河南博爱县	统段	191115	蚌埠市栢晟商贸有限公司
S10	怀牛膝	河南温县	统段	191101	吉林省品茸堂商贸有限公司

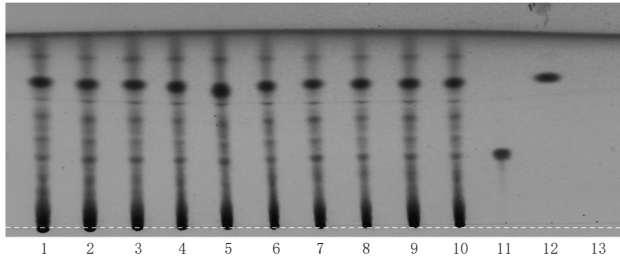
2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

取各批样品粉末约4 g,加入80%甲醇50 mL,超声(功率:300 W,频率:40 kHz,下同)提取2次,每次30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水15 mL,微热(30 ℃)使溶解,过D101型大孔吸附树脂柱(内径:1.5 cm,柱高:15 cm),依次用水100 mL、20%乙醇100 mL、80%乙醇100 mL洗脱,收集80%乙醇洗脱液,蒸干,残渣加80%甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。取β-蜕皮甾酮对照品、人参皂苷Ro对照品适量,加甲醇分别制成每1 mL含1 mg的单一对照品溶液;以甲醇作为阴性对照溶液。按2015年版《中国药典》(四部)通则“0502薄层色谱法”^[14-15],吸取供试品溶液、对照品溶液和阴性对照溶液各4 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水-甲酸(7:3:0.5:0.05, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,于105 ℃加热至斑点显色清晰。结果,在供试品色谱中,与β-蜕皮甾酮、人参皂苷Ro对照品色谱相应位置上有相同颜色的斑点且阴性对照无干扰,详见图1。

2.2 水分、总灰分、醇溶性浸出物的含量测定

水分、总灰分和醇溶性浸出物的测定分别按2015年



注:1~10.饮片样品(S1~S10);11.人参皂苷Ro对照品;12.β-蜕皮甾酮对照品;13.阴性对照

Note:1-10. samples (S1-S10);11. ginsenoside Ro control;12. β-ecdysterone control;13. negative control

图1 薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms

版《中国药典》(四部)通则“0832水分测定法烘干法”“2302灰分测定法”“2201醇溶性浸出物测定法”(以水饱和的正丁醇作溶剂)^[15]测定,每批样品平行测定3次,取平均值。结果,水分含量为4.07%~6.33%,平均值为5.27%;总灰分含量为5.04%~6.43%,平均值为5.63%;醇溶性浸出物含量为6.57%~11.12%,平均值为8.78%,详见表2。

表2 10批怀牛膝饮片的水分、总灰分、醇溶性浸出物含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of moisture, total ash and ethanol-soluble extract in 10 batches of *A. bidentata* decoction pieces (n=3)

编号	水分,%	总灰分,%	醇溶性浸出物,%
S1	6.17	5.63	11.12
S2	5.50	5.28	8.95
S3	4.07	6.43	7.64
S4	4.27	6.42	7.69
S5	6.33	5.31	7.34
S6	6.00	5.85	8.81
S7	4.83	5.04	8.35
S8	4.33	5.13	6.57
S9	5.50	5.63	10.27
S10	5.66	5.53	11.04
平均值	5.27	5.63	8.78

2.3 总甾酮的含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 取样品粉末约1g,精密称定,置于具塞三角瓶中,加80%乙醇50mL,超声提取2次,每次1h,滤过,收集滤液,水浴(65℃)加热浓缩至无醇味,过D101型大孔吸附树脂柱(内径:1.2cm,柱高:10cm),依次用水50mL、5%乙醇30mL、80%乙醇50mL洗脱,收集80%乙醇洗脱液,蒸干,残渣用甲醇稀释并定容至25mL,即得^[7]。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取β-蜕皮甾酮对照品5.01mg,置于10mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,制得质量浓度为0.501mg/mL的对照品溶液。

2.3.3 检测波长的确定 取上述供试品溶液(编号:S4)、对照品溶液各0.2mL,分别置于5mL量瓶中,加甲

醇稀释至刻度,混匀;另取甲醇为空白对照溶液。分别于200~400nm波长范围内进行全波长扫描。结果,对照品溶液与供试品溶液均在243nm波长处有最大吸收,故选择243nm为检测波长(图略)。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取“2.3.2”项下对照品溶液0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.45、0.55、0.60、0.65、0.70、0.80mL,分别置于5mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀,于243nm波长处测定吸光度。以质量浓度(X,mg/mL)为横坐标、吸光度(Y)为纵坐标进行线性回归。结果,β-蜕皮甾酮的回归方程为 $Y=25.74X-0.036$ ($R^2=0.9992$),表明β-蜕皮甾酮检测质量浓度的线性范围为0.01~0.08mg/mL。

2.3.5 精密密度试验 取“2.3.1”项下供试品溶液(编号:S4)适量,于243nm波长处连续测定吸光度6次。结果,β-蜕皮甾酮吸光度的RSD为0.57%(n=6),表明方法精密密度良好。

2.3.6 重复性试验 取样品(编号:S4)粉末,约1g,共6份,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,于243nm波长处测定吸光度并按标准曲线法计算样品含量。结果,β-蜕皮甾酮含量的RSD为0.02%(n=6),表明方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取供试品溶液(编号:S4)适量,分别于室温下放置0、1、2、3、4、5h时于243nm波长处测定吸光度。结果,β-蜕皮甾酮吸光度的RSD为0.55%(n=6),表明供试品溶液于室温下放置5h内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取已知含量的样品(编号:S4)粉末,约0.5g,共6份,置于具塞锥形瓶中,加入0.572mg/mL对照品溶液(精密称取β-蜕皮甾酮对照品5.72mg,按“2.3.2”项下方法制得)4.2mL,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,于243nm波长处测定吸光度并计算加样回收率。结果,总甾酮的平均加样回收率为98.85%(RSD=1.89%,n=6)。

2.3.9 样品含量测定 取10批样品粉末适量,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,取2mL,置于5mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀,于243nm波长处测定吸光度并按标准曲线法计算样品含量。每样品平行测定3次。结果,10批样品中总甾酮的平均含量(以β-蜕皮甾酮计)分别为0.50%、0.37%、0.56%、0.34%、0.38%、0.50%、0.34%、0.47%、0.41%、0.52%。

2.4 β-蜕皮甾酮的含量测定

2.4.1 供试品溶液的制备 取样品粉末约1g,精密称定,置于具塞三角瓶中,加入水饱和的正丁醇40mL,密塞,称定质量,浸泡过夜,超声处理45min,冷却至室温,再次称定质量,用水饱和的正丁醇补足缺失的质量,滤过,用甲醇10mL分数次洗涤容器及残渣,合并滤液和洗液,蒸干,残渣加甲醇溶解,移至5mL量瓶中,加甲醇定容,混匀,即得^[11]。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取 β -蜕皮甾酮对照品2.74 mg,置于2 mL量瓶中,用甲醇定容,混匀,制得质量浓度为1.37 mg/mL的对照品溶液。

2.4.3 色谱条件 色谱柱:Inertsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~13 min, 5% A→23% A;13~20 min, 23% A→25% A;20~26 min, 25% A→26% A;26~37 min, 26% A→50% A;37~52 min, 50% A→73% A;52~54 min, 73% A→87% A;54~60 min, 87% A→95% A;60~65 min, 95% A);检测波长:225 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.4.4 系统适用性试验 取供试品溶液、对照品溶液和空白溶液(甲醇)各适量,按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果, β -蜕皮甾酮的理论板数大于6 000,与邻峰基线分离,分离度大于1.5,且空白溶液对测定无干扰(图略)。

2.4.5 线性关系考察 精密量取“2.4.2”项下对照品溶液0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35 mL,置于1 mL量瓶中,加甲醇定容,混匀,按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以 β -蜕皮甾酮质量浓度(X , μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果, β -蜕皮甾酮的回归方程为 $Y=17.12X-310.9(R^2=0.999 0)$,表明 β -蜕皮甾酮检测质量浓度的线性范围为68.5~479.5 μ g/mL。

2.4.6 精密度试验 取“2.4.1”项下供试品溶液(编号:S10)适量,按“2.4.3”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果, β -蜕皮甾酮峰面积的RSD为1.00% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.4.7 重复性试验 取样品(编号:S10)粉末,约1 g,共6份,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果, β -蜕皮甾酮含量的RSD为0.87% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4.8 稳定性试验 取“2.4.1”项下供试品溶液(编号:S10)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, β -蜕皮甾酮峰面积的RSD为0.83% ($n=7$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4.9 加样回收率试验 取已知含量的样品(编号:S10)粉末,约1 g,共9份,精密称定,按已知量的50%、100%、150%加入“2.4.2”项下对照品溶液适量,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果, β -蜕皮甾酮的平均加样回收率为100.34% (RSD=2.12%, $n=9$)。

2.4.10 β -蜕皮甾酮的含量测定 取10批样品粉末适量,约1 g,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量,平行测定3次。结果,10批样品中 β -蜕皮甾酮的平均含量分别为0.07%、0.07%、0.08%、

0.08%、0.08%、0.08%、0.08%、0.09%、0.08%、0.07%。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 供试品溶液的制备 同“2.4.1”项。

2.5.2 色谱条件 同“2.4.3”项。

2.5.3 精密度试验 取“2.5.1”项下供试品溶液(编号:S4),按“2.5.2”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。以 β -蜕皮甾酮(10号峰)为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,24个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.5.4 重复性试验 精密称取样品(编号:S4)粉末,约1 g,共6份,按“2.5.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.2”项下色谱条件进样测定,以 β -蜕皮甾酮为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,24个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取“2.5.1”项下供试品溶液(编号:S4),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.5.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以 β -蜕皮甾酮为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,24个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3% ($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.5.6 指纹图谱的生成 取10批样品粉末,按“2.5.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.2”项下色谱条件进样测定,将所得图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,以S1为参照图谱(S1样品中各色峰分离度良好且对应峰面积稳定),采用中位数法,设定时间窗宽度为0.1,进行多点校正和标记峰(Mark峰)匹配^[13],得到HPLC叠加指纹图谱、对照指纹图谱、对照品溶液的HPLC图,详见图2~图4。结果,10批样品共有共有峰24个。

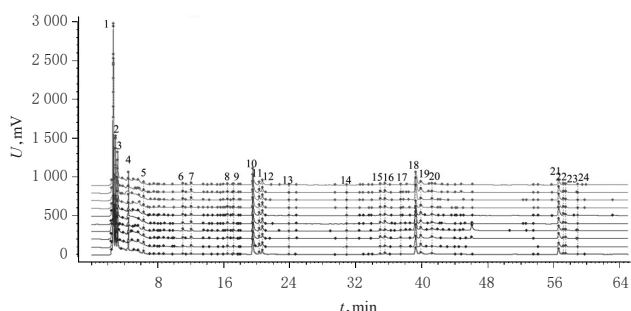


图2 10批怀牛膝饮片样品的HPLC叠加指纹图谱
Fig 2 HPLC superposition fingerprint of 10 batches of *A. bidentata* decoction pieces

2.5.7 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)》对10批样品进行相似度评价。结果,10批样品的相似度分别为0.995、0.991、0.987、0.979、0.969、0.997、0.983、0.975、0.998、0.990,表明10批样品与对照指纹图谱的相似度较高,总体化学成分差异较小。

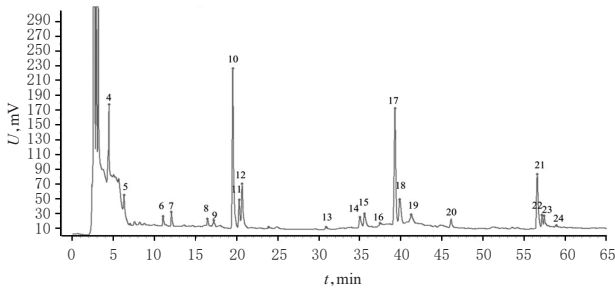


图3 怀牛膝样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 3 HPLC fingerprint of *A. bidentata* decoction pieces

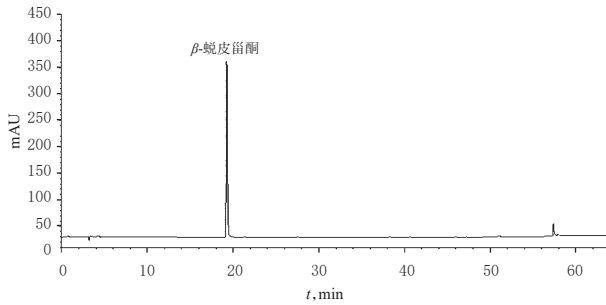


图4 对照品的HPLC图

Fig 4 HPLC chromatogram of substance control

2.5.8 共有峰的指认 本研究前期试验结果显示,怀牛膝饮片中 β -蜕皮甾酮含量较高,且出峰稳定,分离度较好,故以其为参照(s),计算其余各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。通过与对照品保留时间(图4)对比,指认10号峰为 β -蜕皮甾酮。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表3、表4。

表3 10批怀牛膝饮片样品共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peak of 10 batches of *A. bidentata* decoction pieces

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
1	0.136	0.137	0.134	0.134	0.133	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.66
2	0.150	0.150	0.148	0.116	0.148	0.149	0.149	0.149	0.149	0.149	7.13
3	0.163	0.164	0.163	0.162	0.161	0.163	0.163	0.162	0.163	0.163	0.40
4	0.230	0.231	0.229	0.228	0.228	0.229	0.230	0.230	0.229	0.230	0.40
5	0.326	0.324	0.320	0.326	0.318	0.324	0.325	0.317	0.326	0.324	1.05
6	0.566	0.566	0.564	0.565	0.570	0.566	0.568	0.566	0.567	0.566	0.29
7	0.617	0.618	0.616	0.618	0.622	0.623	0.619	0.618	0.619	0.618	0.35
8	0.843	0.844	0.841	0.840	0.842	0.843	0.843	0.843	0.843	0.843	0.15
9	0.883	0.884	0.881	0.880	0.880	0.882	0.882	0.882	0.882	0.883	0.13
10(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
11	1.040	1.039	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	0.03
12	1.058	1.058	1.059	1.059	1.058	1.058	1.059	1.058	1.059	1.059	0.05
13	1.222	1.222	1.225	1.225	1.224	1.225	1.224	1.224	1.226	1.222	0.12
14	1.580	1.584	1.583	1.578	1.579	1.582	1.584	1.584	1.583	1.581	0.14
15	1.795	1.810	1.792	1.781	1.781	1.788	1.791	1.792	1.789	1.793	0.44
16	1.824	1.840	1.821	1.810	1.809	1.817	1.819	1.821	1.821	1.821	0.47
17	1.931	1.950	1.925	1.906	1.900	1.907	1.910	1.913	1.909	1.927	0.79
18	2.016	2.036	2.013	1.995	1.999	2.006	2.008	2.014	2.003	2.011	0.56
19	2.043	2.072	2.046	2.024	2.031	2.037	2.038	2.044	2.027	2.037	0.66
20	2.119	2.145	2.114	2.097	2.096	2.106	2.107	2.111	2.109	2.115	0.65
21	2.910	2.923	2.892	2.874	2.873	2.889	2.895	2.899	2.896	2.904	0.53
22	2.940	2.953	2.922	2.903	2.902	2.918	2.924	2.929	2.926	2.934	0.53
23	2.957	2.964	2.934	2.916	2.916	2.933	2.940	2.944	2.942	2.951	0.53
24	3.033	3.041	3.009	2.984	2.992	3.009	3.016	3.021	3.018	3.019	0.56

表4 10批怀牛膝饮片样品共有峰的相对峰面积

Tab 4 Relative peak area of common peak of 10 batches of *A. bidentata* decoction pieces

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
1	5.286	4.712	6.094	8.506	5.081	4.729	3.410	3.552	6.129	5.421	27.42
2	1.588	1.588	1.560	2.081	1.404	1.522	1.368	1.292	1.831	1.526	14.64
3	1.707	0.652	0.744	0.557	1.642	1.368	1.495	1.629	1.263	1.941	37.39
4	1.288	1.000	1.000	1.588	3.120	1.211	1.103	1.732	1.666	1.404	41.30
5	0.361	0.584	0.514	0.398	0.484	0.321	0.276	0.416	0.254	0.280	28.66
6	0.041	0.059	0.032	0.161	0.092	0.048	0.045	0.056	0.064	0.061	56.77
7	0.036	0.066	0.075	0.109	0.095	0.046	0.040	0.093	0.101	0.092	35.83
8	0.050	0.076	0.071	0.055	0.079	0.052	0.055	0.063	0.058	0.056	16.97
9	0.043	0.079	0.058	0.051	0.057	0.044	0.052	0.060	0.048	0.051	18.79
10(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
11	0.160	0.180	0.166	0.177	0.168	0.166	0.164	0.165	0.165	0.166	3.76
12	0.331	0.322	0.298	0.316	0.308	0.316	0.312	0.309	0.317	0.338	3.63
13	0.011	0.017	0.029	0.031	0.033	0.014	0.012	0.017	0.014	0.020	41.63
14	0.013	0.022	0.029	0.043	0.024	0.018	0.022	0.020	0.025	0.021	33.67
15	0.077	0.081	0.201	0.143	0.179	0.073	0.068	0.118	0.115	0.112	39.15
16	0.141	0.169	0.253	0.173	0.237	0.119	0.108	0.103	0.151	0.142	31.85
17	0.043	0.142	0.189	0.125	0.089	0.025	0.016	0.049	0.050	0.133	67.72
18	0.517	0.766	1.003	1.515	1.076	0.551	0.404	0.978	1.009	0.985	37.39
19	0.280	0.295	0.345	0.454	0.312	0.292	0.264	0.187	0.447	0.440	26.88
20	0.214	0.256	0.287	0.441	0.214	0.184	0.143	0.166	0.314	0.165	37.80
21	0.470	0.354	0.437	0.362	0.376	0.556	0.414	0.390	0.413	0.418	14.24
22	0.086	0.052	0.070	0.078	0.076	0.104	0.067	0.071	0.074	0.079	17.66
23	0.120	0.119	0.088	0.084	0.076	0.107	0.070	0.091	0.092	0.128	20.51
24	0.074	0.014	0.008	0.010	0.010	0.038	0.018	0.048	0.012	0.062	82.94

2.6 聚类分析

以10批样品的24个共有峰峰面积为变量,采用SPSS 21.0软件对峰面积进行标准化处理,采用组间联接,以平方Euclidean距离为测度进行聚类分析。结果,10批样品可聚为4类,其中S1、S3、S6、S10为一类,S2、S7、S8为一类,S4、S9为一类,S5为一类,详见图5。

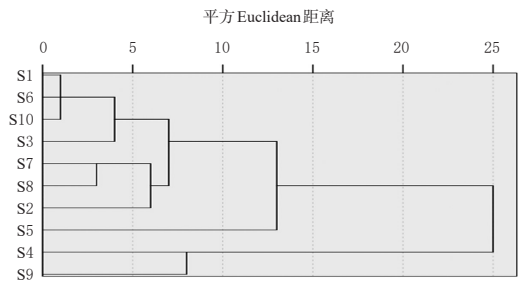


图5 10批样品的聚类分析树状图

Fig 5 Dendrogram of cluster analysis of 10 batches of *A. bidentata* decoction pieces

2.7 主成分分析

采用SPSS 21.0软件对样品中15个共有峰(6~12、15~16、18~23号峰,剔除溶剂峰以及峰面积较小的不稳定峰对于分析结果的影响)峰面积进行标准化处理后,进行主成分分析(以特征值 >1 为标准^[16-17])。结果,得到4个主成分因子,累积方差贡献率为86.774% $>80%$,即这4个主成分因子能反映样品80%以上的质量信息,故以这4个主成分因子为指标,对10批样品进行

质量评价, 详见表5。

表5 主成分分析特征值和方差贡献率

Tab 5 Characteristic values and variance contribution rates of principal component analysis

主成分	特征值	方差贡献率, %	累积方差贡献率, %
1	4.969	33.124	33.124
2	4.100	27.330	60.454
3	2.562	17.081	77.535
4	1.386	9.239	86.774

为了使提取的4个主成分能更加清晰、全面地反映原始数据所包含的信息, 本研究以最大方差法对变量进行正交旋转, 得到旋转后的公共因子载荷矩阵(表6); 同时以4个主成分因子为变量, 绘制主成分分析碎石图(图6)和得分图(图7)。结果, 除16、20号峰外, 其余共有峰在主成分1中有明显的正载荷; 除8、9、21、22、23号峰外, 其余共有峰在主成分2中有明显的正载荷; 除12、21、22、23号峰外, 其余共有峰在主成分3中有明显的正载荷; 除16、19、20、21、22、23号峰外, 其余共有峰在主成分4中有明显的正载荷; 10批样品分为4类, 其中S5为一类, S1、S3、S6、S10为一类, S2、S7、S8为一类, S4、S9为一类, 与“2.6”项下聚类分析结果一致(F为各色谱峰峰面积经标准化后的数据)。

表6 旋转后的公共因子载荷矩阵

Tab 6 Common factor loading matrix after rotation

峰号	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4
6(F ₁)	0.043	0.859	0.069	0.061
7(F ₂)	0.308	0.789	0.285	0.312
8(F ₃)	0.247	-0.038	0.675	0.649
9(F ₄)	0.089	-0.063	0.161	0.952
10(F ₅)	0.965	0.057	0.043	0.149
11(F ₆)	0.876	0.261	0.019	0.326
12(F ₇)	0.929	0.094	-0.260	0.059
15(F ₈)	0.059	0.374	0.870	0.084
16(F ₉)	-0.264	0.190	0.923	-0.050
18(F ₁₀)	0.106	0.873	0.344	0.177
19(F ₁₁)	0.064	0.760	0.022	-0.376
20(F ₁₂)	-0.181	0.835	0.196	-0.152
21(F ₁₃)	0.755	-0.350	-0.098	-0.500
22(F ₁₄)	0.764	-0.015	-0.060	-0.574
23(F ₁₅)	0.117	-0.127	-0.638	-0.179

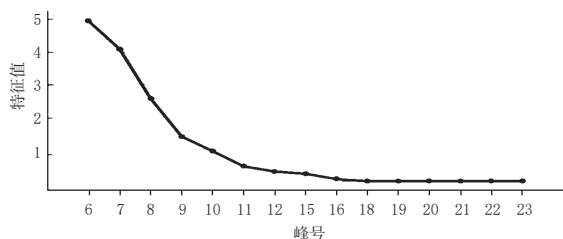


图6 主成分分析碎石图

Fig 6 Scree plot of PCA

2.8 质量综合评价

以X₁、X₂、X₃、X₄分别代表“2.7”项下提取的4个主成分, 根据表6结果, 得各主成分得分为 X₁=0.043F₁+0.308F₂+0.247F₃+0.089F₄+0.965F₅+0.876F₆+0.929F₇+

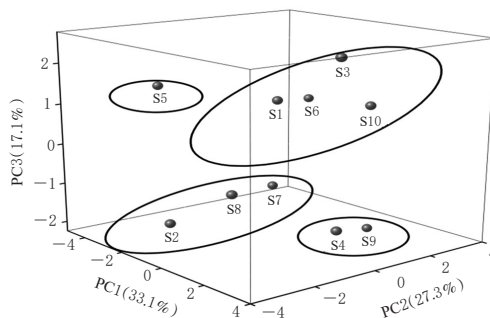


图7 主成分分析得分图

Fig 7 Score plot of PCA

0.059F₈-0.264F₉+0.106F₁₀+0.064F₁₁-0.181F₁₂+0.755F₁₃+0.764F₁₄+0.117F₁₅; X₂=0.859F₁+0.789F₂-0.038F₃-0.063F₄+0.057F₅+0.261F₆+0.094F₇+0.374F₈+0.190F₉+0.873F₁₀+0.760F₁₁+0.835F₁₂-0.350F₁₃-0.015F₁₄-0.127F₁₅; X₃=0.069F₁+0.285F₂+0.675F₃+0.161F₄+0.043F₅+0.019F₆-0.260F₇+0.870F₈+0.923F₉+0.344F₁₀+0.022F₁₁+0.196F₁₂-0.098F₁₃-0.060F₁₄-0.638F₁₅; X₄=0.061F₁+0.312F₂+0.649F₃+0.952F₄+0.149F₅+0.326F₆+0.059F₇+0.084F₈-0.050F₉+0.177F₁₀-0.376F₁₁-0.152F₁₂-0.500F₁₃-0.574F₁₄-0.179F₁₅。同时, 根据表5结果, 得综合得分(x)=(33.124X₁+27.330X₂+17.081X₃+9.239X₄)/86.774, 综合得分越高表示样品整体质量越好^[18], 结果见表7。由表7可知, S8样品综合得分最高, S1样品最低, 提示不同厂家由于炮制方式不同, 其饮片质量存在差异。

表7 10批样品的主成分得分、综合得分及排序

Tab 7 Principal component scores, comprehensive scores and ranking of 10 batches of samples

编号	第1主成分得分	第2主成分得分	第3主成分得分	第4主成分得分	综合得分	排序
S1	-1.07	-0.90	-0.78	-1.25	-0.99	10
S2	-1.56	-0.44	-0.76	1.57	-0.49	9
S3	-0.87	-0.53	1.79	-0.48	-0.12	5
S4	-0.56	2.21	-0.19	-0.34	0.37	4
S5	0.23	0.02	1.86	0.40	0.55	2
S6	1.31	-0.77	-0.40	-1.29	-0.14	7
S7	0.52	-0.95	-0.37	0.39	-0.13	6
S8	1.33	-0.09	-0.24	1.57	0.62	1
S9	0.74	1.08	-0.05	-0.29	0.48	3
S10	-0.07	0.37	-0.86	-0.29	-0.15	8

3 讨论

本研究前期试验分别考察了回流和超声提取对TLC斑点的影响, 结果, 两种方法均呈现清晰的斑点; 随后, 进一步考察了两种方法对待测成分HPLC色谱峰的影响, 结果, 超声提取样品的色谱峰峰形好、响应强且杂质干扰少, 故选择超声提取。同时, 本研究考察了不同料液比(1:15、1:30、1:35、1:40、1:45、1:60, g/mL, 下同)、超声提取时间(30、45、60 min)对待测成分峰面积的影响。结果, 当料液比为1:40时, β-蜕皮甾酮峰面积最大; 但增加料液比, 其峰面积下降, 故选择料液比为

1:40。当超声 45 min 时,β-蜕皮甾酮峰面积最大,故选择超声时间为 45 min。此外,对不同流动相(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水溶液)、流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、柱温(25、30、35 ℃)、色谱柱(Intertsil C₁₈、Synchronis C₁₈、Hedera ODS-2)进行考察,结果,采用“2.4.3”项下色谱条件时,待测物色谱峰峰形对称、分离度良好且响应较强。

基于中药多组分、多靶点的作用机制,影响其质量的因素除药材饮片原料复杂外,还有炮制工艺,这使得“一品多家”的情况十分普遍。可见,建立揭示不同生产企业产品质量差异的统一标准可能会更有利于区分产品的优劣^[19]。本研究在 TLC 鉴别的基础上,对 10 批不同厂家怀牛膝饮片的水分、总灰分及醇溶性浸出物、总甾酮、β-蜕皮甾酮的含量进行测定,采用定性、定量结合指纹图谱对怀牛膝饮片进行分析。结果显示,10 批样品中水分含量为 4.07%~6.33%,总灰分含量为 5.04%~6.43%,醇溶性浸出物含量为 6.57%~11.12%,总甾酮(以β-蜕皮甾酮计)含量为 0.34%~0.56%,β-蜕皮甾酮含量为 0.07%~0.09%,提示不同厂家样品质量存在差异。本研究采用 UV 法检测样品中总甾酮的含量(β-蜕皮甾酮计),目的是为了确定牛膝饮片中大类成分(甾酮类)的含量;采用 HPLC 法检测β-蜕皮甾酮的含量,是由于该化物在甾酮类成分中含量较高,且出峰稳定,是甾酮类成分中的主要成分。虽然均以β-蜕皮甾酮为指标,但由于采用的检测方法不同,检出的目标组分不同,因此并不冲突。

本研究结果显示,10 批样品共有 24 个共有峰,相似度均大于 0.900,并指认了 10 号峰为β-蜕皮甾酮。聚类分析结果显示,10 批样品可聚为 4 类,其中 S₁、S₃、S₆、S₁₀ 为一类,S₂、S₇、S₈ 为一类,S₄、S₉ 为一类,S₅ 为一类,这可能与原药材的生长环境及不同厂家饮片的炮制加工工艺不同有关^[20]。主成分分析结果与上述结果一致。综合质量评价结果显示,S₈>S₅>S₉>S₄>S₃>S₇>S₆>S₁₀>S₂>S₁,提示不同厂家怀牛膝饮片质量有一定差异,这可能是由于炮制方式不同(即使同一炮制品,在辅料用量、炒制温度、炒制时间和炮制程度判定方面也有差异^[21])或者采购的原药材质量存在差异。

综上所述,所建质量标准、含量测定方法和 HPLC 指纹图谱稳定、准确性好,可用于全面评价怀牛膝饮片的质量。

参考文献

[1] 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,2015:72.
[2] 屠万倩,张留记,刘晓苗,等.怀牛膝及其炮制品中甾酮类和皂苷类成分的含量比较[J].中药新药与临床药理,2019,30(1):89-93.

[3] 张留记,刘晓苗,屠万倩,等. HPLC 法同时测定怀牛膝中 5 个成分的含量[J].药物分析杂志,2018,38(4):623-629.
[4] 付国辉,陈随清,刘嘉,等.牛膝化学成分及等级分类研究[J].海峡药学,2018,30(2):29-32.
[5] 郑义哲,刘本.牛膝中植物甾酮类成分的研究进展[J].科技通报,2008,24(6):820-826.
[6] 孟大利,李锐.中药牛膝化学成分和药理活性的研究进展[J].中国药物化学杂志,2001,11(2):120-124.
[7] 张留记,孙丹丹,屠万倩,等.不同产地怀牛膝β-蜕皮甾酮含量测定及指纹图谱研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(4):500-505,510.
[8] 赵侠.中药饮片质量标准的研究现状及相关思考[J].大家健康:中旬版,2013,7(4):77-78.
[9] 纪亮,刘倩茹,梁献葵,等.不同规格怀牛膝不同极性部位 HPLC 指纹图谱[J].中国药学杂志,2020,55(8):580-587.
[10] 唐维维,梁献葵,马驰虹,等.不同采收季节怀牛膝指纹图谱研究[J].中药材,2019,42(9):2079-2085.
[11] 蔡皓,秦昆明,刘晓,等.中药饮片质量标准的研究现状及相关思考[J].世界科学技术:中医药现代化,2011,13(3):450-456.
[12] 仇立志.硫磺熏蒸对怀牛膝饮片质量的相关性评价[D].济南:山东中医药大学,2012.
[13] 王博,孟啸龙,徐宁,等.基于 HPLC 指纹图谱技术的不同厂家怀牛膝饮片质量评价[J].时珍国医国药,2020,31(6):1364-1367.
[14] 杜星,郭东艳,史传道.抗疏健骨颗粒质量标准研究[J].陕西中医学院学报,2014,37(6):97-101.
[15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015 年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57-58,104,202,204-206,224-225.
[16] 冯华,王祥培,王世俊,等.辣椒药材的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析[J].中国药房,2019,30(8):1078-1082.
[17] 黄华花,王明军,黄鸣清,等.金橘药材的 UPLC 指纹图谱建立、聚类分析及主成分分析[J].中国药房,2019,30(12):1661-1665.
[18] 何微微,晋玲,王莉.不同包装、储藏处理羌活饮片的 UPLC 指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(6):144-151.
[19] 王晓伟,王艳伟,王海波,等.香砂和中丸的质量标准改进研究[J].中国药房,2020,31(2):153-159.
[20] 杨俊杰,张振凌.中药材产地加工与地道药材相关性研究[J].时珍国医国药,2006,17(5):676-677.
[21] 王清浩,王云,张雪,等.党参产地加工及炮制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(22):206-214.

(收稿日期:2020-08-22 修回日期:2020-11-04)

(编辑:陈宏)