

不同来源竹茹药材 HPLC 指纹图谱和化学计量学分析

周冰倩^{1,2}, 高喜梅^{1,2}, 杨 颖^{1,2}, 王令充^{1,2}, 张 雯^{1,2}, 赵晓莉^{1,2}, 狄留庆^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 建立不同来源竹茹药材 HPLC 指纹图谱, 结合相似度、聚类、主成分分析等化学计量手段评价不同产地竹茹药材品质, 为其质量控制研究提供技术方法借鉴和基础数据。 **方法** 通过 HPLC 梯度洗脱建立 23 个批次竹茹药材的指纹图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A 版) 对竹茹药材 HPLC 指纹图谱进行相似度评价, 并采用 SPSS24.0 软件进行聚类、主成分分析。 **结果** 选取了 13 个色谱共有峰, 23 批样品共有峰相似度在 0.713~0.991; 聚类分析将 23 批样品分为 2 类; 主成分和因子分析筛选出累积方差达 77.83% 贡献率的 3 个主成分, 能够反映 23 个批次竹茹药材特征性质量差异。 **结论** 建立分析的 HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价方法, 简便可行, 可为综合评价不同产地竹茹药材的质量提供参考。

关键词: 竹茹药材; 指纹图谱; 聚类分析; 化学计量学; 质量评价; 尿苷; 腺苷; 鸟苷; 对羟基苯甲酸; 对香豆酸

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)03-0853-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.026

Quality analysis of *Caulis Bambusae In Taeniam* from different origins by HPLC coupled with chemometrics

ZHOU Bing-qian^{1,2}, GAO Xi-mei^{1,2}, YANG Ying^{1,2}, WANG Ling-chong^{1,2}, ZHANG Wen^{1,2}, ZHAO Xiao-li^{1,2}, DI Liu-qing^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To establish the fingerprints of *Caulis Bambusae In Taeniam* from different habitats by HPLC, and comprehensively analyze the quality of *C. Bambusae In Taeniam* by the similarity evaluation in combination with principal component, clustering, principal component analysis (PCA) and other chemo-metrics, so as to provide theoretical basis for its quality evaluation. **Methods** The fingerprints of 23 batches of *C. Bambusae In Taeniam* were established by HPLC gradient elution, and the similarity evaluation of the HPLC fingerprints of *C. Bambusae In Taeniam* medicinal materials was carried out using the traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2012A version), and SPSS24.0 software was used for clustering and PCA analysis. **Results** Thirteen chromatographic peaks were selected as the common peaks, and the similarity of the 23 batches was 0.713—0.991. Principal components and PCA analysis screened out three principal components with cumulative variance contribution rate of 77.83%, reflecting the quality characteristic differences of 23 batches of *C. Bambusae In Taeniam* medicinal materials. **Conclusion** HPLC fingerprint established in this experiment combined with the chemometric evaluation method is simple, feasible and reproducible, and can be used to comprehensively evaluate the quality of *C. Bambusae In Taeniam* from different producing areas.

Key words: *Caulis Bambusae In Taenias*; fingerprint; cluster analysis; chemometrics; quality evaluation; uridine; adenosine; guanosine; *p*-hydroxybenzoic acid; *p*-coumaric acid

竹茹 *Caulis Bambusae In Taenias* 为禾本科植物 *Sinocalamus beecheyanus* (Munro) McClure var. *pubescens* P. F. Li 或淡竹 *Phyllostachys nigra* 青秆竹 *Bambusa tuldoidea* Munro、大头典竹

收稿日期: 2021-08-06

基金项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (SJCX20_0560, SJCX20_0563)

作者简介: 周冰倩 (1996—), 女, 江苏淮安, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: 1776093511@qq.com

*通信作者: 狄留庆 (1964—), 男, 教授, 研究方向为中药制剂研究与新产品研发。E-mail: diliuqing928@163.com

(Lodd.) *Munrovar henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 的茎秆的干燥中间层, 味甘, 性微寒, 有清热涤痰、和胃降逆止呕的功效^[1], 资源分布广泛, 主产于四川、江西、湖北、安徽等地, 临床多用于治疗痰热咳嗽、胃热呕吐、妊娠恶阻。竹茹入药始见于《金匱要略》, 称“竹皮”。《药品化义》记载: “竹茹轻可去实, 凉能去热, 专清痰, 为宁神开郁佳品”。竹茹是临床常用中药之一^[2], 也是卫生部批准的“可用于保健食品的物品”。目前为止, 《中国药典》2020 年版^[3]关于竹茹药材的质量控制标准仅有水分和浸出物项目, 其化学成分及质量控制也未见深度研究报道。

指纹图谱作为一种能被国内外广为接受的中药质量评价模式, 具有整体性和模糊性的特点^[4-5]。HPLC 指纹图谱结合化学计量学分析, 为整体、综合、全面中药材质量控制提供了新的思路。为合理地评价药材质量, 本实验收集全国 12 个省、自治区 23 批不同产地的竹茹药材, 收集范围基本涵盖竹茹的主要产区, 建立竹茹药材的 HPLC 指纹图谱, 并采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A 版) 进行相似度评价, 运用 SPSS 软件进行聚类分析和主成分分析, 以期竹茹药材指标成分的筛选及竹茹药材的鉴定和质量标准研究提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪, PDA 检测器和 Empower 工作站 (美国 Waters 公司); SB25-12DTD 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司, 功率 220 W, 频率 45 kHz); CPA225D 型 1/10 万分之一电子天平 (南京以马内利仪器设备有限公司); XP6 型百万分之一天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); HH-S8 型数显恒温水浴锅 (江苏金怡仪器科技有限公司)。甲醇为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司), 实验用水为实验室自制超纯水。HPLC 用甲醇为色谱纯。

1.2 材料

对照品鸟苷 (批号 111977-201501)、腺苷 (批号 110879-201703) 购自中国食品药品检定研究院, 尿苷 (批号 B20907)、对香豆酸 (批号 B20335)、对羟基苯甲酸 (批号 B20328), 购自源叶生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%。实验用竹茹药材经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为禾本科植物青秆竹 *Bambusa tuldoidea* Munro、大头典竹 *Sinocalamus beecheyanus* (Munro) McClure var.

pubescens P. F. Li 或淡竹 *Phyllostachys nigra* (Lodd.) *Munrovar henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 的茎秆的干燥中间层, 共 23 批, 产地、批号及采购途径见表 1。

表 1 竹茹药材来源

Table 1 Source of *C. Bambusae* In *Taeniam*

编号	批号	产地	采购途径
S1	20190208	江西	南通精华制药
S2	20190301	江西	南通精华制药
S3	20190126	四川	长春市方一堂经贸有限公司
S4	20180901	广西	南京大华药房
S5	20190403	广西	亳州永刚饮片厂有限公司
S6	20190522	广西	淘宝药王谷中草药销售
S7	20180911	浙江	南通精华制药
S8	20180505	浙江	南通精华制药
S9	20190509	浙江	南通精华制药
S10	20190510	浙江	南通精华制药
S11	20190520	浙江	南通精华制药
S12	20190525	浙江	亳州永刚饮片厂有限公司
S13	20190410	福建	南通精华制药
S14	20180402	福建	南通精华制药
S15	20180610	安徽	淘宝桃源人家
S16	20190515	安徽	河北金叶子药业有限公司
S17	20180513	安徽	亳州永刚饮片厂有限公司
S18	20190326	湖南	淘宝炳然旗舰店
S19	20181201	湖北	南京大华药房
S20	190301c63	河南	淘宝佐今明大药房
S21	181200271	广东	卡莱诺中港大药房
S22	20180804	山东	安国市芳草佳商贸有限公司
S23	20190402	河北	淘宝聚旭堂旗舰店

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取尿苷、鸟苷、腺苷、对香豆酸、对羟基苯甲酸对照品适量, 加甲醇制成含尿苷 1.01 mg/mL、鸟苷 1.03 mg/mL、腺苷 1.02 mg/mL、对香豆酸 1.02 mg/mL、对羟基苯甲酸 1.01 mg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

精密称定 2.0 g 竹茹药材粉末 (过 2 号筛), 置于 150 mL 具塞瓶中, 加水 100 mL, 称定质量, 超声提取 45 min, 取出放冷后补足失重, 10 000 r/min 离心 20 min。取上清液, 水浴蒸干, 50% 甲醇复溶至 2 mL, 摇匀, 高速离心取上清液, 即得。

2.3 色谱条件

Megres C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗

脱, 0~5 min, 2% A; 5~15 min, 2%~12% A; 15~35 min, 12%~18% A; 35~45 min, 18%~22% A; 45~60 min, 22%~35% A; 60~75 min, 35% A; 75~85 min, 35%~2% A; 85~90 min, 2% A; 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μ L, 检测波长 260 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 S21 号样品粉末, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液适量, 按“2.3”项下色谱条件进行检测, 连续进样 6 次。记录色谱图, 并计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。以 7 号峰对羟基苯甲酸为参照峰 (S), 计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.01%~0.12%, 相对峰面积 RSD 为 1.11%~2.24%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 S21 号样品粉末, 按“2.2”项下制备方法平行制备 6 份, 按“2.3”项下色谱条件分别进样检测。记录色谱图, 并计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。以 7 号峰对羟基苯甲酸为参照峰 (S), 计算各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.03%~0.11%, 相对峰面积 RSD 为 1.42%~5.54%, 样品重复性尚可。

2.4.3 稳定性试验 取 S21 号样品粉末, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液适量, 室温保存, 按“2.3”项下色谱条件进样分析, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样。记录色谱图, 并计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。以 7 号峰对羟基苯甲酸为参照峰 (S), 计算各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.05%~0.39%, 相对峰面积 RSD 为 0.30%~2.90%, 表明该供试液在 24 h 内基本稳定。

2.5 不同产地竹茹药材指纹图谱分析

2.5.1 HPLC 指纹图谱的生成 取 23 批竹茹药材样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 得 HPLC 指纹图谱, 见图 1。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版) 对 23 批药材样品的 HPLC 图谱进行分析, 共标定了 13 个共有峰, 通过与对照品比对, 指认出 5 个峰, 分别为尿苷 (2 号峰)、腺苷 (3 号峰)、鸟苷 (4 号峰)、对羟基苯甲酸 (7 号峰)、对香豆酸 (12 号峰)。选取对羟基苯甲酸 (7 号峰) 为参照峰, 建立竹茹药材的对照指纹图谱、混合对照品、指纹图谱共有模式及叠加图见图 1。

2.5.2 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版), 以对照指纹图谱的 HPLC 图谱为对照, 进行整体相似度评价, 见表 2。以 S1 为参照图谱, 设置时间窗宽度为 0.5, 谱多点校正并自动匹配, 按中位数法生成对照图。结果表明, 23 批样品的相似度在 0.713~0.990, 说明收集的不同产地竹茹药材整体概貌有一定差异。

2.6 竹茹药材指纹图谱聚类分析

聚类分析是一种在没有先验知识的前提下, 将每个样本的特征数据按照性质上的亲疏程度进行分

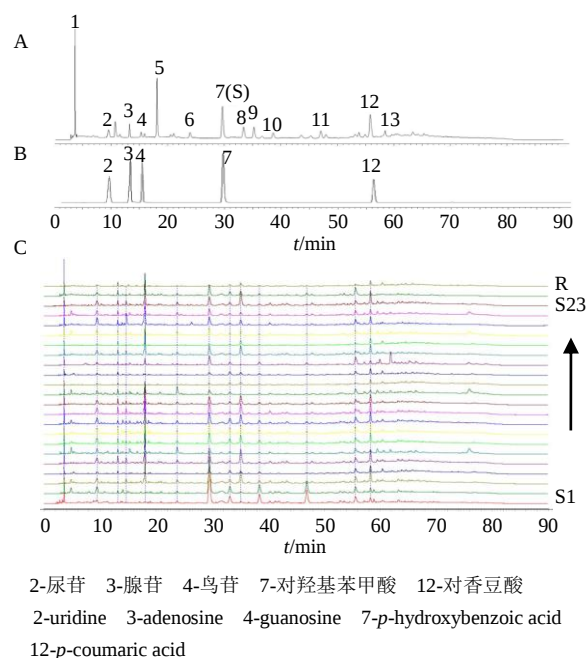


图 1 指纹图谱共有模式 (A)、混合对照品 (B) 及 23 批竹茹药材 HPLC 叠加图谱 (C)

Fig. 1 Common patterns in fingerprints (A), mixed reference control (B) and HPLC superimposed spectrum of 23 batches of *C. Bambusae In Taeniam* (C)

表 2 不同产地竹茹药材指纹图谱相似度

Table 2 Similarity of fingerprints of *C. Bambusae In Taeniam* of 23 batches in different regions

批次	相似度	批次	相似度
S1	0.729	S13	0.826
S2	0.738	S14	0.784
S3	0.972	S15	0.902
S4	0.767	S16	0.895
S5	0.895	S17	0.713
S6	0.890	S18	0.982
S7	0.990	S19	0.914
S8	0.987	S20	0.982
S9	0.984	S21	0.911
S10	0.962	S22	0.927
S11	0.941	S23	0.739
S12	0.855		

组,使其组内个体具有高度相似性,而组间个体具有较小相似性的一种分析手段^[6]。将 23 批不同产地的竹茹药材标定的 13 个共有峰面积导入 SPSS 24.0 软件,以欧式平方距离为测度,Z 标准化,采用组间连接法进行 Q 型聚类分析。在类间距为 15 时,23 份样品被分为 2 类。S1、S2 号样品首先聚为一类,S3~S23 号样品聚为另一类,具体见图 2。

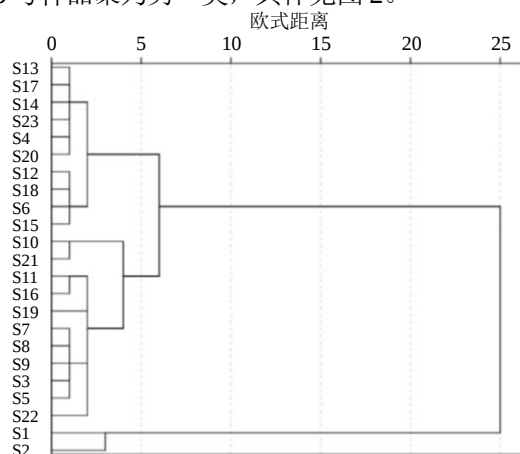


图 2 竹茹指纹图谱聚类树状关系

Fig. 2 Cluster tree diagram of fingerprint of *C. Bambusae In Taeniam*

2.7 主成分分析及因子分析

主成分分析是将多个相互关联的多变量通过线性变换,在保留原始数据大部分信息的前提下将众多变量浓缩为少数几个变量,从而发现变量间的联系的分析手段,是最常用的多指标线性降维压缩和多变量分析方法之一,能够尽可能的揭示数据结构特征,提取化学信息^[7],目前已广泛应用于中药的评价与鉴别。

采用 SPSS24.0 软件对 23 批竹茹药材的 13 个共有峰峰面积原始数据进行标准化处理,以主成分贡献率及特征值为依据,进行主成分因子分析。本研究通过考察提取特征值、碎石图(主成分特征值的连续陡峭部分)、累积方差贡献率来确定最佳主成分数。由图 3 和表 3 可知,前 3 个主成分提取特征值较大($\lambda > 1$),连线较陡峭,对解释变量的贡献最大,提取前 3 个主成分较为合适。其累积方差贡献率为 77.83%,即选取 3 个主成分涵盖了 13 个成分 77.83%的信息量。

通过正交旋转,得到 13 个指标在 3 个主成分中的旋转成分矩阵,见表 4。根据旋转成分矩阵推测,影响竹茹药材质量差异的成分不是单一成分,而是多成分协同作用的结果^[8]。由表 4 可知,第 1

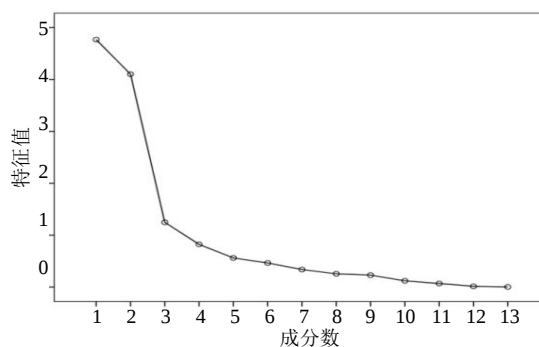


图 3 公共因子碎石图

Fig. 3 Macadam figure of common factor

表 3 主成分方差分析

Table 3 Variance analysis of principal component

峰号	初始特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	4.77	36.68	36.68
2	4.10	31.55	68.23
3	1.25	9.60	77.83

表 4 竹茹药材成分矩阵

Table 4 Component matrix of *C. Bambusae In Taeniam*

峰号	成分		
	1	2	3
1	0.782	-0.023	0.022
2	0.282	0.827	0.165
3	-0.244	0.866	0.005
4	0.182	0.562	-0.487
5	-0.056	0.904	-0.046
6	0.146	0.716	-0.082
7	0.961	0.047	0.192
8	0.890	0.017	-0.010
9	-0.095	0.811	0.224
10	0.964	-0.162	0.062
11	0.933	-0.251	0.163
12	0.657	0.404	-0.437
13	-0.052	0.331	0.816

主成分的信息主要来自峰 1、7、8、10、11、12;第 2 主成分的信息主要来自 2、3、4、5、6、9;第 3 主成分的信息主要来自色谱峰 13。由竹茹药材主成分分析三维图可以看出,23 批竹茹药材被分为 2 大类,结果与聚类分析一致(图 4)。

3 讨论

本实验考察了不同提取溶剂(水,甲醇)、提取方法(加热回流提法,超声提取法)、提取时间(30、45、60 min)对竹茹药材提取效率的影响,发现加热回流提取法与超声提取法无显著差异,水提取效果最佳,最终确定了竹茹药材提取方法为水超声提取 45 min。在指纹图谱分析方法的建深入摸索中,先后考察了不同有机相(乙腈、甲醇),水相

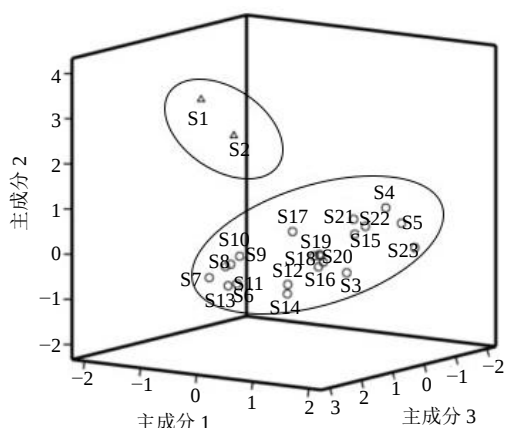


图 4 竹茹药材主成分得分图

Fig. 4 Principal component score chart of *C. Bambusae In Taeniam*

(水、0.1%甲酸水、0.1%磷酸水)对指纹图谱的影响。结果显示,采用甲醇-0.1%甲酸水进行梯度洗脱,获得的指纹图谱基线平稳,各个主要峰基本得到分离,且分离度良好。在全波长扫描下,260 nm 检测条件下处色谱峰出峰较多,分离度良好,各峰吸收均匀,故最终选择的检测波长为 260 nm。龚金炎等^[2]应用高效液相半制备色谱,从竹茹中分离出苜蓿素作为对照品,本研究曾在条件摸索过程中采用 UFLC-Q-TOF-MS,负离子检测模式下检测出低含量的苜蓿素。

通过淘宝线上旗舰店、线下药房和药物饮片公司等途径等收集到了 23 批源自 12 个省的药材,其中,四川、湖南、湖北、河南、广东、山东、河北各 1 批,江西、福建各 2 批,广西、安徽各 3 批,浙江 6 批。在指纹图谱 HPLC 分析方法建立的过程中发现,样品的重复性在 1.42%~5.54%。稍差的样品测量重复性推测与样品来源有关。《中国药典》2020 年版规定,竹茹的药材基原为同种亚科不同族的植物:淡竹、青竿竹、大头典竹,仅从竹茹药材本身无法追溯到具体基原。另外,市售的药材来源复杂,质量良莠不齐,对重复性测定有一定影响。此外,结合化学计量学手段,较为客观地对样品进行分析。23 批竹茹药材样品的相似度为 0.713~0.990,说明不同产地、不同来源的药材在化学成分及含量存在一定差异。其中,同一厂家提供的同一产地不同批次之间的样品相似度有所差异,这可能由于不同采收时间、地点导致的药材质量差异。为保证药材质量的批间一致性,可建议厂家或产地加工商严

格控制药材的初加工过程。聚类分析和主成分分析将 23 批竹茹药材分为 2 类,其中,江西产地的竹茹药材被分为一类,其他产地的竹茹药材被分为另一类,推测江西省的竹茹药材在主成分种类及含量上可能与其他产地的竹茹药材具有一定差异,而其他省份竹茹药材的化学成分较为相似,但目前尚无法明确识别各产地药材质量的优劣,后期将在此基础上进一步完善竹茹药材的质量评价研究。

中药化学成分复杂多样,有效成分难以一一明确,如何在化学成分不完全明确的前提下对药材进行质量控制十分有必要。指纹图谱结合聚类、主成分分析等化学计量学手段可以用于综合评价中药饮片的质量优劣,避免了以单一成分含量来评价饮片质量好坏的弊端^[8]。本研究在 HPLC 条件下建立了竹茹药材的指纹图谱,在后续研究中,考虑可采用质谱结合核磁共振技术,进行多手段、多仪器分析,以期明确竹茹中的指标性成分并对竹茹药材质量控制进行全面评价研究。

基于《中国药典》2020 年版未涉及竹茹药材的 HPLC 质量控制相关内容,本实验建立了具有较好重复性和专属性的 HPLC 指纹图谱,并结合聚类、主成分因子分析等化学计量学方法,对不同产地竹茹药材的质量进行多方面的综合评价,为从多角度多方位分析竹茹药材的质量控制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 温桂荣. 运用橘皮竹茹汤护胃清热降逆止呕 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5404-5406.
- [2] 龚金炎, 毛建卫, 黄伟素, 等. 竹茹中苜蓿素对照品的高效液相半制备色谱制备研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 919-921.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 145.
- [4] 陈林伟, 秦昆明, 徐雪松, 等. 中药指纹图谱数据库的研究现状及展望 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3041-3047.
- [5] 史晓飒, 张洪梅, 刘自尧, 等. 不同产地蝉花药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物生物技术, 2017, 24(6): 489-492.
- [6] 汪涛, 徐云霞, 李伟莉, 等. 聚类分析在中药方剂研究中的应用 [J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(12): 2035-2037.
- [7] 聂鞞, 朱培林, 房海灵, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地广东紫珠药材的质量 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 185-191.
- [8] 孔浩, 郭庆梅, 王慧慧, 等. 主成分分析法在中药质量评价中的应用 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 890-892.

[责任编辑 时圣明]