

## 基于成分定量和指纹图谱的化学模式识别法评价胆木不同部位的差异性

彭 警, 樊箫雨, 王迪磊, 徐 冰, 张泽康, 肖五庆, 杨天姿, 李鹏跃\*, 杜守颖\*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

**摘要:**目的 建立胆木不同部位的 UPLC 指纹图谱, 结合成分定量与化学模式识别, 评价胆木不同部位的差异性。方法 采用 Waters Acquity BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 以乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱; 检测波长 240 nm; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 °C, 对胆木不同部位异长春花苷内酰胺的含量进行测定, 利用化学模式识别法通过 SPSS 20.0 对色谱数据进行聚类分析和通过 SIMCA 14.1 软件对胆木 9 部位进行主成分分析, 并将所有色谱峰化为分类数据对药材不同部位的差异性进行分析。结果 对于异长春花苷内酰胺而言, 植株地下部位 (根皮、去皮根茎) 的累积量要高于地上部位的累积量, 在地下部位, 根皮部位的含量高于去皮根茎部位的含量, 地上部位中叶含量最高, 其次为茎干部位, 最后为枝部位, 茎干部位趋势从高到低大致为去皮茎干、带皮茎干、茎皮, 枝部位趋势从高到低大致为枝皮、去皮枝茎、带皮小枝。3 批次 9 部位 (27 份) 药材 UPLC 图谱有 9 个共有峰, 指认了其中獐牙菜苷、绿原酸、马钱苷酸 3 个色谱峰。当平方欧氏距离为 10 时, 9 部位被聚为 3 类: 3 批叶聚为一类, 3 批根皮、3 批茎皮、3 批枝皮共聚为一类, 3 批去皮根茎、3 批带皮茎干、3 批去皮茎干、3 批带皮小枝、3 批去皮枝茎聚为一类。所有色谱峰化为分类数据后, 在皮部位中, 根皮能区分于茎皮和枝皮, 色谱图中根皮也存在区别于茎皮和枝皮的特征峰; 在去皮部位中, 去皮根茎可区分于去皮枝茎和去皮茎干, 色谱图中去皮根茎也存在区别于去皮枝茎和去皮茎干的特征峰, 同时去皮枝茎和去皮茎干可通过色谱图中的特征峰区分开来; 在带皮部位中, 带皮小枝与带皮茎干可以区分开来。结论 胆木皮部位 (根皮、枝皮、茎皮)、带皮部位 (带皮小枝、带皮茎干)、去皮部位 (去皮茎干、去皮枝茎、去皮根茎)、叶部位存在差异, 可为胆木的进一步开发利用提供依据。  
**关键词:** 胆木; 指纹图谱; 异长春花苷内酰胺; 主成分分析; 獐牙菜苷; 绿原酸; 马钱苷酸; 正交偏最小二乘判别分析  
中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)10-3281-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.025

## Differences of *Nauclea officinalis* in different parts based on quantitative analysis of components and fingerprint by chemical pattern recognition

PENG Jing, FAN Xiao-yu, WANG Di-lei, XU Bing, ZHANG Ze-kang, XIAO Wu-qing, YANG Tian-zi, LI Peng-yue, DU Shou-ying

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract: Objective** To establish UPLC fingerprint of different parts of *Nauclea officinalis*, and evaluate the quality of different parts of *N. officinalis* by combining composition quantification and chemical pattern recognition. **Methods** Waters Acquity BEH C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used. Gradient elution was carried out with acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) as mobile phase. Detection wavelength: 240 nm; Flow rate: 0.3 mL/min; The contents of strictosamide in different parts of *N. officinalis* were determined at 30 °C. Cluster analysis of chromatographic data was performed with SPSS 20.0 by chemical pattern recognition method and principal component analysis was performed with SIMCA 14.1 software for nine parts of *N. officinalis*. **Results** The accumulation of strictosamide in the underground part of the plant (root bark, peeled root) was higher than that in the aboveground part, in the underground part, the content of the root bark part was higher than that of the peeled root, but the content of the peeled root was slightly higher in individual batches, in the aboveground part, the leaf part was the highest, followed by the stem part and the last was branch part, the trend of stem part from high to low was about peeled stem, stem and stem bark, but the content of individual batches of stems was higher than that of peeled stems,

收稿日期: 2022-10-09

作者简介: 彭 警 (1998—), 男, 硕士在读, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: 13535655204 E-mail: tcmpengjing@163.com

\*通信作者: 李鹏跃, 博士, 副教授, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)53912123 E-mail: pengyuelee@126.com

杜守颖, 博士, 教授, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)84738615 E-mail: Dushouying@263.net

and the trend of branch part from high to low was branch bark, peeled branch and branchlet. Nine common peaks were identified, three of which were identified as sweroside, chlorogenic acid and loganic acid. When the squared Euclidean distance was 10, nine parts can be well separated, three batches of leaves clustered into one class, three batches of root bark, three batches of stem bark and three batches of branchlets bark clustered into one class, three batches of stem, three batches of branchlets, three batches of peeled root, three batches of peeled stem and three batches of peeled branchlets clustered into one class. After all chromatographic peaks were classified, the root bark could be distinguished from the stem bark and the branchlets bark, and the characteristic peaks were also distinguished from the stem bark and the branchlets bark. Among the peeled parts, peeled root could be distinguished from peeled branchlets and peeled stem. The characteristic peaks of peeled root could also be distinguished from peeled branchlets and peeled stem, at the same time, peeled branchlets could also be distinguished from peeled stem by the characteristic peaks of chromatogram. In the parts with skin, branchlets with skin can be distinguished from stems with skin.

**Conclusion** There are differences in the parts of bark (root bark, branchlets bark, stem bark), parts with skin (branchlets with skin, stem with skin), peeled parts (peeled stem, peeled branchlets, peeled root) and leaves, which can provide basis for further development and utilization of gallbladder.

**Key words:** *Nauclea officinalis* Pierre ex Pitard.; fingerprint; strictosamide; principal component analysis; sweroside; chlorogenic acid; loganic acid; orthogonal partial least squares discriminant analysis

胆木为海南地区传统植物药，又名药乌檀、山熊胆、熊胆树、黄羊木、黄胆木、黄心木、树黄柏、细叶黄颡木，来源于茜草科乌檀属植物乌檀 *Nauclea officinalis* Pierre ex Pitard.。该植物零星分布于我国广东、广西、海南、湖南等地，生于高山近顶或半腰荫蔽潮湿地带。胆木最早收录于1969年广州部队的《常用中草药手册》，味苦，性寒，功效为清热解毒，消肿止痛，用于治疗急性扁桃体炎、咽喉炎、乳腺炎、肠炎、菌痢、尿路感染、胆囊炎、下肢溃疡、脚癣感染、疖肿脓疮、皮炎湿疹；后记载于1975年《全国中草药汇编》<sup>[1]</sup>，味苦，性寒，功效为清热解毒、消肿止痛，内服用于治疗感冒发热、急性扁桃体炎、咽喉炎、支气管炎、肺炎、泌尿系感染、肠炎、痢疾、胆囊炎，外用用于治疗治乳腺炎，疔疮脓肿；1977年收录于《中国药典》<sup>[2]</sup>，味苦、性寒，功效为清热解毒，用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、外耳道疖肿、急性结膜炎、皮肤疖肿；《广东省中药材标准》<sup>[3]</sup>2004年版中亦有收载，味苦，性寒，功效为清热解毒、消肿止痛，用于治乳蛾、痢疾、下肢溃疡、疔重脓疮、湿疹。但四者关于胆木用药部位的记载并不一致，《常用中草药手册》中记载以枝和树皮入药，《全国中草药汇编》记载以枝、干、皮入药，《中国药典》1977年版记载以茎干及根入药，《广东省中药材标准》记载以木材入药。

目前对于胆木的研究文献相对较少，已有研究显示，胆木中含有喹诺酮类生物碱<sup>[4]</sup>，如短小蛇根草苷；酚酸类成分<sup>[5]</sup>，如对甲氧基桂皮酸、咖啡酸甲酯等；也含有黄酮类<sup>[6]</sup>、倍半萜类化合物<sup>[7]</sup>，但

其含量最高的成分为喹啉酮类生物碱苷异长春花苷内酰胺。部分药效实验显示，胆木提取物具有抗菌、抗病毒活性<sup>[8]</sup>，能够降低血压、减慢心率及延长QT间期<sup>[9]</sup>。相关研究也显示不同生长年限和月份的胆木化学成分有差异<sup>[10]</sup>，不同部位药理活性也有差异<sup>[11]</sup>，然而前述标准中或以茎干为原料，或以茎枝为原料，或以枝叶为原料，受入药部位不一致的影响，已报道的各研究中所采用的“胆木”基原存在混淆，在一定程度上导致对胆木植株不同部位化学成分差异性的分析暧昧不明，为胆木的研究、开发或入药基原的扩大带来了困扰。

本研究拟建立胆木不同部位的UPLC指纹图谱，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”软件对3批次胆木的9个部位(根皮、去皮根茎、叶、去皮茎干、带皮茎干、茎皮、枝皮、去皮枝茎、带皮小枝)进行相似度评价，并运用SPSS 20.0进行聚类分析、运用SIMCA 14.1软件进行主成分分析对胆木不同部位进行分类，并采用偏最小二乘判别法分析不同部位的差异性化学成分，为后续胆木的研究、利用及药源的扩大提供一定的参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

赛多利斯 BSA 223S 型分析天平(德国赛多利斯公司);梅特勒-托利多 MS105DU 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);ACQUITY 型超高效液相色谱仪(美国沃特世公司)。

### 1.2 试药

异长春花苷内酰胺(批号 111778-202003, 质

量分数 95.0%)、绿原酸(批号 110753-202018, 质量分数 96.1%)、马钱苷酸(批号 111865-202005, 质量分数 97.5%), 以上对照品均购自中国食品药品检定研究院; 对照品獐牙菜苷(CAS: 14215-86-2, 批号 P25O10F101344, 质量分数 ≥98%, 购自上海源叶生物科技有限公司)。甲醇、乙腈和磷酸均为色谱纯(美国 Fisher 公司); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。3 批次 9 部位(共 27 份)胆木由海南森祺制药有限公司提供, 经北京中医药大学王晶娟教授鉴定为茜草科乌檀属植物乌檀 *N. officinalis* Pierre ex Pitard. 的根皮、去皮根茎、叶、去皮茎干、带皮茎干、茎皮、枝皮、去皮枝茎、带皮小枝。药材、饮片编号见表 1, 各批次根皮、去皮根茎、叶、去皮茎干、带皮茎干、茎皮、枝皮、去皮枝茎、带皮小枝均来自同一棵植株。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备

分别精密称定 3 批次 9 部位胆木药材粉末 0.5 g

表 1 胆木饮片来源  
Table 1 Source of *N. officinalis*

编号	部位	产地
S1	根皮 1	海南
S2	根皮 2	海南
S3	根皮 3	海南
S4	去皮根茎 1	海南
S5	去皮根茎 2	海南
S6	去皮根茎 3	海南
S7	叶 1	海南
S8	叶 2	海南
S9	叶 3	海南
S10	去皮茎干 1	海南
S11	去皮茎干 2	海南
S12	去皮茎干 3	海南
S13	带皮茎干 1	海南
S14	带皮茎干 2	海南
S15	带皮茎干 3	海南
S16	茎皮 1	海南
S17	茎皮 2	海南
S18	茎皮 3	海南
S19	枝皮 1	海南
S20	枝皮 2	海南
S21	枝皮 3	海南
S22	去皮枝茎 1	海南
S23	去皮枝茎 2	海南
S24	去皮枝茎 3	海南
S25	带皮小枝 1	海南
S26	带皮小枝 2	海南
S27	带皮小枝 3	海南

(过 4 号筛), 分别置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 200 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称定对照品异长春花苷内酰胺 12.20 mg、绿原酸 9.94 mg、马钱苷酸 8.34 mg、獐牙菜苷 10.32 mg 分别置于 10 mL 量瓶, 加甲醇定容后配制成对照品母液冷藏备用; 使用前吸取 1 mL 对照品母液置于 10 mL 量瓶加甲醇定容稀释为含异长春花苷内酰胺 0.115 9 mg/mL、绿原酸 0.095 5 mg/mL、马钱苷酸 0.081 4 mg/mL、獐牙菜苷 0.101 1 mg/mL 的对照品溶液。

### 2.3 色谱条件

Waters Acquity BEH C<sub>18</sub> 色谱柱: (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱; 0~2 min, 6.0%~8.0% A; 2~5 min, 8.0%~10.0% A; 5~7 min, 10.0%~13.0% A; 7~13 min, 13.0%~21.0% A; 13~15 min, 21.0%~22.0% A; 15~17 min, 22.0%~29.0% A; 17~20 min, 29.0%~30.0% A; 20~22.5 min, 30.0%~36.0% A; 检测波长 240 nm; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 1 μL, 柱温 30 °C。

### 2.4 含量测定

**2.4.1 线性关系考察** 取“2.2”项下对照品溶液(含异长春花苷内酰胺 0.115 9 mg/mL) 适量, 按“2.3”项下色谱条件分别进样 0.3、0.8、1.5、2.0、3.0、5.0 μL, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标(Y)、进样量为横坐标(X)进行线性回归, 得回归方程  $Y=844.94X-49.664$ ,  $R^2=0.9997$ 。结果表明在异长春花苷内酰胺进样含量为 0.034 8~0.579 5 μg 时, 线性关系良好。

**2.4.2 精密度试验** 取“2.2”项下对照品溶液(异长春花苷内酰胺 0.115 9 mg/mL) 适量, 按“2.3”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果异长春花苷内酰胺的 RSD 为 0.28%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取带皮小枝药材粉末(S25) 约 0.5 g, 按“2.1”项下方法制备后分别在室温下放置 2、4、8、10、12、24 h 时按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果异长春花苷内酰胺峰面积的 RSD 为 0.53%, 表明供试品溶液在室温下

放置 24 h 内稳定性良好。

**2.4.4 重复性试验** 取同一批带皮小枝药材粉末 (S25) 约 0.5 g, 平行 6 份, 分别按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 结果, 样品中长春花苷内酰胺质量分数 RSD 为 1.05%, 表明该方法重复性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 精密称取已测定成分含量的带皮小枝药材粉末 (S25) 约 0.25 g, 共 6 份, 分别按 1:1 的质量比加入对照品溶液, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率。结果, 异长春花苷内酰胺的平均加样回收率为 99.56%, RSD 为 2.27%, 表明该方法准确度良好。

**2.4.6 样品测定** 取 3 批次 9 部位胆木药材粉末, 按“2.1”项下方法平行制备供试品溶液各 2 份, 按“2.3”项下色谱条件测定, 记录色谱峰面积, 计算样品中异长春花苷内酰胺含量, 结果见表 2。实验结果显示, 在植株不同部位, 异长春花苷内酰胺皆为累积量最高的成分, 对于异长春花苷内酰胺而言, 植株地下部位 (根皮、去皮根茎) 的累积量高于地上部位的累积量; 在地下部位, 根皮部位的含量高于去皮根茎部位的含量, 但个别批次去皮根茎含量略高于根皮含量; 地上部位中叶含量最高, 其次为茎干部位, 茎干部位异长春花苷内酰胺含量从高到低趋势大致为去皮茎干 > 带皮茎干 > 茎皮, 但个别批次带皮茎干含量高于去皮茎干; 异长春花苷内酰胺的含量在枝部位累积较少, 从高到低大致顺序为枝皮 > 去皮枝茎 > 带皮小枝, 带皮小枝药材较为细小, 推测异长春花苷内酰胺的积累可能与生长周期相关。

## 2.5 指纹图谱方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 取供试品带皮小枝溶液 (S25) 适量, 按“2.3”项下色谱条件连续进样测定 6 次。以异长春花苷内酰胺峰为参照峰 (S), 计算各共有峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.07%~0.51%, 相对峰面积的 RSD 为 0.25%~2.10%, 表明该方法精密度良好。

**2.5.2 稳定性考察** 取供试品带皮小枝溶液 (S25) 适量, 分别制备后在室温下放置 2、4、8、10、12、24 h 时按“2.3”项下色谱条件进样测定。以异长春花苷内酰胺峰为参照峰 (S), 计算各共有峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,

表 2 3 批次胆木中异长春花苷内酰胺含量

Table 2 Results of content determination of strictosamide

部位	异长春花苷内酰胺/(mg·g <sup>-1</sup> )	平均值/(mg·g <sup>-1</sup> )
根皮 1-1	47.32	38.72±8.37
根皮 1-2	48.07	
根皮 2-1	39.37	
根皮 2-2	39.51	29.71±2.17
根皮 3-1	29.01	
根皮 3-2	29.05	
去皮根茎 1-1	28.67	17.77±2.41
去皮根茎 1-2	29.29	
去皮根茎 2-1	27.83	
去皮根茎 2-2	27.64	15.33±4.64
去皮根茎 3-1	32.41	
去皮根茎 3-2	32.38	
叶 1-1	21.36	12.22±0.93
叶 1-2	20.27	
叶 2-1	15.95	
叶 2-2	15.93	12.54±5.54
叶 3-1	16.33	
叶 3-2	16.77	
去皮茎干 1-1	12.59	12.41±2.58
去皮茎干 1-2	12.11	
去皮茎干 2-1	12.38	
去皮茎干 2-2	12.36	10.88±1.75
去皮茎干 3-1	22.14	
去皮茎干 3-2	20.40	
带皮茎干 1-1	12.29	4.93±0.31
带皮茎干 1-2	12.33	
带皮茎干 2-1	13.15	
带皮茎干 2-2	13.26	4.77
带皮茎干 3-1	11.08	
带皮茎干 3-2	11.21	
茎皮 1-1	19.72	4.65
茎皮 1-2	19.98	
茎皮 2-1	8.48	
茎皮 2-2	8.57	4.63
茎皮 3-1	9.86	
茎皮 3-2	9.81	
枝皮 1-1	15.57	4.93
枝皮 1-2	15.30	
枝皮 2-1	11.94	
枝皮 2-2	12.26	4.77
枝皮 3-1	9.79	
枝皮 3-2	9.61	
去皮枝茎 1-1	11.18	4.65
去皮枝茎 1-2	11.14	
去皮枝茎 2-1	8.90	
去皮枝茎 2-2	8.71	4.63
去皮枝茎 3-1	12.57	
去皮枝茎 3-2	12.58	
带皮小枝 1-1	5.31	4.93
带皮小枝 1-2	5.31	
带皮小枝 2-1	4.65	
带皮小枝 2-2	4.63	4.77
带皮小枝 3-1	4.93	
带皮小枝 3-2	4.77	

各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.31%，相对峰面积的 RSD 为 0.53%~2.66%，表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

**2.5.3 重复性考察** 取供试品带皮小枝药材粉末 (S25) 约 0.5 g，精密称定，平行 6 份，分别按“2.1”项下方法制备供试品溶液，再按“2.3”项下色谱条件进样测定。以异长春花苷内酰胺色谱峰为参照峰 (S)，计算各共有峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积。结果，各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.42%，相对峰面积的 RSD 为 0.59%~2.51%，表明该方法重复性良好。

**2.6 指纹图谱的建立**

**2.6.1 胆木指纹图谱的建立及共有峰的确切** 取 3 批胆木 9 部位药材粉末各 0.5 g，分别按照“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进行测定，获取 3 批胆木 9 部位指纹图谱，见图 1。将 3 批次 9 部位胆木药材色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”，以 1 号根皮为参照图谱，采用中位数法多点校正后进行匹配，生成对照特征图谱，按照峰面积大于最高峰峰面积 0.1% 和分离度大于 1.5 的条件共选定了 10 个共有峰。由于 10 号色谱峰 (即含量最高的异长春花苷内酰胺) 峰面积过大，而其他峰峰面积均较小，为了避免 10 号峰贡献率太高，掩盖峰面积较小的峰的差异而导致分析结果的误差，因此后续分析中剔除了 10 号色谱峰。以对照图谱为参照进行相似度评价，9 部位总体相似度为 0.837~0.999，表明不同批次不同部位胆木之间相似度较高。

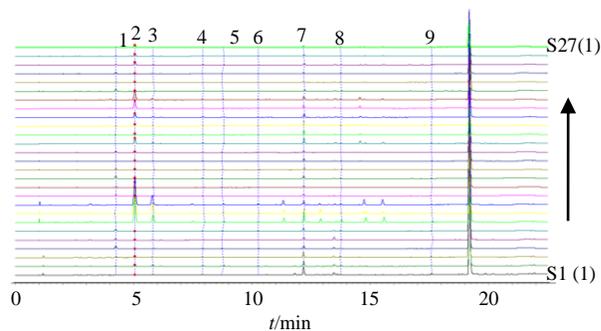


图 1 胆木的 UPLC 特征指纹图谱

Fig. 1 UPLC feature maps of three batches of nine parts of *N. officinalis*

**2.6.2 主要色谱峰的指认** 采用对照品对各峰进行指认，共指认出 4 个成分，1 号峰马钱苷酸，2 号峰绿原酸，4 号峰獐牙菜苷，10 号峰异长春花苷内酰胺，见图 2。

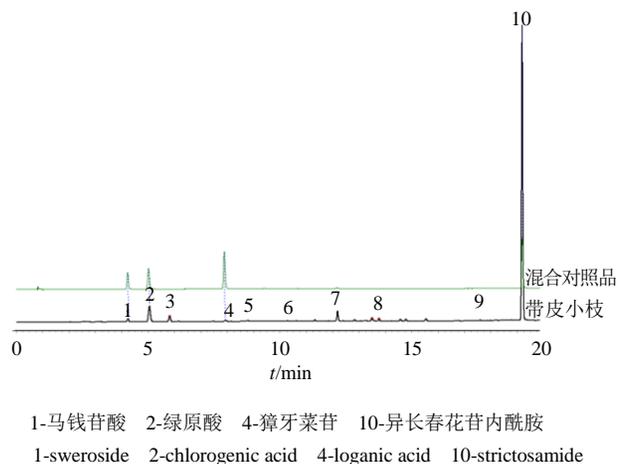


图 2 胆木对照特征图谱

Fig. 2 Comparison feature maps of three batches of nine parts of *N. officinalis*

**2.7 化学模式识别**

**2.7.1 聚类分析** 将 9 个共有峰峰面积导入 SPSS 20.0 软件，以平方欧氏距离 (Euclidean 距离) 为区间，采用 Ward 联结法对 3 批次 9 部位胆木样品进行聚类分析，结果如图 3 所示，可以看出当平方欧氏距离为 10 时，9 部位可以被聚为 3 类：3 批叶 (S7~S9) 聚为一类；3 批根皮 (S1~S3)、3 批茎皮 (S16~S18)、3 批枝皮 (S19~S21) 聚为一类；3 批带皮茎干 (S13~S15)、3 批带皮小枝 (S25~S27)、

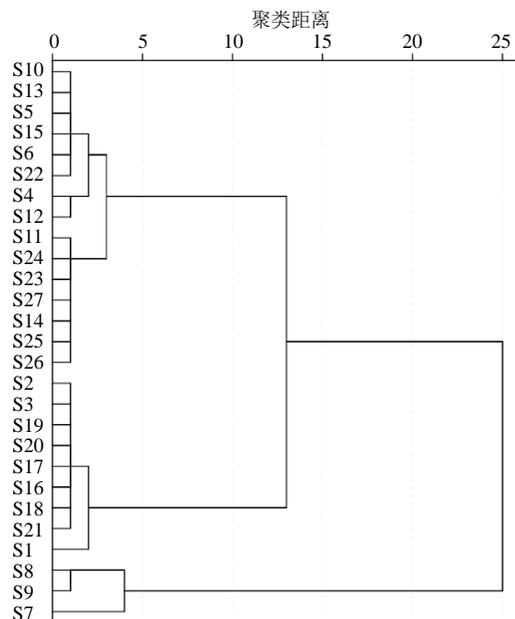


图 3 3 批次 9 部位胆木聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis tree of three batches of nine parts of *N. officinalis*

批去皮根茎 (S4~S6)、3批去皮茎干 (S10~S12)、3批去皮枝茎 (S22~S24) 聚为一类。

**2.7.2 主成分分析** 将3批次9部位胆木样品的9个共有峰峰面积导入SIMCA 14.1软件进行主成分分析。由主成分分析结果可知,前3个主成分的累积贡献率为88.2%,前3个成分载荷值分别为4.830、2.110、0.997,说明前3个主成分基本能反映3批次9部位胆木样品的主要特征,见表3、图4。以前3个主成分建立坐标系,构建样品的主成分分析得分图,见图5,由得分图可知3批次9部位胆木可聚为3类,3批叶 (S7~S9)聚为一类;3批根皮 (S1~S3)、3批茎皮 (S16~S18)和3批枝皮 (S19~S21)聚为一类;3批带皮茎干 (S13~S15)、3批带皮小枝 (S25~S27)、3批去皮根茎 (S4~S6)、3批去皮茎干 (S10~S12)、3批去皮枝茎 (S22~S24)聚为一类,与聚类分析结果一致。

**2.7.3 偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)** 为了进一步比较3批次9部位胆木化学成分的差异和寻找各部位之前的差异性化合物,将3批次胆木9部位9个共有峰峰面积为变量进行了OPLS-DA建模分析。OPLS-DA模型中, $R^2_X$ 为0.77, $Q^2$ 为0.852,均大于0.5,说明建立的模型稳定可靠。由OPLS-DA得分图见图6,3批次9部位胆木明显分为3类。通过变量重要性投影值 (variable importance for the projection, VIP) 筛选出三者间化学成分差异的主要标志性成分,见图7,横坐标为峰号。以VIP部

表3 主成分特征值

Table 3 Principal component eigenvalue					
主成分	$R^2_X$	$R^2_X(\text{cum})$	特征值	$Q^2$	$Q^2(\text{cum})$
1	0.537	0.537	4.830	0.370	0.370
2	0.234	0.771	2.110	0.185	0.486
3	0.111	0.882	0.997	0.031	0.502

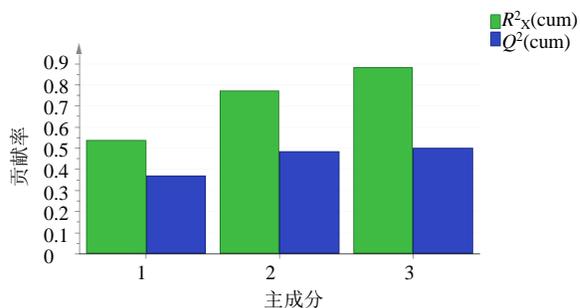


图4 主成分方差贡献率

Fig. 4 Variance contribution rate of principal component

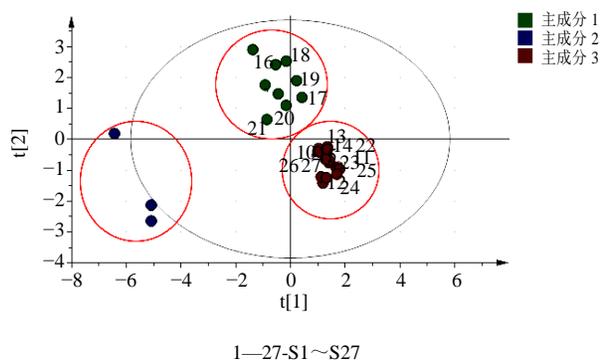


图5 主成分得分分析图

Fig. 5 Score analysis diagram of principal component

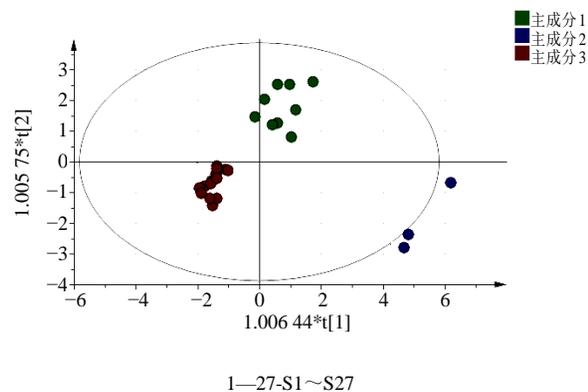


图6 3批次9部位胆木 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA scores of three batches of nine parts of *N. officinalis*

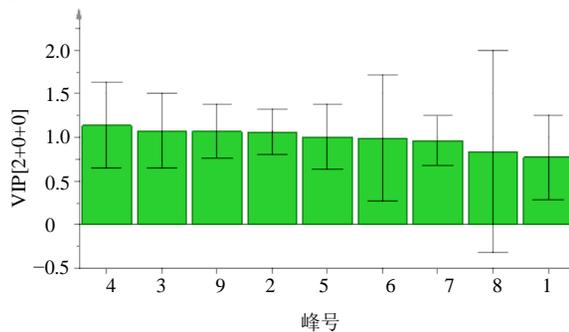


图7 3批次9部位胆木 VIP 图

Fig. 7 VIP map of three batches of nine parts of *N. officinalis*

值大于1作为标准筛选,贡献依次由大到小的4个变量为峰4、3、9、2、5。通过对照品对照,指认出2个成分,分别为峰4獐牙菜苷,峰2绿原酸。

**2.8 胆木药材不同部位的差异性分析**

在聚类分析中将所有样本聚为3类,聚类I: 3批次叶;聚类II: 3批皮部位 (根皮、茎皮、枝皮);聚类III: 带皮部位 (带皮茎干、带皮小枝) 和去皮位 (去皮根茎、去皮茎干、去皮枝茎) 聚为一类。

叶部位在聚类分析中与其他部位得到了区分,而在聚类 II、聚类 III 中尚未能将根、茎、枝来源进行区分,拟在此基础上采用特征峰予以分析,将根、茎、枝来源进行区分。

**2.8.1 皮部位分析** 将3批次胆木药材皮部位(根皮、枝皮、茎皮)色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”,进行共有峰匹配,确定22个共有峰,为了避免最高峰贡献率太高,掩盖峰面积较小的峰的差异而导致分析结果的误差,分析中剔除了最高峰,见图8。

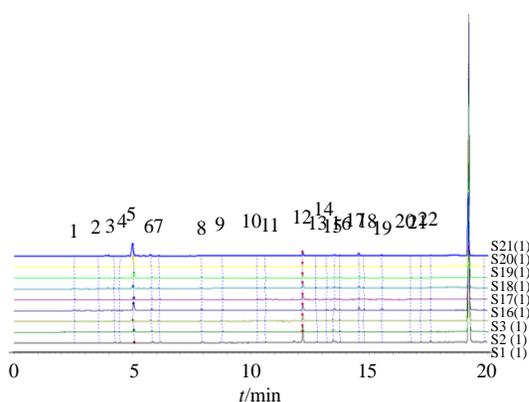


图8 3批次胆木皮部位 UPLC 特征图谱

Fig. 8 UPLC feature maps of three batches of bark parts of *N. officinalis*

将3批次胆木皮部位样品的22个共有峰峰面积导入SIMCA 14.1软件进行主成分分析。由主成分分析结果可知,皮部位前4个主成分的累积贡献率为89.0%,前4个成分载荷值分别为4.020、1.840、1.140、1.020,说明前4个主成分基本能反映3批次胆木皮部位样品的主要特征,见表4;以皮部位前4个主成分建立坐标系,构建样品的主成分分析得分图,见图9,由得分图可知根皮(S1~S3)、茎皮(S16~S18)和枝皮(S19~S21)混在一起无法区分开来。为了进一步将胆木皮部位区分开来,将3批次皮部位胆木药材所有峰峰面积化为分类数据,即相同保留时间下若存在色谱峰则设为1,若不存在色谱峰则设为0,导入SIMCA 14.1软件进行主成分分析。由主成分分析结果可知,皮部位前4个主成分的累积贡献率为79.7%,前4个成分载荷值分别为3.600、1.590、1.120、0.850,说明前4个主成分基本能反映3批次胆木皮部位样品的主要特征,见表5。以皮部位前4个主成分建立坐标系,构建样品的主成分分析得分图,见图10,由得分图可知根皮(S1~S3)聚为一类,茎皮(S16~S18)和枝皮(S19~

表4 基于共有峰分类数据的皮部位主成分特征值及方差贡献率

Table 4 Principal component eigenvalue and variance contribution rate of bark parts based on common peak classification data

主成分	$R^2_x$	$R^2_x(\text{cum})$	特征值	$Q^2$	$Q^2(\text{cum})$
1	0.446	0.446	4.020	0.003	0.003
2	0.204	0.651	1.840	0.025	0.027
3	0.126	0.777	1.140	-0.078	-0.049
4	0.113	0.890	1.020	0.270	0.235

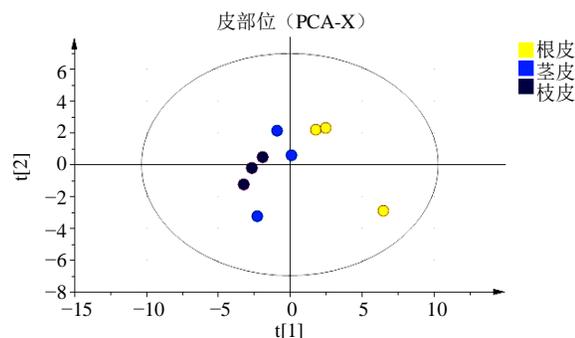


图9 基于共有峰分类数据的皮部位主成分得分分析图

Fig. 9 Score analysis diagram of principal component of bark parts based on common peak classification data

表5 基于色谱峰分类数据的皮部位主成分特征值及方差贡献率

Table 5 Principal component eigenvalue and variance contribution rate of bark parts based on chromatographic peak classification data

主成分	$R^2_x$	$R^2_x(\text{cum})$	特征值	$Q^2$	$Q^2(\text{cum})$
1	0.400	0.400	3.600	0.194	0.194
2	0.177	0.577	1.590	-0.042	0.160
3	0.125	0.702	1.120	-0.207	0.076
4	0.095	0.797	0.850	-0.220	-0.017

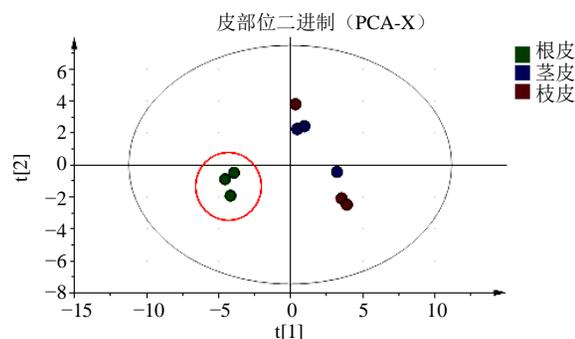


图10 基于色谱峰分类数据的皮部位主成分得分分析图

Fig. 10 Score analysis diagram of principal component of bark parts based on chromatographic peak classification data

S21) 无法区分开来。

结合色谱图分析差异性, 由根皮、枝皮、茎皮色谱图(图 11)可知, 峰 a、d 为枝皮和茎皮特有峰, 峰 b、c、e、f、g、h、i、j 为根皮特有峰, 根皮能够显著区别于枝皮和茎皮, 而枝皮和茎皮之间没有特异性峰, 无法靠特异峰区分开来, 与 PCA 分析结果一致。

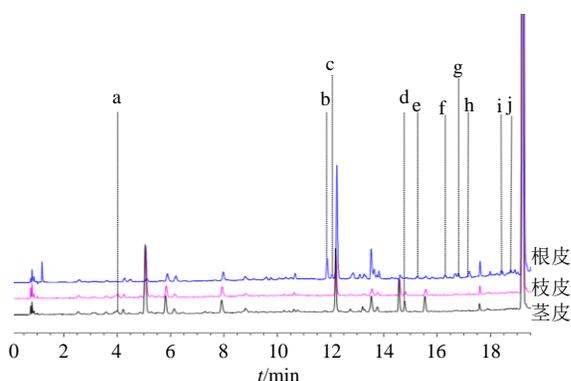


图 11 胆木皮部位特征图谱

Fig. 11 Fingerprint of bark parts of *N. officinalis*

**2.8.2 去皮部位分析** 将 3 批次胆木药材去皮部位(去皮根茎、去皮枝茎、去皮茎干)色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”, 进行共有峰匹配, 确定 18 个共有峰, 为了避免最高峰贡献率太高, 掩盖峰面积较小的峰的差异而导致分析结果的误差, 分析中剔除了最高峰, 见图 12。

将 3 批次胆木去皮部位样品的 18 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析。由主成分分析结果可知, 去皮部位前 4 个主成分的累积贡献率为 84.3%, 前 4 个成分载荷值分别为 3.510、2.020、1.240、0.820, 说明前 4 个主成分基本能反

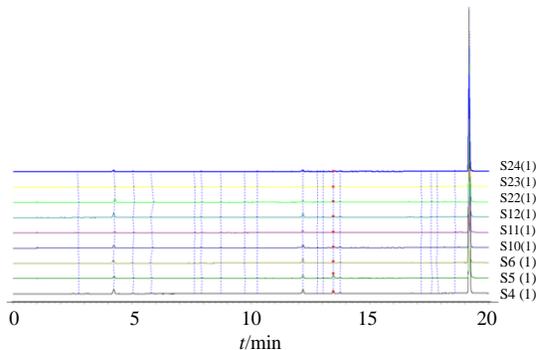


图 12 3 批次胆木去皮部位 UPLC 特征图谱

Fig. 12 UPLC feature maps of three batches of peeled parts of *N. officinalis*

映 3 批次胆木去皮部位样品的主要特征, 见表 6; 以去皮部位前 4 个主成分建立坐标系, 构建样品的主成分分析得分图, 见图 13, 由得分图可知 3 批去皮根茎(S4~S6)聚为一类, 3 批去皮枝茎(S22~S24)聚为一类, 而去皮茎干(S10~S12)混于二者之间, 表明去皮根茎和去皮枝茎化学成分及含量存在较大差异, 而去皮茎干无法和其他两者区分开来。为了进一步将胆木去皮部位区分开来, 将 3 批次去皮部位胆木药材所有峰峰面积化为分类数据, 即相同保留时间下若存在色谱峰则峰面积定为 1, 不存在色谱峰则峰面积定为 0, 导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析。由主成分分析结果可知, 去皮部位前 4 个主成分的累积贡献率为 84.1%, 前 4 个成分载荷值分别为 3.540、2.000、1.280、0.760, 说明前 4 个主成分基本能反映 3 批次胆木去皮部位样品的主要特征, 见表 7。以去皮部位前 4 个主成分建立坐标系, 构建样品的主成分分析得分图, 见图 14, 由得分图可知 3 批去皮根茎(S4~S6)聚为一类, 3 批去皮茎干(S10~S12)和 3 批去皮枝茎(S22~S24)聚为一类, 表明去皮根茎与去皮茎干

表 6 基于共有峰分类数据的去皮部位主成分特征值及方差贡献率

Table 6 Principal component eigenvalue and variance contribution rate of peeling parts based on common peak classification data

主成分	$R^2_x$	$R^2_x(\text{cum})$	特征值	$Q^2$	$Q^2(\text{cum})$
1	0.390	0.390	3.510	0.101	0.101
2	0.225	0.615	2.020	0.018	0.118
3	0.137	0.752	1.240	-0.027	0.094
4	0.091	0.843	0.820	-0.325	0.003

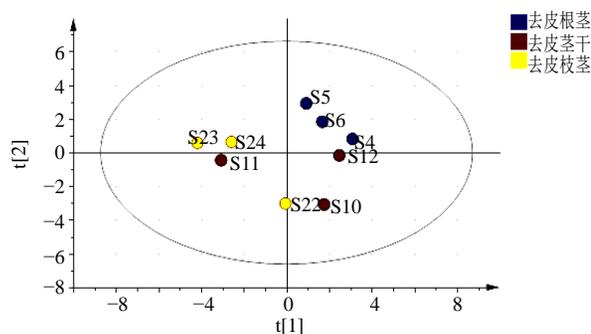


图 13 基于共有峰分类数据的去皮部位主成分得分分析图

Fig. 13 Score analysis diagram of principal component of peeling parts based on common peak classification data

表7 基于色谱峰分类数据的去皮部位主成分特征值及方差贡献率

Table 7 Principal component eigenvalue and variance contribution rate of peeling parts based on chromatographic peak classification data

主成分	$R^2_x$	$R^2_x(\text{cum})$	特征值	$Q^2$	$Q^2(\text{cum})$
1	0.393	0.393	3.540	0.103	0.103
2	0.222	0.615	2.000	0.044	0.142
3	0.142	0.757	1.280	-0.026	0.120
4	0.084	0.841	0.760	-0.100	0.032

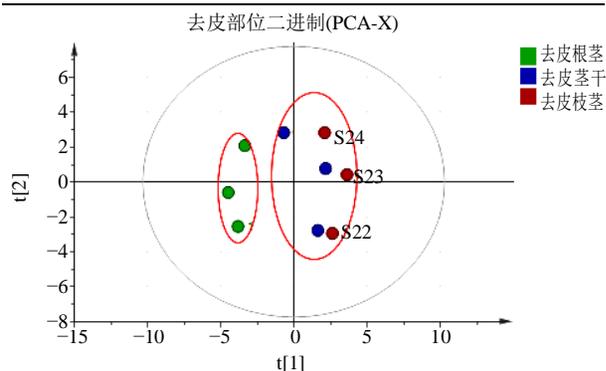


图14 基于色谱峰分类数据的去皮部位主成分得分分析图  
Fig. 14 Score analysis diagram of principal component of peeling parts based on chromatographic peak classification data

和去皮枝茎化学成分及含量存在较大差异，而去皮茎干无法和去皮枝茎区分开来。结合色谱图分析差异性，将第一批去皮枝茎、去皮根茎、去皮茎干叠加后放大，见图15，峰b、d、f、g为去皮枝茎和去皮茎干的特有峰，峰e为去皮根茎的特有峰，去皮根茎能显著区别于去皮枝茎和去皮茎干，与主成分分析结果一致。

尽管色谱图显示，与去皮茎干部位相比，去皮枝茎有少量特有的色谱峰，但以共有峰数据和色谱峰分类化数据进行主成分分析，去皮茎干部位与去皮枝茎部位均有较好的相似性。

**2.8.3 带皮部位分析** 将3批次胆木药材带皮部位(带皮小枝、带皮茎干)色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”，进行共有峰匹配，确定了20个共有峰，为了避免最高峰贡献率太高，掩盖峰面积较小的峰的差异而导致分析结果的误差，分析中剔除了最高峰，见图16。

将3批次胆木带皮部位样品的20个共有峰峰面积导入SIMCA 14.1软件进行主成分分析。由主成分分析结果可知，带皮部位前3个主成分的累积贡献率为86.5%，前3个成分载荷值分别为3.080、

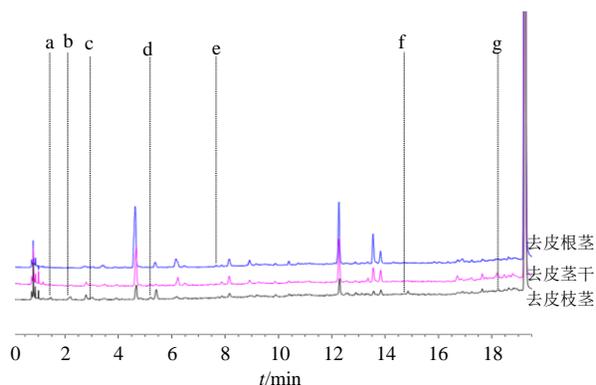


图15 胆木去皮部位特征图谱  
Fig. 15 Fingerprint of peeled parts of *N. officinalis*

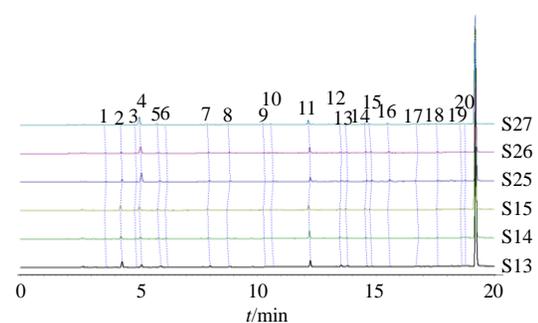


图16 3批次胆木带皮部位UPLC特征图谱  
Fig. 16 UPLC feature maps of three batches of parts with skin of *N. officinalis*

1.360、0.750，说明前3个主成分基本能反映3批次胆木带皮部位样品的主要特征，见表8。以带皮部位前3个主成分建立坐标系，构建样品的主成分分析得分图，见图17，由得分图可知3批带皮茎干(S13~S15)聚为一类，3批带皮小枝(S25~S27)聚为一类，表明带皮茎干和带皮小枝化学成分及含量存在较大差异。

### 3 讨论

#### 3.1 提取方法及时间考察

以异长春花苷内酰胺的提取率为指标对提取方式、提取溶剂、提取时间进行了考察。先考察了甲醇回流提取和超声提取的区别，结果发现对于主成

表8 带皮部位主成分特征值及方差贡献率

Table 8 Principal component eigenvalue and variance contribution rate of parts with skin

主成分	$R^2_x$	$R^2_x(\text{cum})$	特征值	$Q^2$	$Q^2(\text{cum})$
1	0.513	0.513	3.080	0.226	0.226
2	0.227	0.740	1.360	0.018	0.239
3	0.125	0.865	0.750	-0.450	0.163

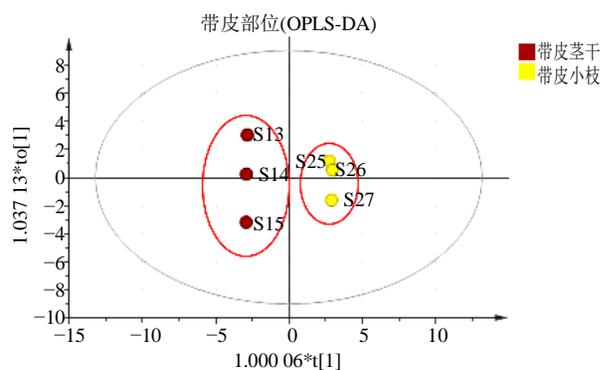


图 17 带皮部位主成分得分分析图

Fig. 17 Score analysis diagram of principal component of parts with skin

分异长春花苷内酰胺而言, 甲醇超声组与甲醇回流组峰面积差异不大, 故选择采用超声的方式进行提取。然后比较了水超声和甲醇超声提取的区别, 对于主成分异长春花苷内酰胺而言, 甲醇超声提取率明显高于水提, 峰面积约是水提的 1.5 倍, 因为要测定异长春花苷内酰胺含量, 决定提取溶剂为甲醇。接着考察了不同超声时间的区别, 对比了超声 30 min 和超声 45 min 的区别, 结果发现随超声时间延长, 主成分异长春花苷内酰胺和其他各高峰峰面积变化不大, 平行性良好, 决定超声时间为 30 min。

### 3.2 色谱条件的考察

本实验也考察了不同流动相洗脱时的分离结果, 对比了 0.1% 甲酸和 0.1% 磷酸洗脱时色谱峰的差异, 综合考虑色谱峰峰形较好且基线较为平稳, 最终确定流动相为 0.1% 磷酸。然后以 0.1% 磷酸为流动相分别比较 226、240、258、285 nm 下样品以及甲醇的色谱图, 考察不同波长下溶剂甲醇对样品色谱图出峰结果的影响, 结果发现, 258 nm 与 285 nm 下各峰面积均较低, 226 nm 下溶剂峰干扰较为显著, 影响后续指纹图谱工作的进行, 为了尽可能获得较全、小峰较高的指纹图谱且降低溶剂峰的干扰, 最终确定检测波长为 240 nm。

本研究以胆木不同部位药材为对象, 建立了不同部位胆木药材的 UPLC 指纹图谱及 UPLC 测定异长春花苷内酰胺含量的方法, 该方法耗时短、效率高、方法学验证合格。通过分析, 9 部位总体可分为 3 大类, 分别为皮部位、叶部位、带皮和去皮部位, 3 大类之间化学成分和含量存在较大差异。皮部位细分后可分为 2 大类, 根皮一类, 茎皮和枝皮一类, 2 大类之间化学成分和含量存在较大差异,

色谱图分析结果显示根皮显著区别于茎皮和枝皮, 而茎皮和枝皮无法通过色谱图分开。去皮部位细分后可分为 2 大类, 去皮根茎一类, 去皮枝茎和去皮茎干一类, 2 大类之间化学成分和含量存在较大差异, 色谱图分析结果显示去皮根茎显著区别于去皮枝茎和去皮茎干, 同时去皮枝茎和去皮茎干可以靠特征峰分开。带皮部位细分后可分为 2 大类, 分别为带皮小枝和带皮茎干, 2 大类之间化学成分和含量存在较大差异, 聚类分析及主成分分析结果可为胆木的用药部位的差异性比较提供参考。

皮部位和去皮部位主成分分析时采用了将所有色谱峰峰面积化为分类数据进行分析的方法, 现存文献多以共有峰进行主成分分析, 如钟海蓉等<sup>[12]</sup>建立了不同产地不同部位川赤芍根、茎、叶的 UPLC 指纹图谱, 共标定了 17 个共有峰, 结果显示川赤芍各部位的化学成分极为相似, 且茎和叶化学成分含量较接近, 说明不同产地川赤芍根药材质量存在显著差异。洪婉敏等<sup>[13]</sup>对不同部位仙鹤草地上部分、茎、叶建立了指纹图谱, 各标定了 20、16、14 个共有峰, 结果显示仙鹤草叶可大致聚为一类, 地上部分与茎多聚为一类, 表明仙鹤草地上部分与茎化学成分较接近, 而与叶的化学成分差异相对较大。吴佳等<sup>[14]</sup>建立了不同部位藤茶普叶和龙须的指纹图谱, 确定了 10 个普叶中共有峰和 12 个龙须中共有峰, 结果显示, 藤茶不同部位即龙须和普叶组间差异远大于组内差异, 龙须和普叶分类明显。与现存文献中普遍使用的共有峰 PCA 法相比, 将所有色谱峰转化为分类数据进行分析能更好的体现差异性。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 624.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 1978: 424.
- [3] 广东省中药材标准 [S]. 第一册. 2004: 154-155.
- [4] 张志远, 陈家全, 王慧, 等. 自动纯化系统纯化和制备胆木中 4 种生物碱类化合物 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(2): 463-466.
- [5] 柳庆龙, 陈阿虹, 唐进英, 等. 胆木枝叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 52-57.
- [6] 戚卫蕊, 王德立, 冯锦东, 等. 南药胆木的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(16): 111-113.
- [7] 麦世瑛, 王怡然, 李永辉, 等. 中药胆木化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 广州化工, 2018, 46(16): 38-41.

- [8] 李娜, 曹亮, 丁岗, 等. 异长春花苷内酰胺抗菌、抗病毒作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 170-174.
- [9] 苏真真, 李娜, 曹亮, 等. 异长春花苷内酰胺注射给药对心血管系统影响的实验研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(7): 1558-1564.
- [10] 张钰昕, 周明艳, 谢振蕊, 等. 不同生长年限和同一年度不同月份胆木化学成分含量研究 [J]. 海南医学院学报, 2021, 27(12): 936-942.
- [11] Zhou M Y, Xie Z R, Guan W W, *et al.* Comparative analysis of bioactive constituents and pharmacological activities from different parts of *Nauclea officinalis* [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35(12): e5214.
- [12] 钟海蓉, 张绍山, 肖芳, 等. 基于 UPLC 法测定指标成分结合指纹图谱评价不同产地川赤芍不同部位的质量 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 2062-2071.
- [13] 洪婉敏, 孙冬梅, 纪玉华, 等. 仙鹤草不同药用部位 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34(6): 46-51.
- [14] 吴佳, 叶文卉, 卢宗元, 等. 藤茶不同部位指纹图谱及其差异研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9): 1507-1514.

[责任编辑 时圣明]