

基于指纹图谱结合化学模式识别对狗脊药材的质量评价

贾天宁^{1,2,3}, 刘芳^{1,2}, 陈鹏^{1,2}, 李先宽³, 马琳^{3*}, 黄钦华⁴

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381

2. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381

3. 天津中医药大学, 天津 301617

4. 厦门医学院附属第二医院, 福建 厦门 361021

摘要: 目的 采用指纹图谱结合聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法-判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)等进行化学模式识别,对狗脊药材指纹图谱数据进行分析,筛选特征性指标成分并以此建立狗脊有效成分的定量分析,为狗脊质量控制提供科学依据。方法 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm),以甲醇-1%醋酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,体积流量为 1.0 mL/min,柱温为 30 °C,检测波长为 280 nm, HPLC 法建立 9 个产地 16 批样品狗脊的指纹图谱,运用相似度分析、HCA、PCA 和 PLS-DA 等化学模式识别技术筛选出不同产地狗脊化学成分的特征成分作为狗脊有效成分,并定量分析。结果 16 批狗脊 HPLC 指纹图谱标定 10 个共有峰,相似度在 0.695~0.954;通过 HCA、PCA 和 PLS-DA 较好的区分各产地狗脊,综合分析筛选 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、原儿茶醛、紫云英苷 4 个成分作为狗脊有效成分,质量分数分别在 0.022 8%~1.339 4%、0.006 2%~0.713 3%、0.020 0%~0.234 5%、0.011 2%~0.106 5%。特征图谱和含量测定结果显示广西产地狗脊药材质量较优。结论 该研究建立的狗脊药材指纹图谱及含量测定方法稳定、可靠,重现性好,可为全面评价狗脊药材质量提供参考。

关键词: 狗脊; 指纹图谱; 相似度; 化学模式识别; 5-羟甲基糠醛; 原儿茶酸; 原儿茶醛; 紫云英苷

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)24-8214-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.026

Evaluation of quality markers of *Cibotii Rhizoma* based on fingerprint and chemical pattern recognition

JIA Tian-ning^{1,2,3}, LIU Fang^{1,2}, CHEN Peng^{1,2}, LI Xian-kuan³, MA Lin³, HUNG Qin-huang⁴

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

4. The Second Affiliated Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen 361021, China

Abstract: Objective To analyze the fingerprint data of Gouji (*Cibotii Rhizoma*, CR) using chemical pattern recognition technology, screen the characteristic index components and conduct quantitative analysis, hoping to provide scientific basis for the quality control of CR. **Methods** HPLC was used to establish fingerprints of 16 batches of CR samples from nine producing areas. Chemical pattern recognition techniques such as similarity analysis, cluster analysis, principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used to screen out the characteristic chemical components of CR among different regions as quality markers, and the quantitative analysis was carried out. **Results** A total of ten common peaks were identified from HPLC fingerprints of 16 batches of CR samples, and the similarity was between 0.695—0.954. A variety of chemical pattern recognition techniques were used to distinguish CR from different producing areas. After comprehensively analysis, four components including 5-HMF, protocatechuic acid, protocatechualdehyde and astragaloside were screened out as Q-Markers of CR, and the mass fractions were

收稿日期: 2023-07-08

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-QIN-46); 天津市道地药材生态种植及质量保障项目(2022)

作者简介: 贾天宁, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量控制研究。E-mail: 308594915@qq.com

*通信作者: 马琳, 教授, 硕士生导师。E-mail: malin7983@163.com

0.022 8%—1.339 4%, 0.006 2%—0.713 3%, 0.020 0%—0.234 5%, 0.011 2%—0.106 5%, respectively. The results of characteristic fingerprint and content determination showed that the quality of CR from Guangxi was superior. **Conclusion** The fingerprint and content determination method established in this study are stable, reliable and reproducible, which can provide a reference for the comprehensive evaluation of the quality of CR.

Key words: *Cibotii Rhizoma*; fingerprint; similarity analysis; chemical pattern recognition; 5-HMF; protocatechuic acid; protocatechualdehyde; astragaloside

狗脊为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. 的干燥根茎, 别名“金毛狗脊”。主产于广西、广东、福建、湖北等地, 具有祛风湿、补肝肾、强腰膝之功效。临床上可治疗风湿痹痛、腰膝酸软、下肢无力等症状^[1]。近年来对狗脊化学成分研究发现其化学成分主要有蕨素类, 水溶性酚酸类、鞣质、淀粉、挥发油、糖及糖苷类等化合物^[2]。本课题组对国家中药标准化项目一生血宝合剂标准化建设进行研究, 狗脊是生血宝七味药之一, 对狗脊进行质量控制不可忽视。《中国药典》2020 年版^[3], 仅对其原儿茶酸这单一指标进行含量测定, 也曾有文献对狗脊中原儿茶醛等 5 个成分进行含量测定^[4], 但中药成分复杂, 无论是单一成分或多成分测定, 都难以全面反映狗脊整体质量的优劣。而指纹图谱在中药分析方面具有整体、灵敏反映样品特征的优点, 结合化学模式识别对指纹图谱进行数据降维、识别和分类, 寻找药材间的差异性, 用于筛选质量差异标志物。查阅文献发现, 狗脊的指纹图谱和化学模式识别的文献较少, 故本实验以狗脊为研究对象, 通过高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱结合化学模式识别技术整合分析指纹图谱中提取共有峰的面积数据, 得到不同产地的特征化学成分并含量测定, 建立狗脊有效成分以期作为狗脊的质量标准研究、相关制剂的质量控制以及资源开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪 Shimadzu SPD-20AT, 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); AB135-S 型十万分之一电子分析天平 (Mettler Toledo 公司); KQ5200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品 5-羟甲基糠醛 (批号 20051201)、原儿茶醛 (批号 20082402)、原儿茶酸 (批号 20082901)、紫云英苷 (批号 19042203) 成都曼思特生物科技有

限公司; 咖啡酸 (批号 110885-201703) 中国食品药品检定研究所, 质量分数均 ≥ 98%。分析纯甲醇购自天津市化学试剂供销公司, 色谱纯甲醇购自美国 Sigma 公司, 冰醋酸 (分析纯, 天津市化学试剂供销公司), 水为娃哈哈纯净水。

1.3 药材

狗脊药材采自广东、广西、浙江、福建等, 共 16 批次。经天津中医药大学马琳教授鉴定为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *C. barometz* (L.) J. Sm. 的干燥根茎。狗脊样品来源见表 1。

表 1 16 批次狗脊来源

Table 1 Sample information of *C. barometz*

编号	产地	编号	产地
S1	广西	S9	云南
S2	广西	S10	云南
S3	浙江	S11	福建
S4	浙江	S12	福建
S5	湖北	S13	四川
S6	贵州	S14	四川
S7	贵州	S15	重庆
S8	广东	S16	重庆

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), 流动相 1% 冰醋酸水溶液 (A) - 甲醇 (B), 流动相梯度洗脱程序为 0~17 min, 93%~85% A; 17~25 min, 85%~76% A; 25~30 min, 76%~74% A; 30~45 min, 74%~65% A; 45~52 min, 65%~40% A; 52~55 min, 40%~10% A; 55~65 min, 10%~93% A; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 检测波长 280 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液制备 分别取对照品 5-羟甲基糠醛 (5-HMF)、原儿茶醛、原儿茶酸、咖啡酸、紫云英苷适量, 精密称定, 置量瓶中, 加入甲醇-1% 冰醋酸水溶液 (70:30) 制成含 5-HMF 679 μg/mL、原儿茶醛 24.0 μg/mL、原儿茶酸 15.0

μg/mL、咖啡酸 42.5 μg/mL、紫云英苷 45.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取本品粉末(过三号筛)约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-1%冰醋酸水溶液(70:30)混合溶液 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 用甲醇-1%冰醋酸水溶液(70:30)混合溶液补足减失的质量, 摇匀, 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一狗脊供试品(S1)溶液, 连续进样 6 次, 进样量 20 μL, 以 5-HMF 为参照峰(S), 计算其他各个特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 考察仪器的精密度, 各特征峰相对保留时间的 RSD 值分别为 0.42%、0.82%、0.54%、0.69%、0.76%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD 值分别为 0.55%、1.29%、0.84%、1.47%、1.53%, 均小于 2.0%。

2.3.2 重复性试验 取同一狗脊供试品(S1), 按“2.2.1”项下制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样测定, 进样量 20 μL, 以 5-HMF 为参照峰(S), 计算其他特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 考察方法的重复性。各特征峰相对保留时间的 RSD 值分别为 0.82%、1.76%、0.73%、0.51%、0.74%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD 值分别为 0.16%、1.57%、1.04%、0.92%、1.24%, 均小于 2.0%。

2.3.3 稳定性试验 取同一狗脊供试品(S1)溶液, 分别于配制后 0、2、5、10、15、24 h 进样测定, 进样量 20 μL, 以 5-HMF 为参照峰, 计算其他特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 考察供试品溶液的稳定性, 各特征峰相对保留时间的 RSD 值分别为 0.17%、0.72%、1.01%、1.02%、1.25%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD 值分别为 0.62%、0.73%、0.89%、1.41%、1.85%, 均小于 2.0%。

2.4 狗脊指纹图谱的建立

2.4.1 狗脊对照指纹图谱的生成 分别精密称定 16 批狗脊样品约 2.0 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版)软件”, 对 16 批狗脊样品 HPLC 图谱进行分析, 以 S1 为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗的宽度默认为 0.1 min, 经过多点校正

之后进行自动匹配, 生成 16 批狗脊药材的 HPLC 指纹图谱和对照图谱(R), 见图 1、2。

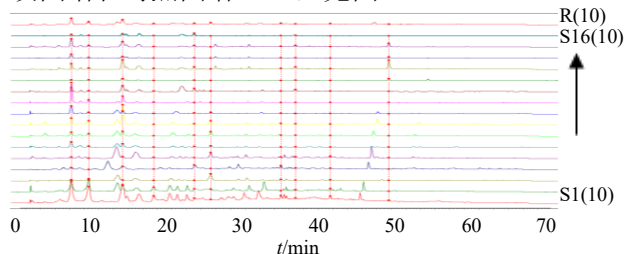


图 1 狗脊 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of *C. barometz*

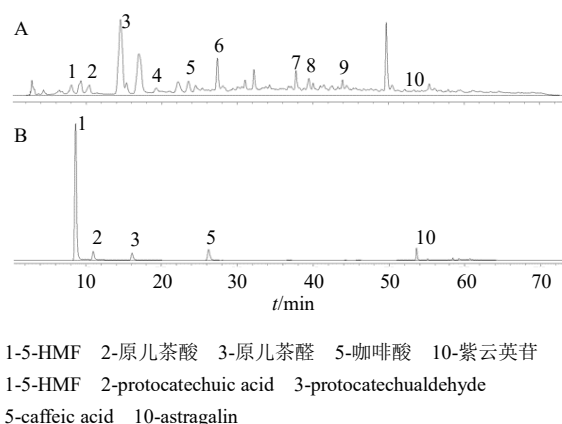


图 2 样品色谱图 (A) 与对照品色谱图 (B)

Fig. 2 Chromatograms of sample (A) and reference (B)

2.4.2 特征峰的指认 16 批狗脊药材有 10 个共有峰, 其中指认 1、2、3、5 和 10 号, 5 个主要特征峰: 分别为 5-HMF, 原儿茶酸, 原儿茶醛, 咖啡酸, 紫云英苷。

2.4.3 相似度评价 对 16 批狗脊样品的指纹图谱进行相似度计算分析, 选取样品中出峰时间稳定、分离度好 5-HMF 作为参照峰(S), 以其保留时间和峰面积为 1, 计算 16 批狗脊样品的共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 2.0%, 相对峰面积的 RSD 在 64.81%~86.64%, 说明不同批次样品中各成分含量差异较大, 相对峰面积结果见表 2。16 批狗脊样品色谱图与对照指纹图谱的相似度在 0.695~0.954, 表明各个产地狗脊差异较大, 这可能与狗脊野生状态种植有关。相似度结果见表 3。

2.5 化学模式识别分析

2.5.1 聚类分析 16 批样品 HPLC 指纹图谱的 10 个共有峰的峰面积导入 SPSS 软件进行系统聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA), 采用组间连接的聚类方法, 以平方欧式距离进行分析, 结

表 2 16 批狗脊指纹图谱相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks in fingerprints of 16 batches of *C. barometz*

样品	相对峰面积									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	1.000 000	0.866 166	0.805 725	0.559 338	0.308 492	0.144 844	0.266 334	0.339 544	0.139 035	0.182 295
S2	1.000 000	0.231 362	0.606 267	0.694 618	0.331 650	0.187 551	0.139 723	0.624 766	0.080 471	0.278 625
S3	1.000 000	0.082 801	0.401 453	0.216 862	0.433 858	0.522 166	0.168 751	0.153 041	0.281 297	0.147 327
S4	1.000 000	0.761 503	3.560 283	0.345 530	0.315 890	0.148 884	0.046 701	0.074 450	0.051 251	0.057 072
S5	1.000 000	0.237 484	1.966 436	0.663 142	0.398 831	0.265 502	0.203 661	0.216 414	0.771 814	0.100 705
S6	1.000 000	0.118 053	0.571 158	0.058 789	0.029 430	0.094 401	0.021 139	0.165 592	0.128 718	0.019 501
S7	1.000 000	0.043 072	0.903 451	0.166 919	0.097 817	0.346 421	0.161 097	0.897 358	0.104 226	0.022 807
S8	1.000 000	0.054 680	0.514 379	0.120 090	0.056 365	0.344 394	0.295 461	0.891 910	0.065 490	0.320 987
S9	1.000 000	0.064 733	0.336 616	0.074 923	0.045 832	0.530 133	0.026 239	0.174 830	0.599 030	0.382 718
S10	1.000 000	0.403 106	0.438 396	0.050 388	0.000 407	0.031 559	0.006 872	0.092 280	0.356 643	0.314 703
S11	1.000 000	0.349 670	2.595 584	0.054 463	0.614 740	0.040 787	0.181 229	0.222 955	0.397 736	0.011 378
S12	1.000 000	0.927 328	4.201 277	0.268 088	0.513 606	0.067 956	0.047 778	0.164 624	0.860 011	0.019 725
S13	1.000 000	0.560 328	2.489 079	0.179 280	0.294 886	0.365 844	0.205 700	0.090 597	0.455 505	0.035 097
S14	1.000 000	0.353 005	2.683 862	0.102 771	0.193 838	0.016 404	0.131 570	0.959 397	0.114 817	0.142 443
S15	1.000 000	0.247 425	0.582 764	0.198 750	0.110 824	0.054 831	0.097 256	0.291 991	0.117 993	0.113 999
S16	1.000 000	0.238 310	1.025 930	0.119 835	0.095 963	0.040 549	0.100 179	0.222 988	0.648 870	0.059 903

表 3 16 批狗脊指纹图谱相似度评价结果

Table 3 Results of similarity evaluation of 16 batches of *C. barometz*

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.954	S9	0.851
S2	0.887	S10	0.824
S3	0.695	S11	0.829
S4	0.829	S12	0.801
S5	0.777	S13	0.848
S6	0.892	S14	0.863
S7	0.908	S15	0.904
S8	0.847	S16	0.918

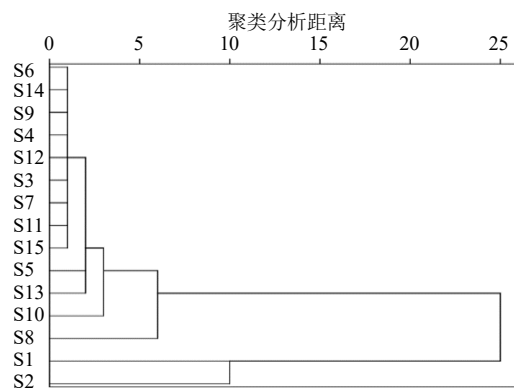


图 3 狗脊样品聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis diagram of *C. barometz* samples

果见图 3。当分类距离 10 时，显示 16 批样品可共聚为两类，其中来自广西的 S1 和 S2 聚为一类，其余地产可聚为一类。

2.5.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 分析 为了进一步区分各不同产地狗脊，将 16 批样品的指纹图谱的 10 个共有峰的峰面积为原始数据导入 SPSS 软件进行处理，进行 PCA。首先，进行降维因子分析，结果显示 KMO 值为 0.773，大于 0.5，表明各变量相关性较好，以特征值大于 1

提取主成分，得到 2 个主要成分，累积方差贡献率为 88.298%，见表 4；其次，用碎石图转折点检验保留主成分个数，进一步说明可提取前 2 个主成分，见图 4。成分矩阵 (表 5) 结果显示，第 1 个主成分信息主要来自 1~7 号峰和 9 号峰，其中 1~3 号峰分别为 5-HMF，原儿茶酸，原儿茶醛，5 号峰为咖啡酸，第 2 个主成分信息主要来自第 10 号峰 (紫云英苷)。最后，将 16 批样品的 10 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件，得到 16 批不同产地样品

表 4 特征值和方差贡献率

Table 4 Eigenvalues and variance contributions

主成分	初始特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
PC1	7.647	76.473	76.473
PC2	1.183	11.825	88.298

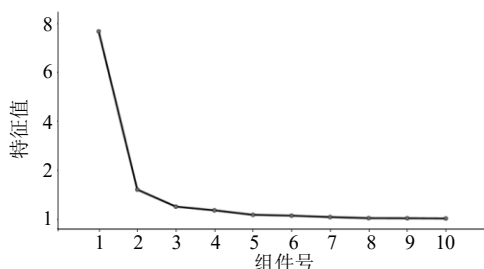


图 4 主成分分析碎石图

Fig. 4 Scree plot of PCA

的主成分得分图, 见图 5, $R^2_X(\text{cum})$ 为 0.75, $Q^2(\text{cum})$ 为 0.645, 说明该模型可靠。结果显示 2 个主成分能反映不同产地狗脊的主要特征, 与上述聚类分析结果一致, 提示不同产地的狗脊在化学成分含量上存在差异。

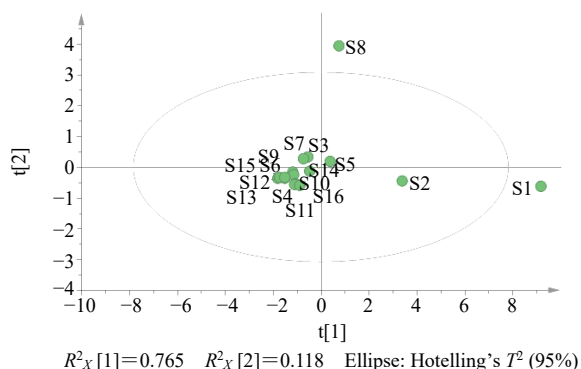


图 5 狗脊 PCA 得分图

Fig. 5 PCA scores of *C. barometz*

初始因子载荷矩阵见表 5, 由表可见, 第 1 主成分主要反映了除峰 8 和 10 的信息, 即原始指标色谱峰 1~7、9 的信息, 第 2 主成分主要反映来自原始指标色谱峰 10 的信息 (载荷值 > 0.7)。其中峰 1 为 5-HMF, 峰 2 为原儿茶酸, 峰 3 为原儿茶醛, 峰 5 为咖啡酸, 峰 10 为紫云英苷。以降维得到的 2 个主成分得分作为 X、Y、Z 轴, 得到 10 个样品的 PCA 得分图, 结果见图 5, S1、S2、S8 均与其他样品偏离, 与聚类分析结果大致相同, 说明广西来源的 2 个样品虽然聚类分析是一类, 但是可能因为生长环境或者采收季节的原因, 经过 PCA 分析, 仍可以将 S1 和 S2 区别开。

表 5 成分矩阵

Table 5 Component matrix

峰号	成分		峰号	成分	
	1	2		1	2
1	0.906	-0.099	6	0.904	0.309
2	0.943	-0.209	7	0.964	0.060
3	0.862	-0.193	8	0.778	0.293
4	0.968	-0.175	9	0.930	-0.056
5	0.965	-0.195	10	0.327	0.914

2.5.3 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 建立 PLS-DA 模型, 可以更好地分析不同产地样本间的组内差异。结果显示, 所有排列在左边的 $R^2(\text{cum})$ 和 $Q^2(\text{cum})$ 值都低于右边的原始点, 并且 $Q^2(\text{cum})$ 点的蓝色回归线有负截距, 说明原始 PLS-DA 模型有效, 确认该分析内容在统计学层面上可信。PLS-DA 得分图及 3D 图, 见图 6、7。结果结果显示 16 批样品可分为 4 组, 广西 2 个样品 S1 和 S2 以及广东样品 S3

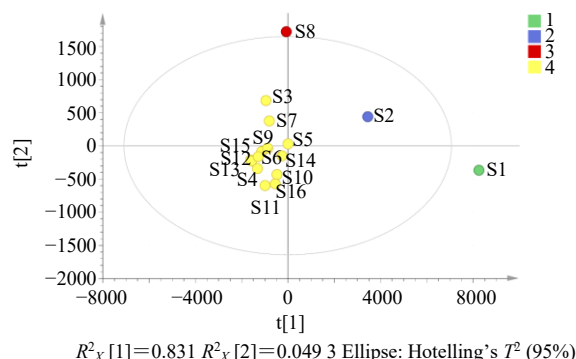


图 6 狗脊样品 PLS-DA 得分图

Fig. 6 PLS-DA scores of *C. barometz*

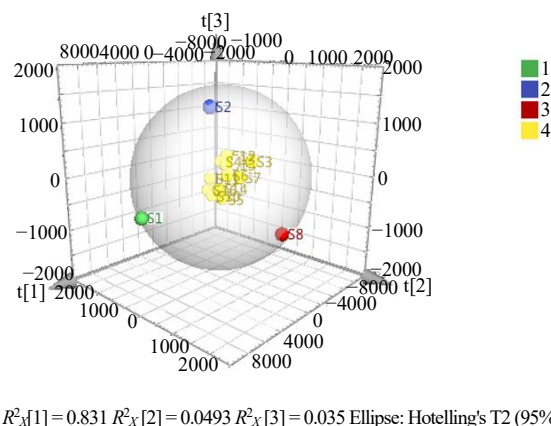


图 7 狗脊样品 PLS-DA 分析 3D 图

Fig. 7 3D image of *C. barometz* by PLS-DA

3个产地各为一组，其余一组。结合变量重要性投影值 (variable importance in projection, VIP) (图 8) 可知 VIP>1 的色谱峰 (数值由高到低) 分别为 2、3、10、8 和 1 号峰 (原儿茶酸、原儿茶醛紫云英苷、未知化合物和 5-HMF)，说明这些化学成分是不同产地狗脊样品的差异性标志物。

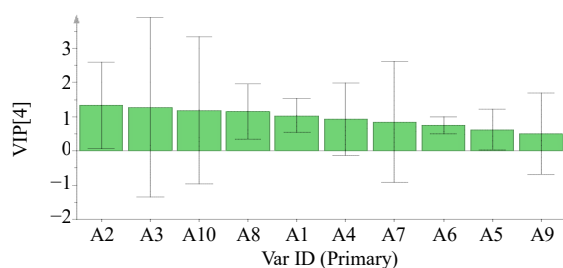


图 8 狗脊样品 PLS-DA 的 VIP 图

Fig. 8 VIP value from PLS-DA load diagram of *C. barometz*

2.6 狗脊中有效成分的含量测定

PCA 分析表明指纹图谱中 1~3、5 号峰是影响不同产地狗脊质量的特征化学成分，分别为 5-HMF、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸，是影响不同产地狗脊质量的特征化学成分。PLS-DA 结果显示，有 5 个成分 VIP>1，分别对应 2 (原儿茶酸)、3 (原儿茶醛)、10 (紫云英苷)、1 (5-HMF) 4 个成分，以及 8 号峰 (未知成分)。说明不同产地这些成分含量差异较大，是产地的差异性特征有效成分，故本实验筛选 5-HMF、原儿茶醛、原儿茶酸、紫云英苷作为狗脊指标性成分进行含量测定。

2.6.1 线性关系考察 精密吸取各对照品储备液适量，吸取“2.2.1”项下对照品溶液混合对照品溶液 1、2、5、15、50、100 μL ，成，按“2.1”项下色谱条件测定 5-HMF、原儿茶醛、原儿茶酸、紫云英苷的峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，计算线性回归方程和相关系数 (r)。结果见表 6。

表 6 对照品的线性方程、相关系数和线性范围

Table 6 Linear equation, correlation coefficient and linear range of reference substance

对照品	线性方程	r	线性范围/ μg
5-HMF	$Y=7.0\times 10^6 X+1.0\times 10^7$	0.999 1	0.679 0~67.9
原儿茶酸	$Y=972\ 370 X-44\ 640$	0.999 8	0.024 0~2.40
原儿茶醛	$Y=928\ 721 X-408\ 122$	0.999 7	0.015 5~1.55
紫云英苷	$Y=2.0\times 10^6 X+268\ 922$	0.999 7	0.042 5~4.25

2.6.2 精密度试验 取混合对照品，按“2.1”项色谱条件重复进样 6 次，测得 5-HMF、原儿茶醛、原儿茶酸、紫云英苷峰面积的 RSD 值分别为 1.07%、1.28%、1.12%、0.98%，结果表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 取 S1 样品共 6 份，按“2.2.2”项下制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别进样测定，测 5-HMF、原儿茶醛、原儿茶酸、紫云英苷含量，RSD 值分别为 1.16%、2.26%、2.12%、1.28%，表明该方法的重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 取混合对照品，分别于配制后 0、2、5、10、15、24 h 进样测定，按“2.1”项色谱条件重复进样 6 次，测得 5-HMF、原儿茶醛、原儿茶酸、紫云英苷峰面积的 RSD 值分别为 1.29%、2.07%、1.18%、1.73%，结果表明样品稳定性良好。

2.6.5 加样回收率试验 取测定的 S1 号狗脊样品粉末 6 份各 1.000 g，精密称定，分别加入等量的上述 4 种有效成分混合对照品溶液，按“2.2.2”项制备供试液，按“2.1”项色谱条件进行测定，5-HMF、原儿茶酸、原儿茶醛、紫云英苷加样回收率分别为 99.27%、98.21%、99.62%、101.18%，RSD 分别为 0.84%、1.89%、0.48%、1.50%。

2.6.6 样品含量测定 根据“2.2.2”项下方法制备狗脊药材供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，测得 5-HMF、原儿茶醛、原儿茶酸、紫云英苷的含量，结果见表 7。由结果可知，《中国药典》规定狗

表 7 16 批狗脊 4 种指标性成分含量测定结果

Table 7 Content determination of four chemical components in 16 batches of *C. barometz*

编号	质量分数/%			
	5-HMF	原儿茶酸	原儿茶醛	紫云英苷
S1	1.339 4	0.713 3	0.234 5	0.012 4
S2	0.633 9	0.090 2	0.156 8	0.029 1
S3	0.122 3	0.006 2	0.020 0	0.106 5
S4	0.051 3	0.024 0	0.074 6	0.018 4
S5	0.097 6	0.014 3	0.078 3	0.034 1
S6	0.221 6	0.016 1	0.051 7	0.015 1
S7	0.191 9	0.007 1	0.070 7	0.046 2
S8	0.323 1	0.010 9	0.067 8	0.021 0
S9	0.343 7	0.013 7	0.047 2	0.014 4
S10	0.551 8	0.136 8	0.098 7	0.012 0
S11	0.117 3	0.025 2	0.124 2	0.035 7
S12	0.022 8	0.013 0	0.039 0	0.012 3
S13	0.043 1	0.014 9	0.043 8	0.011 7
S14	0.180 2	0.039 1	0.197 3	0.011 2
S15	0.167 1	0.025 4	0.039 7	0.019 1
S16	0.327 2	0.047 9	0.137 0	0.018 2

脊中的原儿茶酸应大于 0.02%，16 批狗脊样品中原儿茶酸含量差异较大，部分样品中的原儿茶酸的含量尚未达到《中国药典》的标准。

3 讨论

《中国药典》2020 年版采用乙腈-1%醋酸作为流动相，本实验还考察了 0.1%甲酸水-乙腈、0.05%磷酸水-乙腈、1%甲酸水-甲醇等流动相体系，在结合文献基础上对流动相进行优化^[5-7]，结果发现以 1%醋酸(A)-甲醇(B)为流动相梯度洗脱，样品的分离效果较好，最后采用 1%醋酸-甲醇进行梯度洗脱。

中药材的内在质量受生长环境(海拔、土壤、水源、光照等)、采收时间以及加工方法、炮制方法等多方面影响。仅采用单成分或者多成分考察某种药材的质量，难以体现不同产地药材质量优劣，为了更好地地区分产地对质量的影响，本实验运用相似度评价、聚类分析、PCA 分析和 PLS-DA 的化学计量学方法对不同产地狗脊进行质量研究。聚类分析可知，9 个产地的狗脊样品可聚为 2 类，其中广西狗脊聚为一类，其他产地狗脊聚为一类，说明产地的生态环境、气候条件等因素相关造成不同的差异性。在 PCA 分析中可看出，9 个产地的狗脊样品可分成 3 类，化学成分存在一定的差异，PCA 分析与聚类分析大致相同，说明广西来源的两个样品虽然通过聚类分析是一类，但是经过 PCA 分析，仍可以将 S1 和 S2 区别开，可能与生长环境或者采收季节的原因有关。PLS-DA 分析也可以看出，广西 2 个样品有所区别，广东和广西产地的 3 个样品 S1、S2 和 S8，分别偏离其他产地的样品。这两个产地的狗脊化学成分与其他产地的样品存在一定的差异。16 批狗脊样品 HPLC 指纹图谱，指出 10 个共有峰，其中《中国药典》2020 年版的狗脊以原儿茶酸为含量测定指标，说明以原儿茶酸具有特征性。本研究在此基础上，结合 PCA 分析和 PLS-DA 化学计量学方法，发现 5-HMF、原儿茶醛、紫云英苷是产地的差异性特征有效成分，在考察狗脊质量时可以增加这些成分的考察。PCA 结合 PLS-DA 结果分析，筛选出 5-HMF、原儿茶醛、原儿茶酸、紫云英苷作为狗脊的有效成分。

5-HMF 具有广泛的药理活性，如抗氧化、抗炎、降血糖改善慢性炎症性疾病、阿尔茨海默病等，5-HMF 其本身不存在严重的健康风险，但其代谢产物 5-磺甲基糠醛具有一定的毒副作用，如肾毒性、黏膜刺激、横纹肌损伤等，如何控制其转化以及控制

一定的含量还需深入研究^[8]。

通过文献调研发现，原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸^[1]以及紫云英苷是狗脊发挥祛风湿、补肝肾、强腰膝功效的物质基础。原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸以及紫云英苷均为酚酸类成分。已经证实，原儿茶酸具有抗炎、镇痛、增强免疫力、修复缺血损伤、抑制血小板凝集等药理作用^[9]。近年来，还有学者发现，原儿茶酸可减轻退变软骨细胞的损伤^[10]。而原儿茶醛体现了更多活血化瘀类的作用，如扩张冠状动脉、抑制血小板聚集、抑制单核细胞趋化游走和趋化游走过程中产生的 IL-8 活性等作用^[11]。紫云英苷是黄酮类成分，黄酮类成分在治疗类风湿关节炎^[12]、预防骨质疏松^[13]以及抗缺血损伤、抗惊厥、抗痴呆等多种神经保护作用^[14]。选取 5-HMF、原儿茶酸、原儿茶醛、紫云英苷作为狗脊的有效成分不仅仅是化学模式识别的结果，也符合其祛风湿，补肝肾，强腰膝的作用机制。

本研究建立了 16 批不同产地狗脊的 HPLC 指纹图谱，确立了 10 个共有峰，结合化学模式识别评价方法，在 5 个已知化合物中筛选出了 4 个影响狗脊质量的差异性标志物，并对这 4 个成分进行了含量测定。本研究建立的 HPLC 指纹图谱、化学模式识别方法以及含量测定方法稳定、可靠，为狗脊药材的质量控制和相关资源开发的深入研究奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨慧洁, 吴琦, 杨世海. 金毛狗脊化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 230-234.
- [2] 时圣明, 袁永兵, 兰新新, 等. 狗脊的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 489-492.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 235.
- [4] 石悦, 王宁, 李菲菲, 等. HPLC 法同时测定狗脊中 5 种成分含量 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2019, 57(6): 75-80.
- [5] 周燕园. HPLC 法测定烫狗脊配方颗粒中原儿茶酸和原儿茶醛 [J]. 中成药, 2012, 34(9): 1822-1825.
- [6] 黄燕明, 李雪银, 陈桂生, 等. HPLC 法同步测定烫狗脊标准汤剂指纹图谱及原儿茶酸含量 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(7): 57-60.
- [7] 罗锐, 何智建. 不同产地狗脊中原儿茶酸和原儿茶醛的含量测定 [J]. 临床医学工程, 2011, 18(7): 1100-1101.
- [8] 朱秀清, 雷文华, 黄雨洋, 等. 5-羟甲基糠醛在食品中

- 的变化及其安全性研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(15): 4983-4991.
- [9] 郭昕, 巩荣艳, 朱娟娟, 等. 美洲大蠊乙醇提取物中原儿茶酸超高效液相色谱定量分析方法的建立 [J]. 四川动物, 2018, 37(2): 185-190.
- [10] 占龙, 孟农钦, 农桔安, 等. 原儿茶酸可减轻退变软骨细胞的损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(8): 1149-1154.
- [11] 张晓燕, 许海淼, 王笃军, 等. 原儿茶酸与原儿茶醛对小鼠肝脏细胞色素 P450 表达的影响 [J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(1): 18-21.
- [12] 许晓林, 柳蔚, 李世刚, 等. 黄酮类化合物治疗类风湿性关节炎作用机制的研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(8): 1367-1370.
- [13] 龚凌霄, 迟海林, 曹文燕, 等. 黄酮类物质预防骨质疏松症的研究进展 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 328-335.
- [14] 李珂如, 胡光强, 吴安国, 等. 山奈酚及其衍生物在神经系统疾病中的药理作用研究进展 [J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(4): 412-416.

[责任编辑 时圣明]