

熊胆粉不同极性部位 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究

王晨曦^{1,2}, 杨 敏¹, 梁红宝^{1,2}, 姚景春², 张贵民^{1,2}, 冯 帅¹, 李 峰^{1*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 鲁南制药集团股份有限公司 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276006

摘要: **目的** 建立熊胆 *Fel Ursi* 粉不同极性部位的 HPLC 指纹图谱, 比较不同提取部位化学成分之间的差异, 为全面评价熊胆粉的质量评价提供参考。 **方法** 将熊胆粉分别用醋酸乙酯、三氯甲烷、丙酮、无水乙醇、乙腈依次提取, 浓缩干燥, 用甲醇溶解, 建立 HPLC 指纹图谱, 并采用相似度评价系统软件进行数据分析。 **结果** 10 批熊胆粉醋酸乙酯部位共有模式共标记 6 个共有峰, 三氯甲烷部位共有模式共标记 8 个共有峰, 丙酮部位共有模式共标记 8 个共有峰, 乙腈部位共有模式共标记 10 个共有峰, 乙醇部位共有模式共标记 16 个共有峰, 5 种溶剂提取物均指认了 4 个共有指纹峰 (牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸)。综合聚类分析和主成分分析 (principal component analysis, PCA) 结果, 发现相同产地的熊胆粉, 受不同厂家加工方法不同的影响, 也存在一定的质量差异。通过正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 发现牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、乙醇部位 10 号峰、乙腈部位 1、2 号峰可能是熊胆粉质量差异的主要标志性成分。 **结论** 所建立的 HPLC 指纹图谱可以反映熊胆粉的化学成分分布, 为熊胆粉的整体质量评价提供参考, 并为熊胆粉谱效关系研究提供一定依据。

关键词: 熊胆粉; 极性部位; HPLC; 指纹图谱; 质量评价; 化学模式识别; 牛磺熊去氧胆酸; 牛磺鹅去氧胆酸; 熊去氧胆酸; 鹅去氧胆酸; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘-判别分析

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)03-0770-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.008

HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of different polar parts of *Fel Ursi* powder

WANG Chenxi^{1,2}, YANG Min¹, LIANG Hongbao^{1,2}, YAO Jingchun², ZHANG Guimin^{1,2}, FENG Shuai¹, LI Feng¹

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of different polarity fractions from Xiongdan (*Fel Ursi*) powder and compare the differences of chemical composition between the different extractions from *Fel Ursi* powder, and provide a reference for comprehensive evaluation of the quality of *Fel Ursi* powder. **Method** *Fel Ursi* powder was extracted by ethyl acetate, chloroform, acetone, anhydrous ethanol and acetonitrile, concentrated and dried, dissolved with methanol to obtain samples. The samples were analyzed by HPLC fingerprints. The similarity evaluation software was used for data analysis. **Results** In 10 batches of *Fel Ursi* powder, a total of six common peaks were selected as the fingerprint peaks from the ethyl acetate extracts. A total of eight common peaks were identified from the HPLC fingerprint of chloroform extracts. A total of eight common peaks were identified from the acetone part of HPLC fingerprints. A total of 10 common peaks were identified from the HPLC fingerprint of acetonitrile extraction. A total of 16 common peaks were identified from the anhydrous ethanol extraction of HPLC fingerprints. A total of four common peaks (tauroursodeoxycholic acid, taurochenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid) were identified from the five solvents. Based on the results of cluster analysis and principal component analysis (PCA), it was found that *Fel Ursi* powder from the

收稿日期: 2023-07-04

基金项目: 山东省重大科技创新工程 (2020CXGC010506); 山东省自然科学基金项目 (ZR2020KH018); 2019 泰山产业领军人才 (tscy20200329)

作者简介: 王晨曦, 硕士研究生。E-mail: 332432785@qq.com

*通信作者: 李 峰, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药质量控制与资源研究。E-mail: 13969141796@163.com

same producing area also had certain quality differences due to the different processing methods of different manufacturers. Through orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), it was found that tauroursodeoxycholic acid, taurochenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, peak 10 of the ethanol fraction, peaks 1, 2 of the acetonitrile fraction may be the main marker components of *Fel Ursi* powder quality differences. **Conclusion** The established HPLC fingerprints can fully reflect the distribution of the chemical composition of *Fel Ursi* powder, which provide reference for the quality evaluation of *Fel Ursi* powder, and provide a certain basis for the study of the spectrum-effect relationship of *Fel Ursi* powder.

Key words: *Fel Ursi* powder; polar parts; HPLC; fingerprint; quality evaluation; chemical pattern recognition; tauroursodeoxycholic acid; taurochenodeoxycholic acid; ursodeoxycholic acid; chenodeoxycholic acid; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis

熊胆粉来源于熊科熊属动物黑熊 *Selenarctos thinbetanus* Cuvier 或棕熊 *Ursus arctos* Linnaeus 的干燥胆汁^[1]。按产地划分可分为东胆（东北）和南胆（云、贵、川），尤以云南的品质最佳^[2-4]。

现代药理研究表明，熊胆粉具有镇静、镇痛、抗惊厥、解痉、降血压、调血脂、降血糖、镇咳、祛痰、平喘、利胆、溶石、抗菌、抗炎、抗过敏、解毒、止痛、消肿、明目、去翳、抗疲劳等作用^[5]。现代研究发现，熊胆粉化学成分主要含结合型熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、胆酸、去氧胆酸、牛磺熊去氧胆酸，牛磺鹅去氧胆酸及胆固醇类，胆色素类，氨基酸类、蛋白质、肽、脂肪酸、微量元素等^[6-9]。其中，牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸是熊胆粉重要的特征成分。到目前为止，大多数学者致力于胆酸成分的药理、药化、药代以及临床研究，并取得了可喜的成果^[10-15]。胆汁酸的代表成分熊去氧胆酸已合成并进入国家基本药物。但是对熊胆粉的非胆酸部分的研究比较少。熊胆粉的药理作用绝大多数都是胆汁酸类成分发挥作用，但是熊胆粉的一些作用机制尚不明确，很可能与其中非胆酸成分有很大关系。

因此，本实验尝试对熊胆粉的不同极性部位进行提取分析，建立熊胆粉不同极性部位的 HPLC 指纹图谱，研究不同提取溶剂下熊胆粉化学成分的变化情况，以期为熊胆粉及其相关中成药质量标准的完善提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UltiMate3000 型高效液相色谱仪，赛默飞世尔科技有限公司；CoronaVeo 型电喷雾检测器，赛默飞世尔科技有限公司；ME204 型万分之一电子天平，梅特勒托利多科技(中国)有限公司；SB25-12DT 型超声波清洗机，宁波新芝生物科技有限公司；SHB-IIIIG 型循环水式多用真空泵，郑州长城科工贸有限公司；RE-2000B 型旋转蒸发器，郑州科泰实验设备有限公司。

1.2 试剂

对照品鹅去氧胆酸（批号 110806-202009）、熊去氧胆酸（批号 110755-202005）、牛磺熊去氧胆酸对照品（批号 110816-202110），质量分数均≥98%，中国食品药品检定研究院；对照品牛磺鹅去氧胆酸，批号 16F-FVB-66-0，质量分数≥98%，Panphy 公司；三氟乙酸，色谱纯，批号 S6786162816，Merck KGaA 公司；乙腈，色谱纯，批号 B2122101000，云南新蓝景化学工业有限公司；无水甲醇、无水乙醇、丙酮、三氯甲烷、醋酸乙酯，分析纯，批号分别为 B211109、B211123、B211008、B211109、B211012，西陇科学股份有限公司。

1.3 样品

收集不同产地、不同厂家生产的熊胆粉样品共 10 批，详细信息见表 1。各样品均经山东中医药大学李峰教授鉴定，符合要求。

表 1 熊胆粉样品信息
 Table 1 Sample information for *Fel Ursi* powder

编号	名称	产品批号	来源	生产厂家	编号	名称	产品批号	来源	生产厂家
S1	绿野	20200303	四川	四川绿野生物制药有限公司	S6	滇熊	202112003	云南	楚雄市连墀生物研究所
S2	柏愈	200206	四川	四川新鹿药业有限公司	S7	万秘堂	202203001	云南	楚雄市连墀生物研究所
S3	资惠晶	22080202	四川	都江堰市中善制药厂	S8	明月山	20200501	吉林	延边熊场
S4	天佑	20210901	云南	云南天佑熊业制药有限公司	S9	万秘堂	20220404	吉林	敦化市长白山野生动物繁殖试验场
S5	滇野	220705	云南	瑞丽彩云南集团药业有限公司	S10	归真堂	20220503	福建	福建归真堂药业股份有限公司

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的配制

精密称取“1.3”项下的样品各 0.1 g, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 分别精密加入醋酸乙酯、三氯甲烷、丙酮、无水乙醇、乙腈各 50 mL, 水浴回流 2 h, 综合回收滤液, 蒸干, 用甲醇定容至 50 mL 量瓶中, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 对照品溶液的配制

分别精密称取牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸的对照品适量, 置于同一量瓶中, 加无水甲醇溶解、定容、混匀, 制成上述成分质量浓度分别为 0.50、0.51、0.49、0.50 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.5%三氟乙酸溶液, 梯度洗脱程序: 0~24 min, 10%~42%乙腈; 24~30 min, 42%~73%乙腈; 30~40 min, 73%~90%乙腈; 40~50 min, 90%~10%乙腈; 50~60 min, 10%乙腈; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。按上述色谱条件, 分别吸取对照品溶液和供试品溶液, 进样测定, 记录色谱峰, 结果见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 分别取“2.1”项下 S1 样品的 5 种不同溶剂提取所得的供试品溶液各 1 份, 按“2.3”项下对应色谱条件分别连续进样 6 次, 记录 HPLC 图, 计算得醋酸乙酯、三氯甲烷、丙酮、无水乙醇、乙腈部位色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 依次为 1.4%、1.6%、2.3%、2.1%、1.3%、1.5%、2.1%、1.8%、2.0%、1.3%, 结果表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 分别取“2.1”项下 S1 样品的 5 种不同溶剂提取所得的供试品溶液各 6 份, 按“2.3”项下对应的色谱条件连续进样 6 次进行检测, 记录 HPLC 图, 计算得醋酸乙酯、三氯甲烷、丙酮、无水乙醇、乙腈部位色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 依次为 1.3%、1.6%、1.4%、2.7%、1.8%、1.5%、1.8%、2.3%、2.2%、1.4%, 结果表明该试验重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 分别取“2.1”项下 S1 样品的 5 个极性部位的供试品溶液各 1 份, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录共有峰的保留时间和峰面积, 计算得醋酸乙酯、三氯甲烷、丙酮、无

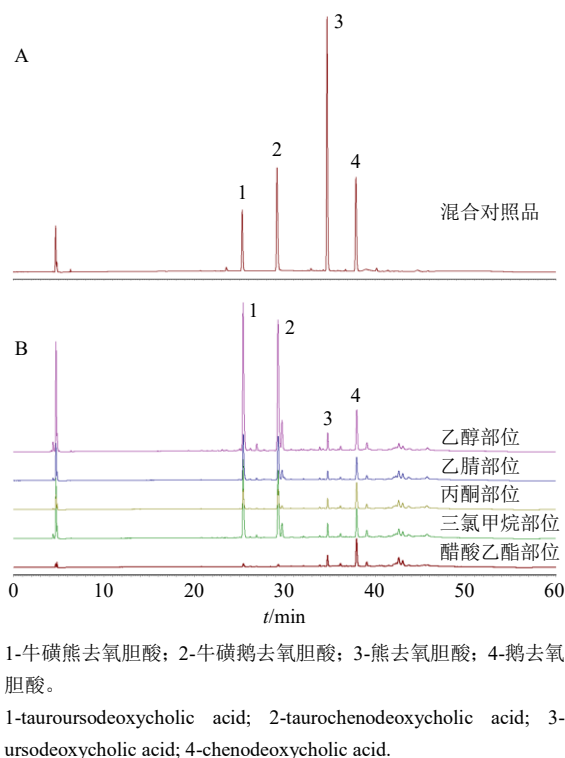


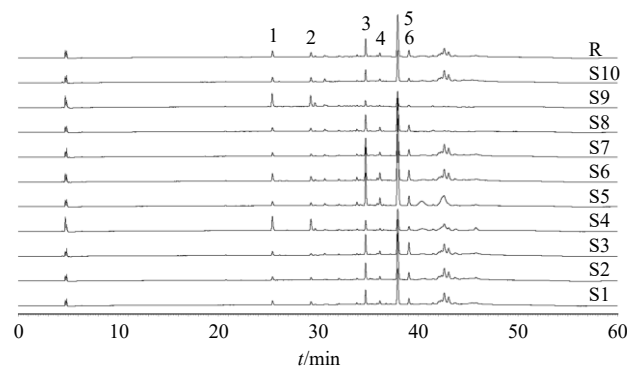
图 1 混合对照品 (A) 和熊胆粉各极性部位 (S1, B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and different polar parts from *Fel Ursi* powder (S1, B)

水乙醇、乙腈部位色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 依次为 1.4%、1.5%、2.1%、2.3%、1.3%、1.5%、2.1%、2.4%、2.2%、1.4%, 结果表明各极性部位的供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 不同极性部位指纹图谱分析

2.5.1 醋酸乙酯部位指纹图谱 分别取 10 批醋酸乙酯部位提取物, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录 HPLC 图。将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2004A 版)”中, 得到 10 批不同产地、不同厂家熊胆粉醋酸乙酯部位指纹图谱叠加图 (图 2), 以 S1 的指纹图谱为参照图谱, 对 S1~S10 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配, 设定时间宽度为 0.2 min, 按平均数法生成对照指纹图谱 (R), 共标定 6 个共有峰, 其中 1~3、5 号峰分别与牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品的保留时间相一致。计算 10 批醋酸乙酯提取物指纹图谱与 R 的相似度, 结果见表 2。可见, S1~S3、S5~S8、S10 的相似度均达到 0.95 以上; S4 与 S9 的相似度达到 0.95, 但与其他厂家相比略有不同。



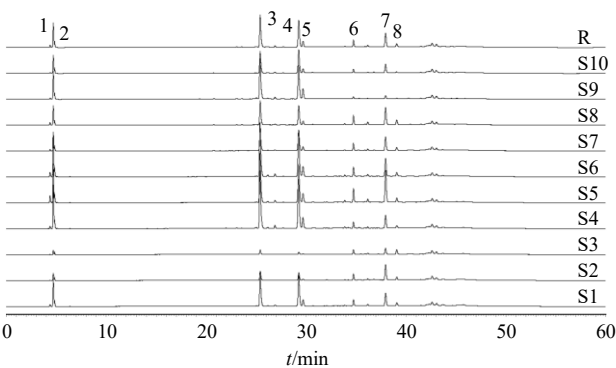
1-牛磺熊去氧胆酸; 2-牛磺鹅去氧胆酸; 3-熊去氧胆酸; 5-鹅去氧胆酸。
1-tauroursodeoxycholic acid; 2-taurochenodeoxycholic acid; 3-ursodeoxycholic acid; 5-chenodeoxycholic acid.

图 2 不同熊胆粉样品醋酸乙酯部位的 HPLC 指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (R)
Fig. 2 HPLC fingerprint overlay of ethyl acetate extracts of different *Fel Ursi* powder samples and its control fingerprint (R)

表 2 不同熊胆粉醋酸乙酯部位指纹图谱与 R 的相似度
Table 2 Similary between fingerprint of ethyl acetate extracts from different *Fel Ursi* powder samples and its control fingerprint

样品	相似度										R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
S1	1.000	0.998	0.981	0.834	0.992	0.996	0.997	0.992	0.632	0.991	0.998
S2	0.998	1.000	0.976	0.805	0.995	0.998	0.995	0.990	0.592	0.987	0.994
S3	0.981	0.976	1.000	0.806	0.972	0.977	0.988	0.977	0.604	0.963	0.981
S4	0.834	0.805	0.806	1.000	0.771	0.808	0.818	0.793	0.950	0.863	0.854
S5	0.992	0.995	0.972	0.771	1.000	0.996	0.993	0.995	0.551	0.982	0.989
S6	0.996	0.998	0.977	0.808	0.996	1.000	0.995	0.989	0.598	0.988	0.995
S7	0.997	0.995	0.988	0.818	0.993	0.995	1.000	0.992	0.613	0.988	0.996
S8	0.992	0.990	0.977	0.793	0.995	0.989	0.992	1.000	0.585	0.984	0.990
S9	0.632	0.592	0.604	0.950	0.551	0.598	0.613	0.585	1.000	0.681	0.662
S10	0.991	0.987	0.963	0.863	0.982	0.988	0.988	0.984	0.681	1.000	0.995
R	0.998	0.994	0.981	0.854	0.989	0.995	0.996	0.990	0.662	0.995	1.000

2.5.2 三氯甲烷部位指纹图谱 分别取 10 批三氯甲烷部位提取物, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录 HPLC 图。将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A 版)”中, 得到 10 批不同产地、不同厂家熊胆粉三氯甲烷部位指纹图谱叠加图(图 3), 以 S1 的指纹图谱为参照图谱, 对 S1~S10 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配, 设定时间宽度为 0.2 min, 按平均数法生成对照指纹图谱 (R), 共标



3-牛磺熊去氧胆酸; 4-牛磺鹅去氧胆酸; 6-熊去氧胆酸; 7-鹅去氧胆酸。
3-tauroursodeoxycholic acid; 4-taurochenodeoxycholic acid; 6-ursodeoxycholic acid; 7-chenodeoxycholic acid.

图 3 不同熊胆粉样品三氯甲烷部位的 HPLC 指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (R)
Fig. 3 HPLC fingerprint overlay of chloroform extracts of different *Fel Ursi* powder samples and its control fingerprint (R)

定 8 个共有峰, 其中 3、4、6、7 号峰分别与牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品的保留时间相一致。计算 10 批三氯甲烷提取物指纹图谱与 R 的相似度, 结果见表 3。可见, 除 S8 与 S9 略有差别外, S1、S4~S10 的相似度均达到 0.9 以上; S2 与 S3 的相似度达到 0.9 以上, 但与其他厂家相比略有不同。

2.5.3 丙酮部位指纹图谱 分别取 10 批丙酮部位提取物, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”

表 3 不同熊胆粉三氯甲烷部位指纹图谱与 R 的相似度
Table 3 Similary between fingerprint of chloroform extracts from different *Fel Ursi* powder samples and its control fingerprint

样品	相似度										R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
S1	1.000	0.784	0.699	0.993	0.978	0.999	0.990	0.965	0.975	0.994	0.998
S2	0.784	1.000	0.911	0.712	0.883	0.767	0.861	0.912	0.636	0.773	0.812
S3	0.699	0.911	1.000	0.632	0.792	0.687	0.778	0.846	0.56	0.666	0.730
S4	0.993	0.712	0.632	1.000	0.953	0.996	0.969	0.931	0.994	0.986	0.987
S5	0.978	0.883	0.792	0.953	1.000	0.975	0.996	0.994	0.918	0.964	0.988
S6	0.999	0.767	0.687	0.996	0.975	1.000	0.986	0.959	0.981	0.990	0.997
S7	0.990	0.861	0.778	0.969	0.996	0.986	1.000	0.991	0.938	0.981	0.996
S8	0.965	0.912	0.846	0.931	0.994	0.959	0.991	1.000	0.889	0.950	0.977
S9	0.975	0.636	0.560	0.994	0.918	0.981	0.938	0.889	1.000	0.967	0.965
S10	0.994	0.773	0.666	0.986	0.964	0.990	0.981	0.950	0.967	1.000	0.989
R	0.998	0.812	0.730	0.987	0.988	0.997	0.996	0.977	0.965	0.989	1.000

项下色谱条件进样测定, 记录 HPLC 图。将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2004A 版)”中, 得到 10 批不同产地、不同厂家熊胆粉丙酮部位指纹图谱叠加图 (图 4), 以 S1 的指纹图谱为参照图谱, 对 S1~S10 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配, 设定时间宽度为 0.2 min, 按平均数法生成对照指纹图谱 (R), 共标定 8 个共有峰, 其中 3、4、6、7 号峰分别与牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸的对照品的保留时间相一致。计算 10 批丙酮提取物指纹图谱与 R 的相似度, 结果见表 4。可见, S1~S4、S6、S7、S10 的相似度均达到 0.9 以上; S8 除与 S3、S4、S9 略有差别外, 与其他厂家熊胆粉的相似度也均达到 0.9 以上; S5 与 S9 和其他厂家相比差别较大。

2.5.4 乙腈部位指纹图谱 分别取 10 批乙腈部位提取物, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录 HPLC 图。将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2004A 版)”中, 得到 10 批不同产地、不同厂家熊胆粉乙腈部位指纹图谱叠加图 (图 5), 以 S1 的指纹图谱为参照图谱, 对 S1~S10 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配, 设定时间宽度为 0.2 min, 按平均数法生成对照指纹图谱 (R), 共标定 10 个共有峰, 其中 4、6、8、9 号峰分别与牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品的保留时间相一致。计算 10 批乙腈提取物指纹图谱

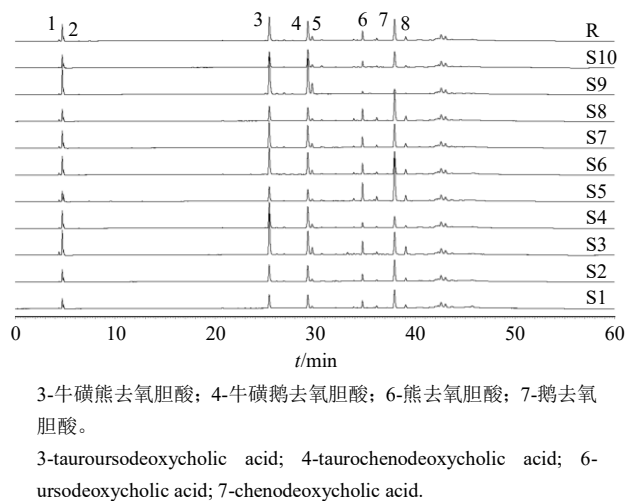
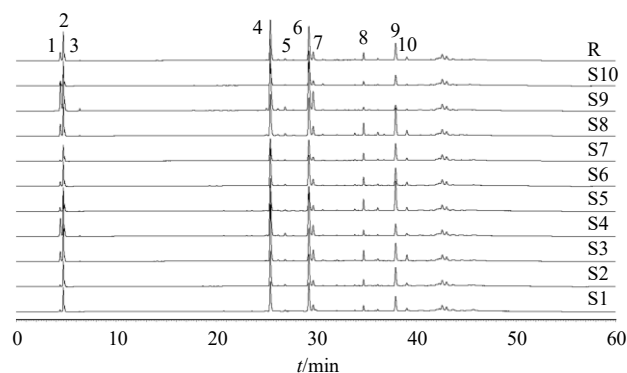


图 4 不同熊胆粉样品丙酮部位的 HPLC 指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 4 HPLC fingerprint overlay of acetone extracts of different *Fel Ursi* powder samples and its control fingerprint (R)

表 4 不同熊胆粉丙酮部位指纹图谱与 R 的相似度
Table 4 Similary between fingerprint of acetone extracts from different *Fel Ursi* powder samples and its control fingerprint

样品	相似度										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.999	0.931	0.900	0.904	0.980	0.984	0.980	0.761	0.978	0.985
S2	0.999	1.000	0.935	0.908	0.895	0.982	0.986	0.974	0.773	0.981	0.987
S3	0.931	0.935	1.000	0.974	0.730	0.981	0.976	0.864	0.906	0.944	0.977
S4	0.900	0.908	0.974	1.000	0.634	0.966	0.961	0.799	0.965	0.954	0.959
S5	0.904	0.895	0.730	0.634	1.000	0.810	0.822	0.969	0.421	0.804	0.827
S6	0.980	0.982	0.981	0.966	0.810	1.000	0.999	0.926	0.869	0.987	0.999
S7	0.984	0.986	0.976	0.961	0.822	0.999	1.000	0.934	0.859	0.989	1.000
S8	0.980	0.974	0.864	0.799	0.969	0.926	0.934	1.000	0.622	0.920	0.936
S9	0.761	0.773	0.906	0.965	0.421	0.869	0.859	0.622	1.000	0.857	0.857
S10	0.978	0.981	0.944	0.954	0.804	0.987	0.989	0.920	0.857	1.000	0.988
R	0.985	0.987	0.977	0.959	0.827	0.999	1.000	0.936	0.857	0.988	1.000



4-牛磺熊去氧胆酸; 6-牛磺鹅去氧胆酸; 8-熊去氧胆酸; 9-鹅去氧胆酸。
4-tauroursodeoxycholic acid; 6-taurochenodeoxycholic acid; 8-ursodeoxycholic acid; 9-chenodeoxycholic acid.

图 5 不同熊胆粉样品乙腈部位的 HPLC 指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 5 HPLC fingerprint overlay of acetonitrile extracts of different *Fel Ursi* powder samples and its control fingerprint (R)

与 R 的相似度, 结果见表 5。可见, 除 S4 与 S5 略有差别外, S1~S8、S10 的相似度均达到 0.9 以上; S9 除与 S5、S7 略有差别外, 与其他厂家熊胆粉的相似度均达到 0.9 以上。

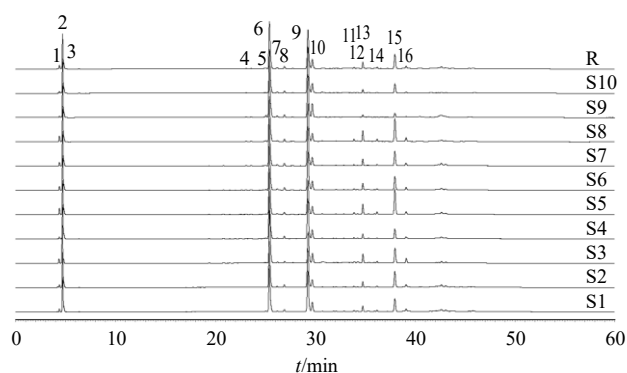
2.5.5 乙醇部位指纹图谱 分别取 10 批乙醇部位提取物, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录 HPLC 图。将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2004A 版)”中, 得到 10 批不同产地、不同厂家熊胆粉乙醇部位

表 5 不同熊胆粉乙腈部位指纹图谱与共有模式相似度

Table 5 Similary between fingerprint of acetonitrile extracts from different *Fel Ursi* powder samples and common mode

样品	相似度										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.997	0.970	0.969	0.947	0.995	0.982	0.983	0.935	0.987	0.992
S2	0.997	1.000	0.972	0.963	0.960	0.997	0.989	0.986	0.925	0.982	0.992
S3	0.970	0.972	1.000	0.978	0.927	0.984	0.949	0.968	0.955	0.943	0.987
S4	0.969	0.963	0.978	1.000	0.878	0.974	0.924	0.954	0.992	0.970	0.987
S5	0.947	0.960	0.927	0.878	1.000	0.957	0.987	0.975	0.820	0.914	0.943
S6	0.995	0.997	0.984	0.974	0.957	1.000	0.984	0.990	0.942	0.980	0.997
S7	0.982	0.989	0.949	0.924	0.987	0.984	1.000	0.990	0.875	0.963	0.973
S8	0.983	0.986	0.968	0.954	0.975	0.990	0.990	1.000	0.917	0.972	0.988
S9	0.935	0.925	0.955	0.992	0.820	0.942	0.875	0.917	1.000	0.946	0.961
S10	0.987	0.982	0.943	0.970	0.914	0.980	0.963	0.972	0.946	1.000	0.983
R	0.992	0.992	0.987	0.987	0.943	0.997	0.973	0.988	0.961	0.983	1.000

指纹图谱叠加图(图 6),以 S1 的指纹图谱为参照图谱,对 S1~S10 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配,设定时间宽度为 0.2 min,按平均数法生成对照指纹图谱(R),共标定 16 个共有峰,其中 6、9、13、15 号峰分别与牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品的保留时间相一致。计算 10 批乙醇提取物指纹图谱与 R 的相似度,结果见表 6。可见,S1~S10 的相似度均达到 0.95 以上。



6-牛磺熊去氧胆酸; 9-牛磺鹅去氧胆酸; 13-熊去氧胆酸; 15-鹅去氧胆酸。
6-tauroursodeoxycholic acid; 9-taurochenodeoxycholic acid; 13-ursodeoxycholic acid; 15-chenodeoxycholic acid.

图 6 不同熊胆粉样品乙醇部位的 HPLC 指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 6 HPLC fingerprint overlay of ethyl alcohol extracts of different *Fel Ursi* powder samples and its control fingerprint (R)

表 6 不同熊胆粉乙醇部位指纹图谱与共有模式相似度

Table 6 Similary between fingerprint of ethyl alcohol extracts from different *Fel Ursi* powder samples and common mode

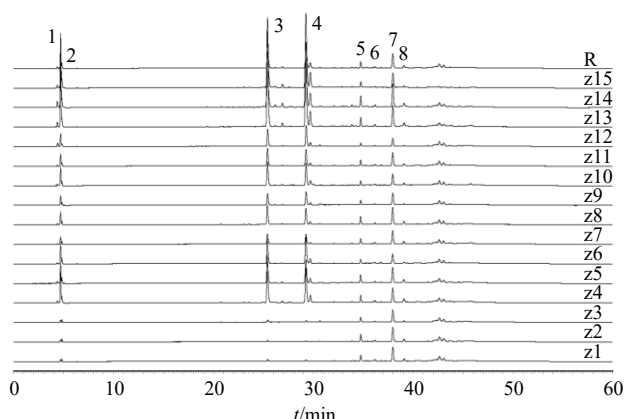
样品	相似度										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.998	0.978	0.998	0.975	0.999	0.999	0.984	0.988	0.994	0.999
S2	0.998	1.000	0.983	0.995	0.985	0.999	0.999	0.992	0.979	0.987	0.999
S3	0.978	0.983	1.000	0.981	0.981	0.985	0.985	0.982	0.968	0.950	0.986
S4	0.998	0.995	0.981	1.000	0.967	0.998	0.997	0.976	0.994	0.991	0.997
S5	0.975	0.985	0.981	0.967	1.000	0.981	0.983	0.998	0.939	0.950	0.983
S6	0.999	0.999	0.985	0.998	0.981	1.000	1.000	0.988	0.986	0.989	1.000
S7	0.999	0.999	0.985	0.997	0.983	1.000	1.000	0.990	0.984	0.988	1.000
S8	0.984	0.992	0.982	0.976	0.998	0.988	0.990	1.000	0.951	0.964	0.990
S9	0.988	0.979	0.968	0.994	0.939	0.986	0.984	0.951	1.000	0.985	0.985
S10	0.994	0.987	0.950	0.991	0.950	0.989	0.988	0.964	0.985	1.000	0.987
R	0.999	0.999	0.986	0.997	0.983	1.000	1.000	0.990	0.985	0.987	1.000

2.5.6 5 种不同溶剂提取指纹图谱 选取样品 S1、S7、S10 的醋酸乙酯、三氯甲烷、丙酮、乙腈以及乙醇部位提取物的 HPLC 图,从 5 种不同提取部位中共得到 15 个指纹色谱图(z1~z3 为醋酸乙酯部位,z4~z6 为三氯甲烷部位,z7~z9 为丙酮部位,z10~z12 为乙腈部位,z13~z15 为乙醇部位),将图谱输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A 版)”中,得到 5 种不同溶剂提取部位指纹图谱叠加图(图 7),以 z14 的指纹图谱为参照图谱,对 z1~z15 的指纹图谱相关参数进行多点校正并自动匹配,设定时间宽度为 0.2 min,按平均数法生成对照图谱,共标定 8 个共有峰。其中 3~5、7 号分别与牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品的保留时间相一致。

将 z1~z15 各色谱峰的峰面积数据导入 SPSS 21.0 统计软件,进行显著性差异分析,发现在保留时间为 4.696 (共有峰 1)、4.834 (共有峰 2)、25.412 (共有峰 3)、26.89、29.266 (共有峰 4)、29.695 min 时,不同极性溶剂之间 $P \leq 0.05$,说明不同极性部位间化学成分含量差异明显。

2.6 化学模式识别

2.6.1 聚类分析 采用 SPSS 21.0 软件将 10 批熊胆粉样品醋酸乙酯部位 6 个共有峰,三氯甲烷部位 8 个共有峰,丙酮部位 8 个共有峰,乙腈部位 10 个共有峰,乙醇部位 16 个共有峰的峰面积进行标准化处理,分别得到 10×6 、 10×8 、 10×8 、 10×10 、 $10 \times$



3-牛磺熊去氧胆酸; 4-牛磺鹅去氧胆酸; 6-熊去氧胆酸; 7-鹅去氧胆酸。

3-tauroursodeoxycholic acid; 4-taurochenodeoxycholic acid; 6-ursodeoxycholic acid; 7-chenodeoxycholic acid.

图 7 不同熊胆粉样品不同极性提取部位的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 7 HPLC fingerprint of different extraction site of different *Fel Ursi* powder samples and its control fingerprint (R)

16 阶的原始数据矩阵; 综合醋酸乙酯部位、三氯甲烷部位、丙酮部位、乙腈部位、乙醇部位共有峰峰面积的标准化数据, 得到 10×48 的原始数据矩阵, 对标准化后的数据, 采用组间连接法, 以平方欧氏距离为分类依据, 对样品进行系统聚类分析, 综合聚类结果见图 8。当平方欧氏距离为 5 时, 10 批熊胆粉样品被分为 5 类, S1、S2、S7、S10 聚为一类, S6、S8、S3 聚为一类, S4、S5、S9 分别被单独聚为一类; 当平方欧氏距离为 10 时, 10 批熊胆粉样品被分为 3 类, S1~S3、S6~S8、S10 聚为一类, S4、S9 聚为一类, S5 单独聚为一类; 当平方欧氏距离为 15 时, 10 批熊胆粉样品被分为 2 类, S1~S3、

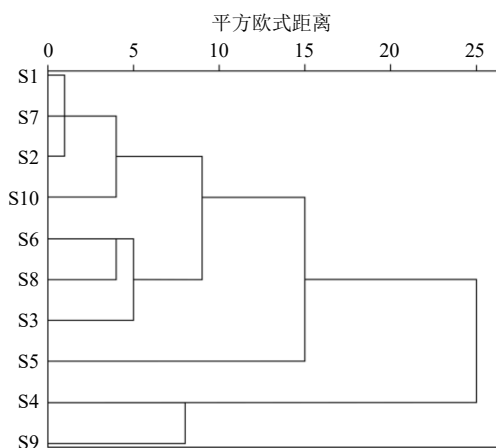


图 8 聚类分析树状图

Fig. 8 Dendrogram of cluster analysis

S5~S8、S10 聚为一类, S4、S9 聚为一类。由于 S1~S3 产地是四川, S4~S7 产地是云南, S8、S9 产地是吉林, S10 产地是福建, 通过聚类结果可知, 相同产地的熊胆粉, 受不同厂家加工方法不同的影响, 也存在一定的质量差异。

2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 采用 SIMCA 14.1 软件分别对 10 批熊胆粉样品醋酸乙酯部位 6 个共有峰, 三氯甲烷部位 8 个共有峰, 丙酮部位 8 个共有峰, 乙腈部位 10 个共有峰, 乙醇部位 16 个共有峰进行 PCA, 计算得分图, 具体见图 9。S1~S3 产地是四川, 在得分图中为蓝色点; S4~S7 产地是云南, 在得分图中是红色点; S8、S9 产地是吉林, 在得分图中是紫色点; S10 产地是福建, 在得分图中是绿色点。

从图 9 可知, 醋酸乙酯部位 S1~S3、S7、S8、S10 质量相似, S5、S6 质量相似, S4、S9 质量相似; 三氯甲烷部位 S4~S6 质量相似, S2、S3 质量相似, S7、S8、S10 质量相似, S1、S9 质量相似; 丙酮部位 S1、S2、S4、S8、S10 质量相似, S3、S6、S7 质量相似, S5、S9 质量相似, 分别单独一类; 乙腈部位 S1、S2、S6、S7、S10 质量相似, S3、S8、S5 质量相似, S4、S9 质量相似, 分别单独一类; 乙醇部位 S1、S2、S6、S7 质量相似, S5、S8 质量相似, S4、S10 质量相似, S3、S9 质量相似, 分别单独一类。根据 PCA 结果, 可知相同产地的熊胆粉, 受不同厂家加工方法不同的影响, 也存在一定的质量差异。此结果与聚类分析结果一致。

2.6.3 正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 为进一步寻找对熊胆粉质量产生影响贡献较大的成分, 采用 SIMCA 14.1 软件分别对 5 个极性部位的指纹图谱进行 OPLS-DA, 得到变量重要性投影 (variable important in project, VIP) 值, 结果见图 10。其中, 醋酸乙酯模型自变量拟合指数 $R^2=0.967$, 因变量拟合指数 $R^2=0.957$, 模型预测指数 $Q^2=0.914$; 三氯甲烷模型 $R^2=0.981$, $R^2=0.791$, $Q^2=0.664$; 丙酮模型 $R^2=0.965$, $R^2=0.825$, $Q^2=0.739$; 乙腈模型 $R^2=0.952$, $R^2=0.824$, $Q^2=0.717$; 乙醇模型 $R^2=0.945$, $R^2=0.925$, $Q^2=0.917$ 。

5 个极性部位的 R^2 和 Q^2 均超过 0.5, 表示模型拟合结果稳定可靠。如图 10 所示, 横坐标为共有峰编号, 纵坐标为 VIP 值, VIP 值越高, 对模型贡献率越高, 进一步筛选 VIP>1 的共有峰: 醋酸乙酯部

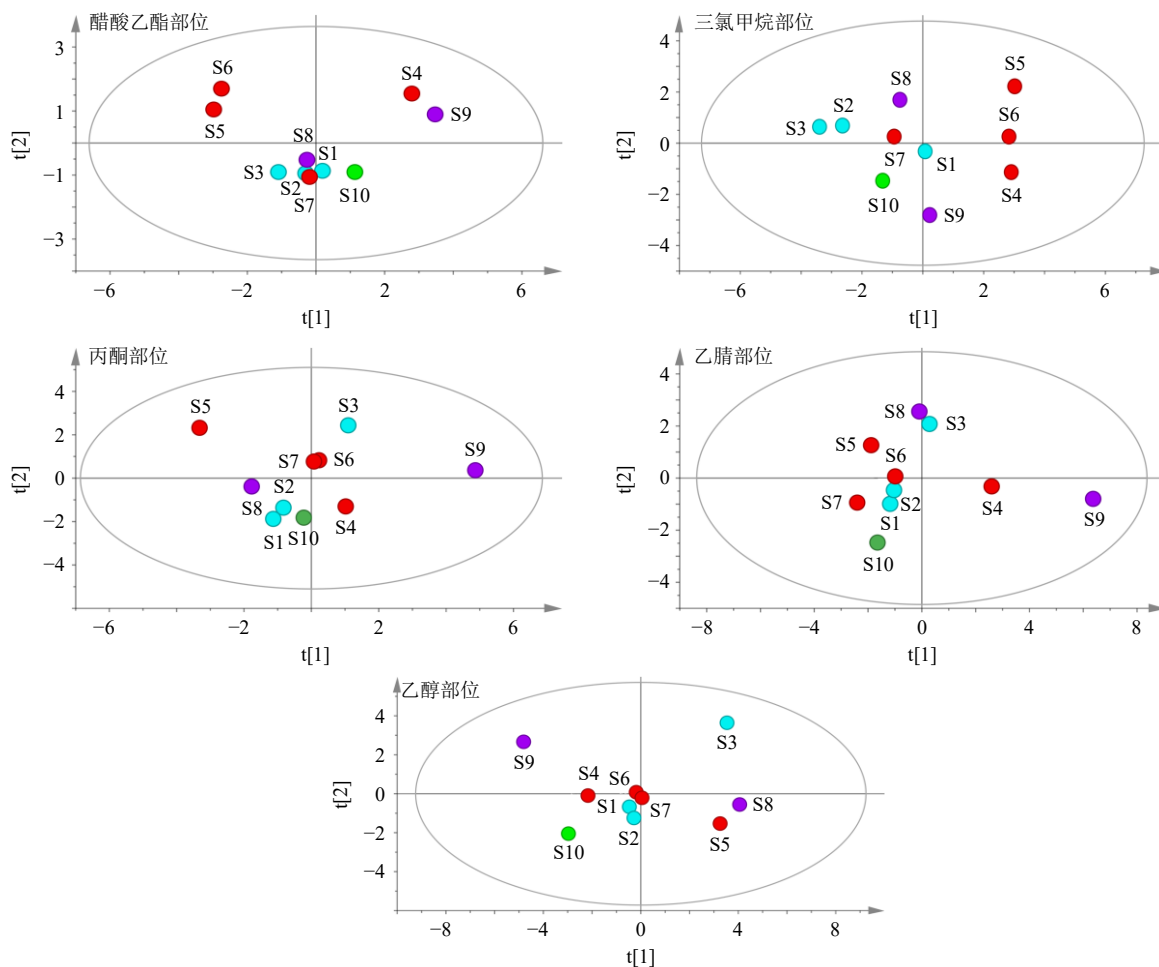


图 9 熊胆粉不同极性部位 PCA 得分图

Fig. 9 PCA score plot for different polar parts of *Fel Ursi* powder

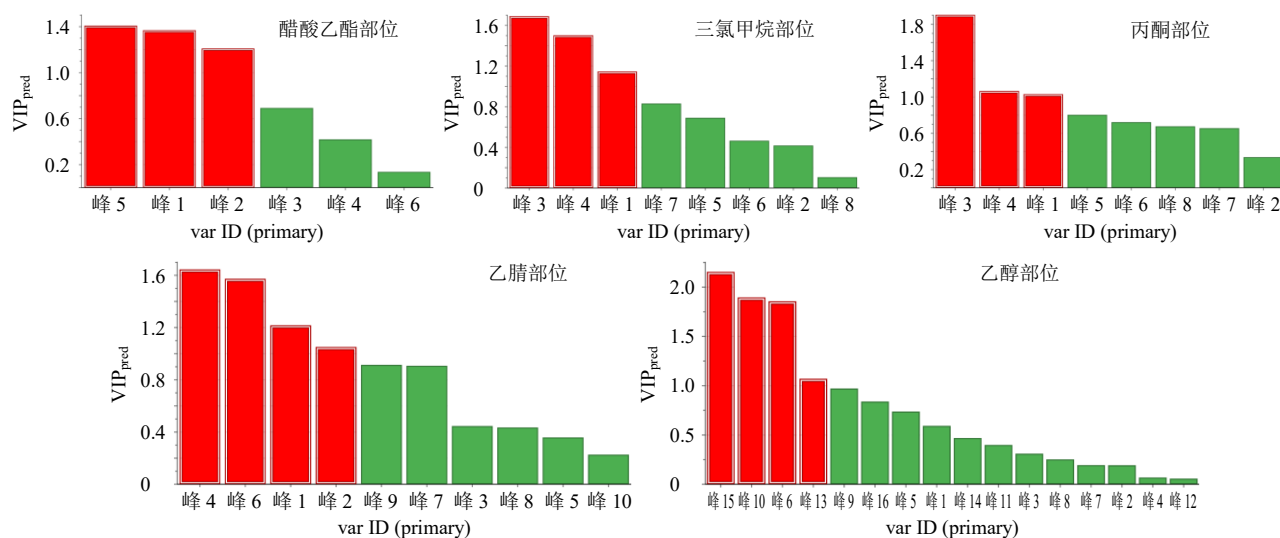


图 10 熊胆粉不同极性部位 VIP 图 (OPLS-DA)

Fig. 10 VIP value of different polar parts of *Fel Ursi* powder (OPLS-DA)

位为 1 (牛磺熊去氧胆酸)、2 (牛磺鹅去氧胆酸)、5 (鹅去氧胆酸) 号峰; 三氯甲烷部位为 1、3 (牛磺熊去氧胆酸)、4 (牛磺鹅去氧胆酸) 号峰; 丙酮部位

位为 1、3 (牛磺熊去氧胆酸)、4 (牛磺鹅去氧胆酸) 号峰; 乙腈部位为 1、2、4 (牛磺熊去氧胆酸)、6 (牛磺鹅去氧胆酸) 号峰; 乙醇部位为 6 (牛磺熊去

氧胆酸)、10、13(熊去氧胆酸)、15(鹅去氧胆酸)号峰。结果表明,上述色谱峰所代表的化学成分分别是熊胆粉各极性部位质量差异的标志性成分。其中,牛磺熊去氧胆酸是 5 种极性部位共同的质量差异标志性成分。经过 200 次置换检验,5 种极性溶剂模型 Q^2 回归线与纵轴的相交点均小于 0,说明模型不存在过拟合,模型验证有效,认为该结果可用于熊胆粉质量差异的标志性成分的筛选。

4 讨论

中药是由多种成分组成的复合体,HPLC 指纹图谱的研究角度很多,是考察单一溶剂处理的提取物的指纹图谱,掩盖了不同极性部位指纹图谱的差别^[16-19],本研究建立熊胆粉 5 个极性部位 HPLC 指纹图谱,利用多种化学模式识别方法综合分析不同极性部位的指纹图谱信息^[20-22],更加客观地反映熊胆粉内在质量,深入研究熊胆粉中化学成分分布情况,为其临床用药的合理性及进一步的药性研究提供研究依据。

实验最初选取了石油醚、醋酸乙酯、三氯甲烷、丙酮、无水乙醇、乙腈、无水甲醇、纯化水、正丁醇 9 种溶剂,以绿野厂家的熊胆粉为样本进行实验。通过 HPLC 法发现石油醚提取出来的化学成分极少,且无水乙醇、无水甲醇、纯化水、正丁醇 4 种溶剂提取出来的化学成分相似,故只采用醋酸乙酯、三氯甲烷、丙酮、无水乙醇、乙腈作为实验试剂。实验最初选用超声法进行熊胆粉有效成分的提取,对比回流提取,发现超声提取的醋酸乙酯部位、丙酮部位、乙腈部位熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸含量明显低于回流提取,故实验最终选用回流法进行熊胆粉有效成分的提取。

通过对不同批次的熊胆粉不同极性溶剂提取物中的成分进行了指纹图谱方法考察,比较 5 个指纹图谱共有模式可清晰地观察到不同极性部位的化学成分种类不同,且每个极性部位间化学成分含量差异明显。10 批熊胆粉醋酸乙酯共有模式共标记 6 个共有峰,三氯甲烷共有模式共标记 8 个共有峰,丙酮共有模式共标记 8 个共有峰,乙腈共有模式共标记 10 个共有峰,乙醇共有模式共标记 16 个共有峰,5 个极性部位均指认了 4 个指纹峰(牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸);采用 5 种不同极性溶剂对熊胆粉进行提取,不同溶剂提取所得的成分种类有所不同,分析不同极性部位的共有模式可知,3~5、7、8 号峰在 5 种溶剂中

均被提取出,而 1、2 号峰在醋酸乙酯部位未被提取出,其峰主要来源于三氯甲烷、丙酮、乙腈、乙醇部位;6 号峰主要来源于醋酸乙酯、乙醇部位。

采用 5 种不同极性溶剂对熊胆粉进行提取,不同溶剂提取所得的成分含量差异明显,按成分含量从高到低排序,醋酸乙酯部位依次为鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸,且熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸的成分含量显著大于牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸;三氯甲烷部位依次为牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸,且牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸的成分含量显著大于熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸;丙酮部位依次为牛磺熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸,且牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、鹅去氧胆酸的成分含量显著大于熊去氧胆酸;乙腈部位依次为牛磺鹅去氧胆酸、牛磺熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸,且牛磺鹅去氧胆酸的成分含量显著大于牛磺熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸,熊去氧胆酸的含量最少;乙醇部位为牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸,且牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸的成分含量显著大于熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸。

由此可见,在不同极性溶剂下,熊胆粉中所提取出的主要成分种类和含量也有所不同。在此条件下,可通过谱效关系的研究方法,将熊胆粉不同极性溶剂的指纹图谱与药理药效结果进行灰色关联分析,探究熊胆粉不同功效的质量标志物(quality marker, Q-Marker),从而为熊胆粉谱效关系的研究提供了实验基础。

熊胆粉按产地划分可分为东胆(东北)和南胆(云、贵、川),尤以云南产的品质最佳。但是,对熊胆粉进行聚类分析和 PCA,发现即使是相同产地的熊胆粉,也存在一定程度上的质量差异,不同产地的熊胆粉也会有质量相近的情况。主要原因可能是不同厂家对熊胆汁引流加工的工艺不同^[23-24],从而产生质量上的差异。现代生产的熊胆粉大多来源于养殖熊,因此,按产地条件来挑选野生熊胆粉的方法已不再科学严谨。通过比较 5 种不同溶剂提取的熊胆粉指纹图谱,发现不同极性部位的指纹图谱差异较大,归因于各厂家对熊胆汁引流加工的工艺不同。

对熊胆粉进行 OPLS-DA,发现熊胆粉质量差异的主要标志性成分是牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧

胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、未知成分乙醇部位 10 号峰、乙腈部位 1、2 号峰。但哪些成分是熊胆粉主要功效的 Q-Marker, 仍有待进一步研究。本实验主要考察了熊胆粉不同极性部位指纹图谱的差别, 并确认了各化学成分峰的归属, 为熊胆粉谱效关系的研究提供一定依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yuan M H, Zhou T, Lei K L, *et al.* Identification of the authenticity and geographical origin of bear bile powder by using high performance liquid chromatography-charged aerosol detector fingerprints combined with chemometrics [J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(3): e202201109.
- [2] 钟林江, 杨俊莉, 何勇志, 等. 熊胆粉的成分、鉴定及应用研究进展 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2021, 40(4): 335-339.
- [3] 曹妍, 张佩杰, 李婷, 等. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 结合 LC-MS 技术分析熊胆粉及常见胆类中药中的胆酸类成分 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5283-5292.
- [4] 石岩, 邹秦文, 魏锋, 等. 熊胆粉药材研究进展 [J]. 中国药事, 2014, 28(1): 82-85.
- [5] 寇冠军, 张晨, 王作林, 等. 熊胆粉的药理学研究进展 [J]. 中国药物评价, 2014, 31(3): 142-145.
- [6] 石岩, 魏锋, 林瑞超, 等. 熊胆粉中主要胆汁酸类成分的测定及分析 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(22): 1958-1961.
- [7] 朱晗. 熊胆粉及其胆汁酸成分抗脂多糖诱导的小胶质细胞炎症作用及机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [8] 林国华, 杜犀, 吴朝, 等. 熊胆粉保肝抗癌作用机制研究进展 [J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(18): 196-198.
- [9] 吴革林, 吴修红, 董阆伟, 等. 熊胆(粉)非胆汁酸类成分研究进展 [J]. 中医药学报, 2011, 39(3): 90-92.
- [10] 刘子博, 田瑶, 陶婷, 等. 熊胆粉改善大鼠实验性结肠炎及其作用靶点预测 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(15): 1680-1687.
- [11] 李艳秋, 程龙, 艾娇, 等. 熊胆粉解酒防醉作用及对急性酒精性肝损伤的保护机制 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(3): 1250-1254.
- [12] 迟新建, 王静, 李晓楠, 等. 熊胆粉滴眼液联合他克莫司治疗卡他性结膜炎临床研究 [J]. 新中医, 2022, 54(20): 127-130.
- [13] 戴晨曦, 阿尔斯拉·玉苏甫, 孙慧, 等. 熊胆粉通过调节 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路产生对急性酒精性肝损伤小鼠的肝保护作用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(11): 4081-4089.
- [14] 王青春, 关文祥, 满达, 等. 熊胆粉及熊去氧胆酸对原发免疫性血小板减少症小鼠骨髓和循环血 $\text{Ly}6\text{C}^{\text{hi}}$ 单核细胞及其细胞因子的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(2): 1154-1157.
- [15] 朱晗. 熊胆粉及其胆汁酸成分抗脂多糖诱导的小胶质细胞炎症作用及机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [16] 陈静. 新型指纹图谱技术在中药分析中的应用进展 [J]. 黑龙江科学, 2021, 12(6): 38-39.
- [17] 刘静, 亓超凡, 绪扩, 等. 指纹图谱技术在食品质量与安全中的应用研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3189-3197.
- [18] 郑振佳, 朱文卿, 梁浩, 等. 指纹图谱在食品分析中的应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 413-421.
- [19] 张怡欣, 孙帅, 程绒绒, 等. 基于超高效液相色谱串联电喷雾式检测器新技术的熊胆粉特征指纹图谱研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(3): 83-90.
- [20] 郭正红, 陈山, 何琪, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价黔钩藤质量 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(3): 583-591.
- [21] 冯志毅, 张强, 纪亮, 等. 甘草汁炮制前后栀子仁不同极性部位 HPLC 指纹图谱及其化学模式识别研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(4): 405-413.
- [22] 周雯雯, 史银基, 何江, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同生长期刺山柑果质量 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2235-2242.
- [23] 闫广利, 孙晖, 邱丽萍, 等. 熊胆粉产业化关键技术研究 [J]. 中医药学报, 2020, 48(1): 1-6.
- [24] 王杰, 熊爱珍, 程绒绒, 等. 不同来源引流熊胆粉的化学成分系统分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2326-2332.

[责任编辑 郑礼胜]