

## 牛膝指纹图谱分析

梁献葵, 雷敬卫\*, 龚海燕, 唐维维, 谢彩侠, 李瑞娟  
(河南中医药大学, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:对不同产地牛膝药材、同一产地不同规格牛膝药材的 HPLC 指纹图谱进行研究,比较不同产地牛膝药材、同一产地不同规格牛膝药材的 HPLC 指纹图谱差异,探讨产地、规格对牛膝药材质量的影响及规格与牛膝药材内部质量的联系;为牛膝药材的产地鉴别提供理论依据;为牛膝药材质量标准制定、规格完善及临床用药提供参考。**方法:**采用超声提取法制备样品,通过 HPLC 法采集不同产地牛膝药材、同一产地不同规格牛膝药材的指纹图谱,运用相似度、聚类分析、主成分分析的方法进行分析,并比较不同产地牛膝药材、不同规格牛膝药材的 HPLC 指纹图谱差异。**结果:**不同产地分析,主成分分析能将 5 个产地牛膝药材区分开,且产地鉴别结果优于聚类分析和相似度分析。不同规格分析,相似度和主成分分析均不能将不同规格牛膝药材区分开。**结论:**不同产地牛膝药材化学成分种类、峰高差异显著;不同规格牛膝药材化学成分种类、峰高差异较小;主成分分析可用于牛膝药材的产地鉴别。

**[关键词]** 牛膝; 不同产地; 不同规格; 相似度; 聚类分析; 主成分分析

**[中图分类号]** R284.2;R285;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)19-0109-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.201911914

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190617.0959.006.html>

**[网络出版时间]** 2019-06-17 17:04

### Analysis on Fingerprint of Achyranthis Bidentatae Radix

LIANG Xian-kui, LEI Jing-wei\*, GONG Hai-yan, TANG Wei-wei, XIE Cai-xia, LI Rui-juan  
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study HPLC fingerprints of Achyranthis Bidentatae Radix from different origins, compare different specifications in the same origin, and explore the effect of origin and specifications on the quality of Achyranthis Bidentatae Radix and relationship between the specifications and the internal quality of Achyranthis Bidentatae Radix, in order to provide basis for the identification of its origin. **Method:** The HPLC fingerprints of Achyranthis Bidentatae Radix from different origins and with different specifications in the same origin were collected. The similarity analysis, cluster analysis and principal component analysis were adopted to analyze the fingerprints, the differences in fingerprints of Achyranthis Bidentatae Radix from different origins and with different specifications in the same origin were compared. **Result:** Analysis of different origins and principal component analysis could be used to distinguish Achyranthis Bidentatae Radix from five producing areas, and the identification results of origin analysis was better than those of cluster analysis and similarity analysis. Analysis of different specifications, similarity analysis or principal component analysis could not distinguish Achyranthis Bidentatae Radix with different specifications. **Conclusion:** There are significant differences in chemical composition and peak height among Achyranthis Bidentatae Radix from different origins, with less differences in chemical composition and peak height of Achyranthis Bidentatae Radix with different specifications, the principal component analysis could be used to identify origins of Achyranthis Bidentatae Radix.

**[收稿日期]** 20181227(012)

**[基金项目]** 河南省中药材开发工程技术研究中心项目(142102313109);河南省科技攻关项目(162102310448)

**[第一作者]** 梁献葵,在读硕士,从事中药质量分析研究,E-mail:646909449@qq.com

**[通信作者]** \*雷敬卫,博士,研究生导师,从事中药质量分析研究,Tel:0371-656955281,E-mail:yjs2017tg@126.com

[Key words] *Achyranthis Bidentatae Radix*; different origin; different specification; similarity analysis; cluster analysis; principal component analysis

牛膝为苋科植物牛膝的干燥根<sup>[1]</sup>,主要含有甾酮、皂苷及多糖类化合物<sup>[2]</sup>,牛膝甾酮具有促进骨质增生、调节糖代谢、抗脂质过氧化等作用<sup>[3]</sup>。牛膝皂苷类具有抗炎、镇痛、活血、抑制肿瘤、子宫兴奋、抗生育的功能<sup>[4-7]</sup>;牛膝多糖具有降血糖、抗衰老、抗菌、抗过敏、免疫调节的功能<sup>[8-11]</sup>;牛膝多肽类物质对神经生长具有保护作用<sup>[12]</sup>等。

2015 年版《中国药典》通过单一化学成分蜕皮甾酮对其质量进行评价<sup>[1]</sup>,而牛膝化学成分复杂,单一化学成分含量不能系统、完整地反映药材的内部质量;2015 年版《中国药典》仅记载了怀牛膝的显微鉴别及以蜕皮甾酮、人参皂苷 R<sub>0</sub> 为对照品的薄层色谱鉴别;目前,我国中药材规格划分主要参照《76 种药材商品规格标准》,至今已历时三十多年,随着时间的变化,中药市场的情况也在不断变化,许多药材的商品规格已与当前的药材市场不相符<sup>[13]</sup>。该标准根据中部直径大小、长度等将牛膝划分为 3 个不同规格<sup>[14]</sup>,其未与牛膝药材内部质量结合起来。因此,本研究在该标准划分的基础上,多添加一个规格 4 等(杂条)<sup>[15-16]</sup>,对不同产地、同一产地不同规格牛膝指纹图谱进行研究,采用相似度、聚类、主成分分析等方法对其进行分析,并比较不同产地、同一产地不同规格牛膝指纹图谱差异,为其质量标准制定、规格完善及临床用药提供参考;为怀牛膝药材质量控制提供实验依据。

表 1 牛膝规格划分依据

Table 1 Specification classification basis of *Achyranthis Bidentatae Radix*

规格	划分依据
1 等(头肥)	长 50 cm 以上,中部直径 0.6 cm 以上,根条均匀,无冻条、油条、破条、杂条、虫蛀、霉变
2 等(二肥)	长 35 cm 以上,中部直径 0.4 cm 以上,根条均匀,无冻条、油条、破条、杂条、虫蛀、霉变
3 等(平条)	中部直径 0.4 cm 以下,但不小于 0.2 cm,长短不分
4 等(杂条)	凡不符合平条规定的细小碎条、枝叉、尖梢部分,间有冻条、油条、破条

## 2 方法与结果

### 2.1 混合对照品品的制备

精密称取蜕皮甾酮 2.17 mg, 25-R 牛膝甾酮 0.30 mg, 25-S 牛膝甾酮 0.31 mg, 人参皂苷 R<sub>0</sub> 1.27 mg, 竹节参皂苷 IVa 0.52 mg, 至 5 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,得混合对照品溶液。

### 2.2 供试品溶液的制备

精密称取牛膝粉末 1 g

## 1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ME204E 型 1/1 万分析天平, AB135-S 型 1/10 万分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);25-S 牛膝甾酮, 25-R 牛膝甾酮, 竹节参皂苷 IVa,  $\beta$ -蜕皮甾酮对照品(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号 3737, 3736, 2665, 1889, 纯度均  $\geq 98.0\%$ );人参皂苷 R<sub>0</sub> 对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 C18S8G43979, 纯度  $\geq 98\%$ );正丁醇、甲醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司),乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司),纯净水(Milli-Q 超纯水)

牛膝样品采集于河南省武陟县驾步村产地 1, 驾步村产地 2, 大封村, 东刘村, 董宋村 5 个产地;驾步村产地 1, 驾步村产地 2, 大封村 3 个产地牛膝采收于 2017 年 12 月;东刘村、董宋村 2 个产地牛膝采收于 2018 年 3 月。经河南中医药大学陈随清教授鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* 的干燥根。牛膝鲜品除去杂质,抢水洗,60 °C 烘干,得不同产地牛膝样品;60 °C 烘干后,驾步村产地 1 牛膝根据表 1 不同规格牛膝划分依据<sup>[14]</sup>进行划分,得不同规格牛膝样品。不同产地、不同规格牛膝均粉碎过 40 目筛,用自封袋密封,保存至干燥器。牛膝规格划分依据见表 1,样品信息见表 2。

(过 40 目筛),置具塞锥形瓶中,加水饱和和正丁醇 30 mL,密塞,浸泡过夜,300 W 超声提取 30 min,放至室温,用水饱和和正丁醇补足减失的质量,滤过,蒸干,浸膏加甲醇溶解,并转移至 5 mL 量瓶中,定容,摇匀,即得。

### 2.3 色谱条件

Venusil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m);流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱

表 2 牛膝样品信息

Table 2 Sample information of *Achyranthis Bidentatae Radix*

样品编号	产地/规格	批次	样品编号	产地/规格	批次
JB1 ~ JB3	驾步村产地 1	1	1D1 ~ 1D4	1 等	1
JB4 ~ JB6		2	1D5 ~ 1D7		2
JB7 ~ JB9		3	1D8 ~ 1D10		3
jb1 ~ jb3	驾步村产地 2	1	2D1 ~ 2D2	2 等	1
jb4 ~ jb6		2	2D3 ~ 2D4		2
jb7 ~ jb10		3	2D5 ~ 2D6		3
DF1 ~ DF3	大封村	1	3D1 ~ 3D4	3 等	1
DF4 ~ DF7		2	3D5 ~ 3D7		2
DF8 ~ DF11		3	3D8 ~ 3D10		3
DL1 ~ DL3	东刘村	1	4D1 ~ 4D3	4 等	1
DL4 ~ DL6		2	4D4 ~ 4D6		2
DL7 ~ DL9		3	4D7 ~ 4D9		3
DL10 ~ DL14		4			
DS1 ~ DS3	董宋村	1			
DS4 ~ DS7		2			
DS8 ~ DS11		3			

(0 ~ 25 min, 10% ~ 20% A, 25 ~ 40 min, 20% ~ 29% A, 40 ~ 48 min, 29% A); DAD 检测器, 0 ~ 26 min, 波长 230 nm, 26 ~ 31 min, 波长 280 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL; 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>。

## 2.4 方法学考察

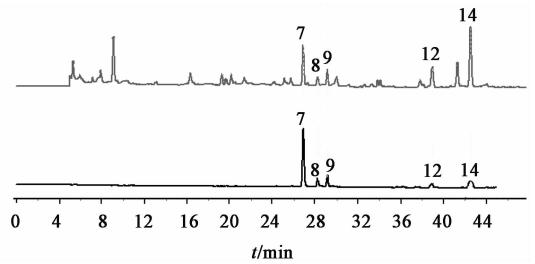
**2.4.1 精密度试验** 取同一牛膝样品一份, 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.3 项下色谱条件, 精密吸取该供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 重复进样 6 次, 记录指纹图谱, 各峰的相对保留时间 RSD 在 0.02% ~ 2.2%, 相对保留峰面积 RSD 在 1.1% ~ 2.8%, 证明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取同一牛膝样品 6 份, 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份, 按照 2.3 项下色谱条件, 精密吸取供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 测得各峰的相对保留峰面积的 RSD 在 1.0% ~ 2.8%, 相对保留时间的 RSD 在 0.03% ~ 2.1%, 说明此方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 同一牛膝样品一份, 按照 2.3 项下色谱条件, 精密吸取供试品溶液 5 μL, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 测得各峰的相对保留峰面积的 RSD 在 1.4% ~ 2.9%, 相对保留时间的 RSD 在 0.04% ~ 2.2%。说明样品在 24 h 内稳定性良好。

**2.5 HPLC 指纹图谱采集** 分别精密吸取对照品

1 μL, 供试品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定, 即得。混合对照品及样品 HPLC 色谱见图 1。



A. 对照品; B. 样品 7. 蜕皮甾酮; 8. 25-R 牛膝甾酮; 9. 25-S 牛膝甾酮; 12. 人参皂苷 R<sub>0</sub>; 14. 竹节参皂苷 IV<sub>a</sub>

图 1 牛膝样品的 HPLC

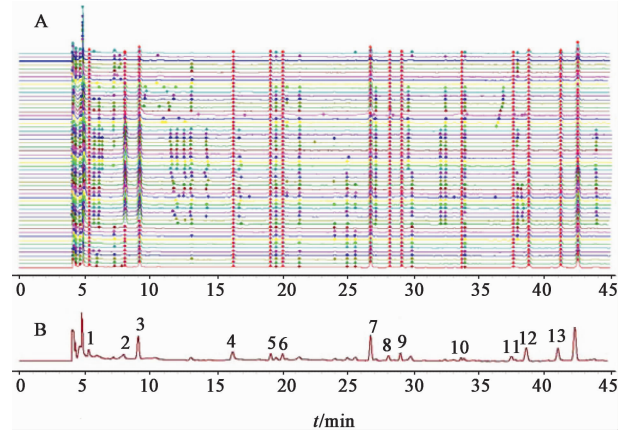
Fig. 1 HPLC of *Achyranthis Bidentatae Radix* sample

**2.6 牛膝 HPLC 指纹图谱相似度分析** 分别将不同产地、不同规格牛膝指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012 版)”中, 设 DF1, 1D1 号样品的指纹图谱为参照图谱, 采用中位数法, 设定时间窗宽度为 0.3, 并进行多点校正和 Mark 峰匹配, 分别生成不同产地、不同规格牛膝的对照图谱。

**2.6.1 不同产地牛膝指纹图谱相似度分析** 叠加图及对照图谱见图 2, 对照图谱共标定 14 个共有峰, 峰 7 为蜕皮甾酮, 峰 8 为 25-R 牛膝甾酮, 峰 9 为 25-S 牛膝甾酮, 峰 12 为人参皂苷 R<sub>0</sub>, 峰 14 为竹节参皂苷 IV<sub>a</sub>。指纹图谱与对照图谱的相似度见表 3, 不同产地牛膝样品的相似度在 0.82 以上, 将 JB8, jb3, DF7 看作离群个体。当相似度在 0.98 以上, 可将东刘村牛膝与其他 4 个产地牛膝区分开; 当相似度在 0.929 ~ 0.961, 可将驾步村产地 2 牛膝与其他 4 个产地牛膝区分开; 当相似度在 0.883 ~ 0.929, 可将董宋村牛膝与东刘村, 驾步村产地 1, 驾步村产地 2 牛膝区分开; 当相似度在 0.852 ~ 0.895, 可将大封村牛膝与驾步村产地 1, 东刘村牛膝区分开; 当相似度在 0.820 ~ 0.865, 可将驾步村产地 1 牛膝与驾步村产地 2, 东刘村, 董宋村牛膝区分开。

**2.6.2 不同规格牛膝指纹图谱相似度分析** 叠加图及对照图谱见图 3, 对照图谱共标定 16 个共有峰, 峰 9 为蜕皮甾酮, 峰 10 为 25-R 牛膝甾酮, 峰 11 为 25-S 牛膝甾酮, 峰 14 为人参皂苷 R<sub>0</sub>, 峰 16 为竹节参皂苷 IV<sub>a</sub>。指纹图谱与对照图谱的相似度见表 4, 不同规格牛膝指纹图谱相似度在 0.92 以上, 说明不同规格牛膝 HPLC 指纹图谱差异较小。

**2.7 不同产地牛膝聚类分析** 运用 IBM SPSS Statistics 21 软件对不同产地牛膝的 HPLC 的指纹图谱进行聚类分析, 输出结果为树状图。描述选项将



A. 叠加图; B. 对照图谱(图 3 同)

图 2 不同产地牛膝 HPLC 指纹谱叠加及对照

Fig. 2 HPLC fingerprint superposition and reference fingerprint of Achyranthis Bidentatae Radix from different habitats

表 3 不同产地牛膝图谱的相似度

Table 3 Similarity in Achyranthis Bidentatae Radix from different habitats

样品编号	相似度	样品编号	相似度	样品编号	相似度	样品编号	相似度
DF1	0.873	DL4	0.986	DS4	0.896	jb7	0.950
DF2	0.894	DL5	0.986	DS5	0.876	jb8	0.936
DF3	0.874	DL6	0.985	DS6	0.900	jb9	0.929
DF4	0.881	DL7	0.988	DS7	0.924	jb10	0.940
DF5	0.881	DL8	0.990	DS8	0.929	JB1	0.836
DF6	0.885	DL9	0.982	DS9	0.883	JB2	0.849
DF7	0.920	DL10	0.980	DS10	0.903	JB3	0.841
DF8	0.879	DL11	0.982	DS11	0.911	JB4	0.827
DF9	0.852	DL12	0.983	jb1	0.954	JB5	0.852
DF10	0.895	DL13	0.991	jb2	0.961	JB6	0.865
DF11	0.888	DL14	0.982	jb3	0.844	JB7	0.861
DL1	0.987	DS1	0.890	jb4	0.946	JB8	0.922
DL2	0.983	DS2	0.905	jb5	0.939	JB9	0.820
DL3	0.982	DS3	0.891	jb6	0.927		

峰面积数据进行标准化处理, 区间选择 Euclidean, 聚类方法为组间连接, 聚类成员选单一方案, 聚类数为 5。树状图输出结果见图 4。

从图 4 可以看出, 将 S19 和 S40 当作离群个体。当欧氏距离 < 8 时, 牛膝样品被分为 4 类, 大封村、驾步村产地 1 牛膝样品被归为 1 类, 东刘村、董宋村、驾步村产地 2 牛膝样品各被归为 1 类; 当欧氏距离 < 9 时, 牛膝样品被归为 3 类, 大封村与驾步村产地一牛膝样品被归为 1 类, 董宋村和驾步村产地二牛膝样品被归为 1 类, 东刘村产牛膝单独归为 1 类; 当欧氏距离 < 10 时, 牛膝样品被归为 2 类, 大封村、

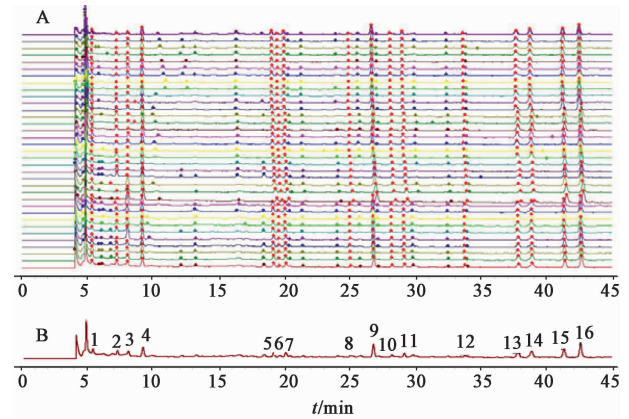


图 3 不同规格牛膝 HPLC 指纹谱叠加及对照谱

Fig. 3 HPLC fingerprint superposition and reference fingerprint of Achyranthis Bidentatae Radix from different specification

驾步村产地 1、董宋村、驾步村产地 2 牛膝被归为 1 类, 东刘村牛膝样品被单独归为 1 类; 当欧氏距离 < 14 时, 5 个不同产地牛膝样品被归为 1 类。

**2.8 主成分分析** 分别以不同产地、不同规格牛膝样品峰面积为原始数据, 通过 SPSS 21.0 软件中的描述统计中描述项对数据进行标准化处理。主成分的依据, 主成分的特征值及贡献率大小。载荷矩阵则反映各个变量对主成分的重要程度。不同产地、不同规格牛膝主成分特征值和方差贡献率分别见表 2, 3, 初始因子载荷矩阵见表 5, 碎石图见图 5, 主成分分析响应值平面图见图 6。

表 4 不同规格牛膝图谱的相似度

Table 4 Similarity in *Achyranthis Bidentatae Radix* from different specification

样品编号	相似度	样品编号	相似度	样品编号	相似度	样品编号	相似度
1D1	0.996	1D10	0.922	3D3	0.995	4D2	0.993
1D2	0.991	2D1	0.977	3D4	0.988	4D3	0.996
1D3	0.997	2D2	0.967	3D5	0.982	4D4	0.996
1D4	0.994	2D3	0.960	3D6	0.939	4D5	0.997
1D5	0.937	2D4	0.970	3D7	0.988	4D6	0.989
1D6	0.988	2D5	0.962	3D8	0.989	4D7	0.995
1D7	0.972	2D6	0.976	3D9	0.941	4D8	0.993
1D8	0.988	3D1	0.987	3D10	0.994	4D9	0.991
1D9	0.982	3D2	0.994	4D1	0.996		

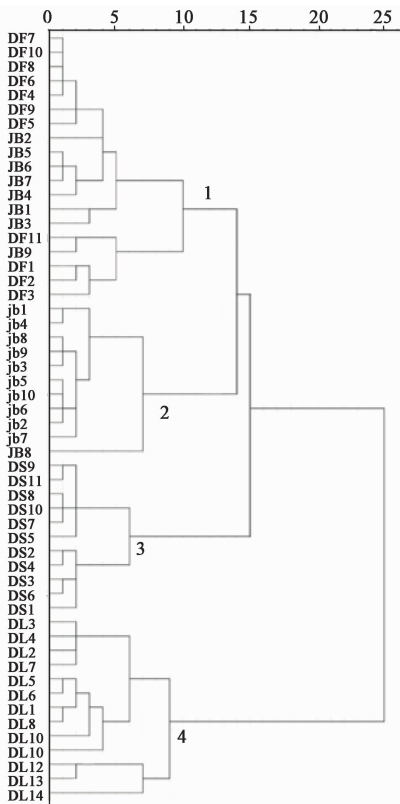


图 4 不同产地牛膝聚类分析树状关系

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis of *Achyranthis Bidentatae Radix* from different habitats

**2.8.1 不同产地牛膝主成分分析** 由表 6,7 可知,前 4 个因子的特征值 > 1,即 6.539,2.197,1.648,1.291 对总方差的累计贡献率达到 83.396%,代表了不同产地牛膝样品指纹图谱中 14 个分析变量的大部分信息。第 1 主成分的特征根为 6.539,累计贡献率为 46.706%,峰 2,4,6,7,8,10,11,15 在第 1 主成分上有较高载荷,说明第 1 主成分主要反映了这 8 个成分的指标的信息;同理,第 2 主成分特征根

为 3.268,累计贡献率为 14.319%,主要反映了峰 13,14,15 的信息;第 3 主成分特征根为 1.648,累计贡献率为 11.774%,主要反映了峰 5,9 的信息;第 4 主成分特征根为 1.291,累计贡献率为 9.221%,主要反映了峰 12 的信息。

**2.8.2 不同规格牛膝主成分分析** 由表 6,7 可知,前 5 个因子的特征值大于 1,即 4.309,2.970,2.471,1.841,1.067 对总方差的累计贡献率达到 79.120%,代表了不同产地牛膝样品指纹图谱中 16 个分析变量的大部分信息。第 1 主成分的特征根为 4.309,累计贡献率为 26.933%,峰 8,9,11 在第 1 主成分上有较高载荷,说明第 1 主成分主要反映了这 3 个成分的指标的信息;同理,第 2 主成分特征根为 2.970,累计贡献率为 18.565%,主要反映了峰 7,12,13,14,15,16 的信息;第 3 主成分特征根为 2.471,累计贡献率为 15.442%,主要反映了峰 5,6 的信息;第 4 主成分特征根为 1.841,累计贡献率为 11.508%,主要反映了峰 1,2,4,10 的信息;第 5 主成分特征根为 1.067,累计贡献率为 6.672%,主要反映了峰 3 的信息。

对不同产地、不同规格牛膝 HPLC 指纹图谱进行主成分分析,由主成分 1 和主成分 2 得分绘制其响应值平面图。由图 6A 可知,除了 DF5,jb10,JB8,JB9 离群外,主成分分析可将驾步村产地 1,驾步村产地 2,大封村,东刘村,董宋村 5 个产地牛膝区分开;由图 6B 可知,除了 2D5 离群外,主成分分析可将不同规格牛膝划分成 3 类,1 等,3 等牛膝被单独归为 1 类,2 等和 4 等牛膝被归为 1 类。

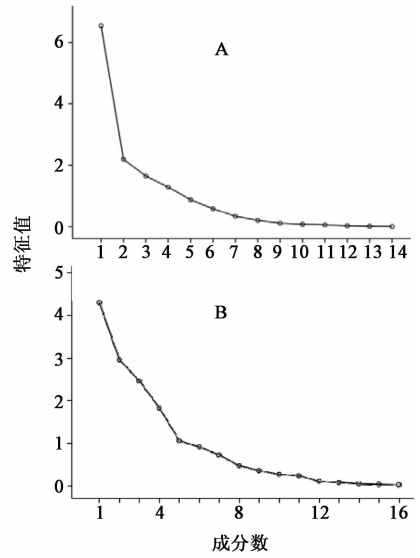
**2.9 不同产地牛膝指纹图谱差异分析** 不同产地牛膝化学成分组成存在显著差异。由图 7 可知,z2 峰为驾步村产地 1 牛膝的特征峰;z1,z10 为驾步村

表 5 初始因子载荷矩阵

Table 5 Initial factor load matrix

分类	峰号	成分				
		1	2	3	4	5
产地	峰 2	0.077	0.407	0.445	0.572	
	峰 3	0.567	-0.597	0.512	-0.045	
	峰 4	0.909	-0.200	0.311	-0.116	
	峰 5	0.589	-0.181	0.659	-0.047	
	峰 6	0.749	-0.545	-0.169	0.112	
	峰 7	0.684	-0.401	-0.433	0.082	
	峰 8	0.820	0.048	-0.519	0.104	
	峰 9	0.640	0.243	-0.680	0.090	
	峰 10	0.924	-0.105	-0.171	-0.052	
	峰 11	0.897	-0.027	0.253	-0.191	
	峰 12	0.045	-0.347	-0.005	0.801	
	峰 13	0.511	0.629	0.176	0.317	
	峰 14	0.617	0.710	-0.036	-0.168	
	峰 15	0.727	0.634	0.209	-0.060	
	规格	峰 1	0.464	-0.260	-0.139	0.580
峰 2		0.285	0.224	-0.545	0.577	-0.267
峰 3		0.578	-0.373	0.301	-0.109	0.401
峰 4		0.160	-0.257	0.692	0.211	0.185
峰 5		0.687	-0.467	0.069	0.236	0.253
峰 6		-0.027	-0.537	-0.246	0.651	0.284
峰 7		0.768	0.085	0.103	-0.416	-0.302
峰 8		0.470	0.371	-0.313	0.213	0.381
峰 9		0.947	-0.076	0.012	-0.149	-0.082
峰 10		-0.138	0.357	0.679	0.071	0.157
峰 11		0.953	-0.015	0.111	-0.091	-0.022
峰 12		0.550	0.073	0.328	-0.035	-0.309
峰 13		0.251	0.782	-0.375	-0.034	0.186
峰 14		0.423	0.681	-0.364	-0.132	0.302
峰 15		-0.019	0.630	0.525	0.447	-0.027
峰 16		0.005	0.621	0.532	0.404	-0.102

产地 1, 大封村, 驾步村产地 2 的共有峰; z3 峰为驾步村产地 1, 东刘村牛膝的共有峰; z4 峰为驾步村产地 1, 大封村, 东刘村, 董宋村牛膝的共有峰; z9 峰为驾步村产地 1, 大封村, 东刘村, 驾步村产地 2 牛膝的共有峰。w1, w3 峰为大封村牛膝的特征峰; w2 为大封村、东刘村牛膝的共有峰; w4 为大封村、驾步村产地 2 牛膝的共有峰。y2, y7 峰为董宋村牛膝的特征峰, y1, y5, y6 峰为东刘村、董宋村牛膝的共有峰;



A. 不同产地; B. 不同规格 (图 6 同)

图 5 不同产地、不同规格牛膝主因子数碎石

Fig. 5 Macadam map of main factors of Achyranthis Bidentatae Radix from different producing areas and specifications

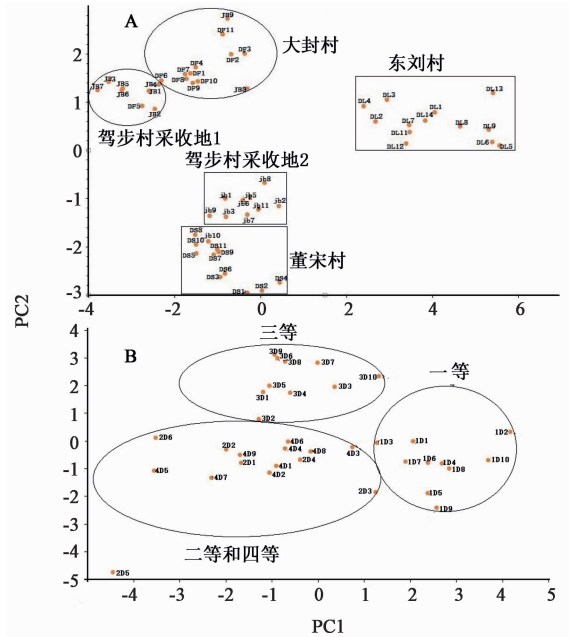


图 6 不同产地、不同规格牛膝主成分分析响应

Fig. 6 Planar plan of principal component analysis of Achyranthis Bidentatae Radix from different habitats and different specifications

y8 峰为大封村、东刘村、董宋村牛膝的共有峰。

不同产地牛膝某些峰峰高存在显著差异。由图 7 可知, 东刘村、董宋村牛膝的峰 1 明显低于其他 3 个产地牛膝, 峰 2, 峰 3 明显高于其他 3 个产地牛膝, 其中东刘村牛膝峰 3 远大于董宋村牛膝; 驾步村产地 1 牛膝峰 4 明显高于其他 4 个产地牛膝; 驾步

表 6 不同产地牛膝主成分特征值与方差贡献率

Table 6 Principal component eigenvalues and variance contribution rate of *Achyranthis Bidentatae Radix* from different habitats

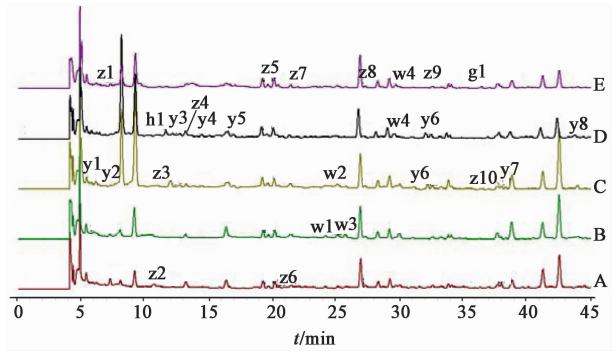
成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差/%	累积/%	合计	方差/%	累积/%
峰 1	6.539	46.706	46.706	6.539	46.706	46.706
峰 2	2.197	15.694	62.400	2.197	15.694	62.400
峰 3	1.648	11.774	74.174	1.648	11.774	74.174
峰 4	1.291	9.221	83.396	1.291	9.221	83.396
峰 5	0.878	6.270	89.665			
峰 6	0.588	4.199	93.864			
峰 7	0.340	2.430	96.294			
峰 8	0.209	1.490	97.784			
峰 9	0.114	0.817	98.601			
峰 10	0.078	0.558	99.160			
峰 11	0.060	0.429	99.589			
峰 12	0.034	0.240	99.829			
峰 13	0.016	0.117	99.946			
峰 14	0.008	0.054	100.000			

表 7 不同规格牛膝主成分特征值与方差贡献率

Table 7 Principal component eigenvalues and variance contribution rates of *Achyranthis Bidentatae Radix* with different specifications

成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差/%	累积/%	合计	方差的/%	累积/%
峰 1	4.309	26.933	26.933	4.309	26.933	26.933
峰 2	2.970	18.565	45.498	2.970	18.565	45.498
峰 3	2.471	15.442	60.941	2.471	15.442	60.941
峰 4	1.841	11.508	72.449	1.841	11.508	72.449
峰 5	1.067	6.672	79.120	1.067	6.672	79.120
峰 6	0.920	5.750	84.871			
峰 7	0.736	4.597	89.468			
峰 8	0.479	2.991	92.459			
峰 9	0.366	2.284	94.744			
峰 10	0.278	1.736	96.479			
峰 11	0.246	1.536	98.015			
峰 12	0.110	0.685	98.700			
峰 13	0.083	0.516	99.217			
峰 14	0.055	0.346	99.563			
峰 15	0.041	0.255	99.817			
峰 16	0.029	0.183	100.000			

村产地 1, 驾步村产地 2, 东刘村牛膝峰 14 明显高于其他 2 个产地牛膝; 董宋村、驾步村产地 1 牛膝的



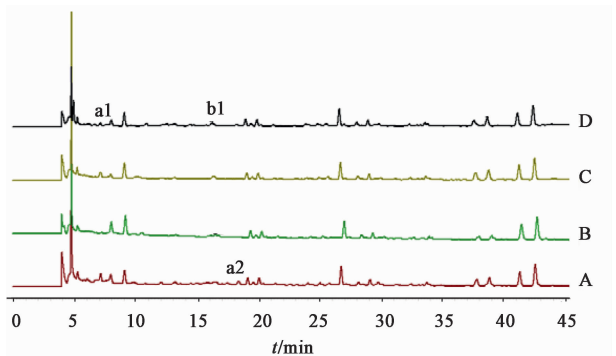
A. JB; B. DF; C. DL; D. DS; E. jb

图 7 不同产地牛膝 HPLC 指纹谱比较

Fig. 7 HPLC comparative diagram of *Achyranthis Bidentatae Radix* from different habitats

y9 峰远大于其他 3 个产地。

**2.10 不同规格牛膝指纹图谱差异** 不通规格牛膝化学成分种类及峰高差异较小。由图 8 可知, 峰 a4 为 1 等牛膝的特征峰, 峰 b1 为 2 等, 3 等, 4 等规格牛膝的共有峰; 其中 1 等牛膝峰 a1 峰高明显高于其他 3 个规格牛膝; 1 等, 3 等, 4 等牛膝峰 13, 峰 14 明显高于 2 等牛膝。



A. 1 等; B. 2 等; C. 3 等; D. 4 等

图 8 不同规格牛膝 HPLC 指纹谱比较

Fig. 8 HPLC comparative diagram of *Achyranthis Bidentatae Radix* from different specifications

### 3 讨论

不同产地牛膝化学成分种类、峰高存在显著差异。相似度分析只能不同产地牛膝归为 3 类, 驾步村产地 2, 东刘村产地牛膝被单独归为 1 类, 驾步村产地 1, 大封村, 董宋村牛膝归为 1 类; 聚类分析只能把不同产地牛膝归为 4 类, 驾步村产地 2, 东刘村, 董宋村牛膝被单独归为 1 类; 驾步村产地 1, 大封村牛膝被归为 1 类; 主成分分析能把 5 个不同产地牛膝区分开。说明主成分分析对牛膝得产地鉴别结果优于聚类分析和相似度分析。

不同规格牛膝化学成分种类、峰高差异较小。

不同规格牛膝相似度在 0.92 以上,相似度未能将规格牛膝区分开;主成分分析能将 1 等,3 等规格牛膝区分开,未能把 2 等,4 等规格牛膝区分开。

中药材质量与其生长环境、采收季节密切相关。本实验研究发现,同 1 季节采收的牛膝,无论是同 1 个村产牛膝或是不同村产牛膝,其化学成分种类及含量均存在显著差异,可能与牛膝生长条件相关,牛膝生长条件(如天气、温度、土壤、种植时间、施肥次数等)不同,药材中的某些成分种类及含量也会存在较大差异;不同季节采收牛膝,其化学种类及含量均存在显著差异,可能和牛膝产地、采收季节不同有关。

实验使用 DAD 检测器,对供试品进行 190 ~ 450 nm 全波长扫描,得到 3D 图谱。从 3D 图谱直接提取的最大值色谱图基线漂移,所以分别提取 230, 280 nm 波长下的色谱图,这 2 个波长下基线平稳。不同成分紫外吸收波长不同,为了获取更多的色谱信息采用转换波长法,将不同波长下色谱信息展现在同一张图谱中。

本实验对不同产地、不同规格牛膝指纹图谱进行研究,探讨不同产地、不同规格牛膝药材指纹图谱差异,为该药材等级标准完善及临床用药提供参考,对保证该药材质量及疗效具有重要意义。但单纯由指纹图谱来评价中药质量仍是不全面的,为了更好地阐明不同产地、不同规格牛膝差异,深入了解不同产地、不同规格牛膝牛膝成分含量及种类差异,尚须做更多的物质基础(化学成分)及药理药效方面的系统研究,下一步将进行不同产地、不同规格牛膝不同极性部位指纹图谱研究,同时对不同产地牛膝不同极性部位及不同规格牛膝进行药理实验实验研究,为该药材临床用药提供参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:73.  
[2] 胡婷婷,张振凌. 中药牛膝化学成分、药理作用及储

藏保管[J]. 中国老年学杂志,2016,36(13): 3321-3322.

[3] 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(6):820-826.  
[4] 赵婉婷,孟大利,李锐. 牛膝的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(4):207-210.  
[5] 郭胜民,车锡平,范晓雯. 怀牛膝皂苷 A 的抗生育作用和对离体子宫平滑肌的作用[J]. 西北药学杂志,1996,11:47-49.  
[6] 张文学,杨林松,张新胜,等. 怀牛膝抗着床作用与子宫肥大细胞的关系[J]. 中国免疫学杂志,2002,18(7):492-495.  
[7] 刘建华,梁生旺,王淑美. 牛膝皂苷栓的抗生育作用研究[J]. 河南中医学报,2006,21(1):35-37.  
[8] TAN F, DENG J. Analysis of the constituents and antisenile function of *Achyranthes bidentata* polysaccharides [J]. Acta Bot Sin, 2002, 44(7): 795-798.  
[9] 彭颖,吕建新. 牛膝多糖抑制大肠埃希菌细胞粘附的实验研究[J]. 中国微生态学杂志,2002,14(5): 2-62.  
[10] 黄丰,童晓云,张荣华. 牛膝多糖对抗原诱导的肥大细胞活化的影响[J]. 中国药理学通报,2008,24(10):1302-1305.  
[11] 杨柳,姜海,卢清秀,等. 牛膝药理作用的研究进展[J]. 生物技术世界,2012,10(12):28-38.  
[12] 沈舒,王琼,李友宾. 牛膝的化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2011,23(11):1-6.  
[13] 薛淑娟. 不同商品规格地黄的品质评价[D]. 郑州:河南中医药大学,2016.  
[14] 国家医药管理局,中华人民共和国卫生部. 七十六种药材商品规格标准[M]. 1984:3.  
[15] 张振凌,石延帮,陈红,等. 不同商品等级牛膝饮片酒炙前后齐墩果酸含量的比较[J]. 中药材,2008(5): 650-651.  
[16] 施崇精,程中琴,刘小妹,等. 基于性状特征结合泡沫试验快速鉴别川牛膝及其伪品、掺伪品[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(5):173-179.

[责任编辑 顾雪竹]