# 川牛膝不同产地药材质量综合评价研究

丁　刚[1,2,3,4],李隆云[1,2,3,4*],宋旭红[1,2,3,4],付绍智[5]

[1]重庆市中药研究院;[2]重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心;[3]重庆市中药资源学重点实验室;
[4]中国中医科学院中药资源中心重庆分中心,重庆 400065;[5]重庆三峡医药高等专科学校,重庆 404120

**摘　要**:为了建立更全面的川牛膝药材质量评价方法,按照 2015 版《中华人民共和国药典》方法测定水分、总灰分、水冷浸物和乙醇冷浸物;新建 HPLC 法测定川牛膝中杯苋甾酮、前杯苋甾酮和齐墩果酸 3 种成分的含量,并通过 SPSS 20.0 软件进行聚类分析和主成分分析。本研究较全面地评价了全国 54 个产地川牛膝药材的质量,54 批川牛膝样品的水分、总灰分、浸出物、含量均符合药典标准,为川牛膝药材的进一步开发提供了依据。

**关键词**:川牛膝;质量评价;聚类分析;主成分分析

**中图分类号**:R932　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2020)5-0851-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.5.019

# Study on quality evaluation of *Cyathula officinalis* Kuan

DING Gang[1,2,3,4],LI Long-yun[1,2,3,4*],SONG Xu-hong[1,2,3,4],FU Shao-zhi[5]

[1]*Chongqing Academy of Chinese Materia Medica*;
[2]*Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica*;
[3]*Chongqing key Laboratory of Chinese Medicine Resources*;
[4]*Chongqing Sub-center of National Resources Center for Chinese Materia Medica*,
*China Academy of Chinese Medical Sciences*,*Chongqing 400065*,*China*;
[5]*Chongqing Three Gorges Medical College*,*Chongqing 404120*,*China*

**Abstract**:In order to establish a more comprehensive quality evaluation method of *Cyathula officinalis* Kuan. The water content,total ash,water-cooled extract and ethanol cold extract were determined according to the Pharmacopoeia of the people's Republic of China (2015);A new HPLC method was established for the determination of three components of cyasterone pre-cyasterone and oleanolic acid in *C. officinalis*. custer analysis and principal component analysis were carried out by SPSS 20.0 software. This study comprehensively evaluated the quality of *C. officinalis* from 54 places in China,the water content,total ash,extract and content of 54 batches of *C. officinalis* samples all meet the pharmacopoeia standard,provided a basis for the further development of *C. officinalis*.

**Key words**:*Cyathula officinalis* Kuan;quality evaluation;cluster analysis;principal component analysis

川牛膝又名白牛膝、甜牛膝,始载于明初兰茂的《滇南本草》。川牛膝来源于苋科植物川牛膝(*Cyathula officinalis* Kuan)的干燥根,为著名的川产道地药材之一,是一种重要的大宗中药材。《中国药典》(2015 版,一部)有收载,其性甘,微苦,平,归肝、肾经,具有逐瘀通经、通利关节、利尿通淋等功效,在我国有较长的民间药用和临床应用历史。川牛膝的产地主要是四川、重庆、湖北和湖南,由于各地气候、地形、土壤条件等不同,所产川牛膝质量也不均一。Ma 等[1]测定不同产地川牛膝中杯苋甾酮的含量有显著性差异,道地川牛膝中杯苋甾酮含量并不是最高。Zhang 等[2]检测不同产地川牛膝中齐墩果酸含量差异较大,牛膝栽培品的含量均高于野生品。Geng 等[3]分离测定川牛膝中阿魏酸,Liu 等[4]分离纯化鉴定川牛膝的多糖。分别从不同角度研究川牛膝内在质量,为了综合开发川牛膝产品及保障用药安全,有必要对各产地川牛膝药材的质量进行全面

收稿日期:2019-12-30　　接受日期:2020-05-21
基金项目:国家中药材产业技术体系(CARS-21);重庆市中药材产业技术体系(2019-[5]号);重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2019jscx-gksbX0009 );奉节川牛膝规范化种植关键技术研究与示范推广(cstc2016shmszx1128)
*通信作者 Tel:86-23-89029118;E-mail:lilongyun8@163.com

天然产物研究与开发

的评价。本实验建立了同时测定川牛膝杯苋甾酮、前杯苋甾酮和齐墩果酸,3 种成分的 HPLC 方法,对不同产地川牛膝 3 种成分、总灰分、水冷浸物和乙醇冷浸物进行测定,并通过系统聚类分析法、主成分分析法进行评价,通过以上研究,更加全面地评价各地川牛膝的质量,为川牛膝药材的临床使用和产品开发提供依据。

## 1 仪器与试药

仪器:Agilent 1260 高效液相色谱仪(Agilent 公司,美国;DAD 检测器),UV 2600 紫外分光光度计(岛津公司,日本),Milli(Q Integral 5 型纯水仪(Millipoer 公司,美国),BSA 124(S 型电子天平(Sartorius,德国),KQ(250 DB 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,中国),8(10 型马弗炉(沈阳节能电炉厂,中国),XMTB 数显式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司,中国),G2X(9240 MBE 电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂,中国)。

对照品:杯苋甾酮对照品(批号:MUST-16070511,纯度:≥99%)、前杯苋甾酮对照品(批号:MUST-16072203,纯度:≥98%)购自成都曼斯特生物科技有限公司;齐墩果酸对照品(批号:TAQT-LR-LA,纯度:≥93.1%)购自中国食品药品检定研究院。

试剂:甲醇(TEDIA 公司,美国;色谱纯)、醋酸(TEDIA 公司,美国;色谱纯),其它试剂均为分析纯。

样品产地:在全国范围内共收集样品 54 批,详细信息见表 1。样品经重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定为苋科植物川牛膝(*Cyathula officinalis* Kuan)的干燥根。

**表 1 川牛膝样品来源**

Table 1 Origin of *C. officinalis* Kuan

| 地区 Region | 编号 No. | 地点 Habitat | 海拔 Altitude (m) | 地区 Region | 编号 No. | 地点 Habitat | 海拔 Altitude (m) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 重庆市 | c-1 | 奉节县太和乡尖山村纸厂坪 | 1 641 | 四川省 | s-1 | 金口河永胜乡五池村 3 组 | 1 845 |
| | c-2 | 奉节县双店乡乡石桥村 3 组 | 1 625 | | s-2 | 宝兴县永富乡中岗村 12 组 | 2 112 |
| | c-3 | 奉节太和乡张家岩 | 1 724 | | s-3 | 宝兴县蜂桶寨新康村 7 组 | 1 942 |
| | c-4 | 奉节长安乡九里村 | 1 642 | | s-4 | 乐山金口河永胜乡大坪村 2 | 1 862 |
| | c-5 | 奉节太和乡双梁村 | 1 579 | | s-5 | 宝兴县永富乡中岗村 15 组 | 1 798 |
| | c-6 | 奉节县长安乡皂角村 | 1 581 | | s-6 | 金口河永胜乡和平村 4 组 | 1 845 |
| | c-7 | 奉节县太和乡尖山村上双梁坪 | 1 684 | | s-7 | 宝兴县陇东乡崇兴村大圆包 | 2 015 |
| | c-8 | 奉节县太和乡尖山村双梁坪 | 1 721 | | s-8 | 金口河永胜乡五池村 2 组 | 1 898 |
| | c-9 | 奉节县太和乡尖山村大湾 | 1 695 | | s-9 | 乐山龙池乡万村 | 1 823 |
| | c-10 | 奉节县长安乡西曹村 7 社 7 | 1 550 | | s-10 | 乐山金口河永胜乡五池村 1 组 | 1 841 |
| | c-11 | 奉节县长安乡西曹村 6 社 1 | 1 700 | | s-11 | 卢山县罗纯岗朝阳村 1 | 1 794 |
| | c-12 | 奉节县长安乡西曹村 6 社 2 | 1 720 | | s-12 | 金口河永胜乡和平村组 1 | 1 823 |
| | c-13 | 奉节县长安乡西曹村 4 社 5 | 1 390 | | s-13 | 峨边县野生 | 2 254 |
| | c-14 | 奉节县长安乡西曹村 4 社 6 | 1 390 | | s-14 | 卢山县罗纯岗朝阳村 2 | 1 792 |
| | c-15 | 奉节县长安乡西曹村 6 社 3 | 1 700 | | s-15 | 乐山金口河永胜乡大坪村 1 | 1 874 |
| | c-16 | 奉节县长安乡西曹村 6 社 4 | 1 700 | | s-16 | 乐山金口河永胜乡五池村 6 组 | 1 869 |
| | c-17 | 城口县厚坪乡 | 1 820 | 湖北 | h-1 | 湖北恩施板桥乡居委会 1 | 1 620 |
| | c-18 | 城口县厚坪乡盘龙村 | 1 750 | 湖南 | h-2 | 湖北恩施板桥乡居委会 2 | 1 656 |
| | c-19 | 巫山县三溪乡红花村 | 1 650 | | h-3 | 利川相阳坎镇龙坊村 2 组 | 1 685 |
| | c-20 | 巫山县红椿乡红椿村 | 1 730 | | h-4 | 恩施板桥镇老鸦石 2 组 1 | 1 841 |
| | c-21 | 巫山县笃坪乡和气村 5 队 1 | 1 830 | | h-5 | 湖北恩施板桥乡蒿坝村 | 1 778 |
| | c-22 | 巫山县笃坪乡和气村 5 队 2 | 1 840 | | h-6 | 利川元理乡洛阳村 10 组 | 1 724 |
| | c-23 | 巫山县笃坪乡和气村乡 5 队 3 | 1 862 | | h-7 | 恩施板桥镇老鸦石 2 组 2 | 1 819 |

天然产物研究与开发

续表 1(Continued Tab. 1)

| 地区 Region | 编号 No. | 地点 Habitat | 海拔 Altitude (m) | 地区 Region | 编号 No. | 地点 Habitat | 海拔 Altitude (m) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | c-24 | 奉节县奉节县长安乡石缙村 1 | 1 740 | | h-8 | 湖南小沙江镇杉木坪村 | 1 685 |
| | c-25 | 奉节县长安乡石缙村 14 社 | 1 760 | | h-9 | 湖南小沙江镇肖家院子 | 1 623 |
| | c-26 | 奉节县长安乡石缙村 2 | 1 820 | 贵州省 | zz-1 | 贵州大方县兴隆乡狮子村 5 组 | 1 925 |
| | c-27 | 奉节县长安乡石缙村 17 社 | 1 830 | | | | |
| | c-28 | 巫溪县天元乡新月村 | 1 740 | | | | |

## 2　实验方法

### 2.1　水分、总灰分、水冷浸物、乙醇冷浸物的检测

水分、灰分、浸出物,样品处理及检测方法按照《中华人民共和国药典》[5]中相关方法进行检测。

### 2.2　含量测定

#### 2.2.1　色谱分析条件

色谱柱:XTERRA® MS-$C_{18}$(150 mm × 4.6 mm,3.5 μm)。流动相:0.2%醋酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱,0~5 min,95% A;5~10 min,95%→65% A;10~35 min,65%→55% A;35~50 min,55%→5% A;50~51 min,5%→95% A;51~60 min,95% A;流速 1 mL/min,进样量 10 μL,柱温为 35 ℃,检测波长:杯苋甾酮、前杯苋甾酮 243 nm,齐墩果酸 215 nm。色谱图见图 1。

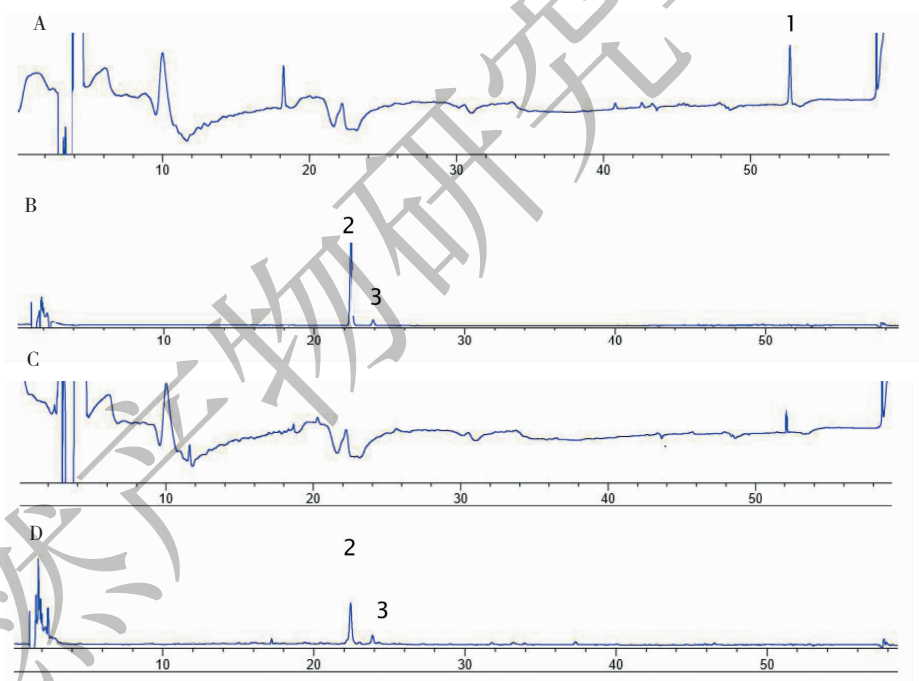


**图 1　对照品(A,B)和川牛膝供试品(C,D)的 HPLC 图**

Fig. 1　HPLC chromatograms of reference substance (A,B) and *C. officinalis* sample (C,D)

注:1. 齐墩果酸;2. 杯苋甾酮;3. 前杯苋甾酮。Note:1. Oleanolic acid;2. Cyasterone;3. Precyasteron.

#### 2.2.2　混合对照品溶液的制备

精密称取对照品齐墩果酸 3.21 mg、杯苋甾酮 2.11 mg、前杯苋甾酮 1.03 mg 置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;精密移取上述溶液,甲醇稀释,得齐墩果酸浓度为 321 μg/mL、杯苋甾酮浓度为 211 μg/mL、前杯苋甾酮浓度为 103 μg/mL 的对照品溶液母液。

#### 2.2.3　供试品溶液的制备

精密称取干燥川牛膝样品粉末(过 30 目筛)0.5 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇 25 mL,称定质量。于 25 ℃超声处理(功率 400 W,频率 40 kHz)60 min,冷却,用甲醇补足失重,摇匀,0.45 μm 微孔滤

天然产物研究与开发

膜滤过,取滤液即得。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 线性关系考察

将梯度浓度的混合对照品溶液按“2.2.1”项下色谱条件进样检测。以各对照品峰面积($Y$)为纵坐标,浓度($X$,μg/mL)为横坐标,做标准曲线,齐墩果酸的线性方程为 $Y=2.968X-0.255$,$r=0.999\ 1$;杯苋甾酮的线性方程为 $Y=14.04X-2.516$,$r=0.999\ 9$;前杯苋甾酮的线性方程为 $Y=11.721X+2.256$,$r=0.999\ 4$。结果表明,齐墩果酸在 0.49 ~ 19.6 μg/mL、杯苋甾酮在 1.45 ~ 72.5 μg/mL、前杯苋甾酮在 1.24 ~ 12.38 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.4.2 精密度试验

取同一混合对照品溶液按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录各成分的峰面积。结果齐墩果酸、杯苋甾酮、前杯苋甾酮面积 RSD 分别为 2.81%、1.28%、2.07%,表明仪器精密度良好。

2.2.4.3 重复性试验

取同一来源川牛膝样品,按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,分别进样,记录各成分的峰面积。结果齐墩果酸、杯苋甾酮、前杯苋甾酮面积 RSD 分别为 2.87%、1.40%、2.24%,表明本方法重现性良好。

2.2.4.4 稳定性试验

取同一供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样,记录各成分的峰面积。结果齐墩果酸、杯苋甾酮、前杯苋甾酮峰面积 RSD 分别为 2.11%、1.34%、1.99%,表明供试品溶液于 24 h 内测定结果稳定。

2.2.4.5 回收率试验

精密称取已知含量的同一来源川牛膝样品 6 份,每份 0.25 g,分别精密添加与样品中含量相当的齐墩果酸、杯苋甾酮、前杯苋甾酮对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样检测,计算得到齐墩果酸的平均加样回收率为 103.31%,RSD 为 2.73%;杯苋甾酮的平均加样回收率为 100.77%,RSD 为 1.75%;前杯苋甾酮的平均加样回收率为 102.63%,RSD 为 2.75%。结果表明本方法的回收率良好。

## 3 结果与分析

### 3.1 水分、总灰分、浸出物及乙醇冷浸物的检测

川牛膝样品中水分、总灰分、浸出物及乙醇冷浸物的检测结果见表 2。结果显示 54 批川牛膝样品的水分含量在 4.08% ~ 8.95% 之间,均低于 16.00%,符合药典规定;总灰分含量在 2.41% ~ 5.40% 之间,均低于 8.00%,符合药典规定;浸出物水冷浸含量在 66.13% ~ 81.82% 之间,均大于 65.00%,符合药典规定;浸出物乙醇冷浸含量在 7.91% ~ 23.94% 之间,药典没有控制。

表 2 川牛膝中水分、灰分、水浸出物和乙醇冷浸物测定结果($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

Table 2 The determination of moisture, ash, water extract, 95% ethanol extract in *C. officinalis* ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

| 编号 No. | 水分 Moisture(%) | 总灰分 Total ash(%) | 水冷浸 Water extract(%) | 乙醇冷浸物 95% ethnaol extract(%) |
|---|---|---|---|---|
| c-1 | 5.54 ± 0.85 | 4.1 ± 0.04 | 76.68 ± 1.47 | 18.42 ± 0.19 |
| c-2 | 5.02 ± 0.31 | 3.9 ± 0.06 | 69.54 ± 0.94 | 12.10 ± 0.05 |
| c-3 | 5.31 ± 0.31 | 3.72 ± 0.20 | 75.08 ± 1.86 | 19.23 ± 0.12 |
| c-4 | 4.76 ± 0.48 | 2.62 ± 0.09 | 72.99 ± 2.22 | 17.47 ± 0.64 |
| c-5 | 7.87 ± 0.92 | 3.5 ± 0.20 | 74.59 ± 1.29 | 15.03 ± 0.73 |
| c-6 | 4.08 ± 0.67 | 3.6 ± 0.73 | 76.38 ± 0.68 | 18.33 ± 0.10 |
| c-7 | 7.82 ± 0.31 | 3.3 ± 0.24 | 70.90 ± 1.60 | 11.94 ± 0.16 |
| c-8 | 7.74 ± 0.60 | 3.17 ± 0.11 | 68.26 ± 0.98 | 13.32 ± 0.02 |
| c-9 | 7.08 ± 0.77 | 3.01 ± 0.47 | 78.06 ± 2.03 | 22.25 ± 0.03 |
| c-10 | 6.95 ± 0.78 | 5.17 ± 0.01 | 74.40 ± 2.14 | 16.08 ± 1.43 |
| c-11 | 7.88 ± 0.40 | 4.78 ± 1.27 | 66.13 ± 1.75 | 11.28 ± 0.11 |
| c-12 | 7.46 ± 0.31 | 4.58 ± 0.09 | 71.45 ± 0.71 | 16.17 ± 0.00 |
| c-13 | 8.95 ± 0.69 | 5.11 ± 0.36 | 77.27 ± 0.67 | 17.31 ± 0.01 |
| c-14 | 6.86 ± 0.23 | 4.39 ± 0.40 | 76.87 ± 0.16 | 18.75 ± 0.05 |

天然产物研究与开发

续表 2(Continued Tab. 2)

| 编号 No. | 水分 Moisture(%) | 总灰分 Total ash(%) | 水冷浸 Water extract(%) | 乙醇冷浸物 95% ethnaol extract(%) |
|---|---|---|---|---|
| c-15 | 6.38 ±0.15 | 4.67 ±0.42 | 78.83 ±1.47 | 18.60 ±0.03 |
| c-16 | 8.40 ±0.38 | 4.58 ±0.23 | 80.10 ±2.66 | 16.53 ±1.20 |
| c-17 | 6.76 ±1.29 | 3.45 ±0.46 | 74.12 ±1.17 | 15.74 ±0.47 |
| c-18 | 6.86 ±1.37 | 2.41 ±0.26 | 79.55 ±1.56 | 21.18 ±1.34 |
| c-19 | 5.59 ±0.28 | 3.95 ±0.51 | 81.17 ±0.45 | 22.95 ±0.08 |
| c-20 | 8.05 ±0.54 | 4.39 ±0.32 | 68.7 ±2.88 | 11.41 ±0.56 |
| c-21 | 8.06 ±0.34 | 4.73 ±0.03 | 76.88 ±2.39 | 18.46 ±0.03 |
| c-22 | 6.19 ±0.85 | 4.77 ±0.52 | 75.00 ±1.02 | 19.23 ±1.48 |
| c-23 | 7.45 ±0.30 | 4.67 ±0.50 | 80.76 ±1.48 | 23.94 ±0.30 |
| c-24 | 7.77 ±1.43 | 4.67 ±0.04 | 71.38 ±1.08 | 15.55 ±0.37 |
| c-25 | 5.61 ±1.44 | 4.86 ±0.07 | 79.50 ±1.24 | 22.61 ±0.18 |
| c-26 | 5.88 ±0.21 | 4.58 ±0.69 | 77.27 ±0.50 | 16.91 ±0.83 |
| c-27 | 7.06 ±1.12 | 5.40 ±0.82 | 74.32 ±1.07 | 16.36 ±0.17 |
| c-28 | 7.47 ±1.25 | 4.13 ±0.26 | 78.32 ±1.66 | 20.14 ±0.25 |
| s-1 | 6.27 ±0.79 | 3.59 ±0.06 | 78.79 ±1.53 | 22.92 ±1.47 |
| s-2 | 5.79 ±0.43 | 5.06 ±0.07 | 74.83 ±2.56 | 17.17 ±0.30 |
| s-3 | 6.51 ±0.07 | 4.78 ±1.00 | 77.84 ±1.71 | 18.51 ±0.10 |
| s-4 | 6.74 ±1.12 | 4.54 ±0.82 | 67.52 ±2.88 | 7.19 ±1.10 |
| s-5 | 8.25 ±0.72 | 4.78 ±0.05 | 77.63 ±1.11 | 15.91 ±1.31 |
| s-6 | 7.21 ±1.42 | 4.39 ±0.28 | 77.92 ±1.93 | 16.37 ±0.20 |
| s-7 | 7.03 ±0.04 | 4.87 ±0.14 | 73.44 ±1.71 | 16.09 ±0.83 |
| s-8 | 5.57 ±0.11 | 4.87 ±0.45 | 68.72 ±1.88 | 10.65 ±0.40 |
| s-9 | 6.65 ±0.51 | 3.58 ±0.24 | 74.58 ±2.11 | 17.82 ±0.46 |
| s-10 | 6.28 ±0.38 | 5.11 ±0.50 | 77.27 ±2.93 | 15.05 ±0.11 |
| s-11 | 7.44 ±1.29 | 4.52 ±0.04 | 76.02 ±0.91 | 15.38 ±0.02 |
| s-12 | 8.12 ±0.92 | 4.87 ±0.54 | 81.82 ±1.06 | 21.35 ±0.21 |
| s-13 | 7.14 ±1.39 | 4.87 ±0.95 | 70.00 ±2.57 | 10.16 ±1.66 |
| s-14 | 8.75 ±0.42 | 3.58 ±0.82 | 76.18 ±1.10 | 15.38 ±2.87 |
| s-15 | 8.32 ±0.59 | 4.79 ±0.05 | 78.39 ±0.28 | 19.21 ±0.05 |
| s-16 | 7.19 ±1.59 | 5.09 ±0.21 | 69.16 ±1.65 | 15.41 ±0.19 |
| h-1 | 7.22 ±0.81 | 3.80 ±0.19 | 70.00 ±1.27 | 13.14 ±0.52 |
| h-2 | 5.75 ±0.78 | 4.92 ±0.35 | 79.18 ±0.45 | 19.71 ±0.48 |
| h-3 | 7.07 ±1.19 | 4.82 ±0.44 | 67.39 ±0.23 | 12.03 ±0.78 |
| h-4 | 5.88 ±0.82 | 4.78 ±0.35 | 69.16 ±1.04 | 14.18 ±0.64 |
| h-5 | 7.06 ±1.19 | 4.39 ±0.24 | 81.12 ±1.11 | 21.75 ±0.74 |
| h-6 | 7.03 ±0.92 | 4.41 ±0.24 | 72.55 ±0.23 | 18.97 ±0.72 |
| h-7 | 7.17 ±0.79 | 4.87 ±0.79 | 75.35 ±0.33 | 16.03 ±0.66 |
| h-8 | 8.06 ±1.19 | 3.58 ±0.72 | 76.66 ±0.40 | 18.80 ±0.53 |
| h-9 | 6.19 ±1.22 | 4.79 ±0.65 | 78.83 ±0.41 | 15.97 ±0.56 |
| zz-1 | 6.95 ±0.44 | 5.16 ±0.21 | 79.49 ±0.11 | 19.22 ±1.01 |
| 药典规定 Pharmacopeial regulations | ≤16.0 | ≤8.00 | ≥65.0 | 未控制 Uncontrolled |

天然产物研究与开发

### 3.2 含量测定

按“2.2.3”项下方法每个样品平行制备3份供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样检测，记录色谱图。根据线性方程分别齐墩果酸、杯苋甾酮与前杯苋甾酮的百分含量，结果见表3。

**表3 川牛膝中3种成分含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)**

Table 3 Determination results of 3 components in *C. officinalis* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 编号 No. | 齐墩果酸 Oleanolic acid(%) | 前杯苋甾酮 Precyasterone(%) | 杯苋甾酮 Cyasterone(%) | PCA得分排序 PCA score sort |
|---|---|---|---|---|
| c-1 | 0.009 ± 0.002 | 0.020 ± 0.002 | 0.221 ± 0.065 | 26 |
| c-2 | 0.044 ± 0.011 | 0.018 ± 0.010 | 0.172 ± 0.037 | 42 |
| c-3 | 0.011 ± 0.001 | 0.023 ± 0.003 | 0.221 ± 0.009 | 31 |
| c-4 | 0.004 ± 0.001 | 0.021 ± 0.011 | 0.212 ± 0.050 | 50 |
| c-5 | 0.006 ± 0.002 | 0.017 ± 0.008 | 0.174 ± 0.025 | 48 |
| c-6 | 0.009 ± 0.002 | 0.019 ± 0.002 | 0.220 ± 0.027 | 32 |
| c-7 | 0.041 ± 0.016 | 0.015 ± 0.002 | 0.151 ± 0.005 | 47 |
| c-8 | 0.039 ± 0.009 | 0.017 ± 0.009 | 0.173 ± 0.008 | 49 |
| c-9 | 0.005 ± 0.001 | 0.022 ± 0.002 | 0.239 ± 0.067 | 23 |
| c-10 | 0.025 ± 0.001 | 0.040 ± 0.0020 | 0.111 ± 0.051 | 36 |
| c-11 | 0.019 ± 0.013 | 0.038 ± 0.007 | 0.103 ± 0.029 | 54 |
| c-12 | 0.042 ± 0.001 | 0.019 ± 0.004 | 0.112 ± 0.006 | 34 |
| c-13 | 0.035 ± 0.003 | 0.021 ± 0.007 | 0.132 ± 0.088 | 17 |
| c-14 | 0.010 ± 0.003 | 0.053 ± 0.002 | 0.118 ± 0.040 | 43 |
| c-15 | 0.050 ± 0.005 | 0.055 ± 0.009 | 0.127 ± 0.062 | 14 |
| c-16 | 0.020 ± 0.001 | 0.046 ± 0.000 | 0.101 ± 0.015 | 35 |
| c-17 | 0.015 ± 0.002 | 0.011 ± 0.007 | 0.192 ± 0.068 | 44 |
| c-18 | 0.018 ± 0.001 | 0.026 ± 0.008 | 0.201 ± 0.071 | 27 |
| c-19 | 0.007 ± 0.027 | 0.015 ± 0.004 | 0.253 ± 0.072 | 7 |
| c-20 | 0.016 ± 0.001 | 0.012 ± 0.006 | 0.184 ± 0.022 | 52 |
| c-21 | 0.015 ± 0.002 | 0.018 ± 0.012 | 0.202 ± 0.044 | 19 |
| c-22 | 0.022 ± 0.000 | 0.025 ± 0.006 | 0.248 ± 0.022 | 10 |
| c-23 | 0.009 ± 0.001 | 0.024 ± 0.008 | 0.209 ± 0.011 | 6 |
| c-24 | 0.007 ± 0.001 | 0.018 ± 0.004 | 0.213 ± 0.009 | 37 |
| c-25 | 0.014 ± 0.001 | 0.025 ± 0.001 | 0.274 ± 0.007 | 4 |
| c-26 | 0.034 ± 0.025 | 0.033 ± 0.008 | 0.302 ± 0.041 | 5 |
| c-27 | 0.010 ± 0.001 | 0.025 ± 0.004 | 0.226 ± 0.022 | 25 |
| c-28 | 0.007 ± 0.003 | 0.019 ± 0.001 | 0.234 ± 0.005 | 16 |
| s-1 | 0.011 ± 0.001 | 0.015 ± 0.012 | 0.162 ± 0.012 | 22 |
| s-2 | 0.005 ± 0.014 | 0.021 ± 0.003 | 0.211 ± 0.042 | 30 |
| s-3 | 0.007 ± 0.005 | 0.019 ± 0.017 | 0.263 ± 0.013 | 12 |
| s-4 | 0.018 ± 0.013 | 0.014 ± 0.004 | 0.209 ± 0.025 | 53 |
| s-5 | 0.031 ± 0.001 | 0.021 ± 0.001 | 0.143 ± 0.007 | 24 |
| s-6 | 0.012 ± 0.003 | 0.019 ± 0.002 | 0.192 ± 0.005 | 29 |
| s-7 | 0.007 ± 0.003 | 0.019 ± 0.001 | 0.151 ± 0.030 | 40 |

天然产物研究与开发

续表 3(Continued Tab. 3)

| 编号 No. | 齐墩果酸 Oleanolic acid(%) | 前杯苋甾酮 Precyasterone(%) | 杯苋甾酮 Cyasterone(%) | PCA 得分排序 PCA score sort |
|---|---|---|---|---|
| s-8 | 0.01 ±0.003 | 0.017 ±0.008 | 0.198 ±0.113 | 51 |
| s-9 | 0.021 ±0.018 | 0.011 ±0.005 | 0.312 ±0.027 | 13 |
| s-10 | 0.027 ±0.001 | 0.011 ±0.003 | 0.184 ±0.031 | 15 |
| s-11 | 0.029 ±0.011 | 0.023 ±0.004 | 0.172 ±0.010 | 28 |
| s-12 | 0.005 ±0.010 | 0.027 ±0.001 | 0.223 ±0.043 | 8 |
| s-13 | 0.014 ±0.000 | 0.027 ±0.002 | 0.241 ±0.018 | 45 |
| s-14 | 0.011 ±0.020 | 0.015 ±0.003 | 0.170 ±0.045 | 41 |
| s-15 | 0.013 ±0.008 | 0.014 ±0.002 | 0.164 ±0.017 | 20 |
| s-16 | 0.035 ±0.003 | 0.022 ±0.002 | 0.181 ±0.005 | 33 |
| h-1 | 0.010 ±0.001 | 0.010 ±0.012 | 0.243 ±0.041 | 46 |
| h-2 | 0.046 ±0.001 | 0.012 ±0.003 | 0.287 ±0.023 | 2 |
| h-3 | 0.021 ±0.015 | 0.015 ±0.012 | 0.243 ±0.021 | 39 |
| h-4 | 0.011 ±0.013 | 0.014 ±0.004 | 0.232 ±0.007 | 38 |
| h-5 | 0.034 ±0.001 | 0.025 ±0.001 | 0.242 ±0.008 | 3 |
| h-6 | 0.026 ±0.001 | 0.023 ±0.006 | 0.221 ±0.031 | 21 |
| h-7 | 0.014 ±0.002 | 0.009 ±0.005 | 0.238 ±0.013 | 18 |
| h-8 | 0.034 ±0.002 | 0.019 ±0.003 | 0.242 ±0.027 | 11 |
| h-9 | 0.026 ±0.002 | 0.019 ±0.007 | 0.223 ±0.023 | 9 |
| zz-1 | 0.070 ±0.002 | 0.003 ±0.001 | 0.581 ±0.028 | 1 |
| 药典规定 Pharmacopeial regulations | 未控制 Uncontrolled | 未控制 Uncontrolled | ≥0.030% | |

由结果可知,川牛膝样品中杯苋甾酮含量在 0.10% ~0.58%之间,均符合药典要求。

## 3.3　化学模式识别

### 3.3.1　聚类分析

总灰分、水冷浸物、乙醇冷浸物及单个有效成分含量是评价川牛膝质量的重要指标。本研究以总灰分、水冷浸物、乙醇冷浸物、齐墩果酸、杯苋甾酮和前杯苋甾酮含量数据为变量,运用 SPSS 20.0 软件,以平方欧氏距离作为度量标准,对 54 批样品进行系统聚类分析,结果见图 2,54 批样品共被分为 2 大类。

### 3.3.2　主成分分析

运用 SPSS 20.0 软件,以川牛膝中齐墩果酸、杯苋甾酮、前杯苋甾酮、总灰分、水冷物、乙醇冷浸物的含量作为变量,以特征值和累计贡献率作为判定依据,对不同产地川牛膝进行主成分分析。根据降维结果,共挑选出 3 个主成分 PC1、PC2、PC3,特征值分别为 1.951、1.497、1.250。各成分方差贡献值分别为 32.511%、24.955%、20.840%,累积贡献值达到 78.306%,具有较强的代表性,可用来评价川牛膝的质量。

**表 4　因子载荷矩阵**

Table 4　Initial factor load matrix

| 化合物 Analyte | 成份 Principal component | | |
|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 |
| 齐墩果酸 Oleanolic acid | -0.035 | 0.395 | 0.666 |
| 前杯苋崽酮 Precyasterone | 0.105 | -0.794 | 0.438 |
| 杯苋甾酮 Cyasterone | 0.380 | 0.825 | 0.041 |
| 总灰分 Total ash | -0.090 | 0.071 | 0.774 |
| 水冷浸 Water extract | 0.939 | -0.112 | 0.101 |
| 乙醇冷浸物 95% ethnaol extract | 0.951 | -0.110 | -0.066 |

天然产物研究与开发

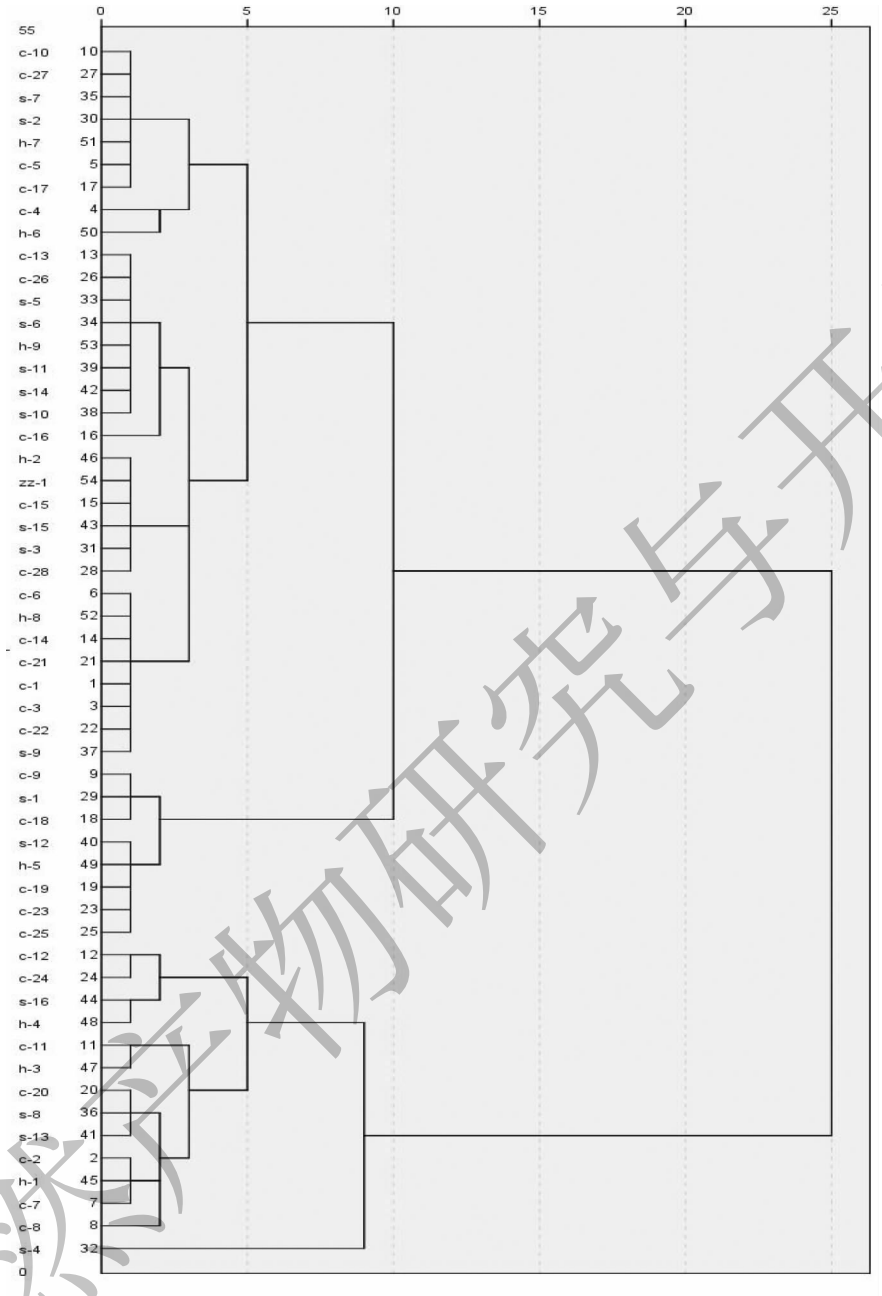


**图 2　川牛膝样品聚类分析**

Fig. 2　Cluster analysis of *C. officinalis*

根据各因子载荷矩阵及特征值计算得分系数，进一步得到 PC1、PC2、PC3 及综合得分（$Y$）方程式：

$$PC1 = -0.025ZX_1 + 0.075\ ZX_2 + 0.272\ ZX_3 - 0.065\ ZX_4 + 0.672\ ZX_5 + 0.681\ ZX_6$$

$$PC2 = 0.323\ ZX_1 - 0.649\ ZX_2 + 0.675\ ZX_3 + 0.058\ ZX_4 - 0.091\ ZX_5 - 0.090\ ZX_6$$

$$PC3 = 0.595\ ZX_1 + 0.392\ ZX_2 + 0.036\ ZX_3 + 0.692\ ZX_4 + 0.090\ ZX_5 - 0.059\ ZX_6$$

$$Y = 0.415\ PC1 + 0.319\ PC2 + 0.266\ PC3$$

式中：$ZX_1$、$ZX_2$、$ZX_3$、$ZX_4$、$ZX_5$、$ZX_6$ 分别为齐墩果酸、前杯苋甾酮、杯苋甾酮、总灰分、水冷浸物、乙醇冷浸物的标准化值。

利用上式计算各地川牛膝质量综合得分并按结果高低进行排序（表 3），得分越高，表明川牛膝质量越好，排名越靠前。同一地域样品排名有前有后，川牛膝质量与地域没有明显关系。此外，由表 4 及图

天然产物研究与开发

4 可知,PC1 主要反映了水冷浸物和乙醇冷浸物的信息,PC2 主要反映了杯苋甾酮的信息;PC3 主要反映了总灰分和齐墩果断的信息。

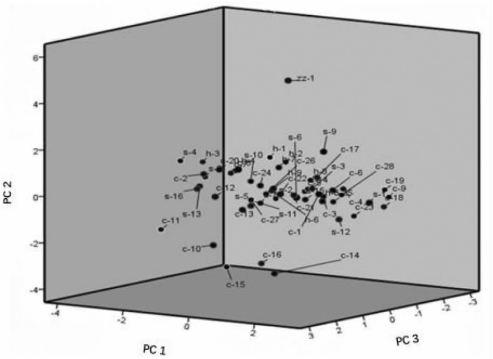


**图 3　主成分得分图**

Fig. 3　Scores plot from principal component analysis

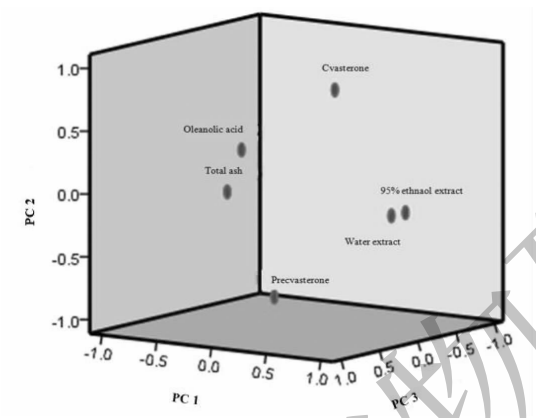


**图 4　主成分因子分析图**

Fig. 4　Loadings plots from principal component analysis

## 4　讨论

本研究建立了可同时检测齐墩果酸、杯苋甾酮、前杯苋甾酮,3 种成分的 HPLC 方法,方法学验证均符合药典中相关规定,表明该方法准确、可行。

本研究对全国各主要产地川牛膝的质量指标进行了较全面地考察。运用主成分分析方法和聚类分析法,分析总灰分、水冷浸物、乙醇冷浸物和齐墩果酸、杯苋甾酮、前杯苋甾酮含量指标数据,通过一系列算法重新组成新的互不相关的几个综合指标代替原来数据指标[6]。结果可将 54 批川牛膝样品分为 2 大类,提炼出 3 个主成分。2 大类主要体现是浸出物与有效成分含量指标。3 个主成分,第一主成分反应浸出物,体现多糖[7]对川牛膝质量的影响;第二主成分反应杯苋甾酮[8],体现有效成分对川牛膝质量的影响;第三主成分反应总灰分,体现盐类、金属氧化物含量等对川牛膝质量的影响。

重庆奉节县长安乡西曹村两个川牛膝伪品(麻牛膝),杯苋甾酮含量分别为 0.086% 和 0.077%,与正品川牛膝杯苋甾酮含量均值 0.207% 有显著差异。经过田间海拔实验,川牛膝在海拔 1 400 m 以下,发现杯苋甾酮含量明显降低。

川牛膝质量与地域没有明显关系,因为川牛膝种植区域集中在西南高海拔山区,生长气候条件类似。药农种植技术、田间管理水平、初加工技术是导致质量差异的主因,同一个加工点,不同批次,川牛膝质量也存在差异。下一步将开展种植技术、初加工技术对川牛膝质量影响的研究。

## 参考文献

1　Ma Y, Bi KS, Wang X, et al. Determination of cyasterone in medicinal *Cyathula*(*Cyathula officinalis*) root by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2000, 31: 427-428.

2　Zhang YG, Yang YQ, Li J, et al. Determination of oleanolic acid in *Cyathula officinalis* Kuan from different habitats [J]. J Guiyang Coll Tradit Chin Med (贵阳中医学院学报), 2010, 32(1): 20-21.

3　Geng QM, Jing CX, Wang X. Separation and determination of ferulic acid from *Cyathula officinalis* Kuan [J]. Chin J Inform Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志), 2000, 7(11): 49.

4　Liu XH, He KZ, Zhang JF, et al. Isolation, Purification and Monosaccharide Composeition of Polysaccharide from *Cyathula officinalis* Kuan [J]. Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报), 2003, 9: 141-145.

5　Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol Ⅳ (中华人民共和国药典:2015 年版第四部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.

6　Zhong WP, Luo Y, Chen YY, et al. Analysis of chemical composition differences of dendrobium based on two principal component analysis methods [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 2049-2055.

7　Peng HY. Determination to content of polyhexose in Radix Achyranthis Bidentatae by uitravolet spectromtry [J]. J China West Normal Univ: Nat Sci (西华师范大学学报:自科版), 2005, 2: 203-204.

8　Zhao XM, Xu GZ, Li JL, et al. General situation of modern pharmacological research from *Cyathula officinalis* Kuan and *Achyranthis bidentata* radix [J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志), 2004, 19: 205-207.

天然产物研究与开发