

基于 UPLC 指纹图谱和化学计量学对华山参及其混伪品的鉴别研究

吕振国^{1,2}, 武恬恬¹, 赵鹏¹, 欧阳慧子¹, 何俊^{1*}

1. 天津中医药大学 组分中药国家重点实验室, 天津 301617

2. 现代中医药海河实验室, 天津 301617

摘要: **目的** 建立华山参的 UPLC 指纹图谱, 鉴别其正品和混伪品。**方法** 建立华山参的 UPLC 指纹图谱, 对相似度进行分析, 采用聚类分析、主成分分析、偏最小二乘-判别分析法对共有峰进行分析。**结果** 建立的指纹图谱共标定出 15 个共有峰。华山参正品的相似度均在 0.867 以上, 混伪品的相似度均低于 0.555。30 批华山参样品聚为 3 类, 正品与伪品、主产地与非主产地华山参药材被显著区分, 并筛选出 4 个差异性成分。**结论** 建立的 UPLC 指纹图谱能有效鉴别华山参及其混伪品, 为华山参药材的质量评价和真伪鉴别提供参考。

关键词: 华山参; 混伪品; 鉴别; 指纹图谱; 相似度; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘-判别分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)09-2202-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.09.011

Identification of *Physochlainae Radix* and adulterants based on UPLC fingerprint and chemometrics

LÜ Zhen-guo^{1,2}, WU Tian-tian¹, ZHAO Peng¹, OUYANG Hui-zi¹, HE Jun¹

1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To establish an UPLC fingerprint of *Physochlainae Radix* to identify *Physochlainae Radix* and its adulterants. **Methods** UPLC fingerprint of *Physochlainae Radix* was established, the similarity was analyzed. The common peaks were analyzed by cluster analysis, principal component analysis, and partial least squares-discriminant analysis. **Results** A total of 15 characteristic peaks were calibrated in the established fingerprint. Similarities of *Physochlainae Radix* were all above 0.867, and the similarity of adulterants were all less than 0.555. Thirty batches of *Physochlainae Radix* samples were clustered into 3 categories. Superior and inferior products of *Physochlainae Radix*, as well as primary and non-primary producing areas, were significantly distinguished, and 4 quality difference markers were screened. **Conclusion** The established UPLC fingerprint can effectively identify *Physochlainae Radix* and its adulterants, providing reference for quality evaluation and identification of *Physochlainae Radix* medicinal materials.

Key words: *Physochlainae Radix*; adulterants; identification; fingerprint; similarity; cluster analysis; principal component analysis; partial least squares-discriminant analysis

华山参为茄科植物漏斗泡囊草 *Physochlaina infundibularis* Kuang 的干燥根, 因主产于西岳华山而得名, 除主产区陕西外, 山西、河南、广西等地亦有分布。华山参中化学成分种类丰富, 主要包括生物碱类、香豆素类、有机酸、挥发油类等成分^[1-4]。《中国药典》2020 版一部中记载华山参性温, 味甘、

微苦, 归肺、心经, 有毒, 具有温肺祛痰、平喘止咳、安神镇惊的功效, 临床上主要用于治疗心悸失眠易惊、寒痰咳嗽等^[5]。在实际用药中, 华山参出现了伪品、次品, 不同产地药材质量不一、硫熏药材导致质量下降等问题。因此, 建立全面合理的华山参药材质量评价方法来指导其临床应用非常重要。

收稿日期: 2023-07-02

基金项目: 现代中医药海河实验室科技项目 (22HHZYJC00005)

作者简介: 吕振国 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。E-mail: lvzhenguo1999@163.com

*通信作者: 何俊 (1981—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为药物分析。E-mail: hejun673@163.com

近年来, 华山参药材的质量评价研究主要集中在指标成分托品烷类生物碱的测定^[6-8]。中药指纹图谱运用现代分析技术, 能够系统、整体地表征中药的共有特征和内在特征, 具有良好的稳定性和重现性, 是评价中药材质量的重要途径^[9-10]。化学计量学提供了多种良好的算法, 能够从大量数据中提取有效信息, 对多个指标进行统计分析, 以实现鉴别药材间差异、评价中药质量的目的^[11-14]。基于此, 本研究建立华山参药材的 UPLC 指纹图谱, 并结合聚类分析和主成分分析等化学模式识别方法鉴别华山参及其混伪品, 为华山参药材的质量评价和真伪鉴别提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1290 超高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 超纯水制备仪 (Millipore 公司); 旋涡混合器 (赛默飞世尔科技公司); 高速控温离心机

(Eppendorf 公司); 超声波清洗机 (天津知著科技有限公司); 十万分之一天平 (波兰瑞德威公司)。

甲醇、乙腈 (色谱纯) 购自美国 Fisher 公司; 磷酸 (色谱纯) 购自美国 ROE 公司; 超纯水由 Milli-Q 超纯水仪制备。东莨菪碱 (批号 DST220614-163)、莨菪碱 (批号 DSTDL011501)、氢溴酸山莨菪碱 (批号 DST220721-478)、东莨菪内酯 (批号 DST190625-004)、托品酸 (批号 DSTDT023201)、东莨菪苷 (批号 DST220215-056)、法箬枝苷 (批号 DST230209-020) 对照品均购自成都德思特生物技术有限公司, 质量分数均大于 98.0%; S1~S28 样品经天津中医药大学李天祥教授鉴定为茄科植物漏斗泡囊草 *Physochlaina infundibularis* Kuang 的干燥根, S29、S30 样品经天津中医药大学李天祥教授鉴定为萝藦科鹅绒藤属植物戟叶牛皮消 *Cynanchum bungei* Decne. 的干燥块根。药材来源信息见表 1。

表 1 样品来源信息

Table 1 Source information of samples

编号	产地	批号	编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	陕西	20221028	S11	山西	20221121	S21	河南	20221026
S2	陕西	20221202	S12	山西	20221130	S22	河南	20221025
S3	陕西	20221124	S13	山西	20221201	S23	广西	20221212
S4	陕西	20221208	S14	山西	20221206	S24	广西	20221215
S5	陕西	20221210	S15	山西	20230215	S25	广西	20230220
S6	陕西	20221212	S16	山西	20230220	S26	广西	20230222
S7	陕西	20230202	S17	河南	20230218	S27	广西	20230223
S8	陕西	20230205	S18	河南	20221105	S28	广西	20230224
S9	陕西	20230208	S19	河南	20221118	S29	陕西	20221129
S10	陕西	20230210	S20	河南	20221205	S30	陕西	20230209

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Acquity UPLC CSH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。流动相: 0.05% 磷酸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱, 0~20 min, 5%~15% B; 检测波长: 200 nm; 体积流量: 0.3 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取东莨菪碱、氢溴酸山莨菪碱、莨菪碱、东莨菪苷、法箬枝苷、托品酸和东莨菪内酯对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇溶解, 制成质量浓度均为 1 mg/mL 的对照品溶液, 放置 4 °C 冰箱备用。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取华山参药材粗粉 (过三号筛) 400.0 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 超声 (300 W、40 kHz) 处理 1 h, 冷却, 补足减失质量, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取华山参粗粉 (编号 S1), 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 以 5 号莨菪碱色谱峰为参照峰 (S), 计算得各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 值分别小于 0.34%、2.41%。

2.4.2 重复性试验 取华山参粗粉 (编号 S1), 平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 以 5 号莨菪碱

色谱峰为参照峰 (S), 计算得各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.70%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 4.89%。

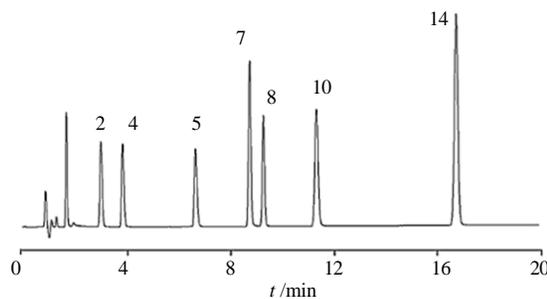
2.4.3 稳定性试验 取华山参粗粉 (编号 S1), 制备供试品溶液, 在 0、2、4、8、12、24 h 分别进样测定, 以 5 号莨菪碱色谱峰为参照峰 (S), 计算得各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.36%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 4.43%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 华山参 UPLC 指纹图谱的建立和相似度评价

取华山参粗粉 (S1~S28), 制备供试品溶液, 进样分析, 将色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (130723 版, 国家药典委员会, 2012), 以色谱图 S1 为参照图谱, 平均数法生成对照图谱, 采用多点校正 Mark 峰匹配, 建立 28 批华山参药材的叠加图谱和对照图谱 (R), 见图 1。共标定出 15 个共有峰, 通过与对照品的色谱图 (图 2) 比对, 指出 7 个成分, 分别为 2 号峰东莨菪碱、4 号峰山莨菪碱、5 号峰莨菪碱、7 号峰东莨菪苷、8 号峰法萜枝苷、10 号峰托品酸和 14 号峰东莨菪内酯。华山参药材的相似度分析结果见表 2, 其相似度均在 0.867 以上, 相似度较高, 说明 28 批华山参样品的化学成分一致性较高, 质量较为均一、稳定。

2.6 伪品华山参 UPLC 图谱分析

将华山参对照图谱及其混伪品 (S29、S30) 的色谱数据导入相似度评价软件, 建立正品及其混伪品的 UPLC 叠加图谱, 见图 3。正品华山参与其混伪品整体峰形具有较大差异, 计算其相似度为 0.531、0.555, 相似度低。可见混伪品与正品华山参化学轮廓整体差异明显, 所建立的该图谱可快速、直观地对其进行鉴别区分。



2-东莨菪碱 4-山莨菪碱 5-莨菪碱 7-东莨菪苷 8-法萜枝苷
10-托品酸 14-东莨菪内酯
2-scopolamine 4-anisodamine 5-hyoscyamine 7-scopolin 8-fabiatrin
10-tropic acid 14-scopoletin

图 2 混合对照品溶液色谱图

Fig. 2 Chromatogram of mixed reference solution

表 2 华山参样品相似度分析

Table 2 Similarity analysis of *Physochlainae Radix*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.916	S15	0.961
S2	0.885	S16	0.995
S3	0.991	S17	0.959
S4	0.983	S18	0.988
S5	0.914	S19	0.950
S6	0.991	S20	0.915
S7	0.931	S21	0.968
S8	0.990	S22	0.983
S9	0.987	S23	0.992
S10	0.975	S24	0.958
S11	0.980	S25	0.923
S12	0.976	S26	0.867
S13	0.985	S27	0.911
S14	0.984	S28	0.983

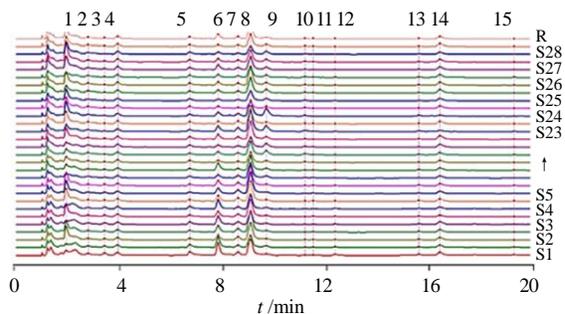


图 1 华山参的叠加图谱和对照图谱

Fig. 1 Overlay map and reference fingerprint of *Physochlainae Radix*

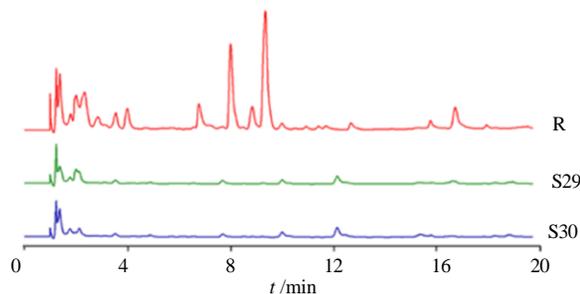


图 3 华山参对照图谱及其混伪品的叠加图谱

Fig. 3 Overlay map of *Physochlainae Radix* and adulterants

2.7 化学模式识别方法

2.7.1 聚类分析 (CA) 运用 SIMCA 14.1 软件, 以 30 批华山参样品 UPLC 指纹图谱中 15 个共有峰的峰面积与样品编号建立矩阵 (若该保留时间下无色谱峰, 则峰面积定为 0), 采用组间连接法, 以平方欧式距离为测度进行聚类分析, 结果见图 4。华山参样品可被明显聚为 3 类, S1~S10 陕西产华山参正品聚为第 1 类, S11~S28 山西、河南和广西省产华山参聚为第 2 类, S29、S30 陕西产伪品聚为第 3 类。聚类分析结果将主产地与非主产地、正品与伪品显著区分开来。

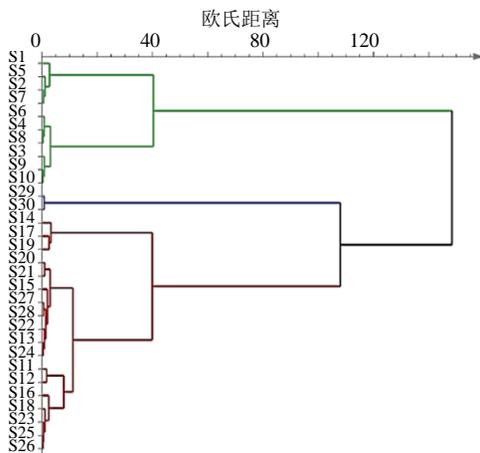


图 4 华山参药材聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis diagram of *Physoclainae Radix*

2.7.2 主成分分析 (PCA) 采用 SIMCA 14.1 软件, 以 30 批华山参样品 UPLC 指纹图谱中 15 个共有峰的峰面积为变量进行 PCA 分析, 模型拟合参数 R^2_X 为 0.876, 预测参数 Q^2 为 0.502, 以上参数均大于 0.5, 表明该模型具有较高的解释能力和预测性能。PCA 得分图见图 5, 可见华山参正品和混伪品呈现出明显的分类, 同时主产地与非主产地药材也被显著区分, 证实了聚类分析的结果。

2.7.3 偏最小二乘-判别分析 (PLS-DA) 将 15 个共有峰的峰面积导入 SIMCA 14.1 软件中, 建立 PLS-DA 模型, 模型得分图见图 6。根据得分图可知, 18 批华山参样品被分为 3 类, 与聚类分析结果一致。模型中 R^2_X 、 R^2_Y 、 Q^2 值分别为 0.812、0.920、0.832, 均接近于 1, 说明该模型具有较好的预测能力。在 PLS-DA 模型中, 对两个分类变量进行了 200 次置换检验, 结果见图 7, Q^2 点所在回归线与 y 轴交于 0 以下, 且左侧点的所有排列值均远低于右上方原始点的值, 表明该模型没有过拟合, 有效可靠。

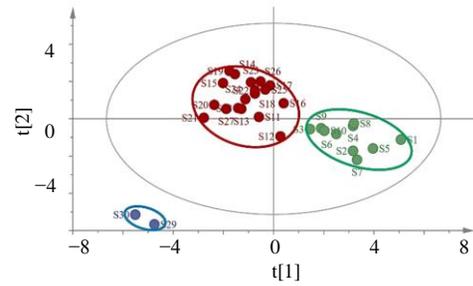


图 5 PCA 散点图

Fig. 5 PCA score plot

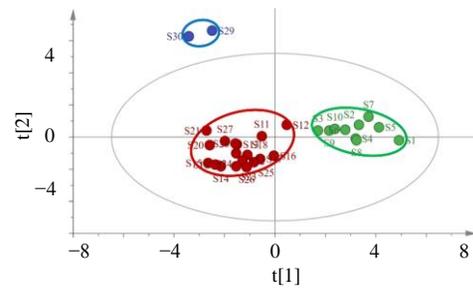


图 6 PLS-DA 散点图

Fig. 6 PLS-DA score plot

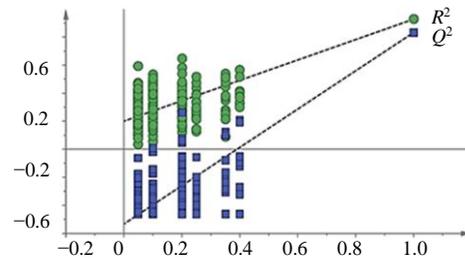


图 7 置换检验验证模型图

Fig. 7 Permutation test validation model diagram

为进一步筛选获得区分正品华山参及其混伪品的标志性成分, 实验选取了变量投影重要度 (VIP) 大于 1 的成分作为差异性成分。由图 8 可知, 4 个得分较高的变量按照 VIP 值大小依次为 4 号峰 (山茛菪碱)、15 号峰、3 号峰和 2 号峰 (东茛菪碱)。

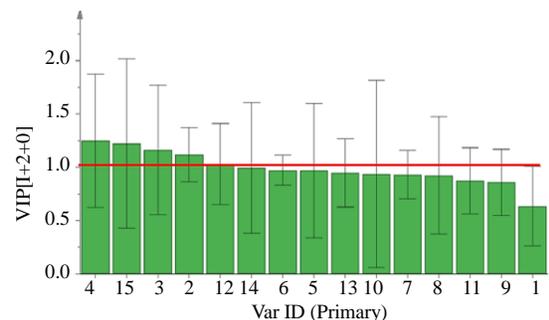


图 8 变量投影重要度 VIP 图

Fig. 8 variable importance in projection (VIP) plot

3 讨论

实验比较了不同流动相与添加剂(甲醇-0.1%甲酸水、甲醇-0.05%磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.05%磷酸水)、柱温(25、30、35℃)、体积流量(0.2、0.3、0.4 mL/min)和提取溶剂(30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、100%甲醇)下各色谱峰的峰数、峰响应和分离度。优化后的结果表明,在提取溶剂为 50%甲醇,乙腈-0.05%磷酸水为流动相,30℃柱温,0.3 mL/min 体积流量下所得色谱峰的分离效果较好、分离度高,且洗脱时间短。

建立的指纹图谱共标定出 15 个共有峰,通过与对照品溶液色谱图比对,共指出 7 个成分,分别为东莨菪碱、山莨菪碱、莨菪碱、东莨菪苷、法箬枝苷、托品酸和东莨菪内酯。相似度结果显示,正品华山参药材的相似度均大于 0.867,而混伪品的相似度在 0.555 以下,表明华山参混伪品与正品化学轮廓差异较大,构建的指纹图谱能够快速地区分正品和混伪品。为进一步增强方法的准确性,采用聚类分析(CA)和主成分分析(PCA)对共有峰进行分析,发现华山参正品和混伪品被显著聚类区分,S1~S10 陕西产华山参正品被聚为第 1 类,S11~S28 山西、河南和广西产正品华山参被聚为第 2 类,S29、S30 陕西产伪品被聚为第 3 类,正品与伪品、主产地与非主产地产华山参药材被显著区分。偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)进一步验证了上述结果。此外,根据变量投影重要度(VIP>1)筛选出 4 号峰(山莨菪碱)、15 号峰、3 号峰和 2 号峰(东莨菪碱)为批次间的差异性成分。

本研究将 UPLC 指纹图谱与化学计量学结合,对华山参药材掺伪行为进行鉴别,将华山参正品与混伪品快速区分。此策略较传统使用的中药材鉴别方法更全面、灵敏、客观,也可为其他存在真伪掺假、优劣混用问题的中药材鉴别提供思路和方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵森淼, 俞桂新, 王峥涛. 华山参化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 938-941.
- [2] 李松武, 庆伟霞, 王文领, 等. 华山参挥发油化学成分分析 [J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2005, 35(3): 34-36.
- [3] 娄永, 许睿珠, 张丽萍, 等. 华山参中 2 个新酰胺类化合物 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 331-334.
- [4] 王勇, 庆伟霞, 李松武, 等. 薄层扫描法测定华山参中总东莨菪内酯的含量 [J]. 中兽药, 2005, 3(5): 274-276.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 146-147.
- [6] 代雪平, 宋汉敏. 华山参中东莨菪苷的含量测定研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(5): 66-68.
- [7] 娄玉霞, 聂桂华, 李振国. 华山参中东莨菪内酯的含量测定方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(6): 1137-1139.
- [8] 李松武, 王勇, 姜芳婷, 等. 华山参中总东莨菪内酯的提取及其 HPLC 测定方法研究 [J]. 中药材, 2005, 28(8): 667-668.
- [9] 李宝辉, 李冬晖, 薛党党, 等. 中药益母草的化学指纹图谱及多组分定量分析方法的建立及应用研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(3): 336-340.
- [10] 赵娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1): 82-86.
- [11] 张倩倩, 卓雪群, 孙淑慧, 等. 基于指纹图谱结合化学计量学的独活寄生丸的质量评价研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(6): 1367-1373.
- [12] 严露, 蒲婧哲, 杨勇, 等. 基于指纹图谱联合化学计量学评价不同产地百蕊草质量的研究 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43(1): 141-152.
- [13] 李文静, 王艳萍, 刘荣宏, 等. 十枣汤 UPLC 指纹图谱化学计量学研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(4): 111-115.
- [14] 张艳欣, 吴佩颖, 王丹丹. 中药指纹图谱中常用的数理统计方法 [J]. 上海医药, 2019, 40(9): 74-77.

[责任编辑 解学星]