

UPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价不同产地草红藤质量

费文波^{1,2,3}, 辜新月^{1,2,3}, 陈玉梅^{1,2,3}, 钟磊^{1,2,3}, 冯健^{1,2,3}, 黄宇^{1,2,3}, 胡昌江^{1,2,3,4*}

1. 四川新绿色药业科技发展有限公司 中药配方颗粒质量与疗效评价重点实验室, 四川 成都 611930

2. 四川省中药配方颗粒工程技术研究中心, 四川 成都 611930

3. 四川省中药配方颗粒研制技术工程实验室, 四川 成都 611930

4. 成都中医药大学 药学院, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 建立草红藤的 UPLC 指纹图谱, 结合化学模式识别分析手段评价不同产地的草红藤药材质量差异。 **方法** 采用 UPLC 法建立草红藤药材指纹图谱, 进行相似度评价、系统聚类分析、主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)。 **结果** 20 批草红藤药材 UPLC 指纹图谱共确定 9 个共有峰, 指出 3 个色谱峰, 分别是二氢杨梅素、杨梅素和花旗松素, 相似度均大于 0.9。聚类分析和主成分分析将 20 批草红藤药材分为 3 类, 经 OPLS-DA 筛选出 3 个差异成分。 **结论** 建立的草红藤药材 UPLC 指纹图谱方法简便, 重现性良好, 同时结合化学模式识别分析, 可为草红藤的质量控制和品质提升提供参考。

关键词: 草红藤; 指纹图谱; 相似度; 系统聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法判别分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)02-0349-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.02.011

Quality evaluation of *Shuteria involucrata* var. *villosa* from different origins by UPLC fingerprinting combined with chemical pattern recognition

FEI Wenbo^{1,2,3}, GU Xinyue^{1,2,3}, CHEN Yumei^{1,2,3}, ZHONG Lei^{1,2,3}, FENG Jian^{1,2,3}, HUANG Yu^{1,2,3}, HU Changjiang^{1,2,3,4}

1. Key Laboratory of Quality Control and Efficacy Evaluation of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Sichuan Neo-Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Chengdu 611930, China

2. Sichuan Provincial Engineering Technology Research Center for Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Chengdu 611930, China

3. Sichuan Province Traditional Chinese Medicine Formula Granules Development Technology Engineering Laboratory, Chengdu 611930, China

4. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To establish an UPLC fingerprint spectrum of *Shuteria involucrata* (Wall.) Wight et Arn var. *villosa* (Pampan.) Ohashi, and evaluate the quality differences of *S. involucrata* var. *villosa* from different origins using chemical pattern recognition analysis methods. **Methods** UPLC method was used to establish the fingerprint of *S. involucrata* var. *villosa* and the fingerprint data was analyzed by similarity evaluation, systematic clustering analysis, PCA, and OPLS-DA. **Results** A total of 9 common peaks were marked in the UPLC fingerprint spectra of 20 batches of *S. involucrata* var. *villosa*, and 3 chromatographic peaks were identified, namely dihydromyricetin, myricetin, and taxifolin. The similarity was greater than 0.9. According to cluster analysis and principal component analysis, the 20 batches of samples were divided into three groups. And three differentially expressed components were screened using OPLS-DA. **Conclusion** The established UPLC fingerprint method is simple and has good reproducibility, and combined with chemical pattern recognition analysis, which can provide reference for the quality control of *S. involucrata* var. *villosa*. **Key words:** *Shuteria involucrata* (Wall.) Wight et Arn var. *villosa* (Pampan.) Ohashi; fingerprint spectrum; similarity; systematic clustering analysis; PCA; OPLS-DA

收稿日期: 2024-10-25

作者简介: 费文波 (1992—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为中药及中药配方颗粒质量标准。E-mail: 979014036@qq.com

*通信作者: 胡昌江 (1952—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药炮制原理及饮片质量标准。E-mail: 654460129@qq.com

草红藤为豆科宿苞豆属植物毛宿苞豆 *Shuteria involucrata* (Wall.) Wight et Arn var. *villosa* (Pampan.) Ohashi 的干燥全草^[1-2], 以全草入药, 为地方习用药材, 主要在四川地区使用, 具有清热解毒、消肿的功效, 主治阑尾炎、乳腺炎、腮腺炎、肺结核咯血等, 其所含化学成分主要为黄酮类^[3-4]。《中国药典》1977 年版曾收录草红藤的药材标准, 但仅有性状描述^[5]。另外《四川省中药材标准》2010 版收载的草红藤药材标准中, 在性状描述的基础上增加了薄层色谱、显微、水分、灰分以及浸出物的质量控制指标^[6]。中药指纹图谱是基于中药化学成分系统研究基础上建立起来的一种分析方法, 可直观地从整体上反映中药中复杂成分的特征性, 并提供相似性分析, 进而开展其质量评价^[7]。化学模式识别可对指纹图谱的数据信息进行多维分析, 通过数据降维对差异成分进行识别和筛选^[8]。为进一步对草红藤药材的质量进行综合评价, 更好地合理开发和利用草红藤药材资源, 本研究采用 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价不同产地的草红藤药材质量差异, 为草红藤药材的质量控制提供参考。

1 仪器与材料

H-class 型超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), AP224W 型电子天平、XBR36 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司), 2700TH 型数控超声波清洗器 (上海安谱实验科技股份有限公司), Comfort 1 型超纯水系统 (德国赛多利斯公司)。

杨梅素 (批号 529-44-2, 质量分数 98.5%)、二氢杨梅素 (批号 27200-12-0, 质量分数 98.8%) 对照品均购自广州佳途科技股份有限公司, 花旗松素 (批号 111816-201102, 质量分数 98.9%) 对照品购自中国食品药品检定研究院。甲醇、磷酸为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。20 批草红藤药材样品分别收集于四川省各地, 信息见表 1。经成都中医药大学胡昌江教授鉴定为豆科宿苞豆属植物有毛宿苞豆 *Shuteria involucrata* (Wall.) Wight et Arn var. *villosa* (Pampan.) Ohashi 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为甲醇 (A) - 0.1% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 20% A; 10~20 min, 20%→25% A; 20~30 min, 25%→30% A; 30~40 min, 30%→43% A; 40~45 min, 43%→65% A; 45~50 min,

表 1 草红藤药材产地信息

Table 1 Information of *Shuteria involucrata* var. *villosa*

编号	产地	编号	产地
S1	四川省绵阳市平武县	S11	四川省成都市彭州市
S2	四川省宜宾市长宁县	S12	四川省乐山市马边县
S3	四川省广元市剑阁县	S13	四川省广元市剑阁县
S4	四川省乐山市马边县	S14	四川省广元市剑阁县
S5	四川省绵阳市安州区	S15	四川省广元市剑阁县
S6	四川省泸州市古蔺县	S16	四川省德阳市什邡市
S7	四川省绵阳市江油市	S17	四川省德阳市什邡市
S8	四川省绵阳市江油市	S18	四川省德阳市什邡市
S9	四川省绵阳市江油市	S19	四川省泸州市古蔺县
S10	四川省成都市彭州市	S20	四川省绵阳市平武县

65%→80% A; 50~55 min, 80%→20% A; 55~60 min, 20% A); 检测波长为 230 nm; 体积流量为 0.3 mL/min; 柱温为 30 ℃; 进样量为 1 μL。

2.2 供试品溶液的制备

取草红藤药材粉末适量, 取约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 300 W、频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

取二氢杨梅素、杨梅素、花旗松素对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成质量浓度为 600、100、50 μg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验 取草红藤药材 (编号 S20) 供试品溶液, 连续进样 6 次, 以 1 号峰二氢杨梅素色谱峰为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值范围分别为 0.01%~0.18%、0.31%~1.50%。

2.4.2 重复性试验 取草红藤药材 (编号 S20) 样品 6 份, 精密称定, 制备供试品溶液, 测定, 以 1 号峰二氢杨梅素色谱峰为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值范围分别为 0.05%~0.21%、0.26%~1.55%。

2.4.3 稳定性试验 取草红藤药材 (编号 S20) 供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 以 1 号峰二氢杨梅素色谱峰为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值范围分别为 0.03%~0.15%、0.38%~1.68%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 指纹图谱的建立和相似度评价 取 20 批草红藤药材样品，制备供试品溶液，进样测定，得 UPLC 指纹图谱。将 20 批草红藤药材的 UPLC 指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，以 S1 样品的色谱图为参照图谱，时间窗宽度设置为 0.1 min，采用平均数法进行多点校正并进行色谱峰匹配，生成草红藤药材叠加图谱和混合对照品溶液色谱图见图 1，相似度评价结果见表 2。20 批草红藤药材共确定 9 个共有峰，并指认了 3 个成分，分别是峰 1 为二氢杨梅素，峰 4 为花旗松素，峰 7 为杨梅素；20 批草红藤样品的相似度均大于 0.9，表明建立的草红藤指纹图谱可反映其指纹特征，可用来比较不同产地间的草红藤。

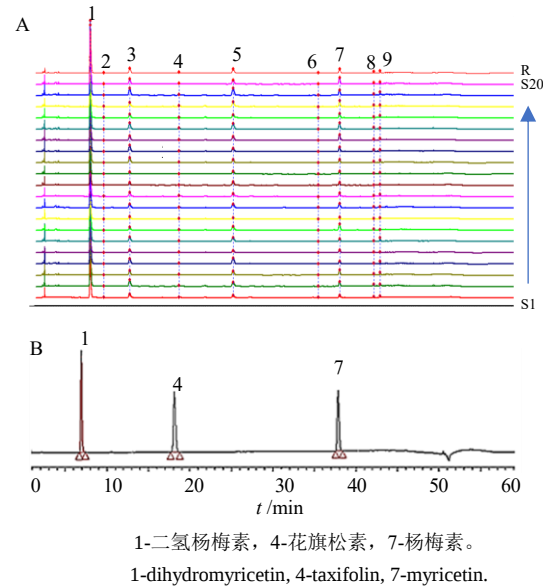


图 1 草红藤指纹图谱叠加图 (A) 和混合对照品溶液色谱图 (B)
Fig. 1 Fingerprint overlay of *S. involucrate* var. *villosa* (A) and mixed reference substances chromatograms (B)

表 2 草红藤的指纹图谱相似度

Table 2 Similarity in spectra of *S. involucrate* var. *villosa*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.999	S8	0.989	S15	0.997
S2	0.996	S9	0.999	S16	0.997
S3	0.996	S10	0.991	S17	0.993
S4	0.997	S11	0.991	S18	0.997
S5	0.997	S12	0.995	S19	0.998
S6	0.984	S13	0.994	S20	0.998
S7	0.998	S14	0.996		

2.5 聚类分析
将 20 批草红藤药材的 9 个共有峰的峰面积导入 SPSS27.0 软件，选择组间联接，平方欧氏距离法进行聚类分析，结果见图 2。当平方欧氏距离为 10 时，草红藤药材可聚为 3 类，其中 S1、S5、S20 聚为 1 类，产地均为四川绵阳，S2、S4、S12 聚为 1 类，产地为四川宜宾和四川乐山，其他聚为 1 类。

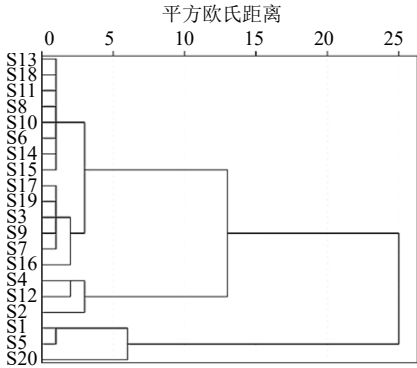


图 2 草红藤药材系统聚类分析图
Fig. 2 System cluster analysis diagram of *S. involucrate* var. *villosa*

2.6 主成分分析 (PCA)
主成分分析是利用降维思想把多指标转化为少数综合指标，使每个主成分能够反映原始变量的大部分信息，且所含信息互不重复^[9]。将草红藤药材 9 个共有峰的峰面积导入 SPSS 27.0 软件进行主成分分析，通过标准化处理后计算主成分特征值和方差贡献率，结果见表 3。设定主成分特征值>1 为提取标准，提取得到 2 个主成分，其累计贡献率为 77.577%，说明提取的 2 个主成分基本可以代表 9 个共有峰的基本特征值和主要信息。再由旋转后成分载荷矩阵表 (表 4) 可知，主成分 1 信息来自峰 1~6、8，主成分 2 信息来自峰 7、9，引起草红藤质量差异的原因可能是多成分协同作用的结果。

为进一步比较 20 批草红藤药材的质量优劣，以提取的 2 个主成分建立草红藤质量评价模型，根据 2 个主成分特征值所占累加特征值比率为权重，结合每批草红藤药材的 2 个主成分因子得分，计算每批草红藤药材的综合得分 (F) 并排序，结果见表 5。综合得分反映不同批次草红藤药材指纹图谱主成分的得分大小，间接说明不同批次药材的质量优劣^[10]。根据排序，S1、S20、S5 排名前 3，说明其质量最优，S2、S4、S12 排序在最后，相对来说质量较差。此结果与系统聚类分析结果一致。

表 3 草红藤主成分特征值和方差贡献率
Table 3 Eigenvalue and cumulative contribution

成分	初始特征值/%			提取载荷平方和/%			旋转载荷平方和/%		
	总计	方差贡献率	累积方差贡献率	总计	方差贡献率	累积方差贡献率	总计	方差贡献率	累积方差贡献率
1	5.277	58.631	58.631	5.277	58.631	58.631	5.068	56.315	56.315
2	1.705	18.946	77.577	1.705	18.946	77.577	1.914	21.262	77.577
3	0.791	8.793	86.370						
4	0.541	6.015	92.385						
5	0.272	3.022	95.407						
6	0.210	2.336	97.743						
7	0.137	1.522	99.265						
8	0.060	0.670	99.934						
9	0.006	0.066	100.000						

表 4 旋转后成分载荷矩阵
Table 4 Component load matrix after rotation

峰号	主成分 1	主成分 2	峰号	主成分 1	主成分 2
1	0.960	0.177	6	0.822	-0.354
2	0.812	0.336	7	0.052	0.653
3	0.975	0.093	8	0.606	0.577
4	0.895	0.303	9	0.004	-0.883
5	0.831	-0.068			

结合其具体产地，分析其可能的原因为产地、生长环境不同导致。S1、S20、S5 的产地为四川绵阳，地处四川北部，S2、S4、S12 的产地为四川乐山和四川宜宾，处于四川南边。但根据相似度评价结果，各批次样品的相似度均大于 0.9，说明四川不同产地的草红藤药材的质量差异不显著，均可作为草红藤的药材利用资源。

2.7 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

为进一步找出对草红藤药材差异贡献较大的成分，将 9 个峰的峰面积导入 SIMCA14.0 软件进行正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)。提取前 3 个主成分，其中自变量 X 模型解释率 R^2_X 为 0.827，因变量 Y 稳定性参数 R^2_Y 为 0.819，模型预测能力参数 Q^2 为 0.516，均大于 0.5，说明所建模型较可靠，具有较强的解释率和预测能力。设置分类 Y 矩阵变量随机排列 200 次做置换检验，见图 3， R^2 拟合直线在 Y 坐标轴的截距为 0.27，小于 0.3，说明所建模型可靠； Q^2 拟合直线在 Y 坐标轴的截距为 -0.582，小于 0.05，说明所建模型不存在过度拟合现象，能有效判别不同批次草红藤药材的指纹图谱差异^[11]。

表 5 草红藤药材的主成分因子得分和综合得分排序
Table 5 Ranking of principal component factor scores and comprehensive scores of *S. involucrate* var. *villosa*

批号	主成分 1	主成分 2	综合得分 F	排序
S1	1.384	-0.900	0.758	3
S2	-2.021	0.255	-1.397	20
S3	-0.009	1.719	0.465	5
S4	-1.357	0.196	-0.931	18
S5	1.726	-1.082	0.957	2
S6	0.209	-2.048	-0.409	14
S7	0.037	1.205	0.357	7
S8	-0.177	-0.386	-0.235	13
S9	0.454	-0.502	0.192	8
S10	-0.090	0.209	-0.008	10
S11	-0.561	-0.650	-0.585	16
S12	-1.022	-0.697	-0.933	19
S13	-0.183	-0.333	-0.224	12
S14	-0.466	-1.163	-0.657	17
S15	0.135	-0.460	-0.028	11
S16	0.664	0.291	0.562	4
S17	0.006	1.361	0.377	6
S18	-0.864	0.582	-0.468	15
S19	-0.115	0.951	0.177	9
S20	2.249	1.451	2.031	1

变量重要性投影值 (VIP) 是筛选差异化合物的重要指标，VIP 值越高，说明该成分对批间差异的影响越大，当 VIP 值大于 1.0 则说明该变量对整体模型的贡献度高于平均水平，可作为差异成分^[12]。因此进一步生成变量重要性投影值图，见图 4。VIP

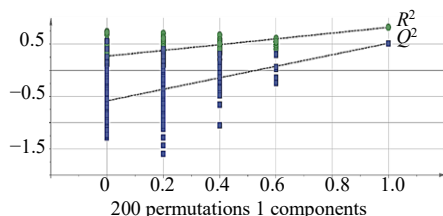


图 3 OPLS-DA 模型置换检验图

Fig. 3 OPLS-DA model permutation test chart

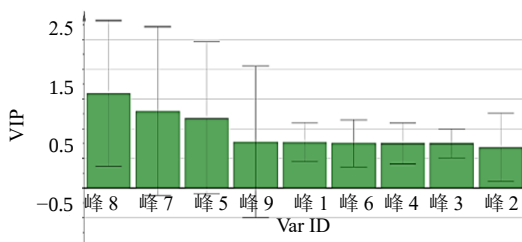


图 4 OPLS-DA 模型 VIP 图

Fig. 4 OPLS-DA model VIP diagram

值大于 1.0 的成分共有 3 个, 分别为峰 8、7、5, 说明这 3 个成分为差异成分, 其中峰 7 经指认为杨梅素, 说明此 3 个成分是造成不同产地的草红藤质量差异的主要成分。而指认的峰 1 (二氢杨梅素)、峰 4 (花旗松素) 的 VIP 值小于 1.0, 说明这 2 个成分对不同产地的草红藤质量差异贡献度较小, 但是根据草红藤药材指纹图谱可知, 峰 1 (二氢杨梅素) 为草红藤药材中含量最高的成分, 也应关注其对草红藤药材质量的影响。

3 讨论

本研究对供试品的提取溶剂、提取时间、提取方式进行了考察。根据色谱峰信息较多为原则最终采用甲醇超声提取 30 min。还对检测波长进行了筛选, 结果在检测波长为 230 nm 时, 色谱峰信息较丰富, 故选择 230 nm 为检测波长。另外还对流动相甲醇-0.1%磷酸、甲醇-0.1%乙酸、甲醇-0.1%甲酸、甲醇-水行了考察, 结果表明, 以甲醇-0.1%磷酸溶液进行洗脱时, 各色谱峰的分离度和峰形较好, 故选择甲醇-0.1%磷酸溶液为流动性。

本研究通过建立 20 批草红藤药材的 UPLC 指纹图谱, 并通过相似度评价不同批次的相似性, 结果显示 20 批样品相似度均大于 0.9, 相似度较高。

通过对照品指认, 指认出 3 个成分, 分别为二氢杨梅素、花旗松素和杨梅素。在进行化学模式识别分析过程中, 系统聚类分析结果显示可将 20 批草红藤药材分为 3 类, 且聚类结果与主成分分析的结果一致。利用 OPLS-DA 进行建模分析, 根据 VIP 值找出了对草红藤药材质量差异影响较大的 3 个成分, 其中一个成分经指认为杨梅素, 另外两个成分还有待进一步指认研究。

本实验建立的草红藤药材 UPLC 指纹图谱方法简便, 重现性良好, 同时结合化学模式识别分析, 为草红藤的药用资源开发和质量控制提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第 41 卷. 北京: 科学出版社, 1995: 243-247
- [2] 艾铁民. 中国药用植物志 [M]. 第 5 卷. 北京: 北京大学医学出版社, 2016: 486-487.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 上册. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [4] 曹延怀, 黄远征, 丁立生. 草红藤中的黄酮成分 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5): 290-291.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 1977.
- [6] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2010.
- [7] 张红娟, 史银基, 罗玉琴, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多指标定量结合熵权 TOPSIS 法评价不同产地白屈菜药材质量 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4194-4203.
- [8] 阮俊翔, 苏志恒, 梁永红, 等. 基于偏最小二乘判别分析法识别陈皮醋制前后化学成分的变化 [J]. 中药材, 2016, 39(1): 70.
- [9] 曲彤, 王小彤, 李宁, 等. 藤络宁胶囊指纹图谱的建立及化学模式识别研究 [J]. 中国药师, 2022, 25(10): 1735-1739.
- [10] 项锋, 叶继锋, 侯齐书. 基于 PCA 和 PLS-DA 算法的不同生长阶段贯叶金丝桃药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(3): 568-576.
- [11] 陈鑫凤, 张学兰, 张艳雪, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析黄精煎制前后化学成分差异 [J]. 中药材, 2022, 45(7): 1595-1600.
- [12] 黄美仙, 闵建国, 周艳林, 等. 大叶紫珠 HPLC 指纹图谱及含量测定研究 [J]. 中药材, 2023, 46(12): 3044-3048.

【责任编辑 解学星】